UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA
SEDE QUITO

CARRERA:
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES

Trabajo de titulación previo a la obtención del título de: INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES

TEMA:

INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD HEMOLÍTICA DEL VENENO DE *Bothrops atrox* POR LOS EXTRACTOS DE *Tabernaemontana sananho* Ruiz & Pav. Y *Mucuna cf. elliptica* (Ruiz&Pav.) DC.

AUTORA:
JENNY VERÓNICA CUEVA PUNGACHO

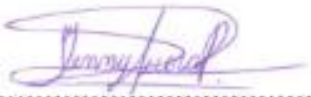
TUTOR:
WILSON FABIÁN TAPIA HERNÁNDEZ

Quito, marzo 2017

Cesión de derechos de autor

Yo, Jenny Verónica Cueva Pungacho, con documento de identificación N° 1723447213, manifiesto mi voluntad y cedo a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que soy autora del trabajo de grado titulado: INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD HEMOLÍTICA DEL VENENO DE *Bothrops atrox* POR LOS EXTRACTOS DE *Tabernaemontana sananho* Ruiz & Pav. Y *Mucuna cf. elliptica* (Ruiz&Pav.) DC., mismo que ha sido desarrollado para optar por el título de: INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En aplicación a lo determinado en la Ley de Propiedad Intelectual, en mi condición de autora me reservo los derechos morales de la obra antes citada. En concordancia suscribo este documento en el momento que hago entrega del trabajo final en formato impreso y digital a la biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.



.....

Nombre: Jenny Verónica Cueva Pungacho

Cédula: 1723447213

Fecha: Quito, marzo del 2017

Declaratoria de coautoría del docente tutor

Yo, declaro que bajo mi dirección y asesoría fue desarrollado el trabajo de titulación, Inhibición de la actividad hemolítica del veneno de *Bothrops atrox* por los extractos de *Tabernaemontana sananho* Ruiz & Pav., y *Mucuna cf. elliptica* (Ruiz&Pav.) DC., realizado por Jenny Verónica Cueva Pungacho, obteniendo un producto que cumple con todos los requisitos estipulados por la Universidad Politécnica Salesiana para ser considerado como trabajo final de titulación.

.....

Wilson Fabián Tapia Hernández
Cédula: 0400942819
Fecha: Quito, marzo del 2017

Dedicatoria

Mi tesis la dedico con todo mi amor a Dios por haberme dado la vida y permitirme haber llegado hasta este momento tan importante de mi formación profesional.

A mis padres Cecilia e Iván, a mis hermanos Lorena e Iván Cueva y mi Sobrinita Amelia por ser el pilar más importante en mi vida, demostrándome siempre su cariño, apoyo incondicional y sobre todo su confianza para culminar esta etapa de mi vida.

A la compañera de toda la vida Birkha que fue quien en las noches frías de angustia siempre estuvo demostrándome su lealtad y cariño hasta su último suspiro.

Agradecimiento

Sin duda alguna mi profundo agradecimiento a la UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA que me dio la oportunidad de realizar mis sueños en la formación profesional con la ayuda de los maestros formadores de jóvenes con inspiraciones para un mañana lleno de sueños y formar un futuro de promesas para una vida mejor.

Este proyecto es el resultado del esfuerzo conjunto de todos los que formamos el grupo de trabajo.

De manera especial mi agradecimiento a mi tutor Químico Farmacéutico Wilson Tapia quien con su esfuerzo, dedicación y sobretodo con su profesionalismo que nos impartió sus conocimientos e hizo posible la culminación del proyecto.

A las personas que forman parte del Laboratorio de Ciencias de la Vida por su ayuda incondicional quienes sin egoísmos nos dieron la oportunidad de utilizar las instalaciones, materiales y equipos.

A todos infinitas gracias.

Índice

Introducción 1

Capítulo 1 Fundamentación teórica 3

1.1. Plantas alexíteras 3

1.2. *Tabernaemontana sananho* 4

1.2.1. Clasificación taxonómica 4

1.2.2. Descripción botánica 5

1.2.3. Usos 5

1.3. Mucuna cf. elliptica 6

1.3.1. Descripción Botánica 6

1.3.2. Usos 6

1.4. Serpientes en el Ecuador 7

1.4.1. *Género Bothrops* 8

1.4.2. Identificación 8

1.4.3. Distribución y Hábitat 9

1.5. Veneno de *Bothrops atrox* 9

1.5.1. Accidente bothrópico 10

1.5.2. Tratamiento 11

1.6. Actividad hemolítica 12

Capítulo 2 Materiales y métodos 13

2.1. Diseño del trabajo experimental 13

2.2. Población y muestra 14

2.3. Obtención de extractos 16

2.3.1. Preparación de extractos 16

2.4. Análisis cuantitativo 18

2.4.1. Determinación de humedad 18

2.4.2. Determinación de cenizas totales, solubles en agua e insolubles en ácido clorhídrico 19

2.4.3. Cuantificación de polifenoles totales 22

2.4.4. Análisis de flavonoides 23

2.5. Análisis cualitativos 24

2.5.1. Tamizaje fitoquímico 24

2.6. Actividad anti hemolítica 27

2.6.1. Obtención de veneno de *B. atrox* 27

2.6.2. Determinación de la dosis mínima hemolítica (MIDH): 27

2.6.2.1. Preparación de eritrocitos lavados 27

2.6.2.2. Preparación del medio de cultivo Agar-sangre fosfatidilcolina 28

2.6.2.3. MIDH veneno de *B. atrox* 29

2.7. Determinación de la capacidad neutralizante de los extractos 31

2.7.1. Actividad anti hemolítica con los extractos 31

Capítulo 3 Resultados y discusiones 34

3.1. Obtención de extractos 34

3.1.1. Maceración 34

3.1.2. Rendimiento de los extractos 34

3.2. Análisis cuantitativo 35

3.2.1. Determinación de humedad 35

3.2.2. Determinación de cenizas 36

3.2.2.1. Cenizas totales 36

3.2.2.2. Cenizas solubles en agua 36

3.2.2.3. Cenizas insolubles en ácido clorhídrico 37

3.3. Cuantificación de polifenoles totales y flavonoides 37
3.4. Análisis de flavonoides totales 38
3.5. Tamizaje fitoquímico 39
3.6. Actividad anti hemolítica 42
3.6.1. MIDH veneno de *B. atrox* 42
3.7. Determinación de la capacidad neutralizante de los extractos 42
3.8. Análisis estadístico 44
3.8.1. Análisis de varianza 44
3.8.2. Prueba Tukey alfa 0,05 45
Discusiones 46
Conclusiones 48
Lista de referencias 50
Anexos 58

Índice de tablas

Tabla 1. *Identificación taxonómica de Kunapi completa*..... 4

Tabla 2. *Identificación taxonómica de wapaá* 6

Tabla 3. *Grado de envenenamiento* 11

Tabla 4. *Cantidades para preparar la solución mexcla veneno extracto.* 32

Tabla 5. *Tratamientos para determinación de actividad neutralizante o inhibitoria.*33

Tabla 6. *Cantidad pesada de material vegetal seco y triturado con su respectivo solvente.*..... 34

Tabla 7 *Rendimiento de las especies vegetales en el extracto Acuoso.* 34

Tabla 8. *Porcentaje de humedad registrada con el equipo METTLER TOLEDO (HB43-halogen).*..... 35

Tabla 9. *Cantidad de cenizas totales determinadas por el método gravimétrico.*..... 36

Tabla 10. *Determinación de porcentaje de cenizas solubles en agua.* 36

Tabla 11. *Determinación de porcentaje de cenizas insolubles en ácido clorhídrico.* 37

Tabla 12. *Cuantificación de Polifenoles.* 37

Tabla 13. *Cuantificación de flavonoides.*..... 38

Tabla 14. *Resultados del screening fitoquímico para el extracto acuoso.*..... 39

Tabla 15. *Resultados del screening fitoquímico para el extracto n-heptano.*..... 40

Tabla 16. *Resultados del screening fitoquímico para el extracto alcohólico.* 41

Tabla 17. *Halos de hemólisis en mezclas MIDH-Extracto acuoso.*..... 43

Tabla 18. *Halos de hemólisis en mezclas MIDH-Extracto heptánico.* 43

Tabla 20. *ANOVA. Análisis de varianza (SC Tipo III).* 44

Tabla 21. *Test Tukey Alfa: 0,05*. 45

Índice de figuras

Figura 1. Tabernaemontana sananho Ruiz & Pav. (Kunapi) 5

Figura 2. Mucuna cf. elliptica (Ruiz&Pav.) DC. (wapaá) 7

Figura 3. Brothrops atrox (pitalala) 8

Figura 4. Ubicación satelital de la muestra 1 Mucuna cf. elliptica (Ruiz&Pav.) DC. conocida como Wapaá, Tabernaemontana sanano Ruiz &Pav. Llamada Kunapi 15

Figura 5. Equipo de para evaporar las muestras vegetales Rota evaporador. 18

Figura 6. Equipo METTLER TOLEDO (HB43-S halogen) para determinar humedad. 19

Figura 7. Determinación de cenizas totales, solubles en agua e insolubles en ácido clorhídrico 20

Figura 8. Tamizaje Fitoquímico parte 1-3 25

Figura 9.Tamizaje Fitoquímico parte 2-3 26

Figura 10. Tamizaje Fotoquímico parte 3-3 26

Figura 11. Centrifugado de la sangre a 2750 rpm durante 15 minutos 28

Figura 13. Dosis hemolítica mínima con un halo de 15,6 cm que corresponde a la concentración 1. 42

Figura 14. Curva de calibración de estándares para flavonoides 71

Anexos

Anexo 1 Halos de hemólisis generado en el extracto acuoso muestra Kunapi 58

Anexo 2 Halos de hemólisis generada en el extracto acuoso muestra Wapaá hojas . 59

Anexo 3 Halos de hemólisis generada en el extracto acuoso muestra Wapaá fruto .. 60

Anexo 4 Halos de hemólisis generado en el extracto n-heptano muestra Wapaá hojas 61

Anexo 5 Halos de hemólisis generado en el extracto n-heptano muestra Wapaá fruto 62

Anexo 6 Halos de hemólisis generado en el extracto n-heptano muestra Kunapi 63

Anexo 7 Halos de hemólisis generado en el extracto alcohólico Wapaá hojas 64

Anexo 8 Halos de hemólisis generado en el extracto alcohólico Wapaá fruto 65

Anexo 9 Halos de hemólisis generado en el extracto alcohólico Kunapi 66

Anexo 10 Permiso de investigación 67

Anexo 11. Determinación del rendimiento de los extractos acuoso, alcohólico y hepático 68

Anexo 12. Determinación de cenizas 69

Anexo 13. Curva de calibración de Polifenoles 70

Anexo 14. Curva de calibración de flavonoides 71

Anexo 15. Identificación Taxonómica de Kunapi completa y de Wapaá 72

Resumen

Esta investigación evaluó la actividad anti hemolítica de las especies vegetales *Mucuna cf. elliptica* (Ruiz & Pav.) DC., y *Tabernaemontana sananho* Ruiz & Pav. que son identificadas por los habitantes de la comunidad de Wawaim como plantas que ayudan a combatir las mordeduras de serpientes de la especie *Bothrops atrox*, un ofidio que habita toda la amazonia y es el responsable de causar el mayor número de accidentes.

Se elaboró extractos totales con solventes de polaridad creciente (heptano, etanol, y agua), y en cada uno se evaluó *in vitro* su capacidad inhibitoria del efecto hemolítico que produce el veneno de *B. atrox*, sobre una placa agar-sangre-fosfatidilcolina, estableciéndose una dosis mínima hemolítica (MIDH) de 15 µg capaz de generar un halo de hemólisis de 15,53 mm, el que se redujo con dosis de 9,4 µg de extracto alcohólico en una proporción 1:7 MIDH-Extracto.

Palabras claves: Alexítera, Anti hemólisis, *B.atrox*

Abstract

This research evaluated the anti-hemolytic activity of plant species *Mucuna cf. elliptica* (Ruiz & Pav.) DC., and *Tabernaemontana sananho* Ruiz & Pav. that are identified by the inhabitants of the community Wawaim as plants that help to combat the snakebites of the species *Bothrops atrox*, an ophidian that lives in the Amazon region and is Responsible for causing most of the accidents.

Total extracts were prepared with solvents of increasing polarity (heptane, ethanol, and water), and in each case their inhibitory capacity for the hemolytic effect produced by *B. atrox* venom on a blood agar-phosphatidylcholine plate was evaluated in vitro, establishing a minimum hemolytic dose (MIDH) of 15 µg capable of generating a hemolysis halo of 15.53 mm, which was reduced with doses of 9.4 µg of alcoholic extract in a proportion 1:7 MIDH-Extract.

Keywords: Alexite, Anti hemolysis y *B.atrox.*

Introducción

El Ecuador se encuentra dentro de los países con mayor incidencia anual de accidentes ocasionados por la mordedura de serpientes, lo que ha generado un problema de salud pública, puesto que no existe atención inmediata ni oportuna debido a que son incidentes que se dan en zonas rurales poco accesibles, que en al paciente o provoca su muerte (MSP de Ecuador, 2007).

Este problema ha ido tomando mayor importancia en el Ecuador ya que las últimas estadísticas registran que 13,21 por cada 100,000 habitantes han sido mordidos por serpientes, de los cuales se han reportado un promedio de 1500 a 1600 casos en la Amazonía en su mayoría causados por la especie *B. atrox* en las provincias de Morona Santiago, Orellana, Zamora Chinchipe y Napo (Villamarín, 2009).

En la actualidad se han identificado alrededor de 200 especies de ofidios, de las cuales 44 especies de serpientes son consideradas venenosas y potencialmente peligrosas para la actividad agrícola rural (MSP de Ecuador, 2007).

Los accidentes por mordedura de serpientes se dan en todo el país especialmente en zonas rurales tropicales y subtropicales las mismas que constituyen el 70% del Ecuador. La población que está en riesgo son agricultores, jardineros, nativos de la zona y todos aquellos que su actividad laboral sea el campo (Jara, Lozada, & Peñaherrera, 2014).

Es por este motivo que los habitantes de la provincia de Morona Santiago de la comunidad de Wawaim de la parroquia San Francisco del cantón Huamboya, tienen creencias muy arraigadas sobre especies vegetales que son utilizadas para tratar la afección causada por la mordedura de serpientes este es el caso de la *Mucuna cf.*

elliptica (Ruiz & Pav.) DC., (Wapaá u Ojo de venado) y de *Tabernaemontana sananho* Ruiz & Pav (Kunapi).

El objetivo general de esta investigación es determinar la actividad anti hemolítica de los extractos de *Mucuna cf. elliptica* (Ruiz&Pav.) DC., y de *Tabernaemontana sananho* Ruiz & Pav., sobre el veneno de *Bothrops atrox*. Para lograrlo, es necesario cumplir con un primer objetivo específico que es elaborar extractos totales de las especies mencionadas, por maceración con solventes de polaridad creciente; un segundo objetivo específico consiste en caracterizar la composición química cualitativa y cuantitativa los extractos obtenidos, priorizando la estimación del contenido de polifenoles y flavonoides, dada su íntima relación con las propiedades alexíteras en los vegetales; como tercer objetivo específico se estableció evaluar *in vitro* la actividad anti hemolítica de los extractos, utilizando agar-sangre-fosfatidilcolina, por la medición del diámetro del halo de hemólisis producido por el veneno, antes y después del tratamiento con los extractos vegetales.

Por ello fueron evaluadas las siguientes hipótesis:

Hipótesis alternativa (Ha): al menos una concentración de extracto vegetal de *Mucuna cf. elliptica* (Ruiz&Pav.) DC., y *Tabernaemontana sananho* Ruiz & Pav., produce reducción del diámetro del halo de hemólisis generado por la dosis mínima hemolítica (DMIH) con el 95% de confiabilidad; y la Hipótesis nula (Ho): ninguna concentración de extracto vegetal de *Mucuna cf. elliptica* (Ruiz&Pav.) DC., y *Tabernaemontana sananho* Ruiz & Pav., produce inhibición del diámetro generado por la dosis mínima hemolítica (DMIH) con 95% de confiabilidad.

Capítulo 1

Fundamentación teórica

1.1. Plantas alexíteras

La importancia y la aplicación de plantas alexíteras data de tiempos inmemorables casi en todas las culturas del mundo, especialmente aquellas que se encuentran en zonas tropicales y subtropicales. Un ejemplo de esto son los tratados medicinales de la india escritos antes de Cristo en la misma que detalla 211 plantas alexíteras utilizadas como antídotos para animales ponzoñosos y venenosos, en México data de la época prehispánica, también en el siglo XVI, Francisco Hernández, en su obra "Historia de las Plantas de la Nueva España" cita 19 plantas usadas con este fin, entre otros (Reyes & Jimenez, 1995).

Cabe destacar que los países que reportan mayor incidencia de casos de mordedura de serpientes son los que están en desarrollo especialmente en las zonas rurales ya que para tratar esta afección recurren a tratamientos ancestrales en base a plantas medicinales propias de cada región, este es el caso de las plantas alexíteras las mismas que están identificadas por los nativos como aquellas que son capaces de aliviar dolores, sangrados, necrosis, inflamación, infección y actuar como antídoto frete al envenenamiento de serpientes (Etnofarmacia, 2008).

Según Sumpa (2013), son plantas alexíteras las que tienen la capacidad de aliviar uno o varios síntomas complejos, como son: dolor, sangrado, inflamación, infección e incluso el envenenamiento.

Es importante aclarar que no todas las plantas antiofídicas son antídotos, muchas de estas solo minimizan los síntomas de la mordedura de las serpientes y ayudan a

incrementar la permeabilidad capilar que ayuda a combatir infecciones causadas por la mordedura de ofidios (Etnofarmacia, 2008).

El modo de acción de las plantas alexíteras se debe a sus metabolitos primarios y secundarios que actúan en conjunto sobre las toxinas del veneno para neutralizar su efecto (Sumpa, 2013). "Entre los compuestos más importantes se encuentran los isoflavonoides, tríterpenoides, alcaloides y taninos" (Reyes & Jimenez, 1995).

Las plantas utilizadas para esta investigación *Mucuna cf. elliptica* (Ruiz&Pav.) DC., y de la *Tabernaemontana sananho* Ruiz & Pav, son utilizadas como plantas antiofídicas por la comunidad de Wawaim en la provincia de Morona Santiago parroquia San Francisco y además se encuentran registradas en el Intituto de investigaciones de la Amazonía Peruana (2010).

1.2. *Tabernaemontana sananho*

Según el Herbario Q. C. A. de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador (2016), se categorizó a *Tabernaemontana sananho* Ruiz & Pav., como indica el anexo 15.

1.2.1. Clasificación taxonómica

Tabla 1.
Identificación taxonómica de Kunapi completa

Nombre vulgar:	Kunapi
Clase:	Equisetopsida C. Agardh
Subclase:	Magnolidae Novák ex Takht.
Superorden:	Asteranae Takht.
Orden:	Gentianales Juss. Ex Bercht. & J. Presl
Familia:	Apocynaceae Juss.
Género:	Tabernaemontana L.
Especie:	Sananho Ruiz & Pav

Nota: Tomado de Herbario Q. C. A. de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, (2016).

1.2.2. Descripción botánica

Arbusto de 7 m de altura que presenta un tronco delgado y cuya corteza es de color rojiza y escamosa; sus hojas miden aproximadamente 19 cm de longitud. Los botones florales son de color verde-blanco con tintes anaranjados y cuyas flores abiertas son de color blanco, por otra parte sus frutos son redondos de color amarillo en estado maduro y su semilla posee una pulpa blanca esponjosa. Florece a partir de mayo o junio está distribuida desde Panamá hasta Perú en bosques tropicales (Oña & Cerón, 2000).

1.2.3. Usos

Esta especie vegetal es utilizada como anticonceptivo, para prevenir y disminuir dolencias causadas por artritis, actúa como diurético y emético; también es recomendada para disminuir los síntomas asociados a reumatismo**,** arritmias, sífilis y úlceras cutáneas. En infusión disminuye la fiebre, previene las afecciones de garganta. Se dice que es utiliza para tratar anemias y síndromes hemorrágicos. (Intituto de investigaciones de la Amazonía Peruana, 2010).

Figura 1. Tabernaemontana sananho Ruiz & Pav. (Kunapi)
Nota: Realizado por la autora (2017).

1.3. Mucuna cf. elliptica

Según el Herbario Q. C. A. de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador (2016), se categorizó a Mucuna cf. Elliptica (Ruiz & Pav) DC., como indica el anexo 16.

Tabla 2.
Identificación taxonómica de wapaá

Nombre vulgar:	**wapaá u ojo de venado**
Clase:	Equisetopsida C. Agardh
Subclase:	Magnolidae Novák ex Takht.
Superorden:	Rosanae Takht.
Orden:	Fabales Bromhead
Familia:	Fabaceae Lindl.
Género:	Mucuna Adans
Especie:	elliptica (Ruiz&Pav.) DC.

Nota: Tomado de Herbario Q. C. A. de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, (2016).

1.3.1. Descripción Botánica

Árbol que mide 12m de longitud con indumento corto en tallos y foliolos, sus hojas son compuestas, alternas, trifoliadas y cuya inflorescencia es en forma de umbelas con pedúnculos que pueden medir 1,0m de longitud, su cáliz es pubescente. Los frutos están cubiertos por tricomas urticantes y semillas discoides de color café oscuro. Se distribuyen en América Latina en las zonas tropicales (Cardona, David, & Hoyos, 2010).

1.3.2. Usos

Es utilizada como antiofídico para la mordedura de serpientes y animales ponzoñosos, actúa como desinflamante de las vías urinarias, es un eficaz diurético y atenúa los síntomas causados por enfermedades venéreas, pulmonares y disminuye la inflamación de vías urinarias, (Intituto de investigaciones de la Amazonía Peruana, 2010).

Figura 2. Mucuna cf. elliptica (Ruiz&Pav.) DC. (wapaá)
Nota: Realizado por la autora (2017).

1.4. Serpientes en el Ecuador

En los últimos años el Ecuador ha registrado un alto índice de incidentes causados por la mordedura de serpientes que se ha convertido en un problema salud pública a nivel de la costa y del oriente ecuatoriano.

Esto se debe a que el clima tropical y subtropical facilita la vivienda, reproducción, sobrevivencia y biodiversidad de ofidios en dichas zonas (MSP de Ecuador, 2007).

"El 90% de los accidentes ofídicos en la región amazónica están dados por la especie *Bothrops atrox* que es conocida por los nativos como Pitalala, y los sitios más frecuentes son los miembros inferiores por las actividades de agricultura" (Jara, Lozada, & Peñaherrera, 2014).

Al producirse el accidente por la mordedura de la serpiente, estas inoculan veneno que es una mezcla de proteínas, polipéptidos que tienen actividad tóxica y enzimática y

que generan varias respuestas fisiológicas en la víctima como sistema de defensa ante este veneno (MSP de Ecuador, 2007).

La gravedad de la mordedura está determinada por el tamaño de la serpiente, especie, edad, peso (a menor edad y mayor peso el veneno es letal) (MSP de Ecuador, 2007).

Por otra parte las personas que presentan mayor vulnerabilidad son niños, ancianos, personas con problemas de salud como diabetes o hipertensión entre otras enfermedades que deprimen el sistema inmune (López & Pérez, 2009).

1.4.1. Género Bothrops

La *B. atrox* pertenece al género Viridae subgrupo Crotalinae llamadas víboras de fosa por tener una fosa loreal entre los ojos y las narinas de cuerpo grueso y con cola corta, escamas opacas y cabeza triangular; la mayoría de estas serpientes son terrestres, aunque también las hay arbóreas (Maruñak, Leyva, Ruiz de Torrent, & Teibler, 2005).

Figura 3. Brothrops atrox (pitalala)
Nota: Pazmiño (2014).

1.4.2. Identificación

Esta especie se distingue de otras especies de Bothrops por la combinación de los siguientes caracteres: cola no prensil; suturas entre algunas de las supralabiales (en especial entre la tercera y cuarta) bordeadas con pigmento oscuro; lacuno labial

presente; el dorso del cuerpo es oliva, café, habano, gris, amarillo o rara vez color óxido, con marcas dorso-laterales cuyos bordes se alinean casi verticalmente formando marcas rectangulares o trapezoidales (Pazmiño, 2014).

1.4.3. Distribución y Hábitat

Bothrops atrox se distribuye en las tierras bajas tropicales de casi toda Sudamérica se la encuentra desde el nivel del mar hasta los 1200 m de altura. Habita en las zonas tropical oriental y subtropical oriental. En Ecuador se ha reportado para las provincias de Sucumbíos, Pastaza, Orellana, Napo, Morona Santiago y Zamora Chinchipe. Habita los bosques húmedos montanos bajos, sabanas, bosques de galería, bosques tropicales deciduos y bosques lluviosos. Generalmente prefiere ambientes húmedos y se encuentra asociada a arroyos, lagos o cursos de ríos, aunque también se la encuentra en cultivos, campos húmedos, en áreas con vegetación de crecimiento secundario e incluso alrededor de asentamientos humanos (Pazmiño, 2014).

1.5. Veneno de *Bothrops atrox*

El veneno de la *B. atrox* está constituido por proteínas, enzimas de origen hidrolítico, péptidos neurotóxicos y cardiotónicos (Reyes & Jimenez, 1995).

Se caracteriza por tener efectos coagulantes, proteolíticos, vasculotóxicos, acción de la fosfolipasa A2 y Hemorraginas.

a) *Acción Coagulante:* Actúa activando el factor X, la protrombina y el fibrinógeno, que generan que aumente el número de plaquetas normales formando un trombo intravascular y produciendo una coagulación intravascular diseminada con efectos graves como gastroenteritis, hemorragias profusas, problemas respiratorios y afección al Sistema Nervioso Central (Maruñak, Leyva, Ruiz de Torrent, & Teibler, 2005).

b) *Acción Proteolítica:* produce la inflamación de los tejidos causada por micronecroisis, liponecrosis y necrosis vascular, también este veneno libera vasoactivos que produce el shock en pacientes y la muerte (Rodriguez, 2001).

c) *Acción Vasculotóxica:* genera lesiones endoteliales que son la causa de las hemorragias pero que no producen alteraciones en la cascada de coagulación y se debe a que el veneno libera hemorraginas (Rodriguez, 2001).

d) *Acción de las fosfolipasa:* (actividad del veneno de serpiente *B. atrox* en sangre): inducen a desestabilización de la membrana, con pérdida selectiva de la permeabilidad a iones calcio que son importantes para evitar la necrosis muscular. Esta necrosis tisular es causada por las miotoxinas que actúan en la membrana plasmática de células musculares generando alteraciones en las arterias musculares y microvasculatura (Maruñak, Leyva, Ruiz de Torrent, & Teibler, 2005).

e) *Hemorraginas:* son metaloproteínas que causan una lesión a la pared y endotelio capilar que produce una digestión enzimática generando con ello daños mecánicos a la matriz extracelular lo que ocasiona hemorragia local y/o sistémica, formación de vesículas en la piel y necrosis hemorrágica" (González & Onofre, 2013).

1.5.1. Accidente bothrópico

Es una lesión cutánea debida a la mordedura de serpiente, en la cual se inocula su veneno que contiene sustancias tóxicas que lesiona los tejidos causando alteraciones fisiopatológicas de gravedad variable (González & Onofre, 2013).

Para que se considere un envenenamiento por *B. atrox* la dosis letal inoculada es de 64,98 μg/ratón y de 3,61 mg/kg (Sanjuán, y otros, 2012).

Tabla 3.
Grado de envenenamiento

Grado 0	Sin envenenamiento: Dolor mínimo marcas de la mordedura.
Grado 1	Mínimo: Marcas, dolor, 2 a 10 cm de edema y eritema durante las 12 primeras horas, sin síntomas sistémicos.
Grado 2	Moderado: Marcas, dolor, 12 a 25 cm de edema y eritema durante las 12 primeras horas, síntomas sistémicos con rápida progresión. Sangrado inicial en la herida.
Grado 3	Severo: Marcas, dolor, edema y eritema mayor a 25 cm durante las 12 primeras horas, síntomas sistémicos con defectos de coagulación. Progresión muy rápida.
Grado 4	Muy Severo: Reacción local muy rápida. Edema, equimosis, ampollas, necrosis. Signos y síntomas sistémicos graves.

Nota: Tomado de: González & Onofre (2013).

1.5.2. Tratamiento

Para el tratamiento de la picadura de *B. atrox* se utiliza el antiveneno, un suero que se obtiene por inmunización en caballos. Este suero presenta algunos efectos secundarios como shock anafiláctico e hipertermia; también presenta algunos inconvenientes como la baja efectividad luego de producirse la picadura de serpiente generando dolor, edema, hemorragia local y necrosis.

Por este motivo se han realizado estudios con plantas nativas del lugar de incidencia en donde las comunidades indígenas para contrarrestar el envenenamiento de la serpiente utilizan plantas maceradas que son aplicadas en las heridas como cataplasmas, decocciones o bebidas alcohólicas para lavar la zona afectada o para ingerirlas (Camargo, Torres, Ricciardi, Ricciardi, & Dellacassa, 2011).

1.6. Actividad hemolítica

La actividad hemolítica es el fenómeno en el cual los eritrocitos se lisan por rupturas en la membrana celular que genera liberación de la hemoglobina y como consecuencia se produce hemoglobinuria, anemia e ictericia esta última por el exceso de hemoglobina trans que forma pigmentos biliares (Hernández & Hermosilla, 2014).

La hemólisis se clasifica en:

a) Extravascular: se genera en sitios específicos encargados del restablecimiento de los componentes intraeritrocitarios. Este mecanismo es realizado por macrófagos situados a nivel esplénico y hepático y es causado por daños endoteliales o por prótesis de válvulas cardiacas y respiratorias (Clinton, 2008).
b) Intracelular: produce la destrucción del eritrocito dentro del sistema vascular, generando la liberación de la hemoglobina en la sangre. Esta patología se produce por enfermedades cardiovasculares, anemias, infecciones, quemaduras y mordeduras de animales venenos (Fernández, 2009).

Capítulo 2

Materiales y métodos

2.1. Diseño del trabajo experimental

Para el presente trabajo de investigación se realizó análisis cuantitativos sobre la calidad de la droga vegetal, determinando el porcentaje de humedad, cenizas totales, cenizas solubles en agua y cenizas insolubles en ácido clorhídrico; determinación espectrofotométrica de fenoles totales y flavonoides, dada su importancia en la propiedad alexítera de un vegetal y, fundamentalmente, la actividad anti hemolítica indirecta de los extractos heptánicos, alcohólicos y acuosos, siendo las variables a correlacionar las siguientes:

Variable independiente:

- Concentración de extractos

Variable dependiente:

- Reducción del halo de hemólisis generado por la dosis mínima hemolítica (DMIH) del veneno de *B. atrox*.

Se tomó muestras vegetales de las plantas *Mucuna cf. elliptica* (Ruiz&Pav.) DC.; *Tabernaemontana sananho* Ruiz & Pav. presentes en la región amazónica del Ecuador en la provincia de Morona Santiago y que son reconocidas como plantas alexíteras por los habitantes de la zona de estudio, la comunidad Wawaim de la parroquia San Francisco del cantón Huamboya y según la bibliografía consultada (Intituto de investigaciones de la Amazonía Peruana, 2010).

Para evaluar la actividad anti hemolítica (alexítera) de cada extracto vegetal se determinó la dosis hemolítica mínima (MIDH) del veneno de la serpiente, considerada en este estudio como aquella dosis de veneno que generó un halo de hemólisis de 15 mm de diámetro sobre una placa de agar-sangre-fosfatidilcolina, cuando se han incubado a 37°C por 20 horas; los extractos que al ser incubados con la MIDH del veneno de la serpiente provocaron la reducción del diámetro del halo de hemólisis, se dice que son alexíteras, por tener actividad Anti hemolítica (Granda, 2015).

Los datos se analizaron en el programa estadístico Infostat/L versión libre del 2014 para calcular el Análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de Tukey para un $p< 0.05$.

2.2. Población y muestra

Material vegetal

Una vez que los permisos ambientales fueron aprobados se procedió a la recolección de las especies vegetales *Mucuna cf. elliptica* (Ruiz&Pav.) wapaá DC.; y *Tabernaemontana sanano* Ruiz &Pav. (kunapi), la recolección de las especies vegetales de estudio se llevó a cabo en la parroquia de San francisco ubicada al Nororiente de la provincia de Morona Santiago, cuyas coordenadas geográficas son: Latitud: 01° 56’ 44” Sur; Longitud: 77° 59’ 27” Oeste.

La localidad presenta un clima tropical húmedo lluvioso con una temperatura que va entre 22-28°C y posee un bosque secundario (GAD Huamboya, 2017).

Ubicación geográfica de la muestra 1y 2

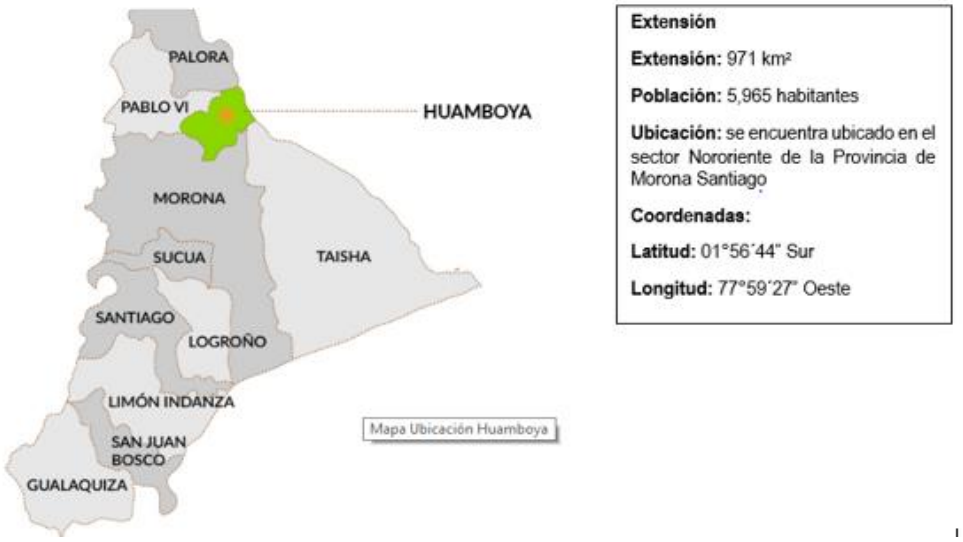


Figura 4. Ubicación satelital de la muestra 1 Mucuna cf. elliptica (Ruiz&Pav.) DC. conocida como Wapaá, Tabernaemontana sanano Ruiz &Pav. Llamada Kunapi
Nota: GAD Huamboya (2017)*. Realizado por la autora (2017).*

Las muestras vegetales obtenidas se las almacenó con papel periódico y prensado con cartón para evitar necrosis vegetal hasta ser transportadas al laboratorio de la UPS en Quito.

Las muestras para análisis fueron lavadas, limpiadas de partes en mal estado, restos de insectos y secadas en estufa a 38°C con 23% de Humead durante 5 días, posterior a esto se las llevó a molienda en molino eléctrico (Soto, 2014).

Las partes utilizadas para cada análisis fueron:

- *Mucuna cf. elliptica* (Ruiz & Pav.) DC.: conocida por la comunidad como wapaá u ojo de venado, se utilizó para ésta investigación el fruto y las hojas.
- *Tabernaemontana sananho* Ruiz & Pav. : llamada por los habitantes como kunapi y se utilizó para esta investigación a la planta completa.

2.3. Obtención de extractos

2.3.1. Preparación de extractos

Los extractos vegetales presentan un sin número de compuestos químicos que tienen actividad farmacológica los cuales se los puede obtener por varios métodos químicos, físicos o biológicos que nos permiten obtener varios principios activos siempre que se utilice el solvente adecuado (Caldas, 2012).

Para comprobar la factibilidad de esta investigación utilizando material vegetal fue necesario preparar tres extractos: heptánico, alcohólico, y acuoso (Carrión & García, 2010, pág. 28) y (Martinez, Valencia, & Jimenez, 2008).

Extracto acuoso: el agua es solvente que mantiene un gradiente osmótico en los tejidos vegetales, que permite que los aceites esenciales se difundan a través de membranas permeables a todos los órganos del vegetal y, en este caso, favorece la eliminación de sus principios activos (Astudillo, 2014).

Se pesó el material vegetal y se adicionó agua destilada; se dejó macerar por 48 h. Pasado este tiempo se filtró y el filtrado fue filtrada y desecada fue desecado en rota evaporador hasta obtener una muestra sólida, se pesó y conservó sellado con parafilm en refrigeración.

Nota: no es recomendable sobrepasar este tiempo de maceración puesto que la muestra tiende a contaminarse por hongos.

Extracto a**lcohólico**: es un solvente que permite la disolución de principios activos liposolubles presentes en un órgano vegetal (Caldas, 2012).

Se pesó la muestra vegetal y se adicionó alcohol al 96 % durante 72 h, se filtró y desecó con rota evaporador hasta obtener una muestra sólida la cual fue pesada y sellada con parafilm y conservada en refrigeración.

Extracto n-heptánico: este disolvente solubiliza los aceites esenciales, grasa y ceras por lo que al final se obtiene una oleorresina (Astudillo, 2014).

Al pesar la muestra vegetal se adicionó n-heptano se maceró por 72 h, se filtró y desecó con rota evaporador hasta obtener una muestra sólida seca la cual fue pesada y sellada con parafilm y conservada en refrigeración. De esta manera se obtiene un extracto seco.

Nota: es importante que la maceración tanto para el extracto alcohólico como heptánico tenga un periodo mínimo de 72 h, ya que facilita que el extracto concentre compuestos químicos propios del material vegetal y aumente el rendimiento del extracto.

Para utilizar los extractos se deben disolver nuevamente en el mismo solvente utilizado al inicio del proceso, es decir que para el extracto acuosa cada muestra se debe reconstituir en agua destilada, para el extracto alcohólico se lo reconstituirá en etanol al 96 % y para el extracto heptánico se reconstituirá con n-heptano.

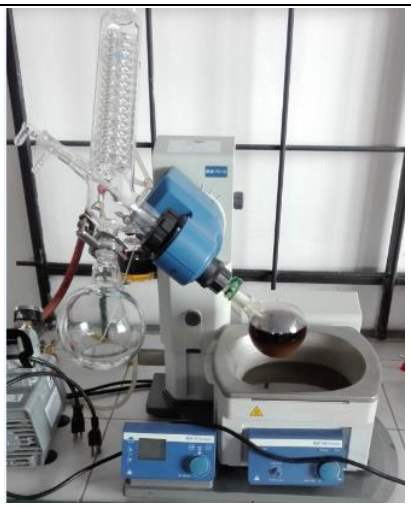


Figura 5. Equipo de para evaporar las muestras vegetales Rota evaporador.
Nota: Realizado por la autora (2017).

Cálculo del rendimiento de extractos

Según Caldas (2012), el rendimiento de un material vegetal se realiza de la siguiente manera.

$$\%\ Rendimiento = \frac{gramos\ del\ extracto\ obtenido}{gramos\ totales\ de\ la\ muestra\ vegetal\ seca}\ x\ 100$$

2.4. Análisis cuantitativo

2.4.1. Determinación de humedad

La humedad de una muestra vegetal **es** la determinación de la pérdida de masa de la muestra luego de haber sido sometidas a incineración, y para ello se utilizó el método analítico con el equipo METTLER TOLEDO (HB43-S halogen).

Se pesó aproximadamente 2 g de muestra vegetal y se introdujo en el equipo analítico, luego se anotó el valor obtenido.

Figura 6. Equipo METTLER TOLEDO (HB43-S halogen) para determinar humedad.
Fuente la autora (2017).

2.4.2. Determinación de cenizas totales, solubles en agua e insolubles en ácido clorhídrico

Se procedió a obtener residuos inorgánicos como producto de la incineración del materia orgánica presente en la muestra vegetal mediante la aplicación del método gravimétrico (Laboratorio de Alimentos I, Facultad de Quìmica, UNAM, 2008).

Para el siguiente proceso se utilizó la técnica descrita por Laboratorio de alimentos I, facultad de química, UNAM (2008), Araujo (2011)y Soto (2014).

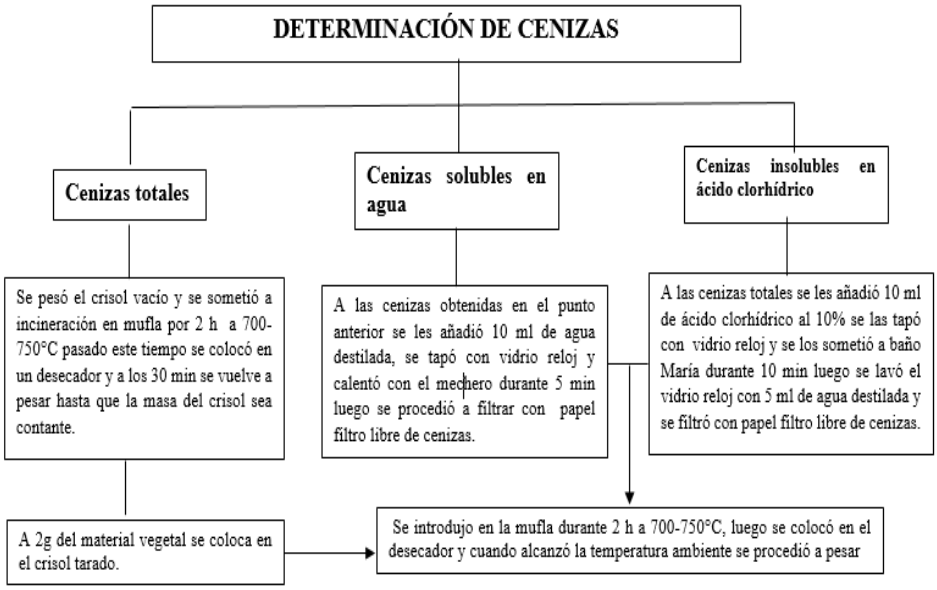


Figura 7. Determinación de cenizas totales, solubles en agua e insolubles en ácido clorhídrico Nota: Laboratorio de alimentos I, facultad de química, UNAM (2008), Araujo (2011)y Soto (2014). Realizado por la autora (20017).

Expresión de resultados

a) Cenizas totales

$$C = \frac{M2 - M}{M1 - M} * 100$$

Tomado de: (ISP de Chile, 2009).

Donde:

M_2: masa en gramos de la cápsula con las cenizas.

M_1: masa en gramos de la cápsula con la muestra.

M: masa en gramos de la cápsula vacía.

100 = factor matemático.

a) Cenizas solubles en agua.

$$Ca = \frac{M2 - Ma}{M1 - M} * 100$$

Tomado de: (SEGOB, 1978).

Donde:

Ca = porcentaje de cenizas solubles en agua.

M_2 = masa del crisol con las cenizas totales (g).

Ma =masa del crisol con las cenizas insolubles en agua (g)

M_1 = masa del crisol con la muestra de ensayo (g)

M = masa del crisol vacío.

100 = factor matemático.

b) Cenizas insolubles en ácido clorhídrico.

Expresión de resultados

$$\%B = \frac{M2 - M}{2M1 - M}\ x\ 100$$

Tomado de: (ISP de Chile, 2009).

Donde:

B= porcentaje de cenizas insolubles en ácido clorhídrico en base hidratada.

m = masa del crisol con la porción de ensayos (g)

m_2= masa del crisol con la ceniza (g)

100= factor matemático.

Nota: Es importante que la sílica gel tenga un color azul el cual es indicativo de que no existe humedad en el desecador.

2.4.3. Cuantificación de polifenoles totales

Los polifenoles son compuestos químicos presentes en todas las plantas y son responsables de la actividad metabólica de estas, son muy susceptibles a la oxidación, por lo que actúan como antioxidantes naturales. La determinación de la concentracion de fenoles se basa en una reaccion colorimétrica de oxido-reducción y cuyo agente oxidante fue el reactivo de Follin-Ciocalteu (Pérez, y otros, 2014).

Curva de calibración: se preparó una solución de ácido gálico (1 mg/mL) y se tomó alícuotas de 0, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140 y 160 μL a cada una se aforó a un volumen de 500 μL con agua destilada, en seguida se agregó 250 μL de reactivo de Folin y se aplicó ultrasonido por 5 min, transcurrido este tiempo se adicionó 1250 μL de solución de carbonato de sodio. Se dejó en reposo durante 2 h y se midió la absorbancia a760 nm (PNT, 2010).

Cuantificación de polifenoles totales: se tomó una alícuota de 100 μL (3,08 mg/mL) y se aforó a un volumen de 500 μL con agua destilada. A cada muestra y estándar se adicionó 250 μL de reactivo de Folin-Ciocalteu 1N y se aplicó ultrasonido por 5 min, después se adicionó 1250 μL de Na_2CO_3 al 20% y se dejó reposar durante 2 h. Al término de este tiempo se midió la absorbancia en el espectrofotómetro con una longitud de onda de 760 nm (Gutiérrez, Martinez, Varona, & Rodriguez, 2000).

Los resultados fueron presentados en mg del ácido gálico por 100 mL del extracto mediante la siguiente fórmula (Mors. WB, 1989).

$$Cantidad\ de\ fenoles = \frac{mg\ de\ ác.\ gàlico}{100mL\ de\ extracto} = \frac{absorvancia + b}{m} * 5$$

2.4.4. Análisis de flavonoides

Los flavonoides están presentes en semillas, hojas y flores y son los encargados de la respuesta a la luz, crecimiento y a la interacción entre la planta y el entorno, esto hace que las plantas generen metabolitos secundarios que ayudan a la protección de la planta contra el medio biótico y abiótico y sobre la salud del humano.

Curva de calibración: se utilizó como estándar a la solución de catequina (0,1 mg/mL) en volúmenes de 0, 20, 40, 60, 80 y 100 µL, se añadió una disolución de nitrito de sodio al 5 % y de cloruro de aluminio y solución de hidróxido de sodio 1M, luego se añadió 1250 µL de agua destilada y 75µL de $NaNO_2$ en solución, se dejó reposar por 6 min; transcurrido este tiempo se añadió 150 µL de AlCl3 al 10 % y se mantuvo en reposo durante 5 min, se agregó 500 µL de NaOH y se aforó a 2,5 mL. La absorbancia fue medida a 510 nm en el espectrofotómetro.

Cuantificaciòn de fenoles: se tomó 100 µL de extracto (3,08 mg/mL) y se adicionó 1250 µL de agua destilada con 75 µL $NaNO_2$ al 5 % y se dejó reposar por 6 min, luego se adicionó 150 µL de $AlCl_3$ al 10 % y nuevamente se dejó reposar durante 5 min, trascurrido este tiempo se añadió 500 µL de NaOH 1M completando con agua destilada a un volumen final de 2,5 mL. Se procedió a medir la absorbancia en el espectrofotómetro con una longitud de onda de 510 nm (García M. , 2007).

Los resultados fueron presentados en mg de catequina sobre 100 mL del extracto utilizando la siguiente fórmula (Mors. WB, 1989).

$$Cantidad\ de\ flavonoides = \frac{mg\ de\ catequina}{100\ mL\ de\ extracto} = \frac{absorvancia + b}{m} * 1$$

Nota: la absorbancia debe ser medida antes de 30 min ya que es una reacción espontánea y la concentración de flavonoides varían según el tiempo que se demore en hacer el proceso.

2.5. Análisis cualitativos

2.5.1. Tamizaje fitoquímico

Este procedimiento determinó de manera cualitativa la presencia compuestos químicos que poseen las muestras vegetales. Las pruebas del tamizaje químico se realizaron según lo publicado por: Pereira, Vega, Almeida, & Morales (2009), Laboratorio de Alimentos I, Facultad de Química, UNAM (2008),Acosta, Fonseca, Saavedra, Fonseca, & Reytor (2010) y Castañeda, Manriquez, & Ibañes (2002).

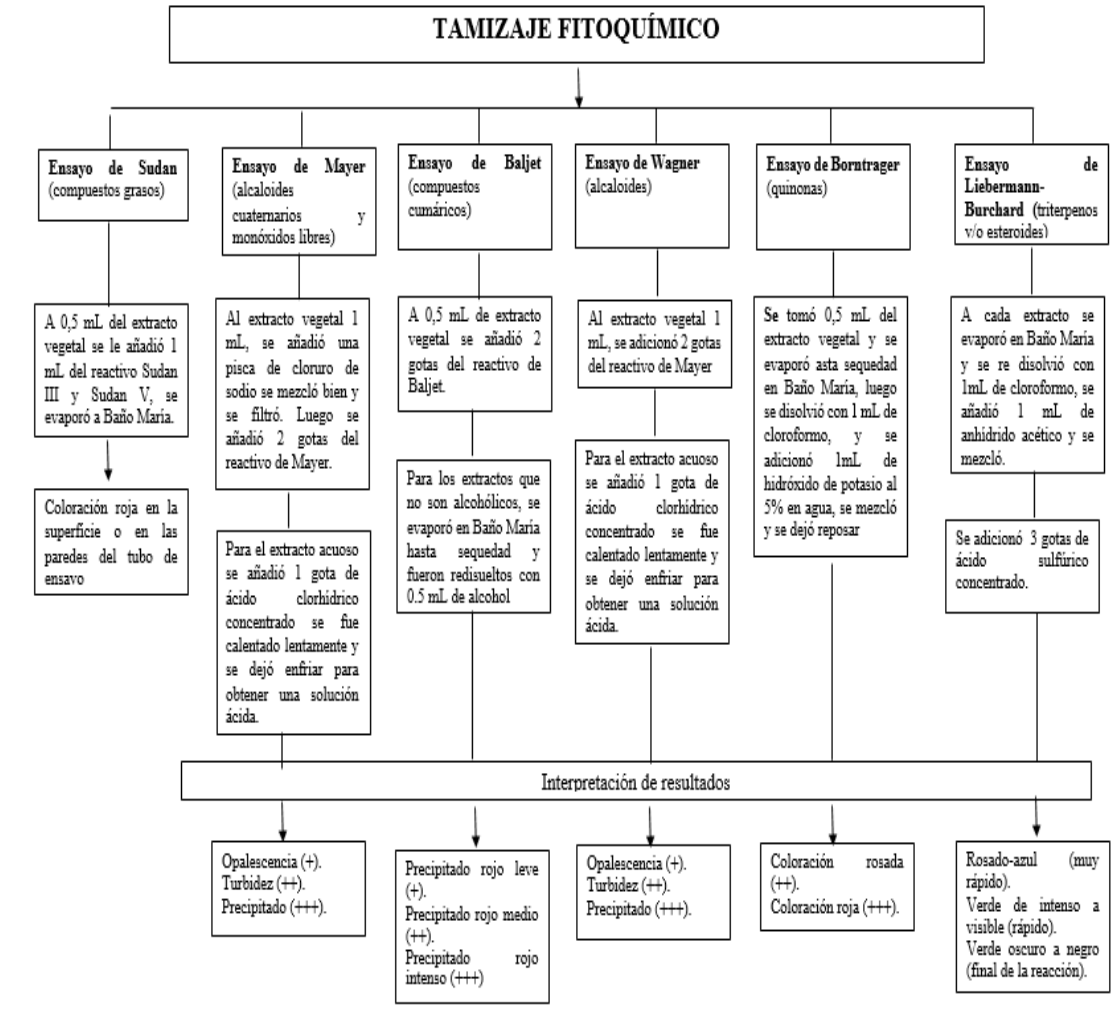


Figura 8. Tamizaje Fitoquímico parte 1-3
Nota: Pereira, Vega, Almeida, & Morales (2009), Laboratorio de Alimentos I, Facultad de Química, UNAM (2008),Acosta, Fonseca, Saavedra, Fonseca, & Reytor (2010) y Castañeda, Manriquez, & Ibañes (2002). Realizado por la autora (2017).

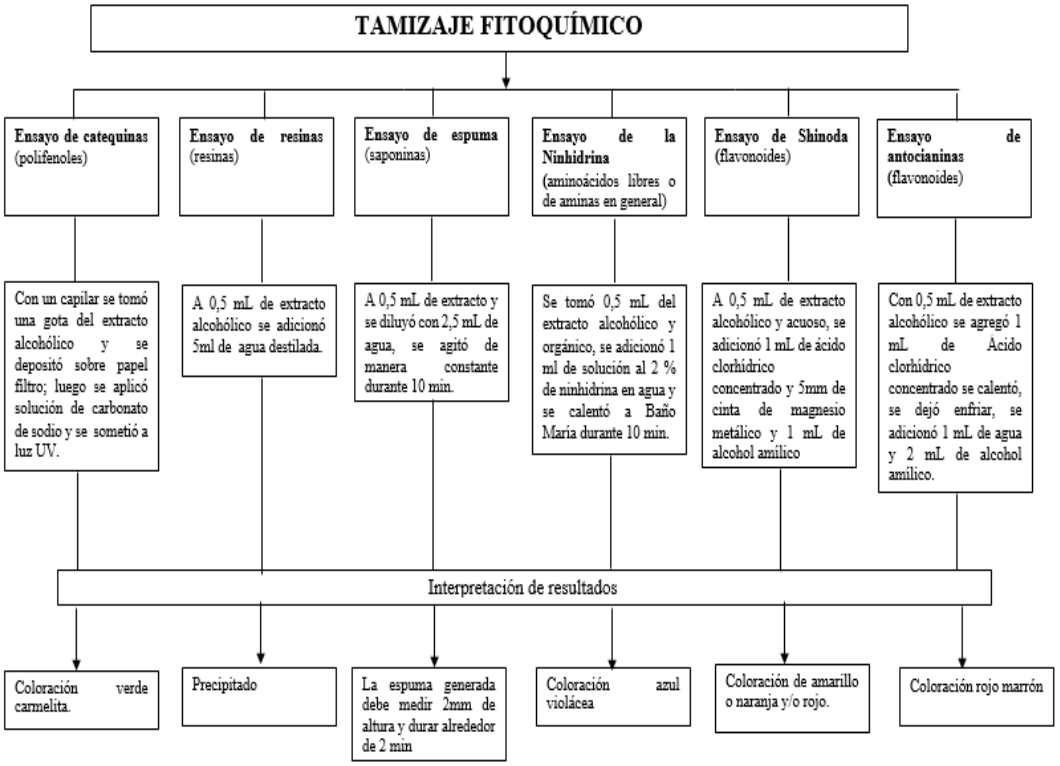


Figura 9.Tamizaje Fitoquímico parte 2-3
Nota: Pereira, Vega, Almeida, & Morales (2009), Laboratorio de Alimentos I, Facultad de Química, UNAM (2008),Acosta, Fonseca, Saavedra, Fonseca, & Reytor (2010) y Castañeda, Manriquez, & Ibañes (2002). Realizado por la autora (2017).

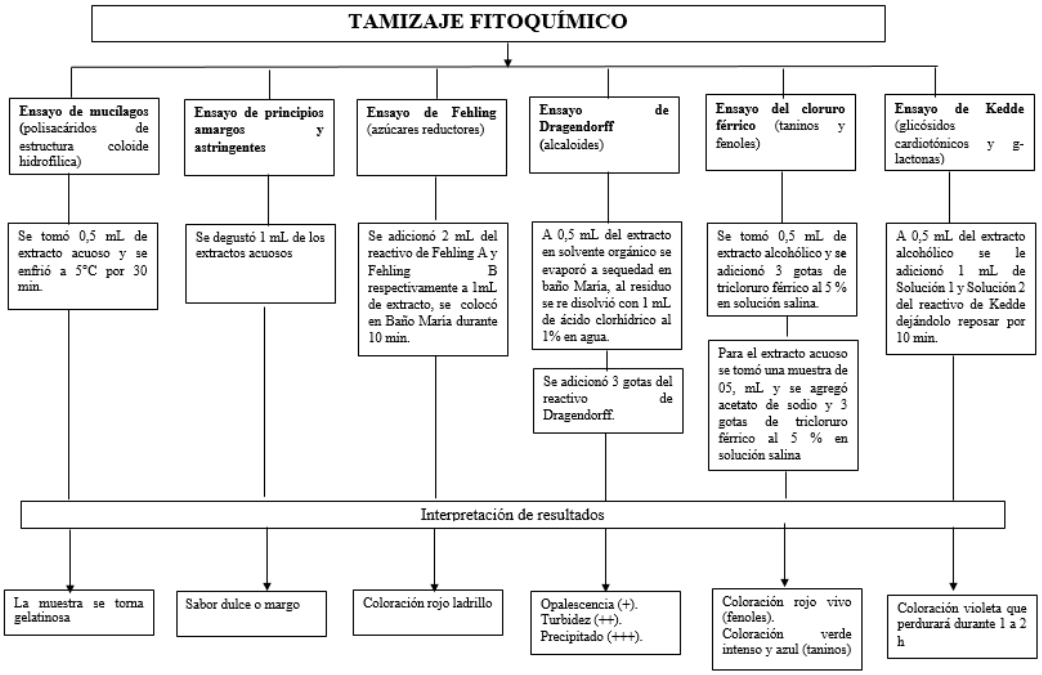


Figura 10. Tamizaje Fotoquímico parte 3-3

Nota: Pereira, Vega, Almeida, & Morales (2009), Laboratorio de Alimentos I, Facultad de Química, UNAM (2008),Acosta, Fonseca, Saavedra, Fonseca, & Reytor (2010) y Castañeda, Manriquez, & Ibañes (2002). Realizado por la autora (2017).

2.6. Actividad anti hemolítica

2.6.1. Obtención de veneno de *B. atrox*

El veneno de la serpiente *Bothrops atrox* se obtuvo por ordeño manual de un ejemplar adulto en la provincia de Morona Santiago, el mismo que se diluyó inmediatamente en 2 mL de solución fisiológica y se transportó en refrigeración hasta la ciudad de Quito para almacenarlo en congelación hasta su uso.

2.6.2. Determinación de la dosis mínima hemolítica (MIDH):

La MIDH es la dosis mínima de veneno capaz de producir una lisis completa de los eritrocitos (Pirela, López, & Hernández, 2006). Para esta determinación se porcedió de la siguiente manera:

2.6.2.1. Preparación de eritrocitos lavados

Se colocó 15 mL de sangre completa en los tubos de centrifugación y se aforó a un volúmen de 45 mL con suero fisiológico, se colocó en la centrifugadora grande por 15 min a 2700 rpm. Después de este tiempo se retiró los tubos de la centrifugadora y se eliminó el sobrenadante. Se repite el proceso por duplicado hasta obtener solo eritrocitos (volumen final de eritrocitos 20 mL) (Ballester, De la Campa, Pérez, & Hourrutinier, 2006).

Para comprobar que no hubo lisis celular es necesario realizar un frotis de los eritrocitos obtenidos, si se presentara algún daño celular repetir el proceso.

Figura 11. Centrifugado de la sangre a 2750 rpm durante 15 minutos
Nota: Realizado por la autora (2017).

2.6.2.2. Preparación del medio de cultivo Agar-sangre fosfatidilcolina

El siguiente procedimiento se tomó como referencia el trabajo realizado por Pereañez, y otros (2008), para preparar 1 L de medio de cultivo.

- Se calentó 1 L de agua destilada en un matraz Erlenmeyer a la cual se agregó 10 pastillas de PBS y con ayuda de un potenciómetro se confirmó el pH de la disolución que fue de 7,5 a 50°C.
- Se pesó 40 g de agar sangre base y se añadió a la mezcla anterior hasta disolverla por completo.
- Se añadió 0,015 g de $CaCl_2$ 0,01 M en 10 mL de agua destilada una vez disuelta agregar a la solución de Agar.
- La disolución anterior fue esterilizada en autoclave por 20 min a 120°C, transcurrido este tiempo se dejó enfriar hasta una temperatura de 50°C. Es importante mantenerla en agitación para evitar que se formen grumos en la solución de Agar.
- Dentro de la cámara de flujo laminar, se añadió 12 mL de eritrocitos lavados a la solución anterior y se mezcló hasta obtener una solución homogénea.

- Se agregó 12 mL de suspensión de yema de huevo (egg-yolk) diluido en solución salina en una proporción de 1:4 y se mantuvo en agitación constante.
- Se distribuyó en cajas Petri de 25 mL del cual se obtuvo 40 cajas del agar sangre base.
- Se dejó enfriar las cajas Petri semi tapadas y luego se procedió a cerrarlas con parafilm y se almacenaron en refrigeración hasta utilizarlas.

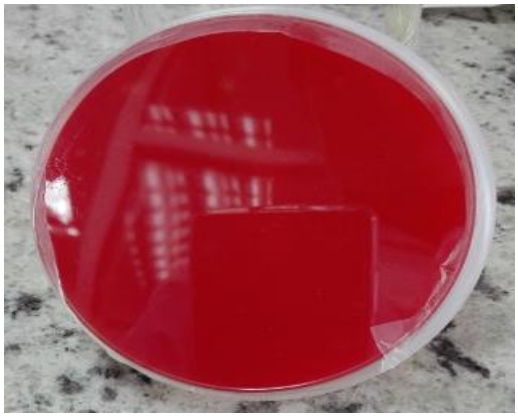


Figura 12. Caja Petri con Agar-sangre-fosfatidilcolina
Nota: Realizado por la autora (2017).

2.6.2.3. MIDH veneno de *B. atrox*

Para obtener la dilución correspondiente a la dosis mínima hemolítica del veneno se procedió de acuerdo a lo descrito por Saravia, y otros (2015), ajustando la técnica a las necesidades de la investigación.

Solución Madre: se pesó 6 mg de veneno y se llevó a disolución en 1000 µL de solución de PBS, pH 7,2. Se obtiene 90 µg de veneno por cada 15 µL de disolución.

Disolución 2: se tomó una alícuota de 670 µL de la solución estándar y se aforó a 1000 µL. Se obtiene 60 µg de veneno por cada 15 µL de disolución.

Disolución 3: de la disolución anterior se tomó 750 µL de la solución estándar y se aforó a 1000 µL. Se obtiene 45 µg de veneno por cada 15 µL de disolución.

Disolución 4: de la disolución anterior se tomó 670 µL de la solución estándar y se aforó a 1000 µL. Se obtiene 30 µg de veneno por cada 15 µL de disolución.

Disolución 5: de la disolución anterior se tomó 500 µL de la solución estándar y se aforó a 1000 µL. Se obtiene 15 µg de veneno por cada 15 µL de disolución.

En 2 cajas Petri con el medio agar base y se realizó 5 pocillos a los cuales se los identificó como Dilución 1, Dilución 2, Dilución 3, concentración 4 Dilución 5.

Con ayuda de una micropipeta se tomó 15 µL de cada disolución del veneno y se colocó en cada pocillo previamente identificado, el proceso se realizó por duplicado.

De esta manera, las dosis de veneno de *B. atrox* testadas son las siguientes:

SM=90 µg

D_2= 60 µg

D_3 = 45 µg

D_4 = 30 µg

D_5 = 15 µg

Se incubó por 20 h a 37°C, y se midió el diámetro del halo de hemólisis formado con un calibrador Vernier.

Se tomó como dosis hemolítica mínima a aquella que produjo un halo de hemólisis que midió 15,53 cm y con esa dosis (1 µg/µL) se procedió a determinar la capacidad neutralizante de los extractos vegetales sobre el veneno.

2.7. Determinación de la capacidad neutralizante de los extractos

2.7.1. Actividad anti hemolítica con los extractos

Se utilizó la técnica de Hernández & Hermosilla (2014) y Pereañez, y otros (2008)la misma que fue sujeta a cambios según la necesidad de la investigación.

A cada caja Petri que contiene 25 mL del agar base sangre-fosfatidilcolina, se realizó 4 pocillos identificando cada uno con C1, C2, C3 y Blanco.

Blanco: se prepararon tres soluciones, a) se tomó 20 mg de extracto seco con 0,5 mL de su respectivo disolvente, b) se tomó 30 mg de extracto seco en 0,5 mL y c) se tomó 60 mg de extracto seco en 0,5 mL, luego a 0,25 mL se aforo a 100 mL, el proceso se repite y finalmente se tomó 0,1 mL y se aforó a 100 mL.

Concentración 1 (MIDH-extracto): se disolvió 3 mg del veneno en 0,5 mL, se pesó 20 mg de extracto vegetal y se diluyó en 0,5 mL del solvente que se utilizó para preparar cada extracto (etanol, agua y n-heptano).

Concentración 2 (MIDH-extracto): se disolvió 3 mg del veneno en 0,5 mL, se pesó 30mg de extracto vegetal y se diluyó en 0,5 mL del solvente que se utilizó para preparar cada extracto (etanol, agua y n-heptano).

Concentración 3 (MIDH-extracto): se disolvió 3 mg del veneno en 0,5 mL, se pesó 60 mg de extracto vegetal y se y se diluyó en 0,5 mL del solvente que se utilizó para preparar cada extracto (etanol, agua y n-heptano).

Una vez que se obtuvo las tres concentraciones diferentes de los extractos se mezclaron con la MIDH en las cantidades que se muestran en la tabla 4.

Tabla 4.
Cantidades para preparar la solución mexcla veneno extracto.

Peso de extracto (µg)	**Veneno-Extracto**	**Volúmen de extracto por triplicado**	**Proporción MIDH-E**
C1: 6,75	15 µL veneno (1 mg/mL) + 3,75 µL extracto (2,5 g/ L)	11,25	1:07
C2: 9,40	15 µL veneno (1 mg/mL) + 1,77 µL extracto (3,8 g/ L)	5,31	1:10
C3: 18,75	15 µL veneno (1 mg/mL) + 1,77 µL extracto (3,8g/ L)	7,5	1:20
Concentración 1(C1), Concentración 2 (C2) y Concentración 3 (C3)			

Nota: Realizado por la autora (2017).

Estas proporciones veneno-extracto se mezclan y se pre incuban por 30 minutos a 37°C.

Luego se tomó 15 µL de cada mezcla MIDH-extracto y se sembró en el pocillo correspondiente de la caja Petri que contiene el agar-sangre-fosfatidilcolina. Todo este proceso se realizó en cámara de flujo laminar. Se selló cada caja Petri con parafilm y se incubó por 20h a 37°C, luego se midió el halo de hemólisis con un calibrador Vernier.

El proceso se realizó por triplicada para cada extracto vegetal.

Se realizaron los tratamientos correspondientes para comparar los halos de hemólisis entre los tres extractos como se muestra en la tabla 5.

Tabla 5.
Tratamientos para determinación de actividad neutralizante o inhibitoria.

N° de ensayo	Tratamiento	Combinación de tratamiento
1	Testigo	Media del halo MIDH
2	C1-Hep	1:7 MIDH-extracto N -heptano
3	C2- Hep	1:10 MIDH-extracto N -heptano
4	C3- Hep	1:20 MIDH-extracto N-heptano
5	C1- Al	1:7 MIDH- extracto Alcohólico
6	C2 -Al	1:10 MIDH- extracto Alcohólico
7	C3 -Al	1:20 MIDH- extracto Alcohólico
8	C1- Ac	1:7 MIDH-extracto acuoso
9	C1- Ac	1:10 MIDH- extracto acuoso
10	C1- Ac	1:20 MIDH- extracto acuoso
Hep: extracto n-heptano; Al: extracto alcohólico; Ac: extracto acuoso		

Nota: Realizado por la autora (2017).

Capítulo 3

Resultados y discusiones

3.1. Obtención de extractos

3.1.1. Maceración

Tabla 6.
Cantidad pesada de material vegetal seco y triturado con su respectivo solvente.

Material vegetal	Peso (g)	Sol. heptánica (mL)	Peso (g)	Sol. alcohólica (mL)	Peso (g)	Sol. acuosa (mL)
Wapaá fruto	23,46	65	25,02	100	23,12	50
Wapaá Hojas	22,44	500	20,97	452	21,34	500
Kunapi completa	24,60	225	24,60	300	21,56	300

Nota: Realizado por la autora (2017).

La tabla 6 indica el peso de la muestra vegetal utilizada para la maceración con su respectivo solvente, este proceso de maceración influye en la extracción del principio activo del material vegetal para que se concentre en función del diluyente que se utilice, esto dependerá de la composición química del vegetal (Cortéz, 2012).

3.1.2. Rendimiento de los extractos

Tabla 7
Rendimiento de las especies vegetales en el extracto Acuoso.

MUESTRA	% Rendimiento extracto Acuoso	% Rendimiento extracto heptánico	% Rendimiento extracto alcohólico
Wapaá fruto	12,76	0,41	0,43
Wapaá hojas	0,91	3,71	4,13
Kunapi completa	11,46	2,14	2,18

Nota: Realizado por la autora, 2017.

De acuerdo a lo analizado en la tabla 7 se tiene que el extracto acuoso es el que proporcionó mayor rendimiento en wapaá fruto (12,76%) y kunapi completa (11,46%) y esto se debe porque el solvente es de naturaleza polar tienen la capacidad de romper enlaces covalentes en el soluto y provocar ionizaciones, es decir que estos solventes cuando actúan sobre el soluto pueden acoplarse mediante la formación de puentes de hidrógeno facilitando la extracción de principios activos (Cortéz, 2012).

Es importante resaltar que los datos completos se encuentran en anexos (12).

3.2. Análisis cuantitativo

3.2.1. Determinación de humedad

Tabla 8.
Porcentaje de humedad registrada con el equipo METTLER TOLEDO (HB43-halogen).

Especie vegetal	**Porcentaje de humedad (%)**
Mucuna cf. elliptica (Ruiz & Pav.) DC. (wapaá)	
Fruto	8,94
Hojas	8,73
Tabernaemontana sananho Ruiz & Pav. (kunapi)	
Completa	8,83

Nota: Realizado por la autora (2017).

Como se observa en la tabla 8, existe un porcentaje similar de humedad en las muestras vegetales con un valor promedio de 8,83 % que indica que las plantas se encontraban secas; este es un factor que influye en la velocidad de reacción enzimática sobre los metabolitos secundarios en las muestras vegetales, por tanto, pueden influir en la determinación cuantitativa de los mismos (Soto, 2014).

3.2.2. Determinación de cenizas

3.2.2.1. Cenizas totales

Tabla 9.
Cantidad de cenizas totales determinadas por el método gravimétrico.

Muestra vegetal	Cenizas totales (%)
Wappá fruto	4,52
Wappá hojas	9,97
Kunapi Completa	10,68

Nota: Realizado por la autora (2017).

La tabla 9 determina que la Kunapi presenta mayor cantidad de cenizas con un porcentaje de 10,68%, lo que denota que existe mayor cantidad de minerales en la muestra vegetal (Peña, 2010).

Para observar los datos completos que se obtuvo en el proceso ver anexo 11.

3.2.2.2. Cenizas solubles en agua

Tabla 10.
Determinación de porcentaje de cenizas solubles en agua.

Muestra vegetal	Porcentaje cenizas solubles (%)
Wapaa Fruto	4,45
Wapaa Hojas	2,40
Kunapi Completa	6,23

Nota: Realizado por la autora (2017).

La tabla 10 determina el porcentaje de cenizas solubles en agua obtenidas en el proceso, siendo la Kunapi completa la que presenta mayor porcentaje con un valor de 6,23%, la cual indica que existió residuos orgánicos en la muestra vegetal que hace

que el contenido de cenizas sea mayor que el resto de plantas (Peña, 2010) y (Araujo, 2011).

3.2.2.3. Cenizas insolubles en ácido clorhídrico

Tabla 1112.
Determinación de porcentaje de cenizas insolubles en ácido clorhídrico.

Muestra vegetal	Porcentaje cenizas solubles (%)
Wapaa Fruto	0,72
Wapaa Hojas	1,47
Kunapi Completa	0,80

Nota: Realizado por la autora (2017).

La tabla 11 indica que la wapaá hojas con un valor del 1,47% es la que presenta mayor cantidad de cenizas solubles en ácido clorhídrico que el resto de especies vegetales en estudio, por tanto contiene mayor cantidad de residuos minerales (Peña, 2010).

3.3. Cuantificación de polifenoles totales y flavonoides.

Se realizó la curva de calibración que sirvió de estándar para determinar la cantidad de polifenoles. Esta curva de calibración se muestra en Anexos 13.

Tabla 132.
Cuantificación de Polifenoles.

Plantas	Absorbancia en ppm	mg ácido gálico/ 100 mL de extracto
Wapaá fruto	0,28	28,88
Wapaá hojas	0,08	8,88
Kunapi completa	0,03	3,88

Nota: Realizado por la autora (2017).

La tabla 12 determina la cantidad de fenoles encontrados en el extracto alcohólico de las especies vegetales, siendo la wapaá fruto con un valor de 28,88 mg ácido gálico/

100 mL de extracto la que presenta mayor cantidad en relación a la wapaá hojas y kunapi completa.

3.4. Análisis de flavonoides totales

El ensayo de flavonoides totales se realizó mediante el método de Liu y col (2002) y descrito por (García M. , 2007), con estándar de catequina (1mg/mL), la curva de calibración se muestra en Anexos 14.

Tabla 143.
Cuantificación de flavonoides.

Plantas	Absorbancia en ppm	mg catequina/ 100 mL de extracto
Wapaá fruto	0,28	0,93
Wapaá hojas	0,02	0,09
Kunapi completa	0,02	0,09

Nota: Realizado por la autora (2017).

La tabla 13 muestra la cuantificación de flavonoides en las especies vegetales se llevó acabo en el extracto alcohólico, denotando que wapaá fruto con un valor de 0,93mgcatequina/100mL de extracto, es la que posee mayor cantidad de este metabolito secundario en relación con la wapaá hojas y la kunapi completa.

3.5. Tamizaje fitoquímico

Tabla 154.
Resultados del screening fitoquímico para el extracto acuoso.

Wapaá hojas					Wapaá fruto				Kunapi completa			
Prueba	**Repeticiones**			**Resultado**	**Repeticiones**			**Resultados**	**Repeticiones**			**Resultados**
	1	2	3		1	2	3		1	2	3	
Felhing (A. reductore)	-	-	-	Negativo	-	+	+	Positivo	+	+	+	Positivo
Espuma (Saponinas)	-	+	-	Negativo	+	+	+	Positivo	+	+	-	Positivo
Amargo	-	-	-	Negativo	+	+	-	Positivo	-	-	-	Negativo
Musilago (Polisacáridos)	-	-	-	Negativo	+	-	-	Negativo	-	-	+	Negativo
Shinoda (Flavonoides)	+	+	+	Positivo	+	-	+	Positivo	+	+	+	Positivo
Dragendor (Alcaloide)	+	+	+	Positivo	+++	++	++	Positivo	+++	+++	+++	Positivo

(---) Ausencia del metabolito secundario, (+) Presencia en baja cantidad del metabolito, (++) Presencia en media cantidad del metabolito, (+++) Presencia en alta cantidad del metabolito.

Nota: Realizado por la autora (2017).

La tabla 14 que corresponde al extracto acuoso muestra que tanto la wapaá fruto y wapaá hojas como la kunapi son positivas para flavonoides y alcaloides, destacándose la wapaá fruto porque también es positiva para azúcares reductores, y saponinas.

Tabla 165.
Resultados del screening fitoquímico para el extracto n-heptano.

Prueba	**Wapaá hojas**			**Resultados**	**Wapaá fruto**			**Resultados**	**Kunapi**			**Resultados**
	Repeticiones				**Repeticiones**				**Repeticiones**			
	1	2	3		1	2	3		1	2	3	
Sudan (Ac. Grasos)	-	-	-	Negativo	++	++	++	Positivo	-	-	-	Negativo
Baljet (Com. Lactónicos)	-	-	-	Negativo	-	-	-	Negativo	-	-	-	Negativo
Wagner (Alcaloides)	++	++	++	Positivo	+	+	+	Positivo	++	++	++	Positivo
Dragendorf (Alcaloides)	++	++	++	Positivo	++	++	++	Positivo	-	-	-	Negativo
Liberman-burchard (Triterpenos o esteroides)	++	++	++	Positivo	++	++	++	Positivo	++	++	++	Positivo
Mayer (Alcaloides)	-	-	-	Negativo	-	-	-	Negativo	+	+	+	Positivo

(---) Ausencia del metabolito secundario, (+) Presencia en baja cantidad del metabolito, (++) Presencia en media cantidad del metabolito, (+++) Presencia en alta cantidad del metabolito.

Nota: Realizado por la autora (2017).

La tabla 15 muestra los resultados obtenidos del tamizaje Fitoquímico del extracto heptánico donde la wapaá hojas y wapá fruto así como la Kunapi son positivas para alcaloides, triterpenos y/o esteroides.

Tabla 176.
Resultados del screening fitoquímico para el extracto alcohólico.

Prueba	Wapaá hojas			Resultados	Wapaá fruto			Resultados	Kunapi			Resultados
	Repeticiones				Repeticiones				Repeticiones			
	1	2	3		1	2	3		1	2	3	
Resinas	+	+	+	Positivo	+	+	+	Positivo	++	++	++	Positivo
Espuma (Saponinas)	-	-	-	Negativo	++	++	++	Positivo	+	-	-	Negativo
Kedde (Glucósidos cardiotónicos)	+	+	+	Positivo	++	++	++	Positivo	+	+	+	Positivo
Shinoda (Flavonoides)	+	+	+	Positivo	+	+	+	Positivo	+	+	+	Positivo
CIFe (Com. Fenólicos)	+	+	+	Positivo	+	+	-	Positivo	+	+	+	Positivo
Ninhidrinas (Aminoácidos)	++	++	++	Positivo	++	++	++	Positivo	+	+	+	Positivo
Wgner (Alcaloides)	-	-	-	Negativo	-	-	-	Negativo	++	++	++	Positivo
Baljet (Comp. Lactónicos)	-	-	-	Negativo	-	-	-	Negativo	-	-	-	Negativo
Antocianinas (Flavonoides)	+	+	+	Positivo	++	++	++	Positivo	++	++	++	Positivo
Catequinas	+	+	+	Positivo	-	-	-	Negativo	+	+	+	Positivo
Felling (A. reductores)	-	-	-	Negativo	-	-	-	Negativo	+	+	+	Positivo
Dragendorf (Alcaloides)	+	+	+	Positivo	-	-	-	Negativo	+	+	+	Positivo
Mayer (Alcaloides)	+	+	+	Positivo	-	-	-	Negativo	++	++	++	Positivo
Borntrager (Quinonas)	++	++	++	Positivo	++	++	++	Positivo	+	+	+	Positivo
Lieberman-burchard (Triterpenos o esteroides)	++	++	++	Positivo	-	-	-	Negativo	++	++	++	Positivo

(---) Ausencia del metabolito secundario, (+) Presencia en baja cantidad del metabolito, (++) Presencia en media cantidad del metabolito, (+++) Presencia en alta cantidad del metabolito**.**

Nota: Realizado por la autora (2017).

La tabla 16 muestra los resultados del extracto alcohólico donde la wapaá hojas y wapaá fruto así como la kunapi son positivas para resinas, flavonoides, fenoles, taninos y aminoácidos libres.

3.6. Actividad anti hemolítica

3.6.1. MIDH veneno de *B. atrox*

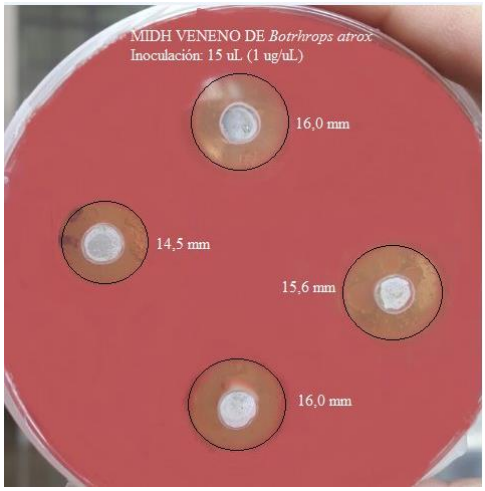


Figura 12. Dosis hemolítica mínima con un halo de 15,6 cm que corresponde a la concentración 1. Nota: Realizado por la autora (2017).

La figura 13 indica la concentración mínima hemolítica (DMIH) de la disolución en PBS del veneno de *B. atrox* (1mg/mL) el mismo que generó un halo de hemólisis de 15,53 mm de diámetro.

3.7. Determinación de la capacidad neutralizante de los extractos

Se determinó la actividad neutralizante de los tres extractos vegetales en concentraciones de 1:7, 1:10 y 1:20 veneno-extracto, por medio de la medición de los halos de inhibición que se generaron al sembrar 15µL de esta disolución incubada por 24h a 37°C.

Las imágenes que se obtuvieron de éste proceso se encuentran en anexos (1-9).

Tabla 187.
Halos de hemólisis en mezclas MIDH-Extracto acuoso.

Muestra	Concentración	R1	R2	R3	MEDIA	MHID	Alexíteras
Wapaá hojas	**C1**	13,00	15,00	6,00	14,0	15,53	Si
	C2	15,00	14,00	6,00	14,50	15,53	Si
	C3	13,00	16,00	6,00	14,50	15,53	Si
Wapaá fruto	**C1**	14,00	14,00	14,00	14,00	15,53	Si
	C2	15,00	6,00	15,00	15,00	15,53	Si
	C3	14,00	15,00	15,00	14,66	15,53	Si
Kunapi	**C1**	16,00	15,00	14,00	15,00	15,53	Si
	C2	15,00	14,00	14,00	14,33	15,53	Si
	C3	15,00	14,00	14,00	14,33	15,53	Si
C1=1:7 V-E; C2=1:10 V-E; C3=1:20 V-E							

Nota: Realizado por la autora (2017).

Tabla 198.
Halos de hemólisis en mezclas MIDH-Extracto heptánico.

Muestra	Concentración	R1	R2	R3	MEDIA	MHID	Alexíteras
Wapaá hojas	**C1**	14,00	15,00	13,00	14,00	15,53	Si
	C2	15,00	12,00	14,00	13,66	15,53	Si
	C3	16,00	14,00	15,00	15,00	15,53	Si
Wapaá fruto	**C1**	14,00	14,00	12,00	13,33	15,53	Si
	C2	13,00	12,00	13,00	12,66	15,53	Si
	C3	12,00	14,00	6,00	13,00	15,53	Si
Kunapi	**C1**	14,00	13,00	15,00	14,00	15,53	Si
	C2	16,00	15,00	16,00	15,66	15,53	**No**
	C3	15,00	6,00	15,00	12,00	15,53	Si
C1=1:7 V-E; C2=1:10 V-E; C3=1:20 V-E							

Nota: Realizado por la autora (2017).

Tabla 19.
Halos de hemólisis en mezclas MIDH-Extracto alcohólico.

Muestra	Concentración	R1	R2	R3	MEDIA	MHID	Alexíteras
Wapaá hojas	**C1**	6,00	6,00	6,00	6,00	15,53	Si
	C2	14,00	15,00	6,00	14,50	15,53	Si
	C3	15,00	6,00	6,00	15,00	15,53	Si
Wapaá fruto	**C1**	11,00	6,00	6,00	11,00	15,53	Si
	C2	13,00	14,00	13,00	13,33	15,53	Si
	C3	11,00	6,00	6,00	11,00	15,53	Si
Kunapi	**C1**	11,00	6,00	6,00	11,00	15,53	Si
	C2	13,00	14,00	13,00	13,33	15,53	Si
	C3	11,00	6,00	6,00	11,00	15,53	Si
C1=1:7 V-E; C2=1:10 V-E; C3=1:20 V-E							

Nota: Realizado por la autora (2017).

3.8. Análisis estadístico

Para determinar la significancia de la disminución del halo de hemólisis se utilizó el programa Infostat/L versión libre del 2014 para calcular el Análisis de varianza y la prueba de Tukey. Se aplicó un DCA con arreglo factorial 3 x 10 (3 muestras vegetales y 10 tratamientos) y tres repeticiones

3.8.1. Análisis de varianza

Tabla 20.
ANOVA. Análisis de varianza (SC Tipo III).

Fuente de Variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor de f	Valor de P
Modelo	29	748,38	25,81	2,79	<0,0004
Tratamiento	9	581,94	64,66	6,99	<0,0001
Especie	2	24,47	12,23	1,32	0,2743
Tratamiento*especie	18	141,98	7,89	0,85	0,6342
Error	60	55,33	9,26		
Total	89	1303,72			

Nota: Realizado por la autora (2017).

Mediante el análisis de varianza (ANOVA), para el diámetro del halo de inhibición (tabla 20), se determinó que existen diferencias estadísticamente significativas ($p<0,05$), sin embargo no existen diferencias significativas entre las especies lo que quiere decir que presentan el mismo efecto inhibitorio y, en este caso, se acepta la hipótesis nula.

3.8.2. Prueba Tukey alfa 0,05

Tabla 21.
Test Tukey Alfa: 0,05.

Tratamientos	Medias	Rangos		
1:7 Al	7,11	A		
1:20 Al	8,11	A	B	
1:20 Hep	12,44		B	C
1:10 Ac	12,67		B	C
1:10 Al	12,78		B	C
1:7 Ac	13,44			C
1:20 Ac	13,56			C
1:7 Hep	14,11			C
1:10 Hep	14,11			C
Testigo	15,53			C

Hep: extracto n-heptano; Al: extracto alcohólico; Ac: extracto acuoso

Nota: Letras distintas indican diferencia significativa a un alfa de 0,05. Realizado por la autora (2017).

Según el Test de Tukey al 5% (tabla 21) en relación a la actividad neutralizante de las especies vegetales, se observa que existen tres rangos de significancia alto (A), medio (B) y bajo (C), en el cual se observa que el que mejor tratamiento es el 1:7 MIDH-Extracto alcohólico (diámetro del halo de hemólisis7,11 mm) ubicado en el primer rango en comparación con el testigo que se ubicó en el último rango (15,53 mm).

Discusiones

Según Pérez, y otros (2014) en su trabajo de investigación "Determinación de fenoles y flavonoides totales en hojas de guayabo (*Psidium guajava* L.)" y Reyes & Jiménez (1995) en su trabajo "Química de las plantas alexíteras", señalan que las característica que deben tener las plantas para considerarse como alexíteras es la presencia de flavonoides, fenoles y alcaloides, los mismos compuestos que presentan *Mucuna cf. elliptica* (Ruiz&Pav.) DC., y de *Tabernaemontana sananho* Ruiz & Pav., y que actúan como neutralizantes para veneno de serpientes, también García, Fernández & Fuentes (2015) en su trabajo titulado "Determinación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu" indican que por otra parte los polifenoles tiene un carácter antitrómbico que ayudan a la coagulación en un proceso hemorrágico disminuyendo la fragilidad capilar ejerciendo efectos sobre la acción de enzimas causantes de alterar la cascada de la coagulación, lo que ejerce un efecto anti hemorrágico frente a la acción del veneno de la *B. atrox*.

La dosis mínima hemolítica del veneno de *B. atrox* investigada en éste trabajo fue de 15,53 mm, esta determinación se sustentó en el trabajo realizado por Granda (2015) "Actividad alexítera de los extractos de *Costus pulverulentus* C., *Presl Desmodium adscendens* (SW) DC., *Begonia glabra* Aubl., sobre el veneno de *Bothrops asper* (Equis) cuyo halo de hemólisis fue de 10 mm, también se sustentó en la publicación de Hernández & Hermosilla (2014) "Efecto de la concentración de saponinas en la actividad hemolítica de extractos de ocho plantas de uso medicinal en Guatemala" y cuyo halo de hemólisis fue de 15 mm, por otra parte en el trabajo de investigación de Pereañez, y otros (2008) "Inhibición de las actividades proteolítica, coagulante y hemolítica indirecta inducidas por el veneno de *Bothrops asper* por extractos

etanólicos de tres especies de heliconias" hace referencia que el halo de hemólisis generado en su investigación midió 20 mm; por tanto el halo de hemólisis que se genera por acción del extracto sobre el veneno de serpientes depende de la concentración del extracto y de su polaridad.

De acuerdo a los datos obtenidos en la presente investigación se evidencia que no existe diferencia significativa entre las especies de estudio en función de la capacidad neutralizante del veneno, pero si existe una diferencia significativa entre tratamientos, siendo el tratamiento C1 Al cuya concentración es 1:7 MIDH- extracto Alcohólico con un diámetro del halo de hemólisis de 7, 11 mm, el que presenta la mayor diferencia significativa al 5% con el testigo, este análisis se relaciona con el trabajo realizado por Saravia, y otros (2015) denominada "Evaluación de la capacidad neutralizante de extractos de plantas de uso popular en Guatemala como antídotos para el envenenamiento por la mordedura de *Bothrops asper"*.

Conclusiones

La actividad anti hemolítica de los extractos alcohólicos de *Mucuna cf. elliptica* (Ruiz&Pav.) DC., y de *Tabernaemontana sananho* Ruiz & Pav., es importante dada la gran reducción de halo de hemólisis generado por MIDH en el veneno de *Bothrops atrox*.

La composición química de los extractos vegetales incluye metabolitos secundarios como fenoles, flavonoides, glicoles, ácidos grasos, azúcares reductores que son compuestos químicos que intervienen en la reducción del halo de hemolisis generado por el veneno de *Bothrops atrox*.

El contenido de polifenoles y flavonoides en las muestras vegetales indica que el fruto de *Mucuna cf. elliptica* (Ruiz&Pav.) DC. (wapaá) es la parte de la planta que posee mayor cantidad de estos compuestos (0,93 mg de catequina/100 mL para flavonoides y 28,88 mg ácido gálico / 100mL de extracto para polifenoles); lo que concuerda con el uso tradicional del fruto de esta especie como alexítero.

Las plantas estudiadas *Mucuna cf. elliptica* (Ruiz&Pav.) DC., (wapaá) y la *Tabernaemontana sananho* Ruiz & Ruiz & Pav (Kunapi) tienen actividad anti hemolítica, siendo el extracto alcohólico el que presenta mayor la *Mucuna cf. elliptica* (Ruiz&Pav.) (wapaá fruto) con un rendimiento del 12,76 % la mejor entre las dos especies.

Las especies vegetales *Mucuna cf. elliptica* (Ruiz&Pav.) DC., llamada como Wapaá y la *Tabernaemontana sananho* Ruiz & Ruiz & Pav llamada como Kunapi presentan mayor actividad Anti hemolítica, con una concentración de 9,4µg de extracto a una disolución de 1.7 MIDH-veneno extracto alcóholico.

Lista de referencias

Acosta, Y., Fonseca, L., Saavedra, M., Fonseca, A., & Reytor, N. (9 de Abril de 2010). *Tamizaje Fitoquímico de extractos etéreo, alcohólico y acuoso de hojas de Pteris vittata L.* Obtenido de http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar/v9n1/acosta.pdf

Araujo, I. (7 de Julio de 2011). *Determinación de cenizas: Método gravimétrico.* Obtenido de http://www.idal.cl/sgcidal/images/stories/Procedimientos/Laboratorio/Determinacion%20cenizas%20metodo%20gravimetrico.pdf

Astudillo, S. (2014). *Utilización de aceites escenciales como conservantes para la preparación de salchichas de pollo.* Obtenido de Maceracion: http://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/7009/1/UPS-CT003676.pdf

Ballester, A., De la Campa, J., Pérez, M., & Hourrutinier, B. (2006). *Manual de Prácticas Médicas - Hospital Hermanos Ameijeiras*. Obtenido de OBTENCIÓN DE COMPONENTES SANGUÍNEOS: http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/hematologia/componentesangre.pdf.pdf

Caldas, A. (2012). *Optimización, escalamiento y diseño de una planta piloto de extracción sólido líquido.* Obtenido de Universidad de Cuenca Facultad de Ingenieria Quimica: http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/2468/1/tq1111.pdf

Camargo, F., Torres, A., Ricciardi, G., Ricciardi, A., & Dellacassa. (2011). SDS-PAGE: una herramienta útil en la evaluación preliminar de la actividad alexítera de extractos vegetales. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 429-434. Obtenido de http://www.blacpma.usach.cl/sites/blacpma/files/006_camargo.pdf

Cardona, F., David, H., & Hoyos, S. (2010). *Guía ilustrada, Flora de la Miel de la Central Hidroeléctricas de Miel al Oriente de Caldas.* Obtenido de https://www.isagen.com.co/comunicados/GUIA_LA_MIEL.pdf

Carrión, A., & García, C. (2010). *Preparación de extractos vegetales-Determinación de eficiencia metódica*. Recuperado el 10 de Diciembre de 2016, de http://cdjbv.ucuenca.edu.ec/ebooks/tq1005.pdf

Castañeda, C., Manriquez, M. M., & Ibañes, V. (2002). *Estudio fitoquímico y farmacológico de plantas con efecto Hipoglicemiantes.* Obtenido de http://www.revistacultura.com.pe/imagenes/pdf/18_02.pdf

Clinton, J. (2008). Síndrome de anemia hemolítica. *REVISTA MEDICA DE COSTA RICA Y CENTROAMERICA*, 85-90. Obtenido de REVISTA MEDICA DE COSTA RICA Y CENTROAMERICA: http://www.binasss.sa.cr/revistas/rmcc/583/art2.pdf

Cortéz, D. (2012). *Obtención de extracto tánico y extracto gálico a partir de la harina de vaina de guarango (Caesalpinea spinosa) (mol.) o. kuntz, a escala laboratorio.* Obtenido de http://dspace.espoch.edu.ec/bitstream/123456789/1979/1/96T00158.pdf

Etnofarmacia. (1 de Noviembre de 2008). *Antídotos tribales (II). Herencia milenaria.* Obtenido de http://www.dfarmacia.com/farma/ctl_servlet?_f=37&id=13128911

Fernández, E. (2009). Interferencias analíticas: Hemólisis. *Revista del Laboratorio Clínico*, 185-195. Obtenido de www.hgucr.es/wp-content/uploads/2013/01/hemolisis.pdf

GAD Huamboya. (2017). *Municipal del Cantón Huamboya*. Obtenido de Características ecológicas de Guamboya:

http://www.huamboya.gob.ec/portal/index.php/contenido/item/informacion-general

García, E., Fernandez, I., & Fuentes, A. (2015). *Determinación de polifenoles totales por el método de Folin- Ciocalteu.* Obtenido de https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/52056/Garcia%20Mart%C3%ADnez%20et%20al.pdf?sequence=1

García, M. (2007). *Cuantificación de fenoles y flavonoides totales en extractos vegetales.* Obtenido de Universidad de Querétaro México: http://www.uaq.mx/investigacion/difusion/veranos/memorias-2007/56_1UAQGarciaNava.pdf

González, J., & Onofre, M. (2013). *Incidencia de lesiones por animales ponzoñosos en el Hospital General Atizapán de Zaragoza de enero 2010 a diciembre 2012.* Obtenido de http://ri.uaemex.mx/handle/20.500.11799/14217

Granda, N. (20 de Mayo de 2015). Actividad alexítera de lo extractos de Costus pulverulentus C., Presl Desmodium adscendens (SW) DC., Begonia glabra Aubl., Sobre el veneno de Bothrops (Equis). Quito, Pichincha, Ecuador.

Gutiérrez, Y., Martinez, M., Varona, N., & Rodriguez, A. (2000). *Validación de 2 métodos espectrofotométricos para la cuantificación de taninos y flavonoides (quercetina) en Psidium guajaba, L.* Obtenido de http://bvs.sld.cu/revistas/far/vol34_1_00/far07100.htm

Herbario Q. C. A. de la Pontificia Universidad Católica. (2016). *Identificación taxonómica de Tabernaemontana sananho Ruiz & Pav., y Mucuna cf. elliptica (Ruiz&Pav.) DC.* Quito.

Hernández, A., & Hermosilla, V. (Julio de 2014). *Efecto de la concentración de saponinas en la actividad hemolítica de extractos de ocho plantas de uso*

medicinal en Guatemala. Obtenido de http://www.repositorio.usac.edu.gt/2065/1/06_3661.pdf

Intituto de investigaciones de la Amazonía Peruana. (2010). *Base de datos de plantas medicinales* . Perú.

ISP de Chile. (7 de Agosto de 2009). *INSTITO DE SALUD PUBLICA DE CHILE SUBDEPARTAMENTO LABORATORIOS DEL AMBIENTE*. Obtenido de Procedimiento para determinar cenizas totales. Método Gravimétrico: http://www.ispch.cl/sites/default/files/documento_tecnico/2010/03/PRT-711.02-011%20V0%20cenizas%20totales.pdf|

ISP de Chile. (5 de Julio de 2009). *Instituto de Salud Pública de Chile Laboratorio Nutrientes, Aditivos y Contaminantes*. Obtenido de Procedimiento determinación de cenizas insolubles en ácido clorhídrico en alimentos. Método gravimétrico.: http://www.ispch.cl/lab_amb/doc/qca_alimentos_nutricion/PRT-711.02-009.pdf

Jara, C., Lozada, S., & Peñaherrera, J. (2014). Conocimientos, actitudes y prácticas sobre la mordedura de ofidio. Patuca-Morona Santiago, 2014. Cuenca, Azuay, Ecuador.

Laboratorio de Alimentos I, Facultad de Quìmica, UNAM. (2008). *Determinación de cenizas.* Obtenido de http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/FUNDAMENTOSYTECNICASDEANALISISDEALIMENTOS_12286.pdf

López, J., & Pérez, J. (2009). Planta alexitéricas: antídotos vegetales contra la picadura de serpientes venenosas. *Medicina Naturista, III*, 17-24.

Martinez, A., Valencia, G., & Jimenez, N. (Mayo de 2008). *Manual de practicas de laboratorio de Farmacognosia y Fitoquimica*. Recuperado el 19 de Julio de 2014, de Univercidad de Antoquia: http://farmacia.udea.edu.co/~ff/manual2008.pdf

Maruñak, S., Leyva, G., Ruiz de Torrent, R., & Teibler, G. (2005). *Mionecrosis inducida por fosfolipasa A2 aislada del veneno de Bothrops jararacussu de Argentina*. Obtenido de http://www.unne.edu.ar/unnevieja/Web/cyt/com2005/4-Veterinaria/V-016.pdf

Mors. WB, D. (1989). Neutralization of lethal y myotoxix activities of south american rattlesnake venom by extract y constituents of the plant Eclipta protata (Asteraceae).toxicon 27:1003-1009.

MSP de Ecuador. (2007). *Manual de normas y procedimientos sobre prevención y tratamiento de accidentes ocasionados por mordedura de serpientes.* Obtenido de Ministerio de Salud Pública del Ecuador: https://aplicaciones.msp.gob.ec/salud/archivosdigitales/documentosDirecciones/dnn/archivos/MANUAL%20DE%20NORMAS%20PROCEDIM.%20PREVENC.MORDEDURA%20DE%20%20SERPIENTES(1).pdf

Oña, M., & Cerón, J. (2000). *Árboles representativos de Pachijal.* Obtenido de http://www.ecofondoecuador.com/images/publicaciones/Arboles%20representativos%20de%20Pachijal.pdf

Pazmiño, G. (23 de Abril de 2014). *Bothrops atrox.* Obtenido de Reptila web Ecuador: http://zoologia.puce.edu.ec/Vertebrados/reptiles/FichaEspecie.aspx?Id=1621

Peña, C. (12 de Diciembre de 2010). *Determinación de cenizas.* Obtenido de http://avibert.blogspot.com/2010/12/determinacion-de-cenizas-totales-o.htmL

Pereañez, J., Jimenez, S., Quintana, J., Nuñez, V., Fernandez, M., & Restrepo, J. (25 de Marzo de 2008). *Inhibición de las actividades proteolítica, coagulante y hemolítica indirecta inducidas por el veneno de Bothrops asper por extractos etanólicos de tres especies de heliconias.* Recuperado el 2017, de https://aprendeenlinea.udea.edu.co/revistas/index.php/vitae/article/viewFile/780/672

Pereira, S., Vega, D., Almeida, M., & Morales, G. (18 de Diciembre de 2009). *Tamizaje fitoquímico de los extractos alcohólico, etéreo y acuoso de las hojas de la Trichilia hirta L.* . Obtenido de Química viva: http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar/v8n3/pereiracabrera.pdf

Pérez, E., Ettiene, G., Marín, M., Casassa, A., Silva, N., Raga, J., . . . Medina, D. (14 de Enero de 2014). *Determinación de fenoles y flavonoides totales en hojas de guayabo (Psidium guajava L.).* Obtenido de http://revfacagronluz.org.ve/PDF/enero_marzo2014/v31n1a20146077.pdf

Pirela, R., López, J., & Hernández, J. (Mayo de 2006). *Caracterización toxinológica del veneno Total de la serpiente de cascabel Crotalus durissus cumanensis (VIPERIDAE), presente en la localidad de Porshoure, Guajira Venezolana*. Obtenido de http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-22592006000300004

PNT. (8 de Agosto de 2010). *Determinaciòn colorimètrica de fenoles solubles en material vegetal mediante el reactivo de Follin-Ciocalteu*. Obtenido de

http://www.mncn.csic.es/docs/repositorio/es_ES/investigacion/cromatografia/fenoles_en_planta.pdf

Reyes, R., & Jimenez, M. (1995). Química de las plantas alexíteras. *INTERCIENCIA*, 257-263. Obtenido de http://www.interciencia.org/v20_05/art03/

Rodriguez, A. (2001). *Los venenos y el síndrome de envenenamiento ofídico.* Obtenido de http://caibco.ucv.ve/caibco/vitae/VitaeNueve/Articulos/MedicinaTropical/ArchivosPDF/MedicinaTropical.PDF

Sanjuán, J., Vargas, J., Ortiz, F., González, L., Watanabe, B., & Granja, Y. (2012). *Determinación de la DL50 del veneno de serpientes adultas de la especie Botrox atrox en ratones albinos*. Obtenido de http://www.udla.edu.co/revistas/index.php/momentos-de-ciencia/article/view/239/147-152

Saravia, P., Mérdida, M., Marroquín, N., Orellana, Marcella, Cáceres, A., . . . Gutiérrez, J. (28 de Enero de 2015). *Evaluación de la capacidad neutralizante de extractos de plantas de uso popular en Guatemala como antídotos para el envenenamiento por la mordedura de Bothrops asper.* Obtenido de http://digi.usac.edu.gt/bvirtual/informes/puiis/INF-2014-27.pdf

SEGOB. (8 de Abril de 1978). *Norma oficial Mexicana. Determinación del porcentaje de las cenizas solubles e insolubles en té y productossimilares, NOM-F.260-S.1978.* Obtenido de https://es.slideshare.net/Gerardo_25/cenizas-30782360

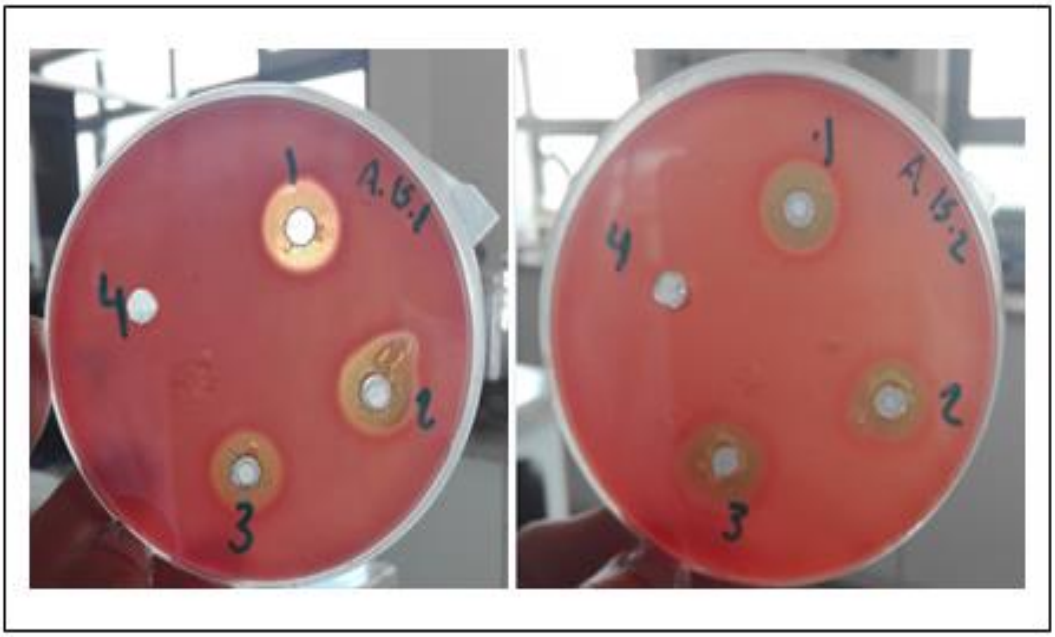
Soto, M. (2014). *Control de calidad de drogas vegetales.* Obtenido de http://www.authorstream.com/Presentation/marilusoto-1180661-control-de-calidad-drogas-vegetales-por-q-f-maril-r-soto-v-squez/

Sumpa, P. (2013). *Plantas medicinales y su tratamiento en la mordedura de serpiente en la comunidad achuar Kaiptach.* Obtenido de http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/20110/1/TESIS%20ACHUAR%20-%20ESPA%C3%91OL.pdf

Villamarín, J. (Mayo de 2009). *Accidente ofídico: manifestaciones y complicaciones clínicas en pacientes atendidos en el hospital José María Velasco Ibarra, Tena agosto 2007 – mayo 2009.* Obtenido de http://dspace.espoch.edu.ec/bitstream/123456789/194/1/94T00064.pdf

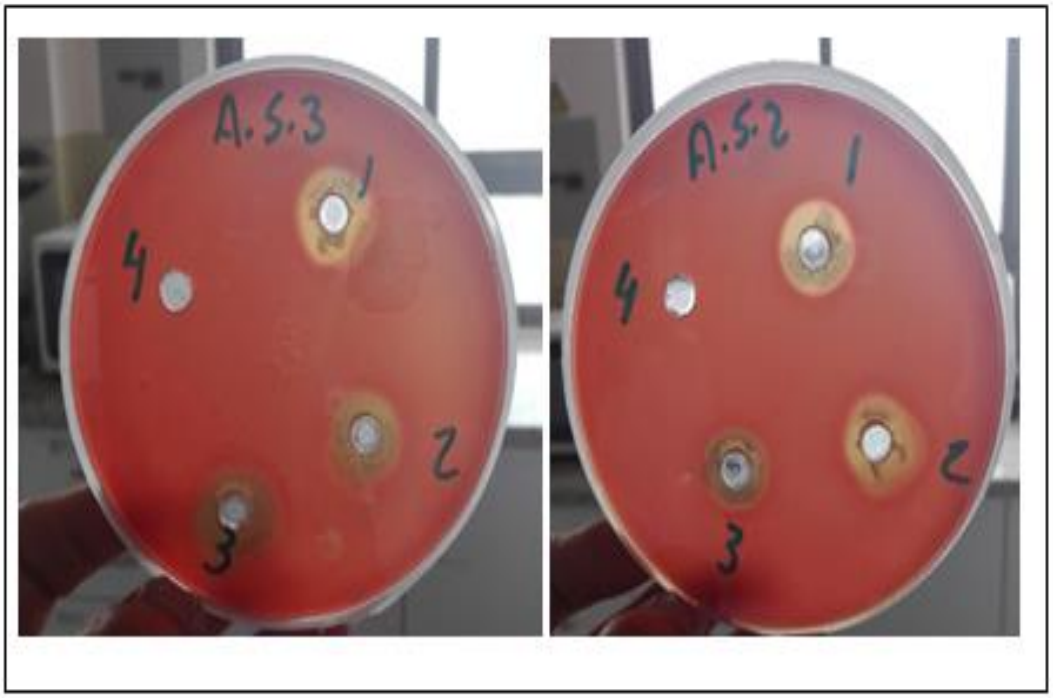
Anexos

Anexo 1 Halos de hemólisis generado en el extracto acuoso muestra Kunapi



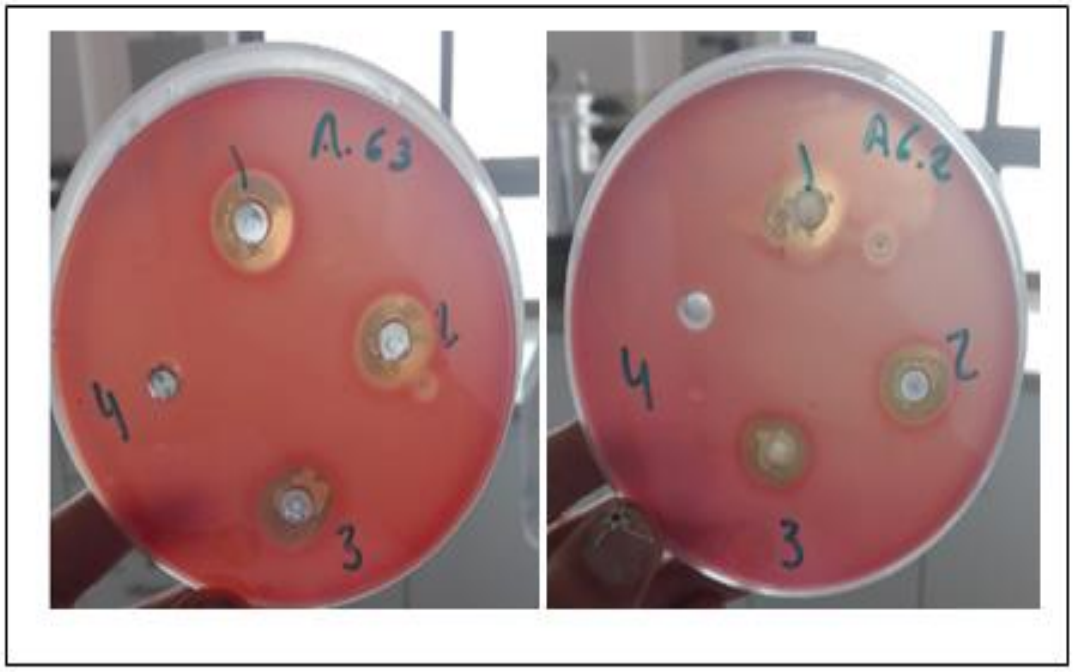
Nota: Realizado por la autora (2017).

Anexo 2 Halos de hemólisis generada en el extracto acuoso muestra Wapaá hojas



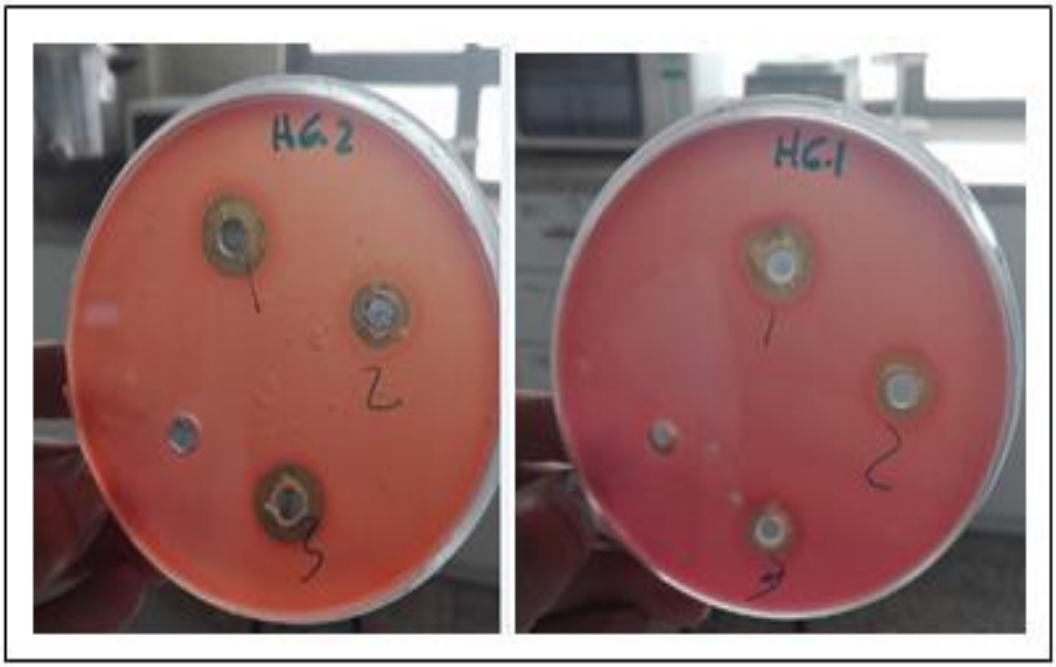
Nota: Realizado por la autora (2017). Nota: Realizado por la autora (2017).

Anexo 3 Halos de hemólisis generada en el extracto acuoso muestra Wapaá fruto



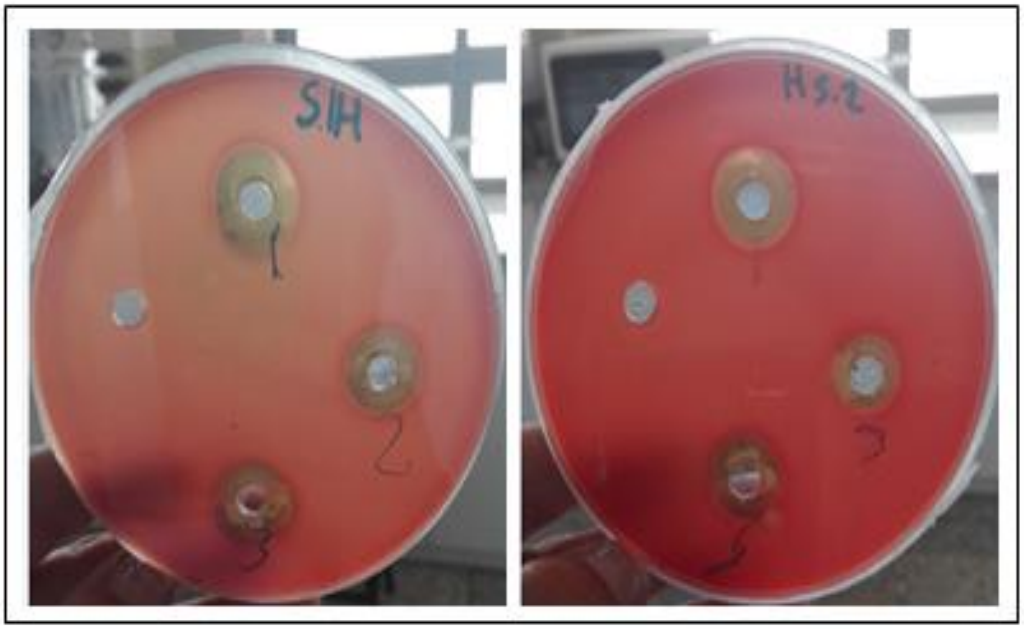
Nota: Realizado por la autora (2017). Nota: Realizado por la autora (2017).

Anexo 4 Halos de hemólisis generado en el extracto n-heptano muestra Wapaá hojas



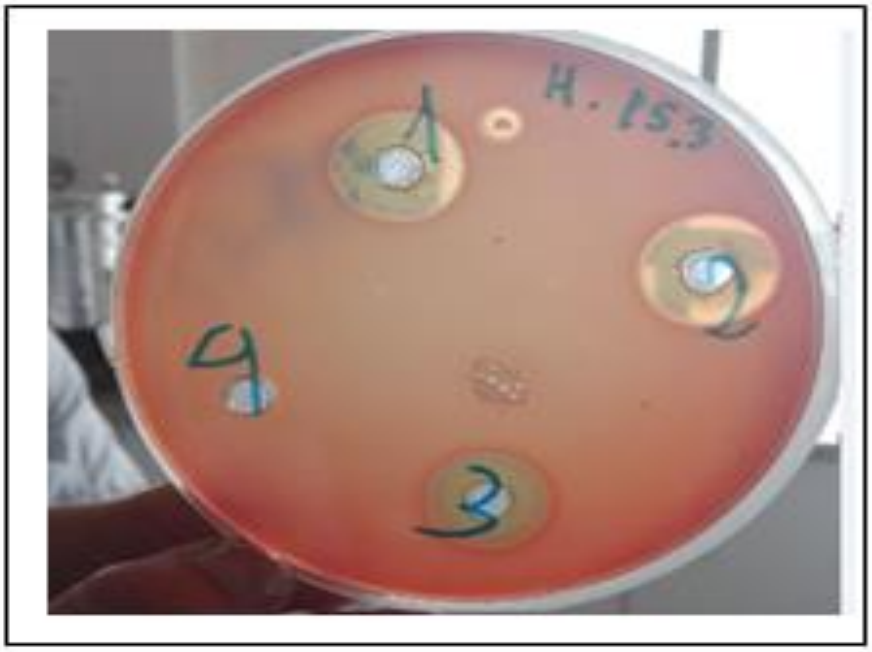
Nota: Realizado por la autora (2017). Nota: Realizado por la autora (2017).

Anexo 5 Halos de hemólisis generado en el extracto n-heptano muestra Wapaá fruto



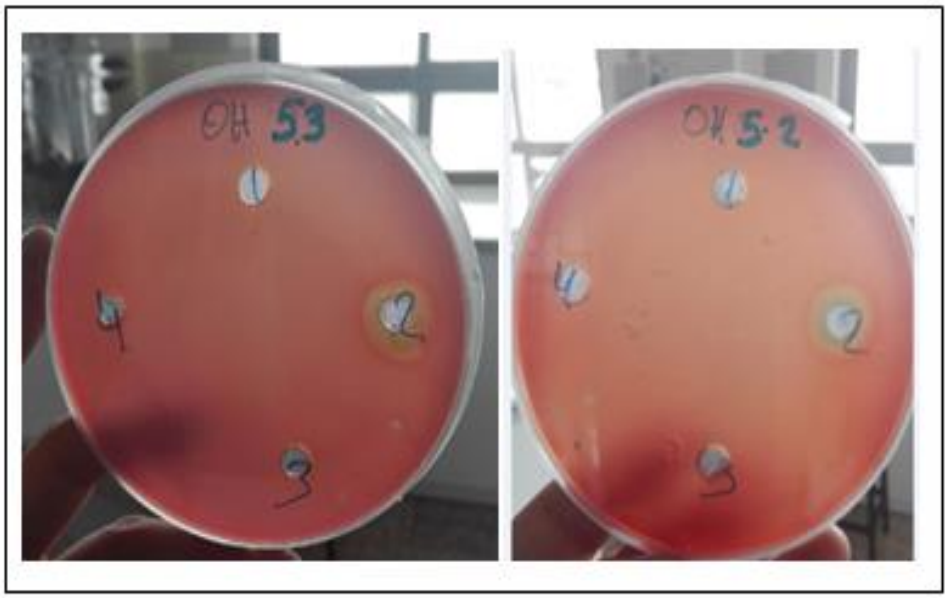
Nota: Realizado por la autora (2017). Nota: Realizado por la autora (2017).

Anexo 6 Halos de hemólisis generado en el extracto n-heptano muestra Kunapi



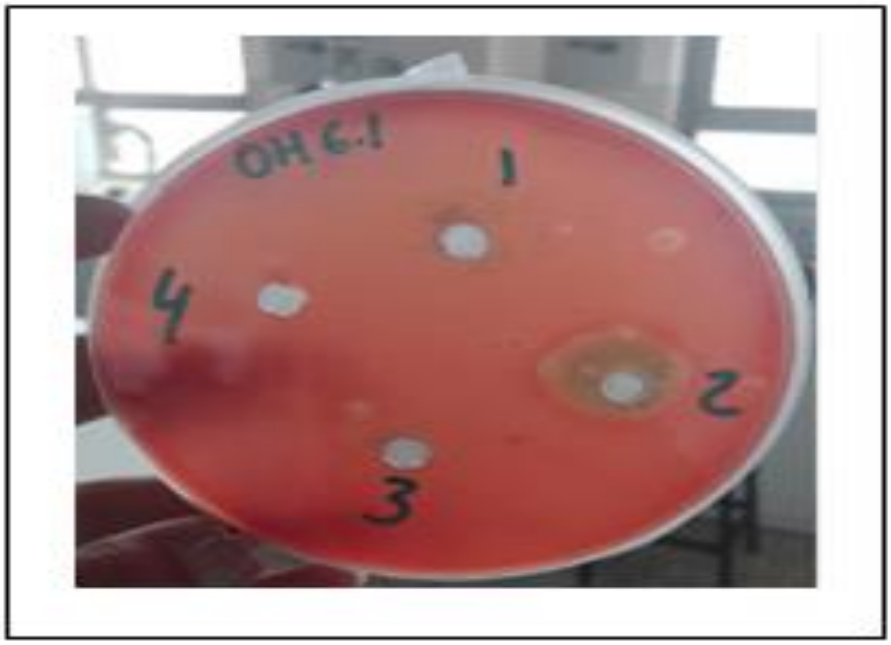
Nota: Realizado por la autora (2017).

Anexo 7 Halos de hemólisis generado en el extracto alcohólico Wapaá hojas



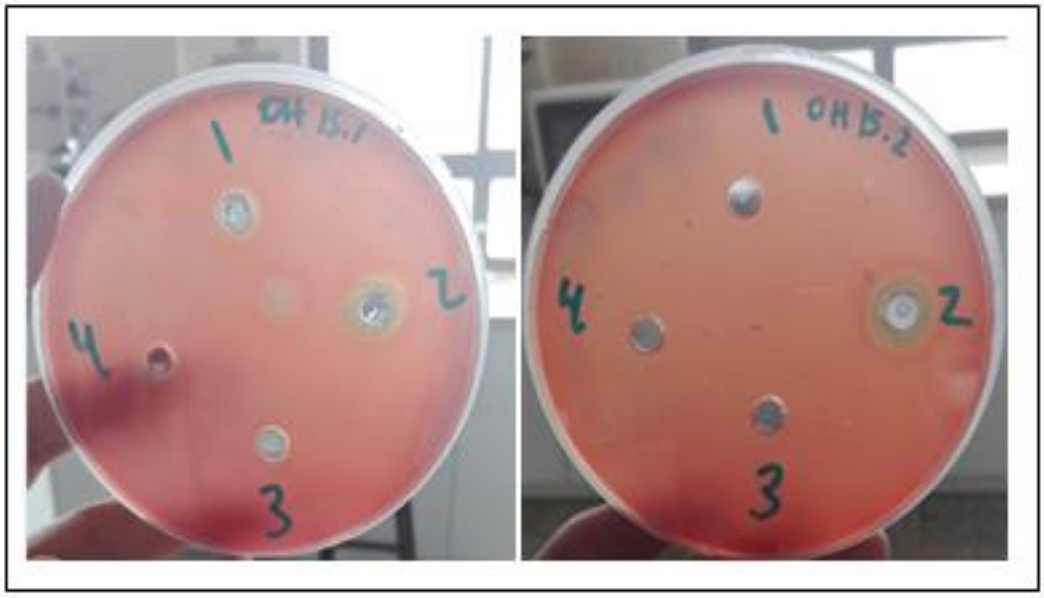
Nota: Realizado por la autora (2017).

Anexo 8 Halos de hemólisis generado en el extracto alcohólico Wapaá fruto



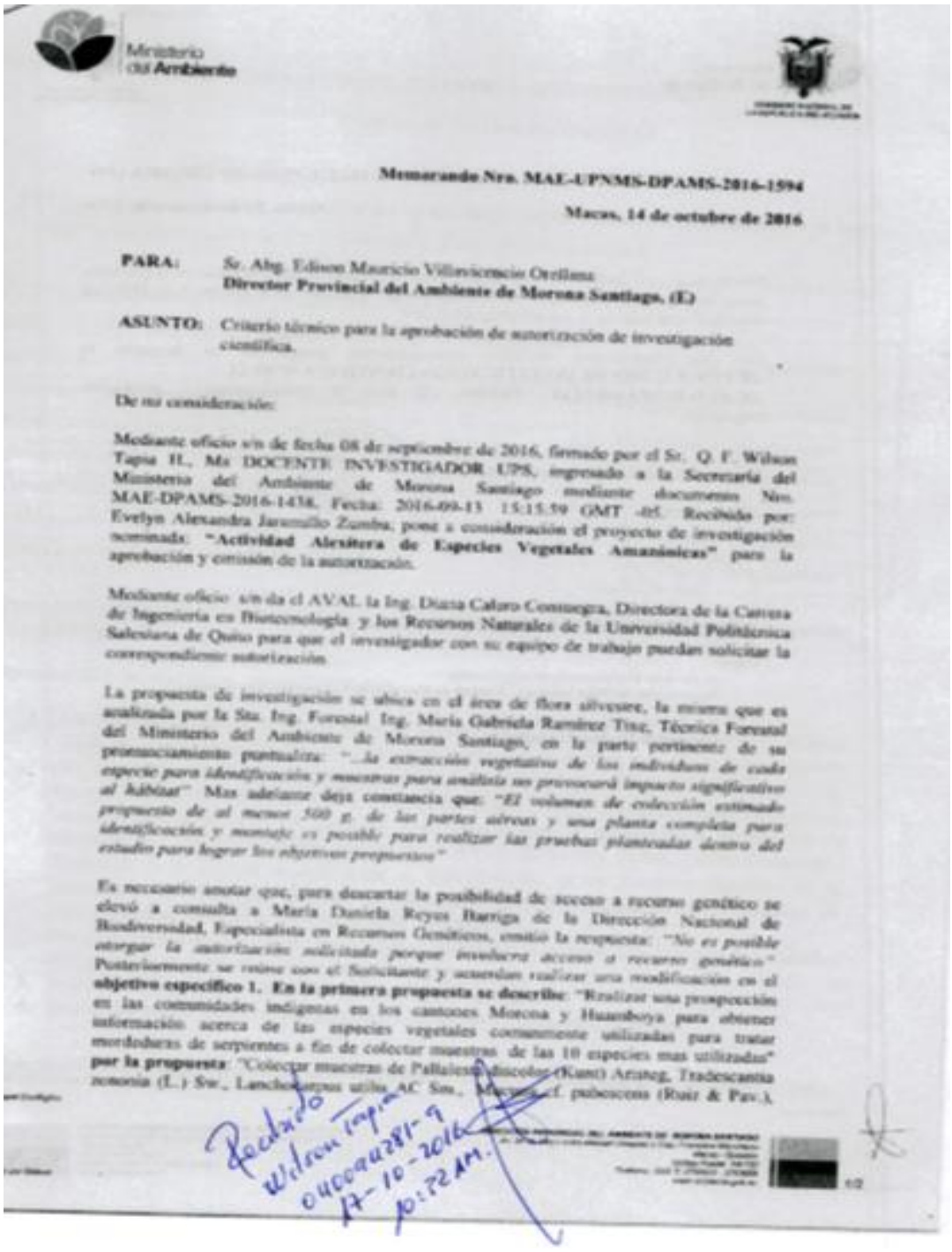
Nota: Realizado por la autora (2017).

Anexo 9 Halos de hemólisis generado en el extracto alcohólico Kunapi



Nota: Realizado por la autora (2017).

Anexo 10 Permiso de investigación



Ministerio del Ambiente

Memorando Nro. MAE-UPNMS-DPAMS-2016-1594

Macas, 14 de octubre de 2016

PARA: Sr. Abg. Edison Mauricio Villavicencio Orellana
Director Provincial del Ambiente de Morona Santiago, (E)

ASUNTO: Criterio técnico para la aprobación de autorización de investigación científica.

De mi consideración:

Mediante oficio s/n de fecha 08 de septiembre de 2016, firmado por el Sr. Q. F. Wilson Tapia H., Ms DOCENTE INVESTIGADOR UPS, ingresado a la Secretaría del Ministerio del Ambiente de Morona Santiago mediante documento Nro. MAE-DPAMS-2016-1438, Fecha: 2016-09-13 15:15:59 GMT -05. Recibido por: Evelyn Alexandra Jaramillo Zumba, pone a consideración el proyecto de investigación nominado: **"Actividad Alexitera de Especies Vegetales Amazónicas"** para la aprobación y emisión de la autorización.

Mediante oficio s/n da el AVAL la Ing. Diana Calero Consuegra, Directora de la Carrera de Ingeniería en Biotecnología y los Recursos Naturales de la Universidad Politécnica Salesiana de Quito para que el investigador con su equipo de trabajo puedan solicitar la correspondiente autorización.

La propuesta de investigación se ubica en el área de flora silvestre, la misma que es avalizada por la Sta. Ing. Forestal Ing. María Gabriela Ramírez Tinc, Técnica Forestal del Ministerio del Ambiente de Morona Santiago, en la parte pertinente de su pronunciamiento puntualiza: *"...la extracción vegetativa de los individuos de cada especie para identificación y muestras para análisis no provocará impacto significativo al hábitat"* Mas adelante deja constancia que: *"El volumen de colección estimado propuesto de al menos 500 g. de las partes aéreas y una planta completa para identificación y muestreo es posible para realizar las pruebas planteadas dentro del estudio para lograr los objetivos propuestos"*

Es necesario anotar que, para descartar la posibilidad de acceso a recurso genético se elevó a consulta a María Daniela Reyes Barriga de la Dirección Nacional de Biodiversidad, Especialista en Recursos Genéticos, emitió la respuesta: *"No es posible otorgar la autorización solicitada porque involucra acceso a recurso genético."* Posteriormente se reúne con el Solicitante y acuerdan realizar una modificación en el **objetivo específico 1. En la primera propuesta se describe**: "Realizar una prospección en las comunidades indígenas en los cantones Morona y Huamboya para obtener información acerca de las especies vegetales comunmente utilizadas para tratar mordeduras de serpientes a fin de colectar muestras de las 10 especies mas utilizadas" **por la propuesta**: "Colectar muestras de Palisota pilosicolon (Kunth) Arisng, Tradescantia zononia (L.) Sw., Lanchocarpus utilis AC Sm., Mikania cf. pubescens (Ruiz & Pav.),

Recibido
Wilson Tapia
0400942281-9
17-10-2016
10:32 AM.

1/2

Anexo 11. Determinación del rendimiento de los extractos acuoso, alcohólico y hepático

Tabla 22.
Rendimiento de los extracto Acuoso

MUESTRA	Peso de la muestra (g)	Peso balón vacío (g)	Peso del balón más extracto (g)	% Rendimiento
Wapaá fruto	22,0184	101,6034	104,4129	12,76
Wapaá hojas	20,9754	139,5156	139,7074	0,91
Kunapi completa	20,7552	140,1842	142,5627	11,46

Nota: Realizado por la autora (2017).

Tabla 23.
Rendimiento de los extracto N-heptano

MUESTRA	Peso de la muestra (g)	Peso balón vacío (G)	Peso del balón más extracto (g)	% Rendimiento
Wapaá fruto	25,0000	132,6259	132,7899	0,41
Wapaá hojas	25,0000	132,6829	133,5377	3,71
Kunapi completa	25,0250	132,6067	132,9741	2,14

Nota: Realizado por la autora (2017).

Tabla 24.
Rendimiento de los extracto Alcohólico

MUESTRA	Peso de la muestra (g)	Peso balón vacío (g)	Peso del balón más extracto (g)	% Rendimiento
Wapaá fruto	23,4609	64,4663	64,5679	0,43
Wapaá hojas	22,4427	124,9914	125,9177	4,13
Kunapi completa	24,6048	125,2145	125,7509	2,18

Nota: Realizado por la autora (2017).

Anexo 12. Determinación de cenizas

Tabla 25.
Cantidad de cenizas totales

Muestra Vegetal	Peso Crisol (g)	Peso Crisol Tarado (g)	Muestra vegetal (g)	Peso crisol con materia vegetal (g)	Peso crisol muestra incinerado (g)	Cenizas totales (%)
Wappá Fruto	22,89	22,87	2,06	24,93	22,96	**4,52**
Wapaá Hojas	23,1	23,1	2,06	25,15	23,3	**9,97**
Kunapi Completa	22,44	22,1	2,03	24,13	22,32	**10,68**

Nota: Realizado por la autora (2017).

Tabla 26

Determinación de porcentaje de cenizas solubles en agua.

Muestra vegetal	Peso crisol (g)	Peso crisol tarado (g)	Peso crisol con materia vegetal (g)	P. cenizas filtradras (g)	Incinerado final (g)	Peso crisol muestra incinerado (g)	Porcentaje c. solubles (%)
Wapaa Fruto	22,89	22,87	24,93	22,97	22,87	22,96	4,45
Wapaa Hojas	23,10	23,10	25,15	23,25	23,25	23,30	2,40
Kunapi Completa	22,44	22,10	24,13	22,44	22,19	22,32	6,23

Nota: Realizado por la autora (2017).

Tabla 27.

Determinación de porcentaje de cenizas insolubles en ácido clorhídrico.

Muestra vegetal	Peso crisol (g)	Peso crisol tarado (g)	Peso crisol con materia vegetal (g)	Peso cenizas filtradras (g)	Incinerado final (g)	Peso crisol muestra incinerado (g)	Porcentaje cenizas solubles (%)
Wapaa Fruto	21,44	20,35	41,79	21,60	21,45	21,45	0,72
Wapaa Hojas	20,53	13,08	33,61	20,63	20,43	20,43	1,47
Kunapi Completa	21,71	20,15	41,86	21,90	21,74	21,74	0,80

Nota: Realizado por la autora (2017).

Anexo 13. Curva de calibración de Polifenoles

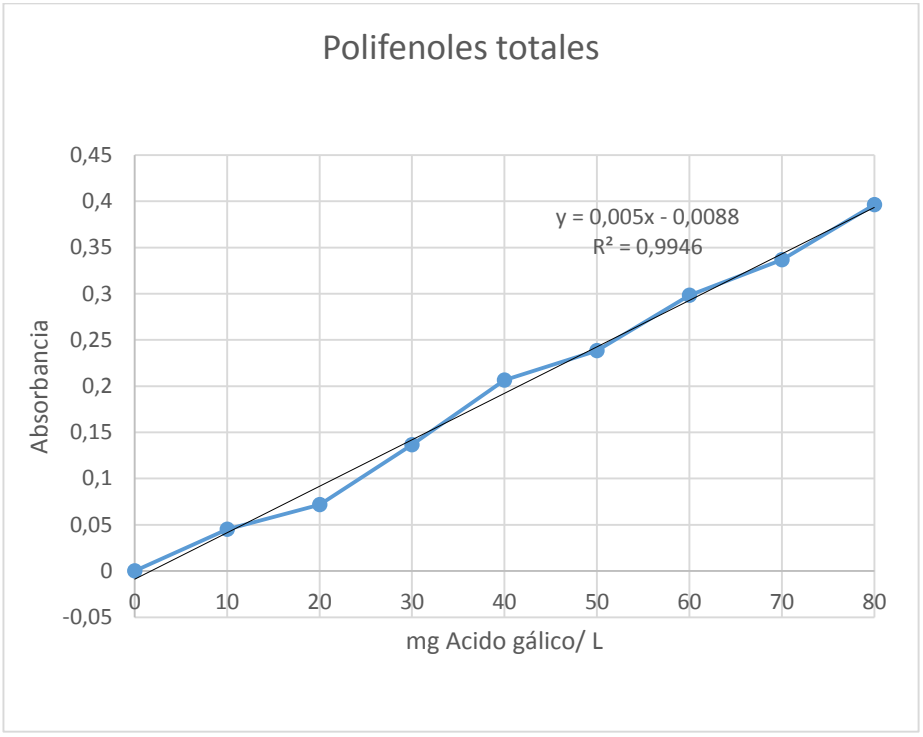


Figura 13. Curva de calibración de estándares para fenoles
Nota: Realizado por la autora (2017).

Anexo 14. Curva de calibración de flavonoides

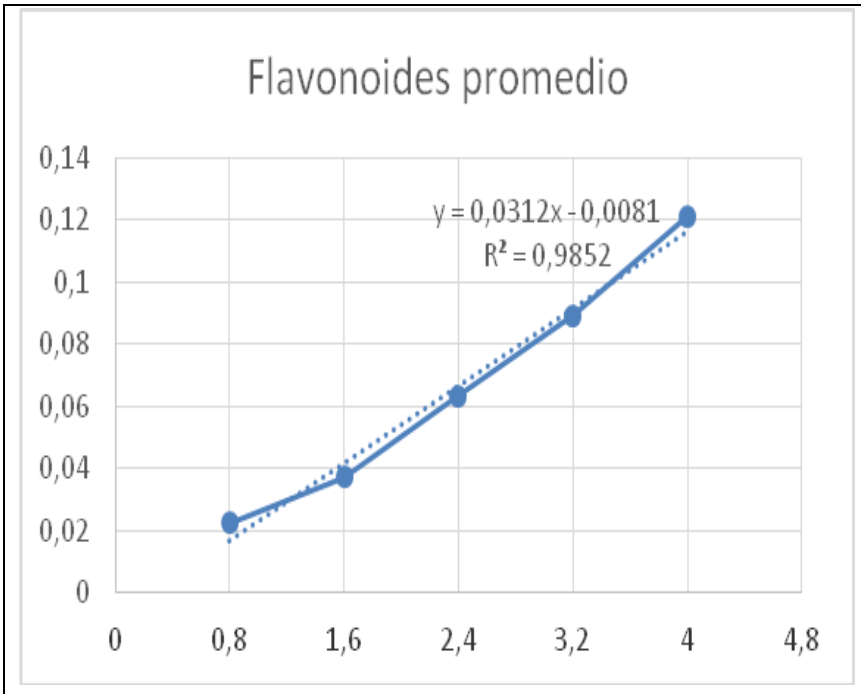


Figura 134. Curva de calibración de estándares para flavonoides
Nota: Realizado por la autora (2017).

Anexo 15. Identificación Taxonómica de Kunapi completa y de Wapaá

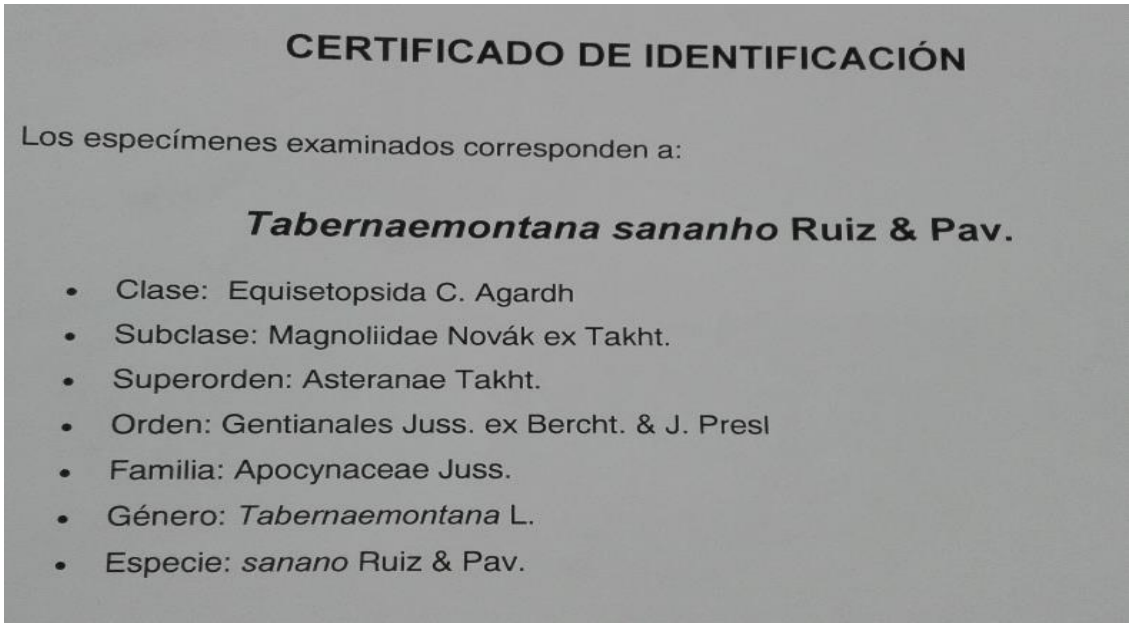


Figura 15. Identificación taxonómica de Kunapi completa
Nota: Herbario Q.C.A. de la Pontificia Universidad Católica (2016).

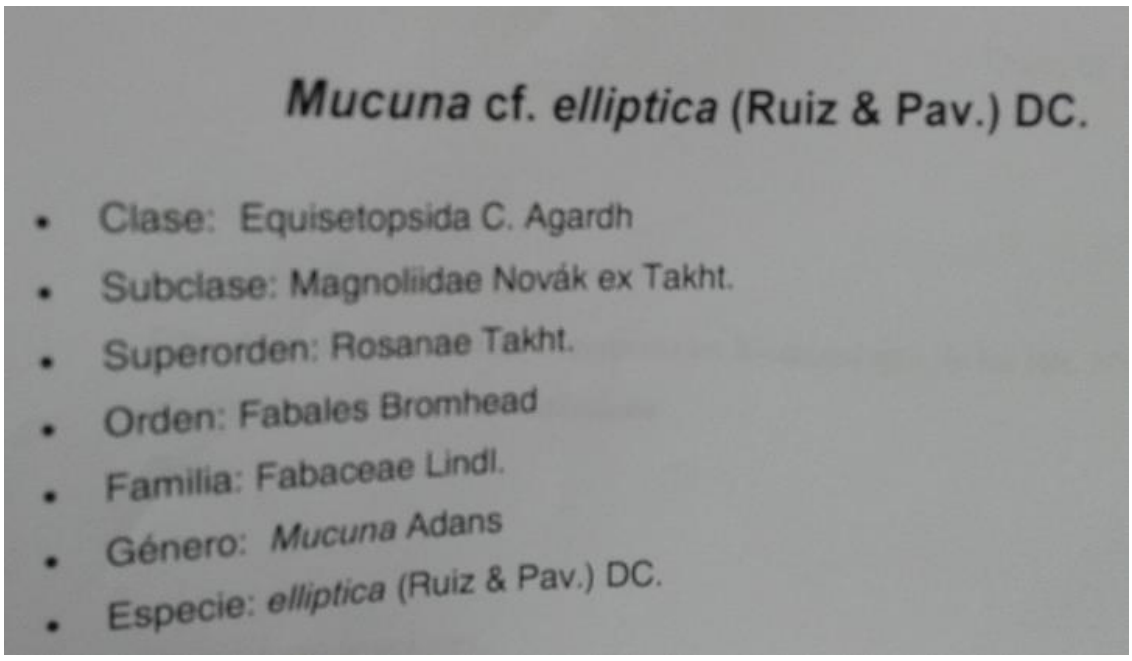


Figura 17. Identificación taxonómica de Wapaá
Nota: Herbario Q.C.A. de la Pontificia Universidad Católica (2016).