



UADY

POSGRADO
INSTITUCIONAL
EN CIENCIAS
QUÍMICAS Y
BIOQUÍMICAS

**ESTUDIO ANTITROMBÓTICO E IDENTIFICACIÓN
DE METABOLITOS DE EXTRACTOS DE HOJAS DE
CHAYA (*Cnidoscolus aconitifolius*)**

TESIS

PRESENTADA POR

I.Q.I. JUAN PABLO QUINTAL MARTÍNEZ

EN OPCIÓN AL GRADO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS
QUÍMICAS Y BIOQUÍMICAS**

MÉRIDA, YUCATÁN, MÉXICO

2019



UADY

POSGRADO
INSTITUCIONAL
EN CIENCIAS
QUÍMICAS Y
BIOQUÍMICAS

**ESTUDIO ANTITROMBÓTICO E IDENTIFICACIÓN
DE METABOLITOS DE EXTRACTOS DE HOJAS DE
CHAYA (*Cnidoscolus aconitifolius*)**

TESIS

PRESENTADA POR

I.Q.I. JUAN PABLO QUINTAL MARTÍNEZ

EN OPCIÓN AL GRADO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS
QUÍMICAS Y BIOQUÍMICA**

MÉRIDA, YUCATÁN, MÉXICO

2019



UADY


POSGRADO
INSTITUCIONAL
EN CIENCIAS
QUÍMICAS Y
BIOQUÍMICAS

Oficio Num.: PICQB/127/2019

Asunto: Autorización de digitalización

La tesis "Estudio antitrombótico e identificación de metabolitos de extractos de hojas de chaya (*Cnidosculus aconitifolius*)" presentada por el I.Q.I Juan Pablo Quintal Martínez, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar por el grado de Maestro en Ciencias Químicas y Bioquímicas, ha sido aprobada en cuanto a su contenido científico y en cuanto a lo establecido en el Manual de Procedimientos del Posgrado Institucional en Ciencias Químicas y Bioquímicas, por lo que se le autoriza la digitalización de los ejemplares correspondientes.

Directora de la tesis


Dra. Maira Rubi Segura Campos


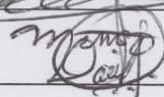
Sinodales

Dra. Mónica Noel Sánchez González

Dr. David Muñoz Rodríguez

Dra. Zhelmy del Rocío Martín Quintal

Firmas



ATENTAMENTE
"LUZ, CIENCIA Y VERDAD"


DRA. MAIRA RUBI SEGURA CAMPOS
COORDINADORA DEL POSGRADO INSTITUCIONAL
EN CIENCIAS QUÍMICAS Y BIOQUÍMICAS

c.c. Archivo
MRSC



POSGRADO INSTITUCIONAL
EN CIENCIAS QUÍMICAS
Y BIOQUÍMICAS

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Maira Rubí Segura Campos, por motivarme y guiarme a lo largo de mi preparación como futuro investigador. Por sus conocimientos y el apoyo que me ha brindado.

A la Química Ligia Gabriela Alonzo Salomón y a la Maestra en Ciencias Irma Guadalupe Quintal Ortiz, por brindarme su valioso conocimiento en el área de la hematología para que pueda realizar las metodologías empleadas en este trabajo. Por sus consejos y paciencia conmigo.

Al Doctor David Muñoz Rodríguez por sus consejos y por haberme ayudado en la identificación de los metabolitos presentes en los extractos de chaya.

A los Doctores, Zhelmy del Rocío Martín Quintal, Mónica Noel Sánchez y David Muñoz Rodríguez, por las observaciones hechas en la realización del documento de este trabajo.

A mis amigos William Rubio, Lilibeth Manzanilla, Nidia Quintal, Anaí León, Edwin Martínez, Jonatan Uuh, Ulil Us, Roberto Laviada e Ivan Chan, por sus consejos y críticas constructivas hechas en las reuniones de trabajo. Por su amistad y por todo el apoyo que recibí de ustedes.

A todos mis amigos de la generación PICQB 2017-2019, por su amistad.

A mis padres y hermanos, por el apoyo y amor que me han brindado.

Por último, a una persona muy valiosa en mi vida, a mi novia Asunción de Jesús Molina Martín. Por todo el amor, cariño y entendimiento que me ha brindado. Por su apoyo incondicional.

Este trabajo fue realizado en los Laboratorios de Ciencia de Alimentos, Ingeniería Química, Tecnología de Alimentos y Análisis Instrumental, de la Facultad de Ingeniería Química, así como en el Laboratorio de Hematología del Centro de Investigaciones Regionales Dr. Hideyo Noguchi, todos de la Universidad Autónoma de Yucatán, bajo la dirección de la Dra. Maira Rubí Segura Campos, con el apoyo de la beca concedida por CONACYT 632866

RESUMEN DEL TRABAJO

En el 2017, las enfermedades cardiovasculares fueron la principal causa de muerte en México, caracterizándose por la formación de trombos que pueden ocluir los vasos sanguíneos. En la terapia antitrombótica, la aspirina y la heparina, previenen la formación de trombos, mientras la estreptoquinasa disuelve los formados. Sin embargo, dichos fármacos han reportado diversos efectos secundarios. Así, las fuentes vegetales son opción al tratamiento farmacológico debido a sus menores efectos secundarios. La chaya (*Cnidoscolus aconitifolius*), empleada para mejorar la circulación sanguínea, posee metabolitos antitrombóticos pertenecientes a los flavonoides, saponinas y triterpenos. Sin embargo, se requiere evidencia que compruebe su actividad frente a este padecimiento. En este estudio se evaluó la actividad antitrombótica *in vitro* y se identificaron los metabolitos mayoritarios de extractos de chaya. Las hojas se secaron, molieron y maceraron, obteniendo los extractos acuoso (Ac), etanólico (EtOH), acetónico (An), acetato etílico (AcOEt), éter dietílico (Et₂O) y hexánico (Hx). Los extractos fueron evaluados a 0.1, 1.0 y 10.0 mg/mL mediante los ensayos inhibición de la agregación plaquetaria (IAP), inhibición de la fosfolipasa A₂ (IFA₂), tiempo de protrombina (TP), tiempo de tromboplastina parcialmente activada (TTPA) y lisis del coágulo (LC). Se empleó cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) para identificar los metabolitos mayoritarios en los extractos con mayor actividad antitrombótica. En la prueba IAP, los extractos Ac y EtOH a 10 mg/mL presentaron 100% de inhibición. En la prueba IFA₂, los extractos con mayor efecto fueron el EtOH, Et₂O y Ac a 10 mg/mL. En los ensayos TP y TTPA los extractos Ac y An a 10 mg/mL, presentaron el mayor efecto anticoagulante y en la LC, los extractos con mayor actividad fueron el AcOEt, An y Hx a 10 mg/mL. Los extractos Ac y ETOH presentaron mayor potencial antitrombótico y por su naturaleza química, únicamente el EtOH fue analizado por GC-MS. Dicho extracto reportó poseer vitamina E, diversos ácidos grasos y triterpenos. En conclusión, el extracto etanólico de chaya presentó mayor actividad antiagregante que el control positivo y todos los extractos demostraron moderada actividad inhibitoria de la fosfolipasa A₂, anticoagulante y fibrinolítica en comparación con los controles positivos.

ABSTRACT

In 2017, cardiovascular diseases were the leading cause of death in Mexico, characterized by the formation of thrombi that can occlude blood vessels. In antithrombotic therapy, aspirin and heparin, prevent thrombus formation, while streptokinase dissolves the formed ones. However, these drugs have reported various side effects. Thus, plant sources are an option to drug treatment due to its lower side effects. Chaya (*Cnidoscolus aconitifolius*), used to improve blood circulation, has antithrombotic metabolites belonging to flavonoids, saponins and triterpenes. However, evidence is required to prove your activity against this condition. In this study the antithrombotic activity was evaluated in vitro and the major metabolites of chaya extracts were identified. The leaves were dried, ground and macerated, obtaining the aqueous (Ac), ethanolic (EtOH), acetonic (An), ethyl acetate (AcOEt), diethyl ether (Et₂O) and hexane (Hx) extracts. The extracts were evaluated at 0.1, 1.0 and 10.0 mg/mL by the tests inhibition of platelet aggregation (IAP), inhibition of phospholipase A₂ (IFA₂), prothrombin time (TP), partially activated thromboplastin time (TTPA) and clot lysis (LC). Gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) was used to identify major metabolites in extracts with greater antithrombotic activity. In the IAP test, the Ac and EtOH extracts at 10 mg/mL had 100% inhibition. In the IFA₂ test, the extracts with the greatest effect were EtOH, Et₂O and Ac at 10 mg/mL. In the TP and TTPA trials, the Ac and An extracts at 10 mg/mL had the highest anticoagulant effect and in the LC, the extracts with the highest activity were AcOEt, An and Hx at 10 mg/mL. The Ac and ETOH extracts showed greater antithrombotic potential and due to their chemical nature, only EtOH was analyzed by GC-MS. Said extract reported having vitamin E, various fatty acids and triterpenes. In conclusion, the ethanolic extract of chaya showed greater antiaggregant activity than the positive control and all the extracts demonstrated moderate inhibitory activity of phospholipase A₂, anticoagulant and fibrinolytic compared to positive controls.

ÍNDICE

	PÁGINA
OFICIO DE AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN	v
AGRADECIMIENTOS	vii
RECONOCIMIENTOS	ix
RESUMEN DEL TRABAJO	xi
ABSTRACT	xiii
ÍNDICE	xv
OTROS ÍNDICES	xix
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	3
Enfermedades cardiovasculares: un problema en salud a nivel mundial	3
Formación de trombos y tratamiento farmacológico	4
Agregación plaquetaria, coagulación sanguínea y fibrinólisis. Procesos involucrados en la trombosis.	5
Inhibición farmacológica de los procesos involucrados en la trombosis	7
Alternativa natural contra la trombosis	8
<i>Cnidocolus aconitifolius</i> como alternativa natural contra la trombosis	9
Consumo y valor nutritivo	10
Uso de la chaya en la medicina tradicional	10
Metabolitos secundarios presentes en las hojas de chaya	10
Identificación de metabolitos secundarios de hojas de chaya y su efecto antitrombótico	13
Terpenos	13
Compuestos fenólicos	15
Actividad antitrombótica de extractos de hojas de chaya	18
HIPÓTESIS	19
JUSTIFICACIÓN	21
OBJETIVOS	23
Objetivo general	23
Objetivos específicos	23

MATERIALES Y MÉTODOS	25
Diseño experimental	25
Obtención del material vegetal y preparación de los extractos	26
Preparación de los extractos	26
Evaluación de la actividad antitrombótica <i>in vitro</i>	27
Recolección de la sangre	27
Actividad antiagregante	27
Inhibición de la agregación plaquetaria	27
Inhibición de la fosfolipasa A ₂	28
Actividad anticoagulante	29
Tiempo de protrombina y tiempo de tromboplastina parcialmente activada	29
Actividad fibrinolítica	30
Lisis del coágulo	30
Identificación de metabolitos mayoritarios presentes en los extractos de chaya por cromatografía de gases con detección por espectrometría de masas (GC-MS)	31
Análisis estadístico	31
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	33
Preparación de los extractos	33
Evaluación de la actividad antitrombótica <i>in vitro</i>	34
Actividad antiagregante	34
Inhibición de la agregación plaquetaria	34
Inhibición de la fosfolipasa A ₂	35
Actividad anticoagulante	37
Tiempo de protrombina y tiempo de tromboplastina parcialmente activada	37
Actividad fibrinolítica	40
Lisis del coágulo	40
Identificación de metabolitos mayoritarios presentes en extractos de chaya por cromatografía con detección por espectrometría de masas (GC-MS)	41

CONCLUSIONES	47
REFERENCIAS	49
ANEXOS	63

OTROS ÍNDICES

Índice de figuras

		PÁGINA
Figura 1.	Diagrama general de los procesos involucrados en la trombosis	6
Figura 2.	Muestra de la diversidad morfológica de hojas de chaya	9
Figura 3.	Principales rutas biosintéticas del metabolismo secundario en plantas	11
Figura 4.	Sitios de acción biológica de los metabolitos presentes en hojas de chaya en el sistema implicado en la trombosis	14
Figura 5.	Estructura química de los triterpenos y saponinas triterpénicas con actividad antitrombótica presentes en hojas de chaya	15
Figura 6.	Estructura química de los compuestos fenólicos simples con actividad antitrombótica presentes en hojas de chaya	16
Figura 7.	Estructura química de los flavonoides con actividad antitrombótica presentes en las hojas de chaya	17
Figura 8.	Diagrama metodológico para la evaluación antitrombótica e identificación de metabolitos mayoritarios de extractos de chaya	25
Figura 9.	Gráfica de los efectos observados en la agregación plaquetaria debido a los distintos extractos a sus respectivas concentraciones	34
Figura 10.	Gráfica de los efectos observados en la inhibición de la fosfolipasa A ₂ debido a los distintos extractos a sus respectivas concentraciones	36
Figura 11.	Gráfica de los efectos observados en la inhibición de la coagulación sanguínea de la vía extrínseca debido a los distintos extractos a sus respectivas concentraciones	37
Figura 12.	Gráfica de los efectos observados en la inhibición de la coagulación sanguínea de la vía intrínseca debido a los distintos extractos a sus respectivas concentraciones	39
Figura 13.	Gráfica de los efectos observados en la lisis de coágulos debido a los distintos extractos a sus respectivas concentraciones	40
Figura 14.	Cromatograma del extracto etanólico de chaya obtenido mediante cromatografía de gases con detección por espectrometría de masas	42

Índice de tablas

	PÁGINA
Tabla 1. Comparación de análisis cualitativos de extractos de hojas de chaya	12
Tabla 2. Comparación de análisis cuantitativos de metabolitos secundarios presentes en hojas de chaya	13
Tabla 3. Rendimientos promedio de los extractos de chaya obtenidos por maceración con los distintos solventes	33
Tabla 4. Metabolitos mayoritarios identificados por cromatografía de gases acoplado a espectrómetro de masas en el extracto etanólico de hojas de chaya.	43

Índice de anexos

	PÁGINA
Anexo 1. Carta de consentimiento informado	63
Anexo 2. Comparación entre el espectro del extracto EtOH de hojas de chaya (parte superior) y el espectro de la base de datos (parte inferior) de los compuestos (1) y (2)	66
Anexo 3. Comparación entre el espectro del extracto EtOH de hojas de chaya (parte superior) y el espectro de la base de datos (parte inferior) de los compuestos (3) y (4)	67
Anexo 4. Comparación entre el espectro del extracto EtOH de hojas de chaya (parte superior) y el espectro de la base de datos (parte inferior) de los compuestos (5) y (6)	68
Anexo 5. Comparación entre el espectro del extracto EtOH de hojas de chaya (parte superior) y el espectro de la base de datos (parte inferior) de los compuestos (7) y (8)	69
Anexo 6. Comparación entre el espectro del extracto EtOH de hojas de chaya (parte superior) y el espectro de la base de datos (parte inferior) de los compuestos (9) y (10)	70

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de muerte a nivel mundial. La OMS calculó que, en 2018 murieron por esta causa 19.9 millones de personas, lo cual representó el 31% de todas las muertes mundiales, mientras que en México, en el 2017, estas enfermedades fueron las responsables del 19% de muertes. Entre las patologías incluidas se encuentran las cardiopatías coronarias, las enfermedades cerebrovasculares y las arteriopatías periféricas, teniendo en común la formación de trombos intravasculares, los cuales pueden obstruir los vasos sanguíneos, causando isquemia e incluso la muerte. El objetivo del tratamiento antitrombótico consiste en prevenir la formación de trombos o disolverlos. Los fármacos antitrombóticos han sido clasificados según su mecanismo de acción en antiagregantes, anticoagulantes y fibrinolíticos. Entre algunos se encuentran el agente antiagregante ácido acetilsalicílico, los anticoagulantes rivaroxaban y apixaban y el fibrinolítico estreptoquinasa, los cuales provocan efectos secundarios, tales como hipersensibilidad, hiperplasminemia y hemorragias.

Por lo anterior, la búsqueda de alternativas naturales se convierte en una opción viable al tratamiento de la trombosis. A lo largo del mundo diversas plantas han sido empleadas para el tratamiento de las enfermedades tromboembólicas, siendo la chaya un ejemplo de la medicina tradicional maya. La acción biológica de las plantas se debe a los metabolitos secundarios, compuestos que las plantas biosintetizan para protegerse de la radiación ultravioleta solar, patógenos y otras plantas que amenazan su crecimiento. La diversidad y distribución de estos compuestos por el reino vegetal es variable según la familia o especie vegetal. De los metabolitos presentes en chaya, los triterpenos, saponinas, flavonoides y ácidos fenólicos, han demostrado inhibir las enzimas o receptores involucrados en el proceso trombótico.

La chaya, ha sido escasamente estudiada bajo el enfoque científico por sus efectos antitrombóticos. Ebenezer *et al.* (2014) indicaron que, el extracto metanólico de chaya, en un estudio *in vitro*, demostró un efecto fibrinolítico, mientras que, García-Rodríguez *et al.* (2014) demostraron el efecto cardioprotector del extracto etanólico de chaya, empleando un modelo de ratas inducidas a isquemia/reperfusión. Achi *et al.* (2018) han reportado el efecto anticoagulante de una fracción metanólica de hojas de chaya. Debido a la falta de estudios que comprueben el uso de la chaya como agente hemostático, el presente trabajo tiene como objetivo la evaluación de la actividad antitrombótica de diversos extractos derivados de hojas de chaya y la identificación de los metabolitos mayoritarios presentes en los extractos con mayor actividad antitrombótica.

ANTECEDENTES

Enfermedades cardiovasculares: un problema en salud a nivel mundial

En el 2017, las enfermedades cardiovasculares (ECV) fueron la principal causa de muerte en el mundo, con 19.9 millones de casos, lo equivalente al 31% de las muertes mundiales (OMS, 2018). La OMS prevé que para el año 2030, las ECV continúen siendo la primera causa de muerte, aproximando que la cifra de personas fallecidas aumente hasta las 23.6 millones (OMS, 2015).

El alto consumo de alimentos ultra-procesados, los cuales, se encuentran alterados por la adición de sustancias tales como sal, aceite, azúcares, grasas saturadas y trans, puede ocasionar problemas de salud, tales como el sobrepeso, la obesidad, la diabetes, la hipertensión y las dislipidemias, los cuales, son considerados factores de riesgo para las ECV (Moreira *et al.*, 2018; Poti *et al.*, 2015). Aunado al consumo de estos alimentos, la ingesta excesiva de alcohol, la inactividad física y los hábitos de fumar tabaco, pueden incrementar el riesgo de padecer estas complicaciones (Gaziano, 2017; Kubota *et al.*, 2017; Ricci *et al.*, 2018).

En México, en el 2017, estas enfermedades fueron las responsables del 23% de muertes (IHME, 2017). Las enfermedades trombóticas son las patologías más comunes subyacentes de los trastornos cardiovasculares, afectando a nivel cerebrovascular, coronario y periférico (Hira *et al.*, 2016). Según el Instituto de Métricas y Evaluación de la Salud (IHME por sus siglas en inglés), en México, el 82% de las muertes debidas a las ECV, son causadas por los eventos trombóticos. Se caracterizan por la formación de trombos, los cuales pueden provocar la obstrucción parcial o total del flujo sanguíneo, disminuyendo el transporte de oxígeno al corazón, lo que causa dolor en el pecho, inflamación crónica e incluso infarto (Hardman, 2018; Hira *et al.*, 2016; Koupenova *et al.*, 2017; Wolberg *et al.*, 2015). El proceso anterior es conocido como trombosis. La formación de los trombos es debida a diversos estados patológicos, entre los cuales, Virchow identificó los siguientes: disfunción endotelial, alteraciones del flujo sanguíneo y estados hipercoagulables (Crowley y Hunt, 2017).

a) Alteraciones en el flujo sanguíneo

En estado fisiológico, la sangre circula en régimen laminar. Las plaquetas, fluyen en el centro del vaso sanguíneo, separado del endotelio por una capa de plasma con movimiento más lento. Sin embargo, factores como la hipertensión arterial y la formación de la placa aterosclerótica, alteran el flujo sanguíneo hacia un estado turbulento. En este régimen, se facilita el contacto de las plaquetas con el endotelio y se

impide la entrada de inhibidores de los factores coagulantes (Mitchell, 2013). Asimismo, el flujo sanguíneo turbulento causa lesiones al endotelio, alterando las uniones intercelulares y causando adelgazamiento del glucocalix. Lo anterior favorece la migración de lipoproteínas de baja densidad (LDL) y monocitos a la íntima subendotelial (Zmysłowski y Szterk, 2017).

b) Lesión endotelial

La ingesta excesiva de alimentos ricos en grasas saturadas promueve la acumulación de lipoproteínas de baja densidad (LDL) en la pared endotelial, permitiendo el paso de monocitos y LDL a la subíntima endotelial (Mundi et al., 2018). Esto produce un estado inflamatorio crónico, en el que se generan radicales libres debido a los sistemas lipooxigenasa y óxido nítrico sintetasa, los cuales oxidan las LDL. Los macrófagos, al fagocitar las LDL, no son capaces de degradarlas, convirtiéndose en células espumosas (Aluganti-Narasimhulu et al., 2016). La rotura del ateroma depende del equilibrio entre la síntesis y degradación del tejido conectivo. Cuando la placa es rota, el colágeno y diversas proteínas endoteliales quedan expuestas, lo cual puede promover la adherencia de plaquetas y la formación de trombos (Hansson et al., 2015).

c) Hipercoagulabilidad

La diabetes y el cáncer han demostrado estar íntimamente relacionadas con las enfermedades trombóticas. La hiperglucemia y la hiperinsulinemia aumentan la reactividad de las plaquetas (Fejes et al., 2017), mientras que las células cancerosas, expresan una elevada concentración de proteínas coagulantes, de esta forma, dichos trastornos favorecen la formación de trombos sanguíneos (Falanga et al., 2015).

Formación de trombos y tratamiento farmacológico

La formación de trombos se lleva a cabo mediante dos procesos que ocurren simultáneamente: la agregación plaquetaria y la coagulación sanguínea. Dichos trombos pueden obstruir el flujo sanguíneo en diversos tipos de vasos sanguíneos, de esta forma clasificando la trombosis en arterial o venosa. En ambos casos el trombo está compuesto por una malla de fibrina y agregados plaquetarios. Sin embargo, los trombos arteriales son comúnmente formados después de la ruptura de la placa aterosclerótica, siendo las plaquetas las principales células que lo constituyen. Este tipo de trombosis se produce en sitios de flujo turbulento sanguíneo, siendo es la causa del infarto de miocardio y del accidente cerebrovascular (Tomaiuolo et al., 2017). En la trombosis venosa, se forma un agregado rico en fibrina y glóbulos rojos, el cual puede originarse en zonas donde la pared endotelial se encuentra intacta y el flujo sanguíneo es lento. La activación del proceso de coagulación es el principal mecanismo en este tipo de trombosis y es la causa de las arteriopatías periféricas. En ambos tipos de trombosis, debido a la

constante activación de las enzimas plaquetarias y coagulantes, la fibrinólisis se encuentra disminuida, lo que atenúa la disolución de los trombos sanguíneos (Engelmann y Massberg, 2013; Koupenova *et al.*, 2017).

Conociendo la naturaleza del trombo, es posible administrar una terapia eficaz. El trombo arterial debe tratarse con agentes antiagregante, mientras que la trombosis venosa, debe tratarse con fármacos anticoagulantes. Ambos tipos de terapia previenen la extensión y recurrencia del trombo, pero no disuelven los ya formados. Así, la terapia fibrinolítica es empleada para disolver dichos trombos (Sikka & Bindra, 2010).

Agregación plaquetaria, coagulación sanguínea y fibrinólisis. Procesos involucrados en la trombosis.

Cuando ocurre la ruptura de la placa aterosclerótica, diversas proteínas quedan expuestas, tales como el colágeno y el factor de von Willebrand (FvW). Las plaquetas, como se presenta en la Figura 1, mediante diversos receptores se unen a dichas proteínas desencadenando diversas reacciones bioquímicas, enmarcadas en el proceso de activación y secreción. Por un lado, diversas enzimas plaquetarias son activadas, entre ellas la fosfolipasa A₂. Dicha enzima cataliza la liberación de ácido araquidónico, el cual es convertido mediante las enzimas ciclooxigenasa (1 y 2) y tromboxano sintetasa al agente reclutador de plaquetas tromboxano A₂ (Deppermann, 2018). Por otro lado, las plaquetas liberan diversas sustancias, entre ellas el ADP, el cual señalará los receptores P₂Y₁ y P₂Y₁₂ y promoverá un cambio conformacional plaquetario, junto con la activación del receptor GPIIb/IIIa. De esta forma, debido a la acción del tromboxano A₂ y del ADP, se promueve el reclutamiento de plaquetas y su unión mediante fibrinógeno y el receptor GPIIb/IIIa (Leslie, 2015; Yun *et al.*, 2016).

Simultáneamente, diversos factores coagulantes trabajan de manera conjunta. Son designados con números romanos, acompañado por una letra "a" en caso de estar activados. Siete son enzimas serín proteasas que circulan en forma inactiva (II, VII, IX, X, XI, XII y precalicreína) y son activadas por un cofactor (factor tisular, calcio, V, VIII y quininógeno de alto peso molecular).

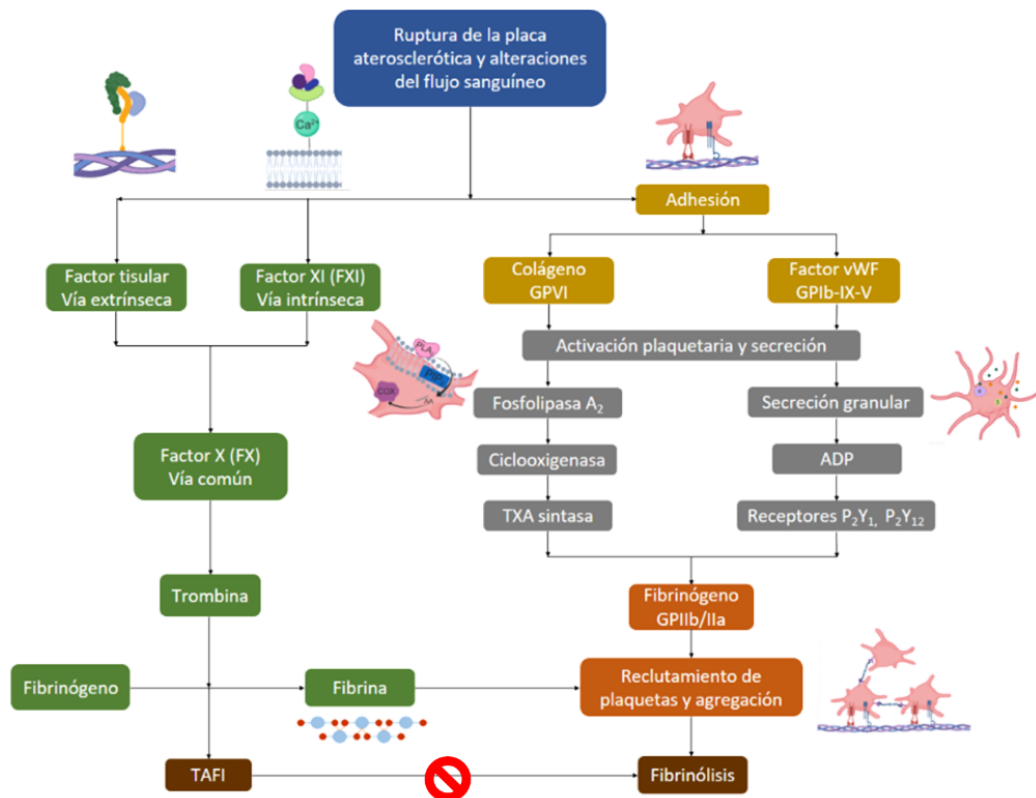


Figura 1. Diagrama general de los procesos involucrados en la trombosis.

La vía extrínseca es activada después de la ruptura de la placa aterosclerótica, cuando el factor tisular (FT), expresado en la membrana endotelial, se une al FVII, activando al FIX y al FX. Al mismo tiempo, la vía intrínseca, a través del FXII y del complejo colágeno, kininógeno de alto peso molecular y calcio, promueven la activación del FX. Ambas vías convergen en la activación del FX, denominando a las reacciones subsecuentes vía común. El FXa junto con el FVa, activan la enzima trombina, la cual convierte el fibrinógeno en fibrina. Mediante el FXIII, una enzima transglutaminasa, la fibrina es entrelazada con otras moléculas iguales para formar una red tridimensional, la cual refuerza el tapón plaquetario, estabilizando el trombo sanguíneo (O'Donnell *et al.*, 2019; Weidmann *et al.*, 2017).

La constante activación de la enzima trombina promueve la activación del inhibidor de la fibrinólisis, lo que atenúa la lisis del coágulo. De esta forma se inhibe la conversión de la fibrina a sus productos degradables (Chapin y Hajjar, 2015).

Inhibición farmacológica de los procesos involucrados en la trombosis

Los inhibidores de la agregación plaquetaria previenen la formación tapones plaquetarios mediante el bloqueo de alguno de los receptores plaquetarios o interfiriendo en la generación de algún agonista. Los fármacos antiagregantes pueden clasificarse en 1) inhibidores de la ciclooxigenasa, 2) inhibidores de la fosfolipasa A₂ y 3) antagonistas del receptor P₂Y₁ y P₂Y₁₂.

1) El ácido acetilsalicílico, mediante la acetilación del residuo serina 529, bloquea el acceso del ácido araquidónico hacia el sitio activo de la enzima ciclooxigenasa, de esta forma se inhibe la producción del tromboxano A₂ (Patrignani & Patrono, 2018).

2) El ácido aristolóquico, inhibe la proteína quinasa activada por mitógeno p38 (p38 MAPK), promoviendo la síntesis de óxido nítrico y reduciendo la movilización del calcio, de esta forma, se inhibe la acción catalítica de la fosfolipasa A₂ (Shen et al., 2008).

3) Las tienopiridinas se convierten en el hígado en varios metabolitos activos. Se unen de manera irreversible mediante enlaces disulfuro con residuos de cisteína en los receptores P₂Y₁ y P₂Y₁₂, antagonizando la acción del ADP (Koenig-Oberhuber & Filipovic, 2016).

Los fármacos anticoagulantes se clasifican en: 1) Inhibidores directos de la trombina, 2) inhibidores indirectos de la trombina e 3) inhibidores directos del FX.

1) Ximelgatran y dabigatran son convertidos por el hígado a su forma activa. Inactivan tanto a la trombina libre como a la unida a fibrina, evitando la conversión de fibrinógeno en fibrina (Hess *et al.*, 2017).

2) Los metabolitos activos de Apixaban y rivaroxaban se unen directamente al sitio activo del factor Xa, de esta manera se inhibe la activación de la trombina (Harter *et al.*, 2015).

3) La heparina no fraccionada se une a la antitrombina III y según la longitud de la cadena polisacárida, puede inhibir la acción de la trombina o del factor X. La heparina fraccionada o de bajo peso molecular, obtenida mediante degradación enzimática, posee un efecto anticoagulante más predecible, debido al menor tamaño de la cadena polisacárida (Oduah *et al.*, 2016).

Los fármacos fibrinolíticos han sido clasificados según su desarrollo en 4 generaciones.

1) Primera generación. El fármaco estreptoquinasa convierte tanto al plasminógeno unido a la fibrina como al circulante, en su forma activa de plasmina, para promover la degradación de la red de fibrina en productos degradables. Debido a su inespecificidad, causa la ausencia de plasminógeno en el plasma (Weitz *et al.*, 2012).

2) Segunda y tercera generación. Mediante tecnología de ADN recombinante, se ha producido el t-PA como alteplasa, reteplasa y tenecteplasa. Debido a la ausencia de varios sitios de unión a la fibrina, presentan mayor especificidad que la estreptoquinasa (James & Zehnder, 2012).

3) Cuarta generación. Ancrod, extraído del veneno de *Calloselasma rhodostoma*, modifica estructuralmente el fibrinógeno, lo que conlleva a la disminución de la viscosidad sanguínea y mejora la circulación en las zonas afectadas (Kirmani *et al.*, 2012).

El sangrado gastrointestinal es el efecto secundario más reportado por el ácido acetilsalicílico. Se han reportado algunos casos de resistencia a este fármaco, debida a que su acción interfiere de forma selectiva en una de las varias vías de la activación plaquetaria (Khan *et al.*, 2018; Pettersen *et al.*, 2015). Los anticoagulantes no deben ser administrados en pacientes con insuficiencia hepática, debido a que esta es la principal vía de su eliminación. Los fibrinolíticos de primera generación no son específicos a la fibrina, lo que causa fuertes hemorragias. Los de segunda y tercera generación han provocado arritmias y el de cuarta generación, ancrod, ha sido asociado con hemorragias cerebrales. Por lo que la búsqueda de alternativas naturales para el tratamiento de las enfermedades trombóticas, se ha vuelto una opción viable (Zhang *et al.*, 2014).

Alternativa natural contra la trombosis.

La medicina alternativa se basa en el consumo de extractos preparados a partir de diversas partes de las plantas, como hojas semillas, flores y raíces (Amin y Khan, 2016). Según la OMS, entre el 65% y el 80% de la población de los países en desarrollo, utilizan plantas como atención primaria a problemas de salud (OMS, 2011). La principal razón del uso de la medicina alternativa para el tratamiento de las enfermedades trombóticas, se centra en que los compuestos presentes en el extracto o alimento de origen natural, pueden tener diversos sitios diana, lo que generalmente reduce los efectos secundarios (Fuentes y Palomo, 2014).

Después de China, con casi 5000 especies de plantas medicinales, México posee el segundo número más alto con 4500 registradas (Muñetón-Pérez, 2009). En el estado de Puebla, los habitantes tehuacanenses emplean diversas plantas de la familia Euphorbiaceae y el género *Jatropha* por sus efectos anticoagulantes (Hernández-Nicolás *et al.*, 2018). En Yucatán, una planta perteneciente a esta familia, *Cnidoscolus aconitifolius*, ha sido utilizada para mejorar la circulación sanguínea (Ankli *et al.*, 2000; Ross-Ibarra y Molina-Cruz, 2002).

***Cnidoscolus aconitifolius* como alternativa natural contra la trombosis**

Cnidoscolus aconitifolius, comúnmente conocida como chaya en Yucatán, es un arbusto perenne de hoja grande y de crecimiento rápido. Esta planta es originaria de la región maya de Guatemala, Belice y el Sureste de México (Ross-Ibarra y Molina-Cruz, 2002). Actualmente, también puede encontrarse en las regiones tropicales y subtropicales de todo el mundo, incluyendo África, el sur del desierto Sahara y la India (Ganiyu, 2005). La característica principal de esta especie es la presencia de tricomas urticantes que causan fuerte dolor cuando son estimulados (Melo y Sales, 2008; Wurdack y Davis, 2009). Ross-Ibarra y Molina-Cruz (2002) identificaron cuatro variedades dentro de la especie *aconitifolius*, las cuales se presentan en la Figura 2. La variedad estrella y picuda han sido clasificadas como especies silvestres, mientras que chayamansa y redonda, son consideradas variedades domesticadas, siendo chayamansa la más empleada en la medicina tradicional y como alimento.

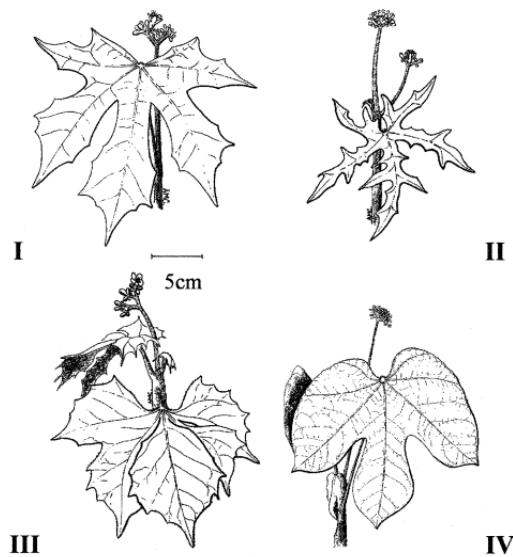


Figura 2. Muestra de la diversidad morfológica de hojas de chaya. I “estrella”, II “picuda”, III “chayamansa” y IV “redonda” (Ross-Ibarra y Molina-Cruz 2002).

Consumo y valor nutritivo

La chaya se consume de manera similar a la espinaca (*Spinaca oleraceae*), por lo que también es conocida como “espinaca maya”. Sin embargo, el contenido de vitaminas, minerales y aminoácidos presentes en las hojas de chaya, es superior a los hallados en la espinaca (Adanlawo y Elekofehinti, 2012; Erfani *et al.*, 2007; Obichi *et al.*, 2015). En relación a las enfermedades cardiovasculares, se ha demostrado que el consumo de dichos nutrientes, regula diversos mecanismos implicados con las enfermedades trombóticas, tales como la presión arterial sistólica y diastólica, la oxidación de las lipoproteína de baja densidad y la producción de óxido nítrico en los vasos sanguíneos (May & Qu, 2010; Rebholz *et al.*, 2012; Stamler *et al.*, 1996).

Las hojas de chaya contienen glicósidos cianogénicos, los cuales, al ser consumidos producen cianuro de hidrógeno, causante de efectos nocivos a la salud como náuseas, vómitos, dolor de cabeza, convulsiones y por último la muerte. Sin embargo, se ha descrito que estos compuestos son reducidos a concentraciones menores de 0.025 mg HCN/g mediante procesos como el secado y la cocción (Bolarinwa *et al.*, 2016; Kuti & Konoru, 2006; Ross-Ibarra & Molina-Cruz, 2002).

Uso de la chaya en la medicina tradicional

En relación a las enfermedades cardiovasculares, las hojas de chaya han sido empleadas en forma de infusiones y macerados para purificar la sangre y mejorar la circulación sanguínea, existiendo poca información acerca del mecanismo de acción relacionado a estos efectos biológicos (Ross-Ibarra y Molina-Cruz, 2002).

La actividad biológica de los extractos preparados a base de plantas, se debe principalmente a diversos compuestos que sintetiza la planta, denominados metabolitos secundarios. El consumo de estos compuestos, ejerce un efecto benéfico en la salud humana, ayudando para la prevención y tratamiento de diversas enfermedades, entre ellas las trombóticas (Ain *et al.*, 2016; Chen *et al.*, 2015; Vasanthi *et al.*, 2012)

Metabolitos secundarios presentes en las hojas de chaya

Las plantas, sintetizan diversos compuestos mediante dos tipos de metabolismo: primario y secundario. El metabolismo primario es el encargado de producir carbohidratos, proteínas y lípidos, compuestos necesarios para el crecimiento y desarrollo de la planta. En el metabolismo secundario, las plantas emplean una cantidad del carbono y de la energía asimilada del metabolismo primario, para la síntesis de diversas moléculas orgánicas que no parecen tener una función directa en procesos fotosintéticos, respiratorios y asimilación de nutrientes (Ávalos-García y Pérez-Urria, 2009; Pérez-Pérez, 2006).

Los metabolitos secundarios se sintetizan en pequeñas cantidades y presentan una distribución variable en el reino vegetal, es decir, su producción, en algunos casos es restringida a un determinado género, familia, incluso especie vegetal (Ávalos-García & Pérez-Urria, 2009; Mazid *et al.*, 2011). Las plantas utilizan estos compuestos para su protección contra depredadores y patógenos microbianos. Otros, son pigmentos que proporcionan color a flores y frutos, atrayendo a insectos polinizadores o animales, que contribuirán a la dispersión de las semillas. De igual forma son utilizados para poder competir con otras plantas por luz, agua y nutrientes (Gutzeit y Ludwig-Muller, 2014). Según su ruta metabólica de biosíntesis, presentada en la Figura 3, han sido clasificados en: terpenos, compuestos fenólicos, policétidos y alcaloides (Mazid *et al.*, 2011).

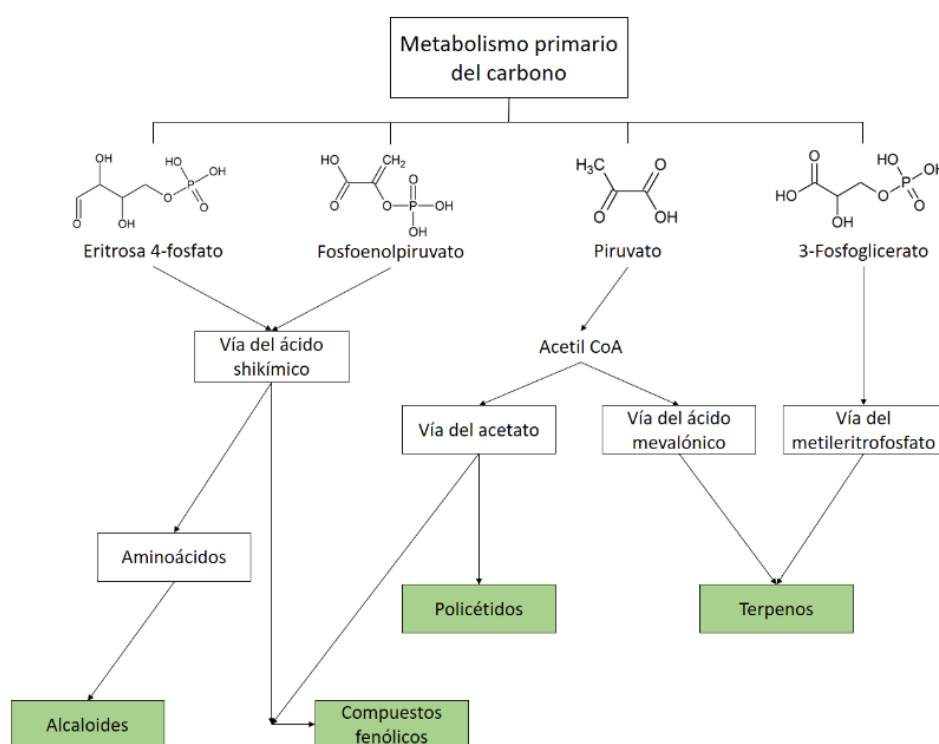


Figura 3. Principales rutas biosintéticas del metabolismo secundario en plantas.

En la medicina tradicional, para la obtención de extractos vegetales, se han desarrollado diversas técnicas que permiten la separación de los metabolitos provenientes de tejidos vegetales, mediante procedimientos estandarizados. La extracción por maceración es uno de los métodos más empleados, debido a que las temperaturas bajas no provocan la descomposición ni alteración los compuestos a extraer (Gupta *et al.*, 2012). Comúnmente se emplean diversos disolventes tales como agua, etanol, acetato de etilo, metanol y hexano. El solvente a emplear para la extracción, debe ser elegido en función a la planta y al efecto biológico deseado, pues estos compuestos presentan diferente solubilidad (Rababah *et al.*, 2010). Diversos

estudios han identificado los metabolitos secundarios presentes en chaya mediante técnicas cualitativas, las cuales, únicamente indican la presencia o ausencia de dichos metabolitos. En la Tabla 1 se presenta el perfil de metabolitos secundarios de chaya extraídos a partir de diversos disolventes (Molina-Naranjo, 2007).

Tabla 1. Comparación de los análisis cualitativos de extractos de hojas de chaya.

Autor	Awoyinka <i>et al.</i> (2007)	Adaramoye <i>et al.</i> (2011)	Adeniran <i>et al.</i> (2013)	Otitolaiye y Asokan, (2016)	García- Rodríguez <i>et al.</i> (2014)
Disolvente	Acuoso	Metanólico	Etanólico	Éter dietílico	Hexano
Alcaloides	-	+	+	+	-
Saponinas	+	++	+	N.A.	N.A.
Flavonoides	-	+++	-	+	-
Esteroides	N.A.	N.A.	+	-	+++
Terpenos	N.A.	N.A.	+	N.A.	N.A.
Triterpenos	N.A.	N.A.	N.A.	+	N.A.

N.A. = no analizados, “-“ = presencia negativa, “+“ = presencia positiva, “++“ = presencia fuerte, “+++“ = presencia muy fuerte

De acuerdo a la Tabla 1, las saponinas se encontraron presentes en agua, metanol y etanol, aunque en éter dietílico no se analizó la presencia de estos compuestos, en general, son solubles tanto en solventes polares y apolares debido a que poseen regiones hidrofílicas e hidrofóbicas (Oleszek y Hamed, 2010). La solubilidad de los flavonoides depende de la unión que puedan tener con moléculas glicosídicas, siendo solubles en solventes polares aquellos que presentan sustituciones glicosídicas (Bartnik y Facey, 2017; Martínez-Flórez *et al.*, 2002). Por último, los esteroides y terpenos poseen carácter hidrofóbico, siendo solubles en solventes polares aquellos que poseen sustituciones con grupos hidroxilo (Martins *et al.*, 2017).

Así mismo, diversos estudios han reportado el contenido cuantitativo de metabolitos secundarios en hojas de chaya, los cuales son presentados en la Tabla 2. Dichos estudios han reportado que la chaya posee saponinas, alcaloides y compuestos fenólicos como flavonoides y taninos hidrolizables.

Tabla 2. Comparación de análisis cuantitativos de metabolitos secundarios presentes en hojas de chaya

Metabolitos	(Jaramillo-Jaramillo <i>et al.</i> , 2016) (mg/g)	(Obichi <i>et al.</i> , 2015) (mg/g)	(Orji <i>et al.</i> , 2016) (mg/g)
Saponinas	4.45 ± 0.03	124.9 ± 0.2	0.0630 ± 0.0013
Alcaloides	1.01 ± 0.02	174.5 ± 6.5	0.0196 ± 0.0026
Fenoles	5.60 ± 0.03	N.A	0.3302 ± 0.0032
Taninos hidrolizables	1.40 ± 0.02	57.2 ± 0.00	N.A
Flavonoides	N.A.	237.2 ± 0.2	0.0295 × 10 ⁻² ± 0.0009

N.A. = No analizados

Identificación de metabolitos secundarios de hojas de chaya y su efecto antitrombótico

La identificación de los metabolitos secundarios es una tarea importante en la obtención de extractos con actividad antitrombótica, ya que esto, permite proponer el mecanismo de acción por el cual dicho extracto posiblemente ejerce su efecto biológico (Razborzek *et al.*, 2007). De entre las técnicas empleadas para la identificación de los metabolitos secundarios de extractos de hojas de chaya, se encuentran la cromatografía de líquidos y la cromatografía de gases. El primer tipo de cromatografía, ha permitido identificar metabolitos polares y no volátiles, mientras que la cromatografía de gases, ha permitido identificar metabolitos volátiles y térmicamente estables. La cromatografía de líquidos con ayuda del detector de arreglo de diodos, ha logrado identificar diversos ácidos fenólicos, mientras que, con el espectrómetro de masas, se han identificado diversos flavonoides y saponinas (Ramos-Gomez *et al.*, 2016). Por otro lado, la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas ha permitido identificar triterpenos pentacíclicos (Pérez-González *et al.*, 2017; Pérez-González *et al.*, 2018). De los metabolitos que han sido identificados en las hojas de chaya, se han descrito que los triterpenos, las saponinas y los compuestos fenólicos poseen efecto antitrombóticos. Algunos sitios diana de dichos metabolitos son presentados en la Figura 4.

Terpenos

Constituyen la clase más grande de metabolitos secundarios, con aproximadamente 25,000 compuestos. Suelen ser insolubles en agua y derivan de la unión de unidades de 5 átomos de carbono, llamadas isoprenos, de esta forma se clasifican en: monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos, tetraterpenos y politerpenos, cada uno de ellos formados por la unión de 2, 3, 4, 6, 8 y más de 8 unidades de isopreno, respectivamente (Ávalos-García y Pérez-Urria, 2009; Sato, 2014). Los terpenos derivan del dimetilalil difosfato (DMAPP) y del isopentenil difosfato (IPP), provenientes de las rutas del ácido mevalónico, activa en el citosol, y de la ruta del metileritrol fosfato (MEP), activa en cloroplastos (Christianson, 2017; Sato, 2014).

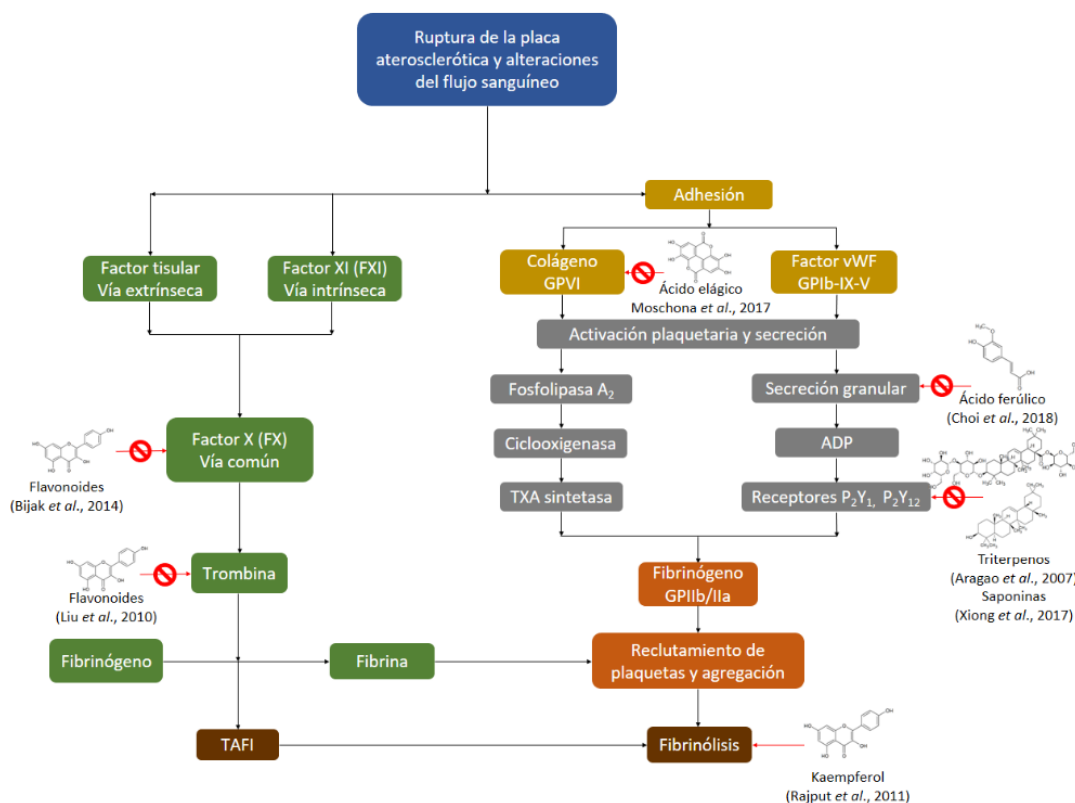


Figura 4. Sitios de acción biológica de los metabolitos presentes en hojas de chaya en el sistema implicado en la trombosis.

Los triterpenos pentacíclicos y las saponinas triterpénicas presentes en hojas de chaya, han demostrado poseer actividad antitrombótica. Ambos tipos de metabolitos son derivados del escualeno, terpeno formado por 6 unidades de isopreno, y en la Figura 5 se presentan la estructura química de aquellos reportados en chaya. Poseen en su estructura química 5 anillos de 6 miembros cada uno, donde únicamente la alfa amirina presente estructura triterpénica del tipo ursano, y el resto de triterpenos y saponinas poseen estructura del tipo oleanano. Las saponinas, además, presentan sustituciones glicosídicas en las posiciones 3 y 28, lo que les otorga carácter anfipático.

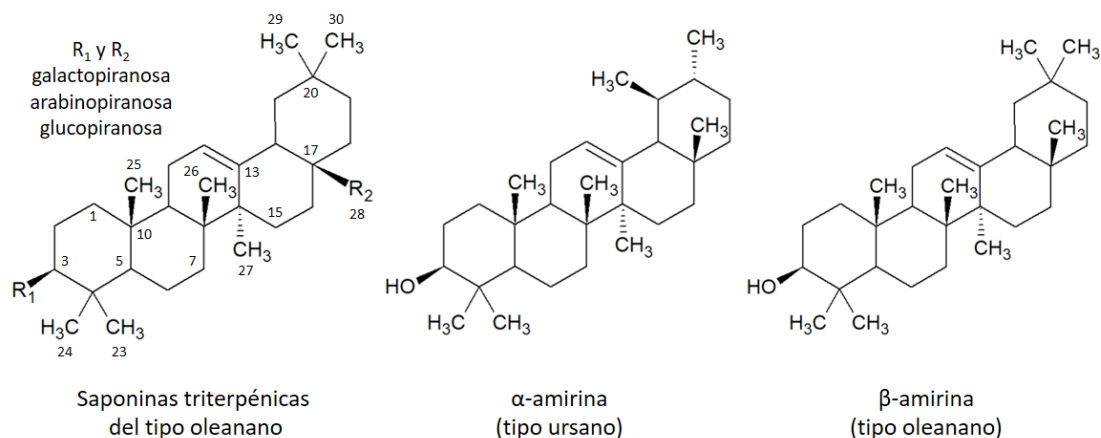


Figura 5. Estructura química de los triterpenos y saponinas triterpénicas con actividad antitrombótica presentes en hojas de chaya.

La mezcla racémica de los triterpenos α y β amirina, los cuales han sido identificados en las hojas de chaya, han demostrado actividad antiagregante en pruebas *in vitro* en plasma sanguíneo humano. La máxima inhibición de la agregación plaquetaria observada, empleando como agonista ADP 3 μ M, fue del 60%, resultante de emplear una concentración de 200 μ M de la mezcla racémica. De igual forma, esta mezcla de metabolitos logró inhibir el 41% y el 27% de la agregación inducida por colágeno (10 μ g/mL) y ácido araquidónico (150 μ M), a concentraciones de 150 y 200 μ M respectivamente (Aragão *et al.*, 2007). Las saponinas triterpénicas con esqueleto oleanano, las cuales han sido identificadas en chaya, han demostrado poseer efecto antiagregante en plasma sanguíneo de conejo, contra el agente agregante ADP (5 μ M).

No se han realizado estudios donde se evalúe el efecto fibrinolítico de las saponinas triterpénicas y los triterpenos pentacíclicos. Sin embargo, algunos estudios indican que este tipo de metabolitos podrían estar involucrados en la activación del plasminógeno. Khatun *et al.* (2013) al evaluar el efecto fibrinolítico de un extracto metanólico de la planta *Ardisia humulis*, sugirieron que el efecto estudiado fue debido a los triterpenos pentacíclicos, mientras que Klafke *et al.* (2012), al evaluar el mismo efecto en la planta *Campomanesia xanthocarpa*, sugirieron que las saponinas triterpénicas estuvieron involucradas en el proceso de lisis.

Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos son moléculas que tienen uno o más grupos hidroxilo unidos a un anillo bencénico. Se estima que aproximadamente 10,000 compuestos fenólicos pueden ser encontrados en las plantas, de los cuales, algunos pueden ser

solubles en agua o en solventes orgánicos (Saltveit, 2010). Son sintetizados a partir de dos rutas metabólicas secundarias: la ruta del ácido shikímico, productora de la mayor parte de estos compuestos en plantas, y la ruta del acetato, de poca utilidad en plantas superiores (Saltveit, 2010). Una clasificación de este tipo de compuestos fue propuesta por Evans (1989), quien los categorizó según el número de átomos de carbono en su esqueleto central. A continuación, se presentarán aquellos compuestos fenólicos reportados en chaya y que han reportado poseer actividad antitrombótica.

a) Compuestos fenólicos simples (C_6-C_n , $1 \leq n \leq 3$)

Son los más ubicuos en las plantas. Los grupos sustituyentes que se unen al anillo bencénico son: aldehído, cetona y alcohol. Estos grupos pueden ir unidos directamente al anillo bencénico, dando estructuras C_6-C_1 o unidos a través de 1 o 2 carbonos al anillo bencénico, resultando en estructuras C_6-C_2 y C_6-C_3 . Los ácidos fenólicos con actividad antitrombótica que han sido identificados en chaya, son el ferúlico, elágico, p-cumárico, cafeico y protocatecuico, presentados en la Figura 6.

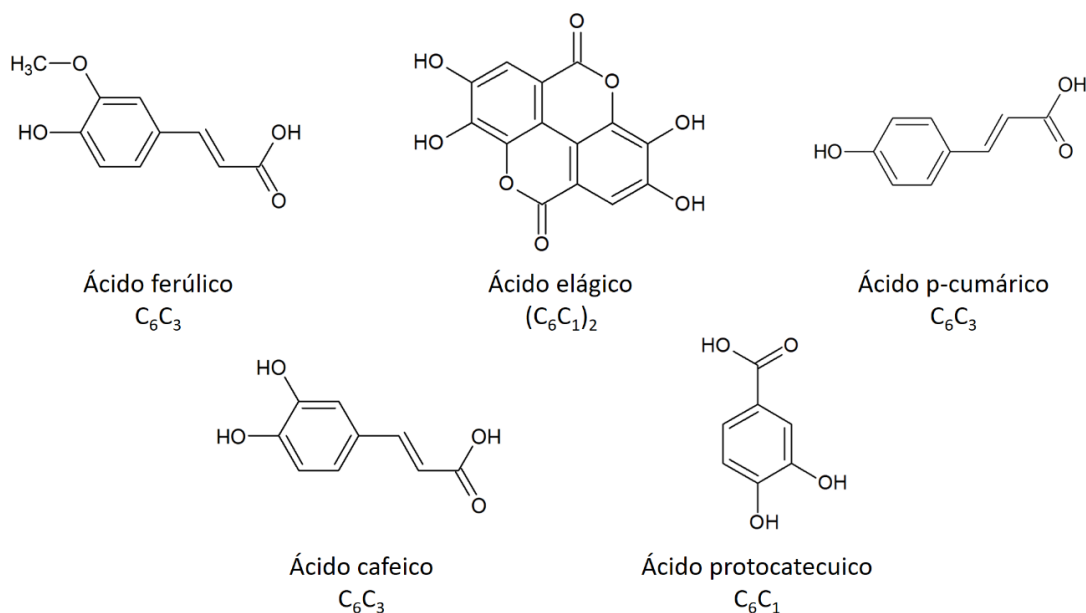


Figura 6. Estructura química de los compuestos fenólicos simples con actividad antitrombótica presentes en hojas de chaya.

El ácido elágico, un dímero fenólico con estructura $(C_6C_1)_2$, ha demostrado inhibir la agregación plaquetaria inducida por colágeno ($5 \mu\text{g/mL}$) y ADP ($20 \mu\text{M}$) en plasma sanguíneo humano y mediante un estudio *in silico*, demostró poseer alta afinidad hacia la isoforma 2 de la enzima ciclooxygenasa, al formar 4 puentes de hidrógeno con diversos residuos aminoacídicos presentes en el sitio activo de dicha enzima (El-Shitany *et al.*, 2014; Moschona *et al.*, 2017).

El ácido ferúlico, un ácido hidroxicinámico con estructura C_6C_3 , a 10 $\mu\text{g/mL}$, reportó inhibir un 30% de la liberación de serotonina desde las plaquetas obtenidas de ratones. Dicha liberación de serotonina fue promovida por la enzima trombina a 0.25U/mL. Este mismo metabolito, junto con los ácidos p-cumárico, cafeico y protocatecuico han demostrado prolongar la coagulación sanguínea en plasma sanguíneo humano y murino (Choi *et al.*, 2018; Wee *et al.*, 2010).

b) Flavonoides

Los flavonoides constan de dos anillos de benceno (A y B) enlazados a través de un anillo de pirano heterocíclico (C). Las diferentes clases de flavonoides difieren en el patrón de sustitución del anillo C, mientras que los compuestos individuales dentro de una clase difieren en el patrón de sustitución de los anillos A y B (Pietta, 2000). Liu *et al.* (2010) mediante un estudio QSAR (por sus siglas en inglés relación cuantitativa estructura-actividad) concluyeron que la inhibición de la trombina aumenta cuando el flavonoide posee: grupo hidroxilo en la posición 3 del anillo C, grupos hidroxilo en el anillo B, doble enlace entre el carbono 2 y 3 y doble enlace entre el carbono 4 y un átomo de oxígeno. Entre los flavonoides evaluados por Liu *et al.* (2010) por su actividad inhibitoria de la enzima trombina y que han sido reportados en la chaya se encuentran el kaempferol, quercetina, rutina, naringenina, amentoflavona y dihidromiricetina, cuyas estructuras químicas se presentan en la Figura 7.

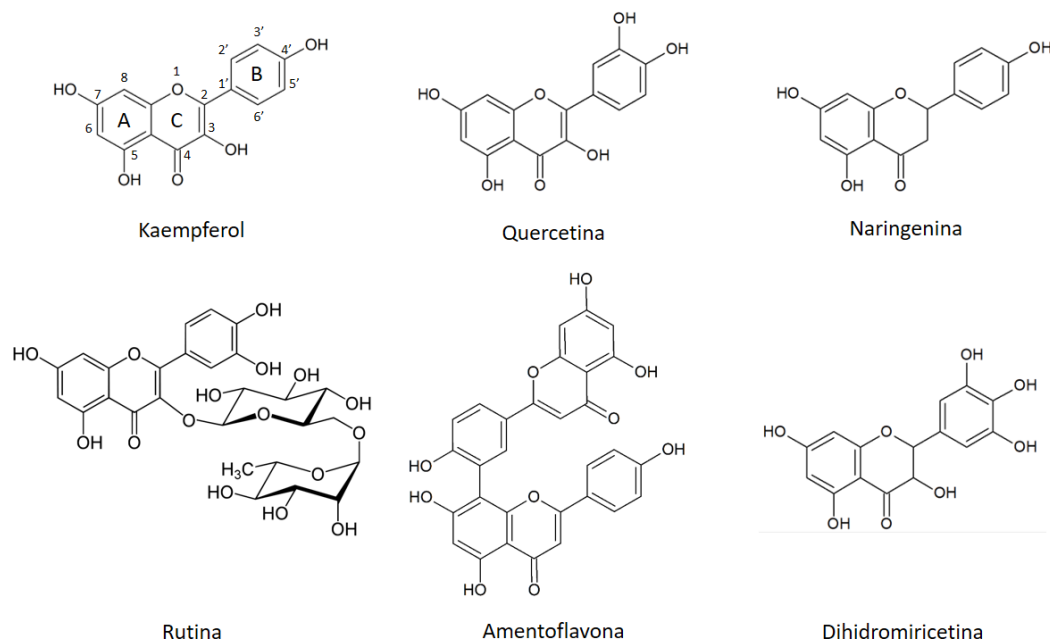


Figura 7. Estructura química de los flavonoides con actividad antitrombótica presentes en las hojas de chaya.

De igual forma se ha reportado que los flavonoides quercetina y kaempferol tienen efecto antiagregante. Al ser evaluados a una concentración de 10 μM , demostraron inhibir la agregación plaquetaria inducida por el ADP 10 μM en un 90% (Mira *et al.*, 2017). También se ha reportado que el flavonoide kaempferol tiene efecto fibrinolítico y es capaz de lisar trombos en 77% a una concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$ (Rajput *et al.*, 2011).

Actividad antitrombótica de extractos de hojas de chaya

Con respecto a la actividad antitrombótica de hojas de chaya existen pocos estudios que evidencien esta actividad. García-Rodríguez *et al.* (2014) empleando un modelo de ratones CD1 inducidos a un estado de isquemia, indicaron que aquellos tratados con 500 mg de una fracción etanólica de chaya por kg de peso corporal, presentaron una reducción del 10% en el daño al ventrículo izquierdo del corazón causado por la isquemia, comparado con aquellas que no recibieron el tratamiento. Los autores mencionan que, el efecto pudo deberse a la activación del compuesto vasodilatador óxido nítrico, estimulado por el extracto metanólico.

Un estudio realizado para medir la actividad fibrinolítica debido a diversos extractos es el reportado por Ebenezer *et al.* (2014). En este trabajo se reportó que el extracto metanólico de hojas de chaya, a una concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$, presentó una lisis del coágulo del 48.38%, mientras que el medicamento estreptoquinasa (30,000 UI) causó una lisis del 60.2%. Estos autores, al analizar el potencial fibrinolítico de otras 10 plantas y con base a sus resultados, sugirieron que aquellas plantas con bajas concentraciones de calcio y zinc poseen un mayor efecto fibrinolítico, pues ambos metales participan en el proceso de coagulación, contrario a la lisis del coágulo.

Recientemente se ha reportado el efecto anticoagulante debido a un extracto de hojas de chaya en ratas albinas inducidas a diabetes con el fármaco estreptozotocina (Achi *et al.*, 2018). Las ratas diabéticas, presentaron incrementos en la concentración del fibrinógeno plasmático y en el conteo de plaquetas en plasma, lo cual estaba correlacionado con la disminución de los tiempos de coagulación de las pruebas tiempo de trombina, tiempo de protrombina y tiempo de tromboplastina parcialmente activada, pruebas relacionadas a las vías común, extrínseca e intrínseca de coagulación respectivamente. Las ratas que recibieron el extracto metanólico de hojas de chaya a 250 y 500 mg/kg de peso corporal, presentaron un decremento de la concentración de fibrinógeno y del conteo de plaquetas, así como los tiempos de coagulación antes mencionados fueron prolongados prácticamente a los valores normales de coagulación. Los resultados anteriores demuestran el efecto anticoagulante del extracto metanólico de chaya.

HIPÓTESIS

Los extractos de hojas de chaya presentan efecto antitrombótico en los procesos involucrados en la agregación plaquetaria, la coagulación sanguínea y la fibrinólisis, debido a los metabolitos secundarios que contienen.

JUSTIFICACIÓN

A nivel mundial las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de muerte. En México, el 23% de las defunciones totales en el año 2017 fueron debido a las cardiopatías coronarias, enfermedades cerebrovasculares y arteriopatías periféricas. Estas complicaciones tienen en común la formación de trombos sanguíneos, lo cuales pueden ocluir de manera parcial o total los vasos sanguíneos. Para prevenir la formación de dichos trombos y promover la disolución de los ya formados, se emplean fármacos antitrombóticos, tales como los antiagregantes, anticoagulantes y fibrinolíticos. Sin embargo, la terapia antitrombótica ha demostrado provocar numerosos efectos secundarios, como la hiperplasminemia y los sangrados gastrointestinales. Por lo que una alternativa, es la búsqueda de plantas que puedan coadyuvar en el tratamiento de las enfermedades cardiovasculares.

La medicina tradicional, por años ha sido empleada por diversas culturas para el tratamiento y prevención de diversas enfermedades. Se ha reconocido que, los metabolitos secundarios de las plantas empleadas en la medicina tradicional, son capaces de contrarrestar las alteraciones bioquímico-metabólicas desencadenadas en enfermedades como las cardiovasculares. Por lo que La búsqueda de alterativas que coadyuven al tratamiento de las ECV, es un objetivo de diversos grupos de investigación.

La chaya, ampliamente consumida en la península Yucateca, es originaria de la región de Guatemala, Belice y México; la cual, además de ser una fuente importante de proteína y minerales, ha sido empleada por la cultura maya para el tratamiento de enfermedades, tales como la diabetes y la enfermedad renal. Particularmente, estudios dirigidos por Ebenezer *et al.* (2014), García-Rodríguez *et al.* (2014) y Achi *et al.* (2018) han reportado que los extractos obtenidos de hojas de chaya presentan efecto fibrinolítico, cardioprotector y anticoagulante, respectivamente.

Se ha reportado que las hojas de chaya contienen ácidos fenólicos, flavonoides y triterpenos. Por otro lado, diversos reportes han demostrado que dichos metabolitos poseen actividad asociada al tratamiento de las ECV, como la antiagregante, anticoagulante y fibrinolítica. Por lo anterior, este estudio tiene como finalidad evaluar la actividad antitrombótica de extractos de hojas de chaya obtenidos con diferentes disolventes.

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar la actividad antitrombótica *in vitro* e identificar metabolitos de extractos de hojas de *Cnidoscolus aconitifolius*.

Objetivos específicos

Determinar la actividad antiagregante *in vitro* de extractos de *Cnidoscolus aconitifolius* utilizando plaquetas humanas.

Determinar la actividad inhibitoria de la enzima fosfolipasa A₂ de extractos de *Cnidoscolus aconitifolius* empleando eritrocitos de sangre humana.

Determinar el efecto inhibitor de la coagulación *in vitro* de extractos de *Cnidoscolus aconitifolius* en plasma sanguíneo humano.

Determinar la actividad fibrinolítica de extractos de *Cnidoscolus aconitifolius* en sangre humana.

Identificar los metabolitos mayoritarios de los extractos de *Cnidoscolus aconitifolius* con mayor actividad antitrombótica por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño experimental

En la Figura 8 se presenta el diagrama metodológico para la evaluación de la actividad antitrombótica de los extractos de hojas de *C. aconitifolius*. De manera general, las hojas de la variedad chayamansa fueron adquiridas del huerto “Los Achiotes”, en el municipio de Timucuy, Yucatán. Las hojas fueron secadas a temperatura de 40°C en una estufa de convección. Seguidamente se obtuvieron los extractos en una proporción de 1:10 (p/v) empleando agua, etanol, acetona, acetato de etilo, éter dietílico y hexano como disolventes. Esto se realizó en los laboratorios Ciencia de Alimentos, Ingeniería Química y Tecnología de los Alimentos, todos ellos pertenecientes a la Facultad de Ingeniería Química. Posteriormente, se evaluó la actividad antitrombótica de los extractos empleando los siguientes ensayos: Inhibición de la agregación plaquetaria, inhibición de la fosfolipasa A₂, tiempo de protrombina, tiempo de tromboplastina parcialmente activada y lisis del coágulo, los cuales fueron realizados en el Laboratorio de Hematología del Centro de Investigaciones Regionales Dr. Hideyo Noguchi. Seguidamente, los extractos con mayor actividad antitrombótica se analizaron por cromatografía de gases con detección por espectrometría de masas, para identificar los metabolitos mayoritarios. Dichos análisis fueron realizados en el Laboratorio de Análisis Instrumental, perteneciente a la Facultad de Ingeniería Química.

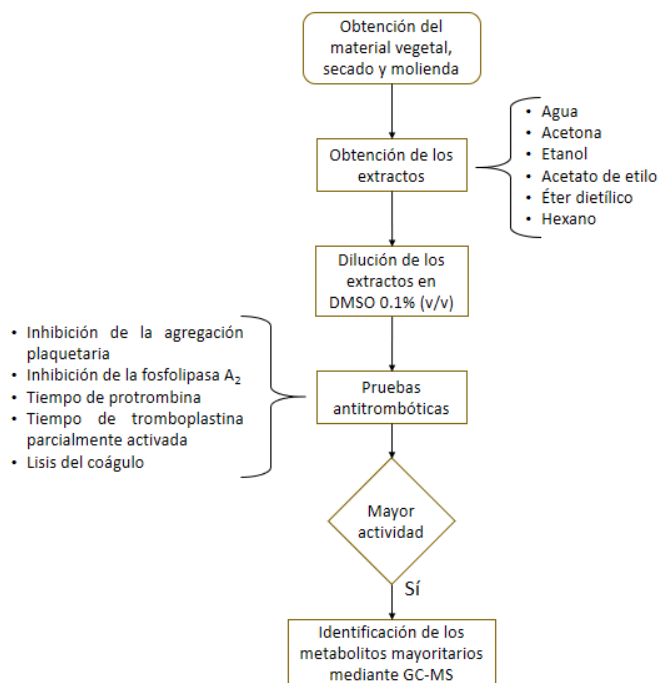


Figura 8. Diagrama metodológico para la evaluación antitrombótica e identificación de metabolitos mayoritarios de extractos de chayamansa.

Obtención del material vegetal y de los extractos

Las hojas de *Cnidoscolus aconitifolius* variedad chayamansa fueron recolectadas en el mes de octubre del año 2017. La muestra vegetal fue identificada por el Doctor José Luis Tapia Muñoz con el folio 69489 y depositada en el Departamento de Recursos Naturales del Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY) para futura referencia. Las hojas se secaron a 40°C durante 24 horas en una estufa de convección, con circulación de aire, y se molieron en un molino Cyclotec. Antes de preparar los extractos, las hojas procesadas se almacenaron en bolsas de polietileno, a temperatura ambiente y protegidas de la luz.

Preparación de los extractos

Antes de la extracción, se determinó el porcentaje de humedad de las hojas, el cual fue 6.4 ± 0.32 %. De esta forma los extractos se prepararon tomando el peso de las hojas en base seca. Se realizaron extracciones no secuenciales e independientes, empleando la técnica de maceración, a temperatura ambiente, por 48 horas, en una proporción 1:10 (p/v) y con agitación continua a 150 rpm empleando un agitador orbital Thermolyne Big Bill (M49235, E.U.A.). Los extractos se prepararon utilizando 250 mL de agua, acetona, etanol, acetato de etilo, éter dietílico o hexano. Los extractos se filtraron empleando papel Whatman #50. Posteriormente, los extractos se concentraron a presión reducida, empleando un evaporador rotatorio IKA (RV10C, Alemania) y se almacenaron en viales de vidrio de 5 mL previamente pesados. Finalmente, los extractos se congelaron y liofilizaron en un dispositivo Labconco (FreeZone 2.5L Benchtop, E.U.A.), para remover la humedad. Los extractos se almacenaron a 4°C y en obscuridad hasta su posterior análisis. El porcentaje de rendimiento de cada extracto se calculó con la fórmula:

$$\%C = \frac{M_e}{M_{bs}} \times 100$$

Donde

M_e es el peso del extracto después de liofilizarlo

M_{bs} es el peso en base seca de las hojas pulverizadas

Evaluación de la actividad antitrombótica *in vitro*

Para la evaluación de la actividad antitrombótica de los extractos se emplearon las pruebas de inhibición de la agregación plaquetaria, tiempo de protrombina, tiempo de tromboplastina parcialmente activada, lisis del coágulo e inhibición de la fosfolipasa A₂. Los extractos liofilizados se disolvieron a la respectiva concentración en dimetilsulfóxido (DMSO) al 0.1% en solución salina, para ser evaluados a las concentraciones finales de 0.1, 1.0 y 10.0 mg/mL tomando en cuenta el volumen del componente sanguíneo a emplear.

Recolección de la sangre

Las muestras de sangre se tomaron bajo previa autorización. Para asegurar que los participantes seleccionados para el estudio fueran sanos y no tuvieran antecedentes hemorrágicos o trombóticos, se les hizo firmar una carta de consentimiento informado (Anexo 1). La sangre venosa se retiró entre las 8 y 10 am de la vena antecubital utilizando la técnica vacutainer. La sangre fue colocada en tubos vacutainer de 4.5mL con citrato de sodio para su posterior uso en las pruebas antitrombóticas. Los residuos peligrosos biológicos infecciosos generados fueron identificados para ser separados y clasificados inmediatamente después de su generación de acuerdo a la NOM-087-SEMARNAT-SSA1- 2002 en:

- a) Sangre líquida y sus derivados
- b) Objetos punzocortantes (jeringas y agujas)

Actividad antiagregante

La actividad antiagregante de los extractos se evaluó mediante las técnicas inhibición de la agregación plaquetaria inducida por ADP e inhibición de la enzima fosfolipasa A₂, con la finalidad de determinar si los metabolitos presentes en los extractos de chaya bloquean los receptores plaquetarios afines al ADP (P₂Y₁ y P₂Y₁₂) e inhiben la desesterificación de los fosfolípidos plaquetarios.

Inhibición de la agregación plaquetaria

Esta prueba midió el cambio de la densidad óptica del plasma rico en plaquetas luego de adicionar un agonista agregante. Conforme las plaquetas se agregaron, el paso de la luz por el plasma aumentó, de esta forma el equipo registró el aumento de la transmitancia. La agregación plaquetaria se determinó siguiendo la metodología propuesta por Miyashita *et al.* (1999). Las muestras de sangre se colocaron en tubos vacutainer de 4.5 mL con citrato de sodio para evitar su coagulación. Para obtener plasma rico en plaquetas (PRP), los tubos vacutainer se centrifugaron a 900 rpm durante

15 min, el sobrenadante se retiró y se colocó en un tubo siliconizado. El precipitado se centrifugó a 3,500 rpm durante 15 min para obtener el plasma pobre en plaquetas (PPP). Se añadió 250 µL de PPP en una celda de vidrio y se colocó en el receptáculo del agregómetro de la marca BIO/DATA® (PAP-8E, E.U.A.) para ajustar la transmitancia al 100%. El PRP fue ajustado a 300×10^3 plaquetas por µL empleando un citómetro hemático Sysmex (KX-21, Japón) y como diluyente solución fisiológica (NaCl 0.9%, p/v). 162 µL de PRP fueron reajustados a 200×10^3 plaquetas por microlitro añadiendo 63 µL del respectivo extracto y fueron colocados en una celda de vidrio con barra imantada en el receptáculo del agregómetro. El PRP fue incubado por 8 minutos y pasado el tiempo, se adicionaron 2 µL de una solución acuosa de difosfato de adenosina (ADP) 10 mM, esperando 6 min aproximadamente para su medición. El control negativo consistió en DMSO 0.1%. Para el control positivo se diluyó una tableta efervescente de aspirina. La transmitancia se graficó con ayuda del programa computacional Start PAP-8E V2.1.0 de la marca BIO/DATA®. El porcentaje de inhibición de agregación plaquetaria (IAP) se calculó con la siguiente fórmula:

$$\%IAP = \left(1 - \frac{\%AM}{\%AC}\right) \times 100$$

Donde:

% AM es el porcentaje de agregación plaquetaria de la muestra

% AC es el porcentaje de agregación plaquetaria del control negativo

Inhibición de la fosfolipasa A₂

Esta prueba midió la acción de la enzima fosfolipasa A₂ empleando veneno de serpiente y una solución de eritrocitos. La enzima provoca la desesterificación del ácido araquidónico de la membrana eritrocitaria, de esta forma se libera hemoglobina la cual es cuantificada empleando un espectrofotómetro. La inhibición de la fosfolipasa A₂ se determinó siguiendo la metodología reportada por (Reddi *et al.*, 2014). Se utilizó veneno de la serpiente *Bothrops asper*, el cual contiene de 23 a 45% de la enzima fosfolipasa A₂ (Alape-Girón *et al.*, 2008). El veneno fue adquirido de una serpiente *Bothrops asper*, perteneciente a la UMA "Tsaab Kaan", con registro SEMARNAT-UMA-IN-0183-YUC-10. El veneno fue liofilizado y suspendido en buffer de fosfatos a una concentración de 335,000 µg/mL. Por otro lado, los eritrocitos de la sangre humana colectada se lavaron tres veces con buffer de fosfatos y luego, se suspendieron en dicho buffer a un conteo de 1.2×10^6 células/µL. A esta solución se le añadió 1% de albúmina de huevo y la mezcla resultante fue considerada como sustrato del veneno de serpiente. Para realizar la prueba se mezclaron 100 µL de eritrocitos, 100 µL de veneno a 100 mg/mL y 50 µL de DMSO 0.1% como control negativo o 50 µL del respectivo extracto. La mezcla anterior se incubó por 30 min a 37°C, se centrifugó a 3,200 rpm por 5 minutos y el sobrenadante

fue colocado en una placa de 96 pozos. Las absorbancias se midieron a 540 nm con un lector de placas BioTek (Elix800, E.U.A.). Para obtener el porcentaje de inhibición de empleó la fórmula:

$$\%Inhbición = 100 - \left(100 \times \frac{Abs\ muestra}{Abs\ veneno} \right)$$

Donde:

Abs muestra es la absorbancia del sobrenadante cuando fue añadido el correspondiente extracto

Abs veneno es la absorbancia del sobrenadante cuando fue añadido el veneno y DMSO 0.1%

Actividad anticoagulante

La actividad anticoagulante de los extractos de chaya fue evaluada mediante las técnicas inhibición tiempo de protrombina y tiempo de tromboplastina parcialmente activada, con la finalidad de determinar si los metabolitos presentes en los extractos de chaya inhiben los factores coagulantes de las vías extrínseca e intrínseca respectivamente. Ambas pruebas emplearon plasma pobre en plaquetas, el cual se obtuvo como se describió con anterioridad.

Tiempo de protrombina y tiempo de tromboplastina parcialmente activada

En la prueba del tiempo de protrombina, al añadir el factor tisular al plasma sanguíneo, se formó el complejo FT-FV, el cual promovió la coagulación debido la vía extrínseca. El tiempo de protrombina se determinó siguiendo la metodología reportada por Jagtap *et al.* (2012). Para ello, 50 µL de PPP fueron mezclados con 50 µL del respectivo extracto, y dicha mezcla fue incubada a 37°C por 2 minutos. Pasado el tiempo se añadieron 100 µL del reactivo de protrombina, el cual consiste en factor tisular, y se midió el tiempo que tarda el plasma en formar un coágulo sanguíneo con la ayuda de un coagulómetro de la marca Stago (Start, E.U.A.). Los tiempos fueron expresados como prolongación de la coagulación relativa al plasma sin extracto. El control negativo y positivo consistieron en DMSO 0.1% y heparina 75 USP respectivamente.

En la prueba tiempo de tromboplastina parcialmente activada, al añadir cefalina y una mezcla de fosfolípidos al plasma sanguíneo, se formó el complejo de precalicreína-FXII, el cual promovió la coagulación debido la vía intrínseca. El tiempo de tromboplastina parcialmente activada se determinó siguiendo la metodología reportada por Jagtap *et al.* (2012). 50 µL de PPP fueron mezclados con 50 µL del respectivo

extracto, y dicha mezcla fue incubada a 37°C por 2 minutos. Pasado el tiempo se añadieron 100 µL de reactivo de tromboplastina parcialmente activada y la mezcla se incubó durante 1 min. Por último, se añadieron 100 µL cloruro de calcio 25 mM, se incubó la mezcla nuevamente durante 15 s y se midió el tiempo que tarda el plasma en formar un coágulo sanguíneo con la ayuda de un coagulómetro de la marca Stago (Start, E.U.A.). Los tiempos se expresaron como prolongación de la coagulación relativa al plasma sin extracto. El control negativo y positivo consistieron en DMSO 0.1% y heparina 75 USP respectivamente.

Actividad fibrinolítica

La actividad fibrinolítica de los extractos de chaya fue evaluada por la técnica lisis del coágulo, para determinar si los metabolitos presentes en los extractos de chaya tenían la capacidad de activar el plasminógeno.

Lisis del coágulo

Esta prueba midió la degradación de la fibrina presente en el coágulo debido a la activación del plasminógeno en plasmina. La lisis del coágulo se llevó a cabo de acuerdo con el método descrito por Prasad *et al.* (2006). La sangre venosa extraída del voluntario sano se colocó en un tubo de eppendorf previamente pesado en un dispositivo VELAB (VE-204, E.U.A.) (0,5 mL/tubo) y se incubó durante 45 minutos a 37 °C en un baño de agua GEO-LAB (GL-12B, México) para formar el coágulo. El suero se eliminó completamente después de la formación del coágulo y el tubo con coágulo nuevamente fue pesado. Posteriormente, se añadieron 100 µL de cada de extracto a cada tubo eppendorff con coágulo previamente pesado. El control negativo consistió en DMSO 0.1%. Todos los tubos fueron a 37 ° C durante 90 min. Después de la incubación, el fluido liberado se separó y se pesaron los tubos con coágulo lisado. La diferencia obtenida en el peso tomado antes y después de la lisis del coágulo se expresó como porcentaje de lisis del coágulo empleando la fórmula:

$$\% \text{ Lisis del coágulo} = \frac{P_1}{P_2} \times 100$$

Dónde

P₁= peso del coágulo antes de la lisis – peso del coágulo después de la lisis

P₂ = peso del coágulo antes de la lisis

Identificación de metabolitos mayoritarios presentes en los extractos de chaya por cromatografía de gases con detección por espectrometría de masas (GC-MS)

La técnica GC-MS contribuyó a la identificación de metabolitos secundarios presentes en los extractos de chaya con mayor actividad antitrombótica. Para la identificación de los metabolitos mayoritarios, 0.3 μL del extracto etanólico se inyectó en modo splitless a una temperatura de 280°C. Se utilizó una columna capilar DB-5MS (30 m, 250 μm , 0.25 μm). La fase móvil fue helio a un flujo de 1 mL/min. La temperatura inicia del horno fue 90°C e incrementó 35°C/min hasta 210°C y se mantuvo así por 2 min.; luego, la temperatura se incrementó a 10°C/min hasta llegar a 270°C, manteniéndose por 2 min.; finalmente la temperatura subió a 5°C/min hasta 300°C permaneciendo así durante 4 min. Con respecto al espectrómetro de masas, la línea de transferencia y la fuente de iones se ajustaron a 320 y 230°C, en el modo de ionización por impacto electrónico (70 eV). Los fragmentos iónicos se detectaron en modo scan (50 - 865 m/z). La interpretación de espectros se efectuó mediante la base de datos del equipo (NIST).

La información proporcionada por el software incluyó el nombre para cada compuesto, junto con diversos estadísticos que indicaron la similitud entre el espectro de la muestra y los espectros de la base de datos. El factor de coincidencia (MF) indicó la similitud del espectro desconocido con los espectros de la base de datos. Mientras que, el factor de coincidencia inversa (RMF) se refirió a dicha similitud ignorando las señales m/z del espectro desconocido que no coincidieron con los espectros de la biblioteca. El RMF fue útil en los casos donde se observó ruido en el espectro. Valores superiores a 900 indicaron una coincidencia alta y valores entre 800 y 900, fueron empleados como coincidencias buenas.

Análisis estadístico

Todos los experimentos se efectuaron por triplicado. Los resultados de las pruebas inhibición de la agregación plaquetaria, inhibición de la fosfolipasa A₂, tiempo de protrombina, tiempo de tromboplastina parcialmente activada y lisis del coágulo, se analizaron con un modelo multifactorial, para determinar si hubo diferencia estadística significativa entre los diferentes solventes y las distintas concentraciones evaluadas. Se verificaron los supuestos estadísticos y se consideró $p < 0.05$ como nivel de significancia. El procesamiento de los datos se efectuó mediante el software Statgraphics Centurion XVI®.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Preparación de los extractos

Tomando en cuenta el porcentaje de humedad, se necesitaron 26.71 g de hojas para preparar los extractos. La extracción no secuencial por maceración empleando los solventes agua, etanol, acetona, acetato de etilo, éter dietílico y hexano, generó 6 extractos cuyos rendimientos de extracción se presentan en la Tabla 3.

Tabla 3. Rendimientos promedio de los extractos de chaya obtenidos por maceración con los distintos solventes.

Solvente	Extracción (% p/p)
Agua	25.30 ± 4.31
Etanol	13.87 ± 1.80
Éter dietílico	7.41 ± 0.04
Acetona	7.10 ± 0.34
Acetato de etilo	7.08 ± 1.05
Hexano	6.43 ± 0.69

Como se observa en la Tabla anterior, rendimientos de extracción variaron entre 6.43 ± 0.69 y $25.30 \pm 4.31\%$ (p/p), correspondientes al extracto hexánico y acuoso, respectivamente. El disolvente que logró el mayor porcentaje extractivo fue el acuoso. La polaridad del disolvente empleado y la naturaleza química de los metabolitos vegetales, son los parámetros de mayor influencia en el rendimiento extractivo (Metrouh-Amir *et al.*, 2015). Según los resultados de este trabajo, los metabolitos presentes en las hojas de chaya demostraron mayor afinidad hacia el solvente agua, lo que pudo deberse a que poseen estructura polar. Sin embargo, Do *et al.*, 2014 mencionó que este efecto también puede ser debido a la mayor solubilidad de las proteínas y carbohidratos vegetales en agua que en disolventes como el etanol y acetona.

El segundo extracto con mayor rendimiento extractivo fue el etanólico con 13.87%. Por último, los extractos obtenidos con acetona, éter dietílico, acetato de etilo y hexano, presentaron el menor rendimiento, sin presentar diferencias entre ellos. Galanakis *et al.* 2013 reportaron que los disolvente polares próticos, tales como el etanol, al poseer un grupo hidroxilo en su estructura química, son capaces de formar puentes de hidrógeno con metabolitos fenólicos. En contraste, los disolventes polares apróticos, como la acetona, el acetato de etilo y el éter dietílico, forman menos puentes polares con metabolitos fenólicos. Lo anterior pudo estar correlacionado con el mayor rendimiento extractivo del disolvente etanol. El disolvente hexánico, por su baja polaridad, pudo estar extrayendo únicamente metabolitos hidrofóbicos, indicando que la chaya posee una baja concentración de dichos metabolitos (Bhebhe *et al.*, 2016).

Evaluación de la actividad antitrombótica *in vitro*

Actividad antiagregante

Inhibición de la agregación plaquetaria

En la Figura 9 se presenta el efecto en la inhibición de la agregación plaquetaria, de los extractos a sus respectivas concentraciones. Se evaluó el efecto biológico del control negativo, que consistió en DMSO 0.1% (v/v) disuelto en solución salina. Éste, no demostró inhibir la agregación plaquetaria, indicando que el empleo del mismo como disolvente de los extractos no interferirá en el proceso biológico estudiado. A la concentración de 0.1 mg/mL, los extractos no demostraron efecto alguno. Esto posiblemente se debió a que los metabolitos secundarios presentes a esta concentración, no fueron capaces de producir efecto alguno en la agregación de las plaquetas. A la concentración de 1 mg/mL, la actividad biológica varió entre el 13 y 34%, correspondiente a los extractos hexánico y etanólico, respectivamente. El porcentaje de inhibición de los extractos a esta concentración aumentó en el orden: hexano < acetona < agua = éter dietílico = acetato de etilo < etanol, conformando según su efecto biológico 4 grupos, los cuales, como se puede apreciar en la Figura 9, presentan diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) entre ellos.

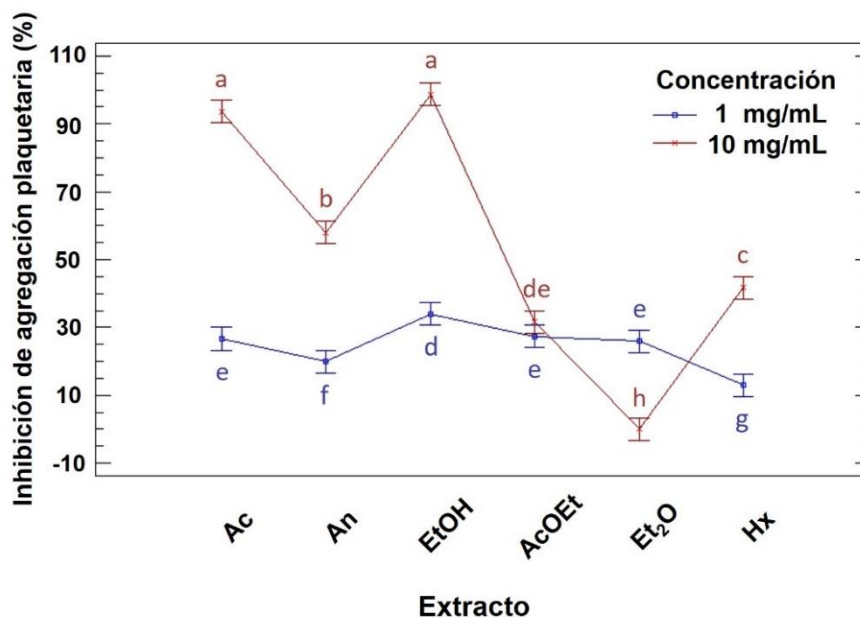


Figura 9. Gráfica de los efectos observados en la agregación plaquetaria debido a los distintos extractos a sus respectivas concentraciones. ^{a-h}Letras minúscula distintas indican diferencia estadística significativa entre tratamientos ($p < 0.05$). $n = 3$. Ac: acuoso; An: acetona; EtOH: etanol; AcOEt: acetato de etilo; Et₂O: éter dietílico; Hx: hexano.

A la concentración de 10 mg/mL, la actividad biológica varió entre el 0 y 100%, correspondiente a los extractos obtenidos con éter dietílico y etanol, respectivamente. El porcentaje de inhibición de los extractos a esta concentración aumentó en el orden: éter dietílico < acetato de etilo < hexano < acetona < agua = etanol, conformando según su efecto biológico 5 grupos, los cuales presentan diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) entre ellos. A esta concentración, el extracto acetato de etilo pudo haber causado el menor porcentaje de inhibición, debido a que a 1 mg/mL, los metabolitos presentes en dicho extracto posiblemente saturaron las enzimas plaquetarias. Por lo que aumentar la concentración del extracto de acetato de etilo no influyó en el porcentaje de inhibición de la agregación plaquetaria. Al evaluar el control positivo, el cual consiste en una solución comercial de aspirina, se observó que a 0.1 mg/mL, dicho control no reportó efecto antiagregante. Sin embargo, la solución comercial de aspirina a 1 y 10 mg/mL, demostró inhibir el 100% de la actividad biológica. Lo anterior pone de manifiesto que los extractos de chaya, a la concentración de 10 mg/mL, poseen efecto antiagregante similar al fármaco comercial aspirina.

El efecto antiagregante de los extractos obtenidos en el presente estudio, puede atribuirse a la sinergia de los metabolitos extraídos por los distintos disolventes. Se ha reportado que las hojas de chaya, poseen diversos metabolitos con efecto antiagregante, como los triterpenos pentacíclicos, saponinas con esqueleto oleanano, flavonoides y ácidos fenólicos. El extracto etanólico, posiblemente debido a su polaridad mediana, extrajo metabolitos tanto polares como apolares, lo cual puede estar relacionado con su mayor actividad antiagregante (Adeniran *et al.*, 2013). En contraste, se ha reportado que el agua extrae principalmente metabolitos polares como los flavonoides glicosilados y las saponinas triterpénicas. Aunque los flavonoides glicosilados han reportado menor efecto antiagregante que su forma aglicona, posiblemente la sinergia de los metabolitos glicosilados, influyó en la actividad antiagregante del extracto acuoso.

Inhibición de la fosfolipasa A₂

En la Figura 10 se presenta el efecto en la inhibición de la fosfolipasa A₂ de los extractos a sus respectivas concentraciones. Se evaluó el efecto biológico del control negativo, que consistió en DMSO 0.1% (v/v) disuelto en solución salina. Éste, no demostró inhibir la fosfolipasa A₂, indicando que el empleo del mismo como disolvente de los extractos no interferirá en el proceso biológico estudiado. A la concentración de 0.1 y 1 mg/mL, ningún extracto inhibió la acción catalítica del veneno. Esto pudo deberse a que las saponinas presentes en los extractos de chaya promovieron la permeabilización de la membrana eritrocitaria, siendo este efecto independiente a la inhibición de la fosfolipasa A₂ (Moses *et al.*, 2014). A la concentración de 10 mg/mL, la actividad biológica varió entre -22 y 44%, correspondiente a los extractos obtenidos con hexano y etanol, respectivamente. El porcentaje de inhibición de los extractos a esta concentración aumentó en el orden: hexano < acetona < acetato de etilo < agua < éter

dietílico < etanol, conformando según su efecto biológico 6 grupos, los cuales presentan diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$) entre ellos. Para el control positivo se tomó como referencia lo reportado por la quercetina (Pereañez *et al.*, 2010). Este flavonoide ha demostrado inhibir el 50% de la actividad de la fosfolipasa A_2 a una concentración de $0.813 \mu\text{g/mL}$. Lo anterior puede ser atribuido a que el flavonoide pudo estar interactuando directamente con la fosfolipasa A_2 .

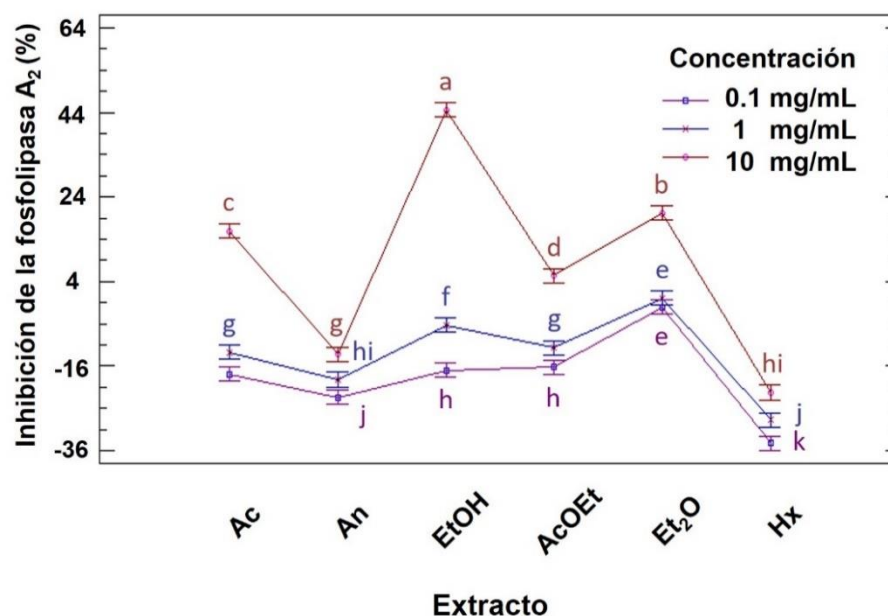


Figura 10. Gráfica de los efectos observados en la inhibición de la fosfolipasa A_2 debido a los distintos extractos a sus respectivas concentraciones. ^{a-k}Letras minúscula distintas indican diferencia estadística significativa entre tratamientos ($p < 0.05$). $n = 3$. Ac: acuoso; An: acetona; EtOH: etanol; AcOEt: acetato de etilo; Et₂O: éter dietílico; Hx: hexano.

Diversos estudios han reportado que, los triterpenos pentacíclicos, saponinas triterpénicas, ácidos fenólicos y flavonoides presentes en las hojas de chaya, inhiben la fosfolipasa A_2 (Ramesh-Kumar *et al.*, 2012; Romero-Estrada *et al.*, 2016; Zheng *et al.*, 2015). El extracto etanólico, posiblemente presentó el mayor efecto inhibidor debido a que extrae mayor cantidad de compuestos fenólicos y triterpenos pentacíclicos del tipo oleanano, comparado con los solventes acetona y agua. El efecto sinérgico de los metabolitos presentes en este extracto resultó ser el más activo, debido a que la mediana polaridad del etanol, pudo estar extrayendo metabolitos polares y apolares (Ngo *et al.*, 2017; Schneider *et al.*, 2009). Se ha reportado que el agua extrae diversas moléculas glicosídicas, tales como flavonoides glicosilados y saponinas triterpénicas. Al respecto, Lago *et al.* (2014) y Toyama *et al.* (2014), han reportado que las sustituciones glicosídicas influyen en la interacción del metabolito con la fosfolipasa A_2 , pudiendo

aumentar o disminuir la actividad enzimática. Lo anterior puede estar relacionado con el menor porcentaje de inhibición del extracto acuoso comparado con el etanólico. Entre el extracto éter dietílico y acetato de etilo, el primero posiblemente demostró mayor inhibición, con diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) entre los dos extractos, debido a que su mayor hidrofobicidad fue un determinante clave para extraer metabolitos apolares activos contra la fosfolipasa A₂ (Yasmen et al., 2018).

Actividad anticoagulante

Tiempo de protrombina y tiempo trombolastina parcialmente activada

La actividad anticoagulante de los extractos de hoja de chaya se investigó mediante los ensayos TP y TTPA. La primera prueba se usa para evaluar los factores de coagulación tales como el II (factor tisular), V y VII, los cuales están involucrados en la coagulación de la vía extrínseca, mientras que la segunda prueba se usa para evaluar los factores VIII, IX, X, XII, los cuales están involucrados en la coagulación de la vía intrínseca (Quinn et al., 2016). En la Figura 11 se presenta el efecto en la inhibición de la coagulación sanguínea de los extractos a sus respectivas concentraciones.

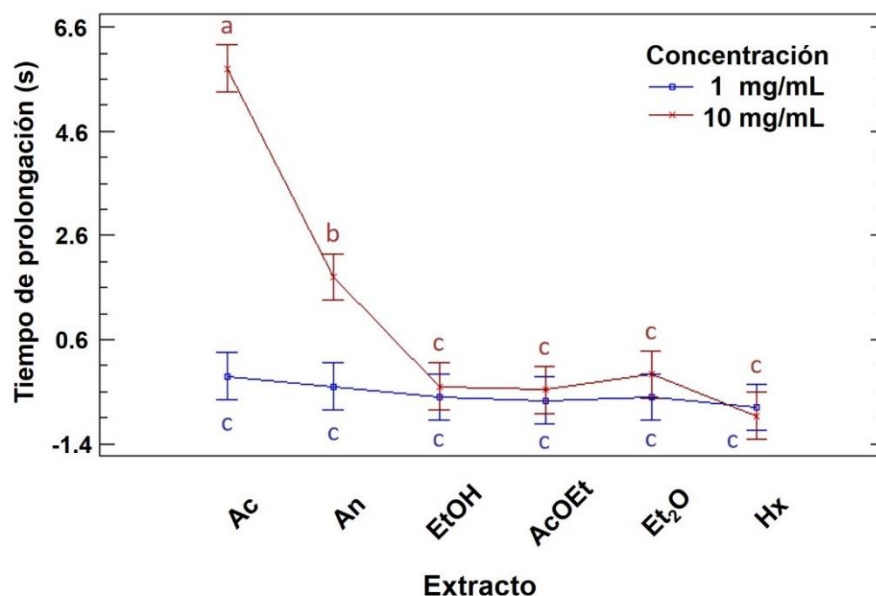


Figura 11. Gráfica de los efectos observados en la inhibición de la coagulación sanguínea de la vía extrínseca debido a los distintos extractos a sus respectivas concentraciones. ^{a-c}Letras minúscula distintas indican diferencia estadística significativa entre tratamientos ($p < 0.05$). $n = 3$. Ac: acuoso; An: acetona; EtOH: etanol; AcOEt: acetato de etilo; Et₂O: éter dietílico; Hx: hexano.

Se evaluó el efecto biológico del control negativo, que consistió en DMSO 0,1% (v/v), el cual, no demostró prolongar la coagulación sanguínea comparado con los valores normales de coagulación (13.1 ± 0.3 s para la prueba TP y 27.9 ± 0.7 s para la prueba TTPA), lo que indica que el disolvente empleado no causa interferencia alguna en el proceso biológico estudiado. En la prueba de tiempo de protrombina, todos los extractos a la concentración de 0.1 y 1.0 mg/mL no prolongaron la coagulación sanguínea. Sin embargo, a la concentración de 10 mg/mL, el extracto acuoso y el acetónico prolongaron los tiempos de coagulación en 5.8 ± 0.5 y 1.8 ± 0.36 s, respectivamente con diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) con los demás extractos. El control positivo, consistente en heparina 75 USP, demostró prolongar la coagulación sanguínea en 74.4 ± 0.3 s. Este fármaco ha demostrado ocasionar hemorragias en más del 10% de los pacientes. Por lo que los extractos de chaya, al prolongar menor tiempo la coagulación sanguínea, posiblemente no presenten efecto hemorrágico (Ingle *et al.*, 2017).

Los resultados obtenidos en el presente estudio, por la composición química de las hojas de chaya, pueden estar relacionados con la presencia de triterpenos, saponinas y flavonoides (Lee *et al.*, 2012; Mira *et al.*, 2017; Thom *et al.*, 2018). El extracto etanólico posiblemente extrajo flavonoides con grupos hidroxilo y compuestos triterpénicos. Aunque estos metabolitos han demostrado inhibir la coagulación debido a la vía extrínseca (Choi *et al.*, 2015; Mira *et al.*, 2017), el efecto sinérgico del extracto etanólico de chaya no presentó dicho efecto anticoagulante. Probablemente la mezcla compleja de metabolitos presentes en este extracto, podrían estar interfiriendo con el efecto anticoagulante de los flavonoides y los triterpenos (Wee *et al.*, 2010). El extracto acuoso, a pesar de que probablemente no extrajo alta concentración de flavonoides con grupos hidroxilo y compuestos triterpénicos, presentó el mayor efecto anticoagulante debido a la vía intrínseca. Este efecto biológico pudo deberse a la acción sinérgica de los flavonoides glicosilados y saponinas triterpénicas (Ku *et al.*, 2013; Xiong *et al.*, 2017). El extracto acetónico de igual forma demostró efecto anticoagulante, el cual fue menor al observado en el extracto acuoso. Lo anterior posiblemente esté relacionado a los flavonoides glicosilados, los cuales, poseen menor afinidad al disolvente acetona comparado con el extracto acuoso, lo que se ve reflejado en la menor prolongación de la coagulación (Chebil *et al.*, 2007).

Los resultados obtenidos en la prolongación de la coagulación de la vía intrínseca se presentan en la Figura 12.

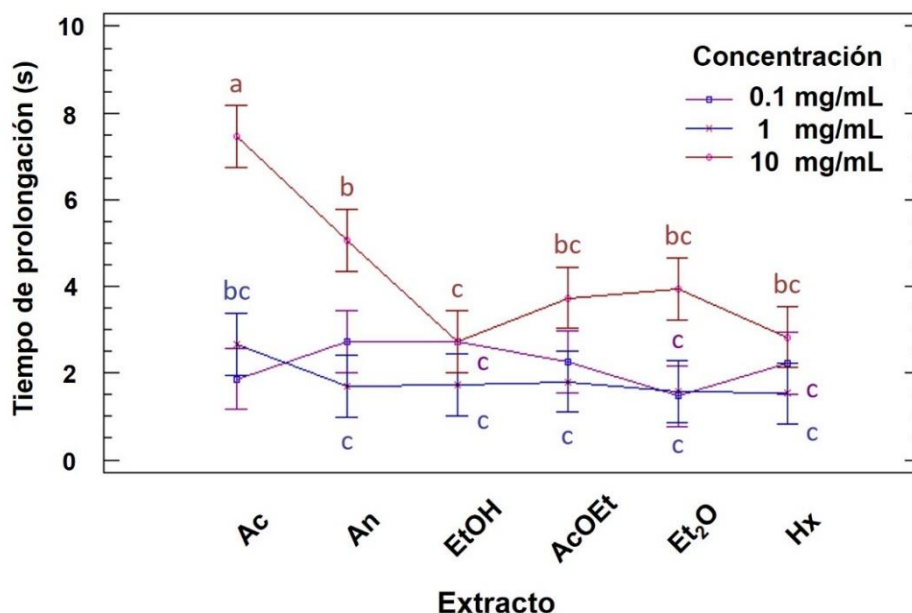


Figura 12. Gráfica de los efectos observados en la inhibición de la coagulación sanguínea de la vía intrínseca debido a los distintos extractos a sus respectivas concentraciones. ^{a-c}Letras minúscula distintas indican diferencia estadística significativa entre tratamientos ($p < 0.05$). $n = 3$. Ac: acuoso; An: acetona; EtOH: etanol; AcOEt: acetato de etilo; Et₂O: éter dietílico; Hx: hexano.

En esta prueba, el efecto anticoagulante de todos los extractos a la concentración de 0.1 y 1.0 mg/mL no presentó diferencia estadística significativa ($p < 0.05$), prolongando la coagulación en tiempos que variaron entre 1.5 y 2.7 s. A la concentración de 10 mg/mL, nuevamente el extracto acuoso y el acetónico fueron los que mayor efecto biológico presentaron, con diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) y tiempos de prolongación de 7.46 ± 0.80 y 5.06 ± 1.15 segundos, respectivamente. En general, todos los extractos demostraron prolongar la coagulación, lo que indicaría que los metabolitos secundarios en chaya poseen mayor afinidad hacia los factores coagulantes de la vía intrínseca. Diversos estudios indican que, los flavonoides en su forma glicosídica (Ku *et al.*, 2013; Pawlaczyk-Graja, 2018), aglicona (Mira *et al.*, 2017; Ryu *et al.*, 2015) y metilada (Ku *et al.*, 2013), han demostrado una mayor prolongación de la coagulación en la vía intrínseca. De igual forma se ha reportado el efecto anticoagulante de diversos triterpenos, los cuales también presentaron mayor afinidad hacia los factores coagulantes de la vía intrínseca, siendo esta la razón por la que el extracto hexánico, a pesar no contener flavonoides, reportó poseer este efecto anticoagulante (Lee *et al.*, 2012; Mosa *et al.*, 2015; Osunsanmi *et al.*, 2018).

Actividad fibrinolítica

Lisis del coágulo

En la Figura 13 se presenta el efecto en la lisis del coágulo debido a los extractos a sus respectivas concentraciones. Se evaluó el efecto biológico del control negativo que consistió en DMSO 0.1% (v/v), el cual, no demostró lisar los coágulos, lo que indica que el disolvente utilizado para disolver los extractos no interfirió en el proceso biológico estudiado. En general, se pudo observar que todos los extractos presentaron un comportamiento dosis-dependiente en la lisis del coágulo con diferencia estadística significativa entre las concentraciones 1 y 10 mg/mL, a excepción de los extractos etanólico y éter dietílico, los cuales no presentaron diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) a sus 3 concentraciones de estudio. Estos extractos, posiblemente alcanzaron su mayor efecto biológico a la concentración de 0.1 mg/mL, logrando la máxima conversión de plasminógeno a plasmina, por lo que, al aumentar la concentración, no se observó incremento en su actividad biológica. El grupo homogéneo conformado por los extractos acetato de etilo, acetónico y hexánico a 10 mg/mL, tuvieron el mayor efecto fibrinolítico con porcentajes que variaron entre 18.4 y 24%. En contraste, la estreptoquinasa ha reportado una capacidad lisante del 76% a 30,000 UI/mL, lo equivalente a 62.7 mg/mL (Bangham & Walton, 1965; Kabir et al., 2016).

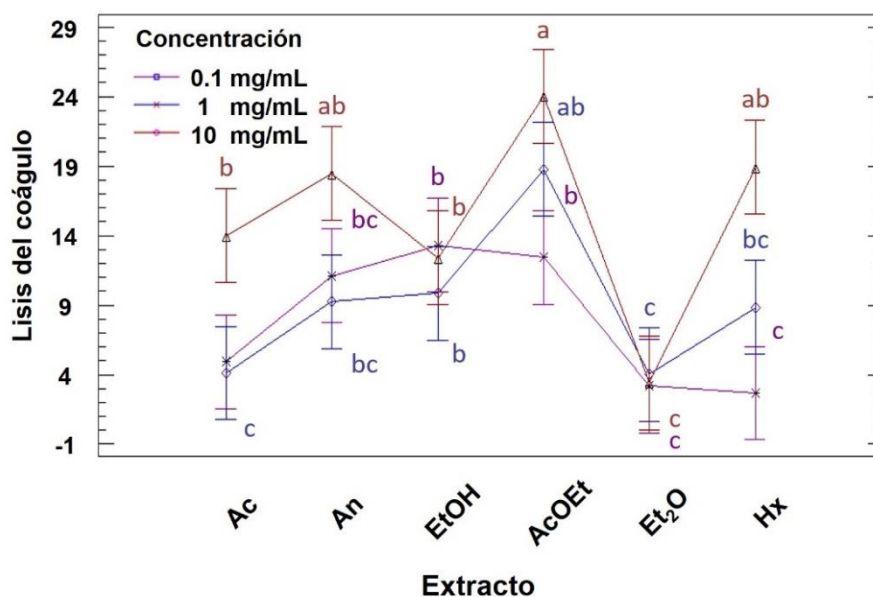


Figura 13. Gráfica de los efectos observados en la lisis del coágulo debido a los distintos extractos a sus respectivas concentraciones. ^{a-c}Letras minúscula distintas indican diferencia estadística significativa entre tratamientos ($p < 0.05$). $n = 3$. Ac: acuoso; An: acetona; EtOH: etanol; AcOEt: acetato de etilo; Et₂O: éter dietílico; Hx: hexano.

Mahmud *et al.* (2015) evaluaron el efecto fibrinolítico de 5 extractos metanólicos de plantas originarias de Bangladesh y concluyeron que, los metabolitos glicosilados del tipo flavonoide, esteroide y glicósido cardíaco, presentaron afinidad al sitio activo del plasminógeno. Considerando el estudio anterior, el efecto fibrinolítico de los extractos de chaya podría relacionarse con la presencia de metabolitos glicosilados como los flavonoides y las saponinas. A pesar de que el agua, por su polaridad, posee mayor afinidad hacia las saponinas y flavonoides glicosilados, la polaridad mediana del acetato de etilo y de la acetona permitió una extracción selectiva de estos compuestos, lo que influyó en su mayor actividad fibrinolítica. Diversos estudios indican que, este disolvente es capaz de extraer metabolitos fibrinolíticos, siendo mayor o igual su efecto comparado con disolventes como el metanol, etanol y agua (Tamilarsan *et al.*, 2015; Zaman *et al.*, 2015).

Se ha reportado que el hexano no es capaz de extraer moléculas glicosiladas de las hojas de chaya (García-Rodríguez *et al.*, 2014), razón por la que se podría inferir que este extracto no ejercería efecto fibrinolítico. Sin embargo, los datos obtenidos en el presente trabajo, demuestran que, este extracto no presentó diferencia estadística significativa con el efecto fibrinolítico del extracto acetato de etilo. Lo anterior, demuestra que el efecto lisante del extracto hexánico pudo ser debido a los triterpenos pentacíclicos (Luong *et al.*, 2003). En contraparte, el solvente éter dietílico pudo haber presentado el menor efecto fibrinolítico, debido a que los metabolitos glicosilados, poseen menor afinidad hacia solventes de baja polaridad (Plaza *et al.*, 2014).

Identificación de metabolitos mayoritarios presentes en extractos de chaya por cromatografía de gases con detección por espectrometría de masas (GC-MS)

Los extractos con mayor actividad biológica en los ensayos inhibición de la agregación plaquetaria, tiempo de protrombina, tiempo de tromboplastina parcialmente activada e inhibición de la fosfolipasa A₂, fueron el acuoso y el etanólico. Por la volatilidad de ambos extractos, únicamente el etanólico fue analizado por GC-MS. En el cromatograma obtenido (Figura 14) se pueden observar nueve picos mayoritarios. Siete pudieron ser identificados con base en la literatura y la biblioteca del equipo, a los cuales, se les asignaron los números 1, 3, 4, 5, 6 y 10. Así mismo, fue posible identificar cuatro compuestos minoritarios, a los que se les asignaron los números 2, 7 y 8.

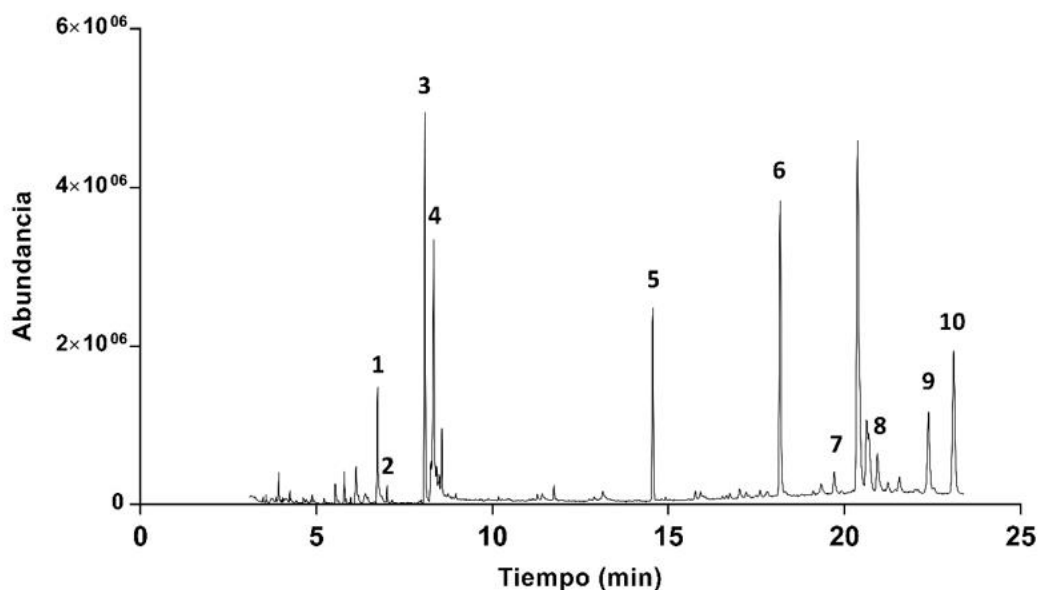


Figura 14. Cromatograma del extracto etanólico de chaya obtenido mediante cromatografía de gases con detección por espectrometría de masas.

En la Tabla 4, para cada compuesto se presenta, el tiempo de retención (t_R), el nombre del metabolito identificado, el factor de coincidencia, el factor de coincidencia inverso (MF/RMF) y los principales fragmentos iónicos.

En el espectro del pico con t_R de 6.71 min (**1**), se observó una serie de fragmentos que variaban en 14 unidades del ion 73 al 227 m/z. Dicha fragmentación es característica de la pérdida de grupos metileno [-CH₂-] de ácidos grasos alifáticos. El ion molecular se observó a 256 m/z y el fragmento a 239 m/z está relacionado a la ruptura en el carbono α del ácido carboxílico. Los datos anteriores confirman la identidad del ácido palmítico. El pico con t_R de 8.33 min. (**2**) reportó un ion base a 88 m/z y una serie de fragmentos que variaban en 14 unidades del ion 101 al 255 m/z. Lo anterior, corresponde al reordenamiento de McLafferty y a la pérdida de grupos metileno de esteres etílicos de cadena larga. Los fragmentos 284 y 239 m/z corresponden al ion molecular y a la pérdida del grupo etoxilo [-O-CH₂-CH₃], respectivamente, confirmando la identidad del palmitato de etilo. Los valores del factor MF/RMF para ambos metabolitos reportados por el equipo fueron de 934/935 y 880/880, indicando una alta y buena coincidencia de los espectros de estudio con los de la base de datos.

Tabla 4. Metabolitos mayoritarios identificados por cromatografía de gases acoplado a espectrómetro de masas en el extracto etanólico de hojas de chaya.

No.	Tr (min.)	Nombre del compuesto	MF/RMF (%)	Iones representativos (abundancia relativa %)
1	6.71	Ácido palmítico	934/935	73 (100), 129 (50), 157 (19), 213(29), 256 (33)
2	7.10	Palmitato de etilo	880/880	88 (100), 101 (62), 157 (18), 239 (8), 284 (10)
3	8.07	Fitol	938/952	71 (100), 81 (22), 123 (18), 296 (0.2)
4	8.32	Ácido α -linolénico	939/942	79 (100), 93 (50), 108 (39), 222 (7), 278 (3)
5	14.55	Escualeno	960/960	69 (100), 81 (55), 95 (15), 137 (13), 410 (0.8)
6	18.17	Vitamina E	943/945	165 (100), 205 (10), 430 (89)
7	19.70	Estigmasterol	870/903	55 (100), 255 (63), 213 (86)
8	20.93	β -amirina	887/894	189 (13), 203 (43), 218 (100) 426 (3)
9	22.39	Acetato de β -amirina	903/907	189 (18), 203 (48), 218 (100), 468 (3)
10	23.10	Acetato de lupeol	903/903	107 (68), 135 (56), 189 (100), 468

Se ha demostrado que, el ácido palmítico **(1)** posee propiedades antitrombóticas, debido a que inhibe de manera competitiva la fosfolipasa A₂ (Aparna *et al.*, 2012). Por otro lado, el palmitato de etilo **(2)** ha demostrado efectos antiinflamatorios al reducir los del factor nuclear kappa β , sustancia involucrada en la expresión de la isoforma 2 de la ciclooxygenasa (Saeed *et al.*, 2012).

El espectro del pico con t_R de 8.32 min. **(4)** presentó un ion base a 79 m/z y una serie de fragmentos que variaban en 14 unidades del ion 93 al 163 m/z. Dichos fragmentos son característicos de los trienos con interrupción de metilenos. Los fragmentos 108 y 222 m/z corresponden a los iones ω y α , los cuales indican un doble enlace terminal n-3 y un primer doble enlace en la posición 8 desde el carbono carboxílico, respectivamente. Los fragmentos anteriores, junto con el ion molecular a 278 m/z confirman la identidad del ácido α -linolénico. El valor del factor MF/RMF para este metabolito fue de 939/942, indicando una alta coincidencia del espectro de estudio con el de la base de datos.

El ácido linolénico **(4)** pertenece a la familia de los ácidos grasos omega-3, los cuales han demostrado poseer efectos antitrombóticos y antiateroscleróticos. Estos ácidos grasos poliinsaturados han demostrado reducir la presión arterial, mejorando así la función endotelial y han demostrado aumentar los niveles plasmáticos de lipoproteína de alta densidad. Los estudios epidemiológicos han asociado el consumo de este tipo de ácidos grasos con la disminución en la incidencia tanto del infarto de miocardio como del accidente cerebrovascular (Mozaffarian & Wu, 2011). Se ha reportado que la chaya contiene 58.9 g de ácidos grasos por cada 100 g de hoja, de los cuales, 50% corresponden a los ácidos omega-3, lo que indica que esta planta posee un perfil de ácidos grasos adecuado para el consumo humano, los cuales pueden ejercer efecto protector contra los procesos trombóticos (Kumar et al., 2011).

El espectro de masas del pico con t_R de 8.07 min. **(3)** presentó un ion base a 71 m/z, un ion molecular a 296 m/z y algunos fragmentos tales como 81, 95 y 123. Estos datos corresponden a la fragmentación característica del fitol, cuyo espectro demostró alta similitud con el espectro de la base de datos con valores de MF/RMF de 938/952. Este metabolito es un diterpeno que se encuentra en abundancia en la naturaleza y forma parte de la estructura química de la clorofila. Ha reportado ejercer diversos efectos, tales como el antimicrobiano, antioxidante, ansiolítico y anticonvulsivo. Sin embargo, hasta la fecha no ha reportado ejercer efectos sobre los sistemas involucrados en el proceso de la trombosis (Islam *et al.*, 2018).

El espectro de masas del compuesto con t_R de 14.55 min. **(5)** presentó un ion base a 69 m/z y diversos fragmentos a 81, 95, 121, 137 y 149 m/z. El ion molecular se detectó a 410 m/z. Los datos anteriores correspondieron al escualeno, cuyo espectro tuvo una alta coincidencia con el espectro de la biblioteca con valores de MF/RMF de 960/960. Este compuesto es precursor de los triterpenos, por lo que se encuentra ampliamente distribuido en las plantas (Lozano-Grande *et al.*, 2018). El escualeno, aunque no ha reportado poseer efectos relacionados a la hemostasia sanguínea, ha demostrado ejercer efecto cardioprotector en un modelo de ratas albinas macho de la cepa Wistar, las cuales fueron inducidas a infarto de miocardio por el medicamento isoprenalina. La suplementación por 45 días con alimento comercial adicionado con 2% de escualeno previo a la inducción al infarto, demostró prevenir las alteraciones del tejido cardíaco, lo que pudo estar relacionado con la propiedad estabilizadora de membrana atribuida al escualeno. Además, este metabolito hidrofóbico inhibió la peroxidación lipídica y mantuvo en los niveles basales la concentración del agente antioxidante no enzimático glutatión (Farvin *et al.*, 2007).

El espectro de masas del compuesto con t_R de 18.17 min. **(6)** presentó ion molecular y base a 430 y 165 m/z y diversos iones a 205, 177 y 121 m/z. Estos fragmentos han sido reportados por Bruinen et al. (2018), quien mencionó que pertenece a la fragmentación específica del α -tocoferol. El espectro de este metabolito presentó una alta coincidencia con el espectro de la biblioteca con valores de MF/RMF de 943/945. Este compuesto, también conocido como vitamina E, ha demostrado inhibir la agregación y la adhesión plaquetaria mediante cuatro mecanismo propuestos: 1) inhibición de la proteína quinasa C, inhibiendo la secreción del contenido de los gránulos plaquetarios, 2) inhibición de la enzima γ -carboxilasa dependiente de la vitamina K, necesaria para el correcto funcionamiento de los factores coagulantes, 3) inhibición de la ruta del ácido araquidónico, inhibiendo a las enzimas ciclooxigenasa y tromboxano sintetasa, encargadas de la conversión del ácido araquidónico al agente agregante tromboxano A_2 y 4) reducción de la adhesividad plaquetaria, al interaccionar con receptores plaquetarios, disminuyendo la adhesión de las plaquetas al fibrinógeno y colágeno (Chakrabarti & Freedman, 2010; Couris, 2005).

El espectro de masas del compuesto con t_R de 19.70 min. **(7)** presentó el ion molecular y base a 412 y 55 m/z respectivamente. También, presentó diversos iones a 394, 351, 255 y 213 m/z, los cuales, según lo reportado por Suttiarporn *et al.*, (2015) pertenecen al triterpeno tetracíclico stigmasterol. El espectro de masas del pico con t_R de 20.93 min. **(8)** presentó un ion base a 218 m/z, característico de los triterpenos con esqueleto oleanano o ursano. Se pudo observar el ion molecular a 426 m/z, lo que sugirió una fórmula molecular $C_{30}H_{50}O$. Debido a que el ion 203 m/z, es más del doble de la intensidad del ion 189 m/z, según la fragmentación Retro Diels-Alder, dicho metabolito pudo identificarse como β -amirina. El equipo, al comparar los espectros de ambos metabolitos con la base de datos, reportó una buena coincidencia con valores de MF/RMF de 870/903 y 887/894 respectivamente (Fingolo *et al.*, 2013; Yam-Puc *et al.*, 2019).

Los espectros de masas de los compuestos con t_R de 22.39 **(9)** y 23.10 min. **(10)** presentaron como ion molecular 468 m/z. El primer compuesto presentó un ion base a 218, característico de los ésteres de amirina, mientras que el segundo, presentó un ion base a 189, característico de los compuestos de tipo lupano. Por lo que ambos compuestos fueron identificados como acetato de amirina y acetato de lupeol (Yam-Puc *et al.*, 2019). El equipo, al comparar los espectros de ambos metabolitos con la base de datos, reportó una alta coincidencia con valores de MF/RMF de 903/903 y 903/093 respectivamente.

Amal *et al.* (2007) obtuvieron un extracto etanólico de la planta *Sesamum indicum* L., del cual, por fraccionamiento por partición, se obtuvieron las fracciones éter de petróleo y n-butanol. En la fracción éter de petróleo se identificaron los triterpenos tetracíclicos β -sitosterol, estigmasterol y estigmasterol-3-O- β -D-glucósido, los cuales fueron evaluados en las pruebas tiempo de coagulación y tiempo de protrombina. Dicha fracción demostró prolongar el tiempo de coagulación de ambas vías, demostrando la interacción de los metabolitos con las enzimas coagulantes.

El triterpeno pentacíclico β -amirina (**8**), ha demostrado inhibir la agregación plaquetaria en plasma sanguíneo humano contra el agente agonista ADP, lo que demuestra su efecto antagonista de los receptores plaquetarios P_2Y_1 y P_2Y_{12} (Aragão *et al.*, 2007). Por último, los triterpenos acetato de olean-12-en-ilo (9) y acetato lupeol (**10**), los cuales poseen un grupo acetilo unido al carbono 3. En un estudio *in silico*, el grupo acetilo del triterpeno taraxerol demostró cierta afinidad hacia diversos residuos aminoacídicos presente ambas isoformas de la enzima ciclooxigenasa, lo que sugiere que los triterpenos acetilados identificados en hojas de chaya, son capaces de inhibir esta enzima plaquetaria (Rehman *et al.*, 2013).

Con los resultados anteriores se puede demostrar que la chaya, debido a que su composición química, presenta efecto antitrombótico, por lo que la obtención e identificación de los metabolitos activos puede ser una estrategia para la obtención de moléculas con potencial antitrombótico.

CONCLUSIONES

Los extractos de *Cnidoscolus aconitifolius* a la concentración de 10 mg/mL presentaron el mayor efecto inhibidor de la agregación plaquetaria (31 - 99%), destacando el efecto del extracto acuoso y etanólico.

Los extractos obtenidos con agua, etanol, acetato de etilo y éter dietílico a la concentración de 10 mg/mL inhibieron la fosfolipasa A₂ (5 - 44%), destacando el mayor efecto del extracto etanólico.

Los extractos obtenidos con agua y acetona prolongaron la coagulación sanguínea debido a la vía extrínseca e intrínseca, con tiempos que variaron entre 1.8 - 5 y 2.7 - 7.4s, destacando el mayor efecto biológico del extracto acuoso.

Todos los extractos, excepto el obtenido con éter dietílico, causaron la lisis del coágulo (2 - 24%), destacando el mayor efecto del extracto obtenido con acetato de etilo.

En el extracto etanólico se identificó la presencia de ácidos grasos saturados e insaturados, vitamina E y diversos triterpenos que están relacionados con la actividad antitrombótica del extracto.

REFERENCIAS

- Achi, N., Ohaeri, C., Ijeh, I., Eleazu, C., Igwe, K., y Onyeabo, C. (2018). Ameliorative Potentials of Methanol Fractions of *Cnidoscopus aconitifolius* On Some Hematological And Biochemical Parameters In Streptozotocin Diabetic Rats. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets*, 18(6), 637-645.
- Adanlawo, I. G., y Elekofehinti, O. O. (2012). Proximate analysis, mineral composition and amino acid composition of *Cnidoscopus aconitifolius* leaf. *Advances in Food and Energy Security*, 2(2012), 17–21.
- Adeniran, O. I., Olajide, O. O., Igwemmar, N. C., y Orishadipe, A. T. (2013). Phytochemical constituents, antimicrobial and antioxidant potentials of tree spinach [*Cnidoscopus aconitifolius* (Miller) I. M. Johnston]. *Journal of Medicinal Plants Research*, 7(19), 1310–1316.
- Ain, Q. U., Khan, H., Mubarak, M. S., y Pervaiz, A. (2016, Septiembre). Plant alkaloids as antiplatelet agent: Drugs of the future in the light of recent developments. *Frontiers in Pharmacology*, 7. Consultada el 13 de octubre de 2018, <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2016.00292/full>
- Alape-Girón, A., Sanz, L., Escolano, J., Flores-Díaz, M., Madrigal, M., Sasa, M., y Calvete, J. J. (2008). Snake Venomics of the Lancehead Pitviper *Bothrops asper*: Geographic, Individual, and Ontogenetic Variations. *Journal of Proteome Research*, 7(8), 3556–3571.
- Aluganti-Narasimhulu, C., Fernandez-Ruiz, I., Selvarajan, K., Jiang, X., Sengupta, B., Riad, A., y Parthasarathy, S. (2016). Atherosclerosis - do we know enough already to prevent it? *Current Opinion in Pharmacology*, 27, 92–102.
- Amal, E., Khaleel, A., Gonaid, M., El-Bagary, R., Sleem, A., y Shabana, M. (2007). Chemical and Biological Study of the Residual Aerial Parts of *Sesamum indicum* L. *Journal of Food and Drug Analysis*, 15(3), 249–257.
- Amin, S., y Khan, H. (2016). Revival of Natural Products: Utilization of Modern Technologies. *Current Bioactive Compounds*, 12(2), 103–106.
- Ankli, A., Heilmann, J., Heinrich, M., y Sticher, O. (2000). Cytotoxic cardenolides and antibacterial terpenoids from *Crossopetalum gaumeri*. *Phytochemistry*, 54(5), 531–537.
- Aparna, V., Dileep, K. V., Mandal, P. K., Karthe, P., Sadasivan, C., y Haridas, M. (2012). Anti-Inflammatory Property of n-Hexadecanoic Acid: Structural Evidence and Kinetic Assessment. *Chemical Biology & Drug Design*, 80(3), 434–439.
- Aragão, G. F., Carneiro, L. M. V., Júnior, A. P. F., Bandeira, P. N., Lemos, T. L. G., y Viana, G. S. de B. (2007). Antiplatelet Activity of α and β Amyrin, Isomeric Mixture from *Protium heptaphyllum*. *Pharmaceutical Biology*, 45(5), 343–349.

- Ávalos-García, A., y Pérez-Urria, E. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal*, 2(3), 119–145.
- Bangham, D. R., y Walton, P. L. (1965). The international standard for streptokinase-streptodornase. *Bulletin of the World Health Organization*, 33(2), 235–242.
- Bhebhe, M., Füller, T. N., Chipurura, B., y Muchuweti, M. (2016). Effect of Solvent Type on Total Phenolic Content and Free Radical Scavenging Activity of Black Tea and Herbal Infusions. *Food Analytical Methods*, 9(4), 1060–1067.
- Bolarinwa, I. F., Oke, M. O., Olaniyan, S. A., y Ajala, A. S. (2016). A Review of Cyanogenic Glycosides. En S. Solenski y L. Larramendy (Eds.), *Edible Plants. En Toxicology - New Aspects to This Scientific Conundrum* (pp. 179-192). Londres: InTech.
- Bruinen, A. L., Fisher, G. L., Balez, R., Van Der Sar, A. M., Ooi, L., y Heeren, R. M. A. (2018). Identification and High-Resolution Imaging of α -Tocopherol from Human Cells to Whole Animals by TOF-SIMS Tandem Mass Spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 29(8), 1571–1581.
- Chakrabarti, S., y Freedman, J. E. (2010). Review: Nutraceuticals as Antithrombotic Agents. *Cardiovascular Therapeutics*, 28(4), 227–235.
- Chapin, J. C., y Hajjar, K. A. (2015). Fibrinolysis and the control of blood coagulation. *Blood Reviews*, 29(1), 17–24.
- Chebil, L., Humeau, C., Anthoni, J., Dehez, F., Engasser, J.-M., y Ghouil, M. (2007). Solubility of Flavonoids in Organic Solvents. *Journal of Chemical & Engineering Data*, 52(5), 1552–1556.
- Chen, C., Yang, F. Q., Zhang, Q., Wang, F. Q., Hu, Y. J., y Xia, Z. N. (2015, Marzo). Natural Products for Antithrombosis. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015. Consultada el 26 de noviembre de 2017, <https://www.hindawi.com/journals/ecam/2015/876426/>
- Choi, J. H., Park, J. K., Kim, K. M., Lee, H. J., y Kim, S. (2018). In vitro and in vivo antithrombotic and cytotoxicity effects of ferulic acid. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 32(1), 1–9.
- Choi, J. H., Park, S. E., Kim, S. J., y Kim, S. (2015). Kaempferol inhibits thrombosis and platelet activation. *Biochimie*, 115, 177–186.
- Christianson, D. W. (2017). Structural and Chemical Biology of Terpenoid Cyclases. *Chemical Reviews*, 117(17), 11570–11648.
- Couris, R. (2005). Vitamins and minerals that affect hemostasis and antithrombotic therapies. *Thrombosis Research*, 117(1–2), 25–31.

- Crowley, M. P., y Hunt, B. J. (2017). Venous thromboembolism and thrombophilia testing. *Medicine*, 45(4), 233–238.
- Deppermann, C. (2018). Platelets and vascular integrity. *Platelets*, 29(6), 549–555.
- Do, Q. D., Angkawijaya, A. E., Tran-Nguyen, P. L., Huynh, L. H., Soetaredjo, F. E., Ismadji, S., y Ju, Y. H. (2014). Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatica*. *Journal of Food and Drug Analysis*, 22(3), 296–302.
- Ebenezer, O. A., Kenneth, E., Monday, B. B., y Hilda, M. O. (2014). Fibrinolytic activity of some Nigerian medicinal plants. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2, 177–184.
- El-Shitany, N. A., El-Bastawissy, E. A., y El-desoky, K. (2014). Ellagic acid protects against carrageenan-induced acute inflammation through inhibition of nuclear factor kappa B, inducible cyclooxygenase and proinflammatory cytokines and enhancement of interleukin-10 via an antioxidant mechanism. *International Immunopharmacology*, 19(2), 290–299.
- Engelmann, B., y Massberg, S. (2013). Thrombosis as an intravascular effector of innate immunity. *Nature Reviews Immunology*, 13(1), 34–45.
- Erfani, F., Hassandokht, M. R., Jabbari, A., y Barzegar, M. (2007). Effect of Cultivar on Chemical Composition of Some Iranian Spinach. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 10(4), 602–606.
- Evans, C. S. (1989). 1. Plant phenolics. En J. B. Harborne (Ed.), *Methods in plant biochemistry* (vol.2, pp. 1-552). Nueva York: Academic Press.
- Falanga, A., Schieppati, F., y Russo, D. (2015). Cancer Tissue Procoagulant Mechanisms and the Hypercoagulable State of Patients with Cancer. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 41(07), 756–764.
- Farvin, K. H. S., Kumar, S. H. S., Anandan, R., Mathew, S., Sankar, T. V., y Nair, P. G. V. (2007). Supplementation of squalene attenuates experimentally induced myocardial infarction in rats. *Food Chemistry*, 105(4), 1390–1395.
- Fejes, Z., Póliska, S., Czimmerer, Z., Káplár, M., Penyige, A., Gál Szabó, G., ... Nagy, B. (2017). Hyperglycaemia suppresses microRNA expression in platelets to increase P2RY12 and SELP levels in type 2 diabetes mellitus. *Thrombosis and Haemostasis*, 117(03), 529–542.
- Fingolo, C., Santos, T., Filho, M., y Kaplan, M. (2013). Triterpene Esters: Natural Products from *Dorstenia arifolia* (Moraceae). *Molecules*, 18(4), 4247–4256.
- Fuentes, E., y Palomo, I. (2014). Antiplatelet effects of natural bioactive compounds by multiple targets: Food and drug interactions. *Journal of Functional Foods*, 6, 73–81.

- Galanakis, C. M., Goulas, V., Tsakona, S., Manganaris, G. A., y Gekas, V. (2013). A Knowledge Base for The Recovery of Natural Phenols with Different Solvents. *International Journal of Food Properties*, 16(2), 382–396.
- García-Rodríguez, R. V., Gutiérrez-Rebolledo, G. A., Méndez-Bolaina, E., Sánchez-Medina, A., Maldonado-Saavedra, O., Domínguez-Ortiz, M. Á., ... Cruz-Sánchez, J. S. (2014). *Cnidioscolus chayamansa* Mc Vaugh, an important antioxidant, anti-inflammatory and cardioprotective plant used in Mexico. *Journal of Ethnopharmacology*, 151(2), 937–943.
- Gaziano, T. A. (2017). Lifestyle and Cardiovascular Disease. *Journal of the American College of Cardiology*, 69(9), 1126–1128.
- Gupta, A., Naranawal, M., y Kothari, V. (2012). Modern extraction methods for preparation of bioactive plant extracts. *International Journal of Applied and Natural Sciences*, 1(1), 8–26.
- Gutzeit, H. O., y Ludwig-Muller, J. (2014). Biosynthesis and Chemical Properties of Natural Substances in Plants. En *Plant Natural Products: Synthesis, Biological Functions and Practical Applications* (pp. 1–80). Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Hansson, G. K., Libby, P., y Tabas, I. (2015). Inflammation and plaque vulnerability. *Journal of Internal Medicine*, 278(5), 483–493.
- Hardman, R. (2018). Management of Chronic Deep Vein Thrombosis in Women. *Seminars in Interventional Radiology*, 35(01), 3–8.
- Harter, K., Levine, M., y Henderson, S. O. (2015). Anticoagulation drug therapy: a review. *The Western Journal of Emergency Medicine*, 16(1), 11–17.
- Hernández-Nicolás, N. Y., Córdova-Téllez, L., Romero-Manzanares, A., Jiménez-Ramírez, J., y Luna-Cavazos, M. (2018). Traditional uses and seed chemical composition of *Jatropha spp.* (Euphorbiaceae) in Tehuacán-Cuicatlán, México. *Revista de Biología Tropical*, 66(1), 266–279.
- Hess, C. N., Norgren, L., Ansel, G. M., Capell, W. H., Fletcher, J. P., Fowkes, F. G. R., ... Hiatt, W. R. (2017). A Structured Review of Antithrombotic Therapy in Peripheral Artery Disease With a Focus on Revascularization. *Circulation*, 135(25), 2534–2555.
- Hira, R. S., Cowart, J. B., Akeroyd, J. M., Ramsey, D. J., Pokharel, Y., Nambi, V., ... Virani, S. S. (2016). Risk Factor Optimization and Guideline-Directed Medical Therapy in US Veterans With Peripheral Arterial and Ischemic Cerebrovascular Disease Compared to Veterans With Coronary Heart Disease. *The American Journal of Cardiology*, 118(8), 1144–1149.
- IHME. (2017). GBD Compare. Seattle. Retrieved from <https://vizhub.healthdata.org/gbd-compare/>

- Ingle, K., Mahendra, S., Moharil, M. P., Khelurkar, V. C., Krishnananda, I., Deshmukh, A. G., ... Dudhare, M. S. (2017). Phytochemicals: Extraction methods, identification and detection of bioactive compounds from plant extracts. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 6(61), 32–36.
- Islam, M. T., Ali, E. S., Uddin, S. J., Shaw, S., Islam, M. A., Ahmed, M. I., ... Atanasov, A. G. (2018). Phytol: A review of biomedical activities. *Food and Chemical Toxicology*, 121, 82–94.
- James, L., y Zehnder, M. D. (2012). Drugs used in disorders of coagulation. En B. G. Katzung y A. J. Trevor (Eds.), *Basic and Clinical Pharmacology* (pp. 601–618). Nueva York: McGraw Hill Medical.
- Jaramillo-Jaramillo, C., Jaramillo-Espinoza, A., D'Armas, H., Troccoli, L., Rojas de Astudillo, L., Jaramillo Jaramillo, C., ... Rojas de Astudillo, L. (2016). Concentraciones de alcaloides, glucósidos cianogénicos, polifenoles y saponinas en plantas medicinales seleccionadas en Ecuador y su relación con la toxicidad aguda contra *Artemia salina*. *Revista de Biología Tropical*, 64(3), 1171–1184.
- Kabir, M. S. H., Mahamoud, M. S., Chakrabarty, N., Ahmad, S., Masum, M. A. A., Hoque, M. A., ... Uddin, M. M. N. (2016). Antithrombotic and cytotoxic activities of four Bangladeshi plants and PASS prediction of their isolated compounds. *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology*, 27(6), 659–666.
- Khan, H., Jawad, M., Kamal, M. A., Baldi, A., Xiao, J., Nabavi, S. M., y Daglia, M. (2018). Evidence and prospective of plant derived flavonoids as antiplatelet agents: Strong candidates to be drugs of future. *Food and Chemical Toxicology*, 119, 355–367.
- Khatun, A., Rahman, M., Kabir, S., Akter, N., y Chowdhury, S. A. (2013). Phytochemical and Pharmacological Properties of Methanolic Extract of *Ardisia humulis* Vahs (Myrsinaceae). *International Journal of Research in Ayurveda and Pharmacy*, 4(1), 38–41.
- Kirmani, J. F., Alkawi, A., Panezai, S., y Gizzi, M. (2012). Advances in thrombolytics for treatment of acute ischemic stroke. *Neurology*, 79(1), S119–S125.
- Klafke, J. Z., Arnoldi da Silva, M., Fortes Rossato, M., Trevisan, G., Banderó Walker, C. I., Martins Leal, C. A., ... Ferreira, J. (2012). Antiplatelet, Antithrombotic, and Fibrinolytic Activities of *Campomanesia xanthocarpa*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012. Consultada el 26 de febrero de 2018, <https://www.hindawi.com/journals/ecam/2012/954748/>
- Koenig-Oberhuber, V., y Filipovic, M. (2016). New antiplatelet drugs and new oral anticoagulants. *British Journal of Anaesthesia*, 117(S2), ii74–ii84.
- Koupenova, M., Kehrel, B. E., Corkrey, H. A., y Freedman, J. E. (2017). Thrombosis and platelets: an update. *European Heart Journal*, 38(11), 785–791.

- Ku, S. K., Kim, T. H., y Bae, J. S. (2013). Anticoagulant activities of persicarin and isorhamnetin. *Vascular Pharmacology*, 58(4), 272–279.
- Ku, S. K., Kim, T. H., Lee, S., Kim, S. M., y Bae, J. S. (2013). Antithrombotic and profibrinolytic activities of isorhamnetin-3-O-galactoside and hyperoside. *Food and Chemical Toxicology*, 53, 197–204.
- Kubota, Y., Evenson, K. R., Maclehorse, R. F., Roetker, N. S., Joshu, C. E., y Folsom, A. R. (2017). Physical Activity and Lifetime Risk of Cardiovascular Disease and Cancer. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 49(8), 1599–1605.
- Kumar, A., Or-rashid, M. M., Alzahal, O., y McBride, B. W. (2011). Fatty Acid Profile of Chaya (*Cnidoscopus aconitifolius*) Leaves and Fodder. *The Indian Journal of Animal Sciences*, 81(8), 95–100.
- Kuti, J. O., y Konoru, H. B. (2006). Cyanogenic glycosides content in two edible leaves of tree spinach (*Cnidoscopus spp.*). *Journal of Food Composition and Analysis*, 19(6–7), 556–561.
- Lago, J., Toledo-Arruda, A., Mernak, M., Barrosa, K., Martins, M., Tibério, I., y Prado, C. (2014). Structure-Activity Association of Flavonoids in Lung Diseases. *Molecules*, 19(3), 3570–3595.
- Lee, W. H., Yang, E.-J., Ku, S. K., Song, K. S., y Bae, J. S. (2012). Anticoagulant activities of oleanolic acid via inhibition of tissue factor expressions. *BMB Reports*, 45(7), 390–395.
- Leslie, C. C. (2015). Cytosolic phospholipase A₂: physiological function and role in disease. *Journal of Lipid Research*, 56(8), 1386–1402.
- Liu, L., Ma, H., Yang, N., Tang, Y., Guo, J., Tao, W., y Duan, J. (2010). A series of natural flavonoids as thrombin inhibitors: Structure-activity relationships. *Thrombosis Research*, 126(5), e365–e378.
- Lozano-Grande, M. A., Gorinstein, S., Espitia-Rangel, E., Dávila-Ortiz, G., y Martínez-Ayala, A. L. (2018). Plant Sources, Extraction Methods, and Uses of Squalene. *International Journal of Agronomy*, 2018. Consultada el 14 de mayo de 2019, <https://www.hindawi.com/journals/ija/2018/1829160/>
- Luong, N. X., Hac, L. Van, y Dung, N. X. (2003). Chemical composition of the leaf oil of *Zanthoxylum alatum* Roxb. from Vietnam. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 6(3), 179–184.
- Mahmud, S., Akhter, S., Rahman, M. A., Aklima, J., Akhter, S., Merry, S. R., ... Emran, T. Bin. (2015). Antithrombotic Effects of Five Organic Extracts of Bangladeshi Plants in Vitro and Mechanisms in In Silico Models. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015. Consultada el 17 de noviembre de 2017, <https://www.hindawi.com/journals/ecam/2015/782742/>

- May, J. M., y Qu, Z. (2010). Ascorbic Acid Prevents Increased Endothelial Permeability Caused by Oxidized Low Density Lipoprotein. *Free Radical Research*, 44(11), 1359–1368.
- Mazid, M., Khan, T. A., y Mohammad, F. (2011). Role of secondary metabolites in defense mechanisms of plants. *Biology and Medicine*, 3(2), 232–249.
- Melo, A. L. De, y Sales, M. F. De. (2008). O gênero *Cnidoscolus Pohl* (Crotonoideae-Euphorbiaceae) no Estado de Pernambuco, Brasil. *Acta Botanica Brasilica*, 22(3), 806–827.
- Metrouh-Amir, H., Duarte, C. M. M., y Maiza, F. (2015). Solvent effect on total phenolic contents, antioxidant, and antibacterial activities of *Matricaria pubescens*. *Industrial Crops and Products*, 67, 249–256.
- Mira, A., Alkhiary, W., y Shimizu, K. (2017). Antiplatelet and Anticoagulant Activities of *Angelica shikokiana* Extract and Its Isolated Compounds. *Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis*, 23(1), 91–99.
- Mitchell, R. N. (2013). Robbins Basic Pathology. En V. Kumar, A. Abbas, Y J. Aster (Eds.), Robbins Basic Pathology (pp. 75–98). Amsterdam: Elsevier.
- Moreira, P. V., Hyseni, L., Moubarac, J.-C., Martins, A. P. B., Baraldi, L. G., Capewell, S., ... Guzman-Castillo, M. (2018). Effects of reducing processed culinary ingredients and ultra-processed foods in the Brazilian diet: a cardiovascular modelling study. *Public Health Nutrition*, 21(1), 181–188.
- Mosa, R. A., Ndwandwe, T., Cele, N. F., y Opoku, A. R. (2015). Anticoagulant and anti-inflammatory activity of a triterpene from *Protorhus longifolia* stem bark. *Journal of Medicinal Plants Research*, 9(19), 613–619.
- Moschona, A., Kyriakidis, K. D., Kleontas, A. D., y Liakopoulou-Kyriakides, M. (2017). Comparative Study of Natural Phenolic Acids and Flavonols as Antiplatelet and Anti-inflammatory Agents. *The Grant Medical Journal*, 2(4), 57–66.
- Moses, T., Papadopoulou, K. K., y Osbourn, A. (2014). Metabolic and functional diversity of saponins, biosynthetic intermediates and semi-synthetic derivatives. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 49(6), 439–462.
- Mozaffarian, D., y Wu, J. H. Y. (2011). Omega-3 Fatty Acids and Cardiovascular Disease. *Journal of the American College of Cardiology*, 58(20), 2047–2067.
- Mundi, S., Massaro, M., Scoditti, E., Carluccio, M. A., van Hinsbergh, V. W. M., Iruela-Arispe, M. L., y De Caterina, R. (2018). Endothelial permeability, LDL deposition, and cardiovascular risk factors - a review. *Cardiovascular Research*, 114(1), 35–52.

Muñetón Pérez, P. (2009). Plantas medicinales: un complemento vital para la salud de los mexicanos. Entrevista con el Dr. Erick Estrada Lugo. *Revista Digital Universitaria*, 10(9), 1–9.

Ngo, T. Van, Scarlett, C. J., Bowyer, M. C., Ngo, P. D., y Vuong, Q. Van. (2017). Impact of different extraction solvents on bioactive compounds and antioxidant capacity from the root of *Salacia chinensis* L. *Journal of Food Quality*, 2017, 1–8.

O'Donnell, J. S., O'Sullivan, J. M., y Preston, R. J. S. (2019). Advances in understanding the molecular mechanisms that maintain normal haemostasis. *British Journal of Haematology*. 186(1), 24-36.

Obichi, E. A., Monago, C. C., y Belonwu, D. C. (2015). Effect of *Cnidocolus aconitifolius* (Family Euphorbiaceae) Aqueous Leaf Extract on Some Antioxidant Enzymes and Haematological Parameters of High Fat Diet and Streptozotocin Induced Diabetic Wistar Albino Rats. *Journal of Applied Sciences and Environmental Management*, 19(1), 201–209.

Oduah, E. I., Linhardt, R. J., y Sharfstein, S. T. (2016). Heparin: Past, Present, and Future. *Pharmaceuticals*, 9(3), 1–12.

OMS. (2015). Enfermedades Cardiovasculares. Nota descriptiva. Consultada el día 13 de septiembre de 2018, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/es/>

OMS. (2018). Enfermedades no transmisibles. Nota descriptiva. Consultada el día 24 de noviembre de 2018. <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/noncommunicable-diseases>

Orji, O. U., Ibiam, U. A., Aja, P. M., Okechukwu, P. C. U., Uraku, A. J., Alope, C., ... Nwali, B. U. (2016). Evaluation of the Phytochemical and Nutritional Profiles of *Cnidocolus aconitifolius* Leaf Collected in Abakaliki South East Nigeria. *World Journal of Medical Sciences*, 13(3), 213–217.

Osunsanmi, F. O., Zaharare, G. E., Oyinloye, B. E., Mosa, R. A., Ikhile, M. I., Shode, F. O., ... Opoku, A. R. (2018). Antithrombotic, anticoagulant and antiplatelet activity of betulinic acid and 3 β -acetoxybetulinic acid from *Melaleuca bracteata* Revolution Gold (Myrtaceae) Muell leaf. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 17(10), 1983–1989.

Patrignani, P., y Patrono, C. (2018). Aspirin, platelet inhibition and cancer prevention. *Platelets*, 29(8), 779–785.

Pawlaczyk-Graja, I. (2018). Polyphenolic-polysaccharide conjugates from flowers and fruits of single-seeded hawthorn (*Crataegus monogyna* Jacq.): Chemical profiles and mechanisms of anticoagulant activity. *International Journal of Biological Macromolecules*, 116, 869–879.

- Pereañez, J. A., Lobo-Echeverri, T., Rojano, B., Vargas, L., Fernandez, M., Gaviria, C. A., y Núñez, V. (2010). Correlation of the inhibitory activity of phospholipase A₂ snake venom and the antioxidant activity of Colombian plant extracts. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 20(6), 910–916.
- Pérez-González, M. Z., Gutiérrez-Rebolledo, G. A., Yépez-Mulia, L., Rojas-Tomé, I. S., Luna-Herrera, J., Y Jiménez-Arellanes, M. A. (2017). Antiprotozoal, antimycobacterial, and anti-inflammatory evaluation of *Cnidoscolus chayamansa* (Mc Vaugh) extract and the isolated compounds. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 89, 89–97.
- Pérez-González, M. Z., Siordia-Reyes, A. G., Damián-Nava, P., Hernández-Ortega, S., Macías-Rubalcava, M. L., y Jiménez-Arellanes, M. A. (2018). Hepatoprotective and Anti-Inflammatory Activities of the *Cnidoscolus chayamansa* (Mc Vaugh) Leaf Extract in Chronic Models. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2018. Consultada el día 17 de marzo de 2019, <https://www.hindawi.com/journals/ecam/2018/3896517/>
- Pérez Pérez, I. (2006). Metabolitos secundarios aislados de las raíces y las hojas de *Stevia Jorullensis* H.B.K. Tesis de Licenciatura, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.
- Pettersen, A. A., Arnesen, H., y Seljeflot, I. (2015). A brief review on high on-aspirin residual platelet reactivity. *Vascular Pharmacology*, 67–69, 6–9.
- Pietta, P. G. (2000). Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*, 63(7), 1035–1042.
- Plaza, M., Pozzo, T., Liu, J., Gulshan Ara, K. Z., Turner, C., y Nordberg Karlsson, E. (2014). Substituent Effects on in Vitro Antioxidizing Properties, Stability, and Solubility in Flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(15), 3321–3333.
- Poti, J. M., Mendez, M. A., Ng, S. W., y Popkin, B. M. (2015). Is the degree of food processing and convenience linked with the nutritional quality of foods purchased by US households? *The American Journal of Clinical Nutrition*, 101(6), 1251–1262.
- Rababah, T. M., Banat, F., Rababah, A., Ereifej, K., y Yang, W. (2010). Optimization of Extraction Conditions of Total Phenolics, Antioxidant Activities, and Anthocyanin of Oregano, Thyme, Terebinth, and Pomegranate. *Journal of Food Science*, 75(7), C626–C632.
- Rajput, M. S., Mathur, V., Agrawal, P., Chandrawanshi, H. K., y Pilaniya, U. (2011). Fibrinolytic activity of kaempferol isolated from the fruits of *Lagenaria siceraria* (Molina) Standley. *Natural Product Research*, 25(19), 1870–1875.

- Ramesh-Kumar, D., Seetha-Lakshmi B, P., Saravani, N., y Marimuthu, S. (2012). In silico Molecular Docking Studies on Porcine Pancreatic Phospholipase A₂ against Plant extracts of Phenolic Inhibitors. *International Journal of Research in Biomedicine and Biotechnology*, 2(3), 8-16.
- Ramos-Gomez, M., Figueroa-Pérez, M. G., Guzman-Maldonado, H., Loarca-Piña, G., Mendoza, S., Quezada-Tristán, T., y Reynoso-Camacho, R. (2016). Phytochemical profile, antioxidant properties and hypoglycemic effect of chaya (*Cnidoscolus chayamansa*) in stz-induced diabetic rats. *Journal of Food Biochemistry*, 41(1), 1-9.
- Razborzek, M. I., Brodnjak Voncina, D., Dolecek, V., y Voncina, E. (2007). Determination of Major Phenolic Acids, Phenolic Diterpenes and Triterpenes in Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) by Gas Chromatography and Mass Spectrometry. *Acta Chimica Slovenica*, 54, 60–67.
- Rebholz, C. M., Friedman, E. E., Powers, L. J., Arroyave, W. D., He, J., y Kelly, T. N. (2012). Dietary Protein Intake and Blood Pressure: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *American Journal of Epidemiology*, 176(7), S27–S43.
- Reddi, K. V. N. R., Rajesh, S. S., Narendra, K., Jangala, S., Reddy, P. C. O., Satya, A. K., ... Sekhar, A. C. (2014). In vitro anti-venom potential of various *Jatropha* extracts on neutralizing cytotoxic effect induced by phospholipase A₂ of crude venom from Indian cobra (*Naja naja*). *Bangladesh Journal of Pharmacology*, 9(1), 22–28.
- Rehman, U. U., Shah, J., Khan, M. A., Shah, M. R., Ishtiaq, y Khan, I. (2013). Molecular docking of taraxerol acetate as a new COX inhibitor. *Bangladesh Journal of Pharmacology*, 8(2), 194-197.
- Ricci, C., Wood, A., Muller, D., Gunter, M. J., Agudo, A., Boeing, H., ... Ferrari, P. (2018). Alcohol intake in relation to non-fatal and fatal coronary heart disease and stroke: EPIC-CVD case-cohort study. *British Medical Journal*, 361, k934.
- Romero-Estrada, A., Maldonado-Magaña, A., González-Christen, J., Bahena, S. M., Garduño-Ramírez, M. L., Rodríguez-López, V., y Alvarez, L. (2016). Anti-inflammatory and antioxidative effects of six pentacyclic triterpenes isolated from the Mexican copal resin of *Bursera copallifera*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 16(1), 422-432.
- Ross-Ibarra, J., y Molina-Cruz, A. (2002). The Ethnobotany of Chaya (*Cnidoscolus Aconitifolius* ssp. *Aconitifolius* Breckon): A Nutritious Maya Vegetable. *Economic Botany*, 56(4), 350–365.
- Ryu, R., Jung, U. J., Seo, Y.-R., Kim, H.-J., Moon, B. S., Bae, J.-S., ... Choi, M.-S. (2015). Beneficial Effect of Persimmon Leaves and Bioactive Compounds on Thrombosis. *Food Science and Biotechnology*, 24(1), 233–240.

Saeed, N. M., El-Demerdash, E., Abdel-Rahman, H. M., Algandaby, M. M., Al-Abbasi, F. A., y Abdel-Naim, A. B. (2012). Anti-inflammatory activity of methyl palmitate and ethyl palmitate in different experimental rat models. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 264(1), 84–93.

Saltveit, M. E. (2010). Synthesis and Metabolism of Phenolic Compounds. In L. de la Rosa, E. Alvarez-Parrilla, y G. González-Aguilar (Eds.), *Fruit and Vegetable Phytochemicals* (pp. 89–100). Nueva Jersey: Wiley-Blackwell.

Sato, F. (2014). Plant Secondary Metabolism. En *Encyclopedia of Life Sciences*, 1–13. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd.

Schneider, P., Hosseiny, S. S., Szczotka, M., Jordan, V., y Schlitter, K. (2009). Rapid solubility determination of the triterpenes oleanolic acid and ursolic acid by UV-spectroscopy in different solvents. *Phytochemistry Letters*, 2(2), 85–87.

Shen, M. Y., Liu, C. L., Hsiao, G., Liu, C. Y., Lin, K. H., Chou, D. S., y Sheu, J. R. (2008). Involvement of p38 MAPK Phosphorylation and Nitrate Formation in Aristolochic Acid-Mediated Antiplatelet Activity. *Planta Medica*, 74(10), 1240–1245.

Sikka, P., y Bindra, V. K. (2010). Newer antithrombotic drugs. *Indian Journal of Critical Care Medicine*, 14(4), 188–195.

Stamler, J., Elliott, P., Kesteloot, H., Nichols, R., Claeys, G., Dyer, A. R., Y Stamler, R. (1996). Inverse relation of dietary protein markers with blood pressure. *Circulation*, 94(7), 1629–1634.

Suttiarporn, P., Chumpolsri, W., Mahatheeranont, S., Luangkamin, S., Teepsawang, S., y Leardkamolkarn, V. (2015). Structures of Phytosterols and Triterpenoids with Potential Anti-Cancer Activity in Bran of Black Non-Glutinous Rice. *Nutrients*, 7(3), 1672–1687.

Tamilarasan, M., Sivamani, S., Maheshwari, A. S., y Rajesh, T. P. (2015). Phytochemical Screening and In Vitro Bioactivities of the Extracts of Aerial Part of *Evolvulus nummularius*. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*, 7(1), 111–116.

Thom, V., Tung, N., Van Diep, D., Thuy, D., Hue, N., Long, D., ... Ly-Huong, D. (2018). Antithrombotic activity and saponin composition of the roots of *Panax bipinnatifidus* Seem. growing in Vietnam. *Pharmacognosy Research*, 10(4), 333.

Tomaiuolo, M., Brass, L. F., y Stalker, T. J. (2017). Regulation of Platelet Activation and Coagulation and Its Role in Vascular Injury and Arterial Thrombosis. *Interventional Cardiology Clinics*, 6(1), 1–12.

- Toyama, D. O., Ferreira, M. J. P., Romoff, P., Fávero, O. A., Gaeta, H. H., y Toyama, M. H. (2014). Effect of chlorogenic acid (5-Caffeoylquinic Acid) isolated from *Baccharis oxyodonta* on the structure and pharmacological activities of secretory phospholipase A₂ from *Crotalus durissus terrificus*. *BioMed Research International*, 2014. Consultada el 26 de mayo de 2019, <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2014/726585/>
- Vasanthi, H. R., ShriShriMal, N., y Das, D. K. (2012). Phytochemicals from Plants to Combat Cardiovascular Disease. *Current Medicinal Chemistry*, 19(14), 2242–2251.
- Wee, J., Kim, Y., Kyung, J., Song, Y., Do, J., Kim, D., y Lee, S. (2010). Identification of Anticoagulant Components in Korean Red Ginseng. *Journal of Ginseng Research*, 34(4), 355–362.
- Weidmann, H., Heikaus, L., Long, A. T., Naudin, C., Schlüter, H. y Renné, T. (2017). The plasma contact system, a protease cascade at the nexus of inflammation, coagulation and immunity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1864(11), 2118–2127.
- Weitz, J. I., Eikelboom, J. W., y Samama, M. M. (2012). New Antithrombotic Drugs: Antithrombotic Therapy and Prevention of Thrombosis, 9th ed: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines. *Chest*, 141(2), e120S–e151S.
- Wolberg, A. S., Rosendaal, F. R., Weitz, J. I., Jaffer, I. H., Agnelli, G., Baglin, T., y Mackman, N. (2015). Venous thrombosis. *Nature Reviews Disease Primers*, 1(1), 1–17.
- Wurdack, K. J., y Davis, C. C. (2009). Malpighiales phylogenetics: Gaining ground on one of the most recalcitrant clades in the angiosperm tree of life. *American Journal of Botany*, 96(8), 1551–1570.
- Xiong, L., Qi, Z., Zheng, B., Li, Z., Wang, F., Liu, J., y Li, P. (2017). Inhibitory Effect of Triterpenoids from *Panax ginseng* on Coagulation Factor X. *Molecules*, 22(4), 649.
- Yam-Puc, A., Santana-Hernández, A. A., Yah-Nahuat, P. N., Ramón-Sierra, J. M., Cáceres-Farfán, M. R., Borges-Argáez, R. L., y Ortiz-Vázquez, E. (2019). Pentacyclic triterpenes and other constituents in propolis extract from *Melipona beecheii* collected in Yucatan, México. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 29(3), 358-363.
- Yasmen, N., Aziz, M. A., Tajmim, A., Akter, M. I., Hazra, A. K., y Rahman, S. M. M. (2018). Analgesic and Anti-Inflammatory Activities of Diethyl Ether and n-Hexane Extract of *Polyalthia suberosa* Leaves. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2018. Consultada el 14 de enero de 2019, <https://www.hindawi.com/journals/ecam/2018/5617234/>
- Yun, S. H., Sim, E. H., Goh, R. Y., Park, J. I., Y Han, J. Y. (2016). Platelet Activation: The Mechanisms and Potential Biomarkers. *BioMed Research International*, 2016. Consultada el 12 de febrero de 2018, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27403440>

Zaman, R., Parvez, M., Jakaria, M., Abu Sayeed, M., y Islam, M. (2015). In vitro Clot Lysis Activity of Different Extracts of *Mangifera sylvatica* Roxb. Leaves. *Research Journal of Medicinal Plant*, 9(3), 135–140.

Zhang, J., Ma, G., Lv, Z., Zhou, Y., Wen, C., Wu, Y., y Xu, R. (2014). Targeted thrombolysis strategies for neuroprotective effect. *Neural Regeneration Research*, 9(13), 1316–1322.

Zheng, Y.-F., Wei, J.-H., Fang, S.-Q., Tang, Y.-P., Cheng, H.-B., Wang, T.-L., ... Peng, G.-P. (2015). Hepatoprotective Triterpene Saponins from the Roots of *Glycyrrhiza inflata*. *Molecules*, 20(1), 6273–6283.

Zmysłowski, A., y Szterk, A. (2017). Current knowledge on the mechanism of atherosclerosis and pro-atherosclerotic properties of oxysterols. *Lipids in Health and Disease*, 16. Consultada el día 22 de mayo de 2019, <https://lipidworld.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12944-017-0579-2>.



UADY
FACULTAD DE
INGENIERÍA
QUÍMICA

ANEXO 1

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Mérida, Yucatán, México, a 24 de febrero del año 2018

Título de proyecto:

Estudio antitrombótico de extractos de hojas de chaya (*Cnidoscolus aconitifolius*)

Dependencia o Institución de procedencia:

Facultad de Ingeniería Química de la Universidad Autónoma de Yucatán

Nombre del investigador principal: Dra. Maira Rubí Segura Campos

A quien corresponda:

Yo _____, declaro libre y voluntariamente que acepto participar en el estudio titulado: Estudio antitrombótico y perfil de compuestos derivados de extractos de hojas de chaya (*Cnidoscolus aconitifolius*), cuyo responsable es la Doctora Maira Rubí Segura Campos, Investigador y Docente del Posgrado Institucional en Ciencias Químicas y Bioquímicas de la UADY.

Breve descripción del objetivo del estudio

En el 2017, las enfermedades cardiovasculares fueron la primera causa de muertes en México. Estas enfermedades, tienen como característica común la formación de coágulos en el interior de las venas y arterias, los cuales pueden disminuir u obstruir el flujo sanguíneo, pudiendo causar infartos. En la medicina tradicional, una planta empleada como mejorador de la circulación sanguínea es la chaya, sin embargo, no se conoce el mecanismo exacto por el cual ejerce esta acción. Se me ha informado que el objetivo del presente estudio consiste en determinar si los extractos de chaya inhiben la formación de coágulos o logran disolverlos, mediante diversas técnicas *in vitro*, así permitiendo conocer su modo de acción.

Descripción de los procedimientos a realizar

Mi participación en el proyecto consistirá en donar 10 mL de sangre, estando en ayunas y sin haber consumido medicamentos antiinflamatorios no esteroideos al menos 10 días con anticipación. Mi sangre será extraída por un químico con más de 20 años de experiencia en el área de salud y será utilizada en diversos equipos, los cuales ayudarán a conocer los mecanismos que inhibirán la formación de coágulos o propiciarán la disolución de aquellos previamente constituidos.

Las posibles complicaciones que pudieran surgir, no van más allá de las incomodidades ordinarias implicadas en la extracción de sangre, y se me ha informado que puedo solicitar atención por parte del personal operativo del laboratorio. Las muestras sanguíneas serán desechadas después de haber realizado las pruebas pertinentes.

Costo y Beneficio

En ningún momento se me pedirá contribución económica alguna y como beneficio obtendré los resultados de una citometría hemática, realizados por el químico profesional, los cuales me permitirán conocer mi estado de salud.

Comunico que me han informado los objetivos de la investigación, la justificación, los beneficios que se obtendrán de mi participación, y la descripción de los procedimientos a realizar.

Después de haber comprendido este documento manifiesto que estoy de acuerdo en ingresar y ser parte de este estudio de investigación, o retirarme, sin menoscabo de la atención que recibo. Así como que la información será manejada con estricta ética de confidencialidad y discreción de todos los datos personales.

Finalmente, hago mención de que estoy enterado(a) de que podré solicitar, en cualquier momento, información adicional acerca de los riesgos y beneficios de mi participación en este estudio dirigiéndome a la Doctora Maira Rubí Segura Campos, al

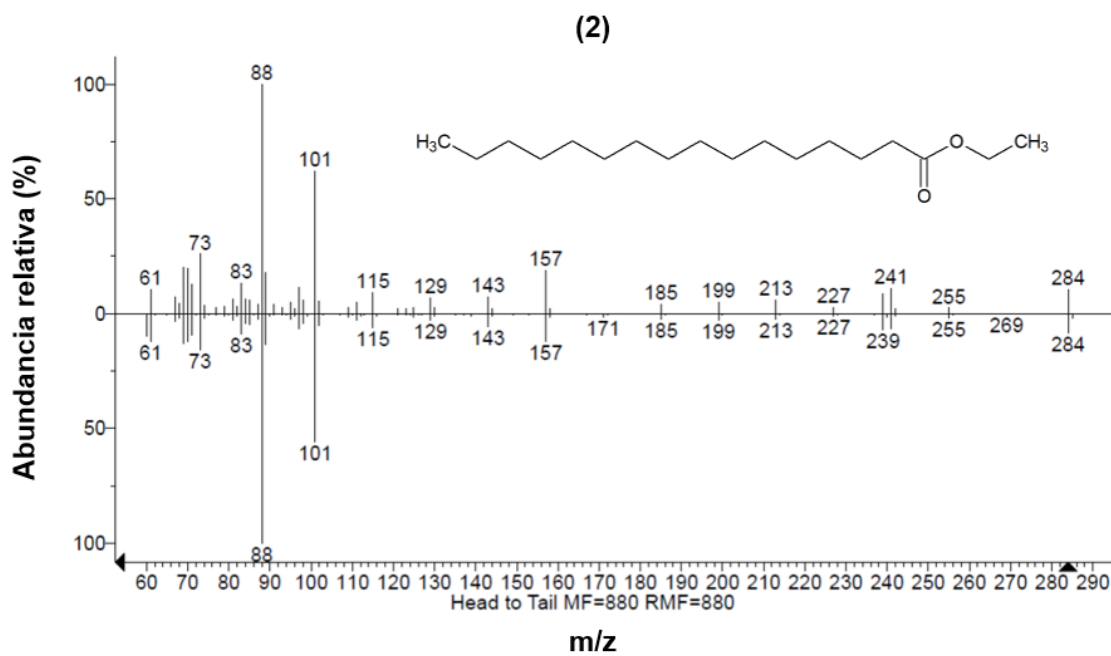
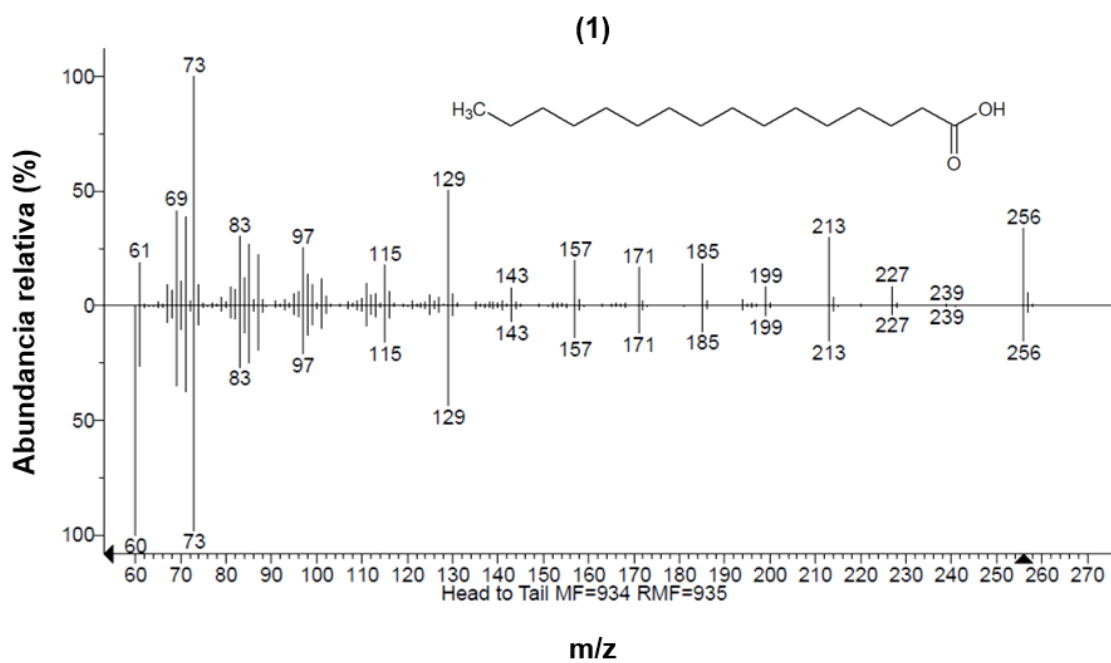
celular: celular: 9999-07-44-78 o al correo electrónico: maira.segura@correo.uady.mx,
para obtener la información o una cita para que esta sea ampliada.

Nombre _____

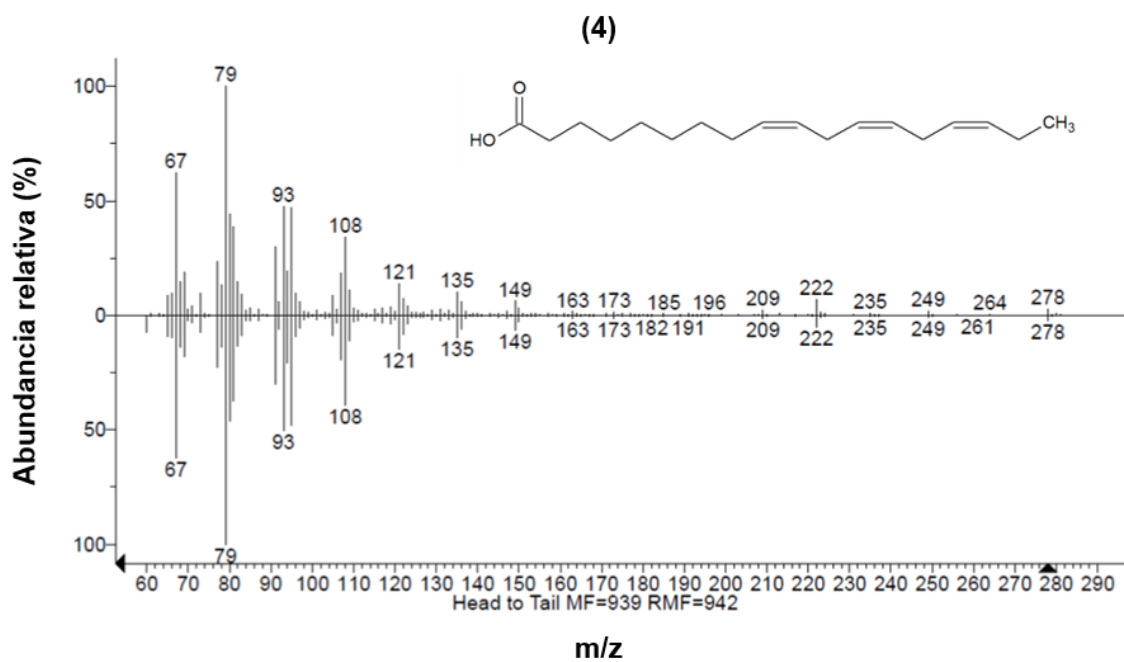
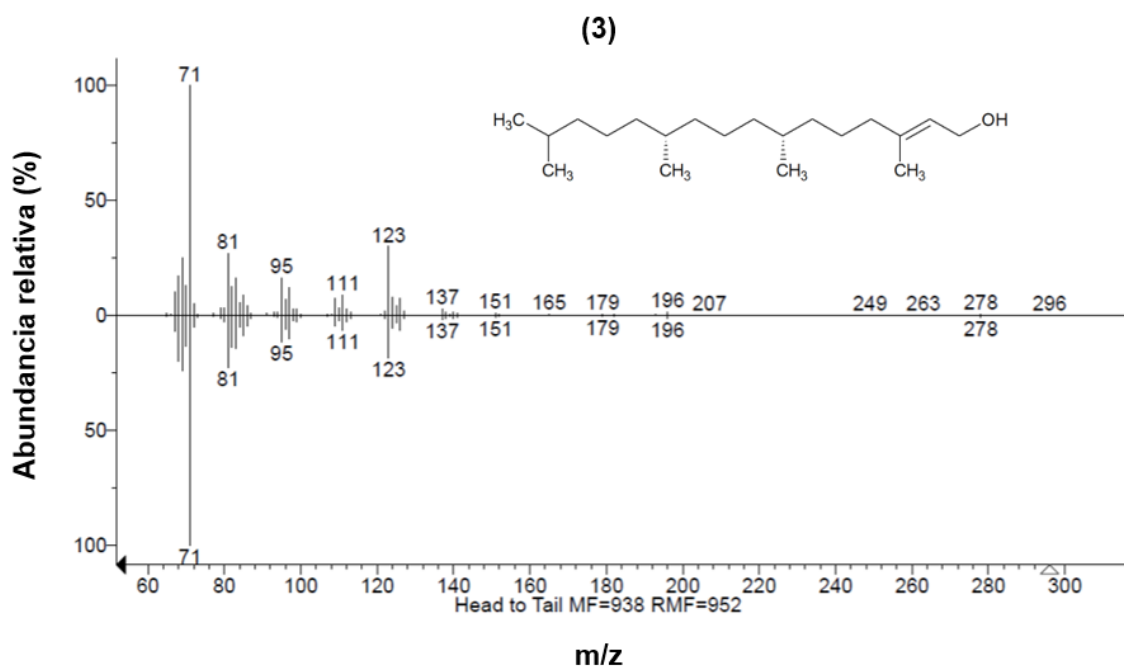
Firma _____

Nombre testigo1: _____ Firma: _____

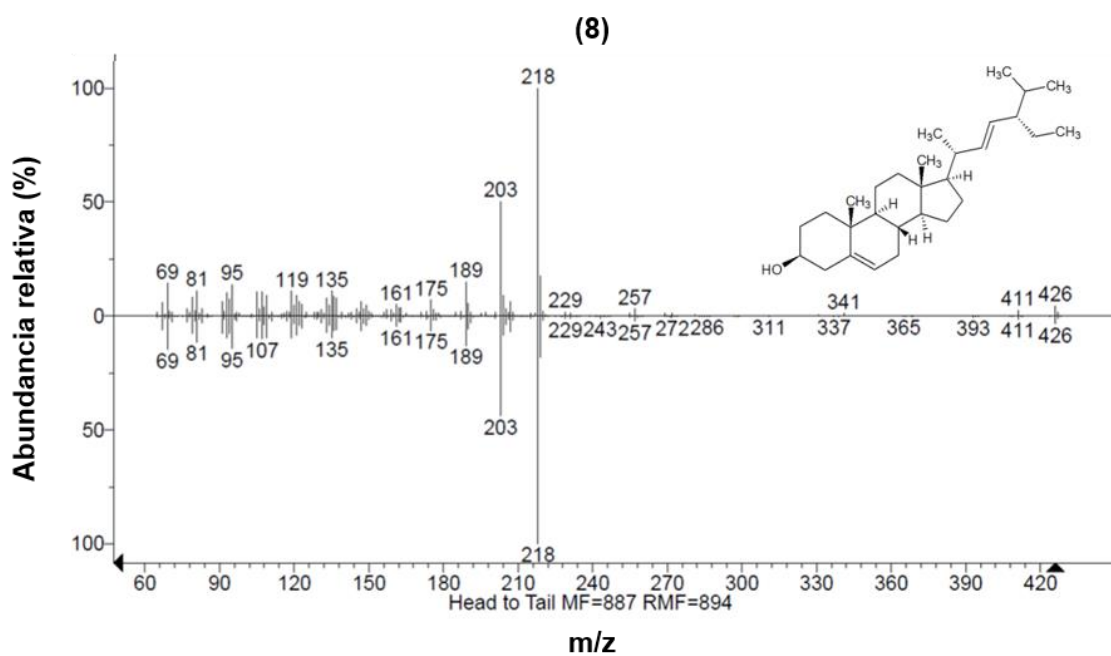
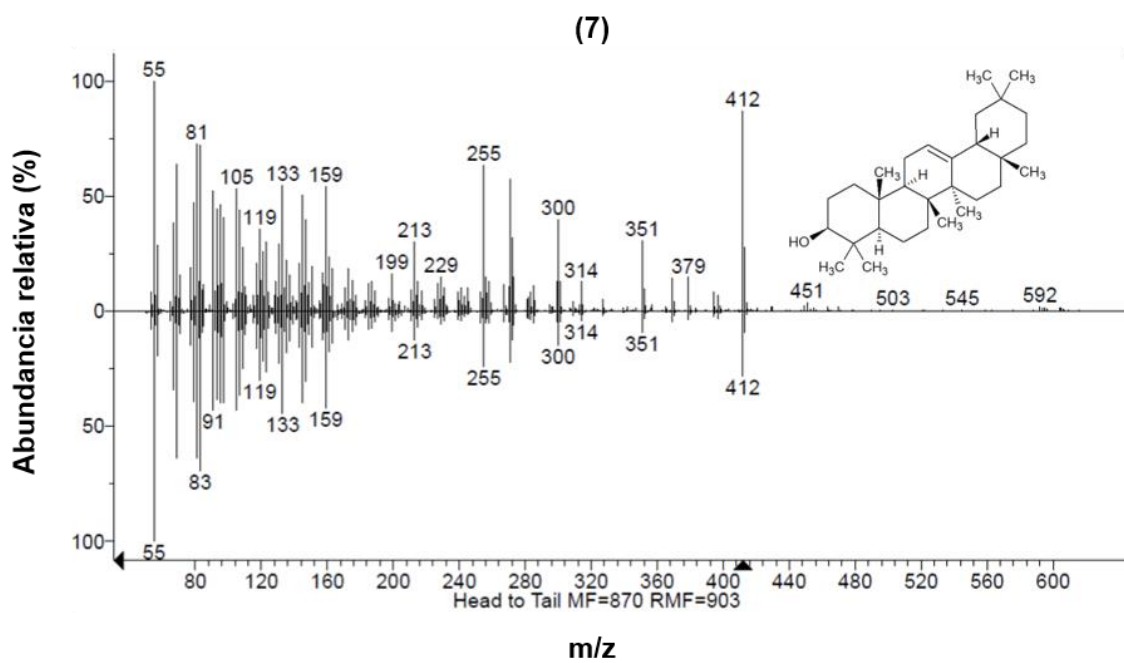
Nombre testigo 2: _____ Firma: _____



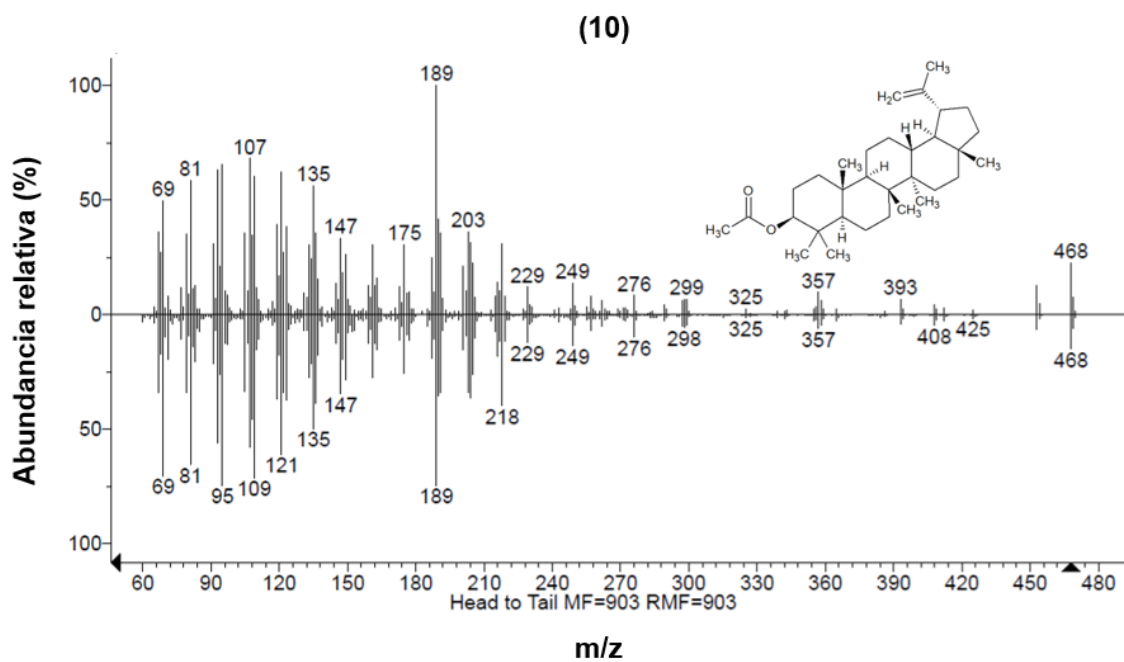
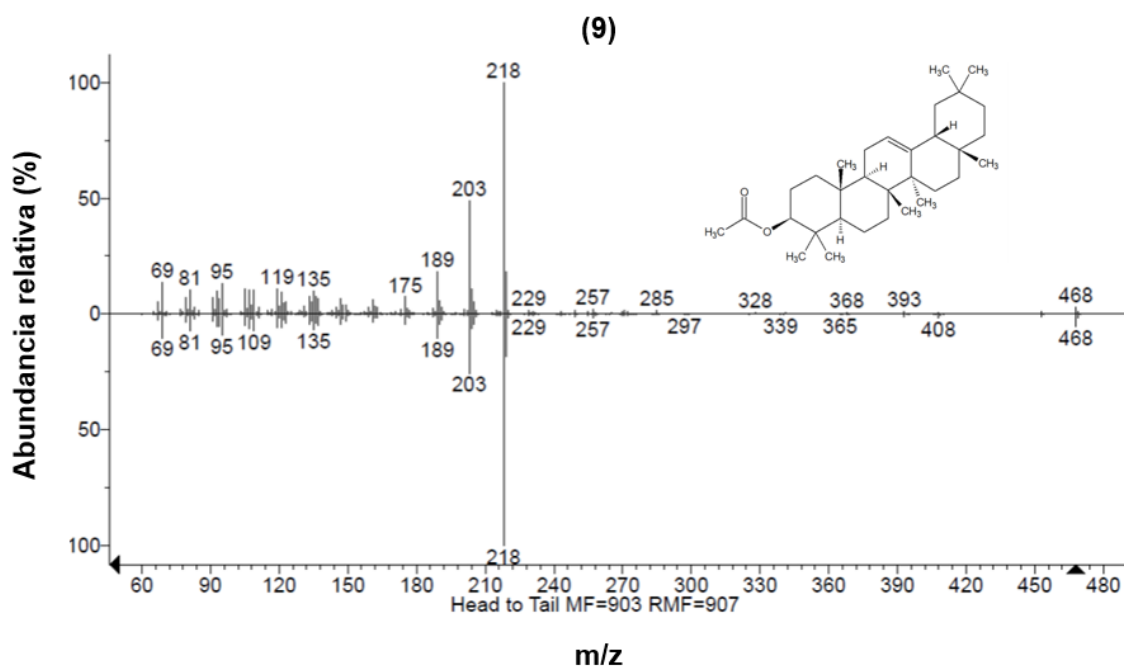
Anexo 2. Comparación entre el espectro del extracto EtOH de hojas de chaya (parte superior) y el espectro de la base de datos (parte inferior) de los compuestos (1) y (2).



Anexo 3. Comparación entre el espectro del extracto EtOH de hojas de chaya (parte superior) y el espectro de la base de datos (parte inferior) de los compuestos (3) y (4).



Anexo 5. Comparación entre el espectro del extracto EtOH de hojas de chaya (parte superior) y el espectro de la base de datos (parte inferior) de los compuestos (7) y (8).



Anexo 6. Comparación entre el espectro del extracto EtOH de hojas de chaya (parte superior) y el espectro de la base de datos (parte inferior) de los compuestos (9) y (10).

