

**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA  
SEDE QUITO**

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

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

**TEMA:  
INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD HEMOLÍTICA DEL VENENO DE  
*Bothrops atrox* POR LOS EXTRACTOS DE *Minthostachis cf. mollis* (Kunt)  
*Griseb* y *Pollalesta discolor* (Kunt) Aristeg.**

**AUTOR:  
RONALT CRISTIAN MUÑOZ CARRIÓN**

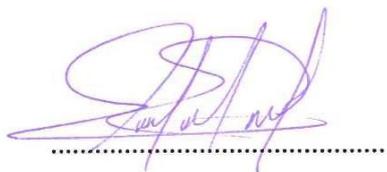
**TUTOR:  
WILSON FABIÁN TAPIA HERNÁNDEZ**

**Quito, marzo del 2017**

## Cesión de derechos de autor

Yo Ronalt Cristian Muñoz Carrión, con documento de identificación N° 1722125703, manifiesto mi voluntad y cedo a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que soy autor del trabajo de titulación intitulado: INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD HEMOLÍTICA DEL VENENO DE *Bothrops atrox* POR LOS EXTRACTOS DE *Minthostachis cf. mollis* (Kunt) Griseb y *Pollalesta discolor* (Kunt) Aristeg, mismo que ha sido desarrollado para optar por el título de Ingeniero en Biotecnología de los Recursos Naturales, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

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



Nombre: Ronalt Cristian Muñoz Carrión

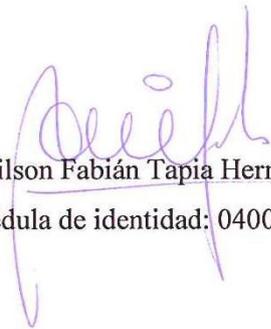
Cédula: 1722125703

Fecha: Marzo del 2017

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

Yo, declaro que bajo mi dirección y asesoría fue desarrollado el trabajo de titulación, INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD HEMOLÍTICA DEL VENENO DE *Bothrops atrox* POR LOS EXTRACTOS DE *Minthostachis cf. mollis* (Kunt) Griseb y *Pollalesta discolor* (Kunt) Aristeg realizado por Ronalt Cristian Muñoz Carrión, obteniendo un producto que cumple con todos los requisitos estipulados por la Universidad Politécnica Salesiana para ser considerados como trabajo final de titulación.

Quito, marzo del 2017



Wilson Fabián Tapia Hernández  
Cédula de identidad: 0400942819

## **Agradecimiento**

A Dios por darme la vida, salud y la fortaleza para conseguir esta meta.

A mi familia por estar siempre a mi lado, apoyándome en cada etapa de mi vida.

A mis padres por darme toda su confianza, constante apoyo, amor y cariño en todo momento, por haber sido mi inspiración a lo largo de este camino.

A mi segundo padre, Pedro Castro por ser un pilar fundamental a lo largo de mi vida.

A mi tutor y amigo Wilson Tapia por brindarme todos sus conocimientos durante mi carrera universitaria, por darme la oportunidad de integrar su grupo de investigación, por lo cual puedo culminar mis estudios.

A todos, gracias.

## ÍNDICE

Capítulo 1: Fundamento teórico.....	4
1.1. Descripción botánica .....	6
1.2. Usos etnobotánicos.....	7
1.3. Descripción botánica .....	8
1.4. Usos etnobotánicos.....	9
1.5. Aspectos generales de las serpientes .....	9
1.6. Serpientes del Ecuador .....	10
1.7. Género bothrops .....	11
1.8. <i>Bothrops atrox</i> .....	11
1.9. Distribución .....	12
1.9.1. Accidente ofídico .....	13
1.9.2. Accidente bothrónico .....	13
1.9.3. Signos y síntomas.....	14
1.9.4. Grados de envenenamiento bothrónico.....	15
1.10. Tratamiento.....	16
1.10.1. Pruebas para determinar la actividad antihemolítica (alexítera) .....	16
Capítulo 2: Materiales y métodos .....	17
Este capítulo presenta las metodologías utilizadas durante la experimentación tanto en campo como en laboratorio. ....	17
2.1. Diseño.....	17
2.2. Población y Muestra .....	17
2.2.1. Material Vegetal.....	17
2.2.2. Obtención de extractos .....	18
2.3. Estudio cuantitativo .....	18

Para este estudio se procedió de acuerdo a lo indicado por (Viduarre, Querevalú, De los Ríos, & Ruiz, 2007), como se describe a continuación: ..... 18

2.3.1.	Determinación de cenizas totales .....	18
2.3.2.	Determinación de cenizas solubles en agua. ....	19
2.3.3.	Determinación de cenizas insolubles en ácido clorhídrico .....	19
2.4.	Cuantificación de fenoles totales y flavonoides. ....	20
2.4.1.	Cuantificación de Fenoles totales.....	20
2.4.2.	Cuantificación de flavonoides.....	20
2.5.	Estudio cualitativo .....	21
2.5.1.	Tamizaje fitoquímico .....	21
2.6.	Actividad anti hemolítica de los extractos.....	23
2.6.1.	Determinación de la dosis mínima hemolítica (MIHD).....	23
2.6.1.1.	Preparación del medio de cultivo.....	23
2.6.1.2.	Dilución del veneno .....	23
2.7.	Actividad neutralizante del veneno .....	24
2.7.1.	Actividad anti hemolítica. ....	24
3.1.	Rendimiento de extractos vegetales .....	26
3.2.	Tamizaje fitoquímico .....	30
3.3.	Determinación de la dosis mínima hemolítica .....	35
3.4.	Actividad anti hemolítica .....	36
3.5.	Análisis estadístico .....	38

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. <i>Minthostachys cf. mollis</i> (Kunth) Griseb .....	6
Tabla 2. <i>Pollalesta discolor</i> (Kunth) Aristeg. ....	8
Tabla 3. Rendimiento del extracto n-heptano .....	26
Tabla 4. Rendimiento del extracto alcohólico.....	26
Tabla 5. Rendimiento del extracto acuoso .....	26
Tabla 6. Determinación de cenizas totales .....	27
Tabla 7. Determinación de cenizas solubles en agua.....	27
Tabla 8. Determinación de cenizas insolubles en ácido clorhídrico .....	28
Tabla 9. Determinación del contenido de humedad.....	28
Tabla 10. Polifenoles totales .....	29
Tabla 11. Flavonoides .....	29
Tabla 12. Extracto n-heptano de <i>Minthostachys cf. mollis</i> .....	30
Tabla 13. Extracto n-heptano de <i>Pollalesta discolor</i> .....	31
Tabla 14. Extracto alcohólico de <i>Minthostachys cf. mollis</i> .....	32
Tabla 15. Extracto alcohólico <i>Pollalesta discolor</i> .....	33
Tabla 16. Extracto Acuoso de <i>Minthostachys cf. mollis</i> .....	34
Tabla 17. Extracto Acuoso de <i>Pollalesta discolor</i> .....	35
Tabla 18. Tratamientos para determinación de actividad anti hemolítica .....	36
Tabla 19. Concentraciones de mezcla veneno-extracto .....	37
Tabla 20. Halos de hemólisis generados por la mezcla veneno-extracto: acuoso, alcohólico y heptánico.....	37
Tabla 20. Análisis de varianza para diámetro de halo de actividad inhibitoria .....	38
Tabla 22. Rangos de significancia para los tratamientos en relación a la actividad inhibitoria .....	39

Tabla 23. Comparación entre las especies según el test de Tukey.....	40
--	----

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Minthostachys cf. mollis</i> (Kunth) Griseb .....	6
Figura 2. <i>discolor</i> (Kunth) Aristeg. (Corteza).....	8
Figura 3. Tamizaje extracto n-heptano.....	21
Figura 4. Tamizaje extracto Alcohólico.....	22
Figura 5. Tamizaje extracto Acuoso .....	22
Figura 6. MIDH veneno de <i>Bothrops atrox</i> .....	35

## Índice de anexos

Anexo 1. Siembra extracto alcohólico .....	53
Anexo 2. Siembra extracto n-heptano .....	54
Anexo 3. Siembra extracto acuoso .....	55
Anexo 4. Permisos ambientales .....	56
Anexo 5. Identificación Taxonómica .....	66
Anexo 6. Rendimiento de extractos vegetales .....	68
Anexo 7. Determinación de cenizas totales .....	69
Anexo 8. Determinación de cenizas solubles en agua .....	70
Anexo 9. Determinación de cenizas insolubles en ácido clorhídrico.....	71
Anexo 10. Determinación del contenido de humedad .....	72
Anexo 11. Formulas .....	73
Anexo 12. Absorbancia fenoles <i>Pollalesta discolor</i> ( <b>Corteza</b> ).....	75
Anexo 13. Absorbancia fenoles <i>Minthostachys cf. mollis</i> .....	76
Anexo 14. Absorbancia flavonoides <i>Pollalesta discolor</i> ( <b>Corteza</b> ).....	77
Anexo 15. Absorbancia flavonoides <i>Minthostachys cf. mollis</i> .....	78

## RESUMEN

El conocimiento etnobotánica es de gran importancia ya que se usan especies vegetales para contrarrestar los efectos de la mordedura de serpientes venenosas. En esta investigación se procedió a comprobar la actividad anti hemolítica de las especies *Minthostachys cf. mollis* (Kunth) Griseb (curarina) y *Pollalesta discolor* (Kunth) Aristeg (pigüe), especies muy utilizadas por los habitantes indígenas amazónicos para contrarrestar los efectos del veneno de la serpiente *Bothrops atrox* (pitalala), especie frecuentemente causante de la mayoría de los accidentes ofídicos, considerados hoy en día como un problema de salud pública. Las muestras vegetales de estas especies fueron colectadas en la provincia de Morona Santiago, en los cantones Morona y Huamboya.

Se elaboró extractos totales secos con solventes de polaridad creciente (n-heptano, etanol y agua) con el fin de investigar su composición química cualitativa y cuantitativa; se realizó la cuantificación de fenoles totales y flavonoides mediante espectrofotometría de luz visible. Se investigó *in vitro* su capacidad de inhibir la hemólisis causada por el veneno de pitalala utilizando medio de agar sangre fosfatidilcolina. Los resultados demostraron que los extractos alcohólicos de ambas especies vegetales poseen una mayor actividad anti hemolítica que los otros extractos, establecida por su capacidad de disminuir el halo de hemólisis de una dosis de veneno de 15 µg.

Palabras clave: hemolítica, ofídico, espectrofotometría, pitalala.

## ABSTRACT

Ethnobotanical knowledge is important because some plant species are used to counteract the effects of the biting of poison snakes. In this research we tested the anti-hemolytic activity of the species *Minthostachys cf. Mollis* (Kunth) Griseb (*kurarina*) and *Pollalesta discolor* (Kunth) Aristeg (*pigue*), species that are widely used by Amazonian indigenous inhabitants to counteract the effects of poison of snake *Bothrops atrox* (pitalala), a species frequently responsible for Ophidian accidents, considered today as a public health problem. The plant samples of these species were collected in the province of Morona Santiago, in the Morona and Huamboya cantons.

Total dry extracts were prepared with increasing polarity solvents (n-heptane, ethanol and water) in order to investigate their qualitative and quantitative chemical composition; the quantification of total phenols and flavonoids were performed by visible light with spectrophotometry. Their inhibition haemolysis caused by pitalala venom using blood agar medium phosphatidylcholine was investigated in vitro. The results showed that the alcoholic extracts of both plants have a higher antihemolytic activity than the other extracts, established by their ability to decrease the haemolysis halo of a dose of poison of 15 µg.

Key words: haemolytic, ophidian, spectrophotometry, pitalala.

## Introducción

Los accidentes ofídicos constituyen un problema de salud pública generalmente en zonas rurales; se han reportado en todo el mundo un promedio de 5.4000.000 de mordeduras de serpientes, de las cuales 125.345 de las personas han muerto por la letalidad del veneno (Gualán Guamante, 2011).

En el Ecuador se puede encontrar climas tropicales y subtropicales muy propicios para el crecimiento de especies ofídicas venenosas (Ministerio de salud pública, 2007).

Las mordeduras de serpiente generalmente se dan en zonas rurales o donde hay una gran actividad agrícola, por lo que las personas más afectadas son campesinos que no poseen una protección adecuada y además no tienen una atención inmediata en caso de presentarse un accidente (Villamarín , 2009). Así, las personas que trabajan en la minería, campesinos, y los habitantes de la Amazonía, al no contar con un centro de salud o clínica totalmente capacitada se encuentran expuestos a sufrir una mordedura; al menos 5000 personas mueren anualmente en toda Latinoamérica por accidentes ofídicos (Ministerio de salud pública, 2007).

El único antídoto totalmente comprobado contra un accidente bothrópico es el suero antiofídico, no obstante, las etnias amazónicas con su conocimiento ancestral han otorgado propiedades antiofídicas a plantas de su entorno, como una medida preventiva o como un antídoto ante estos casos (Yarlequé, 2012).

Especies como la *Minthostachys cf. mollis* (Kunth) Griseb (curarina) y *Pollalesta discolor* (Kunth) Aristeg (pigüe) son utilizadas para contrarrestar los efectos ocasionados por el veneno de serpientes.

Por ello es importante comprobar la actividad anti hemolítica de estas especies sobre el veneno de *B. atrox* para así verificar el uso potencial como alexítera en la mitigación de los efectos mortales de su veneno.

Los objetivos que se pretende en la investigación son: Objetivo general: Determinar la inhibición de la actividad hemolítica del veneno de *Bothrops atrox* por los extractos totales secos de *Minthostachys cf. mollis* (Kunth) Griseb y *Pollalesta discolor* (Kunth) Aristeg. Los Objetivos específicos: Obtener extractos totales secos acuosos, alcohólicos y heptánicos de *Minthostachys cf. mollis* (Kunth) Griseb y *Pollalesta discolor* (Kunth) Aristeg, por maceración; Evaluar la composición química cualitativa de los extractos de acuoso, alcohólicos y heptánicos de *Minthostachys cf. mollis* (Kunth) Griseb y *Pollalesta discolor* (Kunth) Aristeg, por tamizaje fitoquímico; Cuantificar polifenoles totales y flavonoides en los extractos totales de *Minthostachys cf. mollis* (Kunth) Griseb y *Pollalesta discolor* (Kunth) Aristeg; Evaluar *in vitro* la capacidad neutralizante de la actividad hemolítica del veneno de *B. atrox* por los extractos acuoso, alcohólico y heptánico de *Minthostachys cf. mollis* (Kunth) Griseb y *Pollalesta discolor* (Kunth) Aristeg utilizando la técnica de agar sangre fosfatidilcolina.

Las hipótesis planteadas son: Hipótesis nula: Ninguna concentración de extracto de ninguna especie vegetal reduce el halo de hemólisis generado por la concentración mínima hemolítica (MIDH) del veneno de *Bothrops atrox*. La Hipótesis alternativa: Al menos una concentración de extracto y una especie vegetal reduce el halo de hemólisis generado por la concentración mínima hemolítica (MIDH) del veneno de *Bothrops atrox*.

Las variables planteadas son: Variable dependiente: Disminución del diámetro de hemólisis generado por la dosis mínima hemolítica (DMIH) del veneno de *Bothrops atrox*. Y Variable independiente: Concentración del extracto.

## Capítulo 1: Fundamento teórico

Este capítulo contiene conceptos, descripción botánica de las especies vegetales en estudio y la descripción del género *Bothrops*.

El uso de plantas alexítera se traslada a épocas antes de cristo, donde no existía ningún tipo de medicamento para curar enfermedades; en esa época se usaba únicamente plantas con poder curativo, aunque algunas de estas con poca eficacia para ciertas enfermedades (de la Torre, Muriel, & Balslev, 2006). En la India en su medicina ancestral constan 211 plantas con capacidad alexítera, mientras que en México también existe un conocimiento ancestral de plantas alexítera ya que en el siglo XVI se citaron 19 plantas en libro *Historia de las plantas de la nueva España* (Reyes & Jimenez, 1995).

El aporte etnobotánica en esta época era fundamental para las personas, siendo las plantas con poder curativo su único medicamento, incluso en la actualidad muchas de estas siguen siendo usadas por personas con poco acceso a medicamentos (Ansaloni, Wilches, & León, 2010). Un siglo después se da el descubrimiento de los antibióticos, que va a generar un gran impacto ya que para muchas de las enfermedades que se manifestaban en ese entonces las plantas parecían tener poca efectividad (Corales, 2010).

Varias especies han sido utilizadas tradicionalmente con fines alexíteros en gran parte Latinoamérica, especialmente en lugares donde existe una gran variedad de serpientes venenosas, y poco acceso a un centro de salud o medicamentos (Soto & Lopez, 2009).

La propiedad alexítera es la capacidad de una sustancia para contrarrestar los síntomas tóxicos venenosos causados por animales ponzoñosos y en especial serpientes, posee

las propiedades de reducir el sangrado, el dolor, inflamación o a su vez elimina por completo el envenenamiento (Reyes & Jimenez, 1995).

Los envenenamientos por serpientes se producen con alta frecuencia a nivel mundial, se cree que alrededor de 5 millones de picaduras se producen en un año, y 125.000 son mortales (Castrillón & Estrada, 2014). Se conoce que los países de Latinoamérica con más problemas de accidentes ofídicos son Brasil, Colombia, Perú, Venezuela, Ecuador y Argentina siendo el último de estos con menos casos registrados de accidentes ofídicos, cabe destacar que en África las picaduras de serpientes son mucho más frecuentes y llegan a tener un índice de 20.000 muertes en un año (Quesada Aguilera, 2012).

La cifra de muerte se reduce en países desarrollados por lo que se entiende que al tratar de inmediato una picadura con un medicamento o un antídoto los casos de mortalidad bajan en una gran cantidad (Soto & Lopez, 2009).

Los casos de picaduras de serpientes son un grave problema para varios países subdesarrollados en especial aquellos que no poseen una buena atención médica o que no cuentan con un servicio hospitalario cercano, lo que ocurre a menudo en zonas rurales, es por esto que los conocimientos etnobotánicos son muy utilizados para la mordedura de serpientes (Soto & Lopez, 2009).

En la actualidad se sabe que existen alrededor de 800 plantas con capacidad alexitéra alrededor del mundo, pero no de todas se tiene una certeza de su capacidad contra la picadura de serpiente por lo que se las ha investigado para saber cuáles son los componentes o metabolitos que poseen para darle esta capacidad (Houghton & Osibogun, 1993).

En Ecuador existen plantas usadas para contrarrestar el veneno de serpiente como las especies *Minthostachys cf. mollis* (Kunth) Griseb, *Pollalesta discolor* (Kunth) Aristeg, estas se dan a conocer gracias al conocimiento etnobotánico de los habitantes de las zonas afectadas (Vargas, 2015).

Tabla 1.  
*Minthostachys cf. mollis* (Kunth) Griseb

Clase:	Equisetopsida C. Agardh
Subclase:	Magnoliidae Novak ex Takht.
Suborden:	Asteranes Takht.
Orden:	Lamiales Bromhead
Familia:	Lamiaceae Martinov
Género:	<i>Minthostachys</i> (Beth.) Spach
Especie	<i>mollis</i> (Kunth) Griseb.

Nota: Realizado por el autor (2016)

*Minthostachys cf. mollis* (Kunth) Griseb



Figura 1. *Minthostachys cf. mollis* (Kunth) Griseb  
Fuente: El autor (2016)

### 1.1. Descripción botánica

La especie *Minthostachys mollis* (kunth) Griseb (peperina o curarina) es un sub arbusto que puede llegar a medir hasta 2 m de altura, perenne. Hojas laminadas de 1-5 cm de largo con pecíolo de 1 cm de largo, agudas, ovadas con bordes

enteros o levemente dentados, glabras en el haz y pilosas en el envés (Elechosa, 2009).

Posee numerosas flores blancas, pediceladas las cuales están dispuestas en cimas pedunculadas con brácteas foliosas. Cáliz con 5 dientes levemente cigomorfo, su Corola es de color amarillento y llega a medir 3,5 mm de largo, cáliz y corola son levemente cigomorfas, con dos ramas estigmadas de distinto tamaño (Scanadaliaris, Fuentes, & Lovey, 2007).

Su fruto está constituido por 4 clusas o aquenios de color pardo reticuladas, su floración se da una vez al año y su cosecha se debe realizar cuando la planta se encuentra en prefloración (Elechosa, 2009).

## **1.2. Usos etnobotánicos**

Se puede usar para inflamación, parto, tos, gripe, dolor molar y baño posparto (Cerón Martínez, 2006). Se realiza infusiones para la indigestión, diarrea, náuseas, dolor estomacal, además es usada también contra el cólera aunque esto no está comprobado. Se usa como aromatizante ya que tiene el mismo aceite que la menta (Peñafiel Cevallos, 2003).

Otro de los usos que se le atribuye a esta especie es su capacidad para contrarrestar el veneno de serpiente y su capacidad cicatrizante. Se realiza una infusión de la planta en su totalidad y se la aplica sobre la zona afectada por la serpiente (Jara, Lozada, & Peñaranda, 2014).

Tabla 2.  
*Pollalesta discolor* (Kunth) Aristeg.

Clase:	Equisetopsida C. Agardh
Subclase:	Magnoliidae novak ex Takht
Suborden:	<i>Asteranes Takht.</i>
Orden:	Asterales Link
Familia:	Asteraceae Bercht. & J. Presl
Género:	Pollalesta Kunth
Especie	<i>discolor</i> (Kunth) Aristeg.

Nota: Realizado por el autor (2016)

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



Figura 2. *discolor* (Kunth) Aristeg. (Corteza)  
 Fuente: El autor (2016)

### 1.3. Descripción botánica

La especie *discolor* (kunth) Aristeg (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 6-10 cm de largo (Brai & Madrigal, 2005).

Tiene flores blancas en capítulos, una inflorescencia en las panículas terminales de 6 a 18 cm de largo, cabezuelas de 5mm de largo, corola de 4mm de largo,

brácteas tomentosas, con aquenios largos, su corteza es de tonalidad grisácea la cual en su interior contiene una sustancia viscosa negra, ramas jóvenes granuladas con algunas vellosidades. 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 en los meses de mayo a junio y de agosto a octubre (Erazo, Izurieta, Cronkleton, Larson, & Putzel, 2014).

#### **1.4. Usos etnobotánicos**

El pigue es usado según conocimientos etnobotánicos contra el paludismo, se usa la corteza del árbol en conjunto con las hojas. También es usado contra el paludismo cerebral (Brai & Madrigal, 2005). Otro de sus usos es contra la mordedura de serpiente, en este caso se utiliza es la corteza del tallo la cual es aplicada sobre la zona afectada (Vargas, 2015).

#### **1.5. Aspectos generales de las serpientes**

Las serpientes u ofidios son un tipo de reptiles que aparecieron hace unos 150 millones de años, grupo evolutivamente moderno, las primeras serpientes nacieron a partir de los lagartos por lo que poseen púas a cada lado del ano los cuales son vestigios de las extremidades posteriores, estas se caracterizan por la ausencia de patas, un cuerpo muy alargado, cuerpo recubierto por escamas y de habito nocturnos, las más grandes pueden llegar a medir 3 metros y las más pequeñas de 10 a 12 cm (Cueva & Erazo, 2010) citado en (Contreras, 2014).

La manera adecuada de identificar una serpiente venenosa es por la forma de su cabeza, el color que poseen, las escamas en su cuerpo y el color que tiene, así como las franjas de colores en su cuerpo y los colmillos que en muchas ocasiones son visibles y en otras se encuentran al fondo y son más complicados de detectar, las serpientes al momento de morder o atacar lo hacen con el fin de defenderse en caso de sentirse amenazada, se enrollan en su cuerpo y se levantan para atacar (Quesada Aguilera, 2012).

Por lo general las serpientes venenosas al morder, tienden a inyectar veneno constituido por proteínas y poli péptidos con actividad tóxica a la cual se le otorga la capacidad de producir actividades fisiopatológicas negativas. (Ministerio de salud pública, 2007)

## **1.6. Serpientes del Ecuador**

Las serpientes en el Ecuador generalmente se encuentran en ambientes subtropicales y tropicales, donde es mucho más óptimo su crecimiento, es en estas zonas y en especial las zonas rurales es donde existe mayor probabilidad de una mordedura de serpiente (Soto & Lopez, 2009).

Se conocen alrededor de 200 especies de serpientes u ofidios en el Ecuador pero de todas estas solo 44 especies son de alto peligro para las regiones rurales donde los más afectados son los agricultores, ganaderos y nativos de estas zonas, se encuentran muchos más casos de mordeduras de serpientes en los meses de marzo, abril y mayo ya que en estos meses es cuando hay temporada de lluvia y las serpientes salen de sus nidos (Ministerio de salud pública, 2007).

En el Ecuador existen 5 géneros de serpientes venenosas con gran importancia como son: el género *Bothrops*, *Crotalus*, *Lachesis*, *Pelamis* y *Micrurus*, el género *Bothrops* es el responsable de un 70-80% de las mordeduras de serpientes en la región amazónica y del litoral en especial *B. asper* (equis) y *B. atrox* (pitalala) (Gualán Guamante, 2011).

### **1.7. Género bothrops**

El género *bothrops* se encuentra en la clase reptilia, subgénero ophidia y familia viperidae que agrupa a las serpientes venenosas y agresivas, este género agrupa 32 especies distribuidas por América de sur y América central (Jara Guazhco, Lozada Fajardo, & Peñaranda Banegas, 2014)

Las serpientes del genero *bothrops* poseen una cabeza ancha y plana de forma triangular, con una cola corta, colmillos largos y huecos, y en la parte frontal de la cabeza se encuentran lóbulos olfativos (Otero, Tobón, Gómez, Osorio, & Valderrama, 1992). Todas las serpientes de este género se caracterizan por estar cubierto por escamas y van desde los 50 cm o 60 cm hasta los 2 m de largo (Carrasco, 2013).

El hábitat de estas serpientes es en zonas húmedas, entre matorrales y hojas secas donde es difícil su visibilidad, En Ecuador el género *bothrops* encuentra ubicado en bosques nublados, matorrales secos, bosques de tierras bajas y en tierras bajas cerca de la costa del país hasta los 1200 metros de altura (Villacreses, 2013).

### **1.8. *Bothrops atrox***

Este tipo de serpiente se lo encuentra generalmente en la noche, aunque también se las ha visto por la mañana en días lluviosos, las serpientes juveniles de este

género y especie suelen alimentarse de animales pequeños ya que usan su cola para atraer a sus presas y llegan alcanzar su estado de maduras al llegar a los 3 años de vida (Pasmíño-Otamendi, 2013).

Las serpientes juveniles prefieren alimentarse de lagartijas y sapos, mientras que las serpientes de mayor tamaño o ya adultas se alimentan de aves y roedores (Pasmíño-Otamendi, 2013).

La especie *atrox* se caracteriza por tener una longitud entre los 75cm y 125cm, con un dorso color café, abanó, gris o amarillo. Es considerada la especie más peligrosa o la más causante de accidentes ofídicos en la Amazonía ecuatoriana (Córdova Mera & Santos Espin, 2013).

La reproducción de *bothrops atrox* es ovovivípara, donde su periodo de gestación varia de 90 a 120 días, las hembras deben salir de su nido durante la gestación para poder recibir el sol y así mantener su temperatura corporal, puede tener entre 60 y 80 crías (Bolaños, 1982).

## **1.9. Distribución**

La especie *atrox* se encuentran en la mayor parte de Sudamérica, en países como Brasil, Colombia, Venezuela, Guayana Francesa, Perú, Bolivia y Ecuador (Pasmíño-Otamendi, 2013).

*Bothrops atrox* está distribuida en una gran cantidad de hábitats, cerca de ríos, lagos o arroyos. Se las puede encontrar en bosques húmedos, bosques tropicales, montañas bajas etc. (Natera, Almeida, & Perez , 2005). Otro de los lugares donde habita este tipo de serpiente y generalmente causa más accidentes es en zonas urbanas, áreas con maleza y zonas de cultivo (Instituto Nacional de Salud, 2004).

En Ecuador está ubicada generalmente en ambientes húmedos, bosques tropicales, bosques lluviosos, se las encuentra desde los 1200m a nivel del mar, en cuanto a su micro hábitat cuando son jóvenes y adultas tiende a variar ya que las serpientes jóvenes se encuentran en arbustos, mientras las adultas se ubican muy poco en la vegetación y tienden a preferir más el suelo (Pasmíño-Otamendi, 2013).

### **1.9.1. Accidente ofídico**

Es la mordedura causada por una serpiente la cual va a inyectar veneno con actividad tóxica en el cuerpo, estos tipos de envenenamiento son complicados y van a variar según el ofidio que produjo la mordedura (Gutiérrez J., 2011). Este tipo de envenenamiento si no es tratado con rapidez puede producir muerte en el tejido afectado, amputación o muerte de la víctima. (Gutiérrez & Rojas, 1999).

### **1.9.2. Accidente bothrópico**

Según el Ministerio de Salud Pública el accidente bothrópico se da por la mordedura de las serpientes que pertenecen al género bothrops, a estas especies se las considera responsables de la mayor cantidad de accidentes ofídicos, ya que al encontrarse en una gran cantidad de hábitats por su buena adaptación, el que se produzca una mordedura de serpiente es muy frecuente, además constan de una alta reproducción y gran agresividad. (Hurtado Zuluaga, Urán Arboleda, & Villa Arango, 2013)

El accidente bothrópico se da la producirse una lesión cutánea por la mordedura de una serpiente, seguida de la inoculación del veneno compuesto por sustancias

toxicas que producen lesiones severas en el tejido afectado (Secretaria de Salud del Estado de Veracruz, 2014).

La gravedad de la mordedura dependerá de varios factores a tomar en cuenta como las veces que fue mordida la persona, el lugar afectado por la mordedura, edad, peso, el tiempo que a sido desde que se produjo el accidente (Gutiérrez & Rojas, 1999). Estos tipos de accidentes ofídicos deben sr tratados con rapidez para evitar complicaciones posteriores (Hurtado Zuluaga, Urán Arboleda, & Villa Arango, 2013).

El veneno que inocular este tipo de serpientes se lo considera con acción o actividad coagulante, proteolítica, mio-necrotizante y citotóxica. (Farez Pineda, 2015)

### **1.9.3. Signos y síntomas**

Al producirse la mordedura los primeros síntomas locales suelen darse en los primeros 20 minutos como dolor intenso que es el primer síntoma de gran importancia, dolor en el abdomen, la producción de edemas que a medida que transcurre el tiempo pueden ir empeorando y son notorios a los 30 minutos producida la mordedura, hemorragia que dependerá de la cantidad de veneno inoculado, infección y sangrado por la boca. (Hurtado Zuluaga, Urán Arboleda, & Villa Arango, 2013).

Luego de haber transcurrido 3 horas del accidente, dependiendo la cantidad de veneno inyectado se producen lesiones eritematosas de color rojizo, además de la aparición de flictenas en el área afectada y finalmente necrosis total del tejido (Ministerio de salud pública, 2007).

Los signos más comunes en el caso de un accidente bothrópico es la defibrinación que se da luego de haber pasado una hora de la mordedura, hematuria, trombocitopenia y la hipotensión (Hurtado Zuluaga, Urán Arboleda, & Villa Arango, 2013).

#### **1.9.4. Grados de envenenamiento bothrópico**

El envenenamiento bothrópico se puede manifestar en tres grados, leve, moderado y severo, los tres tipos de envenenamientos necesitan un atención hospitalaria, ya que deben ser evaluados y se les debe hacer un seguimiento, debido a que mientras pasa el tiempo las etapas pueden agravarse (Charry, 2006).

Envenenamiento leve: Los síntomas se presentan en el área local de la mordedura, se produce un dolor leve que puede ir aumentando, señales de un pequeño edema, no se da hemorragia, se deben hacer pruebas de tiempo de coagulación (Villamarín , 2009).

Envenenamiento moderado: Se da un dolor más fuerte o intenso, además de una sensación de calor en la parte afectada, se producen pequeños edemas, se puede producir hemorragia en pequeñas cantidades, hipertensión; el paciente necesita ser tratado con un suero antiofídico, la coagulación de la sangre no se produce normalmente. (Villamarín , 2009)

Envenenamiento severo: El dolor se vuelve intenso, se producen edemas en toda la parte afectada aunque puede también darse edemas en otras zonas del cuerpo, la hemorragia se intensifica, se empiezan a ver los primeros síntomas de necrosis, taquicardia, se pueden producir también ampollas flictenas, se puede dar la muerte de la persona afectada. (Charry, 2006)

## **1.10. Tratamiento**

El suero antiofídico es lo que se debe usar en el caso de un accidente bothrópico, este antídoto es de origen equino, y consta de los anticuerpos específicos del tipo de veneno para poder contrarrestar los efectos tóxicos del mismo. Este suero tiene como fin no permitir la absorción, evitar los síntomas que se pueden producir, el suero no puede ser usado para tratar síntomas que ya se presentaron (Mota , 2008).

La administración del suero hay que hacerla antes de las 6 horas a partir que se dio la mordedura, se debe tomar en cuenta que antes de administrar el antídoto o suero se tienen que hacer pruebas de sensibilidad o asegurarse de tener el equipo adecuado en caso de producirse una reacción adversa del paciente. La vía de administración adecuada es la intravenosa, ya que si se usa la vía intramuscular se puede provocar hematomas en el paciente (Mota , 2008).

### **1.10.1. Pruebas para determinar la actividad antihemolítica (alexítera)**

La actividad alexítera es evaluada principalmente en los extractos alcohólicos de las plantas de interés, las cuales van a ser sometidas a pruebas anticoagulantes, anti hemolíticas y anti proteolíticas” (Torres et al., 2012).

## Capítulo 2: Materiales y métodos

Este capítulo presenta las metodologías utilizadas durante la experimentación tanto en campo como en laboratorio.

### 2.1. Diseño

Este estudio se desarrolló de manera cuantitativa y cualitativa de acuerdo a las variables establecidas que se miden según los objetivos planteados para actividad antihemolítica.

### 2.2. Población y Muestra

#### 2.2.1. Material Vegetal

Se realizaron los trámites pertinentes para obtener los permisos medioambientales para realizar la recolección de las especies vegetales. Se tomaron muestras de *Minthostachys cf. mollis* (Kunth) Griseb y *Pollalesta discolor* (Kunth) Aristeg en la provincia de Morona Santiago, cantones Huamboya y Morona.

Se extrajo 2 mL de veneno de un ejemplar adulto de *B.atrox* por ordeño manual, el mismo que fue diluido en solución salina al 0.89% en una proporción 1:2 y transportada en refrigeración hasta los laboratorios en la ciudad de Quito. El ofidio fue liberado en su hábitat natural.

### 2.2.2. Obtención de extractos

Cada especie vegetal desinfectada con hipoclorito de sodio al 5% se secó durante dos semanas por venteo. Para realizar los tres tipos de extractos se utiliza la técnica de maceración con solventes de polaridad creciente; como sigue:

**Extracto heptánico:** se maceró 25 g de material vegetal seco con 150 mL n-heptano durante 48 horas a temperatura ambiente, luego filtró y se secó en rota vapor hasta su uso. (Viglianco, 2007)

**Extracto alcohólico:** El residuo vegetal seco y pesado de la extracción anterior se extrajo por segunda vez por maceración con 250 mL de etanol absoluto y con tres veces el volumen del material vegetal, durante 48 horas a temperatura ambiente, se filtró el extracto y se evaporó el solvente a sequedad en rota vapor. (Viglianco, 2007)

**Extracto acuoso:** El residuo vegetal de la extracción anterior se extrajo una tercera vez por maceración con 250 mL de agua destilada durante 48 horas a temperatura ambiente; se filtró y se evaporó a sequedad en baño maría. (Viglianco, 2007)

### 2.3. Estudio cuantitativo

Para este estudio se procedió de acuerdo a lo indicado por (Viduarre, Querevalú, De los Ríos, & Ruiz, 2007), como se describe a continuación:

#### 2.3.1. Determinación de cenizas totales

Para la determinación de cenizas totales se utiliza 2 g de materia vegetal pulverizada, se calcinó en un crisol previamente tarado, a una temperatura de 750

°C durante dos horas en mufla y luego, cada 30 min hasta obtener peso constante  
La determinación se realizó por triplicado.

### **2.3.2. Determinación de cenizas solubles en agua.**

Para este procedimiento se utiliza las cenizas totales obtenidas en el paso anterior, a cada crisol con cenizas se le añade 15 mL de agua destilada se tapa con un vidrio reloj y se hierve con un mechero durante 5 minutos, posteriormente utilizando papel filtro libre de cenizas se procede a filtrar la solución, el filtro con la muestra es colocada en el crisol utilizado inicialmente para ser incinerado en la mufla durante dos horas a una temperatura de 750°C, este procedimiento se realiza por triplicado.

### **2.3.3. Determinación de cenizas insolubles en ácido clorhídrico**

Al igual que en el caso anterior se utilizó las cenizas totales obtenidas en el primer paso. A cada crisol se le añade 2 mL de ácido clorhídrico al 10% y se lo coloca en baño maría durante 10 minutos para lo cual el crisol debe estar tapado con un vidrio reloj, luego de esto el vidrio reloj es lavado con 5 mL agua destilada la cual será añadida a la solución inicial, se procede a filtrar el contenido con un papel filtro libre de cenizas, a la solución obtenida se coloca ácido nítrico y dos gotas de nitrato de plata hasta lograr ausencia de cloruros. El filtrado obtenido es colocado en el crisol inicial y se deseca a 105°C para posteriormente ser incinerado en la mufla a una temperatura de 750°C durante dos horas. Este proceso se realiza por triplicado. Luego los crisoles son colocados en desecador hasta temperatura ambiente para determinar su peso.

## **2.4. Cuantificación de fenoles totales y flavonoides.**

Se cuantificó a polifenoles totales y flavonoides dado que existen estudios que relacionan directamente a la actividad alexítica de las plantas con la presencia de estos metabolitos secundarios (Zhañay Andrade, 2012)

### **2.4.1. Cuantificación de Fenoles totales**

Esta cuantificación se determinó de acuerdo a lo establecido en (Ricco, y otros, 2011) por espectrofotometría visible y se fundamenta en una reacción de óxido-reducción colorimétrica, donde el reactivo oxidante es el de Folin-Ciocalteu. El procedimiento se describe a continuación:

Se preparó una curva de calibración utilizando una solución de ácido gálico (1 mg/mL) en distintos volúmenes desde 0  $\mu\text{L}$  a 160  $\mu\text{L}$  en intervalos de 20  $\mu\text{L}$ , que se aforaron a un volumen de 500  $\mu\text{L}$  con agua destilada. Se leyó la absorbancia a 760 nm y los resultados fueron expresados en mg de ácido gálico por g extracto.

Se pesó 5 mg del extracto vegetal seco y se lo disolvió en 1 mL de agua destilada. Esta solución se diluyó 1:10 en agua destilada, se tomó una alícuota de 100  $\mu\text{L}$  y se aforó a 500  $\mu\text{L}$  con agua destilada. Posteriormente se adicionó 250  $\mu\text{L}$  de reactivo Folin a cada muestra y se aplicó ultrasonido durante 5 minutos. A continuación, se añadió 1250  $\mu\text{L}$  de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 20% y se dejó en reposo durante 2 horas.

### **2.4.2. Cuantificación de flavonoides**

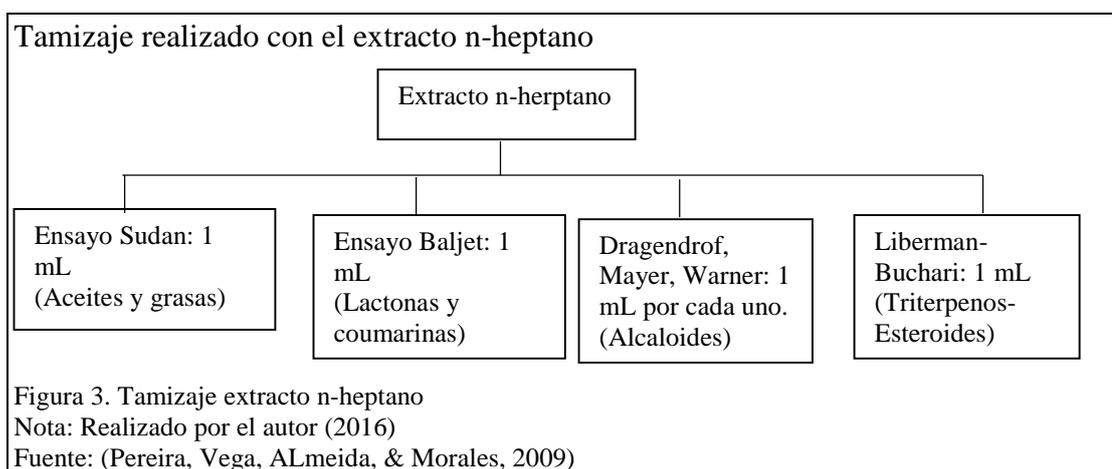
Esta cuantificación se determinó de acuerdo a lo establecido en (Ricco, y otros, 2011) por espectrofotometría visible como se describe a continuación:

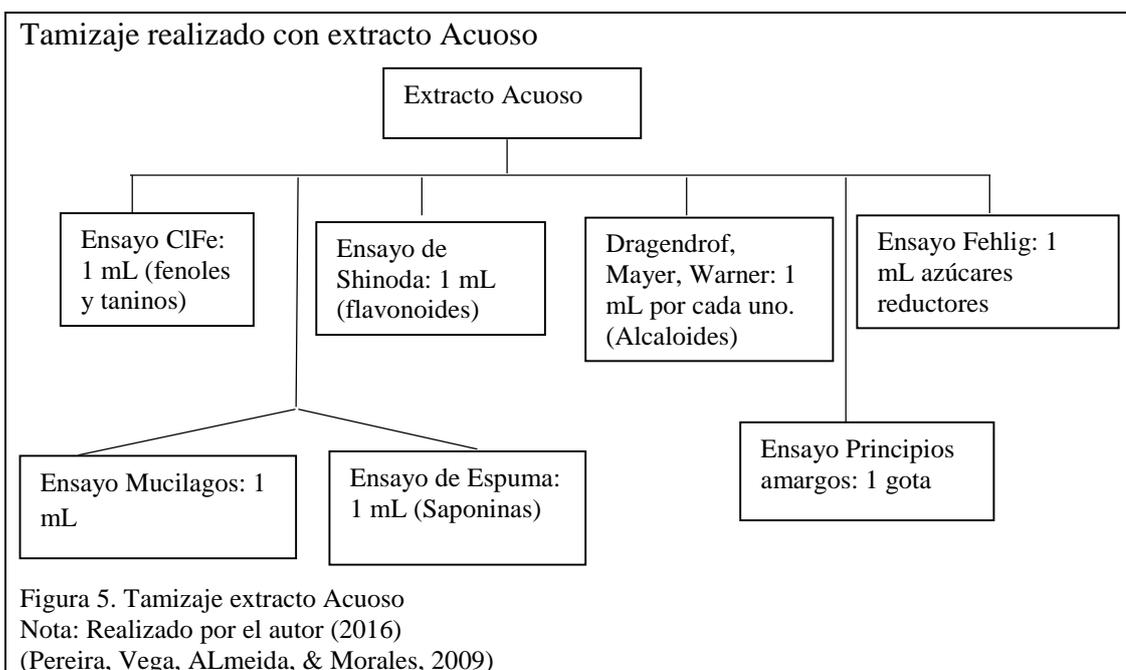
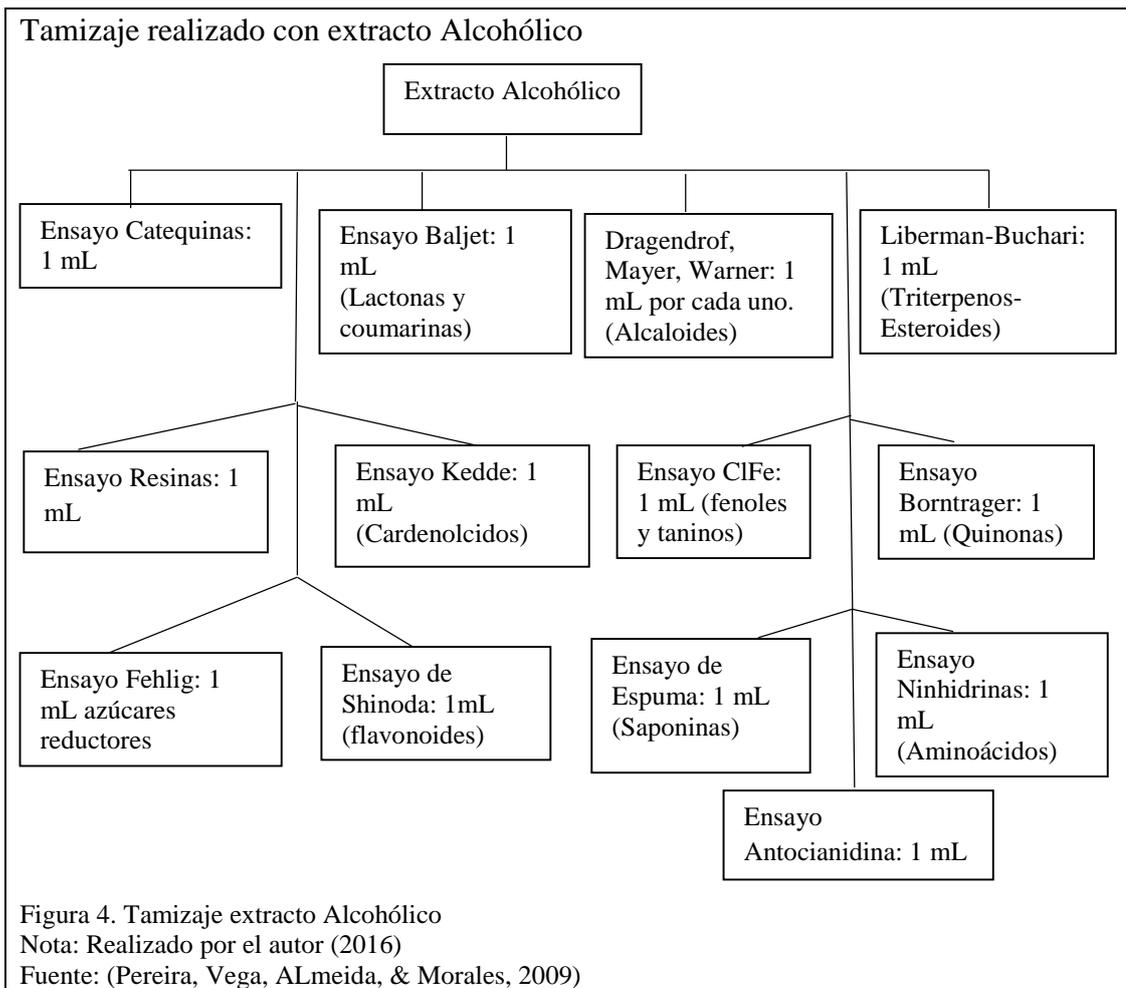
Al igual que en el caso anterior se elaboró una curva de calibración usando una solución patrón de catequina (0,1mg/mL) en volúmenes de 0 a 100  $\mu$ L en intervalos de 20  $\mu$ L. La absorbancia se midió a 510 nm antes de 30 minutos y los resultados se expresaron en mg de catequina por g de extracto vegetal.

Se tomó 5 mg de extracto vegetal seco y se lo disolvió en 1 mL de agua destilada y a esta disolución se la diluyó al décimo en agua destilada. Posteriormente a cada muestra se añadió 250  $\mu$ L de agua destilada, 75  $\mu$ L de NaNO<sub>2</sub> al 5% y se dejó en reposo por 6 minutos. Se adicionó 150  $\mu$ L de AlCl<sub>3</sub> al 10% y se dejó en reposo por 5 minutos. A continuación, se adicionó 500  $\mu$ L de NaOH 1M y por último se aforó cada muestra con agua destilada a un volumen de 2.500  $\mu$ L.

## 2.5. Estudio cualitativo

### 2.5.1. Tamizaje fitoquímico





## **2.6. Actividad anti hemolítica de los extractos**

### **2.6.1. Determinación de la dosis mínima hemolítica (MIHD)**

#### **2.6.1.1. Preparación del medio de cultivo**

Al realizar este ensayo se preparó un medio de cultivo de agar sangre fosfatidilcolina, preparado como sigue: en un matraz Erlenmeyer se añadió 1 litro de agua destilada y se calentó sobre una plancha térmica a una temperatura de 50C°, se disolvió 10 tabletas PBS y se procedió a medir el pH de la solución hasta alcanzar un pH de 7.3 con un rango de error de +- 0.2. Posteriormente se añadió 40 g de agar sangre base y se calentó hasta llegar a ebullición. En seguida, se añadió 10 mL de CaCl<sub>2</sub> 0.01M. Se esterilizó en autoclave durante 15 minutos a 120C°. Se dejó enfriar el medio hasta alcanzar una temperatura de 50C° y se añadió 24 mL de eritrocitos lavados y, finalmente, 12 mL de albumina de huevo (egg-yolk) agitándose lentamente hasta lograr una apariencia homogénea.

En una cámara de flujo laminar, se procedió a hacer la distribución del medio de cultivo en cajas Petri que se guardan en refrigeración hasta su uso (Pirela, López, & Hernández, 2006).

#### **2.6.1.2. Dilución del veneno**

Se preparó una solución madre de veneno disolviendo 6 mg de veneno en un 1mL de PBS.

Dilución 1: Se tomó 0.67 mL de solución madre y se aforó a 1 mL con PBS.

Dilución 2: Se tomó 0.75 mL de la dilución 1 y aforó a 1 mL con PBS.

Dilución 3: Se tomó 0.67 mL de la dilución 2 y se aforó a 1 mL PBS.

Dilución 4: Se tomó 0.5 mL de la dilución 3 y se aforó hasta 1 mL con solución de PBS.

Para realizar la siembra, en cada caja Petri se hizo 5 pocillos en el agar, y, en cada pocillo se depositó 15  $\mu$ L de las soluciones preparadas anteriormente de tal forma que se dosifiquen de 90  $\mu$ g a 15  $\mu$ g de veneno. Posteriormente se incubó a temperatura de 37C° en una estufa por 20 horas; pasado este tiempo, se midió el diámetro de halo de hemólisis generado utilizando un calibrador Vernier. Se tomó como dosis mínima hemolítica (MIDH) a aquella dosis de veneno que formó un halo de hemólisis de 15 mm de diámetro (1  $\mu$ g/ $\mu$ L); con esta dosis se evaluó la capacidad neutralizante de cada extracto sobre el veneno (Pirela, López, & Hernández, 2006).

## **2.7. Actividad neutralizante del veneno**

### **2.7.1. Actividad anti hemolítica.**

En agar sangre fosfatidilcolina se realizó 4 pocillos con una pipeta Pasteur y se marcó como D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub> y D (MIDH).

Se hizo una dilución del veneno en agua destilada estéril como se realizó en el ensayo anterior, para este proceso se utilizó de la dilución 4 para mezclarlo con el extracto vegetal (Dilución D).

Dilución D<sub>1</sub>: Se tomó 15  $\mu$ L de D y se colocó en un tubo Ependorff, luego se disolvió 20 mg de extracto en 0.5 mL de agua destilada de la cual se tomó 250  $\mu$ L y se aforó a 1000  $\mu$ L; de esta se tomó 250  $\mu$ L y se aforo a 1000  $\mu$ L, por último,

de ésta solución se tomó 100  $\mu\text{L}$  y se aforó a 1000  $\mu\text{L}$ , de esta última solución de tomó 11.25  $\mu\text{L}$ . Se mezcló las dos soluciones y se pre incubó a una temperatura de 37C° por 30 minutos. Esta mezcla tiene una proporción 1:7 MIDH- extracto.

Dilución D<sub>2</sub>: A 15  $\mu\text{L}$  de la MIDH en un tubo Ependorff, se le añadió 11.25  $\mu\text{L}$  de una solución de extracto preparada de la siguiente manera: se disolvió 30 mg de extracto en 0.5 mL de agua destilada, luego se tomó 250  $\mu\text{L}$  de la solución y se aforó a 1000  $\mu\text{L}$ , de ésta se tomó 250  $\mu\text{L}$  y se aforó a 1000  $\mu\text{L}$  por último se tomó 100  $\mu\text{L}$  y se aforó a 1000  $\mu\text{L}$ . Se mezcló las dos soluciones y se pre incubó a una temperatura de 37C° por 30 minutos. Esta Dilución tiene una proporción 1:10 MIDH-extracto.

Dilución D<sub>3</sub>: A 15  $\mu\text{L}$  de la dilución MIDH en un tubo Ependorff, se le añadió 11,25  $\mu\text{L}$  de una disolución de extracto preparada como se describe a continuación: se disolvió 60 mg de extracto en 0.5 mL de agua destilada luego se tomó 250 $\mu\text{L}$  de la solución y se aforo a 1000  $\mu\text{L}$ , de esta se tomó 250  $\mu\text{L}$  y se aforo a 1000  $\mu\text{L}$  por último se tomó 100  $\mu\text{L}$  y se aforo a 1000  $\mu\text{L}$ . Se mezcló las dos soluciones y se pre incubó a una temperatura de 37C° por 30 minutos. Esta dilución tiene una proporción 1:20 MIDH-extracto.

Se sembró 15  $\mu\text{L}$  de cada mezcla en cada pocillo y se incubó a 37C° durante 20 horas; posterior a esto se midió el diámetro del halo de hemólisis formado con un Vernier. Este proceso se realizó por triplicado por cada extracto (Pirela, López, & Hernández, 2006).

### Capítulo 3: Resultados y discusión

#### 3.1. Rendimiento de extractos vegetales

Tabla 3.  
Rendimiento del extracto n-heptano

	<b>Rendimiento %</b>
<i>Minthostachys cf. mollis</i>	5.07
<i>Pollalesta discolor</i> (Corteza)	3.30

Nota: Realizado por el autor (2016)

Tabla 4.  
Rendimiento del extracto alcohólico

	<b>Rendimiento %</b>
<i>Minthostachys cf. mollis</i>	5.14
<i>Pollalesta discolor</i> (Corteza)	3.44

Nota: Realizado por el autor (2016)

Tabla 5.  
Rendimiento del extracto acuoso

	<b>Rendimiento %</b>
<i>Minthostachys cf. mollis</i>	9.65
<i>Pollalesta discolor</i> (Corteza)	0.32

Nota: Realizado por el autor (2016)

En las (tablas 3,4 y 5) se observa que la especie *Minthostachys cf. mollis* presenta mayor rendimiento en los 3 extractos, siendo el más alto el del extracto acuoso, es

posible que el alto rendimiento en este extracto y en esta especie en específico se deba a un alto contenido de alcaloides según Álvarez & Enríquez (2006) donde obtiene un alto rendimiento de extracto vegetal por el alto contenido de estos compuestos apolares (pág. 40).

Tabla 6.  
Determinación de cenizas totales

<b>Especie</b>	<b>Cenizas totales (g)</b>
<i>Minthos tachys cf. mollis</i>	11.10
<i>Pollalesta discolor</i> (Corteza)	6.48

Nota: Realizado por el autor (2016)

La (tabla 6) nos muestra que *Minthostachys cf. mollis* posee un alto contenido de cenizas totales, lo que nos indica una gran presencia de materia inorgánica en esta especie con relación a *Pollalesta discolor*, según Barreset & Hernández (2005) las cenizas totales abarca el contenido de materia inorgánica de una especie vegetal.

Tabla 7.  
Determinación de cenizas solubles en agua

<b>Especie</b>	<b>% Cenizas solubles</b>
<i>Minthostachys cf. mollis</i>	2.64
<i>Pollalesta discolor</i> (Corteza)	6.85

Nota: Realizado por el autor (2016)

Como muestra la (tabla 7) la especie *Pollalesta discolor* posee un mayor contenido de cenizas solubles en agua.

Tabla 8.  
Determinación de cenizas insolubles en ácido clorhídrico

<b>Especie</b>	<b>% Cenizas insolubles</b>
<i>Minthostachys cf. mollis</i>	7.16
<i>Pollalesta discolor</i> (Corteza)	2.97

Nota: Realizado por el autor (2016)

Los resultados obtenidos se los muestra en la (tabla 8) indicando a la especie *Minthostachys cf. mollis* con un alto contenido de cenizas insolubles, según (Flores, 2007) esto se debe a la presencia de material térreo.

Tabla 9.  
Determinación del contenido de humedad

<b>Especies</b>	<b>% de humedad</b>
<i>Minthostachys cf. mollis</i>	10.24
<i>Pollalesta discolor</i> (Corteza)	8.20

Nota: Realizado por el autor (2016)

En la (tabla 9) se observa que las dos especies en estudio poseen un alto contenido de humedad, la especie *Minthostachys cf. mollis* es la que presentó mayor porcentaje por lo cual es muy susceptible al crecimiento de hongos como lo indica Gutierrez, M (2011) en su estudio “Control de Calidad del *Xanthium spinosum*, planta medicinal expendida en la ciudad de La Paz, Bolivia”.

Tabla 10.  
Polifenoles totales

<b>Muestra</b>	<b><i>mg ácido galico</i></b> <b><i>mL de extracto</i></b>
<i>Minthostachys cf. mollis</i>	57.54
<i>Pollalesta discolor</i> (Corteza)	12.78

Nota: Realizado por el autor (2016)

Al realizar la cuantificación de fenoles se muestra que las dos especies poseen una alta cantidad de fenoles, la presencia de fenoles en especies vegetales está altamente relacionada con la actividad antioxidante, además que estos compuestos sustentan la actividad farmacológica de varias especies vegetales según Villanueva (2010) en su investigación “Antocianinas, ácido ascórbico, polifenoles totales y actividad antioxidante, en la cáscara de camu-camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K) McVaugh)”

Tabla 11.  
Flavonoides

<b>Muestra</b>	<b><i>mg catequinas</i></b> <b><i>mL de extracto</i></b>
<i>Minthostachys cf. mollis</i>	0.03
<i>Pollalesta discolor</i> (Corteza)	0.40

Nota: Realizado por el autor (2016)

Al realizar la cuantificación de flavonoides se muestra que las dos especies poseen una alta cantidad de flavonoides lo que le otorgaría la propiedad anti hemolítica de las especies vegetales al tener estos metabolitos la capacidad de atrapar radicales libres como lo muestra (Benitez & Diaz, 2011) en su trabajo Actividad antioxidante y antibacteriana de seis cáscaras de frutos del oasis de Pica, mostrando un alto contenido

de flavonoides dándole así la capacidad antimicrobiana y anti hemolítica a estos metabolitos.

### 3.2. Tamizaje fitoquímico

Tabla 12.  
Extracto n-heptano de *Minthostachys cf. mollis*

	<b>Metabolito de interés</b>	<b>Ensayo</b>	<b>Resultados</b>
<i>Minthostachys cf. mollis</i>	Ácidos grasos	Sudan	+
	Compuesto lactónicos	Baljet	--
	Alcaloides	Wagner	+++
	Alcaloides	Dragendorff	--
	Alcaloides	Mayer	+
	Triterpenos o esteroides	Lieberman-Burchard	++
	+ = Poca presencia ++ = Presencia considerable +++ = Alta presencia -- = Ausencia		

Nota: Realizado por el autor (2016)

Con el extracto n-heptano se determinó que la especie *Minthostachys cf. mollis* posee una gran cantidad de triterpenos y alcaloides, una baja cantidad de ácidos grasos y alcaloides y no contiene compuestos lactonicos.

Tabla 13.  
 Extracto n-heptano de *Pollalesta discolor*

	<b>Metabolito de interés</b>	<b>Ensayo</b>	<b>Resultados</b>
<i>Pollalesta discolor</i> (Corteza)	Ácidos grasos	Sudan	+
	Compuesto lactónicos	Baljet	--
	Alcaloides	Wagner	++
	Alcaloides	Dragendorff	--
	Alcaloides	Mayer	--
	Triterpenos o esteroides	Leibermann-Burchard	+
	+= Poca presencia ++ = Presencia considerable +++ = Alta presencia -- = Ausencia		

Nota: Realizado por el autor (2016)

Con el extracto n-heptano se determinó que la especie *Pollalesta discolor* (Corteza) evidencia la presencia de alcaloides, posee en bajas cantidades ácidos grasos y triterpenos, carece de alcaloides y compuestos lactónicos.

Tabla 14.  
Extracto alcohólico de *Minthostachys cf. mollis*

	<b>Metabolito de interés</b>	<b>Ensayo</b>	<b>Resultados</b>
<i>Minthostachys cf. mollis</i>	Resinas	Resinas	--
	Saponinas	Espuma	--
	Glucósidos cardiotónicos	Kedde	+
	Flavonoides	Shinoda	++
	Compuestos fenólicos	Cloruro Férrico	+
	Aminoácidos o Aminas	Ninhidrinas	--
	Alcaloides	Warner	++
	Compuestos lactónicos o Coumarinas	Baljet	---
	Compuestos del grupo flavonoides	Antocianinas	++
	Catequinas	Catequinas	+
	Azucares reductores	Fehling	--
	Alcaloides	Dragendorff	+++
	Triterpenos o esteroides	Leibermann-Burchard	+++
	Quinonas	Borntrager	--
	Alcaloides	Mayer	+
+= Poca presencia ++= Presencia considerable +++ = Alta presencia -- = Ausencia			

Nota: Realizado por el autor (2016)

Con el extracto alcohólico se determinó que la especie *Minthostachys cf. mollis* posee gran cantidad de alcaloides y triterpenos, flavonoides y fenoles, los dos estrechamente relacionados con la actividad anti hemolítica. Además se evidencia poca presencia de catequinas y una ausencia de quinonas en este extracto.

Tabla 15.  
Extracto alcohólico *Pollalesta discolor*

	<b>Metabolito de interés</b>	<b>Ensayo</b>	<b>Resultados</b>
<i>Pollalesta discolor</i> (Corteza)	Resinas	Resinas	--
	Saponinas	Espuma	--
	Glucósidos cardiotónicos	Kedde	--
	Flavonoides	Shinoda	++
	Compuestos fenólicos	Cloruro Férrico	+
	Aminoácidos o Aminas	Ninhidrinas	--
	Alcaloides	Warner	+
	Compuestos lactónicos o Coumarinas	Baljet	--
	Compuestos del grupo flavonoides	Antocianinas	++
	Catequinas	Catequinas	+
	Azucares reductores	Fehling	--
	Alcaloides	Dragendorff	+++
	Triterpenos o esteroides	Leibermann-Burchard	+
	Quinonas	Borntrager	--
	Alcaloides	Mayer	+

+ = Poca presencia  
++ = Presencia considerable  
+++ = Alta presencia  
-- = Ausencia

Nota: Realizado por el autor (2016)

Con el extracto alcohólico se determinó que la especie *Pollalesta discolor* (Corteza) posee una gran cantidad de alcaloides, y se puede determinar poca presencia de flavonoides y fenoles metabolitos de interés para la actividad anti hemolítica.

Tabla 16.  
Extracto Acuoso de *Minthostachys cf. mollis*

	<b>Metabolito de interés</b>	<b>Ensayo</b>	<b>Resultados</b>
<i>Minthostachys cf. mollis</i>	Azucares Reductores	Fehling	+
	Saponinas	Espuma	+
	Sabores	Amargo	--
	Compuestos polisacáridos	Mucilagos	+
	Flavonoides	Shinoda	+
	Alcaloides	Dragendorff	+++
	Alcaloides	Warner	+++
	Compuestos Fenólicos	Cloruro férrico	+
	Alcaloides	Mayer	++
	+= Poca presencia ++ = Presencia considerable +++ = Alta presencia -- = Ausencia		

Nota: Realizado por el autor (2016)

Con el extracto acuoso se determinó que la especie *Minthostachys cf. mollis* posee gran cantidad de alcaloides y se puede evidenciar también la presencia de fenoles y flavonoides que son metabolitos de mayor interés.

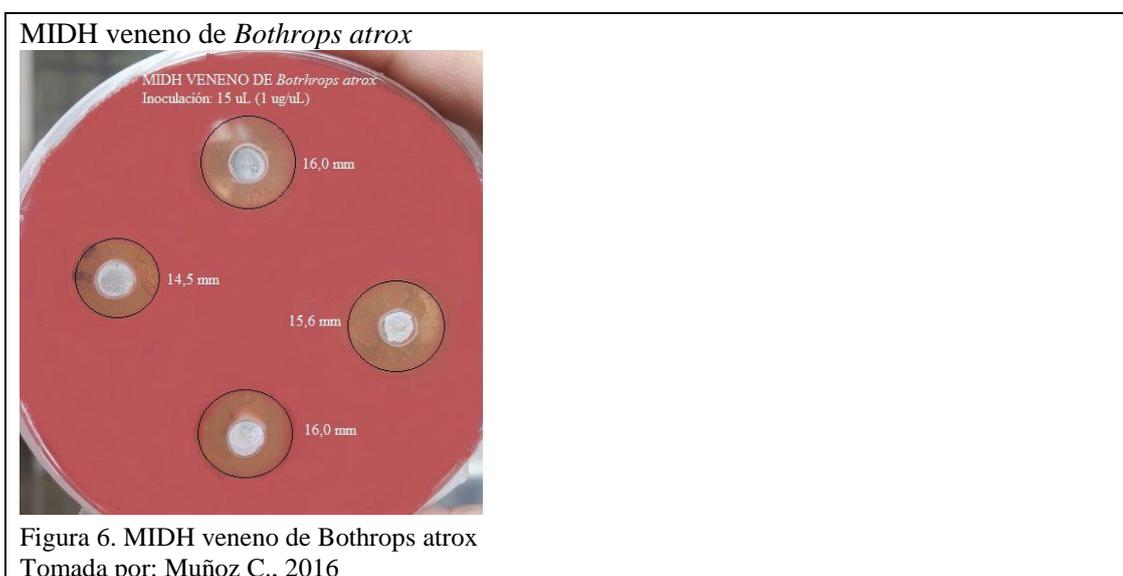
Tabla 17.  
Extracto Acuoso de *Pollalesta discolor*

	<b>Metabolito de interés</b>	<b>Ensayo</b>	<b>Resultados</b>
<i>Pollalesta discolor</i> (Corteza)	Azúcares Reductores	Fehling	--
	Saponinas	Espuma	+
	Sabores	Amargo	+
	Compuestos polisacáridos	Mucilagos	-
	Flavonoides	Shinoda	+
	Alcaloides	Dragendorff	+++
	Alcaloides	Warner	+++
	Compuestos Fenólicos	Cloruro férrico	++
	Alcaloides	Mayer	+++
	+= Poca presencia ++ = Presencia considerable +++ = Alta presencia -- = Ausencia		

Nota: Realizado por el autor (2016)

Con el extracto acuoso se determinó que la especie *Pollalesta discolor* (Corteza) posee gran cantidad de alcaloides y se determinó la presencia de flavonoides y fenoles.

### 3.3. Determinación de la dosis mínima hemolítica



Se generó un halo de 15.53 mm de diámetro promedio como se muestra en la figura (figura 6) dicho halo se lo tomó como (DMIH), (Fernandez, 2010), en su trabajo “evaluación de las propiedades antiofídicas del extracto etanólico y fracciones obtenidas de *Renealmia alpinia* (Rottb) Mass (Zingiberaceae) cultivada in vitro” reporta un halo de 20mm por lo que nuestro estudio se encuentra dentro del rango que fue determinado.

### 3.4. Actividad anti hemolítica

Tabla 18.

Tratamientos para determinación de actividad anti hemolítica

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

Nota: Realizado por los autores, 2016

Tabla 19.

Concentraciones de mezcla veneno-extracto

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

Nota: Realizado por el autor (2016)

Tabla 20.

Halos de hemólisis generados por la mezcla veneno-extracto: acuoso, alcohólico y heptánico

Especie	Extracto	Concentración	Halo (mm)
<i>Minthostachys cf. mollis</i>	Acuoso	1:7	14.00
		1:10	13.50
		1:20	13.33
<i>Pollalesta discolor</i> (Corteza)	Acuoso	1:7	15.33
		1:10	14.66
		1:20	15.33
<i>Minthostachys cf. mollis</i>	Alcohólico	1:7	9.00
		1:10	0.00
		1:20	11.00
<i>Pollalesta discolor</i> (Corteza)	Alcohólico	1:7	0.00
		1:10	12.33
		1:20	0.00
<i>Minthostachys cf. mollis</i>	n-heptano	1:7	15.00
		1:10	13.00
		1:20	12.00
<i>Pollalesta discolor</i> (Corteza)	n-heptano	1:7	12.00
		1:10	12.00
		1:20	11.33

Nota: Realizado por el autor (2016)

### 3.5. Análisis estadístico

Tabla 21.

Análisis de varianza para diámetro de halo de actividad inhibitoria

<b>ANOVA. Análisis de varianza (SC Tipo III)</b>					
<b>Fuente de Variación</b>	<b>Grados de libertad</b>	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>Cuadrados medios</b>	<b>Valor de f</b>	<b>Valor de P</b>
<b>Modelo</b>	19	659.01	34.68	7.01	<0,0001
<b>Tratamiento</b>	9	549.18	61.02	12.33	<0,0001
<b>Especie</b>	1	50.42	50.42	10.19	0,0028
<b>Tratamiento*especie</b>	9	59.42	6.60	1.33	0,2508
<b>Error</b>	40	198.00	4.95		
<b>Total</b>	59	857.01			

Nota: Realizado por el autor (2016)

Mediante el análisis de varianza (ANOVA), para el diámetro del halo (tabla 20), se determinó que existen diferencias estadísticas significativas ( $p < 0.05$ ) entre los tratamientos establecidos y las especies analizadas, a diferencia de la interacción de estas dos variables donde no existe diferencia significativa.

Tabla 22.

Rangos de significancia para los tratamientos en relación a la actividad inhibitoria.

Tratamientos	Medias	Rangos			
C3 Al	7.17	A			
C1 Al	7.50	A			
C2 Al	7.83	A			
C3 Hep	9.00	A	B		
C2 Hep	10.00	A	B	C	
C1 Hep	12.50		B	C	D
C3 Ac	13.17		B	C	D
C2 Ac	14.17			C	D
C1 Ac	14.50				D
Testigo	15.53				D
Hep: extracto n-heptano; Al: extracto alcohólico; Ac: extracto acuoso					

Nota: Realizado por el autor (2016)

Según el Test de Tukey al 5% (tabla 21) para los tratamientos en relación a la actividad inhibitoria o neutralizante, se observa que existen cuatro rangos de significancia. En el primer rango A se ubicaron los tratamientos C<sub>3</sub>Al, C<sub>1</sub>Al y C<sub>2</sub>Al es decir que estos tratamientos son los más eficientes al momento de inhibir la hemólisis. En el último rango D se ubicaron los tratamientos C<sub>3</sub>Ac, C<sub>2</sub>Ac, C<sub>1</sub>Ac con los mayores diámetros de hemólisis, lo que significa que estos son los tratamientos con menor actividad anti hemolítica.

Tabla 23.  
Comparación entre las especies según el test de Tukey

Test Tukey Alfa: 0.05			
Espece	Media de tamaño de halo	Rango	
<i>Minthostachys cf. mollis</i>	10.22	A	
( <i>Corteza</i> )	12.05		B

Nota: Realizado por el autor (2016)

Según el Test de Tukey al 5% (tabla 22) para las especies estudiadas en relación a la actividad antihemolítica, se puede observar que existen dos rangos de significancia en donde la especie *Pollalesta discolor* (*Corteza*), presenta la menor actividad inhibitoria con un halo promedio de 12.05 mm a diferencia de *Minthostachys cf. mollis* (kurarina) que presenta un diámetro de 10.22 mm.

## Discusión

Al realizar la determinación de la dosis mínima hemolítica (DIMH) se tomó como referencia la cantidad de veneno que formó un halo de 15.53 mm de diámetro promedio. Resultado similares a los reportados por (Fernandez, 2010), en su trabajo “evaluación de las propiedades antiofídicas del extracto etanólico y fracciones obtenidas de *Renealmia alpinia* (Rottb) Mass (Zingiberaceae) cultivada in vitro” donde toma como la dosis mínima hemolítica un halo de 20 mm de diámetro.

Las propiedades anti hemolíticas de las especies vegetales si están relacionadas con el contenido de polifenoles y flavonoides (*Minthostachys cf. Mollis* = 57.54; *Pollalesta discolor* 12.38); (*Minthostachys cf. Mollis* = 57.54; *Pollalesta discolor* 12.38) respectivamente, al encontrarse en gran cantidad en el extracto alcohólico, por lo cual este posee los mejores tratamientos (C<sub>3</sub>Al, C<sub>1</sub>Al y C<sub>2</sub>Al) en este estudio. Villanueva (2010) en su investigación “Antocianinas, ácido ascórbico, polifenoles totales y actividad antioxidante, en la cáscara de camu-camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K) McVaugh)” obtiene una mayor cantidad de polifenoles (35.2) y flavonoides (0.48) en el extracto alcohólico comprobando nuestros valores se encuentran en rango similar.

Se obtuvo como resultado que el halo reduce su tamaño significativa de (15mm a 10.21mm), comprobando así las propiedades anti hemolíticas de los extractos alcohólicos como los más eficientes de las especies en estudio, resultados similares se indican en el trabajo presentado por (Arley Patiño, 2012) “Efecto inhibitorio de extractos de *Renealmia alpinia* Rottb. Maas (Zingiberaceae) sobre el veneno de *Bothrops asper* (mapaná)” donde sus extractos alcohólicos son los mejores al producirse una reducción de tamaño del halo de hemólisis de 20mm a 16 o 15mm.

## Conclusiones

- El contenido de polifenoles totales y flavonoides permite anticipar actividad alexítera en ambas especies vegetales, debido a que se relacionan directamente con la capacidad neutralizante del veneno de serpientes del género *Bothrops*.
- La actividad neutralizante o inhibitoria del veneno ocasionada por los extractos demuestra que el extracto alcohólico en las dos especies es el que tiene mayor actividad anti hemolítica.
- Los extractos alcohólicos de las dos especies en estudio son los más eficientes al momento de reducir el halo de hemólisis aceptando así la hipótesis alternativa ya que por lo menos un extracto de las dos especies en estudio reduce el halo de hemólisis generado por la concentración mínima hemolítica (MIDH) del veneno de *Bothrops atrox*.

## Referencias

Álvarez, L., & Enríquez, E. (enero de 2006). *Informe final de la práctica de EDC*.

Obtenido de Universidad de San Carlos de Guatemala:

[http://sitios.usac.edu.gt/wp\\_edc/wp-content/uploads/2012/07/Luis-Eduardo-%C3%81lvarez-Hern%C3%A1ndez-FARMAYA.pdf](http://sitios.usac.edu.gt/wp_edc/wp-content/uploads/2012/07/Luis-Eduardo-%C3%81lvarez-Hern%C3%A1ndez-FARMAYA.pdf)

Ansaloni, R., Wilches, I., & León, F. (2010). *Estudio Preliminar sobre Plantas Medicinales Utilizadas en Algunas Comunidades de las Provincias de Azuay,*

*Cañar y Loja, para Afecciones del Aparato Gastrointestinal*. Obtenido de

<http://www.rte.espol.edu.ec/index.php/tecnologica/article/viewFile/40/12>

Arley Patiño, M. A. (2012). Efecto Inhibitorio de extractos de *Renalmia alpinia*

Rottb. Maas (Zingiberaceae) sobre el veneno de *bothrops asper* (mapaná).

*Scielo*, 32-40.

Barreset, Y., & Hernández, M. (Agosto de 2005). *Revista Cubana de Plantas*

*Medicinales*. Obtenido de Caracterización y estudio fitoquímico de *Cassia*

*alata* L.: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1028-](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962005000200009)

[47962005000200009](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962005000200009)

Benitez, J., & Diaz, R. (Junio de 2011). Actividad antioxidante y antibacteriana de

seis cáscaras de frutos del oasis de Pica. *Revistas Bolivarianas*.

Obtenido de Actividad antioxidante y antibacteriana de seis cáscaras

de frutos del oasis de Pica.

Bolaños, R. (1982). *LAS SERPIENTES VENENOSAS DE CENTROAMÉRICA Y*.

Obtenido de ASPECTOS ZOOLOGICOS, EPIDEMIOLOGICOS:

[https://scholar.google.es/scholar?q=reproduccion+de++la+serpiente+bothrop+s+atrox&btnG=&hl=es&as\\_sdt=0%2C5](https://scholar.google.es/scholar?q=reproduccion+de++la+serpiente+bothrop+s+atrox&btnG=&hl=es&as_sdt=0%2C5)

Brai, S., & Madrigal, B. (2005). *Plantas Antimalarcas De Tumaco Costa Pacífica colombiana*. Medellín: Universidad De Antioquia.

Carrasco, I. R. (2013). Aspectos clínicos y epidemiológicos de la mordedura de serpiente en México. *Evidencia Medica e Investigación en Salud*, 125-136.

Castrillón, D., & Estrada, J. (2014). *Envenenamiento ofídico*. Obtenido de SCielo: <http://www.scielo.org.co/pdf/sun/v23n1/v23n1a10.pdf>

Cerón Martínez, C. (2006). Plantas Mediinales de los Andes ecuaorianos. *Herbario Alfredo Paredes (QAP), Escuela de Biología de la Universidad Central del Ecuador.*, 288.

Charry, H. (2006). Consideraciones generales acerca del accidente ofídico causado por sepientes colombianas pertenecientes a los géneros Bothrops, Bothriopsis, Bothriechis, Bothrocophias y Porthidium (Vipiridae: Critalinae: Bothropinae). *Aspectos Biomédicos del Accidente Bothrópico*, 8-10.

Contreras, R. (2014). El origen de toda las serpientes. *La Guía*, 2-4.

Corales, M. N. (2010). *Especies medicinales nativas de las reservas naturales de Punta Lara e Isla Martín García, Buenos Aires, Argentina*. Buenos Aires: Universidad Nacional de La Plata.

Córdova Mera, G., & Santos Espin, D. L. (2013). *PONTIFICA UNIVERISDAD CATOLICA DEL ECUADOR*. Obtenido de PONTIFICA UNIVERISDAD CATOLICA DEL ECUADOR:

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

Cueva, M., & Erazo, K. (15 de Abril de 2010). *Scribd*. Obtenido de Scribd:

<https://es.scribd.com/doc/37576705/MORDEDURA-DE-SERPIENTES-ECUADOR-UCE-FCM-EM>

de la Torre, L., Muriel, P., & Balslev, H. (2006). *Etnobotánica en los Andes del Ecuador*. Obtenido de

<http://www.beisa.dk/Publications/BEISA%20Book%20pdfer/Capitulo%2016.pdf>

Elechosa, M. (2009). Desarrollo de tecnologías innovativas para la explotación, conservación, evaluación y utilización de plantas aromáticas nativas. *Manual de recolección sustentable de plantas aromáticas nativas de la región central y noroeste de la Argentina*, 14.

Erazo, G., Izurieta, J., Cronkleton, P., Larson, A., & Putzel, L. (2014). El uso de pique (*Piptocoma discolor*) por los pequeños productores de Napo, Ecuador. *Brief*, 2-4.

Farez Pineda, J. (2015). *Prevalencia y Complicaciones de los Accidentes Ofídicos en los pacientes de 15- 60 años de Edad Atendidos en el Hospital San Vicente de Paúl. Pasaje. 2012-2014*. Machala: UNIVERSIDAD DE MACHALA.

Fernandez, M. (2010). *EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES ANTIOFÍDICAS DEL EXTRACTO ETANÓLICO Y FRACCIONES OBTENIDAS DE *Renealmia alpinia* (Rottb) Mass (Zingiberaceae) CULTIVADA IN VITRO*. Obtenido de EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES ANTIOFÍDICAS

DEL EXTRACTO ETANÓLICO Y FRACCIONES OBTENIDAS DE  
*Renealmia alpinia* (Rottb) Mass (Zingiberaceae) CULTIVADA IN VITRO:

[http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0121-40042010000100010&script=sci\\_arttext&tlng=en](http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0121-40042010000100010&script=sci_arttext&tlng=en)

Flores, E. (2007). *ESTUDIO FARMAGNOSTICO Y FITOQUIMICO DEL RIZOMA*

*DE Zingiber officinale Roscoe "Jengibre" DE LA CIUDAD DE*

*CHANCHAMAYO-REGION JUNIN- PERÚ*. Obtenido de ESTUDIO

FARMAGNOSTICO Y FITOQUIMICO DEL RIZOMA DE *Zingiber*

*officinale Roscoe "Jengibre" DE LA CIUDAD DE CHANCHAMAYO-*

*REGION JUNIN- PERÚ*:

<http://dspace.unitru.edu.pe:8080/xmlui/bitstream/handle/UNITRU/4770/Enriquez%20Flores%20Andres%20Manuel%202007.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

d=y

Gualán Guamante, S. P. (2011). *Caracterización epidemiológica y clínica de los*

*pacientes que presentaron accidente ofídico, atendidos en el "Hospital Marco*

*Vinicio Iza" de la provincia de Sucumbios, Durante el periodo de enero a*

*diciembre del año 2010 ( tesis pre grado)*. Quito: Pontificia Univerisdad

Católica del Ecuador.

Gualán, P. (2011). *Caracterización epidemiológica y clínica de los pacientes que*

*presentaron accidente ofídico, atendidos en el hospital Marco Vinicio Iza de*

*a provincia de Sucumbios ( tesis pre grado)*. QUITO: Pontificia Univeridad

Catolica del Ecuador.

- Gutiérrez, J. (2011). Envenenamientos por mordeduras de serpientes en América Latina y el Caribe: Una visión integral de carácter regional. *BOLETÍN DE MALARIOLOGÍA Y SALUD AMBIENTAL*, 6-9.
- Gutiérrez, J. M., & Rojas, G. (1999). Ciencia y Tecnología Endógenas en la Solución de un Problema de Salud Pública en CENTROAMÉRICA. *Interciencia*, 182.
- Gutierrez, M. (Junio de 2011). *BIOFARBO*. Obtenido de Control de Calidad del *Xanthium spinosum*, planta medicinal expendida en la ciudad de La Paz, Bolivia: [http://www.revistasbolivianas.org.bo/scielo.php?pid=S1813-53632011000100003&script=sci\\_arttext&tlng=es](http://www.revistasbolivianas.org.bo/scielo.php?pid=S1813-53632011000100003&script=sci_arttext&tlng=es)
- Houghton, P. J., & Osibogun, I. M. (1993). Plantas utilizadas contra la mordedura de serpiente. *Diario de Etnofarmacología*, 1-29.
- Hurtado Zuluaga, O. A., Urán Arboleda, J. E., & Villa Arango, J. E. (2013). *Protocolo de Atención Prehospitalaria para el Manejo Integral del Accidente Ofídico Bothrópico en Colombia*. MEDELLÍN: UNIVERISDAD CES MEDELLÍN.
- Instituto Nacional de Salud. (2004). *Diagnóstico y tratamiento e los accidentes por animales ponzoñosos*. (J. Lévanno Saravia, & R. Fernández Vera, Editores) Recuperado el 14 de Agosto de 2016, de Diagnóstico y tratamiento e los accidentes por animales ponzoñosos.: <http://www.ins.gob.pe/insvirtual/images/otrpubs/pdf/ponzo%C3%B1osos.pdf>
- Jara Guazhco, C. L., Lozada Fajardo, S. L., & Peñaranda Banegas, J. M. (2014). *Conocimineto, Actitudes y prácticas Sobre la Mordedura de Ofidio*,

*PATUCA-MORONA SANTIAGO, 2014.* Cuenca: Universidad de Cuenca  
Facultad de Ciencias Médicas.

Jara, C., Lozada, F., & Peñaranda, J. (2014). *Conocimiento, Actitudes y Practicas Sobre la Mordedura de Ofidio. (Tesis Pre grado).* Cuenca: Universidad de Cuenca. Facultad de Ciencias Médicas.

Merino Castillo, J. P. (2010). *Estudio Economico de dos frmas de aprovechamiento forestal del pigue (pollalesta discolor) en el canton Mera, provincia de Pastaza.* Riobamba: Escuela Superir Politecnica de Chimbrazo.

Ministerio de salud pública. (2007). *Manual de Noras y Procedimientos Sobre Prevención y Tratamiento de Accidentes Ocasionados por Mordedura de Serpientes.* (G. R. Naranjo, Editor) Recuperado el 14 de Agosto de 2016, de Manual de Noras y Procedimientos Sobre Prevención y Tratamiento de Accidentes Ocasionados por Mordedura de Serpientes:  
<https://bibliotecapromocion.msp.gob.ec/greenstone/collect/promocin/index/asoc/HASH0116/d182eede.dir/doc.pdf>

Mota , J. (2008). *Accidente Ofidico en Venezuela.* Los Teques: Universidad Romulo Gallegos.

Natera, M., Almeida, F., & Perez , E. (2005). *REPORTES RECIENTES DE ACCIDENTES OFÍDICOS EN LA REGIÓN NOROCCIDENTAL DEL ESTADO gUÁRICO, VENEZUELA.* Obtenido de LAS SERPIENTES VENENOSAS DE CENTRAMÉRICA Y EL PROBLEMA DEL OFIDISMO:  
<http://erevistas.saber.ula.ve/index.php/herpetotropicos/article/viewFile/650/6>

- Otero, R., Tobón, G., Gómez, L., Osorio, R., & Valderrama, R. (1992). *Accidente ofídico en Antioquia y Chocó*. Obtenido de Acta médica colombiana:  
<http://www.actamedicacolombiana.com/anexo/articulos/04-1992-04-.pdf>
- Pasmíño-Otamendi. (23 de Abril de 2013). *ReptilaWebEcuador. Versión 2013.0. Museo de Zoología QCAZ. Pontificia Universidad Católica del Ecuador*. Recuperado el 14 de agosto de 2016, de ReptilaWebEcuador. Versión 2013.0. Museo de Zoología QCAZ. Pontificia Universidad Católica del Ecuador:  
<http://zoologia.puce.edu.ec/Vertebrados/reptiles/FichaEspecie.aspx?Id=1621>
- Peñañiel Cevallos, M. (2003). Flora y Vegetación de Cuicocha. En M. Peñañiel Cevallos, *Flora y Vegetación de Cuicocha* (pág. 36). Quito: Abya-Yala.
- Pereira, S., Vega, D., Almeida, M., & Morales, G. (30 de noviembre de 2009). *Revista Química Viva*. Obtenido de Tamizaje fitoquímico de los extractos alcohólico, etéreo y acuoso de las hojas de la *Trichilia hirta* L.:  
<http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar/v9n1/sanchez.pdf>
- Pirela, R., López, J., & Hernández, J. (2006). *Revista Científica, FCV-LU*. Obtenido de CARACTERIZACIÓN TOXINOLÓGICA DEL VENENO TOTAL DE LA SERPIENTE DE CASCABEL *Crotalus durissus cumanensis* (VIPERIDAE), PRESENTE EN LA LOCALIDAD DE PORSHOURE, GUAJIRA VENEZOLANA:  
<http://www.redalyc.org/html/959/95911641004/>
- Quesada Aguilera, J. A. (2012). Prevección y manejo de mordeduras por serpientes. *Revista Archivo medico de Camaguey*. Recuperado el 15 de 08 de 2016

- Reyes, R., & Jimenez, M. (1995). QUIMICA DE LAS PLANTAS ALEXITERAS. *INTERCIENCIA*, 257-263.
- Ricco, R., Agudelo, I., Garcés, M., Evelson, P., Wagner, M., & Gurni, A. (20 de abril de 2011). *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*. Obtenido de Polifenoles y actividad antioxidante en *Equisetum giganteum* L.:  
<http://www.revistas.usach.cl/ojs/index.php/blacpma/article/viewFile/267/263>
- Scanadaliaris, M., Fuentes, E., & Lovey, R. (2007). Dos especies de Lamiáceas comercializadas en Córdoba (Argentina) Bajo el nombre de "peperina". *Cátedra de Botánica Taxonómica. Herbario ACOR. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Córdoba. CC509. 5000. Córdoba. Argentina.*, 74-76.
- Secretaria de Salud del Estado de Veracruz. (2014). *Guía de diagnóstico y tratamiento de intoxicación por accidente ofídico bothrópico*. Recuperado el 15 de agosto de 2016, de Guía de diagnóstico y tratamiento de intoxicación por accidente ofídico bothrópico.
- Soto, J. P., & Lopez, J. A. (2009). Plantas Alexiteras: antídotos vegetales contra picaduras de serpientes venenosas. *Medicina Naturista*, 17-24.
- Torres et al., A. (2012). Actividad antiveneno de dos especies del género *Aristolochia* contra veneno bothrops diporu. *Revista de fitoterapia*, 123-124.
- Vargas, J. A. (2015). *Estudio etnobotánico de especies vegetales en las explotaciones agropecuarias del catón Santa Clara (Tesis de grado)*. Puyo: Universidad Estatal Amazónica .

Viduarre, M., Querevalú, L., De los Ríos, L., & Ruiz, S. (20 de octubre de 2007).

*Biblioteca Central 'Pedro Zulen'*. Obtenido de Características farmacognósticas de las hojas de *Capparis avicennifolia*:  
<http://200.62.146.19/BVRevistas/rmv/v04n2/pdf/a04v4n2.pdf>

Viglianco, N. (2007). Actividad repelente de diferentes extractos vegetales sobre *tribolium catanem*. *AGRISCIENTIA*, 31-36.

Villacreses, J. (14 de Enero de 2013). *SlideShare*. Obtenido de SlideShare:

<http://es.slideshare.net/juanjoreyesvillacreses/morfologia-y-biologia-de-las-serpientes-del-genero-bothrops>

Villamarín, J. (2009). *Accidente ofídico: Manifestaciones y complicaciones clínicas en pacientes atendidos en el hospital Jose Maria Velasco Ibarra, Tena agosto 2007-mayo 2009*. Riobamba: Escuela Superior Politécnica de Chimboazo Facultad de Salud Pública.

Villanueva, J. (Mayo de 2010). *Food Science and Technology (Campinas)*. Obtenido de Antocianinas, ácido ascórbico, polifenoles totales y actividad antioxidante, en la cáscara de camu-camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K) McVaugh):  
[http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0101-20612010000500023&script=sci\\_arttext&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0101-20612010000500023&script=sci_arttext&tlng=pt)

Yarlequé. (2012). Acción neutralizante de la toxicidad del veneno de *bpthrops atrox* por el extracto de plantas amazónicas. *Revista de la sociedad química del Perú*, 3-4.

Zhañay Andrade, M. (2012). *ESCUELA SUPERIOR DE CHIMBORAZO, FACULTAD DE CIENCIAS, ESCUELA BIOQUIMICA Y FARMACIA*.

Obtenido de ESCUELA SUPERIOR DE CHIMBORAZO, FACULTAD DE  
CIENCIAS, ESCUELA BIOQUIMICA Y FARMACIA:

<http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/2582/1/56T00350.pdf>

## ANEXOS

Anexo 1. Siembra extracto alcohólico



Fuente: El autor (2016)

Anexo 2. Siembra extracto n-heptano



Fuente: El autor (2016)

Anexo 3. Siembra extracto acuoso



Fuente: El autor (2016)

Anexo 4. Permisos ambientales

 **Ministerio del Ambiente**

 **GOBIERNO AUTÓNOMO DE LA PROVINCIA DE MORONA SANTIAGO**

**Memorando Nro. MAE-UPNMS-DPAMS-2016-1594**  
**Macas, 14 de octubre de 2016**

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

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

De mi consideración:

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

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

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

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

*Recibido  
Wilson Tapia  
040000281-9  
13-10-2016  
10:22 AM.*

**SECRETARÍA DEL MINISTERIO DEL AMBIENTE DE MORONA SANTIAGO**  
Calle 23 de Agosto s/n. Macas, Morona Santiago  
Móvil: 098 231 2300  
Teléfono: 098 231 2300  
www.mambiente.gub.ec

1/2



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

Macas, 14 de octubre de 2016

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

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

De mi consideración:

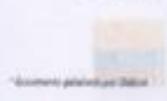
Mediante oficio s/n de fecha 08 de septiembre de 2016, firmado por el Sr. Q. F. Wilson Tapia H., Ms. DOCENTE INVESTIGADOR-UPS, ingresado a la Secretaría del Ministerio del Ambiente de Morona Santiago mediante documento Nro. MAE-DPAMS-2016-1438. Fecha: 2016-09-13 15:15:59 GMT -05. Recibido por: Evelyn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

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

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

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

Firma: Edison



DIRECCIÓN PROVINCIAL DEL AMBIENTE DE MORONA SANTIAGO  
Av. 20 de Mayo entre Alameda Coronel y Cda. Francisco Morúa  
Macas - Ecuador  
Código Postal: 140100  
Teléfono: (031) 7 270000 - 270000  
www.morona.gub.ec



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

**MACAS, 14 de octubre de 2016**

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

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

Con sentimientos de distinguida consideración

Atentamente,

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



Copia:

Sr. Dr. Luis Florencio Sacalabay Cuadros  
Responsable de Vida Silvestre - Unidad de Patrimonio Natural Morona Santiago

Sra. Ing. María Gabriela Ramírez Tiza  
Especialista Forestal Provincial



## AUTORIZACION DE INVESTIGACION CIENTIFICA

N° 08-16 -IC-FLO-B-DPAMS/MAE

FLORA (X)

FAUNA ( )

VARIOS ( )

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

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

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

### De acuerdo a las siguientes especificaciones

1. Solicitud mediante oficio s/n de fecha 08 de septiembre de 2016, firmado por Q.F. Wilson Tapia H., Ms DOCENTE INVESTIGADOR UPS, ingresado a la Secretaría del Ministerio del Ambiente de Morona Santiago mediante documento Nro. MAE-DPAMS-2016-1438. Fecha: 2016-09-13 15:15:59 GMT -05. Recibido por: Evelyn Alexandra Jaramillo Zumba; pone a consideración el proyecto de investigación para la aprobación y emisión de la autorización. Mediante oficio s/n se da el AVAL de la Ing. Diana Calero Consuegra, Directora de la Carrera de Ingeniería en Biotecnología y los Recursos Naturales de la Universidad Politécnica Salesiana de Quito para que el investigador con su equipo de trabajo puedan solicitar la correspondiente autorización.
2. Auspicio de Institución Científica Nacional: Herbario de la Pontificia Universidad Católica de Quito y la Universidad Politécnica Salesiana.
3. Auspicio de Institución Científica Internacional: ninguna.
4. Institución que financia la investigación: Universidad Politécnica Salesiana.

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

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

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

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

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

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

#### Obligaciones del investigador

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

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

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

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

Santiago, cantones:

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

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

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

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

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

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

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

21.- Materiales, equipo, reactivos y otros.

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

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



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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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



Ab Maucio Villavicencio O.

DIRECTOR DEL MINISTERIO DEL AMBIENTE DE MORONA SANTIAGO, ENCARGADO

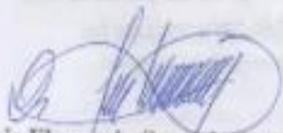
La falta de entrega de los resultados finales en los formatos indicados será causa suficiente para que el investigador no pueda  
continuar con las actividades de investigación en el país.

## SOLICITUD DE CRITERIO TÉCNICO

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

Hago llegar en físico el texto transferido desde Secretaría mediante oficio s/n de fecha 08 de septiembre de 2016, firmado por Q.F. Wilson Tapia H., Ms DÓCENTE INVESTIGADOR UPS, ingresado a la Secretaría del Ministerio del Ambiente de Morona Santiago mediante documento Nro. MAE-DPAMS-2016-1438. Fecha: 2016-09-13 15:15:59 GMT -05. Recibido por: Evelyn Alexandra Jaramillo Zumba; pone a consideración el proyecto de investigación para la aprobación y emisión de la autorización considerando que el estudio se dará en elementos de flora silvestre, para que emita si criterio técnico referente al impacto ambiental que que origine la propuesta y ratifique que las especies pertenecen a la flora silvestre.

Saludos Cordiales,



Luis Florencio Sucuzhañay Gualpa



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

**RESPUESTA: CRITERIO TECNICO**

SOLICITUD DE CRITERIO TÉCNICO

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

13 de  
Octubre  
2016  
15:19



De:

María Gabriela Ramirez Tixe

Para:

Luis Florencio Sucuzhañay Gualipa

Estimado compañero

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

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

\*María Gabriela Ramirez Tixe

RESPUESTA: CRITERIO TÉCNICO

## Anexo 5. Identificación Taxonómica



Pontificia Universidad Católica del Ecuador

HERBARIOS

Av. 12 de Octubre 1076 y Roca  
Avenida postal 1741-2001  
Edu. 1001 - T - 2001 - 507  
Tel: 593 - 2 - 299 1 - 734  
Quito - Ecuador

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

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

### *Tradescantia zanonii* (L.) Sw.

- Clase: Equisetopsida C. Agardh
- Subclase: Magnoliidae Novák ex Takht.
- Superorden: Liliales Takht.
- Orden: Commelinales Mirb. Ex Borch. & J. Presl
- Familia: Commelinaceae Mirb.
- Género: *Tradescantia* L.
- Especie: *zanonii* (L.) Sw.

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

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





Pontificia Universidad Católica del Ecuador

HERBARIO QCA

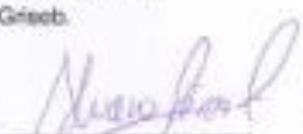
Av. 12 de Octubre 1076 y Bulev  
Avenida principal 17-01-2284  
Tels. 312 - 2 - 391 - 187  
Tel. 312 - 2 - 391 - 114  
Quito - Ecuador

***Capsicum cf. pubescens* Ruiz & Pav.**

- Clase: Equisetopsida C. Agardh
- Subclase: Magnolidae Novák ex Takht.
- Superorden: Asteranae Takht.
- Orden: Solanales Juss. ex Bercht. & J. Presl
- Familia: Solanaceae Juss.
- Género: *Capsicum* L.
- Especie: *pubescens* Ruiz & Pav.

***Minthostachys cf. mollis* (Kunth) Griseb.**

- Clase: Equisetopsida C. Agardh
- Subclase: Magnolidae Novák ex Takht.
- Superorden: Asteranae Takht.
- Orden: Lamiales Brongniart
- Familia: Lamiaceae Martinov
- Género: *Minthostachys* (Benth.) Spach
- Especie: *mollis* (Kunth) Griseb.

  
Ayoro J. Pérez Casañeda

Curador de Angiospermas Herbario QCA



## Anexo 6. Rendimiento de extractos vegetales

### Extracto n-heptano

	<b>Peso de la droga vegetal (g)</b>	<b>Peso balón vacío (g)</b>	<b>Peso balón con muestra vegetal (g)</b>	<b>Rendimiento %</b>
<i>Minthostachys cf. mollis</i>	25.0500	124.7773	124.8965	5.07
<i>Pollalesta discolor</i> (Corteza)	25.0023	64.3989	64.4338	3.30

Nota: Realizado por el autor (2016)

### Extracto alcohólico

	<b>Peso de la droga vegetal (g)</b>	<b>Peso balón vacío (g)</b>	<b>Peso balón con muestra vegetal (g)</b>	<b>Rendimiento %</b>
<i>Minthostachys cf. mollis</i>	24.7252	124.0343	125.3051	5.144
<i>Pollalesta discolor</i> (Corteza)	24.0056	64.9341	65.7600	3.44

Nota: Realizado por el autor (2016)

### Extracto acuoso

	<b>Peso de la droga vegetal (g)</b>	<b>Peso balón vacío (g)</b>	<b>Peso balón con muestra vegetal (g)</b>	<b>Rendimiento %</b>
<i>Minthostachys cf. mollis</i>	23.9494	140.7228	143.0333	9.65
<i>Pollalesta discolor</i> (Corteza)	22.6024	141.2076	141.2808	0.32

Nota: Realizado por el autor (2016)

## Anexo 7. Determinación de cenizas totales

Espece	Numero de repeticiones	Peso crisol (g)	Peso crisol tarado (g)	Muestra vegetal (g)	Peso crisol con muestra vegetal (g)	Peso crisol con muestra incinerada (g)	Cenizas totales (g)
<i>Mintho stachys cf. mollis</i>	1	22.6427	22.6397	2.0079	24.6476	22.841	10.02539967
	2	19.8314	19.8294	2.0319	21.8613	20.0553	11.11767311
	3	21.6775	21.6749	2.0249	23.6998	21.9214	12.17344066

Nota: Realizado por el autor (2016)

## Determinación de cenizas totales

Espece	Numero de repeticiones	Peso crisol (g)	Peso crisol tarado (g)	Muestra vegetal (g)	Peso crisol con muestra vegetal (g)	Peso crisol con muestra incinerada (g)	Cenizas totales (g)
<i>Pollalesta discolor</i> (Corteza)	1	20.8727	20.8705	2.0891	22.9596	20.9824	5.356373558
	2	19.4736	19.4718	2.0556	21.5274	19.6301	7.700914575
	3	22.5057	22.5035	2.0275	24.531	22.634	6.43649815

Nota: Realizado por el autor (2016)

Anexo 8. Determinación de cenizas solubles en agua

<b>Especie</b>	<b>Peso crisol</b>	<b>Peso crisol tarado</b>	<b>Peso crisol con muestra vegetal</b>	<b>Peso Cenizas filtradas</b>	<b>Incinerado final</b>	<b>Peso crisol muestra incinerada</b>	<b>% Cenizas solubles</b>
<i>Minthos tachys cf. mollis</i>	22.6427	22.6397	24.6476	22.8096	22.8056	22.841	1.763036008
	19.8314	19.8294	21.8613	20.0031	20.0019	20.0553	2.628082091
	21.6775	21.6749	23.6998	21.8508	21.8497	21.9214	3.540915601

Nota: Realizado por el autor (2016)

Determinación de cenizas solubles en agua

<b>Especie</b>	<b>Peso crisol</b>	<b>Peso crisol tarado</b>	<b>Peso crisol con muestra vegetal</b>	<b>Peso Cenizas filtradas</b>	<b>Incinerado final</b>	<b>Peso crisol muestra incinerada</b>	<b>% Cenizas solubles</b>
<i>Pollalesta discolor</i> (Corteza)	20.8727	20.8705	22.9596	20.8875	20.7858	20.9824	9.410751041
	19.4736	19.4718	21.5274	19.4925	19.4914	19.6301	6.747421677
	22.5057	22.5035	24.531	22.5252	22.5443	22.634	4.424167694

Nota: Realizado por el autor (2016)

Anexo 9. Determinación de cenizas insolubles en ácido clorhídrico

<b>Especie</b>	<b>Peso crisol tarado</b>	<b>Muestra vegetal</b>	<b>Peso crisol con muestra vegetal</b>	<b>Peso muestra incinerada</b>	<b>Peso ceniza filtrada</b>	<b>Incinerado final</b>	<b>% Cenizas insolubles</b>
<i>Minthostachys cf. mollis</i>	20.8737	2.0158	22.8895	20.8231	20.6016	20.6014	10.99811489
	20.5667	2.0091	22.5758	21.0462	20.8758	20.8757	8.486386939
	22.878	2.0791	24.9571	22.9224	22.8809	22.8804	2.020104853

Nota: Realizado por el autor (2016)

Determinación de cenizas insolubles en ácido clorhídrico

<b>Especie</b>	<b>Peso crisol tarado</b>	<b>Muestra vegetal</b>	<b>Peso crisol con muestra vegetal</b>	<b>Peso muestra incinerada</b>	<b>Peso ceniza filtrada</b>	<b>Incinerado final</b>	<b>% Cenizas insolubles</b>
<i>Pollalesta discolor</i> (Corteza)	22.9325	2.0229	24.9554	22.9871	22.937	22.9356	2.545850017
	23.4897	2.0008	25.4905	23.9946	23.9891	23.9185	3.803478609
	21.6813	2.0103	23.6916	21.7376	21.6858	21.6854	2.596627369

Nota: Realizado por el autor (2016)

Anexo 10. Determinación del contenido de humedad

<b>Especies</b>	<b>Peso de la muestra</b>	<b>% de humedad</b>
<i>Minthostachys cf. mollis</i>	2.003	10.24
<i>Pollalesta discolor</i> (Corteza)	2	8.2

Nota: Realizado por el autor (2016)

## Anexo 11. Formulas

### Fenoles

$$\frac{mg \text{ ácido galico}}{ml \text{ de extracto}} = \frac{ppm \text{ muestra} + b \times fd}{m} \times 100$$

### Flavonoides

$$\frac{mg \text{ catequina}}{ml \text{ de extracto}} = \frac{ppm \text{ muestra} + b}{m} \times fd$$

### Determinación de cenizas insolubles en ácido clorhídrico

$$B = \frac{M_2 - M}{M_1 - M} \times 100$$

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

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

M<sub>2</sub>= masa del crisol con la ceniza (g)

100= factor matemático.

### Determinación de cenizas solubles en agua

$$Ca = \frac{M_2 - Ma}{M_1 - M} \times 100$$

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

M<sub>2</sub> = masa del crisol con las cenizas totales (g).

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

M<sub>1</sub> = masa del crisol con la muestra de ensayo (g)

M = masa del crisol vacío.

100 = factor matemático.

### **Determinación de cenizas totales**

$$C = \frac{M_2 - M}{M_1 - M} \times 100$$

C = porcentaje de cenizas totales en base hidratada.

M = masa del crisol vacío (g)

M<sub>1</sub> = masa del crisol con la porción de ensayo (g)

M<sub>2</sub> = masa del crisol con la ceniza (g)

100 = factor matemático para los cálculos.

### **Rendimiento de extractos vegetales**

$$\% \text{de rendimiento} = \frac{\text{balón más extracto} - \text{balón vacío}}{\text{balón con extracto húmedo} - \text{balón vacío}} \times 100$$

Anexo 12. Absorbancia fenoles *Pollalesta discolor* (Corteza)

**FENOLES MUESTRAS VEGETALES EN ppm**  
**Longitud de onda 760nm**

MUESTRA	absorvancia	ppm (muestra)
1,1	0,1908	4,004
1,2	0,2053	4,287
1,3	0,1978	4,141
2,1	0,4809	9,670
2,2	0,5911	11,822
2,3	0,4979	10,002
3,1	0,4795	9,643
3,2	0,4838	9,727
3,3	0,5209	10,451
5,1	0,0524	1,301
5,2	0,1109	2,443
5,3	0,087	1,977
6,1	0,2944	6,027
6,2	0,263	5,414
6,3	0,2943	6,025
9,1	0,1333	2,881
9,2	0,0625	1,498
9,3	0,2423	5,010
12,1	0,0898	2,031
12,2	0,1108	2,441
12,3	0,0771	1,783
15,1	0,0294	0,852
15,2	0,0101	0,475
15,3	0,0443	1,143
16,1	0,0059	0,393
16,2	0,0202	0,672
16,3	0,0435	1,127
17,1	0,1101	2,428
17,2	0,1079	2,385
17,3	0,1455	3,119
18,1	0,4173	8,428
18,2	0,5519	11,057

Anexo 13. Absorbancia fenoles *Minthostachys cf. mollis*

Untitled

Sample name  
 Comment  
 User  
 Division  
 Company UPS-Giron  
  
 Creation date 23/02/2017 16:00  
 Last update 23/02/2017 16:05  
  
 Instrument name V-730  
 Model name V-730  
 Serial No. A068161798  
 ROM version 1.01.12  
  
 Accessory USE-753  
 Accessory S/N A068161798  
 Cell  
 Ref. beam  
  
 Photometric mode Abs  
 Bandwidth 1.0 nm  
 Response 0.96 sec  
 Wavelength-1 760.0 nm  
 Change source at 340 nm  
 Light source D2/WI  
 Dark correction Off

Mode	Sample Name	Comment	760.0 nm
Sample-1			0.0100
Sample-2	curarina 1 alc		0.5508
Sample-3	curarina 2 alc		0.5703
Sample-4	curarina 3 alc		0.5787

Anexo 14. Absorbancia flavonoides *Pollalesta discolor* (Corteza)

PIWE CORTEZA

Sample name  
 Comment  
 User  
 Division  
 Company UPS-Giron  
 Creation date 23/02/2017 14:21  
 Instrument name V-730  
 Model name V-730  
 Serial No. A068161798  
 ROM version 1.01.12  
 Accessory USE-753  
 Accessory S/N A068161798  
 Cell  
 Ref. beam  
 Photometric mode Abs  
 Bandwidth 1.0 nm  
 Response 0.96 sec  
 Wavelength-1 510.0 nm  
 Change source at 340 nm  
 Light source D2/WI  
 Dark correction Off

Mode	Sample Name	Comment	510.0 nm
Sample-1			-0.0000
Sample-2			0.1183
Sample-3			0.1183
Sample-4			0.1206

Anexo 15. Absorbancia flavonoides *Minthostachys cf. mollis*

**FLAVONOIDES MUESTRAS VEGETALES EN ppm**  
**Longitud de onda 510nm**

Muestra	Absorbancia	ppm(muestra)
2,1	0,1257	6,625
2,2	0,2052	9,173
2,3	0,1901	8,689
3,1	0,1169	6,343
3,2	0,3159	12,721
3,3	0,3195	12,837
5,1	0,0242	3,372
5,2	0,0228	3,327
5,3	0,0057	2,779
6,1	0,2516	10,660
6,2	0,3266	13,064
6,3	0,272	11,314
7,1	0,0584	4,468
7,2	0,0455	4,054
7,3	0,0813	5,202
8,1	0,047	4,103
8,2	0,104	5,929
8,3	0,0623	4,593
9,1	0,0254	3,410
9,2	0,0567	4,413
9,3	0,0363	3,760
10,1	0,0204	3,250
10,2	0,0302	3,564
10,3	0,0269	3,458
12,1	0,0297	3,548
12,2	0,0319	3,619
12,3	0,0342	3,692
14,1	-0,0011	2,561
14,2	0,0017	2,651
14,3	-0,0012	2,558
15,1	0,0198	3,231
15,2	0,0234	3,346
15,3	0,0298	3,551