

**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA
SEDE QUITO**

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

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

**TEMA:
ACTIVIDAD ALEXÍTERA DE *Adenostemma lavenia* L. (KUNTZE) Y *Pollalesta
discolor* (KUNT) ARISTEG. SOBRE EL VENENO DE *Bothrops atrox*
(PITALALA)**

**AUTORA:
DANIELA BELÉN ALMEIDA VACA**

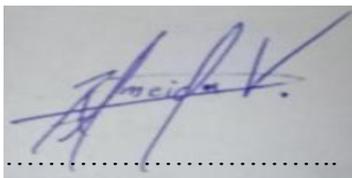
**TUTOR:
MICHAEL VENEGAS FERRÍN**

Quito, junio del 2018.

Cesión de derechos de autor

Yo, Daniela Belén Almeida Vaca, con documento de identificación N° 172597637-5, manifiesto mi voluntad y cedo a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que soy autora del trabajo de titulación titulado: Actividad alexítera de *Adenostemma lavenia* L. (Kuntze) y *Pollalesta discolor* (Kunt) Aristeg sobre el veneno de *Bothrops atrox* (pitalala), mismo que ha sido desarrollado para optar por el título de: Ingeniera en Biotecnología de los Recursos Naturales, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente

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



Daniela Belén Almeida Vaca

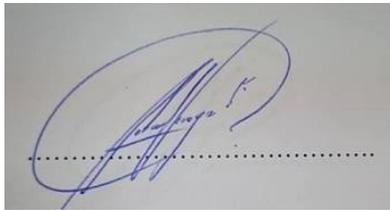
Cédula 172597637-5

Fecha: junio, 2018

Declaratoria de coautoría del docente tutor

Yo, Michael Fabricio Venegas Ferrín, declaro que bajo mi dirección y asesoría fue desarrollado el trabajo de titulación “Actividad alexítera de *Adenostemma lavenia* L. (Kuntze) y *Pollalesta discolor* (Kunt) Aristeg sobre el veneno de *Bothrops atrox* (pitalala)” realizado por: Daniela Belén Almeida Vaca, obteniendo un producto que cumple con todos los requisitos estipulados por la Universidad Politécnica Salesiana para ser considerados como trabajo final de titulación.

Quito, junio, 2018.



Michael Venegas Ferrín

Cédula de identidad 092158638-4

Contenido

RESUMEN.....	
ABSTRACT	
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I: MARCO CONCEPTUAL	5
1.1 Clase Reptilia	5
1.2 Orden Squamata	5
1.3 Suborden Serpentes	6
1.4 Serpientes en el Ecuador	7
1.5 Familia Viperidae	8
1.6 Género Bothrops.....	9
1.7 <i>Bothrops atrox</i>	9
1.8 Ofidismo.....	13
1.9 Accidente ofídico Bothrópico.....	13
1.9.1 Efectos del accidente Bothrópico	14
1.10 Actividad Alexítera.	17
1.11 Descripción de especies.....	18
1.11.1 <i>Adenostemma lavenia</i> L. (Kuntze).....	18
1.11.2 <i>Pollalesta discolor</i> (Kunth) Aristeg.....	21
CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS.....	23

2.1	Obtención del veneno de <i>Bothrops atrox</i>	23
2.2	Obtención de las especies vegetales	23
2.3	Desecado de las muestras vegetales	23
2.4	Obtención de extractos	24
2.4.1	Extracto heptánico	24
2.4.2	Extracto hidroalcohólico	24
2.5	Rehidratación de extractos vegetales.....	25
2.6	Cuantificación de polifenoles	25
2.7	Cuantificación de flavonoides	26
2.8	Determinación de la Dosis Mínima Coagulante de Veneno	26
2.9	Actividad anticoagulante	27
2.10	Actividad anti hemolítica	27
2.10.1	Obtención de eritrocitos lavados.....	27
2.10.2	Determinación de la actividad antihemolítica	28
2.11	Actividad anti proteolítica	29
2.12	Electroforesis SDS-PAGE.....	30
2.13	Análisis estadístico	38
CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....		39
3.1	Obtención de extractos vegetales	39
3.1.1	Extracto heptánico	39

3.1.2 Extracto alcohólico	39
3.2 Cuantificación de polifenoles	41
3.3 Cuantificación de flavonoides	42
3.4 Determinación de la dosis mínima de coagulante de veneno.....	43
3.5 Actividad anticoagulante de los extractos vegetales	44
3.5.1 Análisis estadístico de la actividad anticoagulante.....	45
3.6 Actividad antihemolítica	47
3.6.1 Análisis estadístico de la actividad antihemolítica	50
3.7 Actividad antiproteolítica	51
3.7.1 Análisis estadístico de la actividad antiproteolítica.....	54
3.8 Electroforesis SDS-PAGE.....	57
CONCLUSIONES	67
REFERENCIAS	70
ANEXOS	87

Índice de tablas

Tabla 1. Identificación taxonómica de <i>Adenostemma lavenia</i> L. (Kuntze)	18
Tabla 2. Identificación taxonómica de <i>Pollalesta discolor</i> (Kunth) Aristeg.	21
Tabla 3. Densidades relativas de los extractos vegetales	25
Tabla 4. Peso en gramos de los extractos n-heptánicos	39
Tabla 5. Peso en gramos de los extractos alcohólicos	40
Tabla 6. Concentración de polifenoles en los extractos vegetales	41
Tabla 7. Concentración de flavonoides en los extractos vegetales	42
Tabla 8. Tiempo de coagulación de plasma sanguíneo.....	43
Tabla 9. Tiempo de coagulación del plasma sanguíneo bajo los efectos de la interacción del veneno y los extractos vegetales.....	44
Tabla 10. Análisis de varianza (ANOVA) de la prueba de anticoagulación	45
Tabla 11. Test de Duncan. Interacción entre la especie y extracto de la actividad anticoagulante	46
Tabla 12. Porcentajes de hemólisis de los eritrocitos en las soluciones blanco, veneno y extractos vegetales con veneno	48
Tabla 13. Análisis de varianza (ANOVA) de la prueba de antihemólisis	50
Tabla 14. Test de Duncan. Actividad antihemolítica de la especie y extracto.....	51
Tabla 15. Actividad antiproteolítica de los extractos vegetales	52
Tabla 16. Análisis de varianza (ANOVA) de la prueba de antiproteólisis	54
Tabla 17. Test de Duncan. Actividad antiproteolítica de la especie y extracto	55
Tabla 18. Test de Duncan. Actividad antiproteolítica de las especies	56
Tabla 19. Test de Duncan. Actividad antiproteolítica de los extractos.....	56

Tabla 20. Movilidad electroforética relativa (Rf) y peso molecular (PM) de las bandas pertenecientes al veneno patrón (VP)	59
Tabla 21. Movilidad electroforética relativa (Rf) y peso molecular (PM) de las bandas pertenecientes a los tratamientos del veneno patrón con extracto heptánico y alcohólico de <i>Pollalesta discolor</i>	60
Tabla 22. Movilidad electroforética relativa (Rf) y peso molecular (PM) de las bandas pertenecientes a los tratamientos del veneno patrón con los extractos heptánicos y alcohólicos de <i>Adenostemma lavenia</i>	62

Índice de figuras

Figura 1. Cabeza de la familia viperidae con el aparato inoculador de veneno.....	9
Figura 2. Patrones de color en la cabeza y cuerpo de <i>Bothrops atrox</i>	11
Figura 3. Cascada de coagulación con los respectivos factores de coagulación.....	16
Figura 4. Cálculo de la movilidad electroforética relativa.....	37
Figura 5. Número de bandas en el gel de poliacrilamida.....	58

Índice de anexos

Anexo 1. Certificado de identificación taxonómica de <i>Adenostemma lavenia</i> (L.) Kuntze	87
Anexo 2. Certificado de identificación taxonómica de <i>Pollalesta discolor</i> (Kunth) Aristeg	88
Anexo 3. Curva de calibración del ácido gálico	89
Anexo 4. Curva de calibración de quercetina	90
Anexo 5. Peso en gramos de los extractos n-heptánicos.....	91
Anexo 6. Peso en gramos de los extractos alcohólicos.....	91
Anexo 7. Tiempo de coagulación de plasma sanguíneo	92
Anexo 8. Tiempo de coagulación del plasma sanguíneo bajo los efectos de la interacción del veneno y los extractos vegetales.....	93
Anexo 9. Actividad antihemolítica de las soluciones de eritrocitos con y sin veneno y con los extractos vegetales	94
Anexo 10. Actividad antiproteolítica de los extractos vegetales	95
Anexo 11. Electroforesis vertical del veneno con y sin los extractos vegetales	96

Resumen

Ecuador cuenta con gran diversidad de especies de reptiles, entre ellas, serpientes venenosas; en la Amazonía habitan especímenes del género *Bothrops*, siendo la especie *Bothrops atrox* la causante del mayor número de accidentes ofídicos de la zona. Muchas de las comunidades indígenas tratan este tipo de accidentes mediante la utilización de extractos de plantas que cuentan con actividad neutralizante sobre el efecto del veneno de serpiente. El objetivo del trabajo fue analizar la actividad alexítera de los extractos alcohólicos y heptánicos de dos especies vegetales amazónicas utilizadas en la medicina ancestral: *Adenostemma lavenia* y *Pollalesta discolor*, conocidas localmente como Araratz y Pigue respectivamente, contra el veneno de *B. atrox*. Se realizaron técnicas in vitro, sobre la sangre humana y sus componentes, para analizar la actividad anti hemolítica, anticoagulante y anti proteolítica de los extractos vegetales; también se evidenciaron cambios en el perfil proteico del veneno antes y después de ser expuesto a la acción de los extractos mencionados, aplicando electroforesis vertical en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE). Los resultados obtenidos revelan que ambas especies presentan actividad neutralizante sobre los efectos del veneno en la sangre humana; en los ensayos de antihemólisis, antiproteólisis y anticoagulación, el extracto alcohólico de *P. discolor* presentó mayor actividad alexítera, en comparación a los extractos alcohólicos y heptánicos de *A. lavenia*. El perfil electroforético mostró una mayor cantidad de bandas en el extracto de *P. discolor*, concluyendo de esta manera que la actividad enzimática del veneno es atenuada por componentes presentes en las especies estudiadas.

Palabras clave: Alexítera, *Bothrops atrox*, *Adenostemma lavenia*, *Pollalesta discolor*.

Abstract

Ecuador holds one of the biggest diversity of reptiles in the world, thus, there is a huge number of venomous snakes; there are specimens of the genre *Bothrops* in the Amazon, being *B. atrox* the main cause of snake attacks in the area. Many indigenous communities treat this kind of accident by using alcoholic and heptanic extracts of vegetable species with anihemolytic and antiproteolytic activities. This project's objective was to analyze the antidote activity of two Amazonian vegetable species, *Adenostemma lavenia* and *Pollalesta discolor*, respectively known as Araratz and Pigue, against the venom of *Bothrops atrox*. In vitro techniques were used to analyze anticoagulant, antihemolytic and antiproteolytic activities of the extracts over human blood and its components; changes in venom's proteic profile were observed through SDS-PAGE, before and after its exposure to both extracts. The obtained results reveal that both species have neutralizing activity over the venom's hemotoxic capabilities; but in comparison with alcoholic and heptanic extracts of *A. Lavenia*, the alcoholic extract of *P. discolor* is the best inhibitor in anticoagulant, antihemolytic and antiproteolytic activities; furthermore, the electrophoretic profiling, showed that the number of protein bands of the poison increased under the effects of both species, being the extract of *P. discolor* the one that presented the biggest amount of bands; this concludes that the enzymatic activity of the snake's poison is diminished by organic components found in both vegetable species.

Keywords: Antihemolytic, antiproteolytic, *Bothrops atrox*, *Adenostemma lavenia*,
Pollalesta discolor.

Introducción

En el país, la mayoría de las mordeduras por parte de serpientes se dan en zonas selváticas y poco pobladas; de estos accidentes, los especímenes de la familia Viperidae son los principales responsables (Sandoval, Mendoza, Roldán, & Espinoza, 2011). Existen una gran cantidad de serpientes venenosas en el Ecuador, siendo las del género *Bothrops* spp. (Viperidae) las más peligrosas. Al este de la cordillera de los Andes, *Bothrops atrox* es la especie de mayor importancia, debido a que el mayor porcentaje de accidentes ofídicos son causados por esta especie (Gaus, 2013).

El crecimiento constante y exponencial de la población humana hacia territorios silvestres, la disminución del hábitat natural de varias especies, el aumento de zonas agrícolas, y la gran diversidad de reptiles en el Ecuador, hace que los accidentes ofídicos sean un problema de gran trascendencia en regiones rurales, tropicales y subtropicales (Betancourt, 2012).

Las mordeduras causadas por serpientes del género *Bothrops*, se denominan accidentes ofídicos de tipo Bothrópicos; éstos representan entre un 90 y 95 % de todos los casos de ofidismo, o evento causado por la mordedura de un ofidio en Latinoamérica (Cruz, 2013).

En el país se reporta una media de 13.21 casos de accidentes ofídicos por cada 100 000 habitantes; anualmente se registran entre 1200 y 1400 casos en 19 de las 21 provincias; mientras que los reportes señalan que las provincias con un mayor número de casos son Los Ríos, Guayas, El Oro, Manabí y Esmeraldas en la zona costera; mientras que Pastaza, Morona Santiago, Orellana, Zamora Chinchipe y Napo son las provincias

amazónicas con un mayor número de accidentes ofídicos de tipo Bothrópico (Córdova, 2013).

El veneno de las especies del género *Bothrops* se caracteriza por la alta concentración de factores mionecrotizantes, además de poseer actividad proteolítica, citotóxica y coagulante (Villamarín, 2009).

El cuadro clínico se presenta dentro de 1 a 3 horas posterior a la mordedura, los efectos dependen de la cantidad de veneno inyectado durante la mordedura. Los primeros efectos se manifiestan por la presencia de un dolor intenso localizado, lesiones eritematosas con manchas rosáceas o cianóticas, edema firme progresivo, y el apareamiento de ampollas en el sitio de la mordedura. Si no se trata la herida, al pasar los días aparecen signos de necrosis superficial o profunda en las zonas afectadas, hasta convertirse en necrosis total (Zamora, 2015).

Uno de los principales problemas del envenenamiento ofídico en el Ecuador, es la distancia entre las zonas donde sucede el accidente y los centros de salud donde se puede atender de manera adecuada a los pacientes, muchas veces pasan hasta 6 a 7 horas antes de poder acceder a tratamiento médico luego de sufrir una mordedura, lo que tiene como consecuencia la amputación del miembro afectado y hasta en un 16 % de los casos, la muerte del afectado (Sanchis, 2016).

En la medicina tradicional, existe un gran número de tratamientos alternativos para contrarrestar los efectos ponzoñosos del veneno de serpiente; durante años, se han usado *serums* (remedios) de origen tanto animal como vegetal que han mostrado utilidad para neutralizar venenos de serpientes (Kaushik, 2013).

Se ha estimado que cerca de un 25 % de las plantas encontradas en zonas amazónicas son utilizadas por las comunidades indígenas de la zona para tratar un sinnúmero de afecciones, incluidos los casos de mordedura de serpiente (Carbonell & Jativa, 2002) (López & Pérez, 2009).

Según Muñoz (2017) y Reyes (2017), se sabe que las plantas *Pollalesta discolor* (Kunt) Aristeg y *Adenostemma lavenia* L. (Kuntze) tienen propiedades que mitigan el efecto hemotóxico del veneno, cualidad denominada alexítera, además contienen metabolitos secundarios como polifenoles y flavonoides que contrarrestan o mitigan el efecto hemolítico del veneno dejado por la serpiente.

La sabiduría ancestral, que dominan las culturas de la Amazonía, sobre el tratamiento de los accidentes ofídicos, se basa principalmente en la identificación de la serpiente que causó la mordedura y su captura;, el lavado de la herida con agua caliente, la aplicación de un torniquete en el miembro afectado sobre el nivel de la mordedura, posteriormente la succión del veneno con la boca, la utilización de plantas y sustancias que se encuentren en la zona, y el traslado del herido al hospital más cercano (Jara, 2014).

En algunas regiones del Ecuador se emplean varias plantas a las cuales se les ha atribuido propiedades alexitéricas o antiofídicas; un ejemplo de esto es el uso de la liana denominada Zaragoza (*Aristolochia* sp.), por parte de los indígenas Awá (Parra, 1994) y algunos grupos de colonos; otro ejemplo son algunas especies vegetales de la familia Gesneriaceae, usadas por indígenas Chachi y Awá en la costa del país (Cerón, 2006). En algunos lugares de Ecuador y Colombia, se emplean emplastos de material vegetal,

mezclados con hojas de la planta de tabaco, pólvora, aguardiente y agua caliente; además de infusiones de hierbas medicinales (Jara, 2014).

Este estudio tiene como finalidad comprobar la actividad alexítera de los extractos alcohólicos y heptánicos de *Pollalesta discolor* (Kunt) Aristeg y *Adenostemma lavenia* L. (Kuntze) en contra del veneno de *Bothrops atrox*, para corroborar el conocimiento ancestral del uso de estas plantas en el tratamiento de picaduras de serpientes, se realizaron pruebas in vitro para verificar la actividad anticoagulante, antihemolítica y antiproteolítica de las especies vegetales, también, se evaluó el perfil proteico del veneno antes y después del tratamiento con los extractos vegetales mediante la técnica de electroforesis vertical, para para analizar posibles cambios en el peso molecular de sus proteínas, lo cual se ve ligado a su capacidad hemotóxica.

Capítulo I:

Marco teórico

1.1 Clase Reptilia

Se define como reptil a aquel organismo que al desplazarse se arrastra o reptar. La clase Reptilia agrupa a un número muy diverso de vertebrados y se los divide en cuatro grupos u órdenes: el orden Testudines, al cual pertenecen las tortugas, representa organismos con el cuerpo recubierto por un caparazón óseo; el orden Squamata, representado por lagartijas y serpientes, es el grupo más diverso de reptiles, con un cuerpo alargado recubierto de escamas (Flores, 2014); las lagartijas tienen cuatro extremidades con una cola generalmente larga y prensil, mientras que en las serpientes, las extremidades se encuentran reducidas y ausentes; el orden Crocodylia, el cual incluye cocodrilos y caimanes, los cuales son organismos de gran tamaño y cuerpo resistente y musculoso, son aptos para la vida acuática gracias a su cabeza alargada y plana, ojos y fosas nasales en posición superior, y una cola fuerte y aplanada que es usada como timón; el orden Rhynchocephalia, cuyo representante es el tuatara, el cual es similar a las lagartijas pero con una cabeza grande y una cola gruesa (Canseco, 2008).

1.2 Orden Squamata

El orden Squamata o reptiles escamosos agrupa un amplio número de reptiles como: lagartos, iguanas, camaleones, culebrillas ciegas y serpientes. Se tiene un estimado del

número de especies dentro de este orden, siendo más de 7000; las características anatómicas principales de este grupo son, derivadas del largo proceso evolutivo y adaptativo generado para permitir su supervivencia en el hábitat al que pertenecen, así, las escamas que recubren su cuerpo pueden ser mudadas, presentan un cráneo con fosa temporal, una apertura cloacal transversal y un órgano copulador con dos semipenes.

Este orden se subdivide en tres subórdenes: anfisbenios, lacertilios y serpentes (Paradai Sphynx, 2015).

1.3 Suborden Serpentes

El Suborden Serpentes, o de las serpientes se ve caracterizado por la existencia de un esqueleto óseo, que incluye un cráneo, una columna vertebral larga, y costillas flotantes sin esternón; la piel se encuentra formada por escamas epidérmicas. En algunas especies, aún se encuentran presentes la pelvis y miembros posteriores rudimentarios.

Las principales diferencias entre este suborden y algunos lagartos y anfibios carentes de patas son: en el cráneo de las serpientes, la mandíbula no se encuentra articulada sino a través de un huesito corto intermediario denominado cuadrado; la mandíbula de las serpientes cuenta con dos ramas separadas, débilmente unidas por medio de un ligamento elástico; las serpientes son sordas ya que muestran una ausencia del oído externo, tímpano y oído medio; el cuerpo se encuentra recubierto por escamas que crecen una sobre la otra, no presentan anillos o piel lisa (Manual Ofídico, 2012).

1.4 Serpientes en el Ecuador

En el Ecuador, las serpientes representan el grupo de reptiles más diverso, debido a que, de las 412 especies de reptiles, el 50 % son serpientes. Solo el 17 % son venenosas o peligrosas para el hombre (Betancourt, 2012). Una mayor cantidad de especies habita en los pisos tropicales que rodean a la cordillera de Los Andes, comprendido entre los 0 y los 1000 m.s.n.m; mientras que muy pocas especies habitan sobre los 2000 m.s.n.m (Coloma, 2008) (Cadena, 2016).

Las serpientes en el Ecuador se agrupan en 9 familias: Aniliidae, Anomalepididae, Boidae, Colubridae, Elapidae, Leptotyphlopidae, Tropidophidae, Typhlopidae y Viperidae (Coloma, 2008) (Cadena, 2016).

Las poblaciones de serpientes se ven amenazadas a nivel global, y en el país se ven expuestas a la destrucción y fragmentación de su hábitat, el comercio ilegal, la cacería furtiva, el exterminio de las mismas por el miedo y superstición de los habitantes, parásitos y enfermedades, entre otros (Gibbons, 2000) (Valencia, 2011).

Las más amenazadas, ya sea por disminución en su número de individuos o por la escasez de información en cuanto a sus estatus, son las que habitan en los pisos tropicales y subtropicales de las estribaciones andinas. Cerca del 39 % de las especies tienen datos deficientes para ser catalogadas; el 26.7 % de especies se encuentran como casi amenazadas; un 15.2 % de especies se encuentran como preocupación menor; el 9.5 % de especies son vulnerables con categoría de amenaza inminente; el 8.6 % se encuentra en peligro; y el 1 % en peligro crítico (Carrillo, 2014), (Cisneros, 2017). En contraste, las especies amazónicas muestran niveles inferiores de amenaza, lo que se ha atribuido a la existencia de grandes áreas naturales conservadas sin actividad humana y

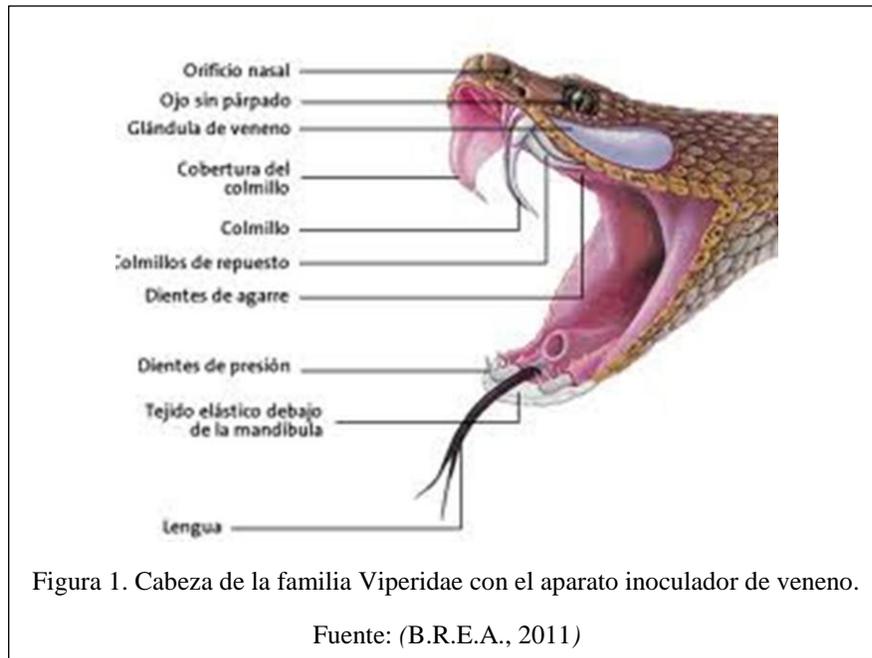
sin ser fragmentadas o verse aisladas por la construcción de asentamientos humanos (Larrea, 2006) (Ortega, 2010).

1.5 Familia Viperidae

Se les conoce como víboras verdaderas, ya que todas las especies pertenecientes a esta familia son venenosas. En el Ecuador se encuentran seis géneros: *Bothriechis*, *Bothriopsis*, *Bothrocophias*, *Bothrops*, *Lachesis* y *Porthidium* distribuidos en el país con 17 especies (Carrillo, 2014) (Martínez, 2017).

Los ofídios de esta familia se ven identificados por la existencia de dos agujeros a cada lado de la cabeza al frente de cada ojo, denominados orificios nasales y fosetas loreales. Así mismo, poseen escamas pequeñas en el dorso cefálico. Se reproducen de forma ovovivípara y al momento de atacar se enroscan con los dos tercios de su cuerpo replegados a manera de base, para atacar de manera dinámica, con un movimiento rápido para morder a la presa (INPB, 2007) (Neri, 2014).

Sus mandíbulas se ven constituidas por un aparato dental con dos glándulas generadoras de veneno conectadas con los colmillos a través de unos canales huecos que funcionan como una jeringa que inyecta el veneno durante la mordida; los colmillos son retráctiles y se mueven de manera independiente (Figura 1); este veneno está compuesto por un grupo de proteínas y enzimas cuyos efectos son la parálisis y muerte de la víctima de mordedura; empieza a actuar como pre digestivo desde su inoculación, ya que al ser un veneno de tipo hemotóxico, va a destruir los tejidos circundantes, facilitando la digestión de la presa (Carpio, 2014).



1.6 Género Bothrops

Se conoce a las especies de este género como “Equis”, debido a la coloración de su dorso, ya que presenta manchas en forma de “X”. En el Ecuador se tienen seis especies de este género, las cuales son de hábitos mayormente terrestres, las más reconocidas, por su peligrosidad y por ser las causantes de la mayor cantidad de accidentes ofídicos, son *Bothrops asper* en la región costa y *Bothrops atrox* en la región amazónica (Betancourt, 2012)

1.7 *Bothrops atrox*

La especie *Bothrops atrox* es un crotárido o víbora de foseta, cuyo hábitat es la selva, bajo los 1400 msnm (Oviedo, 2000). Los adultos tienen una longitud máxima promedio de 1.50 m, mientras que se tienen registros de un ejemplar femenino adulto en el noreste del Perú que alcanzó a medir 1.62 m, siendo éste el ejemplar de mayor longitud registrado. En Ecuador, el espécimen más grande registrado fue una hembra que medía 1.51 m de longitud y el macho más grande fue de 1.20 m de longitud (Pazmiño, 2013).

El lado dorsal del cuerpo es considerablemente variable entre individuos, puede ser café, gris, amarillo, habano, oliva, hasta color cobre; el dorso de la cabeza es del mismo color que el cuerpo, llegando ser en algunos casos un poco más oscura, sin embargo, no presenta marcas o manchas de ningún tipo (Figura 2). La franja post orbital se muestra moderadamente ancha y de color café oscuro, algunas veces delineada en blanco, esta continúa desde el borde trasero del ojo hasta el ángulo de la boca, donde curva hacia abajo y cubre la parte superior de las dos supralabiales anteriores, las cuales tienen suturas con bordes oscuros, característica más aparente en ejemplares adultos; el lado ventral de la cabeza tiene una coloración crema que puede llegar a ser amarilla o gris amarillenta en algunos especímenes y tener motas oscuras; el color del iris es dorado o bronce con reticulaciones oscuras; la lengua es de color negro (Campbell, 2004) (Zúñiga, 2013).

El cuerpo tiene una serie de patrones, variables tanto en forma como en color, sin embargo, generalmente consta de manchas en forma de rectángulo o trapecio, colocadas en serie, cada una se encuentra rodeada por bordes pálidos y difusos, acompañado de un pigmento grisáceo en la base; estas se extienden desde la región ventral y continúan a través del dorso, hasta la línea media del cuerpo. Las manchas pueden llegar a alternarse y pueden asociarse hasta formar grandes bandas que cubren el dorso de un lado al otro. Este patrón formado por las manchas se pierde a lo largo del cuerpo, llegando a desaparecer en la zona de la cola. En ejemplares jóvenes, la cola puede tener tonalidades amarillas o rosadas y el vientre del cuerpo, tonalidades blancas, cremas, o grisáceas con motas o manchas grises y negras (Campbell, 2004) (Zúñiga, 2013).



Bothrops atrox es una especie de hábitos mayormente nocturnos; a pesar de ello, se le ha observado forrajeando, es decir, buscando su alimento en horas del día; su estrategia de forrajeo es en general el uso de emboscada para sorprender a sus presas con un gasto mínimo de energía. También se le ha visto usar el forrajeo activo, pero en menor medida (Oliviera, 2001) (Pietro, 2016). Habitualmente, como en otras especies del mismo género, durante sus etapas de desarrollo o juveniles, su alimentación se basa primordialmente en animales pequeños como anfibios y reptiles; conforme envejecen y aumentan su tamaño, cambian de presas reemplazando los animales ectotérmicos de dimensiones pequeñas por animales endotérmicos de mayor tamaño (aves, marsupiales, roedores, entre otros); en los estómagos de algunos individuos se ha encontrado restos de serpientes pequeñas y artrópodos. Se ha observado que los juveniles cazan usando carnada, al mover la punta de su cola para atraer a su presa, este comportamiento es más común en época de lluvias (Campbell, 2004) (Moldowan, 2016).

Es una especie con tipo de desarrollo embrionario de ovoviviparismo, es decir, pone huevos, pero éstos permanecen dentro del cuerpo de la madre, eclosionando solo cuando

el embrión se ha desarrollado en su totalidad, pariendo entre 8 y 43 ofidios cada vez. La temporada reproductiva en el Ecuador es de larga duración, llegando a ocupar casi todo el año. Esta especie alcanza la madurez sexual a los tres años (Campbell, 2004) (Gonçalves, 2016).

Al aproximarse a un individuo de esta especie, éste va a huir y ocultarse rápidamente o tomar una postura mucho más agresiva, enrollando su cuerpo frente a la amenaza, colocándose en posición de “S” y preparándose para atacar de ser necesario (Oliviera, 2001) (Chloé, 2014). Solo se han reconocido dos especies como predadores de *Bothrops atrox*, el primero perteneciente a la familia de serpientes venenosas *Elapidae: Micrurus spixii*, y el segundo, un arácnido conocido como tarántula Goliath o *Theraphosa blondi*; mientras que el principal parásito del ofidio es el protozoo *Caryospora jararacae* (Campbell, 2004) (Chloé, 2014).

El veneno de *B. atrox* es un líquido viscoso y amarillento debido a la alta cantidad de riboflavina presente en el mismo, contiene un alto porcentaje de proteínas, cerca al 75 %, las cuales tienen una alta actividad enzimática; también contiene fosfolípidos variados y trazas de minerales (Oviedo, 2000) (Santos, 2014).

Esta especie se encuentra distribuida en el norte y centro de Sudamérica, incluyendo Colombia, Perú, Venezuela, Surinam, las Guyanas, zona norte del Brasil y Ecuador; se la encuentra principalmente en zonas amazónicas (Romero & Silva, 2013). Se encuentra en zonas tropicales desde los 0 m.s.n.m hasta los 1200 m.s.n.m (Campbell, 2004). En Ecuador habita en zonas tropical oriental y subtropical oriental, principalmente en las provincias amazónicas de Napo, Orellana, Pastaza, Zamora Chinchipe y Morona Santiago (Pazmiño, 2013).

Habita comúnmente en bosques húmedos, lluviosos, zonas montanas bajas, bosques tanto de galería como tropicales deciduos y sabanas. Esta especie prefiere ambientes húmedos, por lo que se encuentra generalmente en áreas cercanas a arroyos, lagos o ríos; también se puede encontrar individuos en zonas agrícolas húmedas, pastizales y cerca de asentamientos humanos (Campbell, 2004).

Se ha observado una correlación entre la etapa de desarrollo de la serpiente con el hábitat de esta, los individuos jóvenes se encuentran comúnmente en arbustos de hasta 1.5 m de altura, los individuos adultos se encuentran en el suelo y raramente subidas en la vegetación; incluso se han encontrado individuos subidos en árboles de hasta 4m de altura (Pazmiño, 2013).

1.8 Ofidismo

Se conoce como ofidismo al estado o síndrome mórbido causado por una mordedura o inoculación de veneno accidental, por parte de una serpiente venenosa. Los síntomas o manifestaciones clínicas van a ser directamente relacionadas a la serpiente atacante. El ofidismo constituye un problema de salud pública de gran importancia a nivel global. El envenenamiento ofídico es la interacción de varios factores, entre ellos los componentes tóxicos del veneno en sí, la edad o tamaño de la serpiente, la edad o tamaño del paciente y la cantidad de veneno inoculado en la mordida (Navarrete, 2010).

1.9 Accidente ofídico Bothrópico

Se define como accidente ofídico a la mordedura de serpiente que causa una lesión cutánea, seguida de la inoculación de veneno que contiene una serie de sustancias

tóxicas que van a lacerar los tejidos, produciendo una sucesión de alteraciones tanto locales como sistémicas cuya gravedad va a ser variable. En el continente americano, cerca del 90 % de accidentes ofídicos son causados por especies pertenecientes a la familia Viperidae (SSAVER, 2014).

La población que habita en zonas rurales y agrícolas se ve más afectada por este tipo de accidentes. La incidencia en los accidentes ofídicos se ve determinada por la asiduidad del contacto entre el ser humano y las serpientes, además de las variaciones en la actividad estacional, la densidad de las poblaciones de serpientes y de la actividad humana (Betancourt, 2012).

Cualquier accidente ofídico que sea causado por la mordedura de alguna de las especies pertenecientes al género *Bothrops*, se conoce como “accidente bothrópico” (Charry, 2012).

1.9.1 Efectos del accidente Bothrópico

Las especies pertenecientes al género *Bothrops* se caracterizan por poseer un veneno con una concentración muy alta de factores necrotizantes musculares además de tener actividad coagulante, citotóxica y proteolítica (Ministerio de salud pública, 2008) (Santos, 2014).

El veneno de *B. atrox* es de tipo hemotóxico ya que ocasiona perturbaciones en la coagulación sanguínea. Presenta una serie de enzimas coagulantes y procoagulantes que van a generar alteraciones en la coagulación, además de desfibrinación; contiene fosfolipasas A2 que van a alterar la cascada de coagulación de la sangre, al modificar la

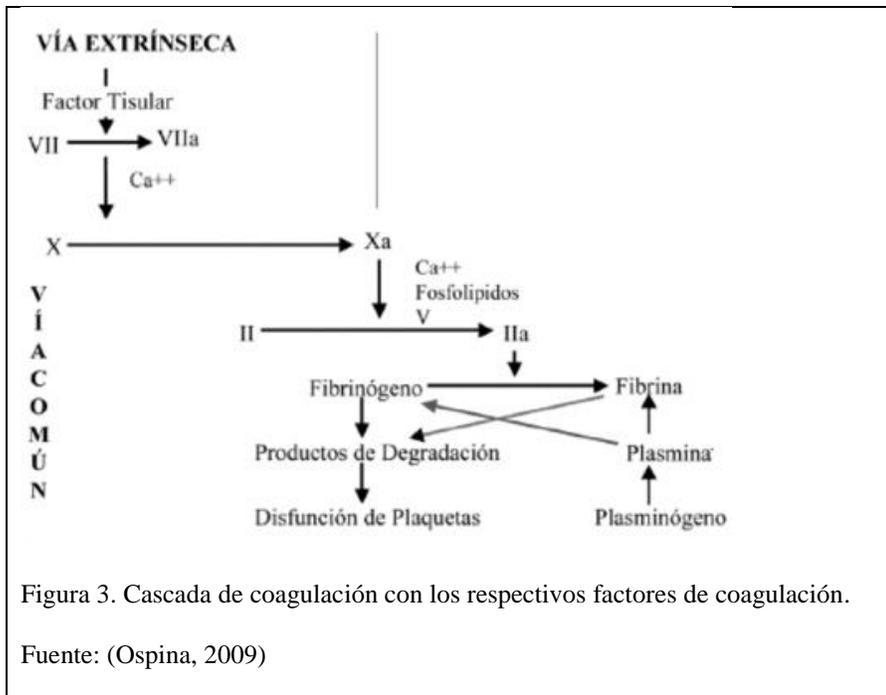
agregación plaquetaria. Presenta enzimas de tipo hidrolasas, trombina, esterases, proteasas, entre otras, estas van a generar hemorragias y necrosis, y coagulación sanguínea (Betancourt, 2012).

1.9.1.1 Efecto coagulante

Normalmente, la coagulación es el resultado de un conjunto de reacciones de proteasas que van a convertir al fibrinógeno en filamentos solubles de fibrina, la cual, al juntarse con las plaquetas, forma un trombo estable. Posterior a una lesión vascular cualquiera, un factor tisular se une al factor VII y lo activa, este se une estrechamente al factor tisular y activa proteasas procoagulantes, además de activar al factor X. El efecto coagulante se da al activar el factor X, el fibrinógeno y la protrombina (Figura 3). Una vez que se activa el factor X, empieza un aumento significativo en el consumo de plaquetas, generando una acumulación de microtrombos en las paredes de los capilares sanguíneos.

El veneno de *Bothrops atrox* contiene un activador del factor X, una enzima similar a trombina y una enzima activadora de protrombina, lo que genera la formación de coágulos mediante la activación de la cascada de coagulación (Oviedo, 2000).

Este efecto no es específico del veneno de *Bothrops*, sino que también aparece con los venenos crotálico y lachésico (Villamarín, 2009).



1.9.1.2 Efecto hemorrágico

Uno de los efectos principales en el cuadro clínico causado por un accidente bothrópico, es la hemorragia local y sistémica, la cual es generada por un grupo de metaloproteinasas dependientes de zinc, éstas van a encargarse de degradar los componentes de la lámina basal de los vasos capilares, generando una consecuente hemorragia (Castro, 1999) (Santos, 2014).

1.9.1.3 Efecto proteolítico

El veneno contiene varias enzimas proteolíticas que van a causar una reacción inflamatoria seguida de la destrucción de tejidos musculares por mionecrosis, tejidos adiposos por liponecrosis, y necrosis vascular. Se liberan mediadores vasoactivos que van a conducir al shock cardiorrespiratorio, como la bradicinina. Este efecto se produce por el veneno de *Bothrops* y *Lachesis* (Villamarín, 2009).

1.9.1.4 Efecto necrotizante

Otro efecto característico del accidente bothrópico es la necrosis de las células musculares, acompañada de la destrucción tanto de tendones como de cartílagos. Posterior a la inoculación de veneno suceden dos tipos de necrosis, dependiendo del efecto sobre las fibras; la necrosis miolítica se ve caracterizada por una clara destrucción del material intracelular; mientras que la necrosis coagulativa se ve caracterizada por la presencia de un material intracelular de apariencia hialina y homogénea entre las fibras musculares (Bolaños, 1980) (Santos, 2014).

1.9.1.5 Efecto hemolítico

El efecto hemolítico es causado principalmente por la presencia de Fosfolipasas A₂, estas van a desorganizar la bicapa lipídica de la membrana plasmática de las células musculares, esto causa el ingreso de calcio que provoca una lesión celular irreversible. *In vitro* se ha observado que la membrana de los glóbulos rojos también se ve afectada, esto ocasiona la hemólisis intravascular; *in vivo*, este efecto no es notable, sino que la hemólisis observada es causada por el daño mecánico sufrido por los eritrocitos al atravesar las redes de fibrina formadas (Otilda, s.f.).

1.10 Actividad Alexítera.

Una sustancia con actividad alexítera va a ser aquella que tenga la capacidad de actuar como antídoto, es decir, mitigar los efectos generados por todo tipo de veneno (García, 2000) (Pereañez & Jimenez, 2008).

En medicina tradicional se tienen muchas especies vegetales que se utilizan para mitigar los efectos causados por la picadura de varias serpientes venenosas; a estas especies se

les denomina plantas alexíteras, ya que sirven como antídoto para tratar las mordeduras de animales ponzoñosos (López & Pérez, 2009).

Cerca del 25 % de las especies vegetales presentes en las zonas tropicales y amazónicas son utilizadas por varias comunidades indígenas para tratar varios tipos de enfermedades, basándose en su amplio conocimiento sobre la medicina natural ancestral; muchas de estas especies vegetales son utilizadas para contrarrestar los efectos de accidentes ofídicos (Carbonell & Jativa, 2002) (Dos Santos, 2016).

1.11 Descripción de especies

1.11.1 *Adenostemma lavenia* L. (Kuntze)

Especie conocida como Araratz, cuya identificación taxonómica se muestra en la tabla 1.

Tabla 1.

Identificación taxonómica de *Adenostemma lavenia* L. (Kuntze)

TAXONOMIA	
<u>Reino:</u>	<u>Plantae</u>
<u>División:</u>	<u>Magnoliophyta</u>
<u>Clase:</u>	Equisetopsida C. Agargh
<u>Orden:</u>	Asterales Link
<u>Familia:</u>	Asteraceae Bercht. & J. Presl.
<u>Género:</u>	<i>Adenostemma</i> J.R.Forst. & G. Forst
<u>Especie:</u>	<i>lavenia</i> L. (Kuntze)

Fuente: Herbario Q.C.A. de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, (2017) (Anexo 1)

1.11.1.1 Distribución

Se encuentra usualmente en lugares abiertos y húmedos, comúnmente cerca de riachuelos, en zonas boscosas y matorrales., a altitudes desde 0 m.s.n.m hasta los 1800 m.s.n.m aproximadamente. Especie ampliamente distribuida en partes templadas y tropicales de Asia e islas del Pacífico (Cheng, 1979). Se encuentra en los países de China, Indo-China, Malasia, Indonesia, Australia, Micronesia, Polinesia, y en las zonas amazónicas de Latinoamérica, como Brasil, Nicaragua, Colombia y Ecuador (Umali, 2014) (Global Compositae Checklist, 2011)

1.11.1.2 Descripción

Se caracteriza por ser hierba perenne, de 0.5 m de alto o más; sus tallos son escasamente puberulentos o glabros. Las hojas son opuestas, con forma deltoide-ovadas y de 4 a 5 cm de largo y 3.5 a 4.5 cm de ancho, sus márgenes son irregularmente aserrados, tienen 3 nervios desde la base; sus pecíolos son de 2 a 3.5 mm de largo. Sus capitulescencias son abiertas o cimoso-paniculadas, con 20 a 50 capítulos, los últimos pedúnculos son de 6 a 20 mm de largo; los capítulos son discoides; con involucros hemisféricos de 4 mm de largo y de 5 a 10 mm de ancho; tiene entre 24 a 30 filarias, en series de 2 a 3, éstas son linear-lanceoladas, eximbricadas, y escasamente puberulentas o ciliadas; sus receptáculos son desnudos; los flósculos son numerosos y perfectos, las corolas tienen de 3 a 3.5 mm de largo, de color blanco, el tubo es casi igual al limbo, el cual es densamente pubescente, 5-lobado y de estilo glabro. (Turner, 2016).

1.11.1.3 Perfil fitoquímico

Se identificaron de manera ampliada compuestos como: 2.710 % de grasas, gran contenido de saponinas tales como ácido esteárico, ácidos diterpenoides, ácidos

dicarboxílicos y triterpenoicos, y glicósidos que poseen grupos del ácido urónicos, cardenolinas o bufodienolidas, además tiene también esteroides, fenoles coligados a taninos, sin presencia de flavonoides, pero alcaloides trazas. Muestra a su vez aceites volátiles como α -cubebeno (32.62 %), caryophyllene (24.97 %) y γ -elemen (5.53 %), y esteroides (monoterpenos y sesquiterpenos) como α -caryophylleno (3.97 %), α -chamigreno (3.57 %), bicyclo [4,3,0] -7-methylene -2,4,4-trimetil-2-vinil nonano (3.41 %), γ -terpinen (3.07 %), d-limoneno (2.57 %), α pineno (2.49 %) y 2-careno (2.28 %) (Ochoa, 2017).

1.11.1.4 Usos

Entre los usos más comunes que se le da a esta especie en el Ecuador, está el tratamiento de abscesos, enfermedades cutáneas y heridas en la piel. En la zona amazónica y algunas partes de la provincia de Pichincha, su uso tradicional es el de inhibir los efectos causados por la mordedura de las serpientes (MUNDOBIODIVERSO, 2009).

En Taiwán, se usa la planta en su totalidad para el tratamiento de congestión pulmonar, neumonía, edema e inflamación. El sondeo fitoquímico de la especie indicó la presencia de amargura, alcaloides y aceites esenciales en las hojas (Cheng, 1979).

En Filipinas, la infusión de las hojas de *A. lavenia* es usada como antiespasmódico, mientras que, en la India, se utiliza la loción obtenida a partir de las hojas como tónico anticalvicie, además las hojas trituradas se utilizan para proteger la piel de quemaduras del sol (Umali, 2014).

En comunidades indígenas de Colombia, se utiliza para tratar enfermedades del hígado, mal de ojo, parásitos, dolor de estómago, y mordeduras de víbora (Ochoa, 2017).

1.11.2 *Pollalesta discolor* (Kunth) Aristeg.

Especie conocida como Pigue, cuya identificación taxonómica se muestra en la tabla 2.

Tabla 2.

Identificación taxonómica de *Pollalesta discolor* (Kunth) Aristeg.

TAXONOMIA	
<u>Reino:</u>	<u>Plantae</u>
<u>División:</u>	<u>Magnoliophyta</u>
<u>Clase:</u>	Equisetopsida C. Agardh
<u>Orden:</u>	Asterales Link
<u>Familia:</u>	Asteraceae Bercht. & J. Presl
<u>Género:</u>	<i>Pollalesta</i> Kunth
<u>Especie:</u>	<i>discolor</i> (Kunth) Aristeg.

Fuente: Herbario Q.C.A. de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, (2017) (Anexo 2)

1.11.2.1 Distribución

Esta especie se halla distribuida desde el sur de América Central hasta Perú y el norte de Brasil. Se encuentra en bosques tropicales y en vegetación secundaria desde los 100 m.s.n.m hasta los 1600 m.s.n.m (Blair, 2005).

1.11.2.2 Descripción

La especie *Pollalesta discolor* (Kunth) Aristeg también conocida como Pigue, posee una germinación del 31 % con una alta producción de semillas. Es un árbol que llega a medir 25 m de altura con tallos grisáceos y rugosos (Merino Castillo, 2010). Posee hojas

alternas, con un ápice acuminado, base cuneada, membranosas y elípticas que van de los 6 a los 10 cm de largo (Blair, 2005).

Tiene flores blancas en capítulos, una inflorescencia en las panículas terminales de 6 a 18 cm de largo, cabezuelas de 5 mm de largo, corola de 4 mm de largo, brácteas tomentosas. Las raíces son superficiales (Merino Castillo, 2010).

El Pigue es un árbol que se encuentra en bosques secundarios y es altamente repoblador, su floración y fructificación se da dos veces al año (Erazo, Izurieta, Cronkleton, Larson, & Putzel, 2014).

1.11.2.3 Perfil fitoquímico

Al igual que otros miembros de la familia, esta especie contiene sesquiterpen lactonas, muchas de las cuales son citotóxicas (Blair, 2005). Posee una alta cantidad de polifenoles, flavonoides y catequinas. Tiene una baja cantidad de ácidos grasos y triterpenos, mientras que carece de compuestos lactónicos, resinas, saponinas, glucósidos cardiotónicos, aminoácidos, azúcares reductores y quinonas (Muñoz C. , 2017).

1.11.2.4 Usos

Comúnmente, la corteza del árbol y las hojas del Pigue se utiliza como medicina contra el paludismo, según el conocimiento etnobotánico de las comunidades. “También es usado contra el paludismo cerebral” (Blair, 2005). “Otro de sus usos es contra la mordedura de serpiente, en este caso se utiliza la corteza del tallo la cual es aplicada sobre la zona afectada” (Vargas, 2015).

Capítulo II:

Materiales y métodos

2.1 Obtención del veneno de *Bothrops atrox*

Se extrajo mediante el ordeño manual de un ejemplar adulto de *B. atrox*, por medio de la compresión de las glándulas de veneno de acuerdo con lo establecido por Murillo & Prada (2009). El veneno fue conservado en refrigeración a -20 °C, en un desecador al vacío de cristal provisto de sílica gel ($\text{SiO}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$) como agente higroscópico.

2.2 Obtención de las especies vegetales

Se visitaron las parroquias de Sevilla Don Bosco y Chiguaza en la provincia de Morona Santiago, donde se realizó la recolección de 500 g de las partes aéreas (tallos, hojas y flores) de *Adenostemma lavenia* y 500 g de la corteza de la especie *Pollalesta discolor*. Además, se recolectaron muestras para la identificación en el herbario de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador (PUCE).

2.3 Desecado de las muestras vegetales

En los laboratorios de la Universidad Politécnica Salesiana se desinfectaron las muestras vegetales recolectadas con solución de hipoclorito de sodio (NaClO) al 1 %, y se secaron en una estufa MEMMERT a 60 °C para eliminar la humedad contenida en los tejidos vegetales, posteriormente se trituró con la ayuda de un molino eléctrico marca TECNAL modelo TE-633, hasta obtener un tamaño de partícula no mayor a 0.5 cm.

2.4 Obtención de extractos

Se preparó extractos por maceración de las muestras vegetales trituradas con solventes de polaridad creciente:

2.4.1 Extracto heptánico

- Se colocó 15 g de muestra vegetal molida de cada especie en vasos de precipitación.
- Se agregó 50 mL de heptano (C_7H_{16}) y se dejó macerar durante 48 h.
- Se filtró el solvente con papel filtro n°3 (46x57 cm) y se secó por completo el residuo vegetal con la ayuda de una estufa a 60 °C.
- Se repitió este proceso dos veces.
- Se pesó el residuo vegetal seco y se recolectó el solvente para ser evaporado posteriormente.

2.4.2 Extracto hidroalcohólico

- Al residuo vegetal de la extracción anterior se agregó 50 mL de etanol (C_2H_6O) al 96 % y se dejó macerar durante 48 h en un vaso de precipitación
- Se filtró el solvente con papel filtro y se secó por completo el residuo vegetal con la ayuda de una estufa a 60 °C.
- Se repitió este proceso dos veces
- Se pesó el residuo vegetal seco.
- Se evaporó ambos extractos obtenidos en rota evaporador a 50 °C a hasta eliminar en su totalidad los solventes y obtener un extracto seco.

2.5 Rehidratación de extractos vegetales

A los extractos vegetales secos obtenidos en el rota evaporador se los rehidrató con 1000 µL de su solvente correspondiente y se los colocó en agitación durante 5 minutos. Se obtuvo solventes rehidratados con las densidades relativas mostradas en la tabla 3; obtenidas al pesar una punta de micropipeta vacía en balanza analítica, llenarla con un volumen de 100 µL del extracto rehidratado y pesándola nuevamente, logrando obtener la densidad con la siguiente fórmula:

$$\text{Densidad relativa} = \frac{(\text{peso de la punta llena}) - (\text{peso de la punta vacía})}{\frac{\text{volumen de extracto}}{\text{densidad del agua}}}$$

Fuente: (Huamani, s.f.)

Tabla 3.

Densidades relativas de los extractos vegetales

Especie vegetal	Solvente	Densidad relativa *
<i>Adenostemma lavenia</i>	Heptano	0.644
	Alcohol	0.836
<i>Pollalesta Discolor</i>	Heptano	0.586
	Alcohol	0.990

Elaborado por: La autora (2018)

Nota *: La densidad relativa es adimensional

2.6 Cuantificación de polifenoles

Se determinó mediante espectrofotometría visible, fundamentada en una reacción de óxido-reducción colorimétrica con reactivo de Folin-Ciocalteu, también llamado método

de equivalencia del ácido gálico (García E. F., 2015), con el cual se realizó una curva de calibración (Anexo 3).

Se tomó 50 μL de extracto rehidratado (numeral 2.5) y se adicionó 1 mL de agua destilada; se añadió 250 μL de reactivo de Folin-Ciocalteu, se agitó y se dejó en reposo durante 5 minutos. Se agregó 750 μL de carbonato de sodio (Na_2CO_3) al 20 % y se aforó con agua destilada a 5 mL. Se agitó vigorosamente y dejó reposar por 90 minutos en un lugar oscuro. Finalmente, se midió la absorbancia a 765 nm (García E. , 2012).

2.7 Cuantificación de flavonoides

La cuantificación de flavonoides se la determinó por espectrofotometría visible usando diferentes concentraciones de estándar de Quercetina, con las cuales se realizó una curva de calibración.

En 1 mL de heptano o etanol, según el extracto, se diluyeron 200 μL del extracto rehidratado, 100 μL de nitrato de aluminio ($\text{Al}(\text{NO}_3)_3$) al 10 % y 100 μL de acetato de potasio ($\text{CH}_3\text{CO}_2\text{K}$) 1M. Se aforó la solución a 5 mL con el solvente correspondiente y se dejó reposar durante 40 min.

Se midió la absorbancia a 415 μm (Venegas, 2012).

2.8 Determinación de la Dosis Mínima Coagulante de Veneno

Se prepararon seis soluciones de veneno con diferentes concentraciones a (0.02, 0.013, 0.001, 0.0009, 0.0008 y 0.0007) $\mu\text{g}/\mu\text{L}$; diluyendo (1.07; 0.6955; 0.0535; 0.0428 y 0.035) μL de veneno puro en 50 μL de PBS (pH 7) respectivamente. Estas soluciones

fueron incubadas a 37°C durante 20 minutos junto con 1800 µL de plasma humano. En un vidrio reloj, se colocaron 300 µL de plasma humano y se añadieron 50 µL de solución de veneno de concentración 0.02 µg/µL; se cronometró el tiempo que tardó el plasma en coagular. Este ensayo se repitió para cada una de las concentraciones, hasta establecer cuál es la concentración que coaguló el plasma sanguíneo en 60 segundos (Theakston, 1983), ya que la dosis coagulante mínima se define como la cantidad de veneno que produce un trombo en un minuto (Ortiz, 2012).

2.9 Actividad anticoagulante

Se preincubó una disolución compuesta por 50 µL de solución de veneno en PBS a la concentración obtenida en el ensayo de dosis mínima coagulante (0.001 mg/mL) junto con 15 µL de cada extracto vegetal durante 30 minutos a 37°C.

Se colocó 300 µL de plasma sanguíneo en un vidrio reloj y se agregó la solución preincubada de veneno y extracto vegetal.

Se cronometró el tiempo que tardó el plasma en coagular. Se tomó como blanco la disolución de plasma sanguíneo junto con el veneno sin los extractos vegetales (Theakston, 1983).

2.10 Actividad anti hemolítica

2.10.1 Obtención de eritrocitos lavados

Se colocó 8 mL de sangre en tubos de ensayo y se añadió 32 mL de solución salina al 0.9 %; posteriormente se centrifugó los tubos de ensayo a 3000 rpm durante 15 minutos.

Se desechó el sobrenadante, se agregó nuevamente 32 mL de solución salina al 0.9 % y se volvió a centrifugar bajo los mismos parámetros.

Éste proceso se repitió 3 veces. Los eritrocitos lavados fueron el remanente del fondo de los tubos de ensayo una vez extraído el sobrenadante.

2.10.2 Determinación de la actividad antihemolítica

En tubos de ensayo se colocó 2 mL de eritrocitos lavados, 1 mL de yema de huevo, 2.85 mL de PBS (pH 7), 1 mL de veneno a concentración de 0.02 mg/mL, concentración establecida por León (2017), y 15 µL de cada uno de los extractos.

Adicionalmente, se prepararon dos soluciones para ser usadas como valores de referencia. La primera solución, denominada Blanco positivo, fue preparada con 2 mL de eritrocitos lavados, 1 mL de yema de huevo y 4 mL de PBS (pH 7); la segunda solución, denominada Blanco negativo fue preparada con 2 mL de eritrocitos lavados, 1 mL de yema de huevo, 3 mL de PBS (pH 7) y 1 mL de veneno a concentración de 0.02 mg/mL.

Se incubaron los tubos de ensayo a 37 °C durante 30 minutos y se centrifugaron a 3500 rpm durante 20 minutos.

Se midió la absorbancia del sobrenadante en espectrofotómetro a una longitud de onda de 550 nm.

El valor de absorbancia del Blanco positivo (2.2148) fue tomado como el 100 % de hemólisis, a partir de éste, se compararon los demás valores obtenidos de cada uno de los tratamientos. Por lo tanto, valores bajos de absorbancia, así como de porcentaje de hemólisis, indican una mejor actividad alexítera (Gutiérrez, 1995).

2.11 Actividad anti proteolítica

Se incubó 1 mL de solución veneno/PBS a una concentración de 0.02 mg/mL (León, 2017) junto con 15 µL de extracto vegetal; a una temperatura de 37 °C durante 30 minutos.

Se tomó 2 mL de solución de caseína en PBS al 1 % y se adicionó la solución veneno-extracto preincubada. Se detuvo la reacción con la adición de Ácido tricloroacético (C₂HCl₃O₂) (Lomonte, 1983) al 5 % y se dejó en reposo durante 30 minutos.

Se centrifugó a 3500 rpm durante 10 minutos y se midió la absorbancia del sobrenadante a 280 nm.

Se utilizó como blanco positivo solución de caseína, veneno pre incubado y Ácido tricloroacético; y como blanco negativo solo caseína con ácido tricloroacético, bajo las mismas instrucciones.

La actividad antiproteolítica se midió en unidades de proteólisis/mg, obtenido mediante la siguiente fórmula (Lomonte, 1983):

$$U/mg = \frac{*absorbancia(280nm)}{mg \text{ veneno}} \times 100$$

*Absorbancia (280nm) = valor absoluto (Abs. del blanco positivo – Abs. del veneno más extracto)

Fuente: Lomonte (1983)

2.12 Electroforesis SDS-PAGE

Se utilizó la técnica de electroforesis vertical en gel de poliacrilamida al 30 % con el fin de determinar el perfil proteico del veneno de *Bothrops atrox* previamente a la adición de los extractos vegetales y posterior a su aplicación.

Se utilizó el protocolo de Laemmli (1970), estandarizado por León (2017), utilizando una cámara de electroforesis vertical en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico, descrito a continuación:

- **Limpieza:**

Se utilizó etanol al 70 % para limpiar tanto los vidrios como los peines del sistema, estos fueron posteriormente secados con papel absorbente.

El tanque, tapa y soporte de la cámara de electroforesis fueron lavados con agua destilada y secados con papel absorbente.

- **Reactivos:**

- a) Tampón Tris-HCl 1.5 M pH 8.8

Para 100 mL de solución tampón Tris-HCl 1.5 pH 8.8; se disolvieron 18.17 g de Tris-base en 80 mL de agua destilada. Se ajustó el pH con HCl concentrado y se aforó a 100 mL con agua destilada (BIO-RAD Laboratories, 2011).

- b) Tampón Tris-HCl 0.5 M pH 6.8

Para 100 mL de solución tampón Tris-HCl 0.5 M pH 6.8; se disolvieron 6.05 g de Tris-base en 80 mL de agua destilada. Se ajustó el pH con HCl

concentrado y se aforó a 100 mL con agua destilada (BIO-RAD Laboratories, 2011).

c) SDS 10 %

Para 100 mL de solución SDS al 10 % se disolvieron 10 g de SDS en 80 mL de agua destilada. Una vez disuelto, se aforó a 100 mL con agua destilada.

Esta solución puede permanecer estable durante 6 meses a temperatura ambiente (CSH Protocols, 2006).

d) Poliacrilamida 30 %

Para 100 mL de solución de poliacrilamida al 30 %, se disolvieron 29.2 g de acrilamida y 0.8 g de Bis acrilamida en 80 mL de agua destilada. Se aforó a 100 mL con agua destilada (Checa, 2017).

La solución preparada se almacenó a 4 °C en un frasco ámbar (León, 2017).

e) Gel de resolución 12 %

Para preparar la cantidad necesaria de un gel de electroforesis se diluyeron 4 mL de la solución de poliacrilamida al 30 %, 2.5 mL de solución Tris 1.5 M pH 8.8, 100 µL de solución SDS al 10 %, 100 µL de persulfato de amonio ((NH₄)₂S₂O₈) en 3.3 mL de agua destilada y se dejó en reposo durante 5 minutos. Finalmente, antes de colocar el gel de resolución en la placa de vidrio del sistema de electroforesis, se añadió 20

μL de TEMED, o Tetrametiletilendiamina ($\text{C}_6\text{H}_{16}\text{N}_2$), el cual va a catalizar la polimerización de la acrilamida (León, 2017).

f) Gel de apilamiento 5 %

Para preparar la cantidad necesaria de un minigel, se diluyeron 830 μL de solución de poliacrilamida 30 %; 630 μL de solución Tris 0.5 M pH 6.8; 50 μL de solución SDS al 10 %; 50 μL de persulfato de amonio; en 3.4 mL de agua destilada y se dejó en reposo durante 5 minutos. Inmediatamente antes de colocar el gel en el sistema, añadir 10 μL de TEMED (León, 2017).

g) Tampón muestra

Se mezclaron 1 mL de solución Tris HCl 0.5 M pH 6.8; 8.8 mL de glicerol; 1.6 mL de solución SDS al 10 %; y 0.4 mL de solución de azul de bromofenol 1 % (previamente preparada, al diluir 1g de azul de bromofenol en 100 mL de agua destilada); con 3 mL de agua destilada. Inmediatamente antes de su uso, se añadió 0.4 mL de 2-mercaptoetanol y debido a su toxicidad, se lo manipuló en la campana de extracción (Roland, 2007).

h) Tampón de electroforesis 10X TrisGlicina pH 8.3

Para preparar 1L se disolvieron 30 g de Tris base; 144 g de glicina; y 10 g de SDS en 800 mL de agua destilada. Se ajustó el pH a 8.3 con HCl concentrado y se procedió a aforar a 1 L con agua destilada (Checa, 2017).

i) Tampón de electroforesis 1X TrisGlicina pH 8.3

Para preparar 1 L se diluyeron 100 mL de la solución concentrada del tampón de electroforesis 10X TrisGlicina pH 8.3 previamente preparada, en 900 mL de agua destilada (León, 2017).

j) Solución decolorante

Para obtener 1 L de solución decolorante, en la campana de extracción se diluyeron 500 mL de metanol y 100 mL de ácido acético en 400 mL de agua destilada. Posteriormente se dejó en agitación durante 30 min (Checa, 2017).

k) Azul de Coomasie

Se mezcló 450 mL de etanol al 96 % y 50 mL de ácido acético glacial en 500 mL de agua destilada. Se añadió 2.5 g de azul de Coomasie y se dejó en agitación durante toda la noche. Se filtró la solución y se almacenó en un frasco ámbar (Serrano, s.f.).

• **Preparación de muestras**

a) VP: Veneno Patrón

Se agregaron 1.07 μ L de veneno puro a 300 μ L de tampón muestra.

b) V+E: Veneno y extracto

Se añadieron 1.07 μ L de veneno puro a 40 μ L de solución fisiológica.

Para obtener el extracto heptánico, se diluyeron 7 mg de extracto vegetal

en 60 μL de heptano o en 60 μL de alcohol en el caso del extracto alcohólico. Las disoluciones de veneno y extracto se mezclaron y se incubaron durante 30 minutos a 37 °C; por último, se añadió 100 μL de tampón muestra.

c) PP: Proteína Patrón

Se diluyeron 5 μL de proteína estándar Thermo Fisher (14-220 kDa) en 15 μL de tampón muestra.

Estas soluciones preparadas se incubaron a 100 °C durante 5 min para incitar la desnaturalización de proteínas.

- **Montaje del sistema y colocación de los geles**

Se armó el sistema de electroforesis vertical, colocando los vidrios uno junto al otro y cubriendo la parte inferior con cinta adhesiva (masking tape). Se aseguraron los vidrios en el empaque y se midió 1 cm bajo el alcance del peine del sistema, realizando una pequeña marca con marcador en este punto.

Se agregó TEMED al gel de resolución y con la ayuda de una micropipeta, se depositó este gel en el compartimento formado entre los dos vidrios, teniendo cuidado de no sobrepasar la línea previamente marcada. Se adicionó 1 mL de etanol al 70 % para evitar la formación de burbujas según metodología y se dejó polimerizar el gel durante 15 min. Posteriormente se extrajo el etanol con la ayuda de papel filtro, con cuidado de no dañar el gel de resolución.

Luego, se agregó TEMED al gel de apilamiento y con la ayuda de una micropipeta se depositó este gel sobre el gel de resolución. A continuación, se colocó el peine evitando la creación de burbujas y se dejó polimerizar el gel.

Una vez polimerizados los geles, se retiró con mucho cuidado la cinta adhesiva colocada en las placas de vidrio y se las introdujo dentro del empaque y del tanque.

Se cargó el tanque con TrisGlicina 1X y se extrajo el peine con cuidado de no dañar los pocillos formados en el gel de apilamiento.

- **Carga de las muestras y corrida**

En los pocillos formados se colocaron 15-20 μ L de los estándares y muestras preparadas anteriormente, ubicando el veneno patrón o VP y la proteína patrón o PP en los pocillos centrales y el veneno con extracto o V+E en los pocillos restantes.

Se tapó el tanque de electroforesis y se ubicaron los cables en su polo respectivo, el cable rojo se ajustó en el polo positivo, mientras que el cable negro se ajustó en el polo negativo; y se conectó el sistema a la fuente de poder.

Se corrió las muestras a un voltaje de 220 v y 26 mA durante 3 horas.

Posterior a esto, se abrió el tanque de electroforesis y se extrajo los vidrios que contenían el gel. Con cuidado se separaron los dos vidrios y se separó el gel de apilamiento con la ayuda de una espátula para ser desechado.

Se despegó el gel de resolución del vidrio y se lo lavó 3 veces con agua destilada.

- **Revelado del gel**

Se situó el gel lavado en un recipiente, se añadió 60 mL de azul de Coomasie y se dejó en agitación durante una hora. Se lavó el gel con agua destilada hasta que el azul de Coomasie fuera enjuagado totalmente.

Se decoloró el gel añadiendo 60 mL de solución decolorante y dejando en agitación durante 2 horas.

Por último, se observaron las bandas obtenidas con el perfil proteico del veneno bajo el efecto de los extractos vegetales de *Adenostemma lavenia* y *Pollalesta discolor*.

- **Determinación del peso molecular**

Para la determinación del peso molecular, se comparó la movilidad electroforética relativa (RF) de las proteínas de las muestras V+E, con la movilidad electroforética relativa (RF) de las proteínas de peso molecular conocido, es decir de la proteína patrón PP.

Para el cálculo de la movilidad electroforética relativa (RF), se utilizó la siguiente fórmula:

$$Rf = \frac{\text{Distancia que migra una determinada proteína}}{\text{Distancia que migra el frente del gel}}$$

Fuente: (Maldonado, 2016)

La distancia que migra una determinada proteína es la distancia en mm que recorre la proteína en cuestión, mientras que la distancia que migra el frente del gel es la distancia en mm recorrida por el colorante azul de bromofenol (Figura 4).

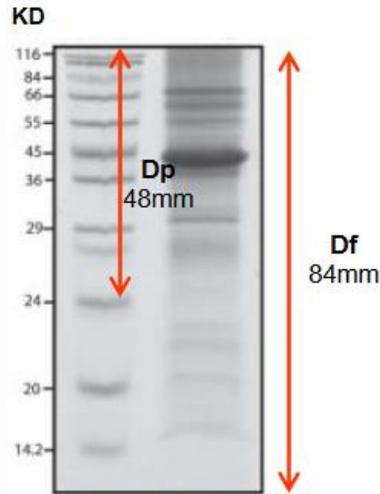


Figura 4. Cálculo de la movilidad electroforética relativa.

Nota: Dp= Distancia que migra la proteína en cuestión. Df=Distancia que migra el frente del gel.

Tomado de: Maldonado (2016)

Una vez calculadas las movilidades electroforéticas relativas de cada una de las proteínas patrón, se calculó el logaritmo del peso molecular de las mismas y se obtuvo la ecuación lineal:

$$\log(\text{PM}) = m \times R_f + b$$

Fuente: (UNQ, 2010)

Posteriormente se calcularon los valores del R_f de las proteínas de las muestras V+E, y se extrapolaron en la ecuación lineal obtenida. Se aplicó el antilogaritmo y se obtuvo el peso molecular de las proteínas incógnitas (UNQ, 2010).

2.13 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de las pruebas de anticoagulación, antihemólisis y antiproteólisis, se usó el software INFOSAT 2017.

Se utilizó un diseño completamente al azar (DCA) con arreglo factorial.

Capítulo III:

Resultados y discusión

3.1 Obtención de extractos vegetales

Siguiendo la metodología previamente citada, se obtuvieron los siguientes extractos vegetales.

3.1.1 Extracto heptánico

Usando como solvente el heptano, a partir de 15 g de material vegetal de cada especie, se obtuvieron los siguientes pesos de extractos secos

Tabla 4.

Peso en gramos de los extractos n-heptánicos

Especie Vegetal	Extracto seco (g)	Rendimiento (%)
<i>Pollalesta discolor</i>	0.0684	0.456
<i>Adenostemma lavenia</i>	0.1024	0.682

Elaborado por: La autora (2017)

La tabla 4 muestra el peso en gramos y el rendimiento de los extractos secos de las especies vegetales usando como solvente heptano. Se puede observar que la mayor cantidad obtenida fue 0.1024 g con un rendimiento de 0.682 %, perteneciente al extracto de *Adenostemma lavenia*.

3.1.2 Extracto alcohólico

Se obtuvieron los siguientes pesos de extractos secos, extraídos usando el solvente de polaridad media:

Tabla 5.

Peso en gramos de los extractos alcohólicos

Especie vegetal	Extracto seco (g)	Rendimiento (%)
<i>Pollalesta discolor</i>	0.1017	0.678
<i>Adenostemma lavenia</i>	0.3931	2.62

Elaborado por: La autora (2017)

La tabla 5 muestra el peso en gramos y el rendimiento de los extractos secos obtenidos mediante la extracción con solvente etanólico al 96 %, de cada una de las especies vegetales. La especie con una mayor cantidad de extracto seco es *Adenostemma lavenia* con 0.3931 g y con un rendimiento del 2.62 %.

Se obtuvo mayor rendimiento al utilizar el solvente alcohólico con resultados similares a los obtenidos por Reyes (2017) y Muñoz (2017), en sus investigaciones sobre la actividad alexítera de *Adenostemma lavenia* y *Pollalesta discolor*. Esto se debe a que el rendimiento de la extracción depende de la polaridad del solvente empleado ya que está asociado a la cantidad y posición de sus grupos hidroxilo y del tamaño molecular, (Soto, 2016); como fue evidenciado en investigaciones sobre contenidos de fenoles en extractos de *Pleurotus* obtenidos con solventes de diferente polaridad, en el cual los rendimientos de los extractos etanólico fueron mayores a los alcanzados con solventes menos polares (Beltrán, 2013).

3.2 Cuantificación de polifenoles

Utilizando la curva de calibración con el reactivo de Folin-Colicatu (Anexo 3), se obtuvieron las siguientes cantidades en mg/L de polifenoles en los extractos tanto heptánicos como alcohólicos:

Tabla 6.

Concentración de polifenoles en los extractos vegetales

Extractos vegetales	Tipo	mg/L
<i>Pollalesta discolor</i>	n-Heptánico	0
	Alcohólico	181.67
<i>Adenostemma lavenia</i>	n-Heptánico	0
	Alcohólico	707.50

Elaborado por: La autora (2017)

La tabla 6 muestra la cantidad en mg/L de polifenoles presentes en cada uno de los extractos vegetales. El extracto con una mayor cantidad de polifenoles es el alcohólico de *Adenostemma lavenia* con 707.50 mg/L; mientras que el extracto con una menor cantidad de polifenoles es el alcohólico de *Pollalesta discolor* con 181.67 mg/L; afirmando la viabilidad de las pruebas de extracción de fenoles. Similares resultados fueron obtenidos en la investigación de Muñoz, W (2015) donde extrajo fenoles a partir de Champa utilizando una metodología similar para la extracción de flavonoides.

En la extracción con heptano se obtuvieron valores nulos de polifenoles y flavonoides en los extractos de ambas especies, debido a que son compuestos orgánicos que poseen un grupo hidroxilo que les brinda alta polaridad, dada por la diferencia de electronegatividad entre el oxígeno y el hidrógeno (Claramunt, 2013); el solvente

heptánico, al ser alcano es una sustancia apolar (Johll, 2008) que no puede reaccionar con los fenoles y por lo tanto su extracción se ve limitada.

3.3 Cuantificación de flavonoides

Utilizando una curva de calibración con el estándar de Quercetina (Anexo 4), se obtuvieron las siguientes cantidades en ppm de flavonoides en los extractos heptánicos y alcohólicos:

Tabla 7.

Concentración de flavonoides en los extractos vegetales

Extractos vegetales	Tipo	mg/L
<i>Pollalesta discolor</i>	n-Heptánico	0
	Alcohólico	75.075
<i>Adenostemma lavenia</i>	n-Heptánico	0
	Alcohólico	654.200

Elaborado por: La autora (2017)

En la tabla 7 se puede ver la cantidad de flavonoides en mg/L presentes en cada uno de los extractos. El extracto con la mayor cantidad de flavonoides es el extracto alcohólico de *Adenostemma lavenia* con una cantidad de 654.200 mg/L; mientras que el extracto con la menor cantidad de flavonoides es el extracto alcohólico de *Pollalesta discolor*, con una cantidad de 75.075 mg/L.

Durante la experimentación se observó que la cantidad de flavonoides obtenida es mayor al utilizar las partes aéreas de *A. lavenia*, lo que coincide con la publicación de Cartaya y Reynaldo (2001), sobre las propiedades de los flavonoides, en la cual indica que una

considerable proporción de los flavonoides presentes en las plantas se encuentran en la membrana tilacoidal de los cloroplastos.

3.4 Determinación de la dosis mínima de coagulante de veneno

Se obtuvo los siguientes tiempos de coagulación para el plasma sanguíneo bajo el efecto de las seis diferentes concentraciones de veneno:

Tabla 8.

Tiempo de coagulación de plasma sanguíneo

Concentración de veneno ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	T (s)
0.02	30.33
0.013	49
0.001	61.6
0.0009	67
0.0008	67.33
0.0007	78.66

Elaborado por: La autora (2017)

La dosis mínima de coagulación fue la concentración que obtuvo el tiempo de coagulación aproximado a los 60 segundos según metodología de Ortiz (2012), es decir 0.001 mg/mL. Un estudio realizado en Centro América sobre la neutralización de los efectos coagulantes del veneno de *Bothrops* sp. por extractos de especies vegetales utilizadas en la medicina tradicional mostró resultados similares (Saravia, 2017), en el cual se obtuvo un tiempo de coagulación de 60 segundos con una dosis de veneno de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, debido a que las enzimas coagulantes presentes en el veneno se encuentran no solo en *Bothrops atrox*, sino que son características de todo el género *Bothrops*.

El tiempo de coagulación del plasma sin veneno o extracto vegetal superó los 5 minutos, lo cual coincide con los tiempos de coagulación del plasma humano bajo condiciones normales que tarda entre 5 y 10 minutos en coagular, debido a la activación de los factores de coagulación (López S. , 2016).

3.5 Actividad anticoagulante de los extractos vegetales

Se obtuvieron los siguientes tiempos de coagulación al exponer el plasma sanguíneo con la concentración mínima coagulante de veneno y los extractos vegetales:

Tabla 9.

Tiempo de coagulación del plasma sanguíneo bajo los efectos de la interacción del veneno y los extractos vegetales

Extracto vegetal	Tipo	Tiempo de coagulación (s)
<i>Pollalesta discolor</i>	n-Heptánico	85
	Alcohólico	105
<i>Adenostemma lavenia</i>	n-Heptánico	70
	Alcohólico	86

Elaborado por: La autora (2017)

En la tabla 9 se evidencia que los extractos vegetales generaron un aumento en el tiempo de coagulación del plasma sanguíneo bajo los efectos del veneno de *Bothrops atrox*. El extracto con un tiempo de coagulación mayor fue el alcohólico de *Pollalesta discolor* con 105 segundos; mientras que el extracto con una menor capacidad anticoagulante fue el heptánico de *Adenostemma lavenia* con 70 segundos.

3.5.1 Análisis estadístico de la actividad anticoagulante

Tabla 10.

Análisis de varianza (ANOVA) de la prueba de anticoagulación

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)					
F.V.	SC	GL	CM	F	p-valor
Modelo	1814.25	3	604.75	2.82	0.1068
Especie	850.08	1	850.08	3.97	0.0814
Extracto	954.08	1	954.08	4.46	0.0678
Especie*Extracto	10.08	1	10.08	0.05	0.0336
Error	1712.67	8	214.08		
Total	3526.92	11			

Elaborado por: La autora (2017)

El valor p es usado para determinar la significancia estadística de la prueba. Si el valor de p obtenido en el análisis de varianza ANOVA es menor al valor de alfa usado, en este caso 0.05, se sugiere que esta muestra provee suficiente información y evidencia para poder aceptar o rechazar la hipótesis (Stone, 2014).

La tabla 10 muestra que los valores no son significativamente diferentes según el análisis de varianza, ya que los valores de p-valor son mayores a 0.05 en el análisis de las especies y extractos por separado; por lo cual se puede decir que, al analizar las variables de especie y extracto por separado, no se observa diferencia entre los tiempos de coagulación obtenidos la cual indica que no hay diferencia entre las medias de los

tratamientos; en otras palabras, ambos tratamientos obtuvieron resultados similares y no se puede decir con seguridad cuál de ellos fue más eficiente.

El único valor de p que presenta un cambio significativo es la interacción especie y extracto ya que es menor al valor de alfa 0.05, lo que indica que, al analizar las variables especie y extracto juntas, indicando que se tiene un efecto anticoagulante superior en uno de los tratamientos. Un resultado significativo representa que los valores obtenidos no ocurrieron por casualidad.

Tabla 11.

Test de Duncan. Interacción entre la especie y extracto de la actividad anticoagulante

Especie	Extracto	Medias	n	E.E.	Rango	
1.00	2.00	104.67	3	8.45	A	
2.00	2.00	86.00	3	8.45	A	B
1.00	1.00	85.00	3	8.45	A	B
2.00	1.00	70.00	3	8.45		B

Nota: abreviaciones en la tabla pertenecen a “Especie 1” (*Pollalesta discolor*), “Especie 2” (*Adenostemma lavenia*), “Extracto 1” (Heptánico), “Extracto 2” (Alcohólico).

Elaborado por: La autora (2017)

La tabla 11 muestra que el mejor tratamiento pertenece a la especie vegetal 1, que corresponde a *Pollalesta discolor*, y el extracto 2, que corresponde al extracto alcohólico; es decir que el extracto de *P. discolor* alcohólico, demostró tener mejor actividad anticoagulante, al demorar el proceso de coagulación del plasma sanguíneo de manera significativa. Por otra parte, el tratamiento que muestra menor actividad anticoagulante corresponde a la especie 2, o *Adenostemma lavenia*, con extracto 1,

extracto heptánico; ya que el extracto de *A. lavenia* heptánico demostró no tener una actividad anticoagulante alta según el test de Duncan con un valor de significancia de α de 0.05.

Los tratamientos que no compartan el mismo rango tienen diferencia significativa, en este caso el tratamiento (especie 1, extracto 2) tiene una media significativamente mayor al tratamiento (especie 2, extracto 1); por lo que existe una diferencia no casual entre estos tratamientos.

Se demostró que el extracto alcohólico de *P. discolor* tiene una importante inhibición del efecto coagulante del veneno de *Bothrops atrox*, lo cual coincide con estudios sobre el efecto inhibitorio de extractos vegetales sobre el veneno de *B. asper* (Patiño, 2012), y sobre la evaluación de las propiedades antiofídicas de extractos etanólicos vegetales (Fernández, 2010), en los que existe una prolongación en el tiempo de coagulación de plasma sanguíneo causada por los distintos extractos vegetales. La inhibición de la acción inflamatoria y coagulante del veneno de *Bothrops atrox* por especies vegetales es atribuida por la capacidad anticoagulante de los extractos vegetales debido a una afinidad de compuestos como fenoles y flavonoides a sitios en el sistema de inflamación y coagulación (Magalhaes, 2011) inhibiendo así a las enzimas tipo trombinas existentes en el veneno de *Bothrops atrox* y explicando los resultados del presente estudio.

3.6 Actividad antihemolítica

Se obtuvieron las siguientes absorbancias de los extractos vegetales con veneno sobre los eritrocitos del plasma sanguíneo:

Tabla 12.

Porcentajes de hemólisis de los eritrocitos en las soluciones blanco, veneno y extractos vegetales con veneno

Solución	Porcentaje de hemólisis (%)
Blanco positivo (Eritrocitos, yema de huevo, PBS, Veneno)	100
Blanco negativo (Eritrocitos, yema de huevo, PBS)	18.55
<i>Pollalesta discolor</i> n-Heptánico + Eritrocitos, yema de huevo, PBS, Veneno	63.68
<i>Pollalesta discolor</i> Alcohólico + Eritrocitos, yema de huevo, PBS, Veneno	26.69
<i>Adenostemma lavenia</i> n-Heptánico + Eritrocitos, yema de huevo, PBS, Veneno	65.90
<i>Adenostemma lavenia</i> Alcohólico + Eritrocitos, yema de huevo, PBS, Veneno	39.89

Elaborado por: La autora (2017)

La tabla 12 muestra la capacidad antihemolítica del blanco positivo y negativo, además de los extractos frente al veneno de *B. atrox*; un valor menor de porcentaje de hemólisis implica una mayor actividad antihemolítica. Se puede observar que el blanco negativo, al no contener veneno, muestra el menor porcentaje de hemólisis, con un valor de 18.55 %. El extracto con mayor capacidad inhibitoria de la hemólisis causada por el veneno es el extracto alcohólico de *P. discolor*, con un porcentaje de 26.69 %.

El extracto con menor capacidad antihemolítica es el extracto heptánico de *A. lavenia*, con un porcentaje de 65.90 %.

Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Fernández (2010), en el cual se contempla que los extractos vegetales valorados generan una neutralización parcial del efecto hemolítico del veneno de *B. asper*, alcanzando un porcentaje de inhibición de hasta el 32 %. Según Oliveira (2016), en su investigación sobre la inhibición de proteasas y fosfolipasas A2 de los venenos de *Bothrops atrox* y *Crotalus durissus terrificus*, se atribuye la capacidad hemolítica del veneno de *Bothrops atrox* principalmente a la enzima fosfolipasa A2 (PLA2); los compuestos fenólicos y flavonoides pueden inhibir la capacidad enzimática de PLA2 al unirse en el sitio hidrófobo de la enzima, bloqueando el acceso del sustrato al sitio activo e impidiendo su acción sobre los eritrocitos (Lobo, 2010), hecho que se evidenció en este estudio.

Se obtuvo valores de hemólisis en el blanco negativo debido a que la temperatura de centrifugación, además de la fuerza centrífuga a la que fueron sometidas las muestras, causa la ruptura de eritrocitos, como indica (Gómez R. A., 2009) en el estudio de hemólisis en las muestras para diagnóstico donde explica que estas son las razones más frecuentes de hemólisis en la sangre.

3.6.1 Análisis estadístico de la actividad antihemolítica

Tabla 13.

Análisis de varianza (ANOVA) de la prueba de antihemólisis

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)					
F.V.	SC	GL	CM	F	p-valor
Modelo	1.59	3	0.53	416.68	<0.0001
Especie	0.09	1	0.09	68.74	<0.0001
Extracto	1.46	1	1.46	1146.43	<0.0001
Especie*Extracto	0.04	1	0.04	34.86	0.0004
Error	0.01	8	3E-03		
Total	1.60	11			

Elaborado por: La autora (2017)

En la tabla 13, el análisis de varianza ANOVA muestra que se tiene una diferencia significativa entre la capacidad antihemolítica de cada uno de los tratamientos, ya que el valor de “p” tanto de la especie, extracto y la interacción especie extracto, es menor a 0.05 **Fuente especificada no válida..** Esta diferencia significativa indica que existe una diferencia entre las medias de los tratamientos, al tener un valor de p menor al valor de alfa (0.05), se tiene la seguridad del 95 % que los resultados obtenidos no son resultados al azar.

Tabla 14.

Test de Duncan. Actividad antihemolítica de la especie y extracto

Especie	Extracto	Medias	N	E.E.	Rango		
1	2	0.59	3	0.02	A		
2	2	0.88	3	0.02		B	
1	1	1.41	3	0.02			C
2	1	1.46	3	0.02			C

Nota: abreviaciones en la tabla pertenecen a “Especie 1” (*Pollalesta discolor*), “Especie 2” (*Adenostemma lavenia*), “Extracto 1” (Heptánico), “Extracto 2” (Alcohólico).

Elaborado por: La autora (2017)

La tabla 14 muestra que el análisis de varianza según Duncan, con un valor de α de 0.05 determina que la especie 1 y el extracto 2 son el tratamiento con mayor actividad antihemolítica, es decir que el extracto alcohólico de *Pollalesta discolor* presenta una mayor capacidad de inhibir el efecto hemolítico del veneno. Mientras que los tratamientos más deficientes son los extractos heptánicos de ambas especies.

3.7 Actividad antiproteolítica

Se obtuvieron los siguientes resultados:

Tabla 15.

Actividad antiproteolítica de los extractos vegetales (Anexo 10)

Extracto vegetal	Tipo	Unidades de proteólisis/mg
<i>Pollalesta discolor</i>	n-Heptánico	370
	Alcohólico	369
<i>Adenostemma lavenia</i>	n-Heptánico	2759.33
	Alcohólico	711.33

Elaborado por: La autora (2017)

La tabla 15 muestra la actividad antiproteolítica de cada uno de los extractos vegetales representada en unidades de proteólisis/mg, un valor menor de U/mg representa mayor actividad antiproteolítica (León, 2017). El extracto con una mayor capacidad de inhibir la proteólisis causada por el veneno de *B. atrox* es el extracto alcohólico de la especie vegetal *P. discolor*, con un valor de 369 U/mg.

El extracto con una menor actividad antiproteolítica es el extracto heptánico de *A. lavenia*, con un valor de 2759.33 U/mg.

Estos resultados se asemejan a los presentados por Gómez (2015) y Vásquez (2012) quienes explican que ciertas especies vegetales contienen una alta capacidad de inhibición de la proteólisis del veneno, ya que presentan cantidades considerables de flavonoides, los cuales son capaces de formar complejos con Zn^{2+} y debido a la dependencia al zinc de la enzima metaloproteasa presente en el veneno su actividad proteolítica se ve alterada. Esto se evidencia en el presente estudio; al tener una

actividad antiproteolítica considerable por parte de los extractos, en especial del extracto alcohólico de *Pollalesta discolor*, que demostró la mayor actividad antiproteolítica en el ensayo, a pesar de tener 8 veces menor cantidad de flavonoides que el extracto alcohólico de *Adenostemma lavenia*; esto puede deberse a que los taninos son también responsables por acomplejar iones metálicos y aunque la especie *P. discolor* tiene alto potencial etnobotánico, no existen investigaciones histoquímicas sobre la cantidad de taninos presentes en su corteza; sin embargo, las especies que pertenecen a la familia Asteraceae, presentan compuestos químicos entre los cuales se destacan flavonoides y taninos (Tosoratto, 2016), por lo que se determina que los extractos alcohólicos y heptánicos de *P. discolor* contienen este compuesto, mejorando su efecto inhibidor de metaloproteasas, causado por una sinergia de flavonoides y taninos; también se evidenció un efecto sinérgico entre estos metabolitos en el estudio sobre el efecto sinérgico de taninos y flavonoides presentes en *Terminalia catappa* L. (Espinosa, 2012)

3.7.1 Análisis estadístico de la actividad antiproteolítica

Tabla 16.

Análisis de varianza (ANOVA) de la prueba de antiproteólisis

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)					
F.V.	SC	GL	CM	F	p-valor
Modelo	11.88E6	3	39.62E5	13.81	0.0016
Especie	5.59E6	1	55.96E5	19.50	0.0022
Extracto	3.148E6	1	31.48E5	10.97	0.0107
Especie*Extracto	3.142E6	1	31.42E5	10.95	0.0107
Error	2.29E6	8	28.69E4		
Total	14.18E7	11			

Elaborado por: La autora (2017)

En la tabla 16, según el análisis de varianza, se puede ver que todos los valores de “p” son menores a 0.05 por lo que la diferencia entre los tratamientos y su actividad antiproteolítica es significativa. Si el valor de p es menor al valor de alfa, se puede decir que las medias de todos los tratamientos son iguales. El valor de p obtenido es menor al valor de significancia de alfa, por lo que se concluye que no todas las medias entre tratamientos son iguales, es decir, existe una diferencia en la actividad antiproteolítica entre los tratamientos (Frost, 2017).

Tabla 17.

Test de Duncan. Actividad antiproteolítica de la especie y extracto

Especie	Extracto	Medias	n	E.E.	Rangos	
1	2	369.00	3	309.28	A	
1	1	370.00	3	309.28	A	
2	2	711.33	3	309.28	A	
2	1	2759.33	3	309.28		B

Nota: abreviaciones en la tabla pertenecen a “Especie 1” (*Pollalesta discolor*), “Especie 2” (*Adenostemma lavenia*), “Extracto 1” (Heptánico), “Extracto 2” (Alcohólico).

Elaborado por: La autora (2017)

La tabla 17 indica que según el test de Duncan con un valor de α de 0.05, los tratamientos de la especie 1, extracto 2; especie 1, extracto 1; y especie 2, extracto 2 se encuentran en el mismo rango, lo que quiere decir que los tres tratamientos tienen una media de la eficacia antiproteolítica similar, por lo que no se puede determinar cuál de estos tratamientos es mejor. Para tener resultados más específicos, se analizó la capacidad antiproteolítica de las especies y los extractos por separado (Tabla 18 y Tabla 19).

Tabla 18.

Test de Duncan. Actividad antiproteolítica de las especies

Especie	Medias	n	E.E.	Rangos	
1	369.50	6	218.69	A	
2	1735.33	6	218.69		B

Nota: abreviaciones en la tabla pertenecen a “Especie 1” (*Pollalesta discolor*), “Especie 2” (*Adenostemma lavenia*).

Elaborado por: La autora (2017)

En la tabla 18 se puede observar que, en el análisis de varianza según Duncan, con un valor de α de 0.05; la especie que muestra una mayor capacidad antiproteolítica es la especie 1, correspondiente a *Pollalesta discolor*. Y la especie que muestra una menor capacidad antiproteolítica es la especie 2, correspondiente a *Adenostemma lavenia*.

Tabla 19.

Test de Duncan. Actividad antiproteolítica de los extractos

Extracto	Medias	N	E.E.	Rangos	
2	540.17	6	218.69	A	
1	1564.67	6	218.69		B

Nota: abreviaciones en la tabla pertenecen a “Extracto 1” (Heptánico), “Extracto 2” (Alcohólico).

Elaborado por: La autora (2017)

En la tabla 19, según el test de Duncan, con un valor de α de 0.05; el extracto que muestra una mayor capacidad antiproteolítica es el extracto 2, correspondiente al alcohólico. Y la especie con una menor capacidad antiproteolítica es el extracto 1, correspondiente al heptánico.

De esta manera se puede decir que el tratamiento con mayor capacidad inhibitoria de la acción proteolítica del veneno de *Bothrops atrox* es el extracto alcohólico de *Pollalesta discolor*, mientras que el tratamiento con menor capacidad antiproteolítica es el extracto heptánico de *Adenostemma lavenia*.

3.8 Electroforesis SDS-PAGE

Una vez revelado el gel de poliacrilamida, se obtuvo el perfil proteico mostrado en la figura 5, donde se puede observar un cambio en el perfil proteico del veneno en relación con los extractos de *Adenostemma lavenia* y *Pollalesta discolor*. Los extractos heptánicos de ambas especies vegetales presentan bandas extras en su perfil en comparación con los extractos alcohólicos; esto puede deberse a que conforme disminuye la polaridad del solvente usado para la extracción, aumenta la cantidad de bandas en el perfil, lo cual se contempla también en el estudio de la actividad alexítera de especies vegetales de León (2017), en el cual los extractos obtenidos con el solvente de mayor polaridad no presentaron aumento en la cantidad de bandas, mientras que los extractos obtenidos con el solvente de menor polaridad presentaron bandas extras.



Figura 5. Número de bandas en el gel de poliacrilamida. (Autora, 2017)

Abreviaciones: VP= Veneno Patrón. PP= Proteína Patrón. V+12H= *Adenostemma lavenia*, extracto heptánico y veneno. V+12OH= *Adenostemma lavenia*, extracto alcohólico y veneno. V+17H= *Pollalesta discolor*, extracto heptánico y veneno. V+17OH= *Pollalesta discolor*, extracto alcohólico y veneno. Todas las bandas pertenecientes a *A. lavenia* se encuentran rotuladas con la letra "A". Las bandas pertenecientes al extracto heptánico de *P. discolor* se encuentran rotuladas con la letra "P". Las bandas pertenecientes al veneno patrón están rotuladas con la letra "v".

El veneno patrón muestra un total de 6 bandas, mientras que las disoluciones de veneno tratado con extractos presentan una mayor cantidad de bandas, con pesos moleculares diversos. El extracto heptánico de *A. lavenia* presenta un total de 8 bandas, y el extracto alcohólico de la misma especie muestra un total de 7 bandas; los extractos preparados a partir de la especie *P. discolor*, el heptánico y alcohólico, exhiben un total de 12 y 9 bandas respectivamente.

Se estimó los siguientes pesos moleculares pertenecientes a cada una de las bandas obtenidas del revelado del gel de poliacrilamida:

Tabla 20.

Movilidad electroforética relativa (Rf) y peso molecular (PM) de las bandas pertenecientes al veneno patrón (VP)

Banda	Rf (mm)	PM (kDa)
v1	0.3818	57.5869
v2	0.5455	35.4561
v3	0.6091	29.3615
v4	0.6545	25.6607
v5	0.7273	20.6850
v6	0.8	16.6740

Elaborado por: La autora (2017)

La tabla 20 muestra que el veneno patrón generó un número de 6 bandas, con sus respectivas movilidades electroforéticas relativas, a partir de las cuales se calculó su peso molecular. Todas estas bandas, como se puede apreciar en la Fig. 5, se encuentran presentes en todas las muestras de veneno con ambos extractos vegetales. Al ser un gel desnaturalizante, cada banda va a ser una cadena polipeptídica aislada; esto concuerda con los resultados obtenidos en estudios anteriores sobre los patrones electroforéticos de veneno de serpiente, en el cual la técnica de SDS-PAGE permite mostrar las bandas proteicas presentes en el veneno de serpiente, las cuales se separan a lo largo del gel debido a la diferencia en su peso molecular (Amrollahi, 2013). Así mismo, estudios electroforéticos sobre el veneno de especies del género *Bothrops*, mostraron que el veneno de *Bothrops atrox* muestra bandas proteicas con pesos moleculares

comprendidos entre los 57 y 11 kDa (Mendoza, 2009), pesos similares a los obtenidos en el presente estudio.

Tabla 21.

Movilidad electroforética relativa (Rf) y peso molecular (PM) de las bandas pertenecientes a los tratamientos del veneno patrón con extracto heptánico y alcohólico de *Pollalesta discolor*

Solvente	Banda	Rf (mm)	PM (kDa)
Heptano	P1	0.1364	1.191.990
	P2	0.1818	1.041.750
	P3	0.3091	714.395
	P4	0.3818	575.869
	P5	0.4182	517.031
	P6	0.4727	439.851
	P7	0.5455	354.561
	P8	0.6091	293.615
	P9	0.6545	256.607
	P10	0.7273	206.850
	P11	0.8000	166.740
	P12	0.9273	114.344
Alcohol	P1	0.1364	1.191.990
	P2	0.1818	1.041.750
	P3	0.3818	575.869
	P4	0.4727	439.851
	P5	0.5091	394.910

	P6	0.6091	293.615
	P7	0.6364	270.815
	P8	0.7091	218.302
	P9	0.8000	166.740

Elaborado por: La autora (2017)

La tabla 21 muestra el número de bandas generadas por el tratamiento del veneno patrón con extracto heptánico de *P. discolor* y su respectivo peso molecular. Éste extracto tiene un total de 12 bandas, 6 de las cuales no se encuentran en el perfil protéico del veneno patrón: la banda P1 con un PM de 119.199 kDa; la banda P2 con un PM de 104.175 kDa; la banda P3 con un PM de 71.4395 kDa; la banda P5 con un PM de 51.7031; la banda P6 con un PM de 43.9851; y la banda P12 con un PM de 11.4344 kDa.

En el tratamiento del veneno patrón con extracto alcohólico de *P. discolor* se aprecia un total de 9 bandas, 3 de las cuales difieren del perfil protéico del veneno patrón, la banda p1 con un PM de 119.199 kDa; la banda p2 con un PM de 104.1750 kDa; y la banda p4 con un PM de 43.9851 kDa.

El alto número de bandas visibles en el extracto heptánico de *P. discolor* está relacionado con los componentes bioquímicos presentes en el mismo; compuestos como taninos, que interactúan con las proteínas del veneno ya que estos presentan la capacidad de precipitar proteínas (Depix, 2011), esto se evidenció en estudios sobre la eficacia de taninos pertenecientes a especies vegetales contra el veneno de cobra, en el cual se observó que los extractos vegetales generaron un cambio en el perfil electroforético del veneno (Sia, 2011), como en el presente estudio. En estudios anteriores donde se analiza el efecto de taninos sobre las proteínas de la albúmina, se observa que la interacción causada por los taninos provoca alteraciones en la estructura

de las proteínas (Neves., 1997); estas alteraciones se evidenciaron en el presente estudio, en el aumento en el número de bandas.

Tabla 22.

Movilidad electroforética relativa (Rf) y peso molecular (PM) de las bandas pertenecientes a los tratamientos del veneno patrón con los extractos heptánicos y alcohólicos de *Adenostemma lavenia*

Solvente	Banda	Rf (mm)	PM (kDa)
Heptano	A1	0.2818	774.540
	A2	0.3818	575.869
	A3	0.4727	439.851
	A4	0.5455	354.561
	A5	0.5909	309.872
	A6	0.6545	256.642
	A7	0.7273	206.850
	A8	0.8	166.740
Alcohol	A1	0.3818	575.869
	A2	0.4727	439.851
	A3	0.5455	354.561
	A4	0.6091	293.615
	A5	0.6545	256.607
	A6	0.7273	206.850
	A7	0.8000	166.740

Elaborado por: La autora (2017)

La tabla 22 demuestra que el tratamiento del veneno patrón con extracto heptánico de *A. lavenia* generó un número de 8 bandas con sus respectivos pesos moleculares. Se puede observar que hay 2 bandas extras en relación con el número de bandas presentadas por el veneno patrón (VP) (Fig.5). La primera banda que difiere es la banda A1 y tiene un peso molecular de 77.454 kDa; la segunda banda extra, es la banda A3 y tiene un peso molecular de 43.9851 kDa. El resto de bandas no muestran un cambio en su peso molecular con respecto a las bandas del veneno patrón.

El tratamiento del veneno patrón con extracto alcohólico de *A. lavenia* presenta un número de 7 bandas, es decir una banda menos que en el caso del extracto heptánico de la misma especie y una banda más que el veneno patrón (Fig. 5). La banda extra con respecto al veneno patrón es la banda a2, con un peso molecular de 43.9851 kDa. El resto de bandas no muestran cambio de peso molecular con respecto a las bandas del veneno patrón

El perfil proteico del veneno analizado antes y después de su incubación con los distintos extractos vegetales coincide con los estudios de Patiño (2012), en el que se observa un cambio en el número de bandas presentes en el veneno, causado por los extractos de etanol y acetato de etilo de *Renalmia alpinia*; también con el estudio sobre el fraccionamiento bioquímico por SDS-PAGE de veneno de serpiente con extracto de *A. mellodora* (Ricciardi, 2016), en el cual se muestra que los extractos alcohólicos de todas las partes vegetales de esa especie presentan actividad alexitérica, al modificar el número y la intensidad de las bandas existentes en el veneno. Esto hace notorio que los extractos vegetales alteran las proteínas (enzimas) de los venenos, lo que puede deberse a una precipitación de los complejos formados (Vásquez, 2012). En el presente estudio se

evidencia un cambio notable en el perfil proteico del veneno de *Bothrops atrox* bajo la influencia alexítera de los extractos heptánicos y alcohólicos de *Pollalesta discolor* y *Adenostemma lavenia*. El número de bandas aumenta en todos los casos; ya que el veneno muestra un número de 6 bandas y los extractos heptánicos y alcohólicos de *A. lavenia* muestran un número de 8 y 7 bandas respectivamente; mientras que los extractos heptánicos y alcohólicos de *P. discolor* exhiben un número de 12 y 9 bandas respectivamente, siendo esta especie la que muestra una mayor actividad alexítera frente al veneno de *B. atrox* según los resultados obtenidos. Este cambio en el número de bandas evidencia que existe una actividad inhibitoria de las actividades coagulantes, hemolíticas y proteolíticas del veneno de serpiente, lo que puede deberse a una acción de proteólisis de las enzimas presentes en el veneno por acción de los diferentes compuestos vegetales activos existentes en los extractos, lo que explicaría el aumento en la cantidad de bandas en los diferentes tratamientos, esto coincide con los resultados del perfil proteico del estudio de León (2017), en el cual los extractos alcohólicos de Kurarina y Kunapi aumentaron el número de bandas presentes en el veneno de *B. atrox*, lo que indica que esas especies tienen actividad alexítera.

En estudios similares que utilizan SDS-PAGE como herramienta para evaluar la actividad alexítera de extractos y aceites vegetales concluyen que la electroforesis de extractos vegetales junto con veneno de serpientes utiliza como indicio fehaciente de actividad alexítera potencial, la disminución de intensidad, desaparición de bandas, o la aparición de bandas de diferente peso molecular a las del veneno patrón (Camargo, 2011), esto explica lo sucedido en el presente estudio, donde se puede observar la aparición de las bandas: A3 del extracto heptánico de *A. lavenia*, A2 del extracto alcohólico de *A. lavenia*, P5, P6 y P12 del extracto heptánico de *P. discolor*, y P4 del

extracto alcohólico de *P. discolor*. Dichas bandas tienen pesos moleculares diferentes a los presentes en las bandas del veneno de *B. atrox*, probablemente producto del fraccionamiento de las proteínas localizadas en la banda de 55KDa. Este fraccionamiento podría explicarse por los compuestos antioxidantes de los extractos vegetales que tienen capacidad de fraccionar las proteínas presentes en el veneno por desnaturalización. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en el estudio sobre la separación de proteomas mediante electroforesis bidimensional, donde la aparición de bandas, especialmente de menor peso molecular es consecuencia de la efectiva desnaturalización de la proteína (Rodríguez, 2015).

En la electroforesis obtenida en un estudio sobre la evaluación biológica de extractos vegetales contra el veneno de *Bothrops asper*, se observa la aparición de bandas de menor peso molecular a las presentes en el veneno, lo que se atribuye a la precipitación de proteínas causadas por extracto vegetal, sin embargo, en los canales pertenecientes a los extractos vegetales con veneno se observa la presencia de bandas con un mayor peso molecular a las bandas pertenecientes al veneno solo (Barranco, 2012); al igual que las bandas A1 del extracto heptánico de *A. lavenia*, P1, P2 y P3 del extracto heptánico de *P. discolor*, y P1 y P2 del extracto alcohólico de *P. discolor* obtenidas en el presente estudio, las cuales presentan un peso molecular superior a las proteínas encontradas en el veneno de *B. atrox*. La presencia de estas bandas puede atribuirse a proteínas propias de los extractos obtenidas durante los procesos de extracción, como se evidencia en el estudio de Llorente (2002) la aparición de bandas correspondientes a proteínas propias de los extractos vegetales en el gel de electroforesis.

Por lo tanto, podríamos inferir que en nuestra experimentación la prueba de electroforesis no fue una herramienta concluyente sobre la acción de los extractos vegetales sobre el veneno de *B. atrox*, sino que debe ser usada junto con pruebas de anticoagulación, antihemólisis y antiproteólisis para tener una visión más amplia de la actividad alexítera de estas plantas.

Conclusiones

Entre las especies vegetales analizadas, *Adenostemma lavenia* presentó un mayor rendimiento durante la extracción, siendo 1.5 veces mayor utilizando el solvente heptánico y 3.8 veces mayor utilizando el solvente alcohólico en comparación con *Pollalesta discolor*.

Del mismo modo, la concentración de fenoles y polifenoles en los extractos de *Adenostemma lavenia* es 8.71 y 3.89 veces mayor respectivamente que en los extractos de *Pollalesta discolor*.

Ambas especies, *Pollalesta discolor* y *Adenostemma lavenia* muestran capacidad alexítera *in vitro* frente a la acción hemotóxica del veneno de *Bothrops atrox* al inhibir la coagulación sanguínea, la hemólisis de eritrocitos y la proteólisis de caseína de huevo. Sin embargo, *Pollalesta discolor* fue la especie que demostró tener una mayor capacidad alexítera en las pruebas de anticoagulación, antihemólisis, antiproteólisis, y electroforesis.

El extracto alcohólico de *Pollalesta discolor* demostró ser más eficiente en la inhibición de las enzimas coagulantes y hemolíticas del veneno, sin embargo, en la prueba de antiproteólisis, el extracto heptánico de esta especie mostró una mejor inhibición de las enzimas proteolíticas del veneno en comparación a *Adenostemma lavenia*.

La cantidad de flavonoides y compuestos fenólicos presentes en los extractos vegetales permite predecir la capacidad antiofídica de los mismos, sin embargo, se debe tener en

cuenta el posible sinergismo entre compuestos vegetales, como taninos, terpenos, polifenoles y flavonoides y su acción sobre las enzimas del veneno. Por lo que se recomienda ampliar el estudio cuantitativo de la composición química de las especies vegetales y relacionar la función que cumplen estos metabolitos con la capacidad alexítera.

El extracto que mostró una menor eficiencia en cuanto a la inhibición de los efectos del veneno fue el extracto heptánico de *Adenostemma lavenia*, ya que no aumentó de manera significativa el tiempo de coagulación de la sangre, ni disminuyó la hemólisis de eritrocitos y proteólisis de la caseína de huevo.

Los extractos heptánicos y alcohólicos de ambas especies, causaron un cambio en el perfil electroforético del veneno, siendo el heptánico de *Pollalesta discolor* el que generó el mayor número de bandas, viéndose seis bandas extras en comparación con el veneno patrón, con un peso de 119.19kDa, 104.17kDa, 71.43kDa, 51.70kDa, 43.99kDa y 11.43kDa.

El análisis total de los resultados obtenidos en este estudio revela que ambas especies evaluadas (*Pollalesta discolor* y *Adenostemma lavenia*) presentan actividad alexítera, es decir una capacidad inhibitoria de los efectos tóxicos del veneno de *Bothrops atrox*, lo cual valida su uso como tratamiento antiofídico por parte de las comunidades indígenas, como una natural, de obtención local y económica de los sueros antiofídicos comúnmente usados en caso de un accidente ofídico.

Este estudio brinda bases científicas del uso de ciertas especies vegetales con capacidad alexítera; sin embargo, son necesarias pruebas más exhaustivas tanto *in vivo* como de análisis de la interacción de los componentes vegetales con las enzimas del veneno. De esta manera, aumentaría la información de los mecanismos de inhibición y las posibles formas de administración o dosificación para en un futuro usar estos extractos como complemento del tratamiento antiofídico tradicional.

Referencias

- Amrollahi, E. Z. (2013). *Partial Purification and Characterization of Anticoagulant Facotr from the Snake (Echis carinatus) Venom*. Retrieved from http://ijbms.mums.ac.ir/m/article_1930_88b5e4f1624fb267ec8d2f37dcac7736.pdf
- B.R.E.A. (2011). *Serpientes Solenoglifas (Familia Viperidae)*. Retrieved from <http://breavenenos.blogspot.com/2011/11/serpientes-solenoglifas-familia.html>
- Barranco, W. N. (2012). Evaluación biológica preliminar de extractos vegetales utilizados en la medicina tradicional de la Sierra Nevada de Santa Marta contra el veneno de la Bothrops asper. *Duazary*, 9(2), 141-150.
- Beltrán, Y. M. (2013). *Contenido de fenoles totales en extractos de Pleurotus obtenidos con solventes de diferente polaridad*. Retrieved from http://bvs.sld.cu/revistas/ibi/vol32_2_13/ibi01213.htm
- Betancourt, R. (2012). *INCIDENCIA, ZONAS DE RIESGO Y PREVENCIÓN DE ACCIDENTES OFÍDICOS EN ÁREAS RURALES DE MANABÍ Y LOS RIOS, ECUADOR. AÑOS 2007 A 2009*. Retrieved from <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/369/1/T-UCE-0010-120.pdf>
- BIO-RAD Laboratories. (2011). *Buffer Formulations*. Retrieved from http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_6199.pdf

- Blair, S. (2005). Plantas antimaláricas de Tumaco. Medellín, Universidad de Antioquía. 56-57.
- Bolaños, R. G. (1980). *EL PROBLEMA DE LOS EFECTOS HEMORRAGICO Y MIONECROTICO POR MORDEDURAS DE SERPIENTE EN EL CONTINENTE AMERICANO*. Retrieved from http://www.kerwa.ucr.ac.cr:8080/bitstream/handle/10669/29115/4_1980_Bol.Of.Sanit.Panam._Guti%C3%A9rez_venoms_local_effects.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Cadena, H. B. (2016). *Anecdotal predation events of some snakes in Ecuador*. Retrieved from https://www.zobodat.at/pdf/HER_30_1_2_0093-0096.pdf
- Camargo, F. T. (2011). *SDS-PAGE como método rápido de screening para evaluación de actividad alexíttera de extractos y aceites vegetales*. Retrieved from <http://www.unne.edu.ar/unnevieja/investigacion/com2011/CE-Web/CE-002.pdf>
- Campbell, L. L. (2004). *The venomous reptiles of the western hemisphere (Vol. 1)*. New York: Comstock Publishing, Cornell University.
- Canseco, L. G. (2008). *Clase Reptilia*. Retrieved from <http://www.biodiversidad.gob.mx/pdf/libros/AvtparteB.pdf>
- Carbonell, D., & Jativa, C. (2002). Bioactividad de plantas Amazónicas. Quito: Abya-Yala.
- Carpio, E. L. (2014). Escultura con espiga frente a la Rectoría de la Universidad de San Carlos de Guatemala. *Revista Apuntes Arqueológicos*, 176.

- Carrillo, E. A. (2014). *Lista Roja de los Reptiles del Ecuador*. Quito: Fundación Novum Milenium.
- Castro, O. G. (1999). Neutralización del veneno hemorrágico inducido por el veneno de *Bothrops asper* (Serpientes: Viperidae) por extractos de plantas tropicales. *Revista Biología Tropical*, 605-616.
- Cerón, C. (2006). *Plantas medicinales de los Andes ecuatorianos*. Retrieved from <http://www.beisa.dk/Publications/BEISA%20Book%20pdfer/Capitulo%2018.pdf>
- Charry, H. (2012). *Aspectos Biomédicos del accidente Bothrópico*. Retrieved from <http://www.probiol.com/images/pdf/aspectosbiomedicosdelaccidentebothropico.pdf>
- Checa, A. (2017). *Método: Gel de poliacrilamida (proteínas)*. Retrieved from <http://conogasi.org/articulos/metodo-gel-de-poliacrilamida-proteinas/>
- Cheng, P. H. (1979). *Isolation of 11-hydroxylated kauranic acids from Adenostemma lavenia*. Retrieved from <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/np50002a009?journalCode=jnprdf>
- Chloé, J. (2014). *Bothrops atrox (Mapepire Balsain or Fer-de-Lance)*. Retrieved from https://sta.uwi.edu/fst/lifesciences/sites/default/files/lifesciences/images/Bothrops_atrox%20-%20Mapepire%20Balsain%20or%20Fer-de-Lance.pdf
- Cisneros, F. G. (2017). *Patterns, biases and prospects in the distribution and diversity of Neotropical snakes*. Retrieved from <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/geb.12679/pdf>

- Claramunt, M. C. (2013). Principales compuestos químicos. Madrid: UNED.
- Coloma, L. Q. (2008). *Reptiles de Ecuador: lista de especies y distribución. Crocodylia, Serpentes y Testudines.* Retrieved from <http://www.puce.edu.ec/zoologia/reptiliawebec/reptilesecuador/index.html>
- Córdova, G. (2013). *Factores asociados con las complicaciones de un accidente ofídico en pacientes que ingresaron al Hospital General Puyo.* Retrieved from <http://repositorio.puce.edu.ec/bitstream/handle/22000/8886/ACCIDENTE%20OFIDICO%20TESIS%202015.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Cruz, V. (2013). *Accidentes Ofídicos en Santo Domingo de los Tsachilas. Epidemiología Clínica por Mordeduras de Serpientes en Pacientes del Servicio de Emergencias del Hospital Dr Gustavo Dominguez Z.* Retrieved from <http://repositorio.usfq.edu.ec/handle/23000/2588>
- CSH Protocols. (2006). *Recipe. SDS (10%) stock solution.* Retrieved from http://cshprotocols.cshlp.org/content/2006/1/pdb.rec10480.full?text_only=true
- Depix, F. (2011). *Interacción diferencial de extractos de taninos enológicos comerciales mediante saliva humana.* Retrieved from <http://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/112295/MEMORIA.Fernando.Depix.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Dos Santos, L. H. (2016). *Pharmacological activity of Costus spicatus in experimental Bothrops atrox envenomation.* Retrieved from <http://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.3109/13880209.2016.1145703>

- Erazo, G., Izurieta, J., Cronkleton, P., Larson, A., & Putzel, L. (2014). El uso de pigue (Piptocomma discolor) por los pequeños productores de Napo, Ecuador. *Brief*, 2-4.
- Espinosa, R. H. (2012). *EFEECTO SINÉRGICO DE TANINOS Y FLAVONOIDES PRESENTES EN TERMINALIA CATAPPA L. SOBRE EL CRECIMIENTO MICELIAL DE RHIZOCTONIA SOLANI KÜHN Y SCLEROTIUM ROLFSII SACC.* Retrieved from <http://www.redalyc.org/html/2091/209125190006/index.html>
- Fernández, M. O. (2010). *EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES ANTIOFÍDICAS DEL EXTRACTO ETANÓLICO Y FRACCIONES OBTENIDAS DE Renealmia alpinia (Rottb) Mass(Zingiberaceae) CULTIVADA in vitro.* Retrieved from <http://www.scielo.org.co/pdf/vitae/v17n1/v17n1a10.pdf>
- Flores, O. G. (2014). *Biodiversity of reptiles in Mexico.* Retrieved from http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1870-34532014000200055
- Frost, J. (2017). *How F-Tests work in analysis of variance (ANOVA).* Retrieved from <http://statisticsbyjim.com/anova/f-tests-anova/>
- García, E. (2012). *Determinación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu.* Retrieved from <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/52056/Garcia%20Mart%C3%ADnez%20et%20al.pdf?sequence=1>
- García, E. F. (2015). *Determinación de totales por el método de Folin-Ciocalteu.* Retrieved from

<https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/52056/Garcia%20Mart%C3%ADnez%20et%20al.pdf?sequence=1>

Garcia, H. (2000, Septiembre 14). *Electroforesis: en gel de poliacrilamida fundamentos*.

Retrieved from http://www.bvs.sld.cu/revistas/uni/vol1_2_00/uni07200.htm

Gaus, D. H. (2013). *Management of Snakebite and Systemic Envenomation in Rural*

Ecuador Using the 20-minute Whole Blood Clotting Test. Retrieved from

[http://www.wemjournal.org/article/S1080-6032\(13\)00175-0/pdf](http://www.wemjournal.org/article/S1080-6032(13)00175-0/pdf)

Gibbons, J. S. (2000). The Global Decline of Reptiles. *Bioscience*, 653-666.

Global Compositae Checklist. (2011). *Adenostemma lavenia (L.) Kuntze*. Retrieved from

<https://compositae.landcareresearch.co.nz/Default.aspx?Page=NameDetails&Tab>

[Num=0&nameId=e8e0d06f-b1cf-4d8c-b0dc-e52827a9201d](https://compositae.landcareresearch.co.nz/Default.aspx?Page=NameDetails&TabNum=0&nameId=e8e0d06f-b1cf-4d8c-b0dc-e52827a9201d)

Gómez, I. (2015). *Estudio de las actividades analgésica e inhibitoria de los efectos*

tóxicos del veneno de Bothrops asper por extractos y compuestos aislados de

Renealmia alpinia silvestre. Retrieved from

<http://tesis.udea.edu.co/bitstream/10495/3517/1/GomezbetancurI->

[2015_Estudioactividadesanalgésica.pdf](http://tesis.udea.edu.co/bitstream/10495/3517/1/GomezbetancurI-2015_Estudioactividadesanalgésica.pdf)

Gómez, R. A. (2009). Hemólisis en las muestras para diagnóstico. *Laboratorio clínico*,

185-195.

Gonçalves, P. (2016). *Biologia reprodutiva e alimentar de Bothrops atrox (serpentes,*

viperidae) nas regiões central e sudoeste da Amazônia. Retrieved from

[http://tede.ufam.edu.br/bitstream/tede/5547/5/Disserta%C3%A7%C3%A3o%20-](http://tede.ufam.edu.br/bitstream/tede/5547/5/Disserta%C3%A7%C3%A3o%20-%20Pedro%20F.%20Gon%C3%A7alves%20Bisneto.pdf)

[%20Pedro%20F.%20Gon%C3%A7alves%20Bisneto.pdf](http://tede.ufam.edu.br/bitstream/tede/5547/5/Disserta%C3%A7%C3%A3o%20-%20Pedro%20F.%20Gon%C3%A7alves%20Bisneto.pdf)

- Gutiérrez, J. R. (1995). Isolation and the characterization of metalloproteinase with weak hemorrhage activity from the venom of snake *Bothrops asper*. *Toxicon*, 19-29.
- Huamani, G. (n.d.). *Densidad en líquidos: Método del Picnómetro*. Retrieved from <http://www.geocities.ws/todolostrabajossallo/fico4.pdf>
- INPB. (2007). *Guía de prevención, diagnóstico, tratamiento y vigilancia epidemiológica de los envenenamientos ofídicos*. Retrieved from http://www.fmed.uba.ar/depto/toxico1/guia_ofidismo_final07.pdf
- Jara, C. L. (2014). *CONOCIMIENTOS, ACTITUDES Y PRÁCTICAS SOBRE LA MORDEDURA DE OFIDIO. PATUCA-MORONA SANTIAGO, 2014*. Retrieved from <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/20548/1/tesis.pdf>
- Johll, M. (2008). *Química e investigación criminal*. Barcelona: Reverté.
- Kaushik, A. A. (2013). *Snake Venom Neutralization Effects of African Medicinal Plants & Their Impact on Snakebites: A Review*. Retrieved from <https://www.alliedacademies.org/articles/snake-venom-neutralization-effects-of-african-medicinal-plants--their-impact-on-snakebites-a-review.pdf>
- Laemmli, U. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly. *Nature*, 680-685.
- Larrea, C. (2006). *Hacia una Historia Ecológica del Ecuador, Propuesta para el debate*. Quito: Corporación Editora Nacional.
- León, K. (2017). *ACTIVIDAD ALEXITERA DE Tabernaemontana sananho Ruiz & Pav. (Kunapi) y Minthostachys cf. mollis (kunth) Griseb (Kurarina) SOBRE EL*

- VENENO DE Bothrops atrox ("Pitalala")*. Retrieved from <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/14639/1/UPS-QT11921.pdf>
- Lobo, T. P. (2010). *ACTIVIDAD INHIBITORIA DE Murraya paniculata CONTRA FOSFOLIPASAS A2 MIOTÓXICAS*. Retrieved from <http://www.scielo.org.co/pdf/vitae/v17n3/v17n3a07.pdf>
- Lomonte, B. G. (1983). La actividad proteolítica de los venenos de serpientes de Costa Rica sobre la caseína. *Revista de Biología Tropical*, 37-40.
- López, J., & Pérez, J. (2009). Plantas Alexitéricas: Antídotos vegetales contra las picaduras de de serpientes venenosas. *Medicina Naturista*, 17-24.
- López, S. (2016). *Pruebas de coagulación*. Retrieved from <http://www.scielo.org.mx/pdf/apm/v37n4/2395-8235-04-00241.pdf>
- Magalhaes, A. B.-S. (2011). *Inhibition of the inflammatory and coagulant action of Bothrops atrox venom by the plant species Marsypianthes chamaedrys*. Retrieved from https://ac.els-cdn.com/S0378874110008470/1-s2.0-S0378874110008470-main.pdf?_tid=4927e40e-0166-11e8-b06e-00000aab0f6b&acdnat=1516840126_6bd78677af6c2d2776a6a6b668580060
- Maldonado, A. J. (2016). *Electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida. Análisis de proteínas de hojas de Arabidopsis thaliana*. Retrieved from <https://www.uco.es/dptos/bioquimica-biol-mol/pdfs/16%20ELECTROFORESIS%20GELES%20PAA.pdf>
- Manual Ofídico. (2012). *Origen de las Serpientes*. Retrieved from <http://manual-ofidico.blogspot.com/2012/08/origen-y-generalidades-de-las-serpientes.html>

Martínez, M. (2017). *Análisis de composición y diversidad de herpetofauna en bosques húmedos del Cantón Mejía con diferentes niveles de intervención antrópica.*

Retrieved from

<https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/14111/1/UPS%20-%20ST003033.pdf>

Mendoza, J. V. (2009). *ATRONES ELECTROFORÉTICOS DE LOS VENENOS DE SERPIENTES PERUANAS DE LOS GÉNEROS BOTHROPS Y LACHESIS.*

Retrieved from <http://www.scielo.org.pe/pdf/rsqp/v75n2/a11v75n2.pdf>

Merino Castillo, J. P. (2010). *Estudio Económico de dos formas de aprovechamiento forestal del pigue (pollalesta discolor) en el cantón Mera, provincia de Pastaza.*

Riobamba: Escuela Superior Politécnica de Chimbrazo.

Ministerio de salud pública. (2008). *Manual de normas y procedimientos sobre prevención y tratamiento de accidentes ocasionados por mordeduras de serpientes.*

Retrieved from Dirección de normalización del sistema nacional de salud:

<https://bibliotecapromocion.msp.gob.ec/greenstone/collect/promocin/index/assoc/HASHe6b7.dir/doc.pdf>

Moldowan, P. (2016). *Common Lancehead (Bothrops atrox) diet and fang replacement.*

Retrieved from

https://www.researchgate.net/publication/307632933_Common_Lancehead_Bothrops_atrox_diet_and_fang_replacement

- MUNDOBIODIVERSO. (2009, julio). *Plantas medicinales y aromáticas*. Retrieved from MundoBioDiverso.com: <http://mundobiodiverso.blogia.com/2009/072602-plantas-medicinales-y-aromaticas.php>
- Muñoz, C. (2017). INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD HEMOLÍTICA DEL VENENO DE *Bothrops atrox* POR LOS EXTRACTOS DE *Minthostachis cf. mollis* (Kunt) Griseb y *Pollalesta discolor* (Kunt) Aristeg. 90.
- Muñoz, W. C. (2015). *Extracción de compuestos fenólicos con actividad antioxidante a partir de Champa (lineatifolia)*. Retrieved from <http://www.redalyc.org/pdf/1816/181643224027.pdf>
- Murillo, J., & Prada, E. (2009). *ESTUDIO QUÍMICO Y DE TOXICIDAD DEL VENENO DE SERPIENTES DE LA FAMILIA VIPERIDAE Bothrops atrox MANTENIDAS EN CAUTIVERIO EN EL SERPENTARIO DE LA UNIVERSIDAD DE LA AMAZONIA*. Retrieved from <http://www.probiol.com/images/pdf/estudioquimicoydetoxicidadelvenenodeserpi-entesbothropsatrox.pdf>
- Navarrete, M. (2010). *Las serpientes venenosas de importancia en la salud pública del Perú*. Retrieved from <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n070710/071011.pdf>
- Neri, E. B. (2014). *Reptiles Venenosos en México*. Retrieved from <http://www.revista.unam.mx/vol.15/num11/art86/art86.pdf>

Neves., V. A. (1997). *Effect of lentil tannins on albumin hydrolysis by trypsin*. Retrieved from http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20611997000300003

Ochoa, A. (2017). *Conocimiento y uso tradicional de recurso Fitomedicinal de la comunidad del Río Yurumanguí, Distrito de Buenaventura*. Retrieved from Universidad de Manizales: http://ridum.umanizales.edu.co:8080/jspui/bitstream/6789/3054/1/Tesis_Etnobot%C3%A1nica_Ang%C3%A9lica_Ochoa_2017.pdf

Oliviera, M. M. (2001). When and where to find a pitviper: Activity patterns and habitat use of the lancehead, *Bothrops atrox*, in central Amazonia, Brazil. *Herpetological Natural History*, 101-110.

Ortega, H. (2010). *Diversidad de la Herpetofauna en la Centro Amazonía de Ecuador*. Retrieved from http://zoologia.puce.edu.ec/vertebrados/Recursos/publicaciones/Cientifica/Ortega_2010c.pdf

Ortiz, C. L. (2012). *VARIACIONES EN LAS ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS DEL VENENO DE LA SERPIENTE GEOGRÁFICAS DEL PERÚ*. Retrieved from <https://www.scielosp.org/pdf/rpmesp/v29n2/a05v29n2.pdf>

Ospina, J. V. (2009). *Utilidad de los sellantes de fibrina en endoscopia terapéutica*. Retrieved from http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-99572009000300013

- Otilda, M. V. (n.d.). *EL ACCIDENTE OFÍDICO EN PANAMÁ*. Retrieved from <http://www.revistamedicocientifica.org/uploads/journals/1/articles/152/public/152-532-1-PB.pdf>
- Oviedo, P. (2000). *Validación del Nuevo Ensayo Tiempo de Bothrops atrox diluido (dBat) para la Detección de Anticoagulante Lúpico*. Retrieved from http://sisbib.unmsm.edu.pe/BVRevistas/anales/v61_n1/pdf/a02v61n1.pdf
- Paradais Sphynx. (2015). *Escamosos, orden Squamata*. Retrieved from <https://reptiles.paradais-sphynx.com/informacion/escamosos-el-orden-squamata.htm>
- Parra, J. V. (1994). *Por el camino culebrero: etnobotánica y medicina de los indígenas Awá del Sábalo (Nariño)*. Nariño: Vicariato Apostólico de TumáCompany, Equipo Pastoral de Altaquer.
- Patiño, A. L. (2012). *efecto inhibitorio de extractos de Renealmia alpinia Rottb. Maas (Zingiberaceae) sobre el veneno de Bothrops asper (mapaná)*. Retrieved from <https://www.revistabiomedica.org/index.php/biomedica/article/view/591/1723>
- Pazmiño, G. (2013). *Bothrops atrox*. Retrieved from <http://zoologia.puce.edu.ec/Vertebrados/reptiles/FichaEspecie.aspx?Id=1621>
- Pereañez, J., & Jimenez, S. (2008). Inhibición de las actividades proteolíticaa, coagulante y hemolítica indirecta inducidas por el veneno de *Bothrops asper* por extractos etanólicos de tres especies de heliconias. *Vitae. Revista de la facultad e Química Farmacéutica*, 15(1), 157-164. Retrieved from

<https://aprendeonline.udea.edu.co/revistas/index.php/vitae/article/viewFile/780/672>

Pérez, A. (2013). *Bothrops atrox*. Retrieved from <http://manual-ofidico.blogspot.com/2013/09/bothrops-atrox.html>

Pietro, D. O. (2016). *Historia natural y ecología de los ofidios (Reptilia: Serpentes) de las sierras australes de la provincia de Buenos Aires, Argentina*. Retrieved from <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/52662>

Reyes, M. (2017). INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD HEMOLÍTICA DEL VENENO DE *Bothrops atrox* POR LOS EXTRACTOS DE *Lonchocarpus utilis* A.C. Sm Y *Adenostemma lavenia* L. (Kuntze).

Ricciardi, B. T. (2016). *Validación del uso tradicional de especies de Asclepias contra el veneno de Bothrops diporus (yarára chica) en el Nordeste de Argentina*. Retrieved from http://www.blacpma.usach.cl/sites/blacpma/files/articulo_5_-_1142_-_112_-_121.pdf

Rodríguez, R. U. (2015). *Implementación de una metodología para la separación de proteomas de plasma humano mediante electroforesis bidimensional*. Retrieved from <https://revistas.unal.edu.co/index.php/rcolquim/article/view/55810/56650>

Roland, J. (2007). *Laemmli Sample Buffer - 20 ml*. Retrieved from <https://www.cytographica.com/lab/solutions/5XSB.htm>

Romero, & Silva. (2013, Diciembre 8). *UNINET: Principios de emergencia y cuidados criticos*. Retrieved from <http://tratado.uninet.edu/c101202.html>

- Sanchis, J. (2016, Septiembre 05). Ecuador: La odisea de 15 expertos contra las mordeduras de serpiente. Quito, Ecuador.
- Sandoval, G., Mendoza, J., Roldán, W., & Espinoza, Y. (2011, Diciembre). *Inmunogenicidad del veneno de Bothrops atrox (Ophidia: Viperidae) y su evaluación por métodos inmunoenzimáticos*. Retrieved from <http://sisbib.unmsm.edu.pe/BVRevistas/biologia/v18n3/pdf/a11v18n3.pdf>
- Santos, F. N. (2014). *Use of a Synthetic Biosensor for Neutralizing Activity Biased Selection of Monoclonal Antibodies against Atroxlysin-I, an Hemorrhagic Metalloproteinase from Bothrops atrox Snake Venom*. Retrieved from <https://pdfs.semanticscholar.org/b449/4f1d3e26399e6c03adc87c81e49ac44d18c5.pdf>
- Saravia, P. M. (2017). *NEUTRALIZACIÓN DE LOS EFECTOS COAGULANTE, FOSFOLIPASA A2 Y PROTEOLÍTICO DEL VENENO DE ESPECIES VEGETALES UTILIZADAS EN LA MEDICINA TRADICIONAL CENTROAMERICANA*. Retrieved from <http://digi.usac.edu.gt/bvirtual/informes/puiis/INF-2016-28.pdf>
- Serrano. (n.d.). *REACTIVOS PARA ELECTROFORESIS*. Retrieved from <http://www.xtal.iqfr.csic.es/labs/2-Reactivos-para-electroforesis.pdf>
- Sia, F. V. (2011). *Efficacy of tannins from Mimosa pudica and tannic acid in neutralizing cobra (Naja kaouthia) venom*. Retrieved from http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1678-91992011000100006

- Soto, M. R. (2016). *Efecto del solvente y de la relación masa/solvente, sobre la extracción de compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante de extractos de corteza de Pinus durangensis y Quercus sideroxyla*. Retrieved from https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-221X2016000400017
- SSAVER. (2014). *Guía de diagnóstico y tratamiento de intoxicación por accidente ofídico bothrópico*. Retrieved from <https://www.ssaver.gob.mx/citver/files/2014/03/Accidente-Of%C3%ADdico-Bothr%C3%B3pico.pdf>
- Stone, B. S. (2014). *How to correctly interpret P values*. Retrieved from <http://blog.minitab.com/blog/adventures-in-statistics-2/how-to-correctly-interpret-p-values>
- Theakston, R. R. (1983). Development of simple standard assay procedures for the characterization of snake venoms. *Bulletin of the World Health Organization*, 949-956.
- Tosoratto, N. C. (2016). *Morfoanatomía e histoquímica de cuatro Asteraceae nativas del bosque Chaqueño Serrano (Córdoba, Argentina)*. Retrieved from <http://www.scielo.org.ar/pdf/bsab/v51n4/v51n4a04.pdf>
- Turner, B. L. (2016, julio 12). *Adenostemma lavenia*. Retrieved from Flora de Nicaragua: <http://www.tropicos.org/name/02700023?projectid=7>
- Umali, G. S. (2014). *Adenostemma lavenia (Linn.) O. Kuntze*. Retrieved from <http://www.stuartxchange.org/Boton.html>

- UNQ. (2010). *TP3: Electroforesis en gel de poliacrilamida*. Retrieved from <https://ibcmunq.files.wordpress.com/2010/03/tp3.pdf>
- Valencia, J. V. (2011). *Natural history, potential distribution and conservation status of the Manabi Hognose Pitviper Porthidium arcosae (SCHÄTTI & KRAMER, 1993), in Ecuador*. Retrieved from https://www.zobodat.at/pdf/HER_23_3_4_0031-0043.pdf
- Vargas, J. A. (2015). *Estudio etnobotánico de especies vegetales en las explotaciones agropecuarias del catón Santa Clara (Tesis de grado)*. Puyo: Universidad Estatal Amazónica.
- Vásquez, J. (2012). *NEUTRALIZACIÓN DEL VENENO DE Bothrops asper CON PLANTAS DE LA FAMILIA ZINGIBERACEAE UTILIZADAS EN LA ETNOBOTÁNICA DEL ACCIDENTE OFÍDICO EN EL ORIENTE ANTIOQUEÑO*. Retrieved from http://www.usfx.bo/nueva/vicerrectorado/citas/SALUD_10/Quimica_Farmacutica/90.pdf
- Venegas, E. (2012). Cuantificación de flavonoides totales y taninos presentes en el extracto acuoso de hojas de *Thea sinensis* L. y su capacidad antioxidante. *Scientia*, 2.
- Villamarín, J. (2009). *ACCIDENTE OFIDICO: MANIFESTACIONES Y COMPLICACIONES CLINICAS EN PACIENTES ATENDIDOS EN EL HOSPITAL JOSE MARIA VELASCO IBARRA, TENA AGOSTO 2007 – MAYO*

2009. Retrieved from
<http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/194/1/94T00064.pdf>

Zamora, G. (2015). *INCIDENCIA DE CASOS DE ACCIDENTES OFÍDICOS EN LOS SUBCENTROS DE SALUD DE SAN MIGUEL DE LOS BANCOS, PEDRO VICENTE MALDONADO Y PUERTO QUITO DE SEPTIEMBRE 2013 A SEPTIEMBRE 2014*. Retrieved from
<http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/6740/1/T-UCE-0006-049.pdf>

Zúñiga, I. C. (2013). *Aspectos clínicos y epidemiológicos de la mordedura de serpientes en México*. Retrieved from <http://www.medigraphic.com/pdfs/evidencia/eo-2013/eo134d.pdf>

Anexos

Anexo 1. Certificado de identificación taxonómica de *Adenostemma lavenia* (L.) Kuntze

***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



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

Anexo 2. Certificado de identificación taxonómica de *Pollalesta discolor* (Kunth) Aristeg.

***Pollalesta discolor* (Kunth) Aristeg.**

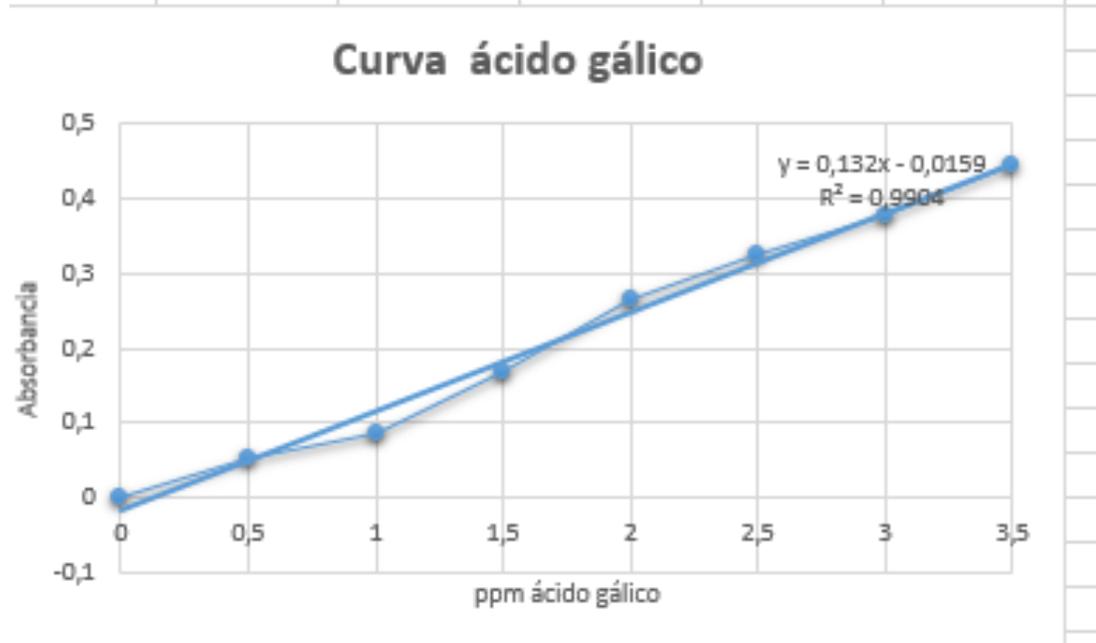
- Clase: Equisetopsida C. Agardh
- Subclase: Magnoliales Novák ex Takht.
- Superorden: Asterales Takht.
- Orden: Asterales Link
- Familia: Asteraceae Benth. & J. Presl
- Género: *Pollalesta* Kunth
- Especie: *discolor* (Kunth) Aristeg.



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

Anexo 3. Curva de calibración del ácido gálico

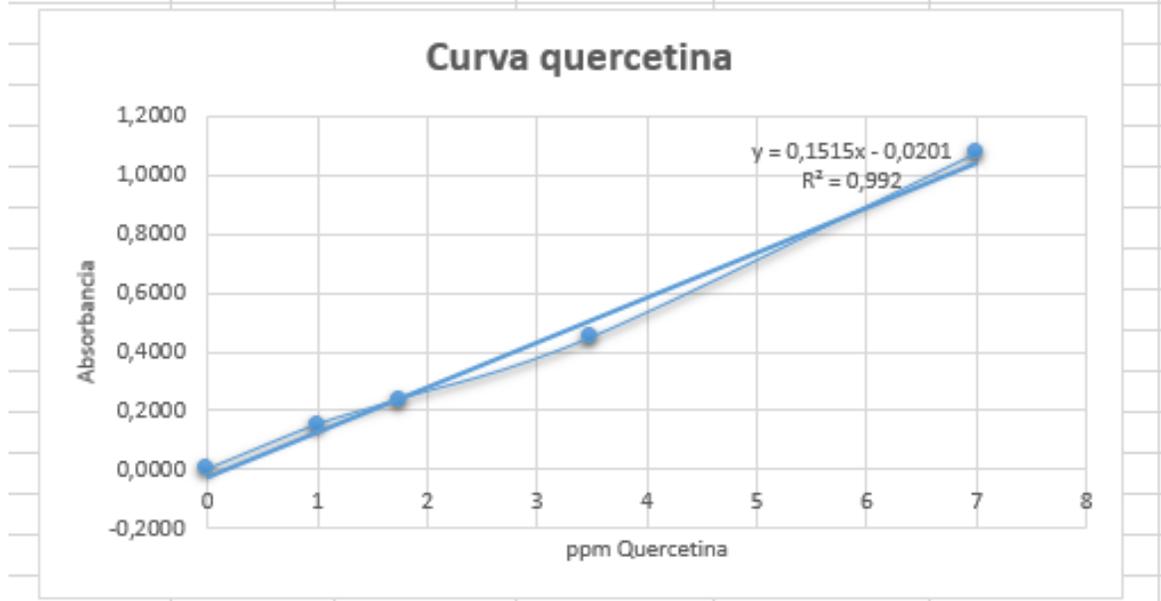
ppm	ESTANDAR				MEDIA
0,00	0	0	0	0	0,0000
0,50	20	0,0532	0,055	0,0552	0,0545
1,00	40	0,0861	0,0864	0,0864	0,0863
1,50	60	0,1668	0,1673	0,1675	0,1672
2,00	80	0,264	0,2646	0,2647	0,2644
2,50	100	0,3254	0,3249	0,3249	0,3251
3,00	120	0,3792	0,3793	0,3794	0,3793
3,50	140	0,4433	0,4435	0,4436	0,4435
4,00	160	0,4554	0,4555	0,4554	0,4554



Elaborado por: La autora (2017)

Anexo 4. Curva de calibración de Quercetina

ppm	ESTANDAR				X
0	0	0	0	0	0,0000
1	100	0,1509	0,1511	0,151	0,1510
1,75	175	0,2371	0,237	0,2371	0,2371
3,5	350	0,4485	0,4476	0,4479	0,4480
7	700	1,069	1,0715	1,0704	1,0703



Elaborado por: La autora (2017)

Anexo 5. Peso en gramos de los extractos n-heptánicos

Especie vegetal	Vaso de precipitación (g)	Extracto seco + Vaso (g)	Extracto seco (g)
<i>Pollalesta discolor</i>	143.4787	143.5471	0.0684
<i>Adenostemma lavenia</i>	156.1741	156.2765	0.1024

Elaborado por: La autora (2017)

Anexo 6. Peso en gramos de los extractos alcohólicos

Especie vegetal	Vaso de precipitación (g)	Extracto seco + Vaso (g)	Extracto seco (g)
<i>Pollalesta discolor</i>	150.4362	150.5379	0.1017
<i>Adenostemma lavenia</i>	143.9126	144.3057	0.3931

Elaborado por: La autora (2017)

Anexo 7. Tiempo de coagulación de plasma sanguíneo

Concentración de veneno (mg/mL)	T1 (s)	T2 (s)	T3 (s)	Media (s)
0.02	30	26	35	30.33
0.013	49	52	46	49
0.001	52	58	75	61.6
0.0009	68	62	71	67
0.0008	48	73	81	67.33
0.0007	80	60	96	78.66

Elaborado por: La autora (2017)

Anexo 8. Tiempo de coagulación del plasma sanguíneo bajo los efectos de la interacción del veneno y los extractos vegetales.

Extracto vegetal	Tipo	Tiempo de coagulación	Media
<i>Pollalesta discolor</i>	n-Heptánico	1 m 40 s	1 m 25 s
		1 m 21 s	
		1 m 14 s	
	Alcohólico	1 m 20 s	1 m 45 s
		2 m 10 s	
		1 m 44 s	
<i>Adenostemma lavenia</i>	n-Heptánico	1 m 11 s	1 m 10 s
		1 m 13 s	
		1 m 06 s	
	Alcohólico	1 m 29 s	1 m 26 s
		1 m 30 s	
		1 m 19 s	

Elaborado por: La autora (2017)

Anexo 9. Actividad antihemolítica de las soluciones de eritrocitos con y sin veneno y con los extractos vegetales

Solución	Absorbancia a 550 nm	Media
Eritrocitos	2.0368	2.2148
	2.2854	
	2.3222	
Eritrocitos más veneno	0.6900	0.7148
	0.7281	
	0.7264	
<i>Pollalesta discolor</i> n-heptánico	1.4245	1.4104
	1.4054	
	1.4013	
<i>Pollalesta discolor</i> alcohólico	0.5457	0.5912
	0.6137	
	0.6143	
<i>Adenostemma lavenia</i> n-heptánico	1.4242	1.4596
	1.4762	
	1.4783	
<i>Adenostemma lavenia</i> alcohólico	0.8343	0.8837
	0.8835	
	0.9332	

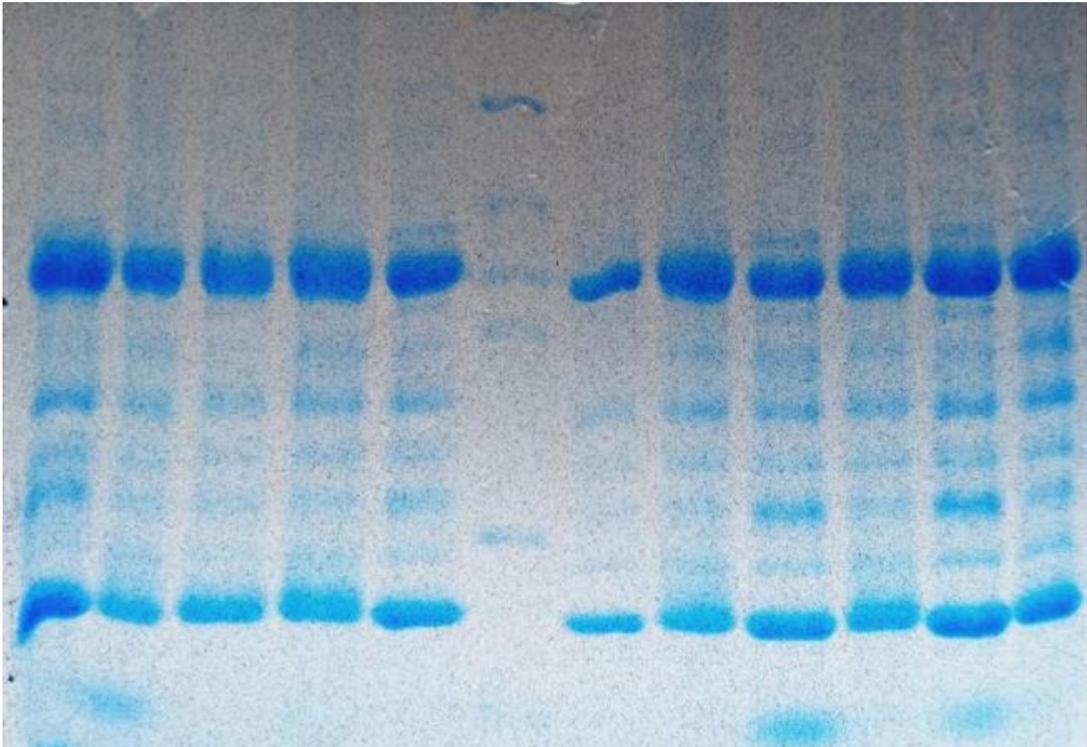
Elaborado por: La autora (2017)

Anexo 10. Actividad antiproteolítica de los extractos vegetales

Extracto vegetal	Tipo	Absorbancia a 280nm	Unidades de proteólisis/mg	Media unidades de proteólisis/mg
<i>Pollalesta discolor</i>	n-Heptánico	0.1620	425.5	370
		0.1133	182	
		0.1774	502.5	
	Alcohólico	0.1499	365	369
		0.1433	332	
		0.1589	410	
<i>Adenostemma lavenia</i>	n-Heptánico	0.4978	2104.5	2759.33
		0.5201	2216	
		0.8684	3957.5	
	Alcohólico	0.2042	636.5	711.33
		0.2637	934	
		0.1896	563.5	

Elaborado por: La autora (2017)

Anexo 11. Electroforesis vertical del veneno con y sin los extractos vegetales



Elaborado por: La autora (2017)