



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
CÁTEDRA DE HEMATOLOGÍA
LABORATORIO DE HEMATOLOGÍA



ACTIVIDAD BIOLÓGICA EN EL EXTRACTO ACUOSO OBTENIDO DEL ALGA MARINA VERDE *Udotea flabellum*

Trabajo de grado como requisito parcial para optar al título de Licenciada en
Bioanálisis.

AUTORAS:

Br. Wanda Kimberlay Ramírez Vázquez
Br. Wendy Kimberley Ramírez Vázquez

TUTOR:

Prof. Dr. Pablo Djabayan Djibeyan

CO-TUTOR:

Prof. Dr. Juan Carlos Yépez González

Mérida, Septiembre de 2016



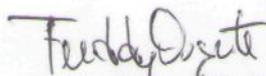
Universidad de Los Andes
Facultad de Farmacia y Bioanálisis
Escuela de Bioanálisis
Departamento Bioanálisis Clínico
Cátedra Hematología

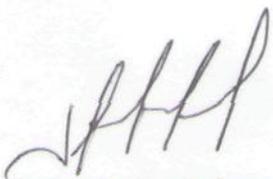


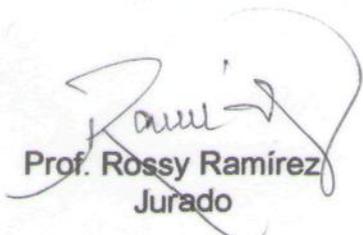
VEREDICTO

Los suscritos miembros de jurado Profesores, Juan Carlos Yépez, Rossy Ramírez y Freddy Dugarte, miembros designados por el Consejo de Escuela de Bioanálisis de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de los Andes, para conocer el trabajo titulado "Actividad biológica en el extracto acuoso obtenido del alga marina verde *Udotea flabellum*", presentado por las Bachilleres Ramírez Vázquez Wanda C.I, 20409053 y Ramírez Vázquez Wendy C.I, 20409052, como requisito parcial para optar al grado de Licenciada en Bioanálisis, reunidos el día viernes 23 de septiembre de dos mil dieciséis a las 10:00 am, en el salón de docencia de la Cátedra de Hematología, de la Universidad de los Andes, previo estudio y análisis del Trabajo de Grado de la Escuela de Bioanálisis, nos permitimos **APROBAR** el Trabajo de Grado, para los efectos que ha sido presentado.

En Mérida, a los veintitrés días del mes de septiembre del año dos mil dieciséis.


Prof. Freddy Dugarte
Jurado


Prof. Juan Carlos Yépez
Co-tutor


Prof. Rossy Ramírez
Jurado



DEDICATORIA

Esta tesis se la dedicamos

A Dios todo Poderoso, por su infinita misericordia y bondad para con nosotras, por guiarnos siempre por el camino de la sabiduría.

A nuestros queridos padres, por una vida de entrega total e incondicional a sus hijas, quienes nos enseñaron que jamás hay que rendirse ante nada, que con esfuerzo e ilusión las cosas se consiguen.

A nuestra hermana Windy por su siempre caluroso ánimo y apoyo y a todos aquellos que creyeron en nosotras, a quienes nos apoyaron en cada paso hacia la culminación de nuestros estudios y diferentes logros, a todos aquellos que nos regalaron por más grande o pequeño tiempo de su vida y vivieron junto a nosotras algún momento de felicidad, enojo o tristeza.

AGRADECIMIENTOS

A Dios todo poderoso fuente de nuestra inspiración y lucha constante.

A nuestros preciados padres Ysora Vázquez y Wolfgang Ramírez por ese apoyo incondicional, por esa lucha constante para que pudiéramos tener un mejor futuro, una educación de calidad y sobre todo por inspirarnos siempre a alcanzar nuestras metas, los amamos profundamente.

A nuestra querida hermana Windy por su amor, su apoyo y sobre todo siempre su buen humor para poder animarnos en esos momentos difíciles.

A nuestro respetado tutor Dr. Pablo Djabayan por el conocimiento impartido, por su dedicación e impulso para el logro de esta meta.

A la Ilustre Universidad de los Andes en especial a la Facultad de Farmacia y Bioanálisis por la formación que nos otorgó a lo largo de nuestra carrera.

A todos nuestros profesores, que permitieron adquirir de ellos los conocimientos que pondremos en práctica.

A nuestra familia, que en todo tiempo estando aún lejos ellos están más cerca de nosotras con cada palabra de aliento o ironía expresada.

A todos nuestros amigos en especial a Eusnaiker, Génesis y José Manuel por apoyarnos, reír, sufrir y aprender juntos ya que siempre tuvieron una mano donde asirnos para transitar en esta ruta.

Al mar, el cielo y la tierra, que con su enorme belleza despertaron en nosotras la curiosidad, nos impulsaron a explorar y adentrarnos más en el mundo natural. Nos sentimos afortunadas de poderlos contemplar.

Y finalmente, gracias a la vida, que nos ha enseñado que para conseguir algo se debe dar algo del mismo valor a cambio, perseverancia y esfuerzo.

ÍNDICE

	Pág.
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTO	iv
ÍNDICE GENERAL	v
ÍNDICE DE ESQUEMAS	ix
ÍNDICE DE TABLAS	x
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
ÍNDICE DE CUADROS	xii
RESUMEN	xiii
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I. EL PROBLEMA	
Planteamiento de Problema	3
Justificación de la Investigación	5
Objetivos de la Investigación	7
<i>Objetivo General</i>	7
<i>Objetivos Específicos</i>	7
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO.	
Trabajos Previos	8
Antecedentes Históricos	12
Antecedentes Teóricos	13
Algas	13
Organización y Estructuras de las Algas	13
Reproducción de las Algas	14
Clasificación de las Algas	16
División Cyanophyta o algas azules	17
División Glaucophyta	17

División Chlorarachniophyta	18
División Euglenophyta	18
División Dinophyta	18
División Criptophyta	19
División Haptophytas	19
División Ochrophyta	19
División Rhodophyta o algas rojas	20
División Chlorophyta o algas verdes	20
Usos de las Algas	21
Descripción del alga Udotea flabellum	22
Los Polisacáridos Sulfatados	23
Principales Propiedades de los Polisacáridos Sulfatados	25
Extractos Acuosa	25
Actividad Biológica	26
La Sangre	26
Composición de la Sangre	27
Hemostasia	28
Coagulación	29
Anticoagulantes	30
Factores de la Coagulación	30
Mecanismos de Coagulación Sanguínea	31
Sistema de Hipótesis	34

CAPÍTULO III. MARCO METODOLÓGICO.

Tipo de Investigación	36
Diseño de la Investigación	36
Población y Muestra	36
Muestra Biológica	36
Reactivos y Químicos	36
Instalaciones	36

Sistema de Variables	37
Instrumento de recolección de datos	38
Método Estadístico	38
Procedimiento o Metodología	38
Extracción Sanguínea	38
Tiempo de Protrombina	39
Tiempo de Tromboplastina parcial activada	39
Preparación del alga marina	40
Método de extracción	40
Disrupción mecánica utilizando licuadora convencional	40
Preparación del Pool de Trabajo	41
Evaluación de la Actividad Anticoagulante “Tiempo de Protrombina”	41
Evaluación de la Actividad Anticoagulante “Tiempo de Tromboplastina Parcial Actividad”	42
 CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES.	
Resultados	46
Discusiones	48
 CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.	
Conclusiones	50
Recomendaciones	50
 CAPÍTULO VI. REFERENCIAS.	
Bibliohemerografía	52
 ANEXOS.	
Nº 1. Alga marina verde Udotea flabellum	59
Nº 2. Tiempo de protrombina (Método de Quick)	60
Nº 3. Tiempo de tromboplastina parcial activada (Método de Quick).	61

N° 4. Estadísticos de muestras relacionadas	62
N° 5. Correlaciones de muestras relacionadas	63
N° 6. Frecuencias	64

ÍNDICE DE ESQUEMAS.

Esquema N°	Pág.
1. Camino metodológico para la determinación de la Actividad Anticoagulante del alga marina verde <i>Udotea flabellum</i>	44

ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla	Pág.
I. Clases de las algas marinas verde	21
II. Nomenclatura Internacional de los Factores de la Coagulación	46
III. Evaluación de la Actividad Anticoagulante	46

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura N°	Pág.
1. Taxonomía del alga marina verde <i>Udotea flabellum</i>	23
2. Cascada de la Coagulación	37

ÍNDICE DE CUADROS.

Cuadro N°	Pág.
1. Estadístico de Tiempo de Protrombina (TP) y Tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPA)	47



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
LICENCIATURA EN BIOANÁLISIS



ACTIVIDAD BIOLÓGICA EN EL EXTRACTO ACUOSO OBTENIDO DEL
ALGA MARINA VERDE *Udotea flabellum*

Autoras:

Wanda Kimberlay Ramírez Vázquez
Wendy Kimberley Ramírez Vázquez

Tutor:

Dr. Pablo Djabayan Djibeyan

Co-tutor:

Dr. Juan Carlos Yépez González

RESUMEN

Es conocido que los organismos marinos producen sustancias que poseen actividades biológicas y estructuras únicas, siendo posible que nuevos metabolitos secundarios con propiedades particulares puedan ser halladas de estos organismos ya que adquieren mayor importancia los productos naturales marinos, debido al interés de la investigación y a la necesidad de encontrar moléculas nuevas que tengan una aplicación en el campo de la industria farmacéutica para combatir enfermedades. La muestra del alga en estudio fue recolectada en el Parque Nacional Morrocoy ubicado en el Estado Falcón, Venezuela y transportada en cavas con hielo al laboratorio de la Cátedra de Hematología de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis. El extracto acuoso fue obtenido por disrupción mecánica usando una licuadora convencional como método de extracción. La evaluación de la actividad anticoagulante se realizó a través de la medición del Tiempo parcial de tromboplastina activada y el tiempo de protrombina de un plasma tratado con el extracto acuoso del alga. El tiempo de tromboplastina parcial activada se prolongó por más de 300 segundos y el tiempo de protrombina hasta 58 segundos. Finalmente en esta investigación en la que se evaluó al alga marina verde *Udotea flabellum*, se determinó la presencia de sustancias con actividad anticoagulante.

Palabras claves: Alga marina, actividad biológica, extracto, *Udotea flabellum*.

INTRODUCCIÓN

Las algas no constituyen hoy en día una categoría taxonómica. Sin embargo este término sigue siendo útil para agrupar organismos muy diversos, tanto procariotas, que no presentan orgánulos celulares delimitados por membrana, como eucariotas, que si lo presentan. Basándose en ese criterio el término “alga” se aplica a los organismos de naturaleza vegetal, ya sean de agua dulce o agua salada, que no desarrollan flores como lo hacen las plantas vasculares terrestres y acuáticas.

Una gran cantidad de fármacos han sido aislados a partir de la investigación fotoquímica en plantas vasculares y no vasculares, obteniendo muy buenos resultados al caracterizar los principios activos responsables del efecto curativo contra enfermedades que sufre el hombre, esto ha impulsado a la industria farmacéutica, la cual dirige algunos de sus esfuerzos y recursos de investigación hacia este campo.

Sin embargo, no se ha puesto atención a las macroalgas marinas organismos que ofrecen posibilidades de extracción de sustancias con actividad biológica. No obstante, un considerable número de investigadores a nivel mundial se han dedicado a explorar la presencia de metabolitos secundarios en estos organismos que tengan una posible aplicación farmacológica.

Partiendo de los supuestos anteriores y de la importancia que representan las algas marinas, esta investigación tiene como propósito determinar la actividad biológica presente en el extracto acuoso obtenido del alga marina verde *Udotea flabellum* en el parque Nacional de Morrocoy Estado Falcón, Venezuela, a través del empleo del método de disrupción mecánica y el uso de ensayos como el tiempo de protrombina y tiempo protrombina parcial activado, por lo que se espera que los resultados obtenidos en este estudio aporten información novedosa y sirvan de base

para futuras investigaciones encaminadas tanto a la detección como al aislamiento de compuestos con actividad biológica en el campo de las macroalgas marinas

CAPÍTULO I

EL PROBLEMA

Planteamiento del Problema

Se han descrito más de 50.000 especies de algas y todavía hay algunos grupos de los que no se conoce bien cuantas especies lo integran. Las algas son ubiquestas y viven prácticamente en todos los medios, aunque están relacionadas, sobre todo, con el hábitad acuático; se desarrollan también en el suelo o sobre la nieve y el hielo siendo los seres vivos que soportan las temperaturas más extremas. En los ecosistemas acuáticos son los productores primarios más importantes y la base de la cadena alimentaria (Gallardo y cols. 2004).

Las Chlorophytas o algas verdes son las que sintetizan polisacáridos sulfatados que están conformados por azúcares tales como ramnosa, arabinosa, galactosa y mezcla de ellos, así mismo forman complejos como 4 arabinogalactanos, galactoramnananos, entre otros. Sin embargo cabe mencionar que los polisacáridos de las algas verdes son los menos estudiados (Shanmugam y Mody, 2000; citado en McClintock y Baker, 2001).

El primer aislamiento de un polisacárido sulfatado a partir de un alga café *Fucus vesiculosus* se realizó en el año de 1913, por Kylin. Desde ese momento se han extraído una gran cantidad de fucoidanos con grandes variantes en su composición química. Además de fucosa y sulfatos, los fucoidanos también están constituidos de otros monosacáridos, como manosa, galactosa, glucosa y xilosa, ácidos urónicos, grupos acetilo y algunas proteínas, las cuales le proporcionan una estructura distinta a los fucoidanos de cada especie de alga (Bo y cols. 2008).

Muchos polisacáridos de origen algal tienen actividad anticoagulante. Lo más activo suelen ser aquellos aislados a partir de algas rojas y cafés, aunque existen ejemplos interesantes en las algas verdes. Los primeros reportes de actividad anticoagulante en algas se realizaron en los años 30. En ese entonces, se demostró que las algas rojas *Iridaea laminatoides* y *Delesseria sanguinea* contenían sustancias que podían inhibir la coagulación sanguínea (Chagarff y cols. 1936; citado por Shanmugam y Mody, 2000).

En 1996, se reportó la actividad anticogulante de fucanos de bajo peso molecular preparados por degradación de fucanos obtenidos a partir de *Ascophyllum nodosum*. Las fracciones separadas por cromatografía de intercambio iónico exhibieron actividad anticoagulante similar a la heparina (Nardella y cols. 1996).

Ya para entonces, esta era un área de investigación muy prolífica, pero seguían apareciendo reportes interesantes, como el de un xilofucoglucuronano aislado a partir de *Spatoglossum schroederi*, el cual mostró baja actividad anticoagulante, pero resultó ser un poderoso estimulante de la síntesis de heparan sulfato (Leite y cols. 1998).

Shanmugam y Mody en el 2000 en la India realizaron un análisis de actividad anticoagulante de las tres divisiones de algas marinas, resultando que *Codium* spp. y *Udotea* spp. mostraron un gran potencial. Así mismo, relacionaron que el grado de sulfatación y la estructura molecular de los polisacáridos provenientes de las algas eran determinantes para la actividad anticoagulante. En este estudio 12 encontraron el mecanismo de acción de los polisacáridos sulfatados de las algas verdes, ya que inhiben la trombina.

Shanmugam y cols en el 2001 evaluaron la actividad anticoagulante de diferentes especies de Chlorophytas: *Caulerpa*, *Cladophora*, *Bryopsis*, *Boodle*, *Chaetomorpha*, *Ulva*, *Enteromorpha* y *Valoniopsis*. Concluyen que los extractos más activos fueron los que presentaban polisacáridos sulfatados de alto peso molecular, alto contenido de azúcares y sulfato, bajo contenido proteico y ácido urónico.

Las propiedades biológicas de las algas marinas son un precedente importante para la búsqueda de nuevos compuesto ya que recientemente estos han sido reportados como anticoagulantes, antioxidantes, antitumorales, antiinflamatorios, antivirales, antiprotozoarios y antibacteriales (Blunt y cols. 2006 citado en Patel, 2012).

Justificación de la Investigación

Las algas son organismos de naturaleza vegetal ya que son de agua dulce o de agua salada que no desarrollan flotes como lo hacen las plantas vasculares terrestres y acuáticas. El mayor interés económico que le ha dado el hombre a estos organismos es la extracción de ficoloides que se han servido como estabilizadores emulgentes en las industrias alimenticias, farmacéuticas o textil en la fabricación de pinturas, papel u otros alimentos importantes en el consumo humano (Gallardo y cols. 2004).

Actualmente la búsqueda de compuestos con actividad biológica en los organismos marinos, particularmente en las macroalgas, ha interesado a un mayor número de investigadores. Sin embargo, los trabajos de aislamiento de dichas sustancias son escasos y la investigación sobre la posibilidad de que éstos sean utilizados como medicamentos con aplicación específica para el hombre es aislada (López, 2015).

Algunas de estas sustancias pueden servir como una alternativa en el tratamiento en contra de cepas bacterianas resistentes a los antibióticos comerciales (De Lara-Isassi y cols. 1989). Dada la importancia de este tipo de investigaciones el aislamiento, purificación y caracterización estructural de nuevos compuestos bioactivos, nos permite replantear estrategias para el aprovechamiento de los nuevos recursos en diversas áreas de interés, como lo son la farmacología, agricultura, acuicultura, industria cosmética, entre otras.

Venezuela cuenta con una increíble diversidad de especies, tanto de flora como de fauna, lo que implica que una gran variedad de estructuras químicas útiles están siendo ignoradas. Los estudios sobre la actividad biológica en especies marinas venezolanas son muy escasos, por lo que nuestras costas continúan inexploradas. Las algas del género *Udotea* son especies que presentan diversos tipos de actividad biológica, los cuales son objeto de estudio en diferentes países latinoamericanos, delimitados por el mar Caribe. Por otra parte, aunque este género presenta una gran variedad de especies, las mismas han sido poco estudiadas o permanecen aún por descubrir (Martínez, 2012).

Las enfermedades del corazón y la cerebrovasculares son la principal causa de muerte, situación que es recurrente desde hace varios años. Debido al incremento de las muertes por estas enfermedades, es trascendental y necesaria la búsqueda de nuevas alternativas que permitan combatir estos padecimientos, por lo que al existir una amplia diversidad de especies de algas resultan ser un potencial recurso para ser utilizado con fines medicinales, de tal manera que es necesario evaluar la actividad anticoagulante de las algas marinas. Así mismo, es esencial centrarse en las especies que han recibido poca atención como es el caso de las algas marinas verdes que han sido reportadas con una fuente importante de polisacáridos sulfatados y como resultado determinar la actividad biológica de los diferentes géneros, así pues generar información sobre una especie a convertirse en un potencial anticoagulante (Rodríguez, 2013).

Atendiendo a la amplia gama de actividad biológica que se puede encontrar en las algas y en el déficit de información que se tienen en este campo acerca de las especies, se presenta este proyecto de investigación con la finalidad de contribuir a los estudios aplicados del recurso algal y de incentivar a las generaciones futuras a investigar acerca de estos organismos inferiores, considerando la importancia en el área farmacéutica, industrial y en la medicina moderna.

Objetivos de la Investigación

Objetivo General

Evaluar la actividad biológica presente en el extracto acuoso obtenido del alga marina verde *Udotea flabellum* en el parque Nacional de Morrocoy Estado Falcón, Venezuela en el año 2015.

Objetivos Específicos

- Colectar el alga marina verde *Udotea flabellum*.
- Obtener el extracto acuoso del alga marina verde.
- Realizar pruebas de TP y TPTA para determinar la actividad anticoagulante

CAPÍTULO II
MARCO TEÓRICO
Trabajos Previos

Propiedades Anticoagulantes en las Algas Marinas

En el este de Asia, las algas marinas son usadas como una fuente de recursos minerales, vitamínicos y fibras dietéticas. Por lo cual son altamente recetadas como un suplemento alimenticio para el mantenimiento de la salud (Preeprame y cols. 2001).

Muchos estudios realizados han demostrado que la actividad anticoagulante puede estar relacionada con el contenido de sulfatos y la posición, el peso molecular y la composición del azúcar. Los grupos que poseen un alto contenido de sulfatos presentan un mayor efecto anticoagulante, sin embargo se han realizado estudios que demuestran que el peso molecular no influye tanto en la actividad como el grado de sulfatación (Bo y cols. 2008).

Los fucoidanos están presentes en muchos órdenes de algas, principalmente en las alga café (Phaeophyceae), como en el orden de las Fucales y Laminariales, además de Chordariales, Dictyotales, Dictyosiphonales, Ectocarpales y Scytosiphonales (Berteau y Mulloy, 2003).

El potencial bioactivo y las propiedades de los fucoidanos depende de la especie del alga, la composición de la molécula, la densidad, distribución, las uniones de los sulfatos y la purificación del compuesto (Marcel y cols. 2011).

Fisiológicamente, algunos estudios han demostrado la existencia de una correlación entre el contenido de fucooidanos y la profundidad a la que se encuentran las algas, siendo que mientras más cercanas estén a la superficie, éstas contienen una mayor cantidad de polisacáridos sulfatados. Además, los fucooidanos juegan un rol en la organización de la pared celular, y pueden estar relacionados con la vinculación entre alginatos y celulosa, además de encontrarse relacionados con la morfogénesis del embrión de las algas (Berteau y Mulloy, 2003).

De igual manera, se ha mostrado actividad anticoagulante en el Fucooidan o fucano propio de las algas pardas, formado por la L-fucosa monosulfato, el cual puede ser empleado en episodios de trombosis provocando pocos efectos colaterales (Mourao, 2004).

Estudios “*In vitro*” e “*in vivo*” mostraron que un polisacárido sulfatado obtenido de la alga parda *Fucus evanescens* posee una actividad anticoagulante similar a la heparina (Kuznesova y cols. 2003).

Entre otros polisacáridos se encuentran el carragenato, polisacárido que se extrae de varias especies de algas rojas como *Eucheuma* e *Hypnea musciformis*. El carragenato contiene entre un 22 y 35% de grupos sulfato y con base a la cantidad de estos y su ubicación dentro de la molécula se puede clasificar en varios tipos, encontrando que el carragenato λ es el que presentaba la mayor antitrombótica, debido probablemente al mayor contenido de sulfatos en su molécula en comparación con los otros tipos de carragenato (Shanmugan y Mody, 2000).

A partir de *Codium pugniformis*, se extrajo un glucano altamente sulfatado que contenía pequeñas cantidades de galactosa y arabinosa. Este polisacárido mostró actividad similar a la heparina en los ensayos de TPTA y TT, pero no tuvo efecto en el ensayo de TP, lo que sugiere que inhibía uno o más de los factores de la coagulación de la vía intrínseca, pero no tenía efecto sobre los factores de la vía extrínseca (Matsubara y cols. 2000).

Muñoz en el año 2006 realizó un estudio mediante la extracción y caracterización de polisacáridos con actividad anticoagulante a partir de algas colectadas en Baja California Sur de México. Así mismo recolectó 21 especies de algas marinas en donde se encontraban 9 rodofitas, 7 feofitas y 5 clorofitas. Cada especie fue sucesivamente extraída con agua destilada a 25 y 80°C. Los extractos fueron sometidos a los ensayos de tiempo de protrombina (TP) y tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPA). De los 41 extractos ensayados, 9 (22%) mostraron actividad en el ensayo de TP, y 29 (70%) fueron activas en el ensayo de TTPA.

Paralelamente el extracto obtenido a 25°C a partir de *Eisenia arborea* fue el más activo, incrementando el TP y TTPA control a más de 300 segundos a una concentración de 322.3 µg mL⁻¹. El extracto de *Eisenia arborea* se seleccionó para ser sometido a análisis adicional hasta caracterizar la estructura y actividad de la fracción anticoagulante, logrando identificar como un heterofucano sulfatado el responsable de la actividad anticoagulante de dicha alga (Muñoz, 2006).

En otras investigaciones, Rodrigues y cols en el 2011 evaluaron características moleculares de un polisacáridos sulfatado con propiedades anticoagulantes aislados a partir de *Caulerpa cupressoides* (Chlorophyta). Los polisacáridos fueron extraídos por digestión proteolítica, seguido por cromatografía de intercambio iónico. Las fracciones obtenidas se analizaron para distribución de masa agarosa al 0.5% y su composición química. Obtuvieron tres fracciones de polisacáridos sulfatados, de las cuales sólo la fracción II; fue activa con un alto contenido de sulfato, sin embargo las fracciones aisladas de *C. cupressoides* fue menos activa que la heparina.

Fernández en el 2012 estudio polisacáridos del alga marina verde *Codium vermilara* en donde el extracto se obtuvo a través de la extracción a temperatura ambiente y a 90°C, usando como métodos de fraccionamiento del polisacárido la cromatografía de intercambio iónico y precipitación por agitación en soluciones acuosas de cloruro de potasio. Realizo ensayos de

TP y TPTA en donde obtuvo como resultado un arabinano sulfatado que presentó una importante actividad anticoagulante a través de al menos cuatro mecanismos: potenciación de antitrombina y de cofactor II de la heparina e inhibición directa de Factor Xa y de trombina. La inhibición directa de trombina involucra un mecanismo novedoso, donde la unión del polisacárido al exosito 2 de la enzima provoca cambios en la geometría de su tríada catalítica.

Años más tarde Sánchez en el 2013, estudió el alga marina parda *Hydroclathrus clathratus* con el propósito de conocer la actividad anticoagulante. En donde se aislaron los polisacáridos sulfatados de esta alga recolectada en Balandra, Baja California Sur, en México. El material algal fresco se lavó con agua corriente y se secó al sol. Se pesaron 100 gramos de *H. clathratus* y fueron secuencialmente extraídos, utilizando agua a los 25 y 80°C. El extracto con agua caliente fue precipitado con una adición de cloruro de cetil-piridium al 10%. El precipitado se fraccionó por cromatografía de intercambio iónico en DEAE-celulosa. La columna fue eluída con NaCl (0.5M, 1.0M, and 2.0M). Finalmente se obtuvieron seis fracciones, las cuales se sometieron a pruebas anticoagulantes, usando los ensayos de tiempo de protombina y tromboplastina parcial activada. La fracción tres, eluída con NaCl a 1.0 M fue la más activa, incrementando el tiempo de la prueba de TP y TTPa >300 segundos.

Rodríguez en el 2013 evaluó el potencial anticoagulante de cuatro especies del género *Codium* recolectadas en las costas de Baja California Sur, México. Para ello, se obtuvo extractos acuosos a diferentes temperaturas (25°C y 80°C). Así mismo, estudió la relación entre la estructura y la actividad biológica. Los extractos fueron sometidos a los ensayos de tiempo de protrombina (TP) y tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPA). De los cuales *Codium simulans* a 80°C fue el que mostró mayor efecto con TP 85.5 segundos y un TPT 83.4 segundos. Por otra parte, las muestras de 25°C fueron fraccionadas por medio de cromatografía de

intercambio iónico para obtener fracciones libres de impurezas y así evaluar su actividad anticoagulante. De estas fracciones, la fracción de *C. simulans* eluída con NaCl al 0.5 M aumentó considerablemente el TP del plasma sanguíneo 269 segundos y un TPT de 200 segundos.

Antecedentes Históricos

Fueron los griegos Teofrasto y Dioscórides los primeros en utilizar en sus descripciones de la naturaleza el término *Phykos* (planta marina) para designar a las algas; pero fue Linneo quien en su obra *Species plantarum* en 1753 separa las algas con algunas acepciones como los líquenes y las hepáticas del resto de las criptógamas marcando así el comienzo de la nomenclatura de las mismas (Carpenter, 1969).

La utilización del microscopio y el descubrimiento del individuo sexuados en el género *Phykus* representó el comienzo de una nueva era en el estudio de estas plantas. Conforme aumentaba el conocimiento sobre la anatomía microscópica y las características de su reproducción, se vio la necesidad de escribir nuevas especies y géneros (Carpenter, 1969).

Fue en los primeros años de la década de los 50 cuando más se progresó en los conocimientos de esos organismos, gracias a la utilización de la microscopías electrónica de barrido y de transmisión y a las nuevas técnicas procedentes de los campos de la fisiología, la bioquímica y la biología molecular (Gallardo y cols. 2004).

La clasificación de las algas ha experimentado en los últimos 30 años grandes modificaciones, y hoy día no existe una ordenación aceptada por todos los ficólogos; existen propuestas de ordenación matemática que la agrupan en 5 y 16 divisiones (Gallardo y cols. 2004)

Antecedentes Teóricos

Algas

Son un grupo de organismos de estructura simple que producen oxígeno al realizar el proceso de la fotosíntesis, aunque la mayoría de las algas son unicelulares y microscópicas, algunas de 1 o 2 micrómetros de diámetro, muchas son visibles. Muchos géneros de algas tienen representantes que viven en simbiosis con hongos y forman los líquenes. Ciertas algas han evolucionado hacia la pérdida de su capacidad fotosintética (Carpenter, 1969).

En otras palabras, las algas son un grupo informal de protista en su mayor parte fotosintéticos, varían en tamaño desde las formas unicelulares microscópicas hasta las grandes algas marinas multicelulares. Aunque la mayoría de las algas son fotosintéticas como las plantas, no son plantas debido a que carecen de muchas estructuras vegetales. Cuando se encuentra en crecimiento activo las algas están restringidas a ambientes acuosos o húmedos como los océanos. La mayor parte de las algas carecen de gametangio multicelulares que se forman a partir de células individuales (Riaño, 2002).

Organización y Estructura de las Algas.

Es muy variada; las hay unicelulares, pluricelulares, móviles, inmóviles entre otras; suelen ser de tamaño microscópico y de contorno distinto, y viven agrupadas en colonias o cenobios, filamentosos, esféricos o planos. Las unicelulares y otras que flotan libremente constituyen una parte importante del plancton. Las pluricelulares son de tamaño variable y con las células ordenadas de un extremo a otro formando filamentos continuos y ramificados, con un tejido, parecido al parénquima de las plantas superiores.

Su tamaño varía desde longitudes microscópicas a las que miden cientos de metros (Herrera y Butanda, 2009).

En las algas se observa mayor diversidad de estructuras que en cualquier otro grupo de plantas. En varios grupos son notables los tipos filamentosos y membranosos; así mismo las algas verdes, pardas y rojas presentan todos los ejemplos de filamentos enlazados para formar plantas masivas de forma específica. Estos grupos poseen formas de crecimiento organizado, productoras de tejido especializado menos complejos que las plantas vasculares y organizadas de diferente modo. Sus células contienen fundamentalmente celulosas y gelatinas peptídicas; sólo las especies móviles más simples carecen de paredes definidas. Las algas presentan una diferencia relativamente pequeña en sus tejidos y carecen de tejido leñoso, de floema y de otros tejidos característicos de las plantas superiores. Carecen de verdaderos tallos, raíces y hojas (Herrera y Butanda, 2009).

Las masas densas y enmarañadas de algas marinas forman el medio ideal para muchos animales como moluscos, crustáceos, peces, gusanos y pólipos, que encuentran refugio y protección. Constituyen los primeros eslabones en la cadena alimentaria del mar, debido a que sirven de alimento a pequeños animales. Son los únicos organismos capaces de extraer el alimento del agua, del anhídrido carbónico y de los minerales que absorben. El 90% de anhídrido carbónico que es absorbido por las plantas del planeta por su función clorofílica, es transformado por algas (Percival, 1979).

Reproducción de las Algas

Las algas presentan una gran diversidad en cuanto a su reproducción o multiplicación. En las unicelulares es frecuente la formación de nuevos individuos por medio del proceso conocido como bipartición o fisión binaria, donde la célula parental origina dos nuevos individuos idénticos tras la correspondiente mitosis. En las multicelulares de organización sencilla se ha

descrito reproducción asexual por fragmentación o reproducción vegetativa; algunas producen estructura vegetativa de propagación muy especializada como ocurre en las algas pardas (Barne, 1983).

Las algas producen también una gran variedad de esporas responsables de la reproducción asexual: Zoosporas si estas son capaces de moverse, aplanosporas si han perdido su capacidad de movimiento, hipnosporas cuando se rodean de una pared gruesa y actuando entonces como esporas de resistencia. Las esporas se reproducen frecuentemente, en el interior de células vegetativas, pero a veces se generan en células diferenciadas y especializadas denominadas esporangios (Kim y Fritz, 1993).

La reproducción sexual es conocida en la mayoría de los grupos, con la excepción de algunos de los integrados por individuos celulares o coloniales. La fecundación puede realizarse por la fusión de gametos morfológicamente indistinguibles (isogametos), este proceso se denomina isogamia y en las algas unicelulares es común que los propios organismos actúen como isogametos. Si uno de los gametos es menor que el otro (anisogametos) entonces el proceso se conoce con el nombre de anisogamia; en el caso de que uno de ellos sea inmóvil y de gran tamaño (óvulo) y el otro móvil y de menor tamaño (espermatozoides) se conoce como oogamia. Los gametos igual que las esporas se originan en células vegetativas o en estructuras especiales, los gametangeos (Gallardo y cols. 2004).

En los últimos años se han descubierto, durante la fase más crucial del ciclo reproductor, numerosas sustancias químicas denominadas hormonas sexuales o feromonas, que provocan la gametogénesis y la atracción de los gametos, y favorecen la adhesión y fusión de las células sexuales (Gallardo y cols. 2004).

Clasificación de las Algas

Los científicos han clasificado las algas de diversos modos. Tradicionalmente los botánicos han estudiado las formas inmóviles, mientras que las móviles incluso las fotosintéticas han interesado también a los zoólogos. Sin embargo, una división simplista de las algas en animales y vegetales es incorrecta. Muchos biólogos usan un sistema de clasificación que las distribuye en reinos diferentes. Las investigaciones actuales sugieren que existen, al menos, 16 líneas filogenéticas. A una línea filogenética se le suele dar la categoría de un filo en zoología y de una división en botánica (Bonay y Fresno, 2000).

Las líneas filogenéticas de las algas se definen según determinadas características. Entre ellas están: Los pigmentos fotosintéticos, los productos de reserva, la composición de la pared celular, los flagelos de las células móviles y la estructura del núcleo, el cloroplasto, el pirenoide y la mancha ocular. Las algas procariotas, que carecen de membrana nuclear, se clasifican en el reino monera. Las formas unicelulares de las algas eucariotas, que tienen su núcleo rodeado de una membrana, se incluyen en el reino protista, al igual que las líneas filogenéticas con formas pluricelulares, aunque según ciertas clasificaciones estas últimas se incluyen en el reino vegetal (Gallardo y cols. 2004).

Una hipótesis apunta que los orgánulos de las células de las algas han evolucionado a partir del endosimbiontes (organismos que viven en simbiosis en el interior de las células o de los tejidos de un huésped). Los partidarios de esta teoría sitúan a las algas eucarióticas con los protozoos en el reino protista. Se reconocen una división de algas procariota Cyanophyta y nueve de algas eucariotas: Glaucophyta, Chlorarachiniophyta, Euglenophyta, Dinophyta, Cryptophyta, Haptophyta, Ochrophyta, Rhodophyta y Chlorophyta (Boraso y cols. 2009).

División Cyanophyta o Algas Azules

Las Cianofitas comprenden una sola clase, Cyanophyceae. Las algas azules son organismos microscópicos con estructura y pared celular. El tipo de ribosoma y de bioquímica que poseen son similares a los que caracterizan a las bacterias Gram negativas. Pero por la ausencia de bacterioclorofila y de la presencia de clorofila “a” y liberación de oxígeno, fueron asignadas al reino vegetal como “algas verdes – azules” (Gallardo y cols. 2004).

Presentan clorofila a y b y pigmentos accesorios como lo son las ficobiliproteínas. Como sustancias de reserva acumulan gránulos de carbohidratos y de cianoficinas, que es un compuesto de arginina y ácido aspártico. Las Cianofíceas son capaces de fijar nitrógeno atmosférico, capacidad que se ha relacionado con la presencia de células especializadas denominadas heterocistos. Están distribuidas por todo el globo y se desarrollan sobre casi cualquier sustrato húmedo siendo capaces de vivir en las condiciones más extremas de temperaturas, tanto en aguas termales como sobre el hielo, formando parte importante del planctón del mar y de las aguas continentales (Gallardo y cols. 2004).

División Glaucophyta

Pertenecen a las algas eucariotas y constituyen un grupo de nueve géneros específicos con características parecidas a las criptofitas; presentan clorofila a y ficobiliproteínas. Son algas que en lugar de cloroplasto tienen unas cianofíceas simbiotas en su interior y, para algunos autores, representan el primer paso dentro de la teoría endosimbiótica del origen del cloroplasto (Lindorf y Rodríguez, 1991).

División Chlorarachniophyta

Se conocen 5 géneros y seis especies de las Cloraracniofitas, incluyen algas marinas unicelulares, desnudas, ameboide y provista de pseudópodos que forman colonias plasmodiales reticuladas, y especies cocoides y flageladas. Contienen varios cloroplastos con clorofila a y b; cada cloroplasto lleva asociado un pirenoide, situado lateralmente y rodeado por una vesícula (Raven y cols. 1991).

División Euglenophyta

Las Euglofitas están reunidas en una sola clase, que incluyen alrededor de 800 especies conocidas, la mayoría de aguas dulces. De las especies escritas sólo la tercera parte presentan cloroplastos y el resto son heterótrofas. Contienen clorofila a y b por lo que se han relacionado clorofíceas, pero siendo este el único carácter que comparten. Como sustancia de reserva contienen gránulos de un polisacárido especial, el paramilo, que rodea el pirenoide, pero siempre fuera del cloroplasto. El desplazamiento se le atribuye debido a que presentan flagelos que se encuentran sujetos en la base de una endidura en forma de botella denominada reservorio, existen diversidad morfológica de las euglenofíceas (Gallardo y cols. 2004).

División Dinophyta

Comprenden una clase con 550 géneros y 4000 especies. Las dinofitas o dianoflagelas son organismo la mayoría unicelulares que abundan en el mar como en las aguas continentales. Aunque algunos son desnudos la mayoría presentan una cubierta constituida por la membrana plasmática, y bajo esta una capa de vesícula que puede contener gruesas placas

poligonales de celulosa. Contienen cloroplasto con clorofila a y c y varios pigmentos accesorios siendo el más importante la peridinina. El principal productor de reserva es el almidón que se acumula fuera de cloroplasto (Raven y cols. 1991).

División Criptophyta

Se agrupan en una clase y están constituidas por 12 géneros y unas 2000 especies. Comprenden algas flageladas desnudas, tanto marinas como de agua dulce, que presentan clorofila a y c y varios complementarios. La mayoría tienen un cloroplasto único y algunas faltas. Las criptofitas suelen ser sensibles a la luz y algunas especies presentan estigmas y su fecundación es asogama (Gallardo y cols. 2004).

División Haptophytas

Comprenden unas 500 especies flageladas, coloniales y filamentosas y están constituidas en una sola clase. Algunas de las Haptoficeas son desnudas y otras presentan la superficie de las células cubiertas por escamas del aparato de Golgi, poseen flagelos, apéndices y haptonemas que les sirve para unirse al sustrato. La mayoría son marinas y forman parte del plancton y algunas son parásitas que se fijan a las agallas de los peces provocándole la muerte por asfixia (Lindorf y Rodríguez, 1991).

División Ochrophyta

Son algas con organización diversa pues incluyen formas unicelulares, coloniales, filamentosas y talos perenquimáticos. Se caracteriza por la presencia de clorofila a y b, junto con xantofilas y carotenos que enmarcan la clorofila. Debido a la presencia de estos pigmentos muchas Ochrofitas tienen

una coloración verde-amarillenta, dorada o parda. Como sustancia de reserva acumulan aceites y crisolaminaria, pero nunca almidón. Esta división contiene al menos ocho clases de las cuales aparecen con la categoría de división en otras clasificaciones (Strasburger, 1993).

División Rhodophyta o Algas Rojas

Las Rodofitas se caracterizan por la presencia de ficobiliproteínas en ficobilisomas y de tilacoides libres, constituyen un grupo morfológicamente diverso. Unos 10 géneros son unicelulares y el resto multicelulares con filamentos simples o ramificados. La pared celular de estas algas contiene celulosa pero también un alto porcentaje de mucilago, de los que se obtiene productos de interés comercial como el agar y el carraginoso. El producto de reserva más específico es conocido como almidón de florídea que se acumula en el fibroblasto (Strasburger, 1993).

División Chlorophyta o Algas Verdes

Las Clorofilas o algas verdes tienen clorofila a y b se distingue del resto de las algas porque su principal producto de reserva es el almidón que se acumula en el cloroplasto y no en el citoplasma; la formación de almidón está asociada con frecuencia a un pirenoide. Las algas marinas verdes son principalmente acuáticas, por consiguiente aparecen en lagos, ríos, mares y océanos. Estos organismos han sido objeto de un número importante de clasificación automática en la historia (Gallardo y cols. 2004).

Las clorofitas vive predominantemente en las aguas dulces, solo el 10% son marinos; algunos ordenes son casi exclusivamente dulceacuícolas y otros marinos. Estas algas han experimentado mayores cambios sistemáticos en los últimos años (Carpenter, 1969).

Silva, en 1982, menciona que las algas verdes han sido divididas en 9 clases:

Tabla I. Clases de las Algas Marinas Verdes.

1 ^{era}	Prasinophyceae.
2 ^{da}	Chlorophyceae.
3 ^{era}	Ulvophyceae.
4 ^{ta}	Cladophorophyceae.
5 ^{ta}	Bryopsidophyceae.
6 ^{ta}	Zygnematophyceae.
7 ^{ma}	Trentepohliophyceae.
8 ^{va}	Klebsormidiophyceae
9 ^{na}	Charophyceae.

Fuente: (Silva, 1982).

Usos de las Algas

Los usos de las algas son muy diversos agrícolas, industriales, terapéuticos y principalmente alimenticios. En el norte de Europa se recolectan muchas especies para utilizarlas como abono y para extraer los productos minerales que contienen. Algunos tipos (goomen) se utilizan en la confección de colchones y también en preparados industriales, culinarios, cosméticos y farmacéuticos. Las propiedades que poseen ciertas algas de aumentar el volumen en el agua se ha utilizado en cirugía. En Japón forman parte de algunos platos (kanten). Algunas algas (agar-agar) intervienen en la sustancia gelatinosa utilizadas para el cultivo de bacterias y hongos como agentes gelificantes para postres y confitura, como ingredientes, cosmética, dentífricos, etc. De algas marinas se extrae yodo y la combustión de algas

origina cenizas ricas en minerales para fertilizar los suelos (Bonay y Fresno, 2000).

Descripción del Alga *Udotea flabellum*

El orden Halimadales posee los géneros *Udotea*, *Halimeda* y *Caulerpa*. Este tipo de alga pertenece a la clase Chlophyceae, el género *Udotea* pueden ser encontradas creciendo en los lechos marinos tropicales y subtropicales arenoso y fangosos anclados por sifón rizoidal ramificado y bulboso. El talo en forma de abanico, de esta célula cenocíticas gigante y única, consiste de unos sifones entrelazados, los cuales contienen tanto cloroplasto como amiloplastos, por lo que el talo es heteroplastídicos. El polisacárido más importante en la pared celular es el B-1.3 xilano y muchas especies presentan en el talo incrustaciones de carbonato de calcio forma de agujas cristalinas de aragonita, localizadas fuera de la pared celular entre los sifones estrechamente entrelazados (Percival, 1979).

Cabe destacar que la propagación vegetativa y la multiplicación se realizan vía el crecimiento de estolones que se extienden sobre la superficie del sedimento en el lecho marino y que se anclan a intervalos. Estos estolones dan origen a nueva planta en cada intervalo (Hillis-Colinvaux, 1980).

Por otra parte *Udotea flabellum* presenta en su parte superior forma de abanico de color verde oscuro que puede crecer tan grande como 12 cm, un grupo de rizoides sostiene la planta en posición vertical, su taxonomía puede observarse en la figura número 1. Cuando las condiciones son favorables esta especie puede reproducirse rápidamente así mismo no son apetecibles por los peces o invertebrados (Kim y Fritz, 1993).

Figura N° 1. Taxonomía del Alga Marina Verde *Udotea flabellum*

Taxonomía	<i>Udotea flabellum</i>
Reino: Plantae Filo: Chlorophyta Clase: Chlorophyceae Orden: Bryopsidales Familia: Udoteaceae Género: Udotea Especie: <i>Udotea flabellum</i>	

Fuente: (Kim y Fritz, 1993)

Los Polisacáridos Sulfatados

Forman una clase de macromoléculas biológicas con estructuras diversas que representan variadas propiedades fisicoquímicas, que varían de acuerdo al largo de la cadena polisacárido, el peso de la molécula y los parámetros estructurales (Marcel y cols. 2011 citado en Talarico, 2008).

El término fucoidano se refiere a los polisacáridos sulfatados producidos como metabolitos secundarios de todas las algas, se encuentran principalmente constituidos por L-fucosa y grupos éster sulfatados. Estos polisacáridos se encuentran en la pared celular, además de espacios intercelulares (Marcel y cols. 2011), mientras que a los polisacáridos sulfatados que provienen de animales, principalmente invertebrados marinos, se les llama fucanos (Holtkamp y cols. 2009).

Debido a que se descubrió por primera vez en las algas del orden Fucales (Phaeophyceae) se le llamó fucano o fucoidano. Algunos autores diferencian estos dos términos, de forma que usan el término 'fucano' para describir heteropolímeros sulfatados que contienen además de L-fucosa, D-xilosa, D-galatosa, D-manosa y ácido D-glucurónico, mientras que utilizan

el término 'fucoidano' para referirse a homopolímeros sulfatados de algas constituidos por L-fucosa y grupos sulfato (Bilan y cols. 2010).

Sin embargo, a pesar de que hay muchos estudios acerca de la composición y estructura química de los fucoidanos o fucanos de algas en los últimos años; todavía no se ha conseguido elucidar completamente su composición. Esto es debido en gran parte a su gran heterogeneidad y complejidad estructural que está condicionada no sólo por diferencias entre las especies, sino también entre partes de la planta e incluso por el método de extracción empleado. De tal forma que cada fucoidano extraído de una determinada especie con un método en concreto, será único en cuanto a estructura y composición, dando lugar por tanto a diferencias en cuanto a actividades biológicas (Eluvakkal y cols. 2010).

Con todo ello, factores como el peso molecular, la cantidad y posición de grupos sulfato y la composición y conformación de los azúcares que lo componen, parecen tener una gran influencia en la actividad biológica del fucoidano (Rioux y cols. 2010).

De los polisacáridos estructurales destacan los polisacáridos sulfatados, polímeros que contienen en su estructura una cantidad importante de grupos éster sulfatos, presentes mayoritariamente en bacterias, algas y animales. En las algas, la estructura de estos polisacáridos varía en composición, secuencia monomérica, peso molecular, configuración anomérica, posición del enlace glicosídico y densidad de cargas. Estas variaciones estructurales dependen del tipo de alga que los produce y de la manera en que ellas responden al medio ambiente (Usov 2011 citado en Kumar y cols. 2011).

Con respecto a las actividades biológicas, son muchas y muy variadas las que se le atribuyen a estos polisacáridos sulfatados de las algas, tales como actividad anticoagulante, antiviral, antiadhesiva, antiinflamatoria, antiproliferativa, antitumoral y antioxidante, entre otras (Li y cols. 2008).

Principales Propiedades de los Polisacáridos Sulfatados.

Los polisacáridos sulfatados además de ser componentes estructurales y de reserva de la pared celular de las algas y jugar un importante papel como fibra alimentaria, presentan muchas propiedades biológicas de gran interés para el consumo humano. Varios estudios han demostrado que tanto la composición de polisacáridos sulfatados y otros nutrientes como las propiedades biológicas de las algas dependen de muchos factores como la variación estacional, la localización geográfica, la calidad nutricional del agua de mar y otros factores relacionados con los procesos de obtención y extracción de los polisacáridos (Rioux y cols. 2010).

Además la bioactividad de los polisacáridos sulfatados de las algas está relacionada con una compleja interacción entre diferentes factores como el grado de sulfatación, la distribución de los grupos sulfato en la molécula, el peso molecular, etc. Aunque son muchos los estudios sobre la estructura química de los polisacáridos sulfatados de algas todavía no se han podido esclarecer las relaciones entre estructura y actividad biológica (Jiao y cols. 2011).

Son muchas las propiedades biológicas atribuibles a los polisacáridos sulfatados de las algas, entre ellas las más relevantes son: Actividad antioxidante, anticoagulante, antiviral, anticancerígena e inmunomodulatoria que se recogen en estudios recientes de revisión bibliográfica además se han descrito otras propiedades menos conocidas para los polisacáridos de algas como pueden ser: Actividad antimicrobiana, antiproliferativa, antiinflamatoria (Wijesekara y cols. 2011).

Extractos Acuosa

Los procesos más popularmente conocidos para transformar una planta medicinal en Medicina para el hombre son la infusión y la

decocción. En estos procesos, se usa el agua hirviendo como líquido para extraer las sustancias activas de dentro de los tejidos vegetales. El agua en ebullición, en contacto con la planta fresca o seca, hace que las células vegetales estallen vertiendo su contenido de sustancias activas. Los preparados como estos se denominan técnicamente "Extractos acuosos" y su ventaja principal es que son fáciles y rápidos de preparar en la casa. Sin embargo, los extractos acuosos deben ser usados en el momento, o dentro de un periodo reducido de tiempo, ya que no son estables (Darr, 1981).

La degradación bioquímica y la contaminación microbiana hacen que rápidamente estos preparados ya no sean aptos para el consumo humano o que pierdan sus propiedades curativas. Otra limitación importante de los extractos acuosos tales como las infusiones y decocciones es que algunas sustancias activas vegetales son sensibles a las altas temperaturas y entonces pierden sus propiedades cuando son sometidas al agua en ebullición (Darr, 1981).

Actividad Biológica

Es la capacidad inherente de una sustancia, tal como un fármaco o una toxina, para alterar una o más funciones químicas o fisiológicas de una célula. Esta capacidad no sólo está relacionada con la naturaleza física o química de la sustancia, sino también con su concentración y con la duración de la exposición celular a esa sustancia (Cann, 2005).

La Sangre

Es una variedad de tejido conjuntivo constituido por células sanguíneas suspendidas en el líquido extracelular, el plasma. Está contenida en los vasos sanguíneos y circula por ellos gracias a la contracción del corazón y a la elasticidad de las paredes vasculares. La sangre actúa

manteniendo la composición adecuada y casi constante de los líquidos corporales, los que permiten la nutrición, el crecimiento y la función de las células del organismo. Participa en el intercambio entre el medio externo y los tejidos corporales y además es portadora de hormonas y de otras sustancias biológicamente activas, que regulan en el funcionamiento de órganos como el hígado, la médula ósea y las glándulas endocrinas (Eynard y cols. 2008).

Composición de la Sangre

Alrededor del 60% es plasma y el 40% son células sanguíneas, estos porcentajes pueden variar considerablemente en diferentes personas dependiendo del género, peso y otros factores (Guyton y Hall 2006).

La sangre está constituida por una parte sólida que corresponde a los elementos formes tales como eritrocitos que contienen en su interior hemoglobina que es la proteína encargada de transportar oxígeno desde los pulmones hasta los tejidos; leucocitos que están involucrados en la defensa y protección del organismo frente a microorganismos y agentes extraños, dentro de los cuales se puede mencionar: segmentados neutrófilos, segmentados eosinófilos y segmentados basófilos, linfocitos y monocitos; y las plaquetas que desempeñan un papel clave en las reacciones de hemostasia. Así mismo, la sangre está conformada por una parte líquida que recibe el nombre de plasma y es donde se encuentran suspendidos dichos elementos (Gal, 2007).

El plasma es el componente mayoritario de la sangre; es una solución acuosa de color amarillento en la que habitualmente se encuentran gases disueltos, electrolitos, iones y sustancias más complejas, como lípidos, hormonas, vitaminas, cofactores, proteínas plasmáticas. Es precisamente el plasma que le da el carácter líquido a la sangre ya que aproximadamente el

90% de su composición es agua. El 10% restante lo componen las proteínas y en menor proporción otros solutos (Cediel 2009).

La composición del plasma es idéntica del líquido intersticial excepto por su contenido de proteínas plasmáticas. La albúmina son el tipo de proteínas más abundante en el plasma y constituyen alrededor del 60% del total. Las albúminas y otras nueve proteínas (entre ellas las globulinas, la proteína de la coagulación, fibrinógeno y la proteína transportadora de hierro transferrina) representa más del 90% de las proteínas plasmáticas. El hígado sintetiza la mayor parte de las proteínas plasmáticas y la secreta hacia la sangre. Algunas globulinas denominadas inmunoglobulina o anticuerpos son sintetizadas por células especializadas y no por el hígado, y luego son secretadas hacia la sangre (Silverthorn, 2008).

Hemostasia

Es el proceso que permite mantener la sangre dentro de un vaso sanguíneo lesionando. Lo opuesto a la hemostasia es la hemorragia. La hemostasia consta de 3 pasos principales: 1. vasoconstricción, 2. bloqueo temporario de la ruptura con un tapón plaquetario y 3. Coagulación de la sangre o formación de un coágulo que sella el orificio hasta que se reparan los tejidos (Silverthorn, 2008).

La sangre normalmente circula dentro de un sistema cerrado de vasos. Una lesión traumática, como la incisión de un dedo, secciona vasos sanguíneos y resulta en hemorragia. Para minimizar la pérdida de la sangre, normalmente se movilizan plaquetas inertes y las proteínas disueltas en el plasma para formar una masa insoluble o barrera estructural que ocluye los vasos lesionados. La barrera se limita al sitio de la lesión de manera tal que la circulación se mantiene en los vasos de otras partes del cuerpo. Los mismos elementos proporcionan un sistema continuo de vigilancia que en

circunstancias normales evita el escape de plasma y de células al interior de los tejidos (McKenzie, 2000).

El proceso de formación de la barrera contra la pérdida de sangre y para la limitación en el sitio lesionado es la hemostasia, es un término que procede de las palabras griegas haima que significa sangre y stasis que significa detener. La masa de la barrera se conoce como tapón hemostático, coágulo sanguíneo o trombo. La hemostasis se produce en etapas llamadas hemostasia primaria, hemostasia secundaria y fibrinólisis. Durante la hemostasia primaria, las plaquetas interactúan con ellas mismas y con los vasos lesionados. Como resultado de esta interacción se forma un conjunto de plaquetas y en este punto el tapón hemostático primario. El cual detiene temporalmente la hemorragia, pero es frágil y fácilmente se desprende de la pared vascular, por lo que subsecuentemente se depositan tiras de fibrina sobre el tapón de plaquetas primario para hacerlo fuerte y estable y permitir la reparación de la herida sin pérdida adicional de sangre (McKenzie, 2000).

Coagulación

Es el conjunto de reacciones que conducen a la formación de fibrina, proteína insoluble que evita la pérdida de sangre cuando se lesiona un vaso. Según su función, estas reacciones se pueden clasificar en: a) procoagulantes, que conducen a la formación de la fibrina, evitando la pérdida de la sangre; b) anticoagulantes que regulan o controlan la coagulación e impiden que los factores activados generados en el punto de hemorragia extiendan su acción y se produzca una coagulación generalizada, y c) fibrinolítica que son las encargadas de eliminar la fibrina cuando ya no es necesaria para evitar la pérdida de sangre, restableciendo el flujo sanguíneo (Sans-Sabrafen y cols. 2006).

Anticoagulantes

Los anticoagulantes impiden la progresión de la coagulación mediante la interferencia con unos o más factores de la coagulación o sus proteínas controladoras; previniendo así formación y depósito de trombos, e inhibiendo la fabricación de la trombina y la protrombina, que son las enzimas responsables de la coagulación (Clark y cols. 1993).

El primer anticoagulante natural fue encontrado por McLean en el hígado, pero fueron Howell y Holten en 1918 quienes lo llamaron heparina (Goodman y cols. 1996).

La heparina ha sido usada ampliamente en medicina. Químicamente se define como un polisacárido formado por residuos de ácido D-glucurónico O-sulfatado y D-glucosamina con un grupo O-sulfato y otro N-sulfato (Foye, 1984).

Los polisacáridos contenidos en la pared celular de las algas difieren de los de la heparina en que no contienen grupo N-sulfato en su molécula. Sin embargo una de las características principales de algunos polisacáridos algales es precisamente el contenido de grupo O-sulfato, característica que no es propia de los polisacáridos de la pared celular de plantas terrestres (Baker y Murphy, 1981).

Factores de la Coagulación

Los factores de la coagulación se han designado con números romanos del I al XIII, de acuerdo con el orden de su descubrimiento y no de la secuencia en la cascada de reacción. Cada factor también tiene uno o más nombres comunes o sinónimos. El factor VI ya no se incluye en la secuencia de la coagulación ya que en la actualidad este “factor” se considera la variante activada del factor V. cuando un factor se activa, tiene actividad enzimática y la letra “a” acompaña el número romano de la designación. Hay

varias excepciones en esta terminología. El factor II (protrombina) en su variante activada se conoce preferentemente como trombina más que como factor IIa y cuando el fibrinógeno (factor I) se fragmenta por efecto de la trombina se denomina fibrina. La fibrina, es el producto final de la cascada, no tiene propiedades enzimáticas y la tromboplastina tisular y el calcio no tienen una variante activada (McKenzie, 2000).

Mecanismos de Coagulación Sanguínea

Al dañarse un vaso sanguíneo se inicia un proceso de reducción de pérdida de sangre llamado hemostasia, el cual ocurre de forma secuencial con la participación de factores vasculares, plaquetarios y plasmáticos (Garrido y cols. 2006).

A grandes rasgos, el proceso comienza con la activación de las plaquetas o trombocitos, los cuales se adhieren a la zona lesionada de la pared vascular, uniéndose al tejido conectivo endotelial debido a la secreción del factor de von Willebrand, y comienzan la formación de un tapón compuesto por 8 trombocitos, deteniendo así el sangrado. Posteriormente, la enzima trombina se encarga de formar un polímero de fibrina, el cual se incorpora al tapón, formando un coágulo (Koolman y Röhm, 2004).

La coagulación sanguínea se lleva a cabo mediante varias reacciones, donde la más importante es la conversión enzimática catalizada por una proteína plasmática, la trombina del fibrógeno soluble (factor I), en un polímero de fibrina el cual se depositará en el tapón primario. Por otro lado, la trombina (factor IIa) es una serina proteinasa que hidroliza la molécula de fibrógeno y libera péptidos pequeños, dejando accesibles algunos sitios de unión para la molécula de fibrina dejando que se agreguen espontáneamente entre sí. Al final, se crea la formación de una red covalente por acción de la transglutaminasa (factor XIII) estabilizando de este modo el tapón (Koolman y Röhm, 2004).

Tabla N° 2: Nomenclatura Internacional de los Factores de la Coagulación.

Factor	Nombre
I	Fibrinógeno
II	Protrombina
III	Tromboplastina
IV	Calcio
V	Proacelerina
VII	Proconvertina
VIII	Factor Antihemofílico A
IX	Factor Antihemofílico B (Christmas)
X	Factor de Stuart-Prower
XI	Antecesor tromboplástico del plasma
XII	Factor de Hageman
XIII	Factor estabilizante de la fibrina

Fuente: Sans-Sabrafen y cols. 2006.

Generalmente, la trombina se encuentra presente en la sangre como una proenzima inactiva. La protrombina por su parte, puede ser activada mediante dos mecanismos desencadenados por daños de la pared vascular. En estas dos vías se forman cascadas de reacciones enzimáticas en donde las proenzimas inactivas son transformadas proteolíticamente en proteinasas activas, y estas, a su vez, activan a la proenzima siguiente. Algunas de las reacciones requieren además, de factores proteicos adicionales, fosfolípidos aniónicos o iones de Ca^{2+} (Koolman y Röhm, 2004).

La vía exógena, también llamada extravascular, se lleva a cabo cuando la tromboplastina tisular (factor III), una proteína de membrana presente en las capas más profundas de la pared vascular, activa al factor VII de la coagulación. Su forma activa (VIIa) favorece autocatalíticamente su formación y libera a los factores activos IXa y Xa. El factor IXa produce una mayor cantidad de factor Xa con ayuda de fosfolípidos aniónicos y Ca^{2+} .

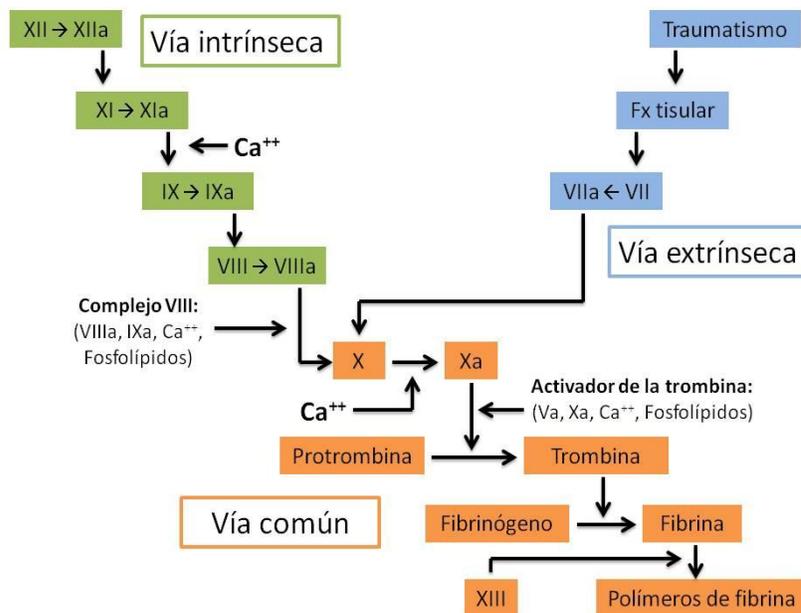
Éste último factor, apoyado por el factor Va, lleva a la liberación final de la trombina activa (Koolman y Röhm, 2004).

Por otro lado, la vía endógena o intravascular se desencadena por los factores por la liberación del factor tisular o factor III, el cual es liberado por los tejidos como consecuencia de un traumatismo (Garrido y cols. 2006). Además, intervienen los factores XIIa, IXa, XIa y Xa (Koolman y Röhm, 2004).

En ambas vías es necesaria la presencia de trombocitos activados, puesto que en la superficie de éstos se llevan a cabo varias reacciones. En el complejo protombinasa, los factores Xa y II, ayudados por iones de Ca^{2+} y fosfolípidos aniónicos, se unen a la membrana de los trombocitos. Para que esta unión se lleve a cabo, es necesario que los factores II y X contengan el aminoácido no proteico γ -carboxil-glutamato (Gla), cuyos residuos se forman debido a la carboxilación prostraduccional de los factores en el hígado. Estos residuos se encuentran localizados en dominios especiales, los cuales generan el contacto 11 con los iones de Ca^{2+} , además los factores VII y IX se encuentran unidos a la membrana fosfolipídica por los residuos de Gla (Koolman y Röhm, 2004).

Además de transformar el fibrinógeno en fibrina, la trombina activa lleva a su propia formación de manera indirecta, debido a que cataliza la formación de los factores V y VII. La trombina también cataliza la activación del factor XIII, desencadenando de esta manera la formación de la red de fibrina (Koolman y Röhm, 2004).

Figura N° 2. Cascada de la Coagulación.



Fuente: Silverthorn, 2008.

Sistema de Hipótesis

Hipótesis Alternativa (H_a)

Es posible encontrar actividad biológica en el extracto acuoso obtenido del alga marina verde *Udotea flabellum*.

Hipótesis Nula (H_0)

No es posible encontrar actividad biológica en el extracto acuoso obtenido del alga marina verde *Udotea flabellum*.

CAPÍTULO III

MARCO METODOLÓGICO

Tipo de Investigación

La investigación es evaluativa siendo esta un tipo especial de investigación aplicada cuya meta, a diferencia de la investigación básica, no es el descubrimiento del conocimiento. Poniendo principalmente el énfasis en los mecanismos aplicados en la evaluación de los hechos, asumiendo también las particulares características de la investigación aplicada, las cuales permitan a las predicciones se conviertan en un resultado de la investigación y las recomendaciones que se hacen en los informes evaluativos son, por otra parte, ejemplos de predicción (Hernández y cols. 2006).

Diseño de la Investigación

El diseño de la investigación es experimental en la medida que se realiza mediante la manipulación de una o más variables experimentales no comprobadas, con el fin de describir de qué modo o por qué causa se produce una situación o acontecimiento particular, así mismo el experimento es una situación provocada por el investigador para introducir determinadas variables de estudio manipuladas por él mismo, para controlar el aumento o disminución de esas variables y sus efectos en las conductas observadas. Utiliza grupos experimental y de control (Silva, 2010).

En atención a lo expuesto, Pineda y cols (2008) agregan que los estudios experimentales o de intervención son los más fuertes para

establecer casualidad entre variables y se caracterizan por la introducción y la manipulación del factor causal o de riesgo para la determinación posterior de su efecto.

Población y Muestra

Para realizar este estudio se seleccionó el alga marina verde *Udotea flabellum*, la cual fue recolectada en el Parque Nacional Morrocoy, en el Estado Falcón, Venezuela. Posteriormente, el alga recolectada se trasladó en una cava con hielo, para su procesamiento y análisis (Anexo 1).

Muestra Biológica

El plasma citratado de cinco donantes provenientes de los alumnos de la cátedra de Hematología, Escuela de Bioanálisis, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de los Andes, Mérida, Venezuela.

Reactivos y Químicos.

- Tubos con citrato de sodio al 3.8%.
- Reactivo de tromboplastina (THROMBOREL S).
- Reactivo de Cefaloplastina activada (ACTIN).
- Cloruro de Calcio (CaCl_2).

Instalaciones

La parte experimental de esta investigación se llevó a cabo en las instalaciones del Laboratorio Asistencial y Docencia de la Cátedra de

Hematología de la Universidad de los Andes de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Mérida, Venezuela.

Sistema de Variables

Una variable es una característica o cualidad, magnitud o cantidad, que puede sufrir cambios, y que es objeto de análisis, medición, manipulación o control en una investigación. Ahora bien, según su función, las variables se clasifican en: independientes, dependientes e intervinientes; en donde las variables dependiente constituyen los efectos o consecuencias que se miden y dan origen a los resultados de la investigación. (Arias, 2006).

Por otra parte, es importante constatar que las variables independientes son la causa de la variación observada en las variables dependientes. (Vit, 2005).

De acuerdo a lo anteriormente descrito, la presente investigación consta de las siguientes variables:

Variable Independiente:

- Composición química del extracto acuoso del alga marina verde *Udotea flabellum*.

Variables Dependientes:

- Actividad Anticoagulante.

Variables Intervinientes:

- Temperatura.
- pH.

- Salinidad del agua del mar.

Instrumento de Recolección de Datos

El procedimiento para la recolección de información que se adopta al diseño del estudio, es la observación directa de los datos en el Laboratorio, descrita como aquella que nos pone en contacto con los hechos, fenómenos y situaciones en el momento que acontecen y permite la búsqueda deliberada de datos necesarios para desarrollar el proceso investigativo (Cordero y cols. 2005).

Método Estadístico

Los análisis estadísticos de los datos se procesaron por el paquete estadístico SPSS versión 15. Se aplicó la PRUEBA T para comparar las diferencias significativas respecto a las medias.

Procedimiento o Metodología

En la presente investigación se realizaron las siguientes técnicas:

Extracción Sanguínea

Punción Venosa: La punción venosa permite extraer una mayor cantidad de sangre para las pruebas necesarias en hematología. Las venas de elección suelen ser las de la cara anterior del antebrazo (vena cubital, vena cefálica y la vena basílica) porque resulta fácil acceder a ellas.

Se coloca un torniquete en la parte superior del brazo (aproximadamente 5 cm por encima del pliegue) para producir congestión venosa. Luego se selecciona el sitio de la punción: Se le pide al paciente que

abra y cierre el puño varias veces; se escoja una vena accesible. Se introduce la punta de la aguja en un ángulo de 15 - 30° sobre la superficie de la vena escogida y se atraviesa la piel con un movimiento firme y seguro, hasta el lumen de la vena. Una vez que penetra en la vena se debe jalar el émbolo con movimiento continuo para extraer la sangre hasta el volumen requerido; solicite al paciente que abra el puño y afloje el torniquete para que la sangre fluya mejor y remueva la aguja del brazo con movimiento suave al terminar de colectar, sin apretar el área de la punción con el algodón. Posteriormente se procede a llenar los tubos con anticoagulante EDTA y citrato de sodio.

Tiempo de Protrombina (TP).

Se fundamenta en la reacción de tromboplastina tisular con el factor VII en presencia de iones de calcio, para activar el factor X y el factor Xa forma un complejo enzimático con el factor V, calcio y fosfolípidos (del reactivo) para generar actividad tromboplastica por vía extrínseca, que convierte laprotrombina en trombina. La trombina transforma el fibrinógeno en fibrina (Gaudens, 1984).

Tiempo de protrombina (Método de Quick). Protocolo y técnica en el anexo número 2.

Tiempo de Tromboplastina Parcial Activada (TPTA).

Es la prueba de elección para la detección de anormalidades en la vía intrínseca. La prueba mide a todos los factores con excepción del factor VII y del XIII. En esta prueba se incubaba una sustancia activadora como el caolín, celite o ácido eláctico, con plasma para activar los factores de contacto. La activación del factor de contacto se continúa por las adiciones de un fosfolípido sustituto de las plaquetas y calcio. El tiempo que tarda en

formarse un coágulo es generalmente de 32 a 46 segundos después de agregarse el fosfolípido y el calcio, pero difieren según el tipo de reactivo usado (Mckenzie, 2000).

Tiempo de protrombina parcial activada (Método de Quick). Protocolo y técnica en el anexo 3.

Preparación del Alga Marina.

Una vez que se descongeló el alga marina verde *Udotea flabellum*, se preparó realizando una limpieza manual con abundante agua corriente y posteriormente se lavó con agua destilada para remover el exceso de sal, arena, detritus, organismos epífitos o partículas extrañas presentes en el material vegetal objeto de estudio.

Método de Extracción

Disrupción Mecánica Utilizando Licuadora Convencional

Método utilizado por Djabayan en el año 2001 donde se pesaron 30 gramos del alga limpia de todo contaminante se licuó utilizando una licuadora convencional (Osterizer Classic, modelo 4065120) con 100 mL de solución salina fisiológica. El alga una vez homogeneizada se filtró a través de un tejido de Nylon fino para eliminar partículas grandes, medianas y pequeñas. Luego de obtener el filtrado se procedió centrifugar a 3000 rpm por 5 minutos empleando una centrifuga (Model HN-S Centrifugue/internacional equipo Company Needham Heights, Mass. 02194 USA), con la finalidad de eliminar las partículas muy pequeñas y microscópicas. El volumen del sobrenadante se midió y se colocó en recipientes de plásticos para su congelación a -20 °C.

Preparación del POOL de Trabajo

Se utilizó plasma sanguíneo humano de 5 donantes sanos. La sangre se obtuvo por venopunción y se mezcló con una solución de citrato de sodio al 3.8%. Posteriormente, se centrifugó a 3000 rpm por 5 minutos para remover el paquete celular y obtener el plasma. Luego se procedió a preparar los siguientes pool:

- **Pool:** Se añadió 1 ml de plasma citratado de cada paciente en un tubo 13x75. Y luego se tomó 0,5 ml y se colocó en tres tubos respectivamente.
- **Pool con Agua Destilada:** Se agregó 0,5 ml del pool anteriormente preparado con 0,5 ml de agua destilada en tres tubos respectivamente.
- **Pool con el Extracto Marino:** Se tomó 0,5 ml de pool citratado con 0,5 del extracto acuoso del alga marina verde *Udotea flabellum* y se deja actuar por 3 minutos a temperatura ambiente en tres tubos respectivamente.

Evaluación de la Actividad Anticoagulante “Tiempo de Protrombina” (TP).

- **De pool:** El ensayo (TP) se realizó de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Se incubó en tubo de 13X75 1 mL del reactivo de tromboplastina a 37 °C por 3 minutos. Luego se colocó 0.1 mL del pool citratado a incubar por 1 minuto, posteriormente se añade 0.2 mL del reactivo de tromboplastina (THROMBOREL S), se mezclaron cuidadosamente por 6 segundos a 37°C. Al momento de agregar el reactivo se activó el cronometro, pasado los 6 segundos se secó y se

limpió el tubo y se observó el punto final con la aparición de la malla de fibrina inmediatamente deteniendo el cronómetro. De igual forma se repitió por triplicado.

- **De pool con Agua Destilada:** El ensayo (TP) se realizó de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Se incubo en tubo de 13X75 1 mL del reactivo de tromboplastina a 37 °C por 3 minutos. Luego se colocó 0.1 mL del pool con agua destilada a incubar por 1 minuto, posteriormente se añade 0.2 mL del reactivo de tromboplastina (THROMBOREL S), se mezclaron cuidadosamente por 6 segundos a 37°C. Al momento de agregar el reactivo se activó el cronometro, pasado los 6 segundos se secó y se limpió el tubo y se observó el punto final con la aparición de la malla de fibrina inmediatamente deteniendo el cronómetro. De igual forma se repitió por triplicado.
- **De Pool con Extracto Marino:** El ensayo (TP) se realizó de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Se incubo en tubo de 13X75 1 mL del reactivo de tromboplastina a 37° C por 3 minutos. Luego se colocó 0.1 mL del pool con el extracto marino a incubar por 1 minuto, posteriormente se añade 0.2 mL del reactivo de tromboplastina (THROMBOREL S), se mezclaron cuidadosamente por 6 segundos a 37°C. Al momento de agregar el reactivo se activó el cronometro, pasado los 6 segundos se secó y se limpió el tubo y se observó el punto final con la aparición de la malla de fibrina inmediatamente deteniendo el cronómetro. De igual forma se repitió por triplicado.

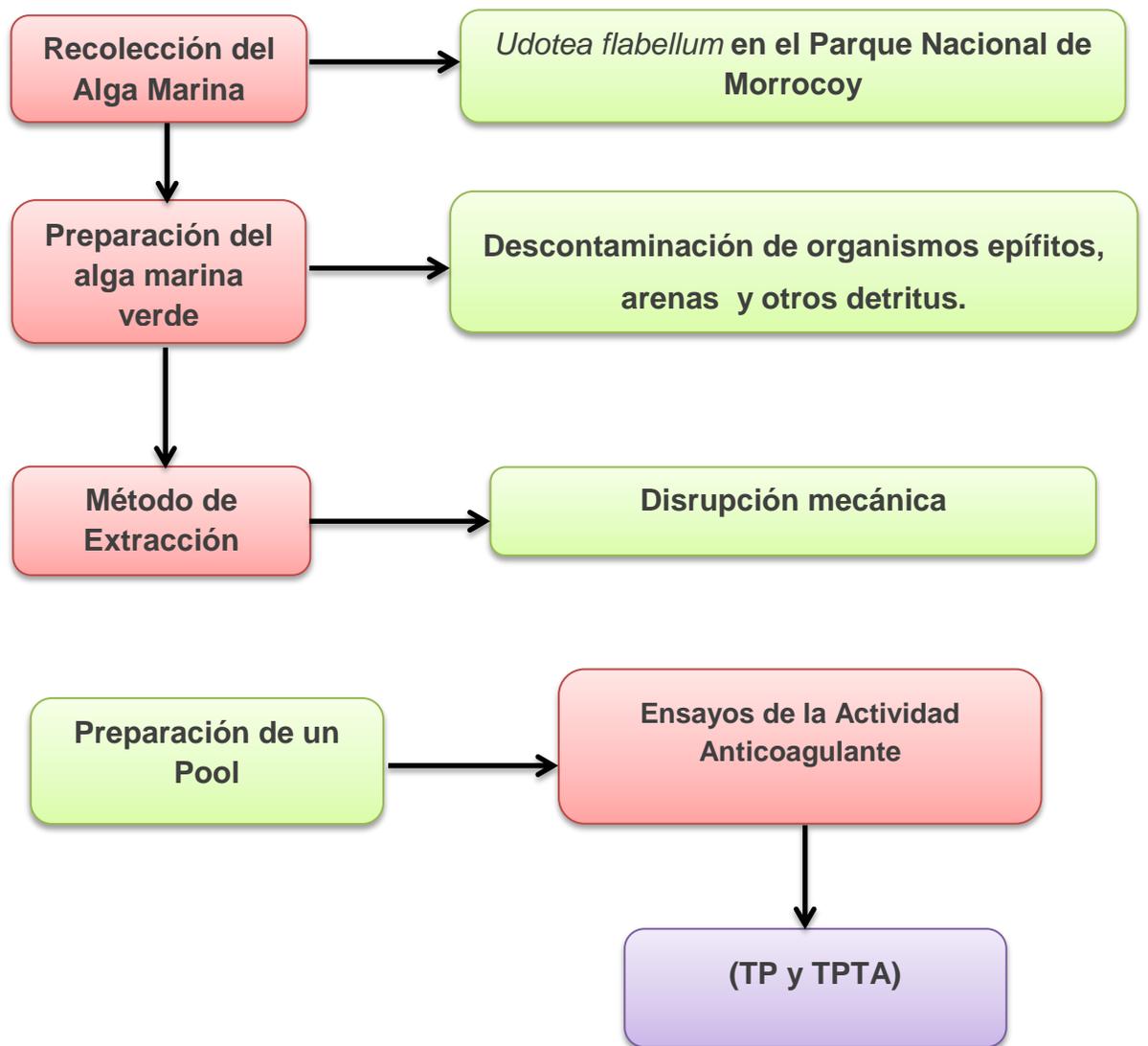
Evaluación de la Actividad Anticoagulante “Tiempo de Tromboplastina Parcial Activado” (TTPA).

- **De Pool:** Para el ensayo tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPA) se realizó bajo las instrucciones indicadas por el fabricante del reactivo. Primeramente se incubó por 5 minutos en un tubo 13x75 0,5

ml de cloruro de calcio al 0.025 mol/L a 37 °C. Después se colocó en otro tubo 0.1 mL del pool y se añadió 0.1 mL del reactivo de Cefaloplastina activada (ACTIN), esta mezcla se incubó por 3 minutos. Al término de la incubación, inmediatamente se agregó 0.1 mL de la solución de CaCl₂ al 0.025 mol/ L se mezclaron cuidadosamente por 21 segundos a 37 °C. Al momento de agregar el reactivo se activó el cronometro, pasado los 21 segundos se secó, se limpió el tubo y se observó el punto final con la aparición de la malla de fibrina inmediatamente deteniendo el cronómetro. De igual forma se repitió por triplicado.

- **De Pool con Agua Destilada:** Para el ensayo tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPA) se realizó bajo las instrucciones indicadas por el fabricante del reactivo. Primeramente se incubó por 5 minutos en un tubo 13x75 0,5 ml de cloruro de calcio al 0.025 mol/L a 37°C. Después se colocó en otro tubo 0.1 mL del pool con agua destilada se añadió 0.1 mL del reactivo de Cefaloplastina activada (ACTIN), esta mezcla se incubó por 3 minutos. Al término de la incubación, inmediatamente se agregó 0.1 mL de la solución de CaCl₂ al 0.025 mol/ L se mezclaron cuidadosamente por 21 segundos a 37°C. Al momento de agregar el reactivo se activó el cronometro, pasado los 21 segundos se secó y se limpió el tubo y se observó el punto final con la aparición de la malla de fibrina inmediatamente deteniendo el cronómetro. De igual forma se repitió por triplicado.
- **De Pool del Extracto Marino:** Para el ensayo tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPA) se realizó bajo las instrucciones indicadas por el fabricante del reactivo. Primeramente se incubó por 5 minutos en un tubo 13x75 0,5 ml de cloruro de calcio al 0.025 mol/L a 37°C. Después se colocó en otro tubo 0.1 mL del pool con el extracto marino y se añadió 0.1 mL del reactivo de Cefaloplastina activada (ACTIN), esta mezcla se incubó por 3 minutos.

Al término de la incubación, inmediatamente se agregó 0.1 mL de la solución de CaCl₂ al 0.025 mol/ L se mezclaron cuidadosamente por 21 segundos a 37°C. Al momento de agregar el reactivo se activó el cronometro, pasado los 21 segundos se secó y se limpió el tubo y se observó el punto final con la aparición de la malla de fibrina inmediatamente deteniendo el cronómetro. De igual forma se repitió triplicado.



Esquema N° 1. Camino Metodológico para la determinación de la actividad biológica del alga marina verde *Udotea flabellum*.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Evaluación de la actividad anticoagulante. Tiempo de protrombina (TP) y tiempo de tromboplastina parcial activada (TPTA).

La actividad anticoagulante del extracto del alga marina verde *Udotea flabellum*, se observó mediante la realización de ensayos de tiempo de protrombina (TP) y tiempo de tromboplastina parcial activada (TPTA), utilizando plasma sanguíneo humano, obteniéndose los siguientes resultados de la tabla N° 2.

En el ensayo de la actividad anticoagulante realizado al extracto acuoso de *Udotea flabellum*, se observó un efecto diferente en comparación con los realizados con agua destilada y el pool citratado. Obteniendo por parte del extracto marino un TP de 56.3 segundos y un TPTA mayor de 300 segundos; ambos prolongados con respecto a los controles que fueron de 12.6 y 41.3 segundos respectivamente.

Tabla N° 2. Evaluación de la Actividad Anticoagulante.

	TP	TPTA
POOL	13 Segundos	41 Segundos
	12 Segundos	40 Segundos
	13 Segundos	43 Segundos
POOL CON AGUA DESTILADA	11 Segundos	70 Segundos
	11,5 Segundos	68 Segundos
	13 Segundos	71 Segundos
POOL CON EL EXTRACTO DEL ALGA <i>Udotea flabellum</i>	55 Segundos	> de 300 Segundos
	58 Segundos	> de 300 Segundos
	56 Segundos	> de 300 Segundos

Fuente: Instrumento de recolección de datos por los autores, sobre la actividad anticoagulante del extracto acuoso marino *Udotea flabellum*, utilizando la técnica: Tiempo de protrombina (TP) y tiempo de tromboplastina parcial activada (TPTA).

Cuadro N° 1. Estadístico de Tiempo de Protrombina (TP) y Tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPA).

		<i>P</i>
TP POOL (12,0000)	TP POOL AGUA DESTILADA (11,8333)	,899
TP POOL (12,0000)	TP POOL EXTRACTO ALGA <i>Udotea flabellum</i> (56,3333)	.001
TP POOL AGUA DESTILADA (11,8333)	TP POOL EXTRACTO ALGA <i>Udotea flabellum</i> (56,3333)	,001
TTPA POOL (41,3333)	TTPA POOL AGUA DESTILADA (69,6667)	.000
TTPA POOL (41,3333)	TTPA POOL EXTRACTO ALGA <i>Udotea flabellum</i> (> 300,0000)	,000
TTPA POOLAGUA DESTILADA (69,6667)	TTPA POOL EXTRACTO ALGA <i>Udotea flabellum</i> (> 300,0000)	.000

Fuente: Datos recopilados por el autor mediante la estudio de las pruebas de TP y TPTA. Aplicando el sistema estadístico SPSS versión 15.

Al comparar estadísticamente el pool (12 segundos) con el pool más agua destilada (11,83 segundos), se obtiene una p de ,899 (>0,05) por lo que estadísticamente son iguales, lo que significa que el pool restituyo los factores al agua destilada, es decir, el pool en una dilución 1/2 con agua destilada corrige el TP.

Al comparar estadísticamente el pool (12 segundos) con TP POOL EXTRACTO ALGA *Udotea flabellum* (56,3 segundos) se obtiene una p de ,001 (< 0,05) por lo que estadísticamente son diferentes, lo que significa que el alga pudo afectar los factores de la vía extrínseca y de la vía común de la cascada de la coagulación.

Contrariamente el TPTA: Al comparar estadísticamente el pool (41,3 segundos) con el pool más agua destilada (69,66 segundos), se obtiene una p de ,001 (< 0,05) por lo que estadísticamente son diferentes, lo que significa que el pool no restituyo suficientemente los factores al agua destilada, es

decir, el pool en una dilución 1/2 con agua destilada no corrige el TPTA. El valor numérico del agua destilada pool fue de aproximadamente 1,6 sobre el pool.

Al comparar estadísticamente el pool TPTA (41,3 segundos) con TTPA POOL EXTRACTO ALGA *Udotea flabellum* (>300,0000) se obtiene una p de ,000 (<0,05), a pesar que el pool no con agua destilada no corrigió estadísticamente el TPTA, el valor numérico del alga sobre el pool fue más de 7 veces mayor respecto al pool agua destilada, lo que pudiera interpretarse que el agua destilada en dilución de ½ diluyo el plasma pool afectando la concentración de los factores de la vía intrínseca más vía común. No obstante al comparar el TPTA POOL (41,3333) con TPTA POOL EXTRACTO ALGA *Udotea flabellum* (>300,0000) resulto una p, 000 (< 0,05), es decir son diferentes.

Por lo que se puede decir que la dilución con agua destilada afecto significativamente el TPTA (1,6 veces), el alga aumento significativamente su valor (7 veces), por lo que pudiéramos considerar que el alga afecta considerablemente los factores de la vía intrínseca y de la común.

Discusión

Evaluación de la actividad anticoagulante “Tiempo de Tromboplastina Parcial Activado (TPTA) y tiempo de protrombina (TP)”

La actividad anticoagulante del extracto del alga marina verde *Udotea flabellum*, mostró un TP de 56.3 segundos y TPTA mayor de 300 segundos; siendo este resultado un hallazgo asombroso en la investigación, debido a que Rodrigues y cols 2011 realizaron un estudio de la actividad anticoagulante de un polisacarido sulfatado aislado del alga marina verde *Caulerpa cupressoides* en donde obtuvieron tres fracciones de polisacáridos sulfatados, de las cuales sólo la fracción II; fue activa con un alto contenido

de sulfato, sin embargo las fracciones aisladas de *C. cupressoides* fue menos activa que la heparina. De acuerdo a estos resultados se presume que *Udotea flabellum* perteneciente a la misma familia que *C. cupressoides* podría poseer un polisacárido sulfatado a quien se le puede atribuir dicha propiedad anticoagulante.

Estos resultados obtenidos del alga marina verde *Udotea flabellum* difieren con los reportados por Muñoz en el 2006 en donde obtuvo 41 extractos a partir de algas marinas: 9 rodofitas, 7 feofitas y 5 clorofitas, resultando 9 (22%) con actividad en el ensayo de TP y 29 (70%) fueron activas en el ensayo de TTPA, siendo *Eisenia arboleae* un alga parda con mayor actividad anticoagulante con un TP y TTPA mayor de 300 segundos; en donde se sometió a pruebas adicionales logrando identificar como un heterofucano el responsable de dicha actividad. Sin embargo se evidencia la actividad anticoagulante de las algas marinas.

En otras investigaciones Sánchez en el 2013 estudió la actividad anticoagulante de un alga marina parda *Hydroclathrus clathratus*, obteniendo como resultado un TP y TTPA mayor a 300 segundos, debido a que las algas pardas tienen mayor cantidad de un polisacárido denominado fucoidano; a quien se le atribuye su potente capacidad anticoagulante. De esta manera, los resultados obtenidos del extracto acuoso de *Udotea flabellum* difieren con estos resultados en el TP siendo menos prolongados.

Por otra parte, Rodríguez en el 2013 estudió polisacáridos obtenidos a partir de macroalgas del género *Codium* y su evaluación como anticoagulante alternativo, adquiriendo como resultado un TP de 269,5 segundos y un TTPA de 200 segundos de la fracción aislada de *Codium simulans*. Difiriendo con los resultados de TP de *Udotea flabellum* en los cuales resultó menos prolongados.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones

Las algas de la costa occidental del Estado Falcón, Venezuela presentan compuestos bioactivos con actividad biológica tales como anticoagulante y otras por estudiar.

El alga marina verde *Udotea flabellum* posee actividad anticoagulante.

Se presume que es un polisacárido sulfatado al que se le atribuye su actividad anticoagulante.

Recomendaciones

Se recomienda ampliar el presente estudio integrando un análisis de la variación estacional y además del ciclo de vida, ya que varios autores mencionan que estos son parámetros que influyen principalmente en la producción de polisacáridos. Así mismo, se plantean métodos específicos de purificación, extracción y fraccionamiento tales como: Cromatografía de intercambio iónico, electroforesis, espectroscopia de infrarrojo y otros. Para posteriormente realizar ensayos de coagulación con muestras más pura siendo posible identificar y caracterizar la conformación estructural del compuesto que actúa sobre la cascada de coagulación.

Se recomienda retomar el presente trabajo de investigación de manera que se puedan realizar pruebas de sustitución más específicas tales como: Plasma normal, suero, plasma adsorbido con sulfato de bario y plasma

envejecido; para esclarecer en que factor o factores interviene el extracto crudo del alga marina verde *Udotea flabellum* provocando la inhibición de la coagulación.

Es importante continuar con el estudio de las algas marinas venezolanas, pues estos organismos son una fuente rica en compuestos con estructuras químicas no encontradas en otras plantas, las cuales pueden resultar beneficiosas para el hombre en la cura de graves enfermedades que actualmente lo atacan.

BIBLIOHEMEROGRAFIA

- Arias, F. (2006). *El proyecto de investigación* (6^{ta} edición). Caracas, Venezuela: Editorial Episteme. pp. 25-90.
- Baker, J. y Murphy, V. (1981). Marine product: Compounds from marine organisms. *Chemical Abstracts*, 2, 240-241.
- Barne, R. (1983). *Zoología de los invertebrados* (2^a edición). Madrid: Mc Graw-Hill-Interamericana, 25, 1005.
- Berteau, O. y Mulloy. B. (2003). Sulfated fucans, fresh perspectives: Sfunctions, and biological properties of sulfated fucans and an overview of enzymes active toward this class of polysaccharidae. *Glycobiology*. 13(6), 29-40.
- Bilan, M. I., Grachev, A. A., Shashkov, A. S., Kelly, M., Sanderson, C. J., Nifantiev, N. E., y Usov, A. I. (2010). Further studies on the composition and structure of a fucoidan preparation from the brown alga *Saccharina latissima*. *Carbohydrate research*, 345(14), 2038-2047.
- Bo, L., Fei, L., Xinjun, W. y Zhao, R. (2008). Fucoïdan: Structure and bioactivity molecules. 13, 1671-1695.
- Bonay, P. y Fresno M. (2000). Lectins from tropical sponges. Purification and characterization of lectins from genus *aplysina*. *Journal of Biological Chemistry*. 275(38), 29283 - 29289.
- Boraso, A., Rico, A., Perales, S., Pérez, L. y Salazar, H. (2009). *Algas marinas de la Patagonia*. Argentina: Editorial Aves Argentinas. pp. 376-405.
- Blunt, J. W., Copp, B., Munro, M., Northcote, P. T. y Prinsep, M. R. (2006). Marine natural products. *Nat Prod Rep*. 23: 26-27.
- Cann, A. J. (2005). *Principles of molecular virology*. Burlington. USA.
- Carpenter, P. (1969). *Microbiología* (2^a edición). México: Editorial Interamericana.

- Cediel, J., Cárdenas, M. y García, A. (2009). *Manual de histología: Tejidos fundamentales* (1ª edición). Bogotá, Colombia: Editorial Universidad del Rosario. pp. 211-212.
- Cordero, V., Hernández, J. y Ortiz, L. (2005). *Introducción a la investigación. Manual del Estudiante*. Caracas: UPEL. Instituto Profesional del Magisterio, pp. 32.
- Chargaff, E., Bancroft, F. W. y Stanley-Brown, M. (1936). Studies on the chemistry of blood coagulation II. On the inhibition of blood clotting by substances of high molecular weight. *Journal of Biological Chemistry*, 115: 155-161.
- Clark, W., Brater, D. y Johnson, A. (1993). *Farmacología Médica* (13ª edición). Madrid: Mosby, pp.449-453, 615-625.
- Darr, Alfred. (1981). *Tecnología Farmacéutica* (2ª edición). Editorial Acribia.
- De Lara-Isassi, G., Sobrino-Figueroa, A., Lozano-Ramírez, C., Ponce-Marquez, M. y Dreckmann-Stay, K. (1989). Evaluación de la actividad antibiótica de las macroalgas de las Costas de Michoacán, México. *Bol. Ins. Océano*. 28: 99-104.
- Djabayan, P. (2001). *A comparison of lectins in green Venezuela marine algae*. Trabajo de ascenso no publicado. Biomedical Science Division, School of Pharmacy and Biomedical Sciences, University of Portsmouth.
- Eluvakkal, T., Sivakumar, S. R. y Arunkumar, K., (2010). Fucoidan in some Indian brown seaweeds found along the coast gulf of mannar. *International Journal of Botany*, 6:176-181.
- Eynard, A., Valentich, M., Rovasio, R. (2008). *Histología y Embriología del ser humano. Bases celulares y moleculares* (4ta edición). Buenos Aires, Argentina: Editorial Médica Panamericana. pp. 224-225.
- Fernández, P. (2012). *Polisacáridos del alga verde Codium vermilara: estructura fina, su ensamble en la pared celular. Actividad anticoagulante de un arabinano piranosico sulfatado*. Tesis Doctoral publicada. Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Buenos Aires, Argentina.

- Foye, W. (1984). *Principios de química farmacéutica* (2ª edición). Barcelona, España: Reverté S.A. pp 279, 452- 456, 743.
- Gaudens, L. (1984). *Manual de hemostasia y coagulación sanguínea* (1ª edición). Caracas: Ediciones de la biblioteca de la Universidad Central de Venezuela. pp. 135-136.
- Gal, B. (2007). *Bases de la Fisiología* (2ª edición). Madrid: Editorial Tebar. pp. 93-95.
- Gallardo, T., Izco, J., Barreno, E. y Costa, M. (2004). *Botánica* (2ª edición). Madrid: McGraw-Hill. pp 321-372.
- Garrido, A., Taeijón, J., Blanco, D., Villaverde, C., Mendoza, C. y Ramírez, J. (2006). *Fundamentos de bioquímica estructural*. España: Editorial Tébar. pp. 444.
- Goodman, A., Ruddon, R., Molinoff, P., Limbird, L. y Hardman, J. (1996). *Las bases farmacológicas de la terapéutica* (9ª edición). Monterrey: McGraw-Hill Interamericana. pp. 1424-1425.
- Guyton, A. y Hall, J. (2006). *Tratado de Fisiología Médica* (11ª edición). Jackson, Mississippi: Editorial Elsevier. pp. 457-463.
- Hernández, R., Fernández, C. y Batista, P. (2006). *Metodología de la investigación* (3ª edición). Editorial McGraw-Hill. pp 252.
- Herrera, T. y Butanda, A. (2009). Algas. *Enciclopedia de las ciencias y la tecnología Mexicana*. México: Editorial EMC-COSMOS. pp. 723-789.
- Hillis-Colinvaux, L. (1980). Ecology and taxonomy of Halimeda: Primary producer of coral reefs. *Advances in marine biology*, 17, 1-327.
- Holtkamp, A., Kelly, S., Ulber, R. y Lang, S. (2009). Fucoidans and fucoidanases-focus on techniques for molecular structure elucidation and modification of marine polysaccharides. *Appl Microbiol Biotechnol.* 82(1), 1-11.
- Jiao, G., Yu, G., Zhang, J. y Ewart, H. S. (2011). Chemical structures and bioactivities of sulfated polysaccharides from marine algae. *Marine Drugs*, 9(2), 196-233.

- Kim, G. y Fritz, L. (1993). Gamete recognition during fertilization in red algae, *antithamnion nipocicum*. *Protoplasma*, 174, 69-73.
- Koolman, J. y Röhm, K. (2004). *Bioquímica: Textos y atlas* (3ª edición). Madrid, España: Editorial Médica Panamericana. pp. 292.
- Kumar, M., Gupta, V., Trivedi, N., Kumari, P., Bijo, A., Reddy, C. R. y Jha, B. (2011). Desiccation induced oxidative stress and its biochemical responses in intertidal red alga *Gracilaria corticata* (Gracilariales, Rhodophyta). *Environmental and Experimental Botany* 72 194-201.
- Kuznesova, T., Besednova, N., Mamaev, A., Momot, A., Shevchenko, N. y Zvyagintseva, T. (2003). Anticoagulant activity of fucoidan from brown algae *fucus evanescens* of the Okhotsk Sea. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 136(5), 471-473.
- Leite, E. L., Madeiros, M. G., Rocha, H. A., Farias, G., Da Silva, L. F., Chavante, S. F., De Abreu, L. D., Dietrich, C. P. y Nader, H. B. (1998). Structure and pharmacological activities of a sulfated xylofucoglucuronan from the alga *Spatoglossum schoederi*. *Plant Science*, 132: 215- 228.
- Li, B., Lu, F., Wei, X., y Zhao, R. (2008). *Fucoidan: Structure and bioactivity*. *Molecules*, 13(8), 1671-1695.
- Lindorf, H. y Rodríguez, P. (1991). *Botánica: Clasificación, estructura y reproducción*. Caracas: Ediciones de la biblioteca de la Universidad Central de Venezuela. pp. 582.
- López, G. (2015). *Evaluación de la actividad antimicrobiana de Ulva lactuca*. Tesis de pregrado publicada. Universidad Autónoma de Baja California Sur. La paz, México.
- Marcel, A., Jorn, M. y Meyer, A. (2011). Important determinant for fucoidan bioactivity: A critical review of structure-function relations and extraction methods for fucose-containing sulfated polysaccharides from brown seaweeds. *Marine Drugs*, 9, 2106-2130.
- Martínez, L. (2012). *Evaluación de los metabolitos secundarios y la actividad biológica del alga invasora Caulerpa racemosa*. Tesis de pregrado publicada, Universidad de Oriente, Escuela de Ciencias, Cumaná, Venezuela.

- Matsubara, K., Matsuura, Y., Hori, K. y Miyazawa, K. (2000). An anticoagulant proteoglycan from marine green alga, *Codium pugniformis*. *Journal of Applied Phycology*, 12: 9-14.
- Mourao, P. (2004). Use of sulfated fucans as anticoagulant and antithrombotic agents; future perspectives. *Current Pharmaceuticals Design*, 9(10), 967-981.
- Muñoz, M. (2006). *Extracción y caracterización de polisacáridos con actividad anticoagulante a partir de algas colectadas en Baja California Sur, México*. Tesis de pregrado, Instituto Politécnico Nacional, México.
- McClintock, J. B. y Baker, B. J. (2001). *Marine Chemical Ecology*. CRC Press. USA. pp. 610.
- McKenzie, Shirlyn B. (2000). *Hematología Clínica* (2ª edición). México. Editorial El Manual Moderno. pp. 603-639.
- Nardella, A., Chaubet, F., Boisson, C., Blondin, C. y Durand, P. (1996). Anticoagulant low molecular weight fucans produced by radical process and ion exchange chromatography of high molecular weight fucans extracted from the brown seaweed *Ascophyllum nodosum*. *Carbohydrate Research*, 289: 201- 208.
- Patel, S. (2012). Therapeutic importance of sulfated polysaccharides from seaweeds: updating the recent findings. *Biotech*. 2: 171-185.
- Percival, E. (1979). The polysaccharides of green, red and brown seaweeds: Their structure, biosynthesis and function. [*British Phycological Journal*](#) 14, 103-117.
- Pineda, E. y Alvarado, E. (2008). *Metodología de la investigación*. (3ª edición). Editorial Organización Panamericana de la Salud. pp 34-35, 89-95.
- Preeprame, S., Hayashi, K., Lee, J. B., Sankawa, U. y Hayashi, T. (2001). A novel antivirally active fucan sulfate derive from edible algae, *Sargassum horneri*. *Chem. Pharm. Bull*, 49(4), 484-485.
- Raven, P., Evert, R. y Eichhorn, S. (1991). *Biología de las plantas*. Barcelona: Editorial Reverté. pp. 198-201.

- Riaño, M. E. (2002). *Importancia y aplicación de las lectinas*. Universidad Veracruzana, Facultad de Química Farmacéutica Biológica. Disponible en: <http://www.monografias.com/trabajos11/lecti/lecti.shtml#ante>
- Rioux, L., Turgeon, S. L., & Beaulieu, M. (2010). Structural characterization of laminaran and galactofucan extracted from the brown seaweed *Saccharina longicuris*. *Phytochemistry*, 71(13), 1586-1595.
- Ríos, N. (2006). *Determinación de los compuestos bioactivos en algas marinas*. Tesis de postgrado no publicada. Universidad de los Andes, Mérida, Venezuela.
- Rodrigues J. A., Vanderlei, É. F., Bessa, F. A., Magalhaes, R. C., Paula, M., Lima, V. y Benevides, N. (2011). Anticoagulant activity of a sulfated polysaccharide isolated from the green seaweed *Caulerpa cupressoides*. *Braz Arch Biol Technol* 54: 691-700.
- Rodríguez, A. (2013). *Polisacáridos obtenidos a partir de macroalgas del género Codium y su evaluación como anticoagulantes alternativos*. Tesis Doctoral publicada. Universidad Autónoma de Baja California Sur, La Paz, México.
- Sánchez, I. (2013). *Extracción, caracterización y análisis de la actividad anticoagulante de los polisacáridos sulfatados del alga café Hydroclathrus clathratus*. Tesis Doctoral publicada. Universidad Autónoma de Baja California Sur. La paz, México.
- Sans-Sabrafen, J., Besses, C. y Vives, J.L. (2006). *Hematología Clínica: Fisiología y exploración de la hemostasia* (5ª edición). Madrid, España: Editorial ElSevier. pp. 659-667.
- Silva, P. (1982). *Synopsis and classification of living organisms*. New York: Editorial McGraw-Hill pp. 133.
- Silva, A. (2010). *Metodología de la investigación* (1ª edición). Editorial CO-BO. pp. 18-21.
- Silverthorn, D. U. (2008). *Fisiología Humana* (4ª edición). Madrid, España: Editorial Médica Panamericana. pp. 550- 569.

- Shanmugan, M. y Mody, K. (2000). Heparinoid- active sulphated polysaccharides from marine algae as potential blood anticoagulant agents. *Current Science*, 79(12), 1672-1683.
- Shanmugam, M., Ramavat, B., Mody, K.H., Oza, R. y Tewari, A. (2001). Distribution of heparinoid-active sulphated polysaccharides in some Indian marine green algae. *Indian J Mar Sci* 30: 222-227.
- Strasburger, E. (1993). Tratado de botánica (7^{ma} edición). Barcelona: Editorial Omega. pp. 201-203.
- Universidad Pedagógica Experimental Libertador. (2014). *Manual de trabajo de grado de especialización y maestría y tesis doctorales*. Caracas: FEDUPEL.
- Usov, I. A., Bilan, M. y Shashnikov, A. 1997. Structure of a sulfated xylogalactan from the calcareous red alga *Corallina pilulifera* (Rhodophyta, Corallinaceae). *Carbohydrate Research*, 303: 93-102.
- Talarico, L. (2008). La entrada del virus dengue a la célula como un potencial blanco antiviral: Estudio de polisacáridos sulfatados como antivirales. *Revista Química Viva*, 2(7), 113-133.
- Vit, P. (2005). *Aprender metodología de la investigación*. Venezuela: Editorial Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de los Andes. pp. 49.
- Wijesekara, I., Pangestuti, R. y Kim, S. (2011). Biological activities and potential health benefits of sulfated polysaccharides derived from marine algae. *Carbohydrate Polymers*, 84(1), 14-21.

ANEXO 1.

Alga marina verde *Udotea flabellum*



ANEXO 2

SIEMENS

Thromborel® S

Human thromboplastin containing calcium

See shaded sections - updated information versus edition from June 2009

Intended Use

Thromborel® S Reagent is used for the determination of the prothrombin time (PT) according to Quick and, in conjunction with the relevant deficient plasmas, for the determination of the activity of coagulation factors II, V, VII and X.

Summary and Explanation

The prothrombin time measured with Thromborel® S Reagent is a rapid, sensitive screening test for coagulation disorders in the domain of the extrinsic system (Factors II, V, VII and X). Due to its high sensitivity for these coagulation factors Thromborel® S Reagent is especially well suited for:

- The induction and monitoring of oral anticoagulant therapy with vitamin K antagonists^{1,4}.
- Diagnosing genetically caused deficiencies in coagulation factors of the extrinsic system.
- Diagnosing acquired deficiencies in coagulation factors.
- Checking the synthesis performance of the liver in hepatic diseases.

With Thromborel® S Reagent and the relevant deficient plasma, it is possible to determine the activity of coagulation factors II, V, VII and X. Additionally, various photo-optical coagulation analyzers are able to derive the fibrinogen value from the determination of the prothrombin time.

Principle of the Method

The coagulation process is triggered by incubation of plasma with the optimal amount of thromboplastin and calcium. The time to formation of a fibrin clot is then measured.

Reagents

Note

Thromborel® S Reagent can be used manually or on automated coagulation analyzers. Siemens Healthcare Diagnostics provides Reference Guides (Application Sheets) for several coagulation analyzers. The Reference Guides (Application Sheets) contain analyzer/assay specific handling and performance information which may differ from that provided in these Instructions for Use. In this case, the information contained in the Reference Guides (Application Sheets) supersedes the information in these Instructions for Use. In addition, please also consult the instruction manual of the instrument manufacturer!

Materials provided

10 x → 4 mL, [REF] OUIHP 29
10 x → 10 mL, [REF] OUIHP 46, [REF] 10484202

Each pack of Thromborel® S contains a table of lot- and analyzer-specific ISI values.

Composition

Thromborel® S Reagent: lyophilized human placental thromboplastin (≤ 60 g/L), calcium chloride (approx. 1.5 g/L), stabilizers
Preservatives: gentamicin (0.1 g/L), 5-chloro-2-methyl-4-isothiazol-3-one and 2-methyl-4-isothiazol-3-one (< 15 mg/L)

Warnings and Precautions

1. For *in-vitro* diagnostic use only.
2. Thromborel® S Reagent is prepared from human placenta. During the manufacturing process, steps are taken to remove and/or inactivate any viruses which may be present. Nevertheless, since absence of infectious agents cannot be proven, all materials obtained from human tissue or body fluids should always be handled with due care, observing the precautions recommended for biohazardous material.

Reagent Preparation

Reconstitute Thromborel® S Reagent with the amount of distilled or deionized water stated on the vial label and mix well by inverting the vial 8 to 10 times, then warm the reagent to +37 °C before use. Please note: after reaching +37 °C the reagent must be incubated at this temperature for 30 minutes. If a water bath is used a total incubation time of 45 minutes is recommended. Before use the reagent should be mixed carefully.

Storage and Stability

Store Thromborel® S Reagent unopened at +2 to +8 °C and use by the expiry date given on the label.
Stability after reconstitution:
at +37 °C 8 hours (opened vial)
at +15 to +25 °C 2 days (opened vial)
at +2 to +8 °C 5 days (closed vial)
Information about on-board stability is specified in the Reference Guides (Application Sheets) for the different coagulation analyzers.

Note on reagent expiration: Control values outside the assigned range for the control used (e.g., Control Plasma N) are an indicator of reagent expiration.

Materials required but not provided

Control Plasma N or Dade® Ci-Tro® Level 1
Control Plasma P, Dade® Ci-Tro® Level 2 or Dade® Ci-Tro® Level 3
PT-Multi Calibrator* (Refer to the Instructions for Use for details on use)
Standard Human Plasma or fresh normal plasma* for determining the reaction time of normal plasma
Sodium citrate solution (0.11 mol/L, 3.2 %) for blood collection
Distilled or deionized water without preservatives
Plastic tubes
Plastic transfer pipettes
Pipettes for precise measurement of 10.0 mL, 1.0 mL, 0.20 mL and 0.10 mL
Coagulation analyzer

Specimen Collection and Preparation

Carefully mix 1 part sodium citrate solution (0.11 mol/L) with 9 parts venous blood, avoiding the formation of foam.
Centrifuge the blood specimen at 1500 x g for no less than 15 minutes at room temperature.
Store in an unopened tube at room temperature. Do not store on ice or at +2 to +8 °C as cold activation of F VII may alter results.
Plasma should be tested within 24 hours of blood collection. Samples should not stand at +37 °C for more than five minutes. If the patient is on both heparin and coumarin-based anticoagulant therapy, the results may vary with time of storage.
Please refer to CLSI document H21-A5 for detailed information on sample preparation and storage⁴.

Procedure

Manual Testing:

Pipette into a test tube prewarmed to +37 °C	
Citrated plasma	100 µL
Incubate for 1 minute at +37 °C	
Thromborel® S Reagent (warmed to +37 °C)	200 µL
On addition of Thromborel® S Reagent start stop-watch or timer on the coagulation analyzer and determine the coagulation time.	

Internal Quality Control

Normal range: Control Plasma N or Dade® Ci-Tro® Level 1
Therapeutic range: Control Plasma P, Dade® Ci-Tro® Level 2 or Dade® Ci-Tro® Level 3
Two levels of quality control material (normal and pathological range) have to be measured at start of the test run, with each calibration, upon reagent vial changes and at least every eight hours on each day of testing. The control material should be processed as a sample. Each laboratory should establish its own QC ranges based on the assigned values and ranges provided by the control manufacturer or based on values determined by the laboratory.
If control values are recovered outside the defined range, check the instrument, reagent and calibration for problems. Do not release patient results until the cause of deviation has been identified and corrected.

Results

The results can be reported in seconds, in % of norm, as prothrombin ratio (PR) or as International Normalized Ratio (INR). Monitoring of oral anticoagulant therapy with vitamin K antagonists should only be reported with PT results expressed as INR as recommended in official guidelines and in the literature⁵.

To obtain the prothrombin ratio, the reaction time of the sample is divided by the reaction time of the normal plasma pool (e.g., Standard Human Plasma).

PR = $\frac{\text{Reaction time of sample (seconds)}}{\text{Reaction time of normal plasma (seconds)}}$

If the prothrombin ratio is determined using a normal plasma which does not have a PR of 1.0, the PR of this plasma has to be taken into account in the calculation:

PR = $\frac{\text{Reaction time of sample (seconds)} \times \text{PR of normal plasma}}{\text{Reaction time of normal plasma (seconds)}}$

The prothrombin ratio can be converted into internationally comparable values by means of the International Sensitivity Index (ISI). The result obtained is in International Normalized Ratio (INR) = $\frac{\text{INR}}{\text{PR}}$

Thromborel® S Reagent is calibrated against the international reference thromboplastin preparations in test runs on normal plasmas and plasmas of donors on oral anticoagulants in the stable phase. The ISI value for Thromborel® S Reagent is stated in the lot-dependent Table of Assigned Values.

Establishment of the Reference Curve in % of norm

Refer to the Reference Guide (Application Sheet) for your analyzer for calculation using % of norm.

Derived Fibrinogen

Using Thromborel® S Reagent and the appropriate assay on Siemens photometric coagulation analyzers or Sysmex coagulation analyzers, the fibrinogen concentration may be derived by analyzing the change in optical signal during prothrombin time determinations, using a derived fibrinogen calibration curve. This calibration curve (master curve) is provided in the lot-dependent Table of Assigned Values.

Limitations of the Procedure

Normal samples spiked with heparin concentrations exceeding 0.6 U/mL produced abnormal results. However, Thromborel® S Reagent may be used to monitor the administration of overlapping dosages of heparin and oral anticoagulants. Inhibitors of the Lupus type anticoagulant can influence prothrombin time and lead to INRs that do not accurately reflect the true level of anticoagulation⁶. The choice of anticoagulant (i.e. oxalate instead of citrate) and the condition of the specimen (e.g. hemolyzed, lipemic, parenteral feeding, etc.) may affect results of PT and derived Fibrinogen. The latter is particularly true for PT measurements done with optical instruments. Hirudin or other direct thrombin inhibitors in therapeutic dose result in prolonged prothrombin times⁴.

Derived fibrinogen results within the reference range can be directly reported. Results outside the reference range should be re-measured by a standard fibrinogen determination method, e.g. Fibrinogen method with Dade® Thrombin Reagent or with Multifibrin® U reagent. Derived fibrinogen testing is not suitable in patients with dysfibrinogenemia⁷ or patients with prolonged PT, e.g. under oral anticoagulation^{8,9}. In thrombolysis therapy, derived fibrinogen and fibrinogen determination according to Clausen may deviate and should be considered in therapy control. Siemens has validated use of these reagents on various analyzers to optimize product performance and meet product specifications. User defined modifications are not supported by Siemens as they may affect performance of the system and assay results. It is the responsibility of the user to validate modifications to these instructions or use of the reagents on analyzers other than those included in Siemens Application Sheets or these Instructions for Use.
Results of this test should always be interpreted in conjunction with the patient's medical history, clinical presentation and other findings.

Expected Values

Values for healthy individuals vary from laboratory to laboratory depending on the technique used. Therefore, each laboratory should establish its own reference intervals based on the procedure and coagulation analyzers used.

In studies on the Sysmex® CA-7000 System with ostensibly healthy subjects the following reference intervals (2.5th to 97.5th percentile) were determined:

Analyte	Samples n =	2.5 th to 97.5 th percentile
PT	158	9.8 to 12.1 seconds
Derived fibrinogen	124	1.7 to 3.2 g/L
PT (% of norm) ¹⁰		70 to 130 %

Therapeutic Ranges

Therapeutic ranges for INR may vary depending on the indication of oral anticoagulant therapy⁴.

Specific Performance Characteristics

Precision

The precision of the PT determination is highly dependent on the method used. The precision of Thromborel® S Reagent on the BCT** System was estimated by assaying normal and pathological control plasmas over a five day period, one run per day in replicates of eight. In a study the within-run precision ranged from 0.7 % to 1.2 %, and the inter-assay precision ranged from 1.5 % to 2.2 %.

Method Comparison

A comparison of Thromborel® S Reagent with the British Comparative Thromboplastin yielded a correlation coefficient of 0.979, with good numerical agreement of the values in percent of norm¹¹.

ANEXO 4.

Estadísticos de muestras relacionadas

		Media	N	Desviación típ.	Error típ. de la media
Par 1	TP POOL	12,0000	3	1,00000	,57735
	TP POOL AGUA DESTILADA	11,8333	3	1,04083	,60093
Par 2	TP POOL	12,0000	3	1,00000	,57735
	TP POOL EXTRACTO ALGA Udotea flabellum	56,3333	3	1,52753	,88192
Par 3	TP POOL AGUA DESTILADA	11,8333	3	1,04083	,60093
	TP POOL EXTRACTO ALGA Udotea flabellum	56,3333	3	1,52753	,88192
Par 4	TTP POOL	41,3333	3	1,52753	,88192
	TTP POOL AGUA DESTILADA	69,6667	3	1,52753	,88192
Par 5	TTP POOL	41,3333	3	1,52753	,88192
	TTP POOL EXTRACTO ALGA Udotea flabellum	300,0000	3	,00000	,00000
Par 6	TTP POOL AGUA DESTILADA	69,6667	3	1,52753	,88192
	TTP POOL EXTRACTO ALGA Udotea flabellum	300,0000	3	,00000	,00000

Fuente: Datos recopilados por el autor mediante la aplicación del sistema estadístico SPSS versión 15.

ANEXO 5.

Correlaciones de muestras relacionadas

		N	Correlación	Sig.
Par 1	TP POOL y TP POOL AGUA DESTILADA	3	-,961	,179
Par 2	TP POOL y TP POOL EXTRACTO ALGA Udotea flabellum	3	-,327	,788
Par 3	TP POOL AGUA DESTILADA y TP POOL EXTRACTO ALGA Udotea flabellum	3	,052	,967
Par 4	TTP POOL y TTP POOL AGUA DESTILADA	3	,929	,242
Par 5	TTP POOL y TTP POOL EXTRACTO ALGA Udotea flabellum	3	.	.
Par 6	TTP POOL AGUA DESTILADA y TTP POOL EXTRACTO ALGA Udotea flabellum	3	.	.

Fuente: Datos recopilados por el autor mediante la aplicación del sistema estadístico SPSS versión 15.

ANEXO 6.

Frecuencias

		TP POOL	TP POOL AGUA DESTIL ADA	TP POOL EXTRACT O ALGA Udotea flabellum	TTP POOL	TTP POOL AGUA DESTI LADA	TTP POOL EXTRACT O ALGA Udotea flabellum
N	Válidos	3	3	3	3	3	3
	Perdidos	0	0	0	0	0	0
	Media	12,000	11,8333	56,3333	41,333	69,67	300,0000
	Desv. típ.	1,0000	1,04083	1,52753	1,5275	1,527	,00000

Fuente: Datos recopilados por el autor mediante la aplicación del sistema estadístico SPSS versión 15