

**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA  
SEDE QUITO**

**CARRERA:  
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES**

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

**TEMA:  
INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD HEMOLÍTICA DEL VENENO DE  
*Bothrops atrox* POR LOS EXTRACTOS DE *Lonchocarpus utilis* A.C. Sm Y  
*Adenostemma lavenia* L. (Kuntze).**

**AUTOR:  
MICHAEL XAVIER REYES CORDOVA**

**TUTOR:  
WILSON FABIÁN TAPIA HERNÁNDEZ**

**Quito, marzo del 2017**

### Cesión de derechos de autor

Yo Michael Xavier Reyes Córdova, con documento de identificación N° 1721592804, manifiesto mi voluntad y cedo a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que soy autor del trabajo de titulación intitulado: INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD HEMOLÍTICA DEL VENENO DE *Bothrops atrox* POR LOS EXTRACTOS DE *Lonchocarpus utilis* A.C. Sm Y *Adenostemma lavenia* L. (Kuntze), mismo que ha sido desarrollado para optar por el título de Ingeniero 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 autor 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: Michael Xavier Reyes Córdova

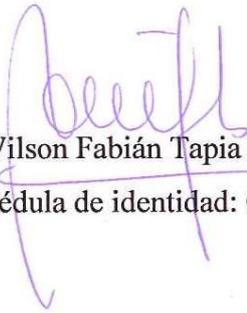
Cédula: 1721592804

Fecha: Marzo del 2017

### **Declaratoria de coautoría del docente tutor/a**

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 *Lonchocarpus utilis* A.C. Sm Y *Adenostemma lavenia* L. (Kuntze) realizado por Michael Xavier Reyes Córdova, obteniendo un producto que cumple con todos los requisitos estipulados por la Universidad Politécnica Salesiana para ser considerados como trabajo final de titulación.

Quito, marzo del 2017



Wilson Fabián Tapia Hernández  
Cédula de identidad: 0400942819

## **Agradecimientos**

Agradezco infinitamente a mis padres y hermanos por su apoyo incondicional en el camino hacia esta meta, por su cariño y consejos que me han ayudado a lo largo de toda mi vida.

A mi tutor y amigo Wilson Tapia por brindarme la oportunidad de formar parte de esta investigación, por el apoyo constante durante este proceso y compartirme sus conocimientos los cuales han sido de gran ayuda para mi formación académica.

Al Químico Cristian Larenas por la ayuda brindada en el área estadística; los asistentes del laboratorio por su colaboración durante la ejecución de este trabajo.

A todos, infinitas gracias.

## Índice

Introducción .....	1
Capítulo 1: Fundamento Teórico .....	4
1.1. Plantas Alexíteras .....	4
1.1.1. Descripción <i>Adenostemma lavenia</i> .....	5
1.1.2. Descripción <i>Lonchocarpus utilis</i> .....	7
1.2. Serpientes en Ecuador .....	9
1.2.1. Género <i>Bothrops</i> .....	9
1.2.1.1. <i>Bothrops atrox</i> .....	10
1.2.1.2. Distribución .....	11
1.2.1.3. Veneno de <i>Bothrops atrox</i> .....	11
1.3. Accidente Bothrópico .....	12
1.3.1. Manifestaciones clínicas locales .....	12
1.3.2. Manifestaciones clínicas sistémicas .....	13
1.3.3. Grados Accidente Bothrópico .....	14
1.3.4. Tratamiento para el Accidente Bothrópico .....	14
1.4. Efecto anti hemolítico .....	15
Capítulo 2: Materiales y Métodos .....	16
2.1. Diseño .....	16
2.2. Población y muestra .....	16
2.2.1. Material vegetal .....	16
2.2.2. Sitio de recolección .....	17
2.3. Extractos .....	17
2.3.1. Extracto heptánico .....	18
2.3.2. Extracto alcohólico .....	18

2.3.3.	Extracto acuoso .....	18
2.4.	Determinación de cenizas.....	18
2.4.1.	Determinación de cenizas totales .....	18
2.4.2.	Cuantificación de cenizas solubles en agua .....	19
2.4.3.	Cuantificación de cenizas insolubles en ácido clorhídrico .....	20
2.5.	Cuantificación del porcentaje de humedad de las muestras vegetales .....	21
2.6.	Análisis de Fenoles totales .....	21
2.6.1.	Curva de Calibración de Fenoles totales .....	21
2.6.2.	Cuantificación de Fenoles totales.....	22
2.7.	Análisis de flavonoides .....	22
2.7.1.	Curva de Calibración.....	23
2.7.2.	Cuantificación de flavonoides.....	23
2.8.	Estudio Cualitativo .....	24
2.8.1.	Técnica de tamizaje fitoquímico .....	24
2.8.1.1.	Extracto N-heptano .....	24
2.8.1.2.	Extracto alcohólico .....	27
2.8.1.3.	Extracto acuoso.....	30
2.9.	Actividad anti hemolítica .....	32
2.9.1.	Obtención de eritrocitos lavados:.....	32
2.9.2.	Elaboración Agar- Sangre fosfatidilcolina.....	32
2.9.3.	Diluciones del Veneno .....	33
2.9.4.	Dosis mínima hemolítica.....	33
2.10.	Actividad anti hemolítica.....	34
Capítulo 3: Resultados y discusión .....		36
3.1.	Rendimiento del extracto.....	36

3.2.	Determinación de cenizas.....	37
3.2.1.	Cenizas totales.....	37
3.2.2.	Cenizas solubles en agua.....	37
3.2.3.	Cenizas insolubles en ácido clorhídrico.....	37
3.3.	Determinación de humedad.....	38
3.4.	Determinación de Fenoles totales.....	38
3.5.	Determinación de Flavonoides.....	39
3.6.	Tamizaje Fitoquímico.....	39
3.7.	Actividad anti hemolítica.....	43
3.7.1.	Dosis mínima hemolítica.....	43
3.7.2.	Ensayo de Bartlett (especies).....	45
3.7.3.	Anova (Excel) Especies.....	45
3.7.4.	Anova relación entre especies.....	45
3.7.5.	Ensayo de Bartlett tratamientos.....	46
3.7.6.	Anova (Excel) Tratamientos.....	46
3.7.7.	Anova Relación extracto-veneno.....	47
3.7.8.	Ensayo de Bartlett Extractos.....	47
3.7.9.	Ensayo de Kruskal-Wallis.....	48
	Discusión.....	49
	Conclusiones.....	51
	Referencias.....	52
	Anexos.....	62

## Índice de tablas

Tabla 1. Taxonomía de <i>Adenostemma lavenia</i> .....	5
Tabla 2. Taxonomía de <i>Lonchocarpus utilis</i> .....	7
Tabla 3. Peso del material vegetal en gramos .....	17
Tabla 4. Rendimiento del extracto N-heptano .....	36
Tabla 5. Rendimiento del extracto alcohólico.....	36
Tabla 6. Rendimiento del extracto acuoso .....	36
Tabla 7. Determinación de humedad .....	38
Tabla 8. Determinación de Polifenoles totales.....	38
Tabla 9. Flavonoides .....	39
Tabla 10. Tamizaje fitoquímico de <i>Lonchocarpus utilis</i> (Barbasco raíz).....	39
Tabla 11. Tamizaje fitoquímico de <i>Lonchocarpus utilis</i> (Barbasco hojas) .....	40
Tabla 12. Tamizaje fitoquímico <i>Adenostemma lavenia</i> (Araratz completa).....	41
Tabla 13. Halo de hemólisis de los extractos, en 3 concentraciones .....	44
Tabla 14. Ensayo de Bartlett especies.....	45
Tabla 15. Test de Anova .....	45
Tabla 16. Test de Anova Relación entre especies.....	45
Tabla 17. Ensayo de Bartlett .....	46
Tabla 18. Test de Anova Relación entre tratamientos .....	46
Tabla 19. Test de Anova Relación extracto-veneno .....	47
Tabla 20. Ensayo de Bartlett .....	47
Tabla 21. Ensayo de Kruskal-Wallis.....	48

## Índice de figuras

Figura 1. <i>Adenostemma lavenia</i> .....	6
Figura 2. <i>Lonchocarpus utilis</i> .....	9
Figura 3. Actividad anti hemolítica.....	34
Figura 4. Concentraciones de la mezcla veneno extracto .....	35
Figura 5. Determinación dosis mínima hemolítica .....	43

## Índice de fórmulas

Fórmula 1. Cenizas totales .....	19
Fórmula 2. Cenizas solubles en agua .....	20
Fórmula 3. Cenizas insolubles en ácido clorhídrico .....	21
Fórmula 4. Cuantificación de fenoles totales .....	22
Fórmula 5. Cuantificación de flavonoides .....	23

## Índice de anexos

Anexo 1. Permisos para recolección de plantas .....	62
Anexo 2. Identificación de plantas escogidas.....	72
Anexo 3. Rendimiento de Extractos.....	74
Anexo 4. Determinación de cenizas.....	75
Anexo 5. Curva de calibración de Polifenoles totales.....	77
Anexo 6. Curva de calibración de Fenoles.....	78
Anexo 7. Ilustraciones siembra extracto acuoso .....	79
Anexo 8. Ilustraciones siembra extracto alcohólico .....	80
Anexo 9. Ilustraciones siembra extracto alcohólico .....	81

## Resumen

Ecuador país pluricultural y multiétnico, rico en especies de flora que permite un amplio estudio etnobotánico y, gracias al conocimiento ancestral de los habitantes de la amazonia, que han utilizado varias especies de plantas como antídotos para contrarrestar los efectos nocivos del veneno de *Bothrops atrox*, se ha realizado la presente investigación para comprobar su capacidad para neutralizarlo.

Se han elaborado extractos heptánicos, alcohólicos y acuosos de las plantas *Lonchocarpus utilis* A.C. Sm y *Adenostemma lavenia* L. (Kuntze). Las muestras vegetales fueron colectadas en la provincia de Morona Santiago, cantón Huamboya, en la parroquia Chiguaza y en el cantón Morona, parroquia Sevilla Don Bosco, siendo transportadas a los laboratorios CIVABI para la realización de ensayos para la determinación de la actividad inhibitoria de hemólisis causada por el veneno de la serpiente *Bothrops atrox*.

Se realizaron pruebas cuantitativas y cualitativas sobre la composición química de estas especies encontrándose flavonoides que se relacionan directamente con la capacidad inhibitoria de los extractos sobre el veneno de *Bothrops atrox*; se determinó la dosis mínima hemolítica (DMIH=15,53 µg) para luego comprobar la capacidad anti hemolítica de los extractos sobre el veneno de las dos especies vegetales, siendo la especie con mayor actividad *Adenostemma lavenia* L. (Kuntze).

**Palabras claves:** *Bothrops atrox*, hemolítica, extractos, actividad inhibitoria

## Abstract

Ecuador multicultural and multiethnic country, which is rich in flora species permits an extensive ethno-botanic study and thanks to the ancestral knowledge of its inhabitants from the Amazon Region who have used different species of plants like antidotes to counter the harmful effects of the *Bothrops atrox* venom, this present research was made to prove its capacity to neutralize it.

Heptanic, alcoholic and watery extracts have been made of *Lonchocarpus utilis* A.C Sm and *Adenostemma lavenia* L (Kuntze) plants. The samples were collected in Morona Santiago Province, Huamboya Town, in Chiguaza Parish and in Morona Canton, Sevilla Don Bosco Parish, and then they were transported to CIVABI laboratories in order to do tests and determine its inhibitory hemolysis activity that is caused by the venom of the snake *Bothrops atrox*.

Quantitative and qualitative tests were done regarding chemical composition of these species and flavonoids were found that were related to the inhibitory capacity of the extracts on *Bothrops atrox* venom. It was determined a minimum hemolytic dose (DMIH=15.53 µg) to prove an anti-hemolytic capacity of the extracts on the venom of two vegetal species, *Adenostemma lavenia* L. (Kuntze) specie was the one with the highest activity.

**KEY WORDS:** *Bothrops atrox*, hemolytic, extracts, inhibitory activity.

## Introducción

El Ecuador debido a su gran variedad tanto en flora como fauna se encuentra entre los países más diversos a nivel mundial, por su ubicación en el cinturón tropical tiene abundante cantidad de energía solar, siendo esta región, una de las más productivas del mundo en recursos naturales (Burneo, 2014).

Se estima que un 25% de plantas que se encuentran en zonas tropicales son utilizadas por las comunidades indígenas para curar sus dolencias, debido a su rico conocimiento en medicina natural ancestral; un gran número de estas plantas se utiliza para contrarrestar la mordedura de serpiente (Carbonell & Jativa, 2002).

Existe en el Ecuador una gran variedad de serpientes venenosas, tal como las del genero *Bothrops*, en especial, en la región amazónica, en donde *Bothrops atrox* ocasiona el mayor número de accidentes ofídicos (Ministerio de salud pública, 2008).

El suero antiofídico polivalente es el tratamiento de elección ante un accidente bothrópico, sin embargo, estos accidentes ocurren en zonas rurales que se encuentran apartadas de un centro de salud u hospital (Instituto Nacional de Salud Colombia, 2013).

Las plantas *Lonchocarpus utilis* A.C Sm y *Adenostemma lavenia* L. (Kuntze) se sabe que tienen propiedades alexíteras ya que contienen metabolitos secundarios que contrarrestan o mitigan los efectos del veneno dejado por la serpiente (Rondon, 2002).

Este estudio tiene como finalidad evidenciar si los extractos de las plantas mencionadas presentan actividad inhibitoria del efecto hemolítico del veneno de *Bothrops atrox* sobre la sangre humana mediante la realización de pruebas *in vitro*.

La información recolectada con habitantes de la comunidad de Chiguaza muestran la dificultad de conseguir el suero antiofídico y las grandes distancias para recibir atención médica, es necesario buscar especies vegetales pertenecientes al lugar que tengan capacidad de contrarrestar los efectos nocivos del veneno, Por tal razón la presente investigación es relevante.

Para la cual se planteó como objetivo general: Determinar la inhibición de la actividad hemolítica del veneno de *Bothrops atrox* por los extractos de *Lonchocarpus utilis* A.C. Sm y *Adenostemma lavenia* L. (Kuntze) y como objetivos específicos: Cuantificar polifenoles totales y flavonoides mediante espectrofotometría de absorción de luz visible en extractos totales acuosos, alcohólicos y heptánicos de *Lonchocarpus utilis* A.C. Sm y *Adenostemma lavenia* L. (Kuntze) obtenidos por maceración. Determinar metabolitos secundarios de las plantas mediante tamizaje fitoquímico en los extractos acuosos, alcohólicos y heptánicos de *Lonchocarpus utilis* A.C. Sm y *Adenostemma lavenia* L. (Kuntze) obtenidos por maceración. Evaluar la capacidad neutralizante de los extractos acuoso, alcohólico y heptánico de *Lonchocarpus utilis* A.C. Sm y *Adenostemma lavenia* L. (Kuntze) sobre el veneno de *Bothrops atrox* evidenciada por la inhibición de halo de hemólisis usando la técnica de agar sangre fosfatidilcolina.

Para el análisis estadístico se planteó como hipótesis nula: Ninguna concentración de extracto de ninguna especie vegetal reduce el halo de hemólisis generado por la concentración mínima hemolítica (MIDH) del veneno de *B. atrox*; y la hipótesis alternativa es: Al menos una concentración de extracto y una especie vegetal reduce el halo de hemólisis generado por la concentración mínima hemolítica (MIDH) del veneno de *B. atrox*.

## Capítulo 1: Fundamento Teórico

### 1.1. Plantas Alexíteras

Los hombres primitivos tuvieron que enfrentarse a varias amenazas, entre ellas, las flechas envenenadas por las tribus rivales, contra lo cual usaban como antídoto a plantas del género *Dracontium* existente en toda América tropical (Bergillos & Rivas, 2013).

Una amenaza que persiste hasta nuestros días, es la asociada a mordeduras de serpiente, principalmente en zonas rurales de los países que se encuentran en desarrollo, en donde el único recurso terapéutico es el natural, específicamente las plantas con capacidad de contrarrestar su veneno y que hoy en día se conocen como plantas alexíteras (Quesada & Quesada, 2012).

En las últimas décadas se ha generalizado el estudio de compuestos orgánicos de origen vegetal para generar un alexifármaco, partiendo de las plantas que son normalmente utilizadas en varias regiones del planeta, las cuales sufren un proceso de maceración o cocción para la ingesta de la persona afectada o a su vez, para lavar la superficie de la piel donde se ha producido una mordedura (Lopez & Perez, 2009).

En la actualidad se conoce que alrededor de 800 plantas tienen actividad alexítera, pero muy pocas han sido estudiadas a profundidad, el trabajo más extenso en este tipo de plantas lo han realizado los investigadores Mashkar y Caius quienes comprobaron dicha actividad en 314 plantas de la India (Reyes & Jimenez, 2002).

Se han aislado varios metabolitos secundarios, los cuales son los que actúan contrarrestando los efectos del veneno de serpiente y aliviando los síntomas que este provoca, los compuestos aislados son en su mayoría triterpenoides como el sitosterol, isoflavonoides, taninos y alcaloides como ácido aristolóquico (Reyes & Jimenez, 2002).

Tabla 1.  
Taxonomía de *Adenostemma lavenia*

Clase	Equiselopsida C. Agardh
Subclase	Magnoliidae Novak ex Takht
Superorden	Asteranae Takht
Orden	Asterales Link
Familia	Asteraceae Bercht. & J. Presl
Género	<i>Adenostemma</i> J.R. Forst. & G. Forst
Especie	<i>lavenia</i> L. (Kuntze)

Nota: Realizado por el autor (2016)  
Fuente: Herbario QCA PUCE, 2016

### 1.1.1. Descripción *Adenostemma lavenia*

Hierbas perennes, 0.5 m de alto o más altas; tallos escasamente puberulentos a glabros. Hojas opuestas, deltoide-ovadas, 4–5 cm de largo y 3.5–4.5 cm de ancho, márgenes irregularmente aserrados, escasamente pubescentes a glabras, 3-nervias desde la base; pecíolos 2–3.5 mm de largo. Capitulescencias abiertas, cimoso-paniculadas, 20–50 capítulos, los últimos pedúnculos 6–20 mm de largo; capítulos discoides; involucros hemisféricos, ca 4 mm de largo y 5–10 mm de ancho; filarias 24–30, en 2–3 series, linear-lanceoladas, eximbricadas, escasamente puberulentas, ciliadas; receptáculos desnudos; flósculos numerosos, perfectos, las corolas 3–3.5 mm de largo, blancas, el tubo

casi igual al limbo, el limbo densamente pubescente, 5-lobado; estilo glabro. Aquenios claviformes, ca 3 mm de largo, muricados; vilano de 3 apéndices con punta glandular (claviformes), 0.8–1 mm de largo (Turner, 2016).

El género *Adenostemma* tiene 20 especies, que se encuentran ampliamente distribuidas gracias a que tiene un mecanismo de dispersión, el cual es altamente evolucionado, las aves son muy útiles al momento de dispersar los glomérulos subsféricos que se forman cuando los aquenios están en su madurez (Blair & Madrigal, 2005).

Usos: En Ecuador se usa para tratar abscesos, heridas, enfermedades cutáneas y principalmente su uso tradicional en la Amazonia y la Provincia de Pichincha es inhibir los efectos que ocasiona el veneno de serpiente (MUNDOBIODIVERSO, 2009).

*Adenostemma lavenia*



Figura 1. *Adenostemma lavenia*  
Fuente: (Cumming, 2010)

Tabla 2.  
Taxonomía de *Lonchocarpus utilis*

Nombre común	Barbasco
Clase	Equisetopsida C. Agardh
Subclase	Magnoliidae Novak ex Takht
Superorden	Rosanae Takht
Orden	Fabales Bromhead
Familia	Fabaceae Lindl
Género	<i>Lonchocarpus</i> Lindl
Especie	<i>utilis</i> A. C. Sm

Nota: Realizado por el autor (2016)  
Fuente: Herbario QCA PUCE, 2016

### 1.1.2. Descripción *Lonchocarpus utilis*

Los habitantes amazónicos utilizan la raíz de esta planta en la pesca, ya que tiene como principio químico a la rotenona, además de alcaloides y saponinas que son tóxicas para los peces, por lo cual se acostumbra introducirla en los ríos, a la espera de los peces muertos por envenenamiento (Patiño, 2014).

Las raíces de esta planta solo se las puede utilizar en la pesca a partir de los 3 o 4 años de edad ya que en este estado las raíces contienen los compuestos tóxicos que causan adormecimiento o muerte (Rondon, 2002).

Por su toxicidad se lo utiliza en la amazonia para la pesca, lo malo de esto es que mata a toda clase de pescados incluyendo a los crustáceos y animales que no van a servir de alimento (Rondon, 2002).

Barbasco es un término que se designa a una planta venenosa y según la clasificación de (Acosta, 1992), el Barbasco tiene propiedades toxicas y

alucinógenas, es un arbusto erecto, que con la edad crece a manera de bejuco, su fruto es una baya, con flores hermafroditas e inflorescencias terminales (Fernández, 2013).

Se propaga únicamente por estacas de 30 metros de largo con una edad superior a los 3 años y se la debe asociar con otros cultivos y mantener una distancia entre planta y planta de 1.5 metros en zonas tropicales y subtropicales de 1000 a 1350 m.s.n.m (Ecured, 2017).

Usos: Controla plagas de insectos, el más frecuente es el control de larvas de mosquito, y para controlar trípodos se tritura su raíz, para el control de la mosca blanca se mezcla el polvo con aceite. Aunque se debe de tener precaución al momento de utilizar esta planta debido a su toxicidad (Mariños & Julia, 2013).

En ganadería era utilizado en control de garrapatas y moscas, aunque en la actualidad ha sido reemplazado por insecticidas orgánicos sintéticos (PARASITIPEDIA.net, 2013).

Esta planta alcanza una altura de hasta 6 metros, necesita de campos abiertos, tiene como característica ser trepadora y así alcanzar alturas de 18 metros o más (Basurto, 2001).



Figura 2. *Lonchocarpus utilis*  
Fuente: el autor (2016)

## 1.2. Serpientes en Ecuador

Las serpientes son vertebrados con piel escamosa ya que tienen queratina, presentan respiración pulmonar y tienen como característica mudar varias veces su piel por año, esto lo hacen mientras crecen (Valls, 2016).

En Ecuador hay 3 especies de reptiles cada 2000 km<sup>2</sup>, lo cual es el país con más diversidad de reptiles en el planeta y cuenta con un registro de 453 especies de las cuales 223 son culebras (Reptilia Web, 2014).

### 1.2.1. Género Bothrops

Pertenecen al orden Squamata la mayoría de especímenes de este género tienen un veneno letal y mixto que actúa rápidamente en sus presas, tiene una reproducción ovovivípara y pueden tener hasta 12 crías, las cuales desde que nacen producen un veneno mortal y en cuanto a su alimentación son animales que aprovechan su fuerza para retener a su presa e inocular su veneno en espera de su muerte para ahí tragársela por completo (Ecured, 2017).

Los especímenes de este género al estar enojados golpean la cola con movimientos rápidos provocando un ruido muy fuerte en la punta, tienen una cabeza triangular, presentan foseta loreal, tienen cavidades termo-receptoras las cuales están ubicadas por debajo de los ojos, tienen ojos con una pupila elíptica, colmillos largos de hasta 3 cm y posee en su mandíbula una fosa amplia en sentido longitudinal y transversal (Nakasone & Ivancovich, 2002).

#### **1.2.1.1. *Bothrops atrox***

En Ecuador viven específicamente en la amazonia y se la conoce como la serpiente equis (Reptilia Web, 2014).

Tiene un cuerpo alargado y esbelto, en su cabeza presenta escamas, los machos llegan a medir 1,25 metros de largo, pero las serpientes hembras superan su longitud alcanzando 1,55 metros, el tamaño de su cola es corta e independiente del sexo y como todas las especies de su género tiene una foseta termo receptora (Pérez, 2013).

Presenta una coloración brillante en el dorso de tono café o negra con manchas que son alternas y un vientre pardo claro en las hembras y en los machos una tonalidad café oscuro con manchas amarillas, los adultos en su cola tienen una tonalidad café en bandas o en grandes manchas, en cambio las serpientes jóvenes tienen el extremo distal de color amarillo y se diferencia de otras especies por su peculiar iris de color café (serpientesdevenezuela.net, 2012).

Esta serpiente puede buscar su alimento en la noche como en el día y está en una búsqueda constante, gracias a su color puede camuflarse fácilmente en la

vegetación y arboles lo cual le facilita atrapar a su presa, se alimenta especialmente de animales pequeños como roedores ya que su veneno es letal en estos (Enríquez, 1999).

Al momento de defenderse ante una amenaza no dudan en atacar rápido y tomar una posición de ataque moviendo fuerte y constantemente su cola para así cambiar de dirección rápido produciendo un sonido parecido a la de una cascabel, esta misma posición y movimiento la realiza en tiempo de copular demostrando una dominancia hacia el resto de serpientes (TUPIZA , 2015).

#### **1.2.1.2. Distribución**

Habitan tanto en bosques primarios como secundarios claros, en senderos y pantanos, y en Ecuador habitan específicamente en todas las provincias de la región amazónica debido a sus condiciones climáticas y topográficas, por lo cual hace que esta especie sea una de las más abundantes en esta región del país (Reptilia Web, 2014).

En el Ecuador se reportaron 1759 casos de accidente ofídico en el año del 2013, generalmente en altitudes inferiores a los 2500 m.s.n.m, esto quiere decir que por cada 100.000 habitantes 13.21 de ellos son víctimas de la mordedura de serpiente, y la mayoría de estos accidentes bothrópico en la región amazónica es producida por la serpiente *Bothrops atrox* (Córdova & Santos, 2014).

#### **1.2.1.3. Veneno de *Bothrops atrox***

El veneno de la serpiente equis es muy peligrosa ya que es hemotóxico, provocando dolores e inflamaciones a nivel local de la mordedura en el mejor

de los casos, pero si es un accidente ofídico grave se dan manifestaciones clínicas locales y sistémicas que puede reducir los tiempos de coagulación, insuficiencia renal y hasta la muerte del individuo si no recibe atención médica inmediata (Murillo & Prada, 2009)

Las principales propiedades que tiene el veneno de la familia Viperidae a la cual pertenece la especie estudiada es un alto contenido enzimático que le da característica de ser tóxico, causa el envenenamiento y daño celular (Yarlequé, Ortiz, Morante, & Yarlequé, 2012).

La cantidad de veneno que se puede extraer varia totalmente si esta está en cautiverio o no, las primeras por el estrés causado de vivir en un territorio delimitado al momento del ordeño van a ser menor que el veneno extraído de una serpiente libre y esta cantidad difiere de entre 0.2 mL a 3 mL, teniendo en cuenta que la dosis mortal en humanos es de 62 mg (Giogina, 2011).

### **1.3. Accidente Bothrópico**

Este tipo de serpientes venenosas al morder inocular veneno, produciendo diversas afecciones fisiopatológicas o incluso la muerte, los efectos varían dependiendo de la especie, la edad de la serpiente y del individuo envenenado, ya que este accidente se da periódicamente por lo que tiene importancia en la salud pública (Walteros, 2014).

#### **1.3.1. Manifestaciones clínicas locales**

Un dolor intenso al momento del accidente ofídico el cual no cesa con analgésicos comunes, se puede observar los orificios dejados por los

colmillos de la serpiente por los cuales va a salir sangre que es incoagulable (Quesada & Quesada, 2012).

La formación de un edema en el sitio de inoculación debido a la acción del veneno mixto, aparece aproximadamente 30 minutos después de la mordedura con un aspecto duro en la extremidad afectada, acompañado de un dolor intenso y ampollas (Walteros, 2014).

### **1.3.2. Manifestaciones clínicas sistémicas**

De acuerdo con DGuerra (2015) se establecen las siguientes manifestaciones sistémicas

**Hemorragia local:** Pueden afectar a más de un órgano, provocando así un sangrado y este puede ocasionar un shock hipovolémico

**Coagulopatías:** El veneno actúa de forma directa en la cascada de coagulación, consumiendo el fibrinógeno necesario, provocando una fibrinólisis y agravando aún más el sangrado sistémico

**Shock cardiovascular:** Debido al sangrado se produce un cuadro de hipovolemia que evoluciona a un shock, muy rara vez este shock puede ser cardiogénico e incluso puede llegarse a dar una insuficiencia renal

**Insuficiencia renal:** Debido a que los compuestos tóxicos que hay en el veneno llegan actuar de manera directa produciendo insuficiencia renal aguda

### 1.3.3. Grados Accidente Bothrópico

De acuerdo con la Secretaría de salud del estado de Veracruz (2014) se establecen los siguientes grados de accidente bothrópico:

- **Ausente:** No hay ninguna manifestación después de 6 horas del accidente, por lo que se puede deducir que no existió la inoculación del veneno
- **Leve:** Solo se presenta con un edema local y dolor, sin manifestación sistémica
- **Moderado:** Existe una hemorragia local y sistémica acompañada de un edema muy duro, principalmente los tiempos de coagulación han variado hasta aumentar en un 50%
- **Grave:** La sangre es incoagulable, existe un dolor intenso, el edema puede estar en todo el miembro afectado y en este grado del accidente ya existe necrosis local y una falla multisistémica.

### 1.3.4. Tratamiento para el Accidente Bothrópico

El tratamiento para este tipo de accidentes es el suero antiofídico polivalente, que es un producto biológico se lo prepara con las indicaciones del fabricante y se lo administra en dosis dependiendo el grado del accidente bothrópico (Grupo de vigilancia y control de enfermedades transmisibles, 2010).

Este suero antiofídico neutraliza el veneno, inhibiendo los efectos sistémicos que puede producir, pero no los efectos locales por lo cual es necesario que se lo administre lo más pronto posible, gracias a medicamentos como este podemos decir que hoy en día una mordedura de serpientes ya no es tan letal como hace unas décadas (Gutiérrez, Lomonte, & Rojas, 2014).

#### **1.4. Efecto anti hemolítico**

Existen dos mecanismos de acción del veneno que provocan hemólisis; estos son directo e indirecto; el primero es regulado por las proteínas presentes en el veneno conocidas como factor lítico directo que en conjunto con la fosfolipasa A<sub>2</sub> provoca la hemólisis indirecta que generan en los eritrocitos una potenciada hemólisis, el responsable de dicha hemólisis es un agente tensioactivo conocido como lisolecitina la cual es citotóxica (Maruñak, Bogado, Ortiz, Gasko, & Pérez, 2013).

La acción final que provocan estos dos mecanismos es la liberación de la hemoglobina fuera de la célula desorganizando los glóbulos rojos, la formación de esta hemólisis provoca el envenenamiento que genera hemoglobinemia que es la causante de la disolución de glóbulos rojos desencadenando hemoglobinuria que causa anemia (Martínez, 1991).

El efecto anti hemolítico tiene como fin aumentar el tiempo de coagulación evitando los efectos provocados por el veneno de serpiente, y reducir la hemólisis generada por el mismo (Pereañez, 2008).

## Capítulo 2: Materiales y Métodos

### 2.1. Diseño

El presente trabajo es de carácter cualitativo, ya que se realizó tamizaje fitoquímico en extractos acuoso, alcohólico y n-heptánico y es de carácter cuantitativo debido a que se realizó pruebas de determinación de cenizas, porcentaje de humedad, determinación de fenoles y flavonoides mediante curva de calibración, actividad anti hemolítica y actividad neutralizante de los extractos sobre el veneno. La característica del estudio propuesto es considerada analítica ya que guarda estrecha relación entre las variables; dependiente disminución del diámetro de hemolisis por una concentración específica del veneno de *B. atrox*; e independiente concentración del extracto con los objetivos previamente planteados en la investigación.

La recolección de las plantas utilizadas *Lonchocarpus utilis* (**Barbasco**) y *Adenostemma lavenia* (**Araratz**) en esta investigación se realizó en campo específicamente en la provincia de Morona Santiago, en los cantones Morona y Huamboya; luego de la recolección todas las pruebas y ensayos se desarrollaron en los laboratorios de la Universidad Politécnica Salesiana de Quito, campus “El Girón”.

### 2.2. Población y muestra

#### 2.2.1. Material vegetal

Se solicitó los permisos en el Ministerio del Ambiente para la recolección de las plantas *Lonchocarpus utilis* (**Barbasco**) y *Adenostemma lavenia*

(**Araratz**) utilizadas en el estudio (Ver anexo 1), en la provincia de Morona Santiago en el cantón Huamboya, parroquia Chiguaza.

### 2.2.2. Sitio de recolección

La recolección de las dos plantas se la realizó en la provincia de Morona Santiago, cantón Morona, parroquia Sevilla Don Bosco y cantón Huamboya en la parroquia Chiguaza.

### 2.3. Extractos

Luego de la recolección de las muestras vegetales se realizó la desinfección en la cual, se hizo un primer lavado y se aseguró la eliminación de ramas, excremento de animales, insectos y partes de otras plantas que no son de interés para el estudio, posteriormente se sumergió en alcohol por 1 minuto y se realizó un segundo lavado, a continuación, se lavó con hipoclorito al 5 % durante 5 minutos, finalmente se realizó un tercer lavado con agua y se guardó en fundas plásticas correctamente etiquetadas para su traslado. Para obtener los extractos se acondicionó las muestras por molienda, en la siguiente tabla se muestra los gramos que se tomó de cada muestra vegetal para la realización de extractos.

Tabla 3.  
Peso del material vegetal en gramos

<b>Nombre de la planta/ parte</b>	<b>Peso (g)</b>
<i>Lonchocarpus utilis</i> (raíz)	25.20
<i>Lonchocarpus utilis</i> (hojas)	25.00
<i>Adenostemma lavenia</i> (completa)	25.06

Nota: Realizado por el autor (2016)

### **2.3.1. Extracto heptánico**

Una vez molido el material vegetal se procedió a colocar en un vaso de precipitación la cantidad de gramos de muestra referenciadas en la tabla 3 en 250 mL de n-heptano y se dejó macerar por 48 horas, luego se filtró, y se llevó a sequedad en rotavapor.

### **2.3.2. Extracto alcohólico**

El residuo seco y pesado de la extracción anterior se colocó en un vaso de precipitación y se añadió 250 mL de alcohol al 96 % y se dejó en maceración por 48 horas, luego se filtró, y se llevó a sequedad en rotavapor.

### **2.3.3. Extracto acuoso**

El residuo seco y pesado de la extracción anterior se colocó en un vaso de precipitación y se añadió 250 mL de agua destilada para maceración por 48 horas, luego se filtró y se llevó a sequedad en baño maría.

## **2.4. Determinación de cenizas**

### **2.4.1. Determinación de cenizas totales**

Las cenizas totales son el residuo inorgánico obtenido después de incinerar la muestra vegetal (Huerta, 2013).

Se pesó aproximadamente 2.0 gramos del material vegetal seco y pulverizado, se colocó en un crisol tarado y se llevó la muestra a la mufla a una temperatura de 750° C durante 2 horas con el objetivo de carbonizar la muestra, después se lo colocó en un desecador durante 30 minutos para que se

enfríe, se repitió el proceso de forma continua hasta que en 2 pesadas consecutivas no varíe por más de 0.5 mg el peso del crisol (Criollo, 2015).

Fórmula 1. Cenizas totales

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

Tomado de (Arias & Gualli, 2013)

Dónde:

C = porcentaje de cenizas totales en base hidratada.

M2 = masa del crisol con la ceniza (g)

M1= masa del crisol con la porción de ensayo (g)

M = masa del crisol vacío (g)

100 = factor matemático para los cálculos

(Arias & Gualli, 2013)

#### **2.4.2. Cuantificación de cenizas solubles en agua**

A las cenizas obtenidas se añadió 20 mL de agua directamente en crisol y se lo calentó en un mechero bunsen durante 5 minutos inmediatamente se procedió a filtrar la solución obtenida utilizando papel filtro libre de ceniza para obtener resultados exactos, el papel filtro junto con el residuo se transfirió al crisol inicial y este a su vez a la mufla a 750° C durante 2 horas, transcurrido este tiempo se trasladó al crisol a un desecar hasta que se enfríe

(Arias & Gualli, 2013)

Se repitió el proceso de forma continua hasta que en 2 pesadas consecutivas no varié por más de 0.5 mg el peso del crisol. La fórmula que se usó para los cálculos respectivos es:

Fórmula 2. Cenizas solubles en agua

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

Tomado de (Criollo, 2015)

Dónde:

Ca = porcentaje de cenizas solubles en agua en base hidratada.

M2 = masa del crisol con las cenizas totales (g)

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

M1 = masa del crisol con la muestra de ensayo (g)

M = masa del crisol vacío (g)

100 = factor matemático

(Criollo, 2015)

#### **2.4.3. Cuantificación de cenizas insolubles en ácido clorhídrico**

Al residuo se añadió 2 mL de ácido clorhídrico, se cubrió con un reloj de vidrio al crisol y se procedió a calentar en un baño maría en agua hirviendo, para evitar pérdidas se lavó el vidrio reloj con 5 mL de agua hirviendo los mismos que se unieron a la mezcla, se filtró la solución obtenida y a esta se le añadió 2 gotas de nitrato de plata para evitar que se encuentren cloruros en la solución y se desecó a una temperatura de entre 100 °C, finalmente se transfirió a la mufla a 750° C por 2 horas (Criollo, 2015).

La fórmula que se usó para los cálculos respectivos es:

Fórmula 3. Cenizas insolubles en ácido clorhídrico

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

Tomado de (Arias & Gualli, 2013)

Dónde:

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

M2= masa del crisol con las cenizas insolubles en ácido clorhídrico (g)

M1 = masa del crisol con la porción de ensayo (g)

M= masa del crisol vacío (g)

100= factor matemático

(Arias & Gualli, 2013)

## **2.5. Cuantificación del porcentaje de humedad de las muestras vegetales**

Para conocer el porcentaje de humedad de las muestras se utilizó el equipo HB43-S Halogen, por termo gravimetría.

## **2.6. Análisis de Fenoles totales**

La cuantificación de fenoles se realizó mediante espectrofotometría, utilizando al reactivo de Folin-Ciocalteu como agente oxidante, al mezclar el molibdato y el tungsteno en un medio básico hacen que este reaccione formando oxido de molibdeno y este a su vez puede ser identificado mediante espectrofotometría (Bedascarrasbure & Maldonado, 2004).

### **2.6.1. Curva de Calibración de Fenoles totales**

Para la curva de calibración de fenoles se usó como solución estándar ácido gálico (0.1 mg/ mL), del cual se utilizó soluciones en intervalos de 20 µL

como estándares, desde 0 hasta 160  $\mu\text{L}$ , aforando hasta alcanzar un volumen de 500  $\mu\text{L}$ ; inmediatamente se añadió 250  $\mu\text{L}$  de reactivo de Folin y finalmente se adicionó 1250  $\mu\text{L}$  de una solución de carbonato de sodio al 10 % y se dejó en reposo por 2 horas para luego medir la absorbancia a una longitud de onda de 760 nm (Ortiz, 2012).

### 2.6.2. Cuantificación de Fenoles totales

Se preparó las muestras, tomando de cada extracto vegetal 100  $\mu\text{L}$  cuya concentración fue 1.6 mg/ mL, completando su volumen a 500  $\mu\text{L}$  con agua destilada, seguidamente se añadió 250  $\mu\text{L}$  de reactivo de Folin, transcurrido este tiempo se añadió 1250  $\mu\text{L}$  de carbonato de sodio al 10 % y se dejó en reposo por 2 horas; se midió la absorbancia 760 nm (Gracia Nava, 2015).

Los resultados se expresan en mg de ácido gálico/ 100 mL de extracto y la fórmula que se utilizó para realizar los cálculos, se derivó de la ecuación de la curva de calibración multiplicada por el factor de dilución cuyo valor es 5:

Fórmula 4. Cuantificación de fenoles totales

$$\frac{mg_{ac.gal}}{100mL_{ex}} = \frac{Abs_m + 0.0088 * 5}{0.005} * 100$$

Tomado de (Gracia Nava, 2015).

### 2.7. Análisis de flavonoides

Para la cuantificación de flavonoides totales se realizó por espectrofotometría utilizando la metodología de Liu y col. (2002).

### 2.7.1. Curva de Calibración

Para la curva de flavonoides totales se usó como solución estándar catequina (0.1 mg / mL) de la que se tomó estándares en intervalos de 20 µL, desde 0 hasta 100 µL. Se preparó una solución NaNO<sub>2</sub> al 5%, una solución de AlCl<sub>3</sub>, y una de NaOH 1M. Seguidamente se adicionó 1250 µL de agua destilada y 75 µL de nitrito de sodio; se dejó reposar por 6 min y se adicionó 150 µL de cloruro de aluminio dejando en reposo por 5min, transcurrido el tiempo se adicionó 500 µL de hidróxido de sodio y se aforó hasta 2500 µL, finalmente se midió la absorbancia en 510 nm de longitud de onda (Gracia Nava, 2015).

### 2.7.2. Cuantificación de flavonoides

Se tomó 100 uL del extracto vegetal cuya concentración fue 1.6 mg/ mL y se adicionó 1250 µL de agua, de la solución de NaNO<sub>2</sub> al 5% se añadió 75 µL se dejó en reposo durante 6 minutos, una vez transcurrido este tiempo se añadió 150 µL de hidróxido de sodio 1M, finalmente se añadió agua destilada hasta completar 2.5 mL (Gracia Nava, 2015).

Una vez que se realizó esto se midió por espectrofotometría la absorbancia con una longitud de onda de 510 nm y se realizó los cálculos utilizando la siguiente fórmula derivada de la curva de calibración correspondiente:

Fórmula 5. Cuantificación de flavonoides

$$\frac{mg_{cateq}}{100mL_{ex}} = \frac{Abs_m + 0.0081}{0.0312} * 100$$

Tomado de (Gracia Nava, 2015).

## 2.8. Estudio Cualitativo

Para el estudio cualitativo se realizó el tamizaje fitoquímico para así determinar los principales grupos de metabolitos secundarios en *Adenostemma lavenia* y *Lonchocarpus utilis*.

### 2.8.1. Técnica de tamizaje fitoquímico

En esta técnica se realizó diferentes ensayos con los extractos heptánicos, alcohólicos y acuosos de las plantas en estudio, siguiendo la metodología empleada por (Barahona, 2013).

#### 2.8.1.1. Extracto N-heptano

##### - Ensayo Sudan (Ácidos grasos)

**Procedimiento:** Se tomó una alícuota del extracto y se le añadió 1 mL del colorante Sudan II, esto se llevó a calentar hasta su evaporación para evidenciar la presencia de ácidos grasos.

**Fundamento Teórico:** Los colorantes que son para determinar grasas generalmente son más solubles en las propias grasas por tal motivo al mezclar el colorante en la solución este tiende a disolverse y como resultado nos da una coloración rojiza en forma de gotas.

**Resultados:** Se considera que el ensayo es positivo cuando se forman gotas de color rojizo en la mezcla.

(Sisalema, 2013)

- **Ensayo Wagner (Alcaloides)**

**Procedimiento:** Se evaporo el extracto y al residuo se le puso 1 mL de ácido clorhídrico al 1 % en agua y se agrega 2 0 3 gotas de Dragendorff y se añadió 2 0 3 gotas del reactivo de Wagner

**Fundamento Teórico:** En el caso de los alcaloides los reactivos que reaccionan con este contienen yodo y varios metales presentes, lo que permite que se dé opalescencia, turbidez y precipitado

**Resultados:** La valoración de los resultados es la siguiente: Opalescencia +, turbidez ++ precipitado +++

(Barahona, 2013)

- **Ensayo de Dragendorff (Alcaloides)**

**Procedimiento:** Se evaporo el extracto y al residuo se le puso 1 mL de ácido clorhídrico al 1 % en agua y se agrega 2 0 3 gotas de Dragendorff

**Fundamento Teórico:** En el caso de los alcaloides los reactivos que reaccionan con este contienen yodo y varios metales presentes, lo que permite que se dé opalescencia, turbidez y precipitado

**Resultados:** La valoración de los resultados es la siguiente: Opalescencia +, turbidez ++ precipitado +++

(Bermejo, Pereira, Cintra, & Morales, 2014)

- **Ensayo de Mayer (Alcaloides)**

**Procedimiento:** Se realizó el mismo procedimiento que en Dragendorff, se colocó un poco de cloruro de sodio y 2 o 3 gotas de la solución de Mayer

**Fundamento Teórico:** En el caso de los alcaloides los reactivos que reaccionan con este contienen yodo y varios metales presentes

**Resultados:** La valoración de los resultados es la siguiente: Opalescencia +, turbidez ++ precipitado +++

- **Ensayo de Liebermann-Buchard (Triterpenos y Esteroides)**

**Procedimiento:** Se tomó una alícuota y se evaporó en baño maría, se lo resolvió en 1 mL de cloroformo, 1 mL de anhídrido acético y por último se añadió 2 o 3 gotas de ácido sulfúrico concentrado

**Fundamento Teórico:** Es un ensayo colorímetro, que da como resultado un color verde intenso el color se da por la presencia de un grupo hidroxilo perteneciente al colesterol

**Resultados:** El resultado se lo interpreto de la siguiente manera cuando es positivo.

1. Rojo azul
2. Verde intenso-visible
3. Verde oscuro

(Barahona, 2013)

### 2.8.1.2. Extracto alcohólico

#### - Ensayo de shinoda (flavonoides)

**Procedimiento:** Se tomó una alícuota del extracto vegetal y se le añadió, 1 mL de ácido clorhídrico y 1 mL de alcohol amílico para mezclar sus fases y se espera el tiempo necesario hasta que se separen las mismas, para ver si presentan flavonoides

**Fundamento Teórico:** Están presentes en cualquier compuesto fluorescentes y al estar en contacto con la luz UV se puede diferenciar de manera fácil su tonalidad generalmente anaranjada

**Resultados:** El ensayo es positivo cuando el alcohol amílico toma alguna de estas tonalidades:

- Amarillo
- Naranja
- Carmelita
- Rojo

Deben ser intensas en todos los casos

(Castillo, 2014)

#### - Ensayo Wagner (Alcaloides)

**Procedimiento:** Se evaporo el extracto y al residuo se le puso 1 mL de ácido clorhídrico al 1 % en agua y se agrega 2 0 3 gotas de Dragendorff y se añadió 2 0 3 gotas del reactivo de Wagner

**Fundamento Teórico:** en el caso de los alcaloides los reactivos que reaccionan con este contienen yodo y varios metales presentes, lo que permite que se dé opalescencia, turbidez y precipitado

**Resultados:** La valoración de los resultados es la siguiente: Opalescencia +, turbidez ++ precipitado +++

- **Ensayo Baljet (Cumarinas)**

**Procedimiento:** Se evaporo extracto en baño maría, y se lo re disolvió con 1 mL de alcohol y por último se adiciono 1 mL del reactivo de Baljet

**Fundamento Teórico:** se basa en la unión del ácido pícrico con las lactonas ( $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ) formando un complejo al darse la presencia de cumarinas se torna una coloración rojiza clara u oscura.

**Resultados:** el ensayo se considera positivo cuando hay una coloración roja o precipitado rojo sea este rojo u oscuro.

(Barahona, 2013)

- **Ensayo de Dragendorff (Alcaloides)**

**Procedimiento:** Se evaporo el extracto y al residuo se le puso 1 mL de ácido clorhídrico al 1 % en agua y se agrega 2 0 3 gotas de Dragendorff

**Fundamento Teórico:** en el caso de los alcaloides los reactivos que reaccionan con este contienen yodo y varios metales presentes, lo que permite que se dé opalescencia, turbidez y precipitado

**Resultados:** La valoración de los resultados es la siguiente: Opalescencia +, turbidez ++ precipitado +++

- **Ensayo de Liebermann-Buchard (Triterpenos y Esteroides)**

**Procedimiento:** Se tomó una alícuota y se evaporó en baño maría, se lo re disolvió en 1 mL de cloroformo, 1 mL de anhídrido acético y por último se añadió 2 o 3 gotas de ácido sulfúrico concentrado

**Fundamento Teórico:** es un ensayo colorímetro, que da como resultado un color verde intenso el color se da por la presencia de un grupo hidroxilo

**Resultados:** El resultado se lo interpreto de la siguiente manera cuando es positivo. 1. Rojo azul 2. Verde intenso-visible 3. Verde oscuro.

(Bermejo, Pereira, Cintra, & Morales, 2014)

- **Ensayo de Borntrager**

**Procedimiento:** Se tomó una alícuota y se evaporó en baño maría, se lo re disolvió en 1 mL de cloroformo, 1 mL de hidróxido de sodio y se agita.

**Fundamento Teórico:** Es un ensayo colorímetro en el que se mezcla un reactivo alcalino con una solución de hidróxido al extracto y se basa principalmente en la coloración que dan los antraquinonicos en un medio alcalino

**Resultados:** El ensayo es positivo cuando la fase acuosa toma una tonalidad rosácea o roja. Rosado (++) y roja (+++).

- **Ensayo de Mayer (Alcaloides)**

**Procedimiento:** Se realizó el mismo procedimiento que en Dragendorff, se colocó un poco de cloruro de sodio y 2 o 3 gotas de la solución de Mayer

**Fundamento Teórico:** en el caso de los alcaloides los reactivos que reaccionan con este contienen yodo y varios metales presentes, lo que permite que se dé opalescencia, turbidez y precipitado

**Resultados:** La valoración de los resultados es la siguiente: Opalescencia +, turbidez ++ precipitado +++

(Barahona, 2013)

### 2.8.1.3. Extracto acuoso

#### - Ensayo Fehling (Azúcares reductores)

**Procedimiento:** Se tomó una alícuota del extracto y se añadió 2 mL del reactivo de Fehling y se procedió a calentarlo durante 10 minutos en baño maría para evidenciar si existe la presencia de azúcares reductores

**Fundamento Teórico:** se basa principalmente en que el grupo carbonilo puede ser oxidado a grupo carboxilo, esta oxidación debe darse en un medio alcalino, toma una tonalidad rojo ladrillo por el óxido cuproso

**Resultados:** El resultado es positivo si la solución toma una tonalidad rojiza o un precipitado rojo

#### - Ensayo Mucilago (Polisacáridos)

**Procedimiento:** Para la identificación de polisacáridos, se tomó una alícuota del extracto y se la llevo a enfriar a -5°C

**Fundamento Teórico:** Los extractos que contienen polisacáridos al contacto con el agua aumenta el volumen obteniendo una solución coloidal o gelatinosa

**Resultados:** Tenemos un resultado positivo si la solución presenta una consistencia gelatinosa.

- **Ensayo Shinoda (Flavonoides)**

**Procedimiento:** Se tomó una alícuota del extracto vegetal y se le añadió, 1 mL de ácido clorhídrico y 1 mL de alcohol amílico para mezclar sus fases y se espera el tiempo necesario hasta que se separen las mismas, para ver si presentan flavonoides

**Fundamento Teórico:** Están presentes en cualquier compuesto fluorescentes y al estar en contacto con la luz UV se puede diferenciar de manera fácil su tonalidad generalmente anaranjada, ya que estos compuestos son fotosensibles

**Resultados:** El ensayo es positivo cuando el alcohol milico toma alguna de estas tonalidades:

- Amarillo
- Naranja
- Carmelita
- Rojo

Deben ser intensas en todos los casos

(Barahona, 2013)

## **2.9. Actividad anti hemolítica**

### **2.9.1. Obtención de eritrocitos lavados:**

Se tomó 6 tubos de 50 mL en los cuales se colocó 8 mL de sangre y se le añadió 32 mL de solución salina al 0.9 %, a estos frascos se los puso en la centrifugadora a 3000 rpm durante 15 minutos para realizar el primer lavado, transcurrido este tiempo se los retiro de la centrifugadora y se procedió a quitar el sobrenadante y se añadió nuevamente solución salina al 0.9 % y se los volvió a colocar en la centrifuga para realizar el segundo lavado, se repitió este proceso para realizar un tercer y último lavado (Ballester Santovenia, de la Campa, Pérez Pérez, & Hourrutinier, 2013).

### **2.9.2. Elaboración Agar- Sangre fosfatidilcolina**

Para elaborar este medio de cultivo primero se disolvió 10 tabletas de PBS (Phosphate Buffered Saline) en un matraz con 1 L de agua destilada, una vez disueltas se midió el pH para comprobar su valor en 7.2 a 50 °C, en esta disolución se disolvió 40 g de agar base sangre y se calentó hasta ebullición, una vez caliente se añadió 10 mL de CaCl<sub>2</sub> al 0.01 M. Después se trasvasó la solución a un frasco boeco de 1000 mL y se procedió a esterilizar en auto clave a 120 °C durante 15 minutos; se dejó enfriar hasta 50 °C, y en cámara de flujo laminar se añadió 24 mL de eritrocitos lavados lentamente y en constante agitación, para finalizar la elaboración del medio de cultivo se añadió 12 mL de suspensión egg-yolk, mientras se continuó agitando hasta obtener una mezcla homogénea (Ramírez & Balqui, 2004).

A continuación, en la misma cámara de flujo laminar se dispensó el medio de cultivo en 40 cajas Petri de plástico de 25 mL cada una; finalmente con se realizó 5 pocillos y se las mantuvo en refrigeración hasta su uso.

### **2.9.3. Diluciones del Veneno**

Se preparó una solución madre disolviendo 6 mg del veneno de serpiente *B. atrox* en 1 mL de agua destilada, aquí hay 90 µg de veneno por cada 15 µL.

Partiendo de la solución madre se tomó 0.67 mL y se completó hasta llegar a 1 mL obteniendo así la disolución 1, aquí hay 60 µg de veneno por cada 15 µL.

De la disolución 1 se tomó 0.75 mL y se completó hasta llegar a 1 mL obteniendo la dilución 2, aquí hay 45 µg de veneno por cada 15 µL.

Después se tomó 0.67 mL de la disolución 2 y se completó hasta llegar a 1 mL obteniendo la disolución 3, aquí hay 30 µg de veneno por cada 15 µL.

Por último, se tomó 0.5 mL de la solución 3 y se completó hasta llegar a 1 mL para obtener la disolución 4, aquí hay 15 µg de veneno por cada 15 µL

(Maruñak, Bogado, Ortiz, Gasko, & Pérez, 2013)

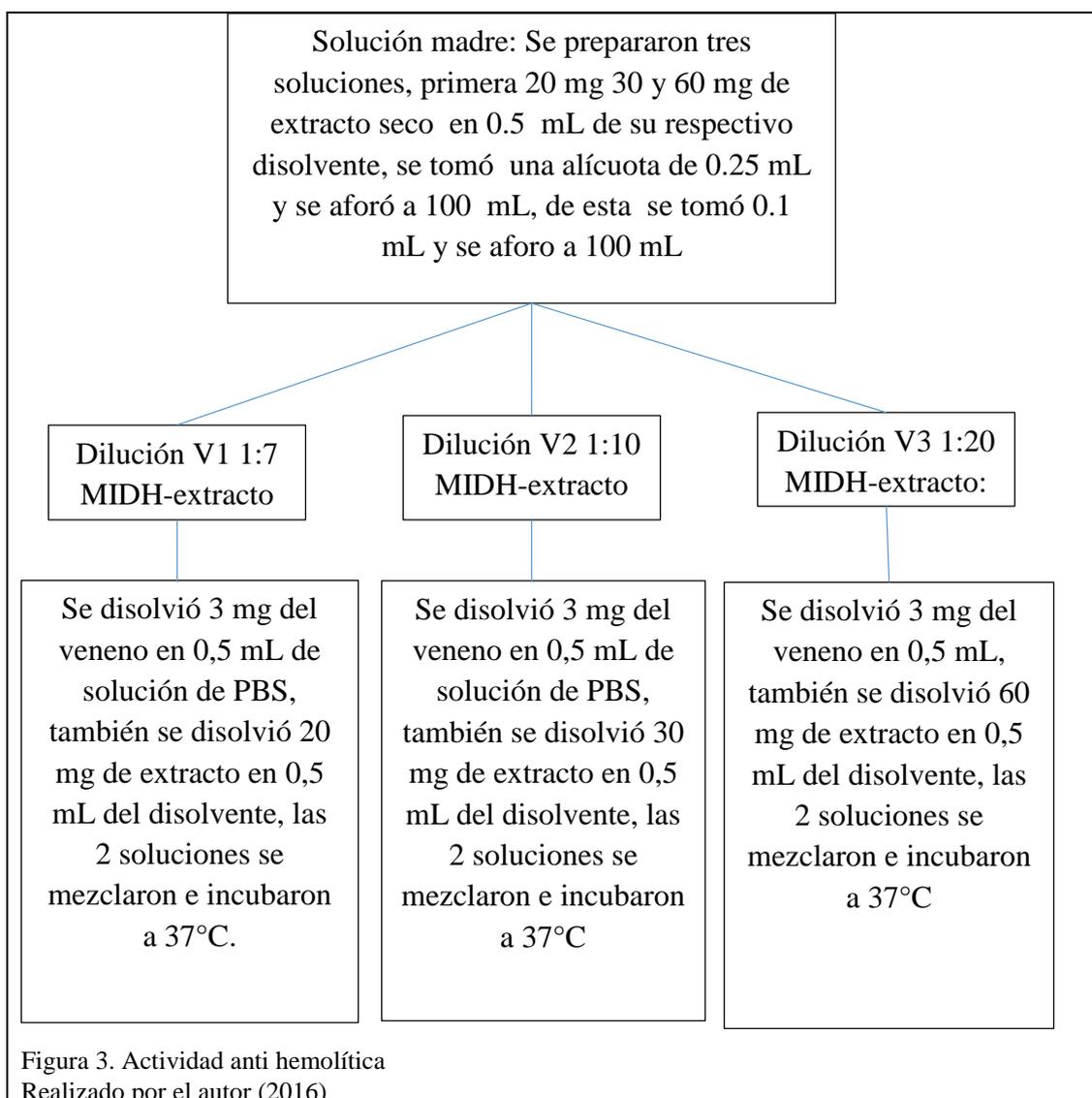
### **2.9.4. Dosis mínima hemolítica**

Se sembró 15 µL de cada una de las disoluciones en los 4 pocillos que están en forma de cruz y en el pocillo del centro se colocó solamente agua destilada para que nos sirva de blanco, después se incubó durante 20 horas en una estufa a 37 °C, luego de este tiempo se midió el diámetro del halo de hemólisis

generado en cada uno de los 5 pocillos. La concentración de veneno de *B. atrox* que al medirlo generó un halo de al menos 15 mm de diámetro se tomó como la dosis mínima hemolítica (MIDH) (Granda, 2015);

## 2.10. Actividad anti hemolítica

Se usó 27 cajas Petri para los 3 extractos, estas cajas contienen 25 mL de agar-sangre-fosfatidilcolina y se realizó 4 pocillos para cada uno de los extractos por triplicado.



Concentraciones de la mezcla veneno extracto

C1	15 $\mu$ L veneno (1mg/mL) + 3.75 $\mu$ L extracto (2.5 g/L)	1:7 MIDH-E
C2	15 $\mu$ L veneno (1mg/mL) + 1.77 $\mu$ L extracto (3.8 g/L)	1:10 MIDH-E
C3	15 $\mu$ L veneno (1mg/mL) + 2.5 $\mu$ L extracto (7.5 g/L)	1:20 MIDH-E

Figura 4. Concentraciones de la mezcla veneno extracto

Nota: Realizado por el autor (2016)

Una vez incubada las soluciones se precedió a sembrar 15  $\mu$ L de las 3 soluciones en los pocillos y en el cuarto pocillo no se sembró nada para que este sea nuestro blanco.

## Capítulo 3: Resultados y discusión

### 3.1. Rendimiento del extracto

Tabla 4.  
Rendimiento del extracto N-heptano

<b>Nombre de la planta</b>	<b>Rendimiento (%)</b>
<i>Lonchocarpus utilis</i> (raíz)	2.79
<i>Lonchocarpus utilis</i> (hojas)	3.75
<i>Adenostemma lavenia</i> (completa)	2.51

Nota: Realizado por el autor (2016)

Tabla 5.  
Rendimiento del extracto alcohólico

<b>Nombre de la planta</b>	<b>Rendimiento (%)</b>
<i>Lonchocarpus utilis</i> (raíz)	6.42
<i>Lonchocarpus utilis</i> (hojas)	3.85
<i>Adenostemma lavenia</i> (completa)	2.64

Nota: Realizado por el autor (2016)

Tabla 6.  
Rendimiento del extracto acuoso

<b>Nombre de la planta</b>	<b>Rendimiento (%)</b>
<i>Lonchocarpus utilis</i> (raíz)	0.33
<i>Lonchocarpus utilis</i> (hojas)	1.62
<i>Adenostemma lavenia</i> (completa)	6.62

Nota: Realizado por el autor (2016)

Se presenta en las Tablas 4, 5 y 6, se determinó que el mejor rendimiento tiene la planta completa de *Adenostemma lavenia* en el extracto acuoso; *Lonchocarpus utilis* raíz 6.62 % en el extracto alcohólico valor similar al obtenido por Palacios, Delgado, Moreno, Kato & Rojas (2009) en su estudio “Actividad antifúngica in vitro de extractos crudos de *Piper tuberculatum*” donde muestra un valor de 6.0 % en la especie *P. tuberculatum* (Ver tablas completas Anexo 3)

### **3.2. Determinación de cenizas**

#### **3.2.1. Cenizas totales**

Según los cálculos de resultados se determinó que el mayor porcentaje de cenizas totales con (4.38 %) lo tuvo *Adenostemma lavenia* (completa), con lo cual se evidencia materia inorgánica presente en la especie vegetal como se muestra en el trabajo de (Cabrera, Morón, Amador, García, & Acosta, 2012). (Ver tabla completa anexo 4)

#### **3.2.2. Cenizas solubles en agua**

Una vez realizado el procedimiento para la determinación de cenizas solubles en agua se obtuvieron los resultados, el mayor porcentaje lo tiene *Adenostemma lavenia* (completa) con (9.35 %) esto denota la contaminación por residuos en la muestra que hace que el contenido de cenizas sea más alto (Ver tabla completa anexo 4)

#### **3.2.3. Cenizas insolubles en ácido clorhídrico**

Se obtuvo que un mayor porcentaje en la especie *Lonchocarpus utilis* (hojas) con (5.09%) esto denota que se encontró materia arenosa en la muestra

(Gutiérrez, Limachi, Gonzales, & Bermejo, 2011) (Ver tabla completa anexo 4).

### 3.3. Determinación de humedad

Tabla 7.  
Determinación de humedad

<b>Planta</b>	<b>Cantidad de muestra seca (g)</b>	<b>Porcentaje de humedad</b>
<i>Lonchocarpus utilis</i> (raíz)	2.00	8.2
<i>Lonchocarpus utilis</i> (hojas)	2.00	7.59
<i>Adenostemma lavenia</i> (completa)	2.01	11.12

Nota: Realizado por el autor (2016)

Como indica la tabla 7, la planta que presentó mayor porcentaje fue *Adenostemma lavenia* con 11.12 %, dicho porcentaje se encuentra dentro del rango indicado por Sharapin (2000) .El cual establece valores de entre 0.5% al 12% que muestra que la planta no estaba completamente seca como se muestra en el estudio (Riaño & Chuvieco, 2015).

### 3.4. Determinación de Fenoles totales

Tabla 8.  
Determinación de Polifenoles totales

<b>Plantas</b>	<b>Absorbancia</b>	<b>mg ácido gálico/ 100 mL de extracto</b>
<i>Lonchocarpus utilis</i> (raíz)	0.5233	53.21
<i>Lonchocarpus utilis</i> (hojas)	0.4947	50.35
<i>Adenostemma lavenia</i> (completa)	0.0905	9.93

Nota: Realizado por el autor (2016)

La tabla 8 muestra que la especie *Lonchocarpus utilis* presentó la mayor cantidad de estos metabolitos secundarios que están altamente relacionados con la actividad anti hemolítica como lo indica (Durán, Montero, & Marrugo, 2013) .

### 3.5. Determinación de Flavonoides

Tabla 9.  
Flavonoides

Plantas	Absorbancia en ppm	mg catequina/ 100 mL de extracto
<i>Lonchocarpus utilis</i> (raíz)	0.1976	0.65
<i>Lonchocarpus utilis</i> (hojas)	0.3177	1.04
<i>Adenostemma lavenia</i> (completa)	0.0319	0.13

Nota: Realizado por el autor (2016)

La tabla 9 muestra que la especie *Lonchocarpus utilis* (hojas) esta parte de la planta posee mayor cantidad de flavonoides que *Lonchocarpus utilis* (raíz) y *Adenostemma lavenia* mostrando así una estrecha relación con la actividad anti hemolítica como se presenta en (Durán, Montero, & Marrugo, 2013).

### 3.6. Tamizaje Fitoquímico

Tabla 10.  
Tamizaje fitoquímico de *Lonchocarpus utilis* (Barbasco raíz)

Barbasco raíz				
Ensayo	Metabolito secundario	N- Heptano	Alcohólico	Acuoso
Sudan	Ácidos grasos	+	---	---
Baljet	Compuestos Lactónicos	-	---	---
Wagner – Dragendorff – Mayer	Alcaloides	++	++	++
Liebermann–	Triterpenos o	+	+	---

Burchard	esteroides			
Resinas	Resinas	---	+++	---
Saponinas	Espuma	---	+	-
Kedde	Glúcidos cardiotónicos	---	+++	---
Shinoda	Flavonoides	+	+	+
Cloruro Férrico	Comp. Fenólicos	+	++	+
Ninhidrinás	Aminoácidos y aminas	---	-	---
Antocianinas	Flavonoides	---	+	+
Catequinas	Catequinas	---	+	---
Fehling	Azúcares reductores	---	+	-
Borntreger	Quinonas	---	++	---
Sabores	Amargor	---	---	-
Mucilagos	Comp. Polisacáridos	---	---	-
(+++) Alta incidencia del metabolito; (++) Mediana Incidencia del metabolito; (+) Poca incidencia del metabolito; (-) no se presencia el metabolito; (---) No se realizó el ensayo				

Nota: Realizado por el autor (2016)

Como muestra la tabla 10 de resultados a destacar son que los metabolitos más representativos en Barbasco raíz son los alcaloides encontrados en los tres extractos con mediana incidencia, glúcidos cardiotónicos y resinas encontrados en el extracto alcohólico con alta incidencia. Además, se identificó la presencia de flavonoides en los distintos extractos los cuales son fundamentales para este estudio.

Tabla 11.  
Tamizaje fitoquímico de *Lonchocarpus utilis* (Barbasco hojas)

<b>Barbasco hojas</b>				
<b>Ensayo</b>	<b>Metabolito secundario</b>	<b>N- Heptano</b>	<b>Alcohólico</b>	<b>Acuoso</b>
Sudan	Ácidos grasos	+	---	---
Baljet	Compuestos Lactónicos	-	---	---

Wagner – Dragendorff – Mayer	Alcaloides	+++	++	++
Liebermann – Burchard	Triterpenos o esteroides	+++	---	---
Resinas	Resinas	---	+++	---
Saponinas	Espuma	---	+	---
Kedde	Glúcidos cardiotónicos	---	+++	---
Shinoda	Flavonoides	++	+++	++
Cloruro Férrico	Comp. Fenólicos	+	+	+
Ninhidrinas	Aminoácidos y aminas	---	+	---
Antocianinas	Flavonoides	---	+	+
Catequinas	Catequinas	---	+	---
Fehling	Azucres reductores	---	-	+
Borntrager	Quinonas	---	+	
Sabores	Amargor	---	---	-
Mucilagos	Comp. Polisacáridos	---	---	-
(+++) Alta incidencia del metabolito; (++) Mediana Incidencia del metabolito; (+) Poca incidencia del metabolito; (-) no se presencia el metabolito; (---) No se realizó el ensayo				

Nota: Realizado por el autor (2016)

Como muestra la tabla 11 se identificó la presencia de alcaloides, en el extracto heptánico hay alta presencia de triterpenos. En el extracto alcohólico se encontraron resinas y glúcidos cardiotónicos con alta incidencia de estos metabolitos. Además, se identificó la presencia de flavonoides en los distintos extractos los cuales son fundamentales para este estudio.

Tabla 12.

Tamizaje fitoquímico *Adenostemma lavenia* (Araratz completa)

<b>Araratz completa</b>				
<b>Ensayo</b>	<b>Metabolito secundario</b>	<b>N- Heptano</b>	<b>Alcohólico</b>	<b>Acuoso</b>
Sudan	Ácidos grasos	-	---	---

Baljet	Compuestos Lactónicos	++	---	---
Wagner – Dragendorff – Mayer	Alcaloides	+++	++	+++
Liebermann – Burchard	Triterpenos o esteroides	+	+++	---
Resinas	Resinas	---	++	---
Saponinas	Espuma	---	-	---
Kedde	Glúcidos cardiotónicos	---	+	---
Shinoda	Flavonoides	---	+++	+
Cloruro Férrico	Comp. Fenólicos	---	+	+
Ninhidrinás	Aminoácidos y aminas	---	+	---
Antocianinas	Flavonoides	---	++	+
Catequinas	Catequinas	---	+	---
Fehling	Azúcares reductores	---	+	+
Borntreger	Quinonas	---	+	
Sabores	Amargor	---	---	amargo
Mucilagos	Comp. Polisacáridos	---	---	+
(+++) Alta incidencia del metabolito; (++) Mediana Incidencia del metabolito; (+) Poca incidencia del metabolito; (-) no se presencia el metabolito; (---) No se realizó el ensayo				

Nota: Realizado por el autor (2016)

Como se observa en la tabla 12 en los tres extractos se presentó alta incidencia de alcaloides, flavonoides y compuestos fenólicos. En el extracto alcohólico hay triterpenos y flavonoides en alta cantidad y finalmente es la única planta que presenta sabor amargo.

### 3.7. Actividad anti hemolítica

#### 3.7.1. Dosis mínima hemolítica

La dosis de veneno necesaria para generar un halo de hemólisis de 15,53 mm de diámetro fue una disolución de veneno en PBS de concentración  $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$

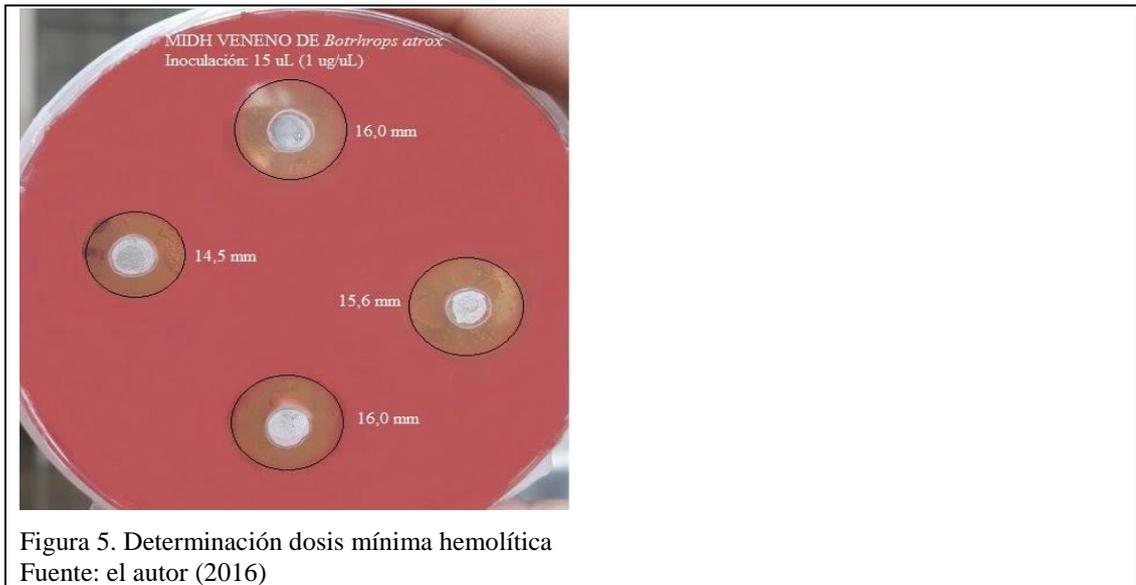


Tabla 13.

Halo de hemólisis de los extractos, en 3 concentraciones

Especie	Extracto	Concentración	Halo medio (mm)
<i>Lonchocarpus utilis</i> (raíz)	Acuoso	1:7	14.66
<i>Lonchocarpus utilis</i> (hojas)	Acuoso	1:7	15.33
<i>Adenostemma lavenia</i> (completa)	Acuoso	1:7	14.66
<i>Lonchocarpus utilis</i> (raíz)	Acuoso	1:10	14.66
<i>Lonchocarpus utilis</i> (hojas)	Acuoso	1:10	14.00
<i>Adenostemma lavenia</i> (completa)	Acuoso	1:10	14.33
<i>Lonchocarpus utilis</i> (raíz)	Acuoso	1:20	14.33
<i>Lonchocarpus utilis</i> (hojas)	Acuoso	1:20	13.00
<i>Adenostemma lavenia</i> (completa)	Acuoso	1:20	15.00
<i>Lonchocarpus utilis</i> (raíz)	Alcohólico	1:7	6,00
<i>Lonchocarpus utilis</i> (hojas)	Alcohólico	1:7	6,00
<i>Adenostemma lavenia</i> (completa)	Alcohólico	1:7	6.00
<i>Lonchocarpus utilis</i> (raíz)	Alcohólico	1:10	13.66
<i>Lonchocarpus utilis</i> (hojas)	Alcohólico	1:10	13.50
<i>Adenostemma lavenia</i> (completa)	Alcohólico	1:10	6,00
<i>Lonchocarpus utilis</i> (raíz)	Alcohólico	1:20	9.50
<i>Lonchocarpus utilis</i> (hojas)	Alcohólico	1:20	6.00
<i>Adenostemma lavenia</i> (completa)	Alcohólico	1:20	11.00
<i>Lonchocarpus utilis</i> (raíz)	Heptánico	1:7	13.00
<i>Lonchocarpus utilis</i> (hojas)	Heptánico	1:7	15.00
<i>Adenostemma lavenia</i> (completa)	Heptánico	1:7	14.33
<i>Lonchocarpus utilis</i> (raíz)	Heptánico	1:10	14.33
<i>Lonchocarpus utilis</i> (hojas)	Heptánico	1:10	14.33
<i>Adenostemma lavenia</i> (completa)	Heptánico	1:10	15.66
<i>Lonchocarpus utilis</i> (raíz)	Heptánico	1:20	12.66
<i>Lonchocarpus utilis</i> (hojas)	Heptánico	1:20	13.66
<i>Adenostemma lavenia</i> (completa)	Heptánico	1:20	15.33

Nota: Realizado por el autor (2016)

### 3.7.2. Ensayo de Bartlett (especies)

Tabla 14.  
Ensayo de Bartlett especies

<b>Ensayo de Bartlett</b>
<b>Estadística test: 0.6471; Grados de libertad: 2; Valor de P: 0.7236</b>

Nota: Realizado por el autor (2016)

Luego de realizada la prueba de Bartlett con un valor de p de (0.7236) se comprobó la homogeneidad de varianza en los tratamientos realizados, por lo que se realizó un ensayo estadístico de Anova.

### 3.7.3. Anova (Excel) Especies

Tabla 15.  
Test de Anova

	<b>Grados de libertad</b>	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>Cuadrados medios</b>	<b>Valor de F</b>	<b>Pr (&gt;f)</b>
Factor (especie)	2	0.24	0.118	0.010	0.991
Error residual	24	297.88	12.41		

Nota: Realizado por el autor (2016)

### 3.7.4. Anova relación entre especies

Tabla 16.  
Test de Anova Relación entre especies

<b>Especie</b>	<b>Media</b>	<b>Desviación estándar</b>	<b>Valor de p</b>
<i>Adenostemma lavenia</i> (completa)	12.47	3.91	0.99
<i>Lonchocarpus utilis</i> (hojas)	12.31	3.65	
<i>Lonchocarpus utilis</i> (raíz)	12.53	2.93	

Nota: Realizado por el autor (2016)

Se evidencia en las tablas de resumen del ensayo estadístico de Anova que el valor de  $p=0.991$  es muy cercano a 1 por lo que se puede decir que no hay diferencias significativas en los tratamientos realizados con los diferentes extractos por lo que se acepta la hipótesis nula en la investigación.

### 3.7.5. Ensayo de Bartlett tratamientos

Tabla 17.  
Ensayo de Bartlett

<b>Ensayo de Bartlett</b>
<b>Estadística test: 1.6194; Grados de libertad: 2; Valor de P: 0.445</b>

Nota: Realizado por el autor (2016)

Luego de realizada la prueba de Bartlett con un valor de  $p$  de (0.445) se comprobó que las variancias son homogéneas en el análisis de tratamientos, por lo que se realizó un ensayo estadístico de Anova.

### 3.7.6. Anova (Excel) Tratamientos

Tabla 18.  
Test de Anova Relación entre tratamientos

	<b>Grados de libertad</b>	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>Cuadrados medios</b>	<b>Valor de F</b>	<b>Pr (&gt;f)</b>
Factor (Tratamientos)	2	13.70	6.852	0.578	0.569
Error residual	24	284.40	11.851		

Nota: Realizado por el autor (2016)

### 3.7.7. Anova Relación extracto-veneno

Tabla 19.  
Test de Anova Relación extracto-veneno

Relación veneno/ Extracto	Media	Desviación estándar	Valor de p
1:7 MIDH	11.66	2.83	0.56
1:10 MIDH	13.38	3.00	
1:20 MIDH	12.27	4.29	

Nota: Realizado por el autor (2016)

Se evidencia en las tablas de resumen del ensayo de Anova de los tratamientos (diluciones) el valor de p (0.569) es cercano a 1 y se comprobó que no hay grandes diferencias significativas en las diluciones que se han realizado en los diferentes extractos por lo tanto se acepta la hipótesis nula.

### 3.7.8. Ensayo de Bartlett Extractos

Tabla 20.  
Ensayo de Bartlett

Ensayo de Bartlett
Estadística test: 20.4987; Grados de libertad: 2; Valor de P: 0.00003538

Nota: Realizado por el autor (2016)

Luego de realizada la prueba de Bartlett se obtuvo un valor de p (0.00003538), se comprobó que no hay homogeneidad en las varianzas por lo que se realizó un ensayo estadístico de Kruskal-Wallis.

### 3.7.9. Ensayo de Kruskal-Wallis

Tabla 21.  
Ensayo de Kruskal-Wallis

<b>Ensayo de Kruskal-Wallis</b>
<b>Estadística test: 15.0414; Grados de libertad: 2; Valor de P: 0.0005418</b>

Nota: Realizado por el autor (2016)

Se evidencia en la tabla 21 del ensayo estadístico de Kruskal-Wallis que el valor de p es (0.0005418) lo que permite comprobar que hay diferencias significativas por lo que se aceptó la hipótesis alternativa que indica que al menos uno de los extractos tiene actividad alexítera, y según los datos detectados los tratamientos con extracto alcohólico presentan actividad alexítera.

## Discusión

Según Pereañez (2008) en su estudio “INHIBICIÓN DE LAS ACTIVIDADES PROTEOLÍTICA, COAGULANTE Y HEMOLÍTICA INDIRECTA INDUCIDAS POR EL VENENO DE *Bothrops asper* POR EXTRACTOS ETANÓLICOS DE TRES ESPECIES DE HELICONIAS”, uso la misma metodología en la elaboración del medio de cultivo agar sangre obteniendo óptimos resultados, pero a diferencia de la presente investigación, usó el veneno de *Bothrops asper* y un solo extracto que fue el alcohólico.

En este estudio se evidenció que existe diferencia significativa entre extractos, siendo el alcohólico el que presenta mayor actividad anti hemolítica, entre las especies y las diluciones no existe diferencia significativa resultados similares presenta el estudio realizado por Otten (2015)

En la investigación de Torres y Camargo (2004), en su estudio “Interacción entre extractos de órganos de plantas y veneno de *Bothrops neuwiedi diporus* Cope (Yarará chica)”, donde uso la misma técnica para la determinación de la Dosis Mínima Hemolítica (DMIH) obteniendo un halo de hemólisis de 15.00 mm. En la presente investigación se obtuvo un (DMIH) promedio que fue de 15.53 mm.

La presencia de polifenoles y flavonoides presentes en el extracto alcohólico indica una mayor eficacia en la actividad anti hemolítica como lo indica Durán, Montero, Marrugo, (2013) en su estudio “EXTRACTOS METANÓLICOS DE CORTEZA DE GUAYABA (*Psidium guajava* L.) Y MANGO (*Mangifera indica* L.): EFECTO CITOTÓXICO, ANTIHEMOLÍTICO Y EN LA MORFOLOGÍA DE MEMBRANA DE ERITROCITOS” donde se obtuvo los mejores resultados en el extracto alcohólico.

Los extractos alcohólicos tuvieron mayor actividad alexítera ya que mostraron un porcentaje de reducción del halo de hemólisis hasta un 60% en las 3 concentraciones; (1:7), (1:10) y (1:20) veneno-extracto aceptando así la hipótesis alternativa, estableciéndose así resultados similares obtenidos por Granda (2015) en su estudio “Actividad alexítera de los extractos de *Costus pulverulentus* C. Persl *Desmodium adscendens* (Sw.) DC., *Begonia glabra* Aubi., sobre el veneno de *Bothrops asper* (EQUIS)” donde se presenta el mejor porcentaje de reducción (45%) del extracto alcohólico.

## Conclusiones

- La identificación y cuantificación de polifenoles y flavonoides presentes en mayor concentración en *Lonchocarpus utilis* (Barbasco) que en *Adenostemma lavenia* (Araratz), podría suponer que la primera especie tiene una mayor eficacia como antídoto anti hemolítico contra el veneno de *B. atrox*.
- Para la dosis mínima hemolítica utilizada en esta investigación, el extracto alcohólico de ambas especies presenta mayor capacidad neutralizante al ser comparado con los extractos acuosos y heptánicos ya que presenta una disminución del 60% del halo de hemolisis generado por el veneno de serpiente de *B. atrox*, no existieron diferencias significativas de actividad anti hemolítica entre *Lonchocarpus utilis* (barbasco) y *Adenostemma lavenia* (Araratz)
- Los extractos alcohólicos de ambas especies presentan mayor actividad anti hemolítica desde las proporciones 1:7 veneno: extracto; no obstante, el extracto acuoso, que generalmente se usa por los nativos amazónicos, también tiene una actividad moderada para las hojas de *L. utilis* en proporción 1:20 V: E, provocando una disminución de actividad hemolítica del veneno de *B. atrox* de alrededor del 16%.

## Referencias

- Acosta, M. (1992). *Vademecum de Plantas Medicinales del Ecuador*. Quito: Abyayala .
- Arias, R., & Gualli, A. (2013). *Estudio Comparativo del Té de la especie (Ilex guayusa)* . Obtenido de Tesis de grado :  
<https://www.dspace.espol.edu.ec/retrieve/89621/D-79842.pdf>
- Ballester Santovenia, A., de la Campa, J. D., Pérez Pérez, M., & Hourrutinier, B. (2013). *Manual de Prácticas Médicas - Hospital Hermanos Ameijeiras*. Obtenido de Obtención de componentes sanguíneos:  
<http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/hematologia/componentesangre.pdf.pdf>
- Barahona, V. (2013). *Evaluación de la actividad antioxidante y valor nutracéutico de las hojas y frutos de la Guanábana (Annona muricata)*. Obtenido de Tesis de Grado:  
<http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/2453/1/56T00321.pdf>
- Basurto, L. (2 de Agosto de 2001). *Todo sobre el Cube o Barbasco*. Obtenido de Alnicolsa: <http://taninos.tripod.com/cube.htm>
- Bedascarrasbure, E., & Maldonado, L. (2004). *Contenido de Fenoles y Flavonoides del Propoleos Argentino*. Obtenido de  
[http://www.latamjpharm.org/trabajos/23/3/LAJOP\\_23\\_3\\_2\\_2\\_50A9K8V7K9.pdf](http://www.latamjpharm.org/trabajos/23/3/LAJOP_23_3_2_2_50A9K8V7K9.pdf)
- Bergillos, F., & Rivas, M. (2013). Epotoxinas. En F. Bergillos, *Picaduras y mordeduras de animales: tratado de Toxicología Clínica* (págs. 1093-1095).

España: Bubok Publishing S.L. Obtenido de Picaduras y Mordeduras de animales.

Bermejo, A., Pereira, S., Cintra, M., & Morales, G. (octubre de 2014).

*Determinación de parámetros químico- físico de las tinturas al 20% obtenidas de las hojas, tallos y frutos de Melia azedarach L (Pursiana).*

Obtenido de Revista Habanera de Ciencias Médicas:

[http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1729-519X2014000500004](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1729-519X2014000500004)

Blair, S., & Madrigal, B. (2005). *Plantas antimaláricas de Tumaco*. Antioquia: Universidad de Antioquia.

Burneo, S. (2014). *Megadiversidad* . Obtenido de Flacso:

<http://repositorio.flacsoandes.edu.ec/bitstream/10469/201/1/04.%20B.%20Art%20C3%ADculo%20completo.pdf>

Cabrera, H., Morón, F., Amador, M., García, A., & Acosta, L. (septiembre de 2012).

*Composición fitoquímica de partes aéreas frescas de Phania matricarioides.*

Obtenido de Revista Cubana de Plantas Medicinales:

[http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1028-47962012000300007](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962012000300007)

Carbonell, D., & Jativa, C. (2002). *Bioactividad de plantas Amazónicas*. Quito: Abya-Yala.

Castillo, E. (2014). *Estudio pre-clínico de la Guadivuca (Piper carpunya) de propiedades y efecto anti ulceroso en ratas Wistar*. Obtenido de Tesis de

grado: [http://repositorio.utmachala.edu.ec/bitstream/48000/1332/7/CD00244-  
TESIS.pdf](http://repositorio.utmachala.edu.ec/bitstream/48000/1332/7/CD00244-<br/>TESIS.pdf)

Córdova, G., & Santos, D. (enero de 2014). *Factores asociados a las complicaciones de un accidente ofídico en pacientes que ingresaron al hospital general Puyo de la Provincia de Pastaza en el periodo enero 2007 a diciembre 2013.*

Obtenido de Tesis de maestría:

<http://repositorio.puce.edu.ec/bitstream/handle/22000/8886/ACCIDENTE%20OFIDICO%20TESIS%202015.pdf?sequence=1>

Criollo, A. (2015). *Determinación cuantitativa de polifenoles y metabolitos.*

Obtenido de Tesis de grado:

[http://repositorio.utmachala.edu.ec/bitstream/48000/3177/1/CD000006-  
TRABAJO%20COMPLETO.pdf](http://repositorio.utmachala.edu.ec/bitstream/48000/3177/1/CD000006-<br/>TRABAJO%20COMPLETO.pdf)

Cumming, R. (13 de septiembre de 2010). *flickriver*. Obtenido de Adenostemma:

<http://www.flickriver.com/search/Adenostemma/>

DGUERRA99. (22 de diciembre de 2015). *Emponzoñamiento Ofídico en Venezuela.*

Obtenido de El rincón del medicoblasto:

<https://dguerra99.wordpress.com/2015/12/22/emponzonamiento-ofidico-en-venezuela/>

Durán, M., Montero, P., & Marrugo, Y. (diciembre de 2013). *EXTRACTOS*

*METANÓLICOS DE CORTEZA DE GUAYABA (Psidium guajava L.) Y*

*MANGO (Mangifera indica L.): EFECTO CITOTÓXICO,*

*ANTIHEMOLÍTICO Y EN LA MORFOLOGÍA DE MEMBRANA DE*

*ERITROCITOS.* Obtenido de Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación

Científica:

[http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0123-42262013000200006](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-42262013000200006)

Ecured. (14 de febrero de 2017). *Barbasco*. Obtenido de

<https://www.ecured.cu/Barbasco>

Ecured. (10 de febrero de 2017). *Bothrops*. Obtenido de

<https://www.ecured.cu/Bothrops>

Enríquez, S. (1999). *Fauna herpetológica amazónica*. Quito: Abya Yala. Obtenido

de <http://giorgetta.ch/serpientes.htm>

Fernández, A. (23 de agosto de 2013). *El Barbasco*. Obtenido de Correo del Caroní:

<http://www.correodelcaroni.com/index.php/opinion/item/718-el-barbasco>

Giogina, G. (2011). *Identificando a las serpientes en México*. Obtenido de La dosis

hace al veneno:

[http://ladosishacealvenenold50.blogspot.com/2014\\_02\\_01\\_archive.html](http://ladosishacealvenenold50.blogspot.com/2014_02_01_archive.html)

Gracia Nava, M. A. (2015). *Universidad Autónoma de Querétaro*. Obtenido de

Cuantificación de fenoles y flavonoides totales en extractos naturales:

[http://www.uaq.mx/investigacion/difusion/veranos/memorias-](http://www.uaq.mx/investigacion/difusion/veranos/memorias-2007/56_1UAQGarciaNava.pdf)

[2007/56\\_1UAQGarciaNava.pdf](http://www.uaq.mx/investigacion/difusion/veranos/memorias-2007/56_1UAQGarciaNava.pdf)

Granda, N. (mayo de 2015). *Actividad alexítera de los extractos de *Costus**

*pulverulentus* C. Persl *Desmodium adscendens* (Sw.) DC., *Begonia glabra*

*Aubi.*, sobre el veneno de *Bothrops asper* (EQUIS). Obtenido de Tesis de

grado: <http://www.dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/9370/1/UPS->

[QT07103.pdf](http://www.dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/9370/1/UPS-QT07103.pdf)

Grupo de vigilancia y control de enfermedades transmisibles. (13 de agosto de 2010).

*Protocolo de vigilancia de accidente ofídico.* Obtenido de Ministerio de salud y protección social Colombia:

[https://www.minsalud.gov.co/comunicadosPrensa/Documents/ACCIDENTE\\_OFIDICO.pdf](https://www.minsalud.gov.co/comunicadosPrensa/Documents/ACCIDENTE_OFIDICO.pdf)

Gutiérrez, J. M., Lomonte, B., & Rojas, G. (2014). *El suero antiofídico polivalente*

*producido en Costa Rica.* Obtenido de Biblioteca Nacional de Salud y Seguridad Social Costa Rica:

<http://www.binasss.sa.cr/revistas/rccm/v9n2/art7.pdf>

Gutiérrez, M., Limachi, G., Gonzales, E., & Bermejo, P. (junio de 2011). *Control de*

*Calidad del Xanthium spinosum, planta medicinal expendida en la ciudad de La Paz, Bolivia.* Obtenido de BIOFARBO:

[http://www.revistasbolivianas.org.bo/scielo.php?pid=S1813-53632011000100003&script=sci\\_arttext&tlng=es](http://www.revistasbolivianas.org.bo/scielo.php?pid=S1813-53632011000100003&script=sci_arttext&tlng=es)

Huerta, A. (2013). *Determinacion de cenizas.* Obtenido de Academia.edu:

[http://www.academia.edu/7103341/Determinacion\\_de\\_cenizas](http://www.academia.edu/7103341/Determinacion_de_cenizas)

Instituto Nacional de Salud Colombia. (2013). *Suero antiofídico polivalente.*

Obtenido de

<http://simposiovirologia.ins.gov.co/Documents/INFORMACION%20SUERO%20ANTIOFIDICO%20POLIVALENTE.pdf>

Lopez, J., & Perez, J. (16 de agosto de 2009). *Plantas Alexiteras.* Obtenido de

Antidotos vegetales contra las picaduras de serpientes venenosas:

<https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/2867907.pdf>

Mariños, C., & Julia, C. (28 de Junio de 2013). *ResearchGate*. Obtenido de Efecto biocida del «barbasco» *Lonchocarpus utilis* (Smith, 1930) como regulador de larvas de mosquitos:  
[https://www.researchgate.net/publication/269551404\\_Efecto\\_biocida\\_del\\_barbasco\\_Lonchocarpus\\_utilis\\_Smith1930\\_como\\_regulador\\_de\\_larvas\\_de\\_mosquitos](https://www.researchgate.net/publication/269551404_Efecto_biocida_del_barbasco_Lonchocarpus_utilis_Smith1930_como_regulador_de_larvas_de_mosquitos)

Martínez, E. (1991). *Actividad hemolítica de venenos de serpientes de los géneros Bothrops, Lachesis, Crotalus y Micrurus (Serpentes: Viperidae y Elapidae)*. Obtenido de Red iberoamericana de innovación y conocimiento científico:  
[http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:sevk36NkAFQJ:www.redib.org/recursos/Record/oai\\_articulo945139-actividad-hemolitica-venenos-serpientes-generos-bothrops-lachesis-crotalus-micrurusserpentes-viperidae-elapidae+&cd=1&hl=es&ct=clnk&gl=ec](http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:sevk36NkAFQJ:www.redib.org/recursos/Record/oai_articulo945139-actividad-hemolitica-venenos-serpientes-generos-bothrops-lachesis-crotalus-micrurusserpentes-viperidae-elapidae+&cd=1&hl=es&ct=clnk&gl=ec)

Maruñak, S., Bogado, F., Ortiz, M., Gasko, H., & Pérez, O. (2013). *Acción de venenos ofídicos del género Bothrops (yarará) sobre la membrana de eritrocitos de carnero*. Obtenido de SCielo:  
<http://www.scielo.org.ar/pdf/revet/v24n2/v24n2a06.pdf>

Ministerio de salud pública. (2008). *Manual de normas y procedimientos sobre prevención y tratamiento de accidentes ocasionados por mordeduras de serpientes*. Obtenido de Dirección de normalización del sistema nacional de salud:  
<https://bibliotecapromocion.msp.gob.ec/greenstone/collect/promocin/index/assoc/HASHe6b7.dir/doc.pdf>

MUNDOBIODIVERSO. (julio de 2009). *Plantas medicinales y aromáticas*.

Obtenido de MundoBioDiverso.com:

<http://mundobiodiverso.blogia.com/2009/072602-plantas-medicinales-y-aromaticas.php>

Murillo, J., & Prada, E. (2009). *Estudio químico y toxicidad del veneno de serpientes de la familia VIPERIDAE Bothrops atrox mantenidas en cautiverio en el serpentario de la universidad de la amazonía*. Obtenido de Tesis de grado:  
<http://www.probiol.com/images/pdf/estudioquimicoydetoxicidadelvenenodeserpientesbothropsatrox.pdf>

Nakasone, A., & Ivancovich, V. (abril de 2002). *Ofidismo*. Obtenido de Revista de Posgrado de la VIa Cátedra de Medicina:  
<http://med.unne.edu.ar/revista/revista114/ofidismo.htm>

Ortiz, C. (2012). Variaciones en las actividades enzimáticas del veneno de la serpiente *Bothrops atrox* "jergón", de tres zonas geográficas del Perú. *Scielo*, 64-73.

Otten, P. (2015). Evaluación de la capacidad neutralizante de extractos de. *Ciencia, Tecnología y Salud*, 25-37.

Palacios, Z., Delgado, G., Moreno, M., Kato, M., & Rojas, C. (diciembre de 2009). *Actividad antifúngica in vitro de extractos crudos de Piper tuberculatum*. Obtenido de Revista Peruana de Biología:  
[http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1727-99332009000200014&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1727-99332009000200014&script=sci_arttext)

- PARASITIPEDIA.net. (2013). *ROTENONA, insecticida natural vegetal*. Obtenido de  
de  
[http://parasitipedia.net/index.php?option=com\\_content&view=article&id=417&Itemid=446](http://parasitipedia.net/index.php?option=com_content&view=article&id=417&Itemid=446)
- Patiño, V. M. (2014). *Medicinales, estimulantes, venenosas Insecticidas*. Obtenido de Biblioteca Luis Ángel Arango:  
<http://www.banrepcultural.org/blaavirtual/historia/pad/pad3a.htm>
- Pereañez, 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. *VITAE, REVISTA DE LA FACULTAD DE QUÍMICA FARMACÉUTICA*, 157-164. Obtenido de  
<http://www.scielo.org.co/pdf/vitae/v15n1/v15n1a19.pdf>
- Pérez, A. (6 de septiembre de 2013). *Bothrops Atrox*. Obtenido de Manual ofídico:  
<http://manual-ofidico.blogspot.com/2013/09/bothrops-atrox.html>
- Quesada, J., & Quesada, E. (19 de Junio de 2012). *Prevención y manejo de mordeduras por serpientes*. Obtenido de Scielo:  
[http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1025-02552012000300014](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1025-02552012000300014)
- Ramírez, A., & Balqui, J. (2004). *Alejandro Ramirez*. Obtenido de Microbiología y medios de cultivo: <http://www.alejandro-ramirez.com/microbio.pdf>
- Reptilia Web. (2014). *Reptiles Ecuador*. Obtenido de ReptiliaWebEcuador:  
<http://zoologia.puce.edu.ec/Vertebrados/reptiles/reptilesEcuador/>

- Reyes, R., & Jimenez, M. (17 de Febrero de 2002). *Química de las plantas alexiteras*. Obtenido de Interciencia:  
[http://www.interciencia.org/v20\\_05/art03/](http://www.interciencia.org/v20_05/art03/)
- Riaño, D., & Chuvieco, E. (enero de 2015). *Estimación de la Humedad de Diferentes Especies Vegetales Mediterráneas mediante Distintos Sensores de Teledetección*. Obtenido de ResearchGate:  
[https://www.researchgate.net/profile/Emilio\\_Chuvieco/publication/268183606\\_Estimacion\\_de\\_la\\_Humedad\\_de\\_Diferentes\\_Especies\\_Vegetales\\_Mediterraneas\\_mediante\\_Distintos\\_Sensores\\_de\\_Teledeteccion/links/54aea1bb0cf29661a3d39e8b/Estimacion-de-la-Humedad-de-Dife](https://www.researchgate.net/profile/Emilio_Chuvieco/publication/268183606_Estimacion_de_la_Humedad_de_Diferentes_Especies_Vegetales_Mediterraneas_mediante_Distintos_Sensores_de_Teledeteccion/links/54aea1bb0cf29661a3d39e8b/Estimacion-de-la-Humedad-de-Dife)
- Rondon, J. (14 de Noviembre de 2002). *Guía descriptiva de los barbascos de Venezuela*. Obtenido de Universidad de los Andes-Venezuela:  
<http://www.saber.ula.ve/bitstream/123456789/23765/1/articulo43-9.pdf>
- Secretaría de salud del estado de Veracruz. (2014). *Guía de diagnóstico y tratamiento de intoxicación por accidente ofídico bothrópico*. Obtenido de <http://web.ssaver.gob.mx/citver/files/2014/03/Accidente-Of%C3%ADdico-Bothr%C3%B3pico.pdf>
- serpientesdevenezuela.net. (2012). *Bothrops atrox*. Obtenido de <http://www.serpientesdevenezuela.net/web/index.php/familias/viperidae?id=174>
- Sharapin, N. (2000). *Fundamentos de tecnología de producto fitoterapéuticos*. Santa fe de Bogota: Impreandes.

Sisalema, D. (2013). Separación de metabolitos secundarios de Martin Galvis (Senna multijuga) con actividad antibacteriana. *Tesis de grado*. Riobamba, Ecuador: Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Torres, A., & Camargo, F. (12 de Agosto de 2004). *UNIVERSIDAD NACIONAL DEL NORDESTE*. Obtenido de <http://www.unne.edu.ar/unnevieja/Web/cyt/com2004/8-Exactas/E-059.pdf>

TUPIZA . (2015). *Serpientes*. Obtenido de <http://giorgetta.ch/serpientes.htm>

Turner, B. L. (12 de julio de 2016). *Adenostemma lavenia*. Obtenido de Flora de Nicaragua: <http://www.tropicos.org/name/02700023?projectid=7>

Valls, J. (17 de marzo de 2016). *Características de los reptiles*. Obtenido de reptiles: <http://reptiles.tuatera.com/reptiles-caracteristicas/>

Walteros, D. (18 de Agosto de 2014). *Instituto Nacional de Salud de Colombia*. Obtenido de ACCIDENTE OFIDICO: <http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/Subdireccion-Vigilancia/sivigila/Protocolos%20SIVIGILA/PRO%20Accidente%20Ofidico.pdf>

Yarlequé, M., Ortiz, C., Morante, Y., & Yarlequé, A. (junio de 2012). *Estudio comparativo de algunas propiedades bioquímicas de venenos de serpientes de diferentes regiones del mundo*. Obtenido de Revista de la Sociedad Química del Perú: [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1810-634X2012000100004&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1810-634X2012000100004&script=sci_arttext)

## Anexos

### Anexo 1. Permisos para recolección de plantas

 **Ministerio del Ambiente**

 **GOBIERNO AUTÓNOMO DE MORONA SANTIAGO**

**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 Zamba, pone a consideración el proyecto de investigación nominada: "Actividad Alexitira de Especies Vegetales Amazónicas" para la aprobación y emisión de la autorización.

Mediante oficio s/n da el AVAL la Ing. Diana Calero Cossuoga, 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 analizada por la Sta. Ing. Forestal Ing. María Gabriela Ramírez Tixe, 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 300 g. de las partes aéreas y una planta completa para identificación y montaje 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 comúnmente utilizadas para tratar mordeduras de serpientes a fin de coleccionar muestras de las 10 especies más utilizadas" por la propuesta: "Colectar muestras de Pallaesta discolor (Kunt) Aristeg., Tradescantia zanonii (L.) Sw., Lanchotarpus utilis AC Sm., Muehlenb. cf. pubescens (Ruiz & Pav.),

*Recibido  
Wilson Tapia H.  
040094281-9  
17-10-2016  
10:52 AM.*

**SECRETARÍA DEL MINISTERIO DEL AMBIENTE DE MORONA SANTIAGO**  
Calle: Francisco Morúa  
Macas - Ecuador  
Código Postal: 140100  
Teléfono: (06) 2 270001 - 270000  
www.mambiente.gub.ec

1/2

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 nominada: "Actividad Alexítora de Especies Vegetales Amazónicas" para la aprobación y omisión 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 analizada por la Sta. Ing. Forestal Ing. María Gabriela Ramírez Tixe, 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 montaje 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 comúnmente utilizadas para tratar mordeduras de serpientes a fin de coleccionar muestras de las 10 especies mas utilizadas" **por la propuesta:** "Colectar muestras de Pallaesta discolor (Kunt) Aristeg., Tradescantia zozonia (L.) Sw., Lanchocarpus utilis AC Sm., Mucuna cf. pubescens (Ruiz & Pav).

Firma Original

Documento gubernamental 2016

DIRECCIÓN PROVINCIAL DEL AMBIENTE DE MORONA SANTIAGO  
Av. 24 de Mayo entre Alameda Central y Cda. Francisco Morúa  
Macas - Ecuador  
Código Postal: 540100  
Teléfono: (06) 7 270622 - 270688  
www.morona.gov.ec



1/2

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

MACAS, 14 de octubre de 2016

Macas, 14 de octubre de 2016

*Mimosa* cf. *mollis* (Kunth) Griseb, especies vegetales referenciadas en la literatura como útiles para el tratamiento de mordeduras de serpientes en la provincia de Morona Santiago que habilita la autorización solicitada.

Con los antecedentes anotados comedidamente pongo en su despacho la **AUTORIZACION DE INVESTIGACION CIENTIFICA N° 08-16 -IC-FLO-B-DPAMS/MAE, FLORA (X)** para su conocimiento y aprobación respectiva.

Con sentimientos de distinguida consideración

Atentamente,



  
Sr. Alexander Miguel Anganiara Valdivieso  
**ESPECIALISTA DE PATRIMONIO NATURAL 3**

Copia:

Sr. Dr. Luis Florencio Sacalobay Cuallpa  
Responsable de Vida Silvestre - Unidad de Patrimonio Natural Morona Santiago

Sra. Ing. María Gabriela Ramírez Tiza  
Especialista Forestal Provincial





## AUTORIZACION DE INVESTIGACION CIENTÍFICA

N° 08-16 -IC-FLO-B-DPAMS/MAE

FLORA (X)

FAUNA ( )

VARIOS ( )

El Ministerio del Ambiente, en uso de las atribuciones que le confiere la Codificación a la Ley Forestal y de Conservación de Áreas Naturales y Vida Silvestre autoriza a:

Investigador/es	C.I/ Pasaporte	Nacionalidad
Q. F. Tapia Hernández Wilson Fabián, investigador principal	CI: 0400942819	Ecuatoriana
Leda Karolys Gutiérrez Germana Margarita, investigadora adicional	CI: 1708492499	Ecuatoriana
Navarrete Espinel Maria Andrea, estudiante	CI: 1723923106	Ecuatoriana
Reyes Córdova Michael Xavier, estudiante	CI: 1721592804	Ecuatoriana
Muñoz carrión Ronalt Cristian, estudiante	CI: 1722125703	Ecuatoriana
Cueva Pungacho Jenny Verónica, estudiante	CI: 1723447213	Ecuatoriana
Zumba Abdo Magaly Estefanía, estudiante	CI: 1724668874	Ecuatoriana
León Cárdenas Karen Priscila, estudiante	CI: 1725809501	Ecuatoriana

Para que lleven a cabo la investigación científica: "Actividad Alexítora de Especies Vegetales Amazónicas"

### De acuerdo a las siguientes especificaciones

1. Solicitud mediante oficio s/n de fecha 08 de septiembre de 2016, firmado por 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 para la aprobación y emisión de la autorización. Mediante oficio s/n se da el AVAL de 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.
2. Auspicio de Institución Científica Nacional: Herbario de la Pontificia Universidad Católica de Quito y la Universidad Politécnica Salesiana.
3. Auspicio de Institución Científica Internacional: ninguna.
4. Institución que financia la investigación: Universidad Politécnica Salesiana.

La falta de entrega de los resultados finales en los formatos indicados será causa suficiente para que el investigador no pueda continuar con las actividades de investigación en el país.

5. Contraparte del Ministerio del Ambiente: Responsable de Vida Silvestre de la Dirección Provincial del Ministerio del Ambiente de Morona Santiago, Dr. Médico Veterinario y Zootecnista Luis Florencio Sucuzhañay Gualipa.
6. Inicio y final de investigación: 10 de octubre de 2016 al 09 de octubre de 2017.

7. Entrega de informe final: 09/10/2017.
8. Valoración técnica del proyecto: Ing. María Gabriela Ramírez Tixe.
9. Esta Autorización **NO HABILITA MOVILIZACIÓN DE FLORA / FAUNA O MICROORGANISMOS**, sin el correspondiente permiso competencia de la Dirección Provincial del Ambiente de Morona Santiago, y que deberá gestionarse en esta dependencia.
10. Esta Autorización **NO HABILITA EXPORTACION DE ESPECIMENS DE LA VIDA SILVESTRE**, documento que deberá obtenerse en la Dirección Nacional de Biodiversidad.
11. Estas muestras no podrán ser utilizadas en cualquier actividad de **BIOPROSPECCIÓN, ACCESO A RECURSO GENÉTICO**, la competencia de Acceso a Recursos Genéticos es exclusiva del MAE, Unidad de Recursos Genéticos.
12. De los resultados que se desprenda de la investigación, no podrán ser utilizados para estudios posteriores de Acceso a Recursos Genéticos sin la previa autorización del Ministerio del Ambiente del Ecuador.

#### Complementos autorizados para llevar a cabo la Investigación

13. Muestras: al menos 500 gr. de las partes aéreas de las plantas seleccionadas y una planta completa (si es posible) para identificación y montaje en el laboratorio.

En los cantones: Morona: parroquia Sevilla y Huamboya: parroquia Chiguaza.

#### Obligaciones del investigador

14. Entregar al Ministerio del Ambiente, Dirección Provincial de Morona Santiago, (02) dos copias del informe final impreso en formato PDF, (incluyendo una versión digital), de los resultados de la autorización otorgada.
15. Citar en las publicaciones científicas: tesis o informes técnicos científicos, el número de Autorización de Investigación Científica otorgada por el Ministerio del Ambiente, con el que se colectó el material.
16. Entregar (2) copias de las publicaciones a la Dirección Provincial del Ambiente de Morona Santiago.
17. Entregar copias del material fotográfico que puedan ser utilizados para difusión (se respetara los derechos de autor).

Del incumplimiento de las obligaciones dispuestas en los numerales 14, 15, 16 y 17 se responsabiliza al Sr. Q. F. Tapia Hernández Wilson Fabián, **investigador principal y DOCENTE- INVESTIGADOR-UPS**

La falta de entrega de los resultados finales en los formatos indicados será causa suficiente para que el investigador no pueda continuar con las actividades de investigación en el país.

**SE AUTORIZA LA INVESTIGACIÓN EN:** la provincia de Morona

Santiago, cantones:

Morona, parroquia Sevilla Don Bosco, latitud: 231667 (2°22'45.61" S), longitud: 78109151 (78°6'32.94" W)

Huamboya, parroquia Chiguaza, latitud: 2043534 (2°2'36.72" S), longitud: 77984201 (77°59'3.12" W)

**SE AUTORIZA EL ESTUDIO DE MUESTRAS BIOLÓGICAS CON EL PROPÓSITO DE:**

18. Determinar la actividad alexitera de extractos de especies vegetales amazónicas del cantón Morona y Huamboya de la Provincia de Morona Santiago.

19. Colectar muestras de especies vegetales que constan en el objetivo específico 2, referenciadas en la literatura como útiles para el tratamiento de mordedura de serpientes en la provincia de Morona Santiago.

20. Realizar ensayos de actividad biológica *in vitro* comúnmente utilizados sobre los extractos secos totales para determinar actividad alexitera: antihemólisis, anticoagulación, inhibición de proteólitos y electroforesis SDS-PAGE de los extractos de las especies colectadas en los cantones Morona y Huamboya sobre el veneno de la *Bothrops atrox*.

**SE AUTORIZA LA UTILIZACIÓN DE LOS SIGUIENTES MATERIALES Y/O EQUIPOS PARA LA REALIZACIÓN DE ESTA INVESTIGACION.**

21.- Materiales, equipo, reactivos y otros.

COMPONENTE	
MATERIALES, EQUIPO, REACTIVOS, ETC	CANTIDAD
Bolsas plásticas	100
Brújula	1
Binoculares	5
Cámara fotográfica digital	5
Poncho de lluvia	5
Cuchilla	4
Espolones o espárragos para trepar árboles	5
Geoposicionador	1
Lápiz de cera o grafito 2HB	10
Libreta o libro de campo	1
Machete	4
Mapa	2
Marcador permanente	5
Mochila para cargar alimentos, libros, etc.	4
Podadora de extensión	2
Podadora de mano	2
Tubeta de 100 cm por 50 cm	1
tollo de cuerdas delgada (piola)	1
lopa adecuada	1
metro de cinta metálica	2

La falta de entrega de los resultados finales en los formatos indicados será causa suficiente para que el investigador no pueda continuar con las actividades de investigación en el país.



**OBLIGACIONES Y CONDICIONES PARA LA VIGENCIA DE ESTA AUTORIZACIÓN:**

22. ESTA AUTORIZACIÓN ES EMITIDA BAJO LOS TÉRMINOS EXPRESADOS EN LA PROPUESTA DE INVESTIGACIÓN, EN TAL SENTIDO NO HABILITA EL MANEJO DE FAUNA Y FLORA.

23. LOS INVESTIGADORES DEBERÁN REALIZAR SUS INTERVENCIONES EN EL CAMPO BAJO UN MANEJO RESPONSABLE Y ÉTICO CON LOS ESPECÍMENES ASÍ COMO CON LOS EQUIPOS Y MATERIALES UTILIZADOS DURANTE LA INVESTIGACIÓN.

24. PARA EL INGRESO A LAS ÁREAS DE PROPIEDAD PRIVADA LOS INVESTIGADORES DEBERÁN CONTAR CON LA AUTORIZACIÓN DEL RESPECTIVO PROPIETARIO.

25. PARA EL INGRESO A LAS ÁREAS NATURALES PROTEGIDAS LOS INVESTIGADORES DEBERÁN CONTAR CON LA AUTORIZACIÓN DEL RESPECTIVO RESPONSABLE DEL ÁREA.

26. NO SE AUTORIZA LA UTILIZACIÓN DE ARMAS DE FUEGO, EXPLOSIVOS O SUSTANCIAS VENENOSAS COMO METODOLOGÍA DE ESTA INVESTIGACIÓN.

27. SE PROHÍBE EL INGRESO A LAS ÁREAS NATURALES EN ESTADO ETILICO, PORTANDO ARMAS, EXPLOSIVOS, TÓXICOS, CONTAMINANTES, MATERIAL VEGETATIVO, ESPECIES ANIMALES Y EN GENERAL TODO AQUELLO QUE ATENTE A LA INTEGRIDAD DEL ÁREA.

28. ESTA AUTORIZACIÓN DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA PODRÁ SER RENOVADA ANUALMENTE PREVIO AL CUMPLIMIENTO DE LAS OBLIGACIONES CONTRAIDAS POR EL INVESTIGADOR, ENTREGA Y APROBACIÓN DE INFORMES PARCIALES O FINALES EN LAS FECHAS INDICADAS.

29. SE SOLICITARÁ PRÓRROGA QUINCE DÍAS ANTES DE LA FECHA DE VENCIMIENTO QUE INDICA ESTE DOCUMENTO.

30. TODO USO INDEBIDO DE ESTA AUTORIZACIÓN, ASÍ COMO EL INCUMPLIMIENTO DE ASPECTOS LEGALES, ADMINISTRATIVOS O TÉCNICOS ESTABLECIDOS EN LA MISMA, SERÁN SANCIONADOS DE ACUERDO A LA CODIFICACIÓN A LA LEY FORESTAL Y DE CONSERVACIÓN DE ÁREAS

La falta de entrega de los resultados finales en los formatos indicados será causa suficiente para que el investigador no pueda continuar con las actividades de investigación en el país.

NATURALES Y VIDA SILVESTRE Y AL TEXTO UNIFICADO DE LA  
LEGISLACIÓN AMBIENTAL SECUNDARIA Y DEMAS NORMATIVA  
PERTINENTE.

31. EL INCUMPLIMIENTO DE CUALQUIERA DE ESTAS DISPOSICIONES ASÍ  
COMO EL USO INDEBIDO DE ESTE DOCUMENTO, O EL INCUMPLIMIENTO DE  
LAS DISPOSICIONES LEGALES, ADMINISTRATIVAS O TÉCNICAS  
ESTABLECIDAS EN LA MISMA, SERÁN SANCIONADOS CONFORME A LA LEY  
FORESTAL Y DE CONSERVACIÓN DE ÁREAS NATURALES Y VIDA SILVESTRE  
CODIFICADA, TEXTO UNIFICADO DE LA LEGISLACIÓN AMBIENTAL  
SECUNDARIA Y CON LA SUSPENSIÓN INMEDIATA DE LA PRESENTE  
AUTORIZACIÓN.

32. TASA POR AUTORIZACIÓN: 20 VEINTE DÓLARES NO REEMBOLSABLES  
DEPOSITADOS EN LA CUENTA 0010000785, CÓDIGO SUBLÍNEA 190499 CON  
REFERENCIA 770770332 EN BAECUADOR, FECHA DE DEPÓSITO: 04/08/2016,  
QUITO.



Ab Maucio Villavicencio O.

DIRECTOR DEL MINISTERIO DEL AMBIENTE DE MORONA SANTIAGO, ENCARGADO

La falta de entrega de los resultados finales en los formatos indicados será causa suficiente para que el investigador no pueda  
continuar con las actividades de investigación en el país.



## SOLICITUD DE CRITERIO TÉCNICO

**De:** "Luis Florencio Sucuzhañay Gualpa" <luis.sucuzhanay@ambiente.gob.ec>  
**Para:** "María Gabriela Ramírez Tixe" <maria.ramirez@ambiente.gob.ec>  
**CC:** "Alexander Miguel Angamarca Valdivieso" <alexander.angamarca@ambiente.gob.ec>  
**Enviados:** Jueves, 13 de Octubre 2016 12:08:44  
**Asunto:** Solicitando criterio técnico para colección de muestras para investigación científica de flora silvestre.

Hago llegar en físico el texto transferido desde Secretaría mediante oficio s/n de fecha 08 de septiembre de 2016, firmado por Q.F. Wilson Tapia H., Ms DÓCENTE 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 para la aprobación y emisión de la autorización considerando que el estudio se dará en elementos de flora silvestre, para que emita si criterio técnico referente al impacto ambiental que que origine la propuesta y ratifique que las especies pertenecen a la flora silvestre.

Saludos Cordiales,



Luis Florencio Sucuzhañay Gualpa



Dirección Provincial de Morona Santiago  
Responsable de Vida Silvestre  
MINISTERIO DEL AMBIENTE

**RESPUESTA: CRITERIO TECNICO**

SOLICITUD DE CRITERIO TÉCNICO

Re: Solicitando criterio técnico para colección de muestras para investigación científica de flora silvestre.

13 de  
Octubre  
2016  
15:19



De:

María Gabriela Ramirez Tixe

Para:

Luis Florencio Sucuzhañay Gualipa

Estimado compañero

De acuerdo al proyecto de investigación Florística, "Actividad Alexifera de Especies Vegetales Amazónicas", la extracción vegetativa de los individuos de cada especie para identificación y muestras para análisis no provocará impacto significativo al hábitat, debido a que la especie *Pollalesta discolor* (Kunt) Aristeg es una especie pionera y de crecimiento rápido, la especie *Lonchocarpus utilis* AC.Sm. es un arbusto y las demás especies son herbáceas, las cuales son muy comunes en los cantones estudiados.

El volumen de colección estimado propuesto de al menos 500 g. de las partes aéreas y una planta completa para identificación y montaje es posible para realizar las pruebas planteadas dentro del estudio para lograr los objetivos propuestos.

\*María Gabriela Ramirez Tixe

RESPUESTA: CRITERIO TÉCNICO

## Anexo 2. Identificación de plantas escogidas



Pontificia Universidad Católica del Ecuador

HERBARIO QCA

Av. 12 de Octubre 1076 y Roca  
Apartado postal 17-01-2184  
Fax: 593 - 2 - 2991 - 687  
Telf: 593 - 2 - 299 1 - 714  
Quito - Ecuador

Quito, 14 de Julio del 2016

### CERTIFICADO DE IDENTIFICACIÓN

#### ***Adenostemma lavenia* (L.) Kuntze**

- Clase: Equisetopsida C. Agardh
- Subclase: Magnoliidae Novák ex Takht.
- Superorden: Asterales Takht.
- Orden: Asterales Link
- Familia: Asteraceae Bercht. & J. Presl
- Género: *Adenostemma* J.R. Forst. & G. Forst.
- Especie: *lavenia* (L.) Kuntze





## Pontificia Universidad Católica del Ecuador

HERBARIO QCA

Av. 12 de Octubre 1076 y Roca  
Apartado postal 17-01-2184  
Fax: 593 - 2 - 2991 - 687  
Tel: 593 - 2 - 299 1 - 714  
Quito - Ecuador

### ***Lonchocarpus utilis* A.C. Sm.**

- Clase: Equisetopsida C. Agardh
- Subclase: Magnoliidae Novák ex Takht.
- Superorden: Rosanae Takht.
- Orden: Fabales Bromhead
- Familia: Fabaceae Lindl.
- Género: *Lonchocarpus* Lindl.
- Especie: *utilis* A.C. Sm.



### Anexo 3. Rendimiento de Extractos

#### Extracto N-heptano

<b>Nombre de la planta</b>	<b>Droga seca (g)</b>	<b>P. de balón vacío (g)</b>	<b>P. balón con extracto (g)</b>	<b>Rendimiento %</b>
<i>Lonchocarpus utilis</i> (raíz)	14,2000	156,4310	156,8281	<b>2.79</b>
<i>Lonchocarpus utilis</i> (hojas)	25,0000	125,3565	125,4383	<b>3.75</b>
<i>Adenostemma lavenia</i> (completa)	25,0646	64,9093	65,1703	<b>2.51</b>

Nota: Realizado por el autor (2016)

#### Extracto alcohólico

<b>Nombre de la planta</b>	<b>Droga seca (g)</b>	<b>P. del balón vacío (g)</b>	<b>P. balón con extracto (g)</b>	<b>Rendimiento %</b>
<i>Lonchocarpus utilis</i> (raíz)	17,1092	124,7902	125,8893	<b>6.42</b>
<i>Lonchocarpus utilis</i> (hojas)	24,3620	64,3944	65,3329	<b>3.85</b>
<i>Adenostemma lavenia</i> (completa)	23,8190	64,9078	65,5363	<b>2.64</b>

Nota: Realizado por el autor (2016)

#### Extracto acuoso

<b>Nombre de la planta</b>	<b>Droga seca (g)</b>	<b>P. del balón vacío (g)</b>	<b>P. balón con extracto (g)</b>	<b>Rendimiento %</b>
<i>Lonchocarpus utilis</i> (raíz)	12,5129	155,3559	155,3975	<b>0.33</b>
<i>Lonchocarpus utilis</i> (hojas)	22,0079	151,9577	152,3133	<b>1.62</b>
<i>Adenostemma lavenia</i> (completa)	26,7466	153,7110	155,4826	<b>6.62</b>

Nota: Realizado por el autor (2016)

#### Anexo 4. Determinación de cenizas

##### Determinación de cenizas totales

Planta	Crisol tarado (gr)	Peso crisol más muestra (gr)	Peso crisol más muestra incinerada (gr)	Porcentaje de cenizas totales (%)
<i>Lonchocarpus utilis</i> (raíz)	22,859	24,909	22,937	<b>3.82</b>
<i>Lonchocarpus utilis</i> (hojas)	20,593	22,621	20,675	<b>4.07</b>
<i>Adenostemma lavenia</i> (completa)	16,357	18,425	16,447	<b>4.38</b>

Nota: Realizado por el autor (2016)

##### Cenizas solubles en agua

Planta	Crisol tarado (gr)	Peso crisol más muestra (gr)	Peso crisol más muestra incinerada (gr)	Peso incinerado final (gr)	Peso incinerado final (gr)
<i>Lonchocarpus utilis</i> (raíz)	21,8017	23,8726	21,9056	21,819	<b>4.18</b>
<i>Lonchocarpus utilis</i> (hojas)	22,859	24,9095	22,9374	22,9058	<b>1.54</b>
<i>Adenostemma lavenia</i> (completa)	22,3885	24,4431	22,6728	22,4806	<b>9.35</b>

Nota: Realizado por el autor (2016)

Cenizas insolubles en ácido clorhídrico

Planta	Crisol tarado (gr)	Peso crisol más muestra incinerada (gr)	Peso incinerado final (gr)	Porcentaje cenizas insoluble (%)
<i>Lonchocarpus utilis</i> (raíz)	23,9313	23,948	23,9309	<b>0.84</b>
<i>Lonchocarpus utilis</i> (hojas)	22,86213	22,9289	22,825	<b>5.09</b>
<i>Adenostemma lavenia</i> (completa)	21,1883	21,2622	21,1957	<b>3.31</b>

Nota: Realizado por el autor (2016)

## Anexo 5. Curva de calibración de Polifenoles totales

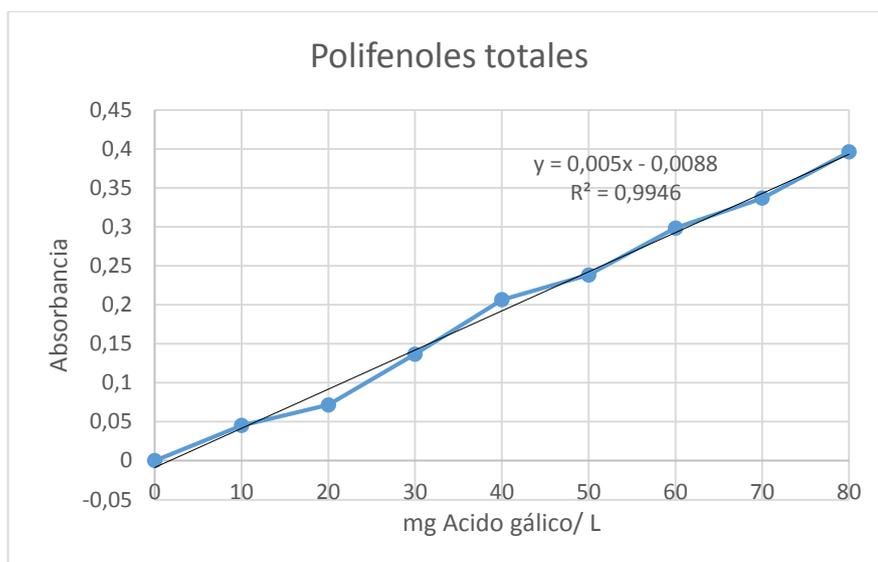


Figura 4. Curva de calibración de fenoles totales

Nota: Realizado por el autor (2016)

Anexo 6. Curva de calibración de Fenoles

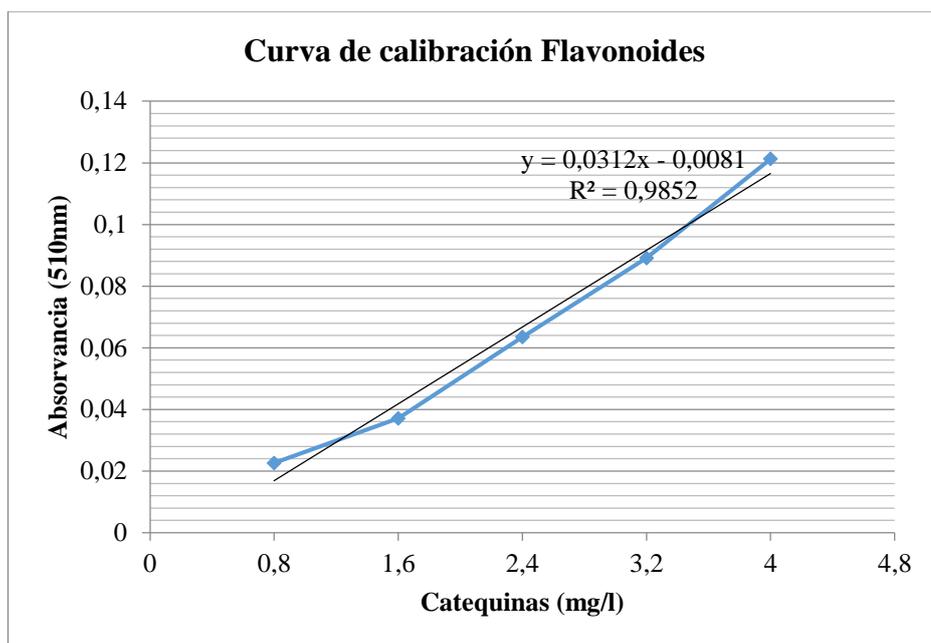
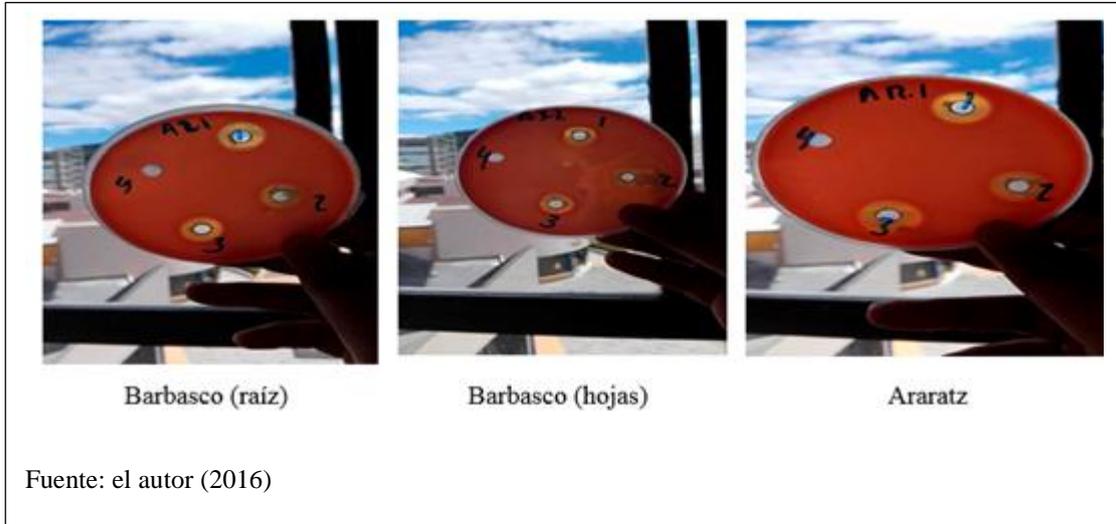


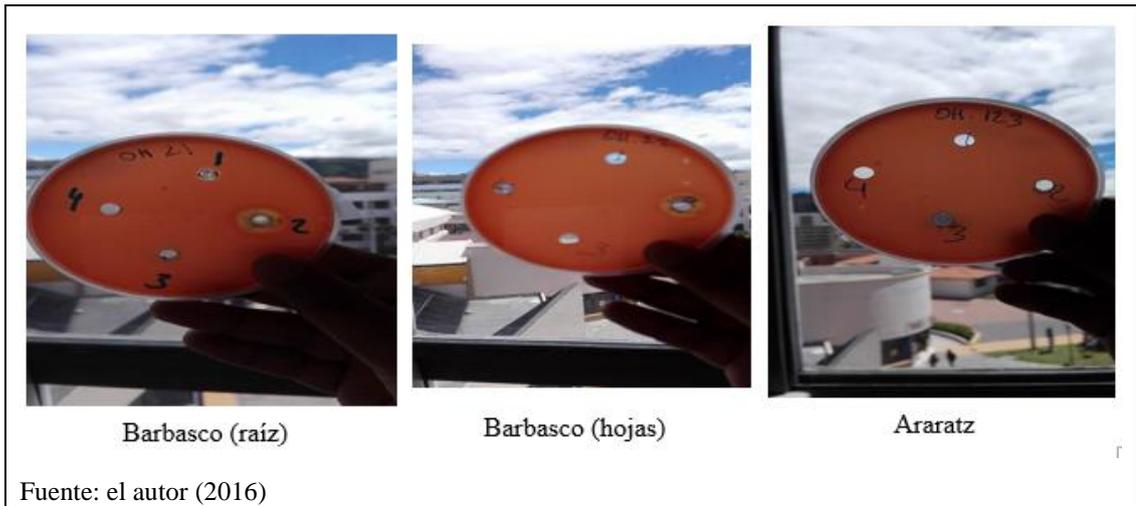
Figura 4. Curva de calibración de fenoles totales

Nota: Realizado por el autor (2016)

Anexo 7. Ilustraciones siembra extracto acuoso



Anexo 8. Ilustraciones siembra extracto alcohólico



Anexo 9. Ilustraciones siembra extracto alcohólico

