



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

CARRERA BIOQUÍMICA Y FARMACIA

**DETERMINACIÓN DE LA INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD
ENZIMÁTICA DEL VENENO DE DOS ESPECIES DE
SERPIENTES (*Bothrops asper*, *Bothrocophias microphthalmus*) POR
Piptocoma discolor.**

Trabajo de Titulación

Tipo: Trabajo Experimental

Presentado para optar al grado académico de:

BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA

AUTORA:

JENNIFER GABRIELA CASTILLO MORA

Riobamba – Ecuador

2022



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

CARRERA BIOQUÍMICA Y FARMACIA

**DETERMINACIÓN DE LA INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD
ENZIMÁTICA DEL VENENO DE DOS ESPECIES DE
SERPIENTES (*Bothrops asper*, *Bothrocophias microphthalmus*) POR
*Piptocoma discolor***

Trabajo de Titulación

Tipo: Trabajo Experimental

Presentado para optar al grado académico de:

BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA

AUTORA: JENNIFER GABRIELA CASTILLO MORA

DIRECTOR: Bqf. DIEGO RENATO VINUEZA TAPIA, MSc.

Riobamba – Ecuador

2022

© 2022, Jennifer Gabriela Castillo Mora

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento, siempre y cuando se reconozca el Derecho de Autor.

Yo, Jennifer Gabriela Castillo Mora declaro que el presente Trabajo de Titulación es de mi autoría, y los resultados son genuinos, los textos en el documento u imágenes que proceden de otras fuentes, que se encuentran en el contexto están adecuadamente citados y referenciados.

Como autora asumo la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este Trabajo de Titulación; patrimonio intelectual pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Riobamba, 11 agosto de 2022



Jennifer Gabriela Castillo Mora

C.I. 060333865-8

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA BIOQUÍMICA Y FARMACIA

El Tribunal del Trabajo de Titulación certifica que: El Trabajo de Titulación; Tipo: Trabajo Experimental, **DETERMINACIÓN DE LA INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DEL VENENO DE DOS ESPECIES DE SERPIENTES (*Bothrops asper*, *Bothrocophias microphthalmus*) POR *Piptocoma discolor***, realizado por la señorita: **JENNIFER GABRIELA CASTILLO MORA**, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal del Trabajo de Titulación, el mismo que cumple con los requisitos científicos, técnicos, legales, en tal virtud el Tribunal Autoriza su presentación.

	FIRMA	FECHA
BQF. Gisela Alexandra Pilco Bonilla, MSc. PRESIDENTE DEL TRIBUNAL	 _____	2022-08-11
BQF. Diego Renato Vinuesa Tapia, MSc. DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN	 _____	2022-08-11
BQF. Karen Lisseth Acosta León, MSc. ASESORA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN	 _____	2022-08-11

DEDICATORIA

El presente trabajo deseo dedicar a mis padres Eduardo y Mercy quienes son mi fortaleza para seguir adelante, con su perseverancia inquebrantable y su apoyo emocional como económico, supieron guiarme en el transcurso de mi vida, gracias a su ejemplo pude trazarme metas que ahora las puedo materializar, y de manera muy especial quiero dedicar este trabajo a mis Hijos Mikeila y Dereck, son mi fortaleza para seguir adelante en la vida, a enseñarles que los sueños si son trabajados con fuerza y constancia se pueden conseguir o hacer realidad y a Darwin que con su amor, paciencia, comprensión me acompañaron en este duro y largo trayecto.

Gabriela

AGRADECIMIENTO

Agradezco en primer lugar a Dios, por ser mi guía en momentos de angustia, debilidad, ser mi soporte, ser mis ganas de seguir adelante, y nunca soltarme de la mano en todo mi camino de estudiante hasta lograr ser una profesional. A mis padres Eduardo Castillo y Mercy Mora por ser mi pilar, mi fortaleza en cada logro que he obtenido gracias por su apoyo incondicional y sus ejemplos a seguir. A mis hijos Mikeila y Dereck, a mi esposo Darwin por ser mi alegría y con su amor, paciencia, comprensión me acompañaron en este camino a ser una profesional. A mis maestros en toda la carrera por brindarme sus conocimientos y guiarme en el camino a ser una persona apasionada por nuestra carrera y no solo una profesional. Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a mi tutor de trabajo de titulación BQF. Diego Vinueza quién me ha guiado, apoyado como un amigo y no solo como mi docente en la realización este proyecto.

Gabriela

ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS.....	xi
ÍNDICE DE ILUSTRACIONES.....	xii
ÍNDICE DE ECUACIONES	xiv
ÍNDICE DE ANEXOS	xv
ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....	xvi
RESUMEN.....	xvii
SUMMARY	xviii
INTRODUCCIÓN	1

CAPÍTULO I

1. DIAGNOSTICO DEL PROBLEMA	2
1.1. Identificación del problema	2
1.2. Justificación del estudio	3
1.3. Objetivos.....	4
1.3.1. Objetivo general.....	4
1.3.2. Objetivos específicos.....	4

CAPÍTULO II

2. MARCO TEÓRICO.....	6
2.1. Ofidios.....	6
2.2. Solenoglifa	8
2.3. Toxina	8
2.4. <i>Bothrops asper</i>	9
2.5. <i>Bothrocophias microphthalmus</i>	11
2.6. Antídoto (suero antiofídico).....	12
2.7. Droga.....	13
2.8. Droga vegetal.....	13
2.9. Planta medicinal	13
2.10. Asteraceae.....	13
2.11. <i>Piptocoma discolor</i> (Asteraceae)	14
2.11.1. Clasificación taxonómica.....	14

2.11.2.	Nombres comunes	15
2.11.3.	Hábitat y distribución geográfica	15
2.11.4.	Descripción	15
2.11.5.	Usos	15
2.12.	Inhibición enzimática	15
2.13.	Enzimas	16

CAPÍTULO III

3.	MARCO METODOLÓGICO	17
3.1.	Tipo y diseño de investigación	17
3.2.	Factores de investigación	17
3.3.1.	Población de estudio	17
3.3.2.	Muestra	17
3.3.3.	Selección de la muestra	17
3.3.3.1.	Criterios de inclusión	17
3.3.3.2.	Criterios de exclusión	18
3.4.	Localización del estudio	18
3.5.	Recolección de la materia vegetal	18
3.6.	Identificación botánica	19
3.7.	Equipos, materiales y reactivos	19
3.7.1.	Reactivos	19
3.7.2.	Materiales	20
3.7.3.	Equipos	21
3.8.	Técnicas y métodos	21
3.8.1.	Acondicionamiento de la planta u materia vegetal	22
3.8.1.1.	Determinación de humedad	22
3.8.1.2.	Determinación de cenizas totales.....	22
3.8.1.3.	Determinación de cenizas solubles en agua	23
3.8.1.4.	Determinación de cenizas insolubles en ácido clorhídrico	24
3.8.2.	Tamizaje fitoquímico	24
3.8.2.1.	Diferentes ensayos utilizados en el tamizaje fitoquímico	25
3.9.	Cuantificación de compuestos fenólicos del extracto de Piptocoma discolor	28
3.10.	Cuantificación de flavonoides	28
3.11.	Evaluación de la actividad inhibitoria	29
3.11.1.	Actividad de la fosfolipasa A₂	29

3.11.2.	Actividad de la hialuronidasa	29
3.11.3.	Actividad caseinolítica.....	30
3.11.4.	Actividad coagulante	30
3.11.5.	Determinación de proteínas	30
3.11.6.	Determinación de proteínas en el suero antiofídico.....	31

CAPÍTULO IV

4.	MARCO DE ANÁLISIS Y DISCUSIÓN	32
4.1.	Control de calidad de la materia vegetal	32
4.2.	Tamizaje fitoquímico.....	32
4.3.	Cuantificación de compuestos fenólicos del extracto de <i>Piptocoma discolor</i>	34
4.4.	Cuantificación de flavonoides del extracto de <i>Piptocoma discolor</i>	34
4.5.	Evaluación de la actividad inhibitoria	35
4.5.1.	Actividad de la fosfolipasa (A ₂)	35
4.5.2.	Actividad de la hialuronidasa	38
4.5.3.	Actividad caseinolítica.....	40
4.5.4.	Actividad coagulante	42
4.5.5.	Determinación de proteínas	44
4.5.6.	Determinación de proteínas presentes en el suero antiofídico.....	45
4.6.	Análisis estadístico.....	45
4.6.1.	Análisis descriptivo de los grupos	45
4.6.1.1.	Actividad de la fosfolipasa A ₂	47
4.6.1.2.	Actividad de la hialuronidasa	48
4.6.1.3.	Actividad caseinolítica	49
4.6.1.4.	Actividad coagulante	50
4.6.2.	Análisis comparativo entre grupos.....	51

CAPÍTULO V

5.	CONCLUSIONE Y RECOMENDACIONES.....	59
5.1.	Conclusiones.....	59
5.2.	Recomendaciones.....	60

GLOSARIO
BIBLIOGRAFÍA
ANEXOS

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2-1:	Clasificación de la dentadura y posición de los colmillos de las serpientes	7
Tabla 2-2:	Acción del veneno del género Bothrops	9
Tabla 2-3:	Clasificación de los sueros antiofídicos	12
Tabla 2-4:	Clasificación taxonómica del Piptocoma Discolor	14
Tabla 4-1:	Resultados de los análisis de calidad de la Corteza de Piptocoma discolor.....	32
Tabla 4-2:	Resultados de la obtención de metabolitos presentes en la corteza del árbol Piptocoma discolor.....	33
Tabla 4-3:	Cuantificación de compuestos fenólicos del extracto de Piptocoma discolor	34
Tabla 4-4:	Cuantificación de flavonoides del extracto de Piptocoma discolor	34
Tabla 4-5:	Actividad de la enzima Fosfolipasa A ₂ presente en las toxinas de las serpientes B. Asper y B. Microphthalmus	35
Tabla 4-6:	Inhibición de la Fosfolipasa A ₂ presente en las toxinas de B. Asper y B. Microphthalmus con el suero antiofídico y el extracto de Piptocoma discolor ...	36
Tabla 4-7:	Inhibición de la actividad de la hialuronidasa presente en las toxinas de B. Asper y B. Microphthalmus con el suero antiofídico y el extracto de Piptocoma discolor	38
Tabla 4-8:	Inhibición de la actividad caseinolítica presente en las toxinas de B. Asper y B. Microphthalmus con el suero antiofídico y el extracto de Piptocoma discolor ...	41
Tabla 4-9:	Actividad coagulante de las toxinas de B. asper y B. microphthalmus	42
Tabla 4-10:	Inhibición de la actividad coagulante.....	43
Tabla 4-11:	Determinación de proteínas en las toxinas de B. asper y B. microphthalmus	44
Tabla 4-12:	Determinación de proteínas presentes en el suero antiofídico	45
Tabla 4-13:	Análisis descriptivo de los grupos	46
Tabla 4-14:	Inhibición de la Fosfolipasa A ₂ presente en toxinas	47
Tabla 4-15:	Inhibición de la actividad de la hialuronidasa presente en las toxinas.....	48
Tabla 4-16:	Inhibición de la actividad caseinolítica presente en las toxinas	49
Tabla 4-17:	Inhibición de la actividad coagulante presente en las toxinas.....	50
Tabla 4-18:	Resumen de los valores p.....	53

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración 2-1:	Bothrops asper.....	10
Ilustración 2-2:	Distribución geográfica de la B. asper.....	10
Ilustración 2-3:	Bothrocophias microphthalmus.....	11
Ilustración 2-4:	Distribución geográfica de B. microphthalmus.....	12
Ilustración 2-5:	Sueros antiofídicos	13
Ilustración 2-6:	Piptocoma discolor	14
Ilustración 3-1:	Laboratorio del grupo de investigación GIPRONAF.....	18
Ilustración 4-1:	Actividad FLA ₂ sobre las toxinas de B. Asper y B. Microphthalmus	36
Ilustración 4-2:	Inhibición de la FLA ₂ presente en las toxinas de B. Asper y B. Microphthalmus con el suero antiofídico	37
Ilustración 4-3:	Inhibición de la FLA ₂ presente en las toxinas de B. Asper y B. Microphthalmus con el extracto de Piptocoma discolor.....	37
Ilustración 4-4:	Porcentaje de inhibición de la hialuronidasa presente en las toxinas de B. Asper	39
Ilustración 4-5:	Porcentaje de inhibición de la hialuronidasa presente en las toxinas de B. Microphthalmus.....	40
Ilustración 4-6:	Inhibición de la actividad caseinolítica presente en la toxina de B. Asper...	41
Ilustración 4-7:	Inhibición de la actividad caseinolítica presente en la toxina de B. Microphthalmus.....	42
Ilustración 4-8:	Inhibición de la actividad coagulante de las toxinas B. asper y B. microphthalmus	44
Ilustración 4-9:	Veneno-Suero antiofídico.....	54
Ilustración 4-10:	Actividad de la Fosfolipasa A ₂	54
Ilustración 4-11:	Inhibición de la Fosfolipasa A ₂ en Toxinas con Suero Antiofídico	55
Ilustración 4-12:	Inhibición de la fosfolipasa A ₂ presente en toxinas con Extracto Piwi.....	55
Ilustración 4-13:	Inhibición de la actividad de la hialuronidasa presente en las toxinas con Suero Antiofídico.....	56
Ilustración 4-14:	Inhibición de la actividad de la hialuronidasa presente en las toxinas con Extracto Piwi	56
Ilustración 4-15:	Inhibición de la actividad caseinolítica presente en las toxinas con Suero Antiofídico.....	57
Ilustración 4-16:	Inhibición de la actividad caseinolítica presente en las toxinas con Extracto Piwi.....	57

Ilustración 4-17: Inhibición de la actividad coagulante presente en las toxinas con Suero Antiofídico	58
Ilustración 4-18: Inhibición de la actividad coagulante presente en las toxinas con Extracto Piwi	58

ÍNDICE DE ECUACIONES

Ecuación 3-1:	Determinación de humedad.....	22
Ecuación 3-2:	Determinación de cenizas totales	23
Ecuación 3-3:	Determinación de cenizas solubles en agua	23
Ecuación 3-4:	Determinación de cenizas insolubles en ácido clorhídrico	24
Ecuación 3-5:	Actividad de la hialuronidasa	29
Ecuación 3-6:	Actividad caseinolítica	30
Ecuación 4-1:	Varianzas.....	52
Ecuación 4-2:	Igualdad de varianzas: Test de Fisher	52
Ecuación 4-3:	La diferencia de varianzas es igual a cero.....	52
Ecuación 4-4:	Comparación de medias: Test T de Student.....	53

ÍNDICE DE ANEXOS

- ANEXO A:** RECOLECCIÓN DE LA MATERIA PRIMA VEGETAL PIWI
- ANEXO B:** CONTROL DE CALIDAD DE LA CORTEZA SECA DE PIPTOCOMA DISCOLOR
- ANEXO C:** TAMIZAJE FITOQUÍMICO
- ANEXO D:** EXTRACCIÓN DEL EXTRACTO DE LA CORTEZA DE PIPTOCOMA DISCOLOR.
- ANEXO E:** RECOLECCIÓN DE LAS TOXINAS DE B. ASPER Y B. MICROPHTHALMUS
- ANEXO F:** LIOFILIZACIÓN DE LAS TOXINAS DE B. ASPER Y B. MICROPHTHALMUS
- ANEXO G:** DETERMINACIÓN DE LA INHIBICIÓN ENZIMÁTICA DE LAS TOXINAS
- ANEXO H:** CURVA DE CALIBRACIÓN DEL REACTIVO DE FOLIN-CIOCALTEU
- ANEXO I:** CURVA DE CALIBRACIÓN DE LA QUERCETINA
- ANEXO J:** AUTORIZACIÓN DE MOVILIZACIÓN DE ESPECÍMENES DE FLORA Y FAUNA SILVESTRE
- ANEXO K:** IDENTIFICÓ: CERTIFICADO DE IDENTIFICACIÓN DE PIPTOCOMA DISCOLOR

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

NaCl :	Cloruro de sodio
ATC:	Ácido tricloro acético
BCTA:	Bromuro cetil trimetil amonio
AA:	Ácido araquidónico
OPS:	Organización Panamericana de la Salud
OMS:	Organización Mundial de la Salud
MSP:	Ministerio de salud pública
EAG:	Equivalentes de ácido gálico
EQ:	Equivalente de quercetina
µL:	Micro Litro
Ppm:	Partes por millón
°C:	Grados Celsius
FLA₂ :	Fosfolipasa
pH:	Potencial Hidrogeno
s:	Segundo
Abs:	Absorbancia
dl:	decilitro
M:	mol
mL:	Mililitro
mg:	Miligramos
mM:	Milimolar
min:=	Minuto
m:	Metros
cm:	Centímetros
g:	Gramos
L:	Litros
Kg:	Kilogramos

RESUMEN

La investigación buscó determinar la capacidad inhibitoria del extracto de Piwi (*Piptocoma discolor*) en la actividad enzimática del veneno de las serpientes *Bothrops asper* y *Bothrocophias microphthalmus*. Para simular las condiciones del cuerpo humano, se utilizaron concentraciones de 10 mg de las toxinas liofilizadas disueltas en un buffer de potasio fosfato monobásico y potasio fosfato dibásico. Se midió la actividad de la hialuronidasa utilizando el sustrato ácido hialurónico, resolviendo la turbidez con el bromuro de cetil-trimetil amonio. Para determinar la fosfolipasa, se midió el tiempo de coagulación con una emulsión lipoproteica de yema de huevo con Tris-HCl y cloruro de calcio. La actividad caseinolítica se midió utilizando caseína y se midió la absorbancia después de precipitarla con ácido tricloroacético. La actividad coagulante se midió utilizando fibrinógeno, y se incubó antes de medir el tiempo de coagulación. Además, se cuantificaron las proteínas presentes en las toxinas utilizando los métodos de Lowry y Folin-Ciocalteu. Los resultados mostraron que el extracto seco de la corteza de *Piptocoma discolor* tuvo una mayor capacidad inhibitoria sobre la actividad enzimática del veneno de ambas serpientes, en comparación con el suero antiofídico. En particular, se observó una mayor inhibición de la hialuronidasa y la caseinolítica en las toxinas de ambas especies, el extracto también tuvo un efecto inhibitorio sobre la actividad coagulante, lo que permitió frenar el tiempo de coagulación. Sin embargo, se encontró una discrepancia en la inhibición de la fosfolipasa A2, ya que esta enzima fue más inhibida en presencia del suero antiofídico. En conclusión, el extracto de *Piptocoma discolor* tuvo un efecto similar al suero antiofídico en la actividad caseinolítica, hialuronidasa y coagulante. Se recomienda realizar más investigaciones sobre el árbol *Piptocoma discolor* para evaluar su capacidad inhibidora en las enzimas presentes en las toxinas de las diferentes familias de serpientes venenosas del país.

Palabras claves: <PIWI (*Piptocoma discolor*)>, <VENENO>, <ACTIVIDAD ENZIMÁTICA>, <INHIBICIÓN>, <EXTRACTO SECO DE CORTEZA>, <SUERO ANTIFÍDICO>.



05-02-2023

0243-DBRA-UPT-2024

SUMMARY

The research pretended to determine the inhibitory capacity of Piwi extract (*Piptocoma discolor*) on the enzymatic activity of the poison of *Bothrops asper* and *Bothrocophias microphthalmus* snakes. To simulate human body conditions, 10 mg concentrations of the lyophilized toxins dissolved in monobasic potassium phosphate and dibasic potassium phosphate buffer were used. Hyaluronidase activity was measured using the substrate hyaluronic acid resolving turbidity with cetyl trimethyl ammonium bromide. To determine phospholipase, clotting time was measured with an egg yolk lipoprotein emulsion with Tris-HCl and calcium chloride. Caseinolytic activity was measured using casein, and absorbance was measured after precipitation with trichloroacetic acid. Coagulant activity was measured using fibrinogen, and it was incubated before clotting time was measured. In addition, proteins present in the toxins were quantified using the Lowry and Folin-Ciocalteu methods. The results showed that the dried extract of *Piptocoma discolor peel* had a higher inhibitory capacity on the enzymatic activity comparing the poison of both snakes. This is compared to the antiphidic serum. In particular, greater inhibition of hyaluronidase and caseinolytic was observed in the toxins of both species. The extract also had an inhibitory effect on the coagulant activity, which allowed slowing down the coagulation time. However, a discrepancy was found in the inhibition of phospholipase A2 as this enzyme was more inhibited in the presence of the antiphidic serum. In conclusion, *Piptocoma discolor peel* extract had a similar effect to antiophidic serum on caseinolytic, hyaluronidase, and coagulant activity. Further research on *Piptocoma discolor tree* is recommended to evaluate its inhibitory capacity on the enzymes present in the toxins of different families of the snakes' poison in the country.

Keywords: <PIWI (*Piptocoma discolor*)>, <POISON>, <ENZYMATIC ACTIVITY>, <INHIBITION>, <DRY PEEL EXTRACT>, <ANTIPHYDIC SERUM>.



Ing. Romel Francisco Calles Jiménez
0603877713

5-02-2023
0243-DBRA-UPT-2024

INTRODUCCIÓN

La OMS estableció que los accidentes con serpientes (ofidios) constituyen un problema de salud mundial debido a que no existen una atención primaria para los accidentes ofídicos, el 09 de junio del 2017 elaboraron un manual sobre las estrategias de control y reducción sobre la problemática, el cual permitió llegar a un consenso para determinar que los antídotos, suero-antiofídico (anti veneno) figuren en la lista de los medicamentos esenciales en las instituciones de salud donde hay zonas geográficas de serpientes (Mohapatra et al., 2011, pág.6).

El Ecuador cuenta con el Ministerio de Salud Pública que ha creado un “Manual de normas y procedimientos sobre prevención y tratamiento de accidentes ocasionados por mordedura de serpientes” son normas de manejo ya establecidas para obtener resultados óptimos para reducir la morbi-mortalidad a causa de las mordeduras de serpientes. En el año 2010, el Instituto Nacional de Salud Vigilancia y Control en Salud Pública creó un “Protocolo de vigilancia de accidente ofídico”, asimismo, en el año 2017 el Ministerio de Salud Pública (MSP) creó el protocolo “Manejo clínico del envenenamiento por mordeduras de serpientes venenosas y picaduras de escorpiones”, con este manual es muy fácil encontrar información vital sobre las especies de serpientes más venenosas en el Ecuador, su tratamiento y manejo para tratar este tipo de casos, este manual es una guía de actuar e identificar las serpientes para realizar nuestro estudio (Evelyn y Brussel, 2011, pág.6).

Existen varios estudios realizados por diferentes científicos con el objetivo de encontrar nuevos métodos y ensayos para inhibir la actividad enzimática del veneno de serpientes. Estos estudios utilizaron el método de Lowry, el método espectrofotométrico y el método Folin-Ciocalteus. Los resultados de estas investigaciones fueron publicados en la revista de artículos académicos de Scielo Perú, Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública, y fueron realizados por investigadores de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, el Instituto Nacional de Salud de Lima y el Centro Nacional de Productos Biológicos. En estos estudios, se destacó la capacidad de inhibir la actividad enzimática del veneno de las serpientes (Mendoza et al., 2008, pág.3).

CAPÍTULO I

1. DIAGNOSTICO DEL PROBLEMA

1.1. Identificación del problema

Las complicaciones por mordedura de serpientes u accidentes ofídicos son cada vez más frecuentes, el 09 de junio del 2017 la Organización Mundial de la Salud (OMS) las consideró como un problema de salud pública a nivel mundial, esto permite efectuar estrategias de control y reducción de la problemática en países tropicales y subtropicales (Mohapatra, 2011, pág.8).

En el Ecuador los accidentes por mordeduras de serpientes son un problema de salud pública, en algunas comunidades de la región amazónica de la región litoral; por no existir un tratamiento adecuado y oportuno, por lo que puede llegar a ocasionar invalidez o hasta la muerte de una persona (Valarezo, 2017, pág.3).

Ecuador es un país multi diverso por sus características climáticas, ecológicas y geográficas, estas condiciones le permiten tener ambientes idóneos para que se desarrollen las diferentes especies de serpientes venenosas y mortales para el ser humano, ya que algunas de estas especies como la familia Viperidae (*bothrops spp*) han ido desarrollando la habilidad de adaptación, por esta razón es indispensable realizar estudios pertinentes sobre los venenos de las serpientes (Michael Crhistopher Osorio, 2016, pág.5).

Existen 240 especies de serpientes en el Ecuador de ellas 36 (15%) son consideradas las más peligrosas y venenosas para el ser humano. A partir de ello, entre los años 2015 a 2019 se realizó un estudio estadístico sobre los accidentes ofídicos por mordeduras de serpientes, reportándose 5052 accidentes. De acuerdo al estudio, las provincias con mayor incidencia son Guayas, Manabí, Los Ríos y Morona Santiago (Ministerio de Salud Pública del Ecuador, 2017, pág.2).

Un problema importante son los casos no reportados ya sea por falta de conocimiento o la lejanía de algún centro de salud para ser atendidos, las personas más afectadas con estos accidentes son las comunidades nativas (Chachi, SÁCHILA, Shuar, Ashuar, Cofán, Huaorani), agricultores, mineros y algunos turistas (Valarezo, 2017, pág.9).

Por otro lado, para acceder a un suero antiofídico (antídoto) es muy difícil debido a su alto costo y la falta de información de las personas como del ministerio de salud al dar a conocer la manera

de obtener el antídoto de manera particular y no solo en un subcentro de salud (Mohapatra, 2011, pág.8).

Los venenos de las serpientes están compuestos por hemorraginas, neurotoxinas, nefrotoxinas, aminas biogénicas y enzimas como la hialuronidasa, fosfolipasa-A2, L-aminoácido oxidasas que participan en la difusión de la toxina por todo el organismo produciendo efectos miotóxicos, edemáticos y alteración en la agregación plaquetaria (Iván et al., 2013, pág.2).

Las cifras obtenidas bibliográficamente indican que este tipo de accidentes constituyen un problema de salud pública en el país, por lo que se considera importante buscar una alternativa que inhibe enzimáticamente los venenos de las serpientes *Bothrops asper*, *Bothrocophias microphthalmus* por *Piptocoma discolor*, como un método alternativo para reducir este índice de morbi-mortalidad (Ministerio de Salud Pública del Ecuador y Gobierno de la República del Ecuador, 2017, pág.8).

Respecto, a la planta *Piptocoma discolor* (*Asteraceae*) conocida como piwi, palo negro, gallinazo, era utilizado por los shamanes en el tratamiento etnobotánico como antimicrobiano, anti fúngico, antigripal, antidiarreico, la parte más utilizada es la corteza triturada y en infusión para tratar mordeduras de serpientes de la familia *Bothrops* (García, 2016, pág.2). La familia *Asteraceae* del piwi (*Piptocoma discolor*) presenta varios metabolitos como sesquiterpenos, lactonas que llegan presentan una alta actividad citotóxica, los colonos de la región amazónica utilizan en casos de emergencia por mordeduras de serpientes una bebida de la corteza de piwi (García. 2016, pág.12).

1.2. Justificación del estudio

Ecuador es un país mega diverso en flora y fauna sus especies vegetales poseen propiedades únicas medicinales de acuerdo a su ubicación geográfica y variedad climática, por tal motivo la mayoría de plantas han sido utilizadas para tratar múltiples patologías por nuestros ancestros a base de remedios caseros, por lo que, es importante realizar estudios sobre las plantas de uso ancestral (Renato, 2015, pág.5).

Se ha demostrado que el uso de plantas medicinales favorece a las personas con sus propiedades medicinales, sobre todo aquellas afectadas por los diferentes animales venenosos y letales que existen en el Ecuador. Las plantas medicinales que encontramos en el país son únicas por contener diferentes metabolitos, propiedades medicinales, que han sido utilizadas por ancestros y nativos de la región amazónica que se encuentran mucho más en contacto con la naturaleza, por tener un

conocimiento inmenso pasado de generación en generación sobre cómo utilizar las plantas, su cantidad y por cuanto tiempo (Osorio, 2016, pág.23).

La planta del PIWI o *Piptocoma discolor* presenta varios metabolitos como sesquiterpenos, lactonas con su alta actividad citotóxica. Debido a ello, la corteza del árbol de piwi es utilizada como una bebida en casos de emergencia, para contrarrestar los efectos de la mordedura de las serpientes (García, 2016, pág.41).

Esta investigación tiene como resultado verificar el efecto inhibitorio de la actividad enzimática del veneno de las serpientes, planteándose como objetivo central la contribución a la productividad del país para desarrollar un método alternativo al elaborar un suero antiofídico en base a los saberes ancestrales y etnobotánicos, que permita mejorar la calidad de vida de las personas (Valarezo, 2017, pág.6).

Este trabajo es viable debido a la disponibilidad de los laboratorios de análisis instrumental y el laboratorio de productos naturales de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, los cuales permitirán determinar la capacidad inhibitoria del extracto hidroalcohólico de *Piptocoma discolor* en la actividad enzimática del veneno de serpientes.

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo general

Determinar el porcentaje de concentración inhibitoria de la actividad enzimática sobre el veneno de dos especies de serpientes por el extracto de *Piptocoma discolor*.

1.3.2. Objetivos específicos

- Ejecutar un control de calidad inicial de la materia prima vegetal de *Piptocoma discolor* a ser empleada en el estudio.
- Determinar cuantitativamente la cantidad de fenoles y flavonoides presentes en el extracto hidroalcohólico de *Piptocoma discolor* por métodos espectrofotométricos.
- Determinar la concentración de extracto hidroalcohólico de *Piptocoma discolor* con mayor actividad inhibitoria del veneno de las serpientes (*Bothrops asper*, *Bothrocophias microphthalmus*) mediante el método espectrofotométrico.

- Comprobar cuantitativamente el porcentaje de proteínas del veneno de dos especies de serpientes (*Bothrops asper*, *Bothrocophias microphthalmus*) a través del método Folin-Ciocalteu y el método de Lowry.

CAPÍTULO II

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Ofidios

Los ofidios o serpientes son parte de los reptiles estos tienen su cuerpo recubierto de escamas, pero estas se caracterizan por carecer de patas, son alargadas para desplazarse a gusto por tierra y agua, su piel es brillante se halla cubierta por escamas las cuales periódicamente mudan su piel de manera completa, su esqueleto les brinda flexibilidad necesaria para moverse tienen una lengua bífida o dividida, todas las especies de serpientes son carnívoras su alimentación se basa en aves, lagartijas y roedores (BioEnciclopedia, 2015, pág.6).

Son excelentes depredadoras emplean diferentes estrategias para compensar su falta de extremidades, poseen habilidades como trepar árboles, ramas estirando y contorneando su cuerpo, el tamaño oscila entre los 10 milímetros hasta 10 metros. Las serpientes no tienen párpados se encuentran cubiertas de escamas transparentes como anteojos, cuando los ojos se nublan están ciegas temporalmente, poseen fosetas loreales que son pequeñas cavidades que resguardan a los receptores infrarrojos que le permiten detectar a otros animales a una distancia de 40 cm y en la oscuridad. Tienen un esqueleto muy flexible la columna vertebral contiene 200-400 vertebras unidas al mismo número de costillas, su cráneo al igual que su mandíbula pueden llegar a dislocarse y facilitar el paso de las presas más grandes sin causar daño alguno (Evelyn y Brussel, 2011, pág.22).

Las serpientes están formadas de huesos fuertes y ligeros los que le permiten proteger los órganos internos como son los pulmones, hígado, riñones e intestinos largos, poseen una garganta muy larga que ocupara la tercera parte del cuerpo, su estómago y garganta son largos que expande mientras engulle o come a sus presas, en su mayoría las serpientes u ofidios poseen 6 filas de dientes que se dividen entre su mandíbula y su maxilar, su abertura anal es pequeña con una escama que la cubre y se denomina placa anal, el resto es la cola que se encuentra formada de más huesos (BioEnciclopedia, 2015, pág.6).

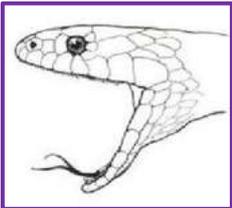
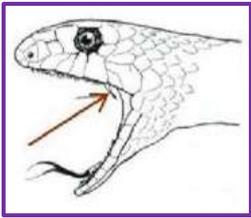
Existen 250 especies de serpientes en el Ecuador de ellas 35 (16%) las que son etiquetadas como las más peligrosas y venenosas para el ser humano, las provincias de nuestro país Ecuador con mayor incidencia de serpientes y por ellos accidentes por ofidios son Manabí, Morona Santiago, Guayas y Los Ríos (Ministerio de Salud Pública del Ecuador, 2017, pág.9).

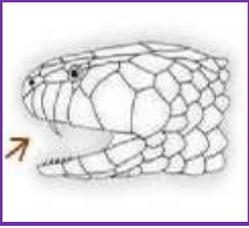
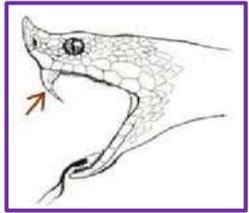
Las serpientes pueden dividirse en venenosas y constrictoras para cazar, matar a sus presas. Las boas, anacondas, pitones son serpientes que se caracterizan por matar mediante constricción sus presas terminan muriendo por asfixia, en cambio otro grupo de serpientes son venenosas estas matan a sus presas inmovilizándolas por inoculación del veneno a través de los dientes (BioEnciclopedia, 2015, pág.87).

Las serpientes tienen una evidente característica que diferencian colmillos esto se clasifican en: serpientes sin dientes o anodontes, serpientes con dientes sólidos de igual tamaño o aglifodontes y serpientes con dientes inoculadores o glifodontes de esta clase se subdivide en solenoglifa dentadura de las víboras, proteroglifas dentadura de la serpiente coral y opistoglifa dentadura de las culebras (Evelyn y Brussel, 2011, pág.6).

Para la producción de veneno las serpientes, tienen un compartimiento en la cabeza al que se lo conoce como aparato venenoso, está formado de glándulas, conductos, músculos, tendones y dentadura, este aparato les permite a los ofidios inocular el veneno a su presa/víctima. (Campbell y Lamar, 2004, pág.6)

Tabla 2-1: Clasificación de la dentadura y posición de los colmillos de las serpientes

ILUSTRACIÓN	SERIES DENTARIAS	CARACTERÍSTICA DEL VENENO	ESPECIE
	<p>AGLIFA No posee colmillos capaces de inyectar veneno</p>	<p>No posee veneno</p>	<p>Falsa coral</p>
	<p>OPISTOGLIFA Sus colmillos son acanalados, finos y se encuentran en la parte de atrás del maxilar</p>	<p>su veneno tiene baja toxicidad</p>	<p>culebras</p>

	<p>PROTEROGLIFA</p> <p>Sus colmillos son acanalados, fijos y se encuentran al frente del maxilar</p>	<p>el veneno es altamente peligroso</p>	<p>Corales</p>
	<p>SOLENOGLIFA</p> <p>Sus colmillos son inoculadores, móviles, huecos se encuentran en la parte delantera del maxilar</p>	<p>El veneno es altamente peligroso</p>	<p>Bothrops</p>

Fuente: (Evelyn and Brussel, 2011).

Realizado por: Castillo, Gabriela, 2022.

2.2. Solenoglifa

La dentadura de la familia *Viperidae* (*Bothrops spp*) han ido evolucionando con el paso del tiempo, por ellos solo poseen un par de colmillos en el maxilar superior su tamaño puede alcanzar a medir la mitad de su cráneo; estos se asemejan a una aguja hipodérmica. Los colmillos de las serpientes *bothrops spp* son retraibles lo que quiere decir que se pueden desplegar de la parte superior de la cavidad bucal, los colmillos pueden rotar hasta 180 grados atacar a su presa (Pérez, 2012, pág.3).

2.3. Toxina

El veneno de los ofidios está constituido por una serie de enzimas proteolíticas, hialuronidasa, fosfolipasa A₂ (PLA₂), metaloproteínas, péptidos, enzimas de tipo trombina, L aminoácido oxidasa, proteasas fibrinogenolíticas, hemorraginas, neurotoxinas, nefrotoxinas, arginina éster hidrolasa, fosfodiesterasa, aminos biogénicas, acetilcolinesterasa, cardiotoxinas estas llegan afectar órganos, aparatos y sistemas provocando daños en tejidos, músculos, musculo esqueléticos, variaciones en la coagulación sanguínea, afectando especialmente el sistema nerviosos central (Sánchez, 2015, pág.7).

Las serpientes del género *Bothrops spp* en su veneno contienen diferentes proteínas como hemorraginas, neurotoxinas, nefrotoxinas, aminas biogénicas y enzimas como la hialuronidasa, fosfolipasa-A2, L-aminoácido oxidasa que participan en la difusión de la toxina u veneno por todo el organismo produciendo efectos miotóxicos, edemáticos y alteración en la agregación plaquetaria llega a interactuar con el sistema hemostático y la matriz extracelular (Sánchez, 2015, pág.4).

Tabla 2-2: Acción del veneno del género *Bothrops*

ACCIÓN DEL VENENO	SÍNTOMAS INICIALES (0-3 HORAS)	SÍNTOMAS TARDÍOS (> 6 HORAS)
PROTEOLÍTICA	Shock, dolor intenso con hinchazón localizada, adenopatías,	Mionecrosis ampollas, abscesos, necrosis local, liponecrosis
VASCULOTÓXICA (Hemorraginas)	-----	Hemorragia en varios órganos localizados como pulmones, cerebro, riñones
COAGULANTE (Fibrinógeno Fibrina)	Sangre sin poder coagularse, hemorragias locales como en las encías, nariz, ojos y sangre en la orina	Hemorragias cerebrales, insuficiencia renal aguda, coagulación intravascular

Fuente:(Nina-Cueva. 2020).

Realizado por: Castillo, Gabriela, 2022.

2.4. *Bothrops asper*

Este ofidio es carnívoro, su dieta se basa en lagartijas, roedores, anfibios y aves que llega a atrapar, son parte de la familia *viperidae* conocidas también como víboras, esta especie es considerada venenosa, sus colores pueden ser muy brillantes en su juventud, poseen dimorfismo sexual lo que quiere decir que ambos sexos nacen de igual tamaño, pero las hembras desarrollan mucho más que los machos pueden llegar a tener 40 crías al año, este tipo de especies poseen 2 pares de fosetas loreales lo que le permiten encontrar a sus presas en la oscuridad, el color del vientre de estos ofidios puede ser amarillo, gris o café rojizo, sus ojos poseen un color café con manchas amarillentas (Amaru, 2019, pág.3)



Ilustración 2-1: *Bothrops asper*

Fuente:(Amaru Bioparque Cuenca, 2019).

Esta serpiente también conocida como Terciopelo, barba amarilla, equis, cuatro narices o rabo fino por los nativos de la región amazónica, tiene su cráneo muy bien diferenciado de forma triangular, se encuentran habitualmente en los bosques húmedos se identifican por ser nocturnas, a estas serpientes se les localiza entre la hojarasca de los árboles y entre sus raíces, por ello las personas las llegan pisan o tocar de manera accidental. Su distribución geográfica en el Ecuador se encuentra en la región occidental (Ministerio de Salud Pública del Ecuador y Gobierno de la República del Ecuador, 2017, pág.8).

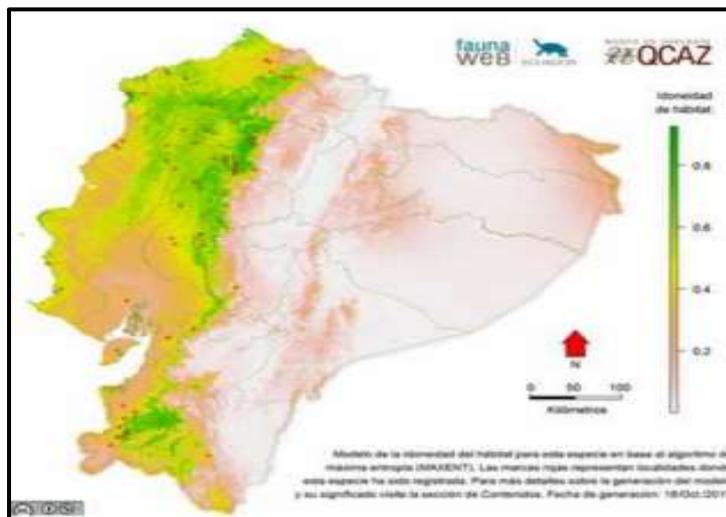


Ilustración 2-2: Distribución geográfica de la *B. asper*

Fuente: (MSP y Gobierno de la República del Ecuador, 2017a).

2.5. *Bothrocophias microphthalmus*

Esta serpiente es carnívora su dieta se basa en lagartijas, roedores, anfibios y aves que llega a atrapar, son parte de la familia *Viperidae* conocidas también como víboras, esta especie es considerada una víbora venenosa, las hembras son más grandes que los machos pueden llegar a tener de 35-47 crías al año, su tiempo de vida es de 6 años, este tipo de especies poseen fosetas loreales lo que le permiten encontrar a sus presas en la oscuridad, el color del cuerpo de estas víboras son café rojizo, grisáceo u café anaranjado, poseen bandas opuestas en pares 12-18 como una V invertida, su cabeza posee colores oscuros, grisáceos u café rojizo en su parte inferior, el color de su vientre es negro con manchas grises pálidas, el nombre de esta víbora proviene del griego mikros significa “pequeño” y ophthalmus significa “ojo” que es serpiente de ojos pequeños (AMARU, 2018, pág.4).



Ilustración 2-3: *Bothrocophias microphthalmus*

Fuente:(Amaru Bioparque Cuenca, 2019).

Esta serpiente también conocida como Hoja podrida, ojos pequeños, cabeza de sapo por los nativos de la región amazónica, tiene su cráneo muy bien diferenciado en la porción anterior del hocico es elevada su mandíbula es flexible capas de dislocarse sin causar daño alguno, se encuentran habitualmente en los bosques húmedo se identifican por ser nocturnas, a estas serpientes se les localiza entre la hojarasca de los árboles y entre la hojas en proceso de descomposición por ello difícil de encontrarles debido al color de sus escamas es un excelente camuflaje en consecuencia ellos las personas las llegan a tener accidentes ofídicos de manera accidental. Su distribución geográfica en el Ecuador se encuentra en varias regiones la región amazónica con sus provincias Zamora Chinchipe, Pastaza, Morona-Santiago y la provincia de Tungurahua que pertenece a la región sierra (Ministerio de Salud Pública del Ecuador y Gobierno de la República del Ecuador, 2017, pág.6).

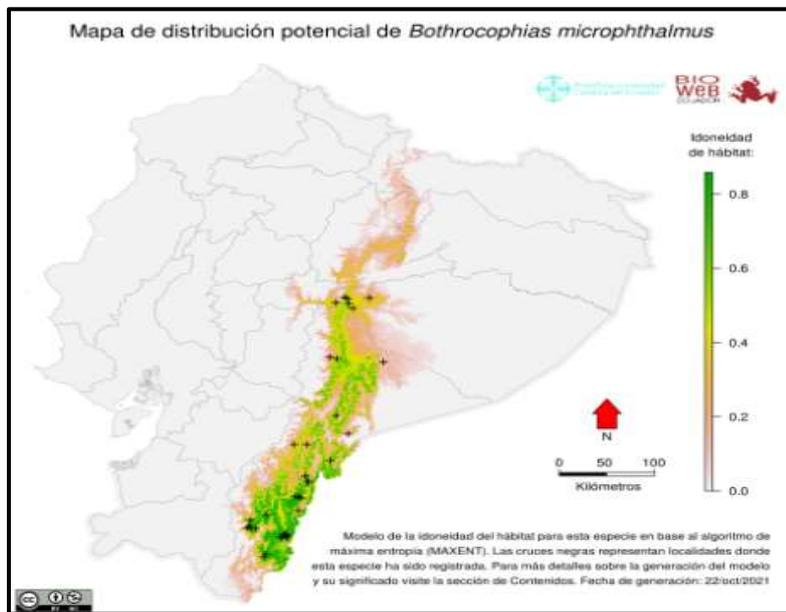


Ilustración 2-4: Distribución geográfica de *B. microphthalmus*

Fuente: (Ministerio de Salud Pública del Ecuador y Gobierno de la República del Ecuador, 2017).

2.6. Antídoto (suero antiofídico)

El suero antiofídico es una solución estéril, obtenida de los equinos por medio de la inoculación de veneno de las serpientes, este suero llega a neutralizar las toxinas del veneno pero no puede remediar las lesiones causadas por la toxina (Ministerio de Salud Pública del Ecuador 2008, págs. 24-25). Este suero antiofídico polivalente se debe aplicar en un lapso de 24 horas del accidente ofídico, las afectaciones u lesiones que pueden causar estas toxinas son náuseas, vómito, visión borrosa, pérdida del conocimiento, prurito, rash, llegando a causar reacción anafiláctica con riesgo de muerte o amputación de los miembros afectados, su administración e inoculación se realiza por vía intravenosa (IV) (Ministerio de Salud Pública del Ecuador y Gobierno de la República del Ecuador, 2017, pág.6).

Tabla 2-3: Clasificación de los sueros antiofídicos

SUERO ANTIOFÍDICO	ESPECIE
Suero antiofídico trivalente antibothrópico, antilachésico y anticrotálico	Generos <i>bothrops, lachesis y cotalus</i>
Suero antilachésico monovalente	Género <i>Lachesis</i> .
Suero antiofídico antibothrópico	Género <i>Bothrops</i> .
Suero anticoral o antimicrúrico	Género <i>Micrurus y Leptomicrurus</i> .

Suero antiofídico polivalente

Género *Bothrops* y *Micrurus*.

Fuente: (Ministerio de Salud Pública del Ecuador y Gobierno de la República del Ecuador, 2017).

Realizado por: Castillo, Gabriela, 2022.



Ilustración 2-5: Sueros antiofídicos

Realizado por: Castillo, Gabriela, 2022.

2.7. Droga

Es todo principio activo de origen animal o vegetal que actúa de manera directa o indirecta sobre el organismo, aprovecha esta materia prima el farmacéutico o bioquímico farmacéutico para la fabricación de nuevos medicamentos (Díaz Paico, 2018. págs.10-30) (Benítez Cruz, 2021).

2.8. Droga vegetal

Es toda la planta o sus partes, esta tiene que estar totalmente seca posterior se le tritura hasta llegar a pulverizarlas, depende de las características y sustancias biológicas (principio activo) con alguna actividad terapéutica de beneficio (Vanaclocha et al. 2003, págs. 2-17).

2.9. Planta medicinal

Son las plantas que tienen alguna actividad terapéutica o alguna sustancia activa, pueden sanar o aliviar alguna enfermedad o dolencia de organismo, por ello la OMS (Organización mundial de la Salud) ha permitido u autorizado el uso de medicamentos naturales o conocida como fitoterapia (Gallegos Zurita. 2016, pág. 237).

2.10. Asteraceae

La familia Asteraceae proviene de la familia *Aster* y del griego *ἀστήρ* o estrella que nos indica el diseño de las flores que caracteriza por el nombre de compuestas antiguamente y la familia de las

Angiospermas. La mayoría de las plantas que pertenecen a esta familia son de uso medicinal tras diversas investigaciones (Stevens, 2001, pág.8).

2.11. Piptocoma discolor (*Asteraceae*)

Es un árbol de crecimiento rápido esta especie no se encuentra en peligro de extinción, crecen en bosques secundarios, se lo utiliza en medicina como antimicrobiano, antifúngico, antigripal, antitusígeno, dolores abdominal, hemorragias, antidiarreico para los productores de Napo este árbol es utilizado para la fabricación de cajas en el transporte de frutas (Erazo et al. 2014, págs. 1-6).



Ilustración 2-6: *Piptocoma discolor*

Realizado por: Castillo, Gabriela, 2022.

2.11.1. Clasificación taxonómica

Tabla 2-4: Clasificación taxonómica del *Piptocoma Discolor*

TAXONOMÍA

REINO	Plantae
PHYLUM	Magnoliophyta
CLASE	Magnoliopsida
ORDEN	Asterales
FAMILIA	Asteraceae
GÉNERO	Piptocoma
EPÍTETO ESPECÍFICO	discolor

Fuente:(Campos Felipe y Arroyo Frank 2019).

Realizado por: Castillo, Gabriela, 2022.

2.11.2. Nombres comunes

Piwi, Palo Negro, Gallinazo, Piwe, cenizo, Pigüe.

2.11.3. Hábitat y distribución geográfica

Este tipo de especie vegetal se encuentra localizada y distribuida mayormente en la provincia de Pastaza en los cantones Mera, Santa Clara, Puyo y Pastaza, es una planta que no se encuentra en peligro de extinción crece en bosques húmedos y terrenos bajos con alturas de 300-1300 m su distribución es muy extensa y en varios países como Brasil, Colombia, Costa rica, Ecuador, Perú y Panamá crecen como mala hierba o como bosque secundario (Erazo et al. 2014, pág. 1-6).

2.11.4. Descripción

Es un árbol de madera blanda, crecimiento rápido de diámetro puede medir 60 cm y una altura de 30m su tallo es cilíndrico y grueso sus ramificaciones siempre crecen sobre el tercio inferior del árbol, posee raíces gruesas, alargadas tiene hojas simples, elípticas, ovaladas de 12-16 cm de largo y 4-6 cm de ancho presenta un ápice acuminado con base decurrente, la corteza es de color negro con fisuras sus flores o inflorescencias son panículas de cabezuela terminales, su cáliz presenta sépalos de color verde, la corola de color blanco las semillas son de color pardo y de forma elíptica. Crece en suelos arcillosos, en bosques secundarios tempranos y arcillosos de la amazonia crecen en las partes claras de los bosques gracias a la dispersión de semillas con ayuda de pájaros y animales que conviven en estos bosques (Stevens, 2001, pág.76).

2.11.5. Usos

El Piwi o *Piptocoma discolor* en la región amazónica del Ecuador permite a sus habitantes generar ingresos económicos ya que este árbol sirve para la fabricación y elaboración de cajas frutales para el transporte de diferente frutas, vegetales y hortalizas para su posterior comercialización. Antiguamente esta planta era utilizada por las personas nativas de la zona como los curanderos o shamanes como antimicrobiano, antifúngico, antigripal, antidiarreico, la parte más utilizada es la corteza triturada para tratar mordeduras de serpientes de la familia Bothrops (García et al., 2016, pág.8).

2.12. Inhibición enzimática

Con la ayuda de varios inhibidores que nos permiten inhibir la acción de las enzimas sin transformarse por los inhibidores, los estudios realizados a las enzimas son de mucho beneficio para llegar a entender sus mecanismos de catálisis, especificidad y su actividad. La inhibición se puede diferenciar pues puede ser irreversible como reversible en la inhibición reversible se subdivide en competitiva, a competitiva y no competitiva (Vizuete, 2010, pág. 1-18).

2.13. Enzimas

Son moléculas de proteína que catalizan las reacciones químicas en las células, las enzimas tienen la capacidad de aumentar la velocidad de las reacciones químicas son muy específicas ya que permiten la transformación de una sola sustancia y no permite la transformación de otras sustancias en la reacción. Las enzimas nunca están solas, trabajan en sucesiones conocidas como rutas metabólicas, estas poseen la capacidad para regular su actividad enzimática (Vizuete, 2010, pág. 1-18).

CAPÍTULO III

3. MARCO METODOLÓGICO

3.1. Tipo y diseño de investigación

La investigación realizada fue de tipo correlacional y se utilizó un diseño experimental. Se llevó a cabo la determinación de la inhibición de la actividad enzimática del veneno de las dos especies de serpientes (*Bothrops asper*, *Bothrops microphthalmus*) por medio del extracto hidroalcohólico de *Piptocoma discolor* utilizando métodos analíticos que permitieron expresar los resultados de manera cuantitativa. La elección de este tipo de investigación se justificó debido a que permitió establecer relaciones entre las variables y obtener conclusiones acerca de la capacidad inhibitoria del extracto de *Piptocoma discolor* en la actividad enzimática del veneno de las serpientes. Además, el diseño experimental permitió controlar las variables y establecer una relación causa-efecto entre la exposición al extracto y la inhibición de la actividad enzimática del veneno.

3.2. Factores de investigación

3.3.1. Población de estudio

La población de estudio fue la corteza del árbol de PIWI.

3.3.2. Muestra

La recolección del material vegetal se llevó a cabo en la ciudad de Tena del Cantón Archidona en la provincia del Napo, mediante un muestreo aleatorio simple que permitió obtener aproximadamente 900g de muestra.

3.3.3. Selección de la muestra

Para la recolección del material vegetal se tuvieron en cuenta los siguientes criterios:

3.3.3.1. Criterios de inclusión

- Especie vegetal seleccionada con buenas características físicas, es decir, sin imperfecciones como nudos.

3.3.3.2. Criterios de exclusión

- Especie vegetal con algún daño por la acción de insectos o animales, ejemplares de la corteza que presentan algún deterioro por el agua o por el hombre.
- La corteza del árbol que se encuentra en proceso de descomposición o contaminación microbiológica.

3.4. Localización del estudio

El trabajo de titulación y los ensayos respectivos se llevaron a cabo en los Laboratorios del grupo de investigación GIPRONAF de la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

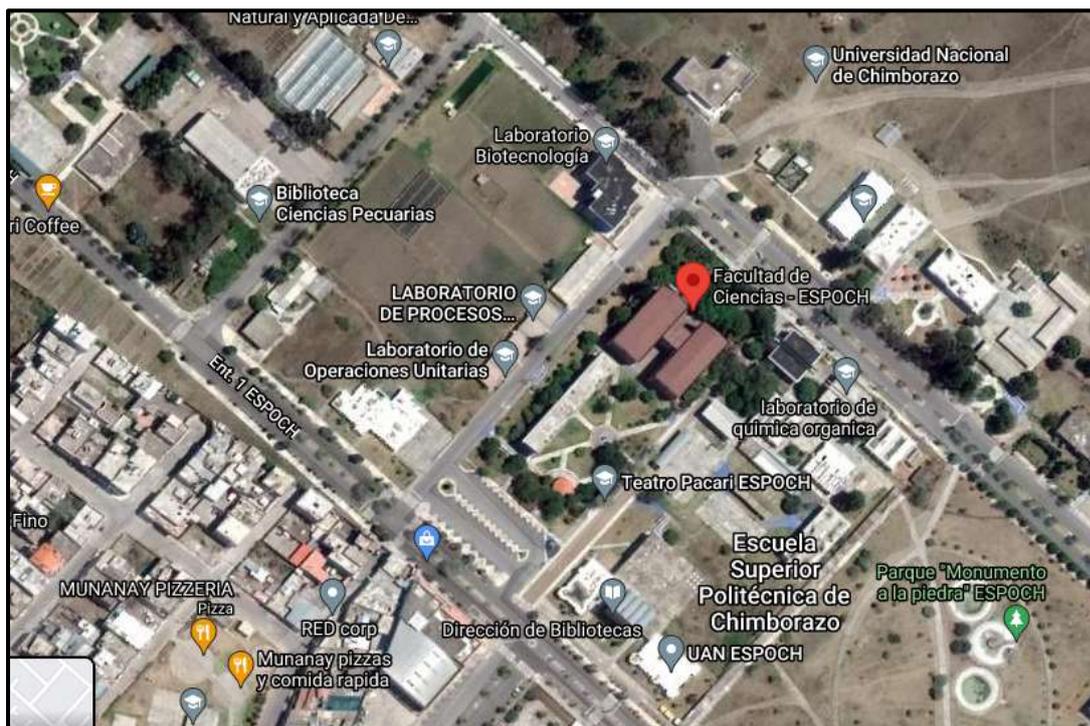


Ilustración 3-1: Laboratorio del grupo de investigación GIPRONAF

Realizado por: Castillo, Gabriela, 2022.

3.5. Recolección de la materia vegetal

La recolección de la corteza del árbol de Piwi (*Piptocoma discolor*) se realizó en la ciudad de Tena del Cantón Archidona en la provincia del Napo; alrededor de las 11h00 en el mes de Noviembre del año 2021.

La planta que se utilizó en el estudio fue recolectada con la ayuda de un botánico experto de la región oriental del país. Se obtuvieron los permisos correspondientes solicitados dentro del contrato Marco de Acceso a los Recursos Genéticos del programa de investigación científica denominado "Estudio de la Biodiversidad en el Ecuador, Ecología, conservación y su potencial uso sostenible".

3.6. Identificación botánica

En la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo se llevó a cabo la identificación taxonómica de la corteza del árbol de Piwi por el Ing. Jorge Caranqui, quien se desempeñó como responsable botánico de la investigación.

3.7. Equipos, materiales y reactivos

3.7.1. Reactivos

- Toxina de *Bothrops asper* y *Bothrocophias microphthalmus* liofilizado
- Suero antifúngico
- Tris-HCl
- Cloruro de Calcio
- Emulsión lipoproteica de la yema de huevo
- Ácido hialurónico
- Acetato de sodio
- Ácido acético glacial
- Bromuro cetil trimetil amonio
- Caseína
- Solución de tricloruro férrico al 5% en solución salina
- Solución al 2% de ninhidrina en agua
- Cinta de magnesio metálico
- Alcohol amílico
- Hielo
- Fibrinógeno

- Ácido clorhídrico al 10%
- Agua destilada
- Ácido nítrico
- Solución de nitrato de amonio
- Peróxido de hidrógeno concentrado
- Solución diluida de colorante de Sudan
- Ácido clorhídrico al 1%
- Reactivo de Dragendorff
- Cloruro de sodio en polvo 22
- Reactivo de Mayer
- Reactivo de Wagner
- Alcohol
- Reactivo de Baljet
- Cloroformo
- Hidróxido de sodio
- Anhídrido acético
- Ácido sulfúrico concentrado
- Solución de carbonato de sodio
- Reactivo de Fehling
- Éter dietílico • Etanol 96%
- Ácido tricloro acético al 5%

3.7.2. Materiales

- Mascarilla
- Guantes
- Termo de acero inoxidable
- Couler-hielera
- Papel aluminio
- Vasos de precipitación
- Pinzas para cápsula de porcelana
- Balones esmerilados de 1000 mL
- Balones de aforo de 10 mL, 25 mL y 100 mL
- Tubos de vidrio de 10 mL
- Cápsulas de porcelana

- Embudo
- Trípode
- Puntas de pipeta Thermo Scientific™
- Gradilla
- Espátula
- Probeta de 25 mL y 100 mL
- Frascos color ámbar
- Papel filtro
- Reverbero.

3.7.3. Equipos

- Refrigerador General Electric®
- Congelador General Electric®
- pH-metro
- Pipetas Thermo Scientific
- Balanza de precisión HDM
- Liofilizador
- Mufla
- Estufa Memmert SNB400
- Rotavapor Heidolph®
- Sorbona
- Mezclador de vórtice
- Cámara UV
- Termo agitador magnético Thermo Scientific™
- Centrífuga
- Espectrofotómetro.
- Termómetro
- Estufa de convección natural RedLine by Binder
- Molino de cuchillas Arthur H. Thomas C.O
- Desecadora
- Balanza analítica

3.8. Técnicas y métodos

3.8.1. Acondicionamiento de la planta u materia vegetal

El proceso se inició realizando una limpieza de la planta, en este caso la corteza del árbol de Piwi (*Piptocoma discolor*), con el fin de eliminar posibles impurezas. Luego se procedió a secarla en la estufa a una temperatura de 40°C durante 48 horas. Posteriormente, se trituró la corteza seca hasta alcanzar un tamaño de 2-3 mm, utilizando un molino industrial. El material vegetal se guardó y conservó en fundas herméticas.

3.8.1.1. Determinación de humedad

- Se colocaron 2g de muestra en una cápsula de porcelana previamente tarada a 105 °C.
- La muestra se secó por 3 horas a 105 °C con el fin de eliminar el agua presente.
- Luego de la secado, la cápsula se trasladó al desecador hasta que enfrió a temperatura ambiente.
- Se realizó el pesado de la cápsula con la muestra.
- La cápsula con la muestra se volvió a colocar en la estufa por 1 hora para completar el proceso de secado.
- Finalmente, se realizó un último pesado de la cápsula con la muestra hasta obtener un peso constante (Miranda, 2006, págs.31-32).

Se efectuó por el método gravimétrico

$$\% \text{Humedad} = \frac{M_2 - M_1}{M_2 - M} \times 100$$

Ecuación 3-1: Determinación de humedad

Dónde:

%H= Porcentaje de pérdida de humedad

M₂= peso de cápsula con la muestra.

M₁= Peso de la cápsula con la muestra desecada

M= Masa de la cápsula tarada vacía.

3.8.1.2. Determinación de cenizas totales

- Se colocaron 2g de muestra en el crisol previamente tarado a 105°C.

- Se carbonizó la muestra hasta la eliminación de la porción orgánica.
- Las cenizas se colocaron en la mufla a una temperatura de 600°C durante 2 horas.
- Una vez obtenido el polvo blanco de la incineración, se enfrió en un desecador.
- Se pesó la muestra hasta obtener un valor constante (Miranda, 2006, págs.31-32).

Se efectuó por el método gravimétrico

$$\% \text{Cenizas} = \frac{M_2 - M_1}{M_2 - M} \times 100$$

Ecuación 3-2: Determinación de cenizas totales

Dónde:

%C= Porcentaje de cenizas

M₂= peso del crisol y la ceniza.

M₁= Peso del crisol y la muestra.

M= Peso del crisol vacío.

3.8.1.3. Determinación de cenizas solubles en agua

- Se añadieron 15 mL de agua a las cenizas totales y se tapó con un vidrio reloj.
- Se calentó la muestra con la ayuda del mechero por 5 minutos.
- Se filtró la solución con papel filtro.
- Las cenizas del papel filtro se colocaron en un crisol previamente tarado.
- Se carbonizaron e incineraron las cenizas en la mufla a 600°C por 2 horas.
- El crisol se enfrió en el desecador.
- Se pesó el crisol hasta obtener un peso constante (Miranda, 2006, pág.33).

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

Ecuación 3-3: Determinación de cenizas solubles en agua

Dónde:

Ca= Porcentaje de cenizas solubles en agua

M₂= Peso de la cápsula con las cenizas totales

M₁= Peso de la cápsula con las cenizas insolubles

M= Peso de la cápsula vacía

3.8.1.4. *Determinación de cenizas insolubles en ácido clorhídrico*

- Se añadieron 3 mL de ácido clorhídrico al 10% a las cenizas solubles en agua y se tapó con un vidrio reloj.
- Luego, se calentó a baño maría por 10 minutos.
- Se lavó el vidrio reloj y se recolectó en el crisol el contenido.
- Se filtró la solución con el papel filtro.
- Se lavó el residuo con agua caliente hasta que no tuviera presencia de cloruros.
- Se secó el residuo a 105°C en la estufa.
- Se colocó el residuo seco en un crisol e incineró a 600°C por 2 horas.
- Se situó el crisol en el desecador y se esperó hasta que esté frío.
- Se pesó el crisol hasta obtener un valor constante. (Miranda, 2006, págs. 33-34).

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

Ecuación 3-4: Determinación de cenizas insolubles en ácido clorhídrico

Dónde:

B= Porcentaje de cenizas solubles en ácido clorhídrico.

M₁= Peso de la cápsula de porcelana con la muestra

M= Peso de la cápsula de porcelana vacía.

M₂= Peso de la cápsula con las cenizas solubles en ácido clorhídrico.

3.8.2. *Tamizaje fitoquímico*

Se llevó a cabo la maceración de la planta triturada en una disolución 1:3, consistente en 50g de la planta en 150mL de Éter etílico. Después de realizar todos los ensayos para este extracto etéreo, se dejó secar. La muestra seca del extracto etéreo se colocó en alcohol de 70° y se dejó macerar por 48 horas. Se realizaron los ensayos correspondientes a este extracto alcohólico y se dejó secar para utilizar la muestra en la siguiente disolución 1:3 con agua destilada, en la que se realizaron los ensayos correspondientes para el extracto acuoso.

3.8.2.1. Diferentes ensayos utilizados en el tamizaje fitoquímico

- Ensayo de Sudan

El ensayo de Sudan se utilizó para determinar la existencia de compuestos grasos en la muestra. Para ello, se tomaron 5 mL del extracto y se agregó 1 mL de reactivo sudan III o IV. Luego, se calentó la mezcla a baño maría hasta que los solventes se evaporaron. Para reportar los resultados, se observó si aparecían gotas rojas o una película roja en el líquido o en las paredes del tubo de ensayo (Miranda, 2006, págs. 40-45).

- Ensayo de Dragendorff

El ensayo de Dragendorff se utilizó para determinar la existencia de alcaloides. Se tomó 2 mL del extracto y se calentó para evaporar el solvente. El residuo resultante fue redisolto en 1 mL de ácido clorhídrico al 1%. Luego se agregó una gota de ácido clorhídrico concentrado, se calentó y se dejó enfriar. Posteriormente, se agregaron 3 gotas del reactivo de Dragendorff a la solución acuosa ácida. Se observó y se consideró una opalescencia (+), una turbidez (++) o una precipitación (+++) (Miranda, 2006, págs. 40-45).

- Ensayo de Mayer

El método fue realizado para determinar la presencia de alcaloides en la muestra. Para ello, se llevaron a cabo los pasos del ensayo anterior hasta obtener una solución ácida. Luego, se agregó una pequeña cantidad de partículas de cloruro de sodio, se agitó y filtró. Posteriormente, se colocaron 3 gotas de reactivo Mayer y se observó la muestra para determinar si había señal de opalescencia (+), turbidez (++) o precipitación (+++) (Miranda, 2006, págs. 40-45).

- Ensayo de Wagner

Este ensayo se utilizó para determinar la presencia de alcaloides en la muestra. Se colocaron 2 a 3 gotas del reactivo sobre la muestra y se aplicó el mismo procedimiento que en el ensayo anterior. Los resultados se reportaron según la opalescencia (+), turbidez (++) y precipitación (+++) (Miranda, 2006, págs. 40-45).

- Ensayo de Baljet

Se determinó la presencia de compuestos cumarínicos del grupo lactónico mediante la siguiente técnica: se evaporó el extracto no alcohólico por baño maría y se redisolvió en 1 mL de alcohol. Luego, se agregó 1 mL de reactivo y se observó la aparición de coloración roja o precipitado para reportar positivo (++) y (+++) (Miranda, 2006, págs. 40-45).

- Ensayo de Borntrager

Se determinó la existencia de quinonas en el extracto mediante el siguiente procedimiento: se colocó 1 mL del extracto y se calentó a baño maría, se añadió 1 mL de cloroformo para re disolver, y se agregó 1 mL de hidróxido de sodio al 5%. Luego se mezcló y se dejó reposar hasta la disociación de las fases. Se reportó como positivo cuando la fase acuosa adquirió un color rosado (++) o rojo (+++) (Miranda, 2006, págs. 40-45).

- Ensayo de Hidroxamato férrico para coumarinas

Se colocó 1 gota del extracto en la cápsula y se añadió 1 gota de clorhidrato de hidroxilamina en etanol al 10%. Posteriormente, se agregaron unas gotas de hidróxido de potasio al 10% en etanol y se calentó a la llama hasta que se produjo burbujeo. Luego, se añadieron unas gotas de ácido clorhídrico 0.5 mol/L y una gota de cloruro férrico al 1% en agua. El ensayo es positivo si se presenta una coloración violeta (+), claro (++) , o intenso (+++) (Miranda, 2006, págs. 40-45).

- Ensayo de Liebermann-Burchard

Para la identificación de compuestos triterpenos y esteroides, se tomó 2 mL del extracto y se calentó a baño maría para evaporar el solvente. Luego, el extracto se redisolvió con 1 mL de cloroformo y se agregaron 3 gotas de ácido sulfúrico concentrado por las paredes del tubo de ensayo. Si es positivo se observó:

- Rosado-Azul rápido.
- Verde intenso-visible, aunque rápido.
- Verde Oscuro- negro –final de la reacción (Miranda, 2006, págs. 40-45).

- Ensayo de Catequinas

Se tomó una pequeña muestra del extracto hidroalcohólico con un capilar y se colocó sobre el papel filtro. Se añadió una gota de carbonato de sodio. Para el reporte de los resultados, se observó en una cámara UV si se formaba una mancha verde carmelita (Miranda, 2006, págs. 40-45).

- Ensayo de cloruro férrico

Se determinaron los compuestos fenólicos en el extracto alcohólico y acuoso. Para el extracto alcohólico, se agregaron 3 gotas de tricloruro férrico al 5% en 2 mL. Por otro lado, en el extracto acuoso se buscaron taninos, para lo cual se añadió acetato de sodio y 3 gotas de tricloruro férrico al 5% en solución salina fisiológica en 2 mL de muestra (Miranda, 2006, págs. 40-45).

Para identificar se observó las coloraciones que se forman:

- Formación de color rojo-vino, indica presencia de fenoles.
- Formación de color verde intenso, presencia de taninos pirocatecólicos.
- Formación de color azul, presencia de taninos pirogalotánicos.

- Ensayo de resinas

Para llevar a cabo este método, se añadieron 2 mL de extracto alcohólico y 10 mL de agua destilada. Se consideró un resultado positivo si se observaba un precipitado (Miranda, 2006, págs. 40-45).

- Ensayo de Fehling

Se empleó este método para determinar la presencia de azúcares reductores. Para ello, se calentó la muestra hasta la evaporación del solvente. En caso de que el extracto no estuviera en agua, se disolvió en 2 mL de agua. Luego, se agregaron 2 mL del reactivo correspondiente y se calentó la mezcla a baño maría durante 10 minutos. Se consideró positivo si el tubo adquirió un color rojo ladrillo o si se observó un precipitado rojo (Miranda, 2006, págs. 40-45).

- Ensayo de espuma

Se tomaron 2 mL de extracto y se agregó 5 veces el volumen de agua. Luego se agitó la solución resultante durante 10 minutos. Los resultados se reportaron como positivos si se formaba espuma

en la parte superior del tubo de ensayo y esta permanecía por al menos 2 minutos (Miranda, 2006, págs. 40-45).

- Ensayo de mucílagos

Se determinó la presencia de compuestos polisacáridos mediante el uso de esta técnica, la cual consiste en la formación de un coloide hidrófilo capaz de aumentar la densidad del agua. Para llevar a cabo el método, se enfrió 10 mL de extracto acuoso a una temperatura de 0-5°C. El resultado se consideró positivo cuando la sustancia aumentó su viscosidad y se tornó gelatinosa (Miranda, 2006, págs. 40-45).

3.9. Cuantificación de compuestos fenólicos del extracto de *Piptocoma discolor*

Los compuestos fenólicos reaccionaron al reactivo, produciendo una coloración azul que se pudo leer en el espectrofotómetro. Se utilizó ácido gálico como blanco para realizar una curva de calibración con las concentraciones de 10, 50, 100, 250, 500 y 1000 ppm (Velázquez et al., 2015, pág. 481).

- Se colocaron 250 µL de muestra y se diluyeron en 15 mL de agua destilada.
- Luego se agregaron 1,25 mL del reactivo Folin-Ciocalteu a la muestra.
- La muestra fue agitada y posteriormente dejada en reposo en la oscuridad durante 8 minutos.
- Se añadieron 3,75 mL de carbonato de sodio al 7,5% a la muestra.
- Se aforó la solución a 25 mL, se mezcló y se dejó reposar en un lugar oscuro durante 2 horas.
- Finalmente, se realizó la lectura de la muestra a una longitud de onda de 765 nm. (Rover and Brown, 2013, pág. 2).

3.10. Cuantificación de flavonoides

Se elaboró una curva de calibración para la cuantificación de flavonoides utilizando la quercetina como referencia. Las concentraciones utilizadas en la curva fueron de 10, 50, 100, 250, 500 y 1000 ppm.

- Se colocó 1mL del extracto en un tubo de ensayo y se agregaron 4mL de agua destilada.
- Se añadieron 300 µL de solución nitrito de sodio al 5%, se mezcló y se colocó en la oscuridad por 5 minutos.
- Posteriormente, se añadieron 300 µL de tricloruro de aluminio al 10%, se mezcló y se colocó en la oscuridad por 5 minutos.

- Se adicionaron 2 mL de hidróxido de sodio 1M, se agitó y se colocó en la oscuridad por 15 minutos.
- La lectura se realizó midiendo la absorbancia a 510 nm (Raj et al., 2010, pág.432).

3.11. Evaluación de la actividad inhibitoria

3.11.1. Actividad de la fosfolipasa A₂

- Se empleó como sustrato una emulsión lipoproteica de la yema de huevo en una cantidad de 1.5 mL.
- La solución lipoproteica de yema de huevo se colocó en un tubo de ensayo.
- Se adicionaron 100 µl de muestra (toxina + antitoxina).
- Los tubos se incubaron por 60 minutos a 37 °C.
- Luego, se sometieron los tubos a un baño de agua hirviendo.
- El tiempo de coagulación se midió posteriormente (Mendoza et al. 2008).

3.11.2. Actividad de la hialuronidasa

- Se utilizó ácido hialurónico a una concentración de 0.5 mg/mL como sustrato, con buffer acetato de sodio 0.07 M y NaCl 0.15 M para ajustarlo a pH 5.0.
- En un tubo de ensayo se colocó 1 mL del sustrato de ácido hialurónico ajustado a pH 5.0.
- Se añadió 100 µl de muestra (toxina + antitoxina) al tubo de ensayo.
- La muestra se incubó durante 15 minutos a 37.5 °C.
- Se añadió 2 mL de BCTA, que permitió determinar la reducción de la turbidez.
- La muestra se colocó en una cubeta para espectrofotómetro.
- La absorbancia se midió a 400 nm (Di Ferrante, 1956, pág.304).

$$\% IH = \frac{Abs_C - Abs_M}{Abs_C} \times 100$$

Ecuación 3-1: Actividad de la hialuronidasa

Dónde:

Abs_C= Absorbancia control

Abs_M= Absorbancia de la muestra

3.11.3. Actividad caseinolítica

- Se utilizó caseína al 2% en buffer Tris-HCl 0.2M, pH 8,5.
- Se colocó 1 mL de solución de caseína
- Se adicionaron 100 µl de muestra (toxina + antitoxina).
- Luego, se incubó a 37 °C por 30 minutos.
- Se añadieron 2 mL de ácido tricloroacético (ATC) a 0.44M.
- Se centrifugó por 20 segundos.
- Finalmente, se leyó la absorbancia a 280 nm en una celda de cuarzo (Pereañez, Jiménez et al. 2008)

$$\text{Inhibición (\%)} = \frac{\text{Abs}_C - \text{Abs}_M}{\text{Abs}_C - \text{Abs}_N} \times 100$$

Ecuación 3-2: Actividad caseinolítica

Dónde:

Abs_C= Absorbancia control

Abs_M= Absorbancia de la muestra

Abs_N= Absorbancia del control negativo

3.11.4. Actividad coagulante

- Se utilizó fibrinógeno a una concentración de 2.97 mg/mL en buffer Tris-HCl 0.05 M con un pH de 7.4 como sustrato.
- El sustrato se colocó en el tubo de ensayo.
- Luego, se incubó a 37 °C durante 10 minutos.
- Se adicionaron 100 µl de muestra (toxina + antitoxina) a distintas concentraciones.
- Se midieron los tiempos de coagulación en segundos (Pereañez J. et al. 2008, pág. 157-164).

3.11.5. Determinación de proteínas

Método de lowry, Método Folin-ciocalteus

- Se tomaron 50uL de la solución de los venenos liofilizados de las dos especies de serpientes para su posterior análisis.
- La solución de los venenos fue medida en términos de absorbancia en un rango de luz ultravioleta de 280nm con la ayuda del espectrofotómetro UV.
- Se preparó una solución alcalina mediante la combinación del reactivo de Folin-Ciocalteus y albúmina sérica como proteína estándar.
- Se utilizaron las concentraciones de 10, 50, 100, 250, 500 y 1000 ppm para realizar las mediciones correspondientes.
- Posteriormente, se midieron las absorbancias de la muestra de proteína estándar en un rango de 660nm (Pereañez J. et al. 2008, pág. 157-164).

3.11.6. Determinación de proteínas en el suero antiofídico

- Se utilizó una solución de sulfato de cobre al 0,15%.
- Se añadió tartrato de sodio y potasio al 0,6%.
- Se agregó hidróxido de sodio al 3% a la mezcla resultante.
- Se midió la densidad óptica de la solución en un rango de 450 nm (Facultad de Química Farmacéutica. et al. 2008).

CAPÍTULO IV

4. MARCO DE ANÁLISIS Y DISCUSIÓN

El Capítulo III presenta los resultados obtenidos a través de los métodos detallados en el Capítulo II.

4.1. Control de calidad de la materia vegetal

Tabla 4-1: Resultados de los análisis de calidad de la Corteza de *Piptocoma discolor*

	British Pharmacopoeia	Corteza de <i>Piptocoma discolor</i>
% Humedad	7% - 14%	6,915 ± 0,03
% Cenizas Totales	Hasta 12%	3,043 ± 0,01
% Cenizas Solubles en Agua	7%	4,726 ± 0,02
% Cenizas Solubles en Ácido	5%	2,358 ± 0,05

Realizado por: Castillo, Gabriela, 2022.

Al evaluar los diferentes parámetros de calidad de la corteza del Piwi (*Piptocoma discolor*), se observó que el porcentaje de humedad fue de 6,915%. Este valor se encontró dentro de los parámetros establecidos, que son de 7 a 14%, lo que indica que los métodos de recolección y procesamiento de la corteza se llevaron a cabo de manera exitosa. El porcentaje obtenido de cenizas totales fue de 3,043%, lo que indica que se encontraba dentro del valor estándar según la farmacopea británica de 12% para cenizas totales. Se obtuvo un porcentaje del 4,726% para las cenizas solubles en agua y un 2,358% para las cenizas solubles en ácido. Estos porcentajes fueron analizados y se determinó que se encuentran dentro de los valores establecidos, lo que permitió identificar y analizar que la corteza del Piwi está en excelente estado para realizar los ensayos determinados para este trabajo de titulación.

4.2. Tamizaje fitoquímico

El ensayo de tamizaje fitoquímico se fundamentó en la evaluación de la coloración y precipitación de los diferentes extractos obtenidos de los solventes utilizados, éter dietílico, etanol a 70° y agua destilada. De esta manera, fue posible detectar la presencia de los diferentes metabolitos presentes en la corteza del árbol Piwi.

Tabla 4-2: Resultados de la obtención de metabolitos presentes en la corteza del árbol *Piptocoma discolor*

<i>Ensayo</i>	Metabolito a determinar	Extracto etéreo	Extracto alcohólico	Extracto acuoso
<i>Sudan</i>	Aceites y grasas	++	NA	NA
<i>Dragendorff</i>	Alcaloides	++	+++	+++
<i>Mayer</i>		+	+	++
<i>Wagner</i>		+	+	+++
<i>Baljet</i>	Lactonas y coumarinas	+	++	NA
<i>Hidroxamato férrico</i>	Coumarinas	NA	++	+++
<i>Borntrager</i>	Quinonas	NA	+++	NA
<i>Lieberman-Burchard</i>	Triterpenos - esteroides	++	+	NA
<i>Catequinas</i>		NA	+++	NA
<i>Shinoda</i>	Flavonoides	NA	+	++
<i>Cloruro Férrico</i>	Compuestos fenólicos o taninos	NA	Verde intenso	Azul
<i>Fehling</i>	Azúcares reductores	NA	+++	+++
<i>Resinas</i>		NA	-	NA
<i>Espuma</i>	Saponinas	NA	+++	+
<i>Ninhidrina</i>	Aminoácidos	NA	-	NA
<i>Mucilagos</i>		NA	NA	-

Realizado por: Castillo, Gabriela, 2022.

Los resultados obtenidos del tamizaje fitoquímico en presencia de diferentes solventes orgánicos se presentan en la tabla 2-3. Se identificó la presencia de diversos metabolitos en la muestra, como compuestos grasos, alcaloides, lactonas, cumarinas, quinonas, triterpenos, taninos del tipo pirocatecolólicos y pirogalotánicos, azúcares reductores y saponinas. La planta de PIWI o *Piptocoma discolor* es conocida por presentar diversos metabolitos, como sesquiterpenos y lactonas, que se han demostrado tener una alta actividad citotóxica en estudios fitoquímicos previos. Por lo tanto, es posible llevar a cabo ensayos para investigar su posible actividad contra venenos (García et al., 2016, pág.8).

4.3. Cuantificación de compuestos fenólicos del extracto de *Piptocoma discolor*

La cuantificación de los compuestos fenólicos del extracto hidroalcohólico de *Piptocoma discolor* fue obtenida mediante el uso de una curva de calibración del reactivo de Folin-Coliccateu en unidades de mg/L.

Tabla 4-3: Cuantificación de compuestos fenólicos del extracto de *Piptocoma discolor*

<i>Muestras</i>	Abs	Conc. mgEAG/L	Dilución	mgEAG/L	Promedio
<i>Ext. hidroalcohólico de pág. discolor</i>	0,0960	21,7	50	1085	1043
<i>Ext. hidroalcohólico de pág. discolor (duplicado)</i>	0,0879	20,0	50	1001	

Realizado por: Castillo, Gabriela, 2022.

La cantidad de polifenoles presentes en el extracto hidroalcohólico de *Piptocoma discolor* fue determinada como 1043 mgEAG/L. Comparando los resultados con otros estudios realizados en diferentes partes de la misma planta, se observa que los valores obtenidos en el presente estudio son mayores. Estos resultados sugieren que la corteza del árbol de *Piptocoma discolor* puede contener una mayor cantidad de polifenoles en comparación con otras partes de la misma planta. Sin embargo, la cantidad de polifenoles en una planta puede verse afectada por varios factores como las condiciones ambientales del lugar donde se recolectó la planta, su crecimiento y distribución geográfica, así como el tipo de solvente orgánico utilizado (Almeida, 2018, p; 53-56).

4.4. Cuantificación de flavonoides del extracto de *Piptocoma discolor*

La cantidad de flavonoides presentes en el extracto hidroalcohólico de *Piptocoma discolor* se determinó utilizando la curva de calibración del estándar de quercetina, reportando los resultados en unidades de mg/L.

Tabla 4-4: Cuantificación de flavonoides del extracto de *Piptocoma discolor*

<i>Muestras</i>	Vol (µL)	Vol AcONa	Vol Al(NO3)3	Vol final (ml)	Abs	Conc. mgEQ/L
Blanco	500	100	0	5		Promedio

Ext. hidroalcohólico de pág. discolor	1000	200	200	10	0,3595	42	44
Ext. hidroalcohólico de pág. discolor (duplicado)	1000	200	200	10	0,4043	48	

Realizado por: (Gabriela Castillo, 2022)

La concentración de flavonoides en el extracto hidroalcohólico de *Piptocoma discolor* fue de 44 mgEQ/L. Según otros estudios, la cantidad de flavonoides presentes en la planta es baja y se encuentran principalmente en los cloroplastos, específicamente en la membrana tilacoidal. Estos metabolitos están presentes en mayor concentración en las hojas y en las partes verdes de las plantas.

4.5. Evaluación de la actividad inhibitoria

4.5.1. Actividad de la fosfolipasa (A_2)

A continuación, se detallan los resultados obtenidos del ensayo para determinar la actividad de la fosfolipasa A_2 .

Tabla 4-5: Actividad de la enzima Fosfolipasa A_2 presente en las toxinas de las serpientes *B. Asper* y *B. Microphthalmus*

<i>Ppm</i> (concentración)	Toxinas	
	<i>B. Asper</i> (μL) <i>tiempo</i> (s)	<i>B. Microphthalmus</i> (μL) <i>tiempo</i> (s)
1000	90	70
500	66	59
250	49	53
100	47	49
50	45	43
10	40	40

Realizado por: Castillo, Gabriela, 2022.

Se observaron los tiempos obtenidos durante el desarrollo del ensayo para determinar el tiempo de coagulación de los dos venenos de serpientes. Se encontró que en una concentración menor, el tiempo de coagulación tuvo una acción más fulminante.

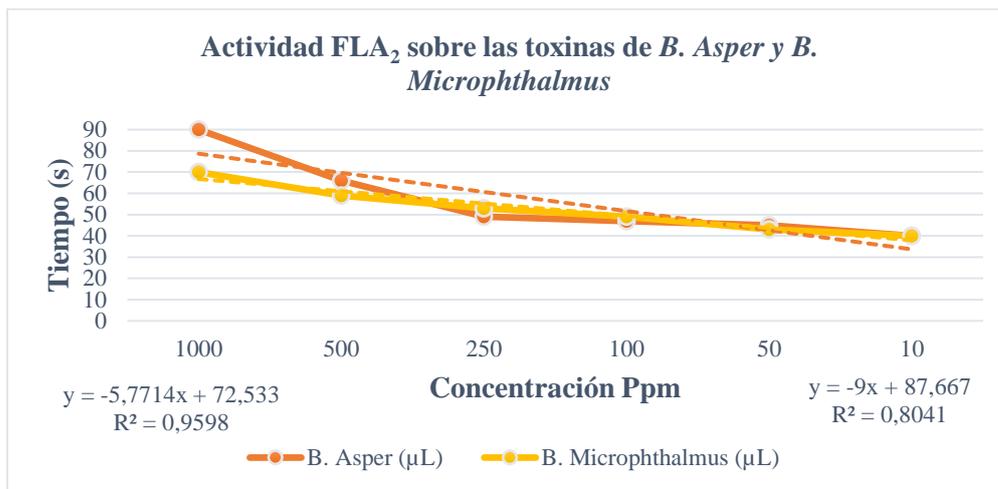


Ilustración 4-1: Actividad FLA₂ sobre las toxinas de *B. Asper* y *B. Microphthalmus*

Realizado por: Castillo, Gabriela, 2022.

La Ilustración 1-3 muestra que el tiempo de coagulación de los venenos de las serpientes *B. Asper* y *B. Microphthalmus* difiere entre ellos. Se puede observar que el veneno de *B. Asper* tiene un tiempo de coagulación menor a partir de la concentración de 250 ppm, mientras que el veneno de *B. Microphthalmus* tiene su tiempo de coagulación menor a partir de la concentración de 100 ppm.

Tabla 4-6: Inhibición de la Fosfolipasa A₂ presente en las toxinas de *B. Asper* y *B. Microphthalmus* con el suero antiofídico y el extracto de *Piptocoma discolor*

ppm concentración	Toxina + suero antiofídico		Toxina + Extracto Piwi	
	<i>B. Asper</i>	<i>B. Microphthalmus</i>	<i>B. Asper</i>	<i>B. Microphthalmus</i>
1000	600	640	720	860
500	480	460	600	420
250	180	280	300	300
100	140	140	250	250
50	120	110	120	120
10	60	80	60	70

Realizado por: Castillo, Gabriela, 2022.

En la tabla 6-3 se presentan los resultados de la inactivación de las toxinas de las serpientes *B. Asper* y *B. Microphthalmus* mediante la adición de suero antiofídico y extracto de *Piptocoma discolor* en cada muestra. Se evaluó el tiempo de coagulación utilizando la emulsión lipoproteica

para determinar si el extracto de la corteza de *Piptocoma discolor* podría retardar la acción del veneno.

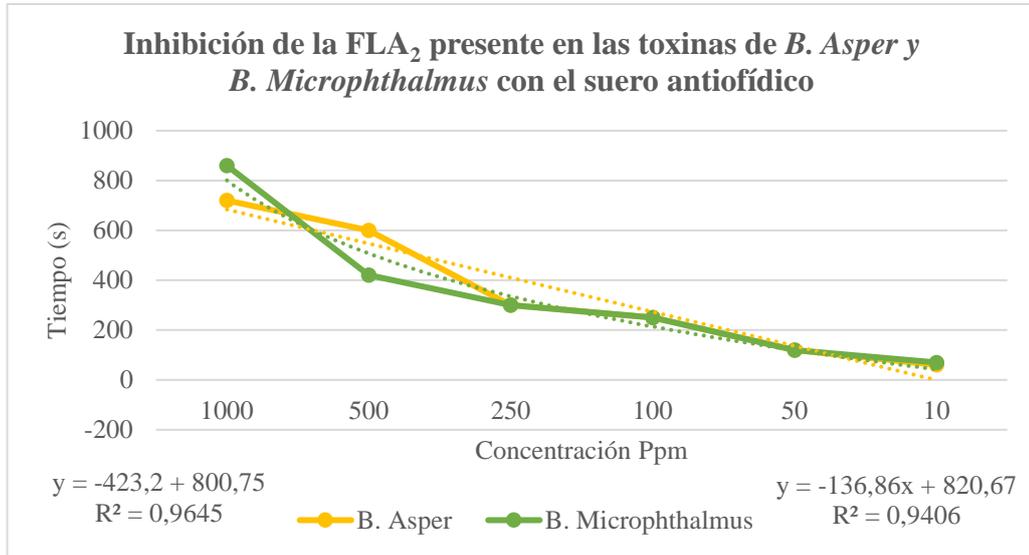


Ilustración 4-2: Inhibición de la FLA₂ presente en las toxinas de *B. Asper* y *B. Microphthalmus* con el suero antifúngico

Realizado por: Castillo, Gabriela, 2022.

Al observar la Ilustración 2-3, la cual muestra la inactivación de la FLA₂ presente en los venenos de *B. Asper* y *B. Microphthalmus* mediante el suero antifúngico, se puede notar que el tiempo de coagulación del suero antifúngico en presencia del veneno de la serpiente *B. Asper* es menor en comparación con la muestra del suero antifúngico con el veneno de la serpiente *B. Microphthalmus*. Esto se evidenció en la reacción a concentraciones de 1000 y 500 ppm.

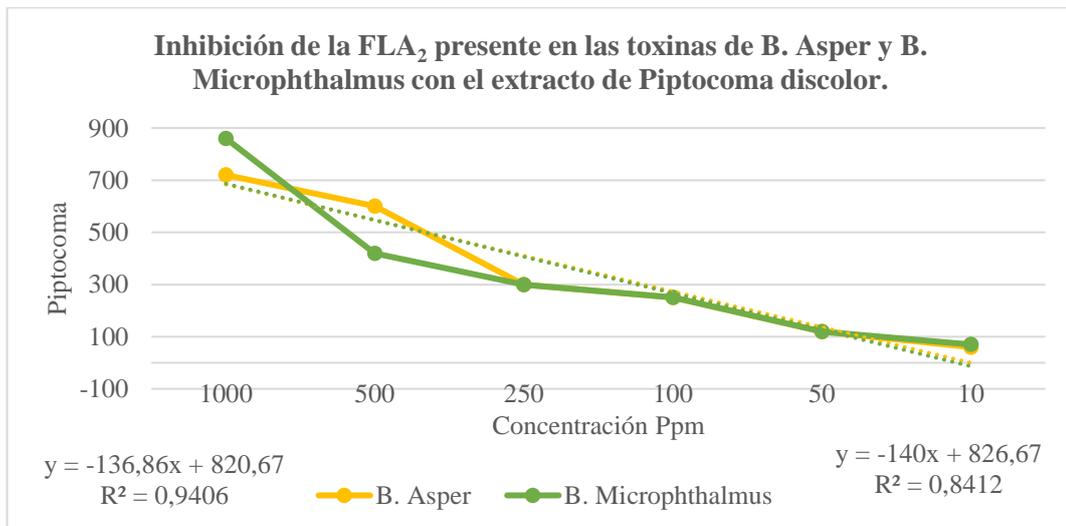


Ilustración 4-3: Inhibición de la FLA₂ presente en las toxinas de *B. Asper* y *B. Microphthalmus* con el extracto de *Piptocoma discolor*

Al analizar la Ilustración 3-3 que muestra la inactivación de la FLA₂ presente en los venenos de *B. Asper* y *B. Microphthalmus* utilizando el extracto seco de la corteza de *Piptocoma discolor*, se puede observar que el tiempo de coagulación del extracto seco sobre el veneno de la serpiente *B. Asper* es menor en comparación con la muestra del extracto con el veneno de la serpiente *B. Microphthalmus*, en las concentraciones de 1000 y 500 ppm al determinar el tiempo de coagulación.

Discusión

Se ha comprobado que el extracto de la corteza del árbol *Piptocoma discolor* tiene la capacidad de inhibir la actividad enzimática de la FLA₂ o Fosfolipasa A2 en el veneno de la serpiente *B. Asper*, en comparación con el veneno de la serpiente *B. Microphthalmus*, el cual presenta un retardo en las concentraciones de 1000 y 500 ppm. Por otro lado, las concentraciones de 250, 100, 50 y 10 ppm presentan una alta probabilidad de inhibición de la enzima, aunque esto puede depender de la parte de la planta utilizada en el proceso.

4.5.2. Actividad de la hialuronidasa

La tabla 4-7 presenta un análisis de los resultados de la inhibición de la hialuronidasa presente en la toxina de las serpientes, utilizando suero antiofídico y extracto de *Piptocoma discolor*. Estos resultados fueron obtenidos a través de la lectura del espectrofotómetro a 400 nm.

Tabla 4-7: Inhibición de la actividad de la hialuronidasa presente en las toxinas de *B. Asper* y *B. Microphthalmus* con el suero antiofídico y el extracto de *Piptocoma discolor*

Ppm concentración	Toxina + suero antiofídico		Toxina + Extracto Piwi	
	<i>B. Asper</i>	<i>B. Microphthalmus</i>	<i>B. Asper</i>	<i>B. Microphthalmus</i>
1000	99,7472	97,1650	99,4135	99,4805
500	98,1380	97,0745	98,8318	98,3957
250	97,9919	96,7213	98,1928	97,8142
100	97,3753	96,8407	97,5723	97,2527
50	96,2455	96,6666	96,6784	97,2222
10	96,1404	96,3788	95,9649	96,6574

Los resultados muestran que el porcentaje de inhibición de la hialuronidasa en las muestras de suero antiofídico contra la toxina de *B. Asper* fue mayor en comparación con la *B. Microphthalmus*. En cuanto a la inhibición de la hialuronidasa en las muestras de las toxinas con el extracto de la corteza de *Piptocoma discolor*, se observó un porcentaje mayor de inhibición sobre la toxina de *B. Microphthalmus*, con un porcentaje mínimo sobre la toxina de *B. Asper*. Las gráficas de la inhibición de las toxinas de *B. Asper* y *B. Microphthalmus* se presentan a continuación.

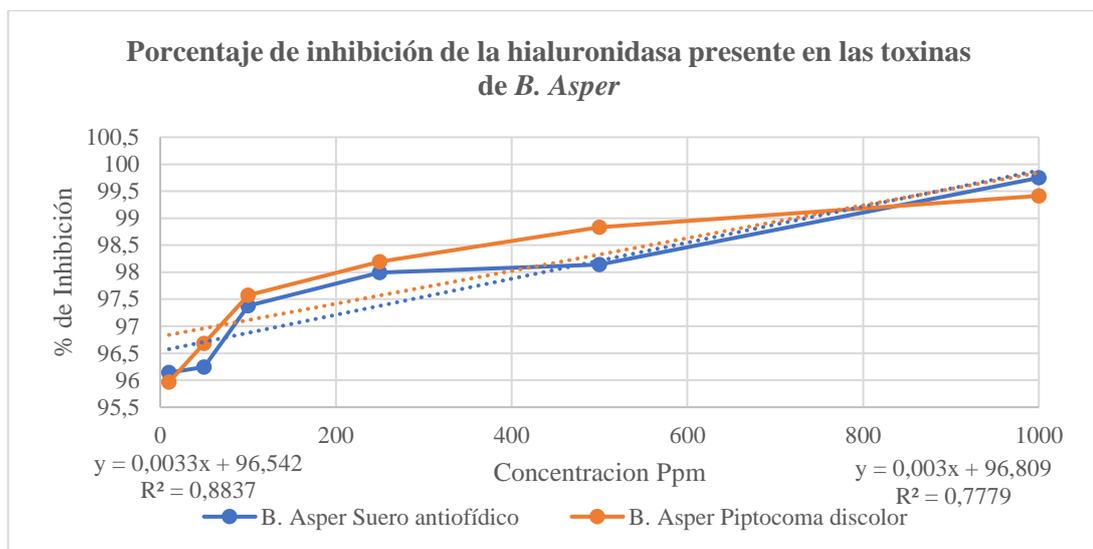


Ilustración 4-3: Porcentaje de inhibición de la hialuronidasa presente en las toxinas de *B. Asper*
Realizado por: Castillo, Gabriela, 2022.

Al analizar la ilustración 4-3, se observa que el porcentaje de inhibición de la hialuronidasa es mejor en presencia del suero antiofídico con un 0.3337% sobre la toxina de la *B. Asper* con 99,7472% y la toxina *B. Asper* con extracto de *Piptocoma discolor* tiene una menor inhibición de la hialuronidasa con 99,4135%, con respecto al suero antiofídico. Las concentraciones más bajas muestran una menor inhibición de la hialuronidasa en presencia del extracto de Piwi, en relación con el suero antiofídico.

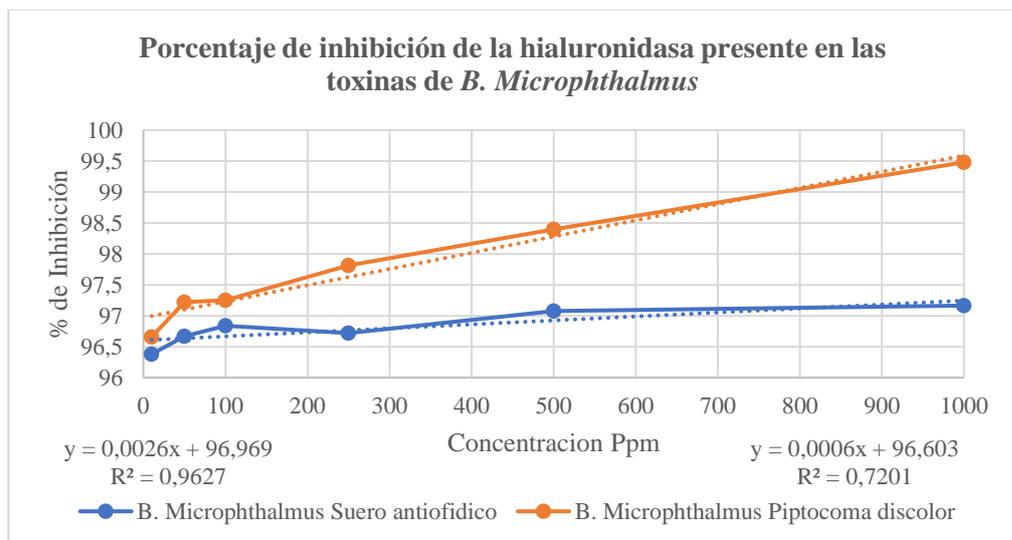


Ilustración 4-4: Porcentaje de inhibición de la hialuronidasa presente en las toxinas de *B. Microphthalmus*

Realizado por: Castillo, Gabriela, 2022.

La ilustración 5-3 muestra que el extracto de *Piptocoma discolor* en la toxina de *B. Microphthalmus* presenta una inhibición del 99,4805% sobre la enzima hialuronidasa, lo que indica una inhibición un 2% mayor que la toxina que contiene el suero antiofídico con un 97,1650% de inhibición.

Discusión

Al analizar los resultados de los porcentajes y las gráficas, se puede constatar que la investigación en cuestión demuestra una inhibición de la enzima hialuronidasa. En concentraciones altas, se puede alcanzar un mayor porcentaje de inhibición, mientras que en concentraciones mínimas se llega a incrementar la actividad enzimática. Al mezclar las muestras de toxinas con el suero antiofídico y el extracto de la corteza de *Piptocoma discolor* con el buffer de ácido hialurónico, se puede observar que existe turbidez y precipitado, lo que indica la presencia de la actividad de la hialuronidasa para degradar el ácido hialurónico. Sin embargo, el suero antiofídico y el extracto de Piwi logran detener la reacción, lo que reduce la actividad de la enzima hialuronidasa y permite su inhibición. En resumen, los resultados obtenidos muestran la capacidad del extracto de *Piptocoma discolor* para inhibir la actividad de la hialuronidasa.

4.5.3. Actividad caseinolítica

A continuación se presentan los resultados de la inhibición de la actividad caseinolítica en la toxina de serpientes mediante el uso de suero antiofídico y extracto de *Piptocoma discolor*, los cuales fueron obtenidos a través de la lectura del espectrofotómetro a 280nm.

Tabla 4-8: Inhibición de la actividad caseinolítica presente en las toxinas de *B. Asper* y *B. Microphthalmus* con el suero antiofídico y el extracto de *Piptocoma discolor*

Ppm concentración	Toxina + suero antiofídico		Toxina + Extracto Piwi	
	<i>B. Asper</i>	<i>B. Microphthalmus</i>	<i>B. Asper</i>	<i>B. Microphthalmus</i>
1000	50,4041	79,4168	79,2003	88,4336
500	48,0134	63,0790	64,7085	77,0627
250	44,8729	58,1340	56,6003	67,4678
100	36,8739	46,4920	43,5038	55,6132
50	31,0582	37,2346	36,2787	43,0790
10	22,4705	24,9411	32,3765	37,1343

Realizado por: Castillo, Gabriela, 2022.

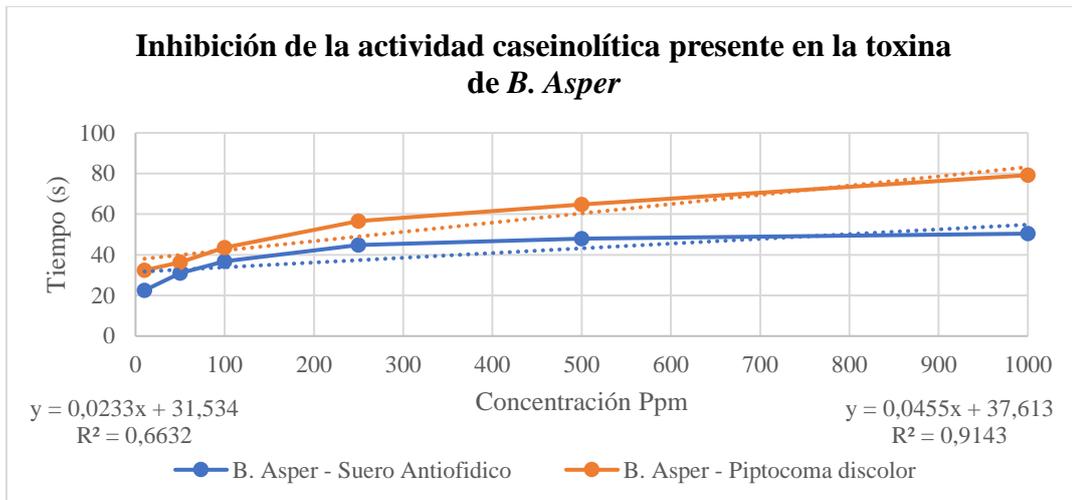


Ilustración 4-5: Inhibición de la actividad caseinolítica presente en la toxina de *B. Asper*

Realizado por: Castillo, Gabriela, 2022.

Al analizar la tabla 8-3 de porcentajes de inhibición y la gráfica correspondiente, se observa que el extracto de *Piptocoma discolor* presenta un porcentaje de inhibición caseinolítica del 32,3765% ante la toxina de *B. asper*, a una concentración de 10 ppm. Esto demuestra que, en concentraciones mínimas, el porcentaje de inhibición es mayor en comparación con la utilización del suero antiofídico, el cual muestra un porcentaje de inhibición del 22,4705%.

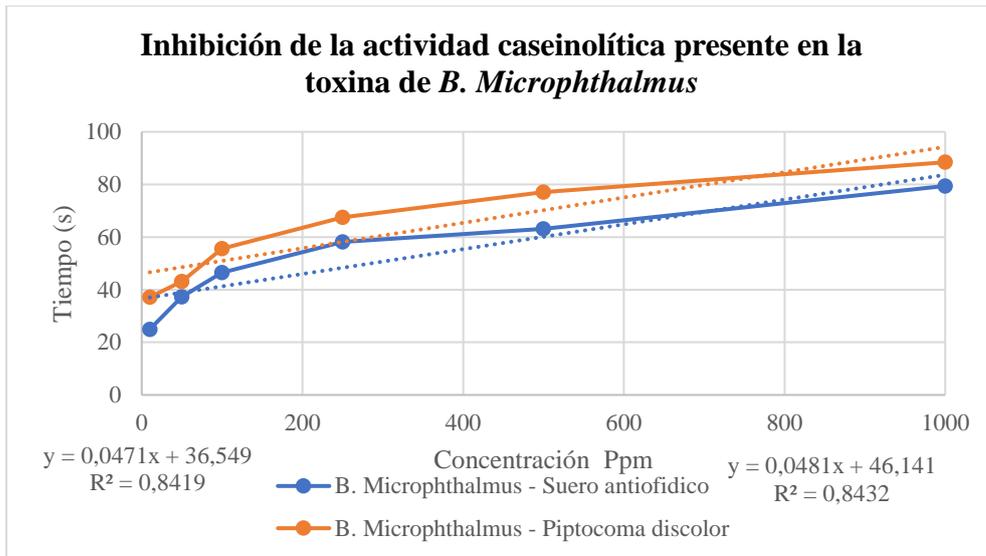


Ilustración 4-6: Inhibición de la actividad caseinolítica presente en la toxina de *B. Microphthalmus*

Realizado por: Castillo, Gabriela, 2022.

Se considera que el extracto de *Piptocoma discolor*, cuando se presenta en una concentración mínima de 10 ppm, posee una capacidad de inhibición del 37.1343% sobre la actividad caseinolítica que se encuentra presente en la toxina de *B. Microphthalmus*. En comparación con el suero antiofídico, que posee una inhibición del 24.9411%, se establece que el efecto de la inhibición de la enzima caseína es mayor en la toxina de *B. Microphthalmus* cuando se utiliza una concentración baja del extracto, con relación a la asimilación que se tiene sobre la toxina de *B. Asper*.

Discusión

El extracto de corteza *Piptocoma discolor* tiene un poder mayor de inhibición de la actividad enzimática de las toxinas de las serpientes *B. Asper* y *B. Microphthalmus* obteniendo un 79% y 88% respectivamente, al respecto del porcentaje obtenido con el suero antiofídico.

4.5.4. Actividad coagulante

A continuación se presentan los resultados de la actividad coagulante y la inhibición de esta actividad mediante el uso del suero antiofídico y el extracto de *Piptocoma discolor*.

Tabla 4-9: Actividad coagulante de las toxinas de *B. asper* y *B. microphthalmus*

Ppm	Toxinas
-----	---------

(concentración)

1000

500

<i>B. Asper</i> (s)	<i>B. Microphthalmus</i> (s)
9	8
6	7

Realizado por: Castillo, Gabriela, 2022.

Al analizar la tabla 9-3, se puede observar que el tiempo de coagulación de las toxinas de las especies *B. asper* y *B. microphthalmus* es significativamente más rápido en ausencia de suero antiofídico o extracto de *Piptocoma discolor*. Específicamente, se observó una actividad coagulante más rápida a una concentración de 1000ppm en la toxina de *B. microphthalmus* y a una concentración de 500ppm en la toxina de *B. asper*.

Tabla 4-10: Inhibición de la actividad coagulante

<i>Ppm</i> concentración	Toxina + suero antiofídico		Toxina + Extracto Piwi	
	<i>B. Asper</i>	<i>B. Microphthalmus</i>	<i>B. Asper</i>	<i>B. Microphthalmus</i>
1000	28	31	21	29
500	31	36	28	31
250	34	40	33	36
100	38	45	35	40
50	40	50	39	42
10	46	53	43	44

Realizado por: Castillo, Gabriela, 2022.

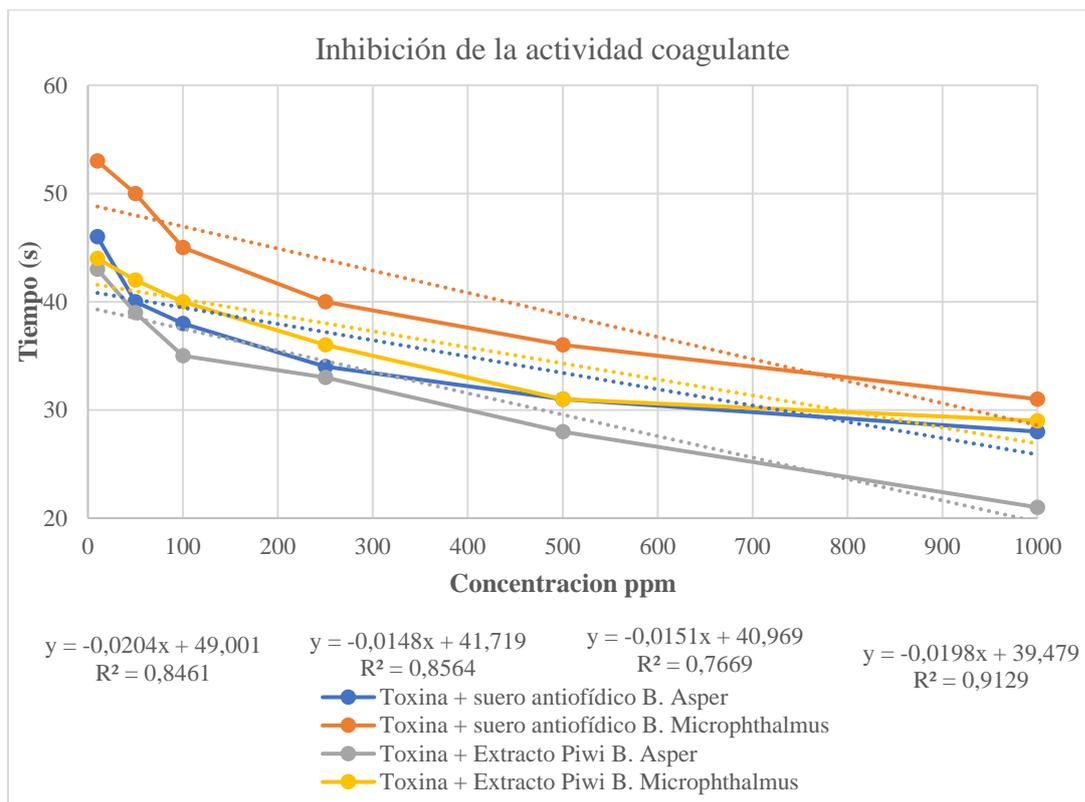


Ilustración 4-7: Inhibición de la actividad coagulante de las toxinas *B. asper* y *B. microphthalmus*

Realizado por: Castillo, Gabriela, 2022.

Al examinar la Ilustración 8-3 que trata sobre la inhibición de la actividad coagulante, se puede observar que el tiempo de coagulación de la toxina de *B. microphthalmus* y *B. asper* disminuye en presencia de suero antiotóxico en comparación con la presencia de extracto de *Piptocoma discolor*. Además, se puede notar una mayor inhibición en la toxina de *B. asper* en comparación con la toxina de *B. microphthalmus*, ya que su tiempo de coagulación es más corto.

4.5.5. Determinación de proteínas

Tabla 4-11: Determinación de proteínas en las toxinas de *B. asper* y *B. microphthalmus*

<i>ppm</i> (concentración)	Toxinas	
	<i>B. Asper</i>	<i>B. Microphthalmus</i>
1000	113.5 mg/dl	37.2 mg/dl
500	100 mg/dl	14.1 mg/dl
100	89.4 mg/dl	3.8 mg/dl

Realizado por: Castillo, Gabriela, 2022.

La cantidad de proteínas que presentan las toxinas de los ofidios varían de acuerdo con la especie, cada ofidio modifica la concentración de su toxina por diferentes factores como su edad, estado de salud, distribución geográfica, alimentación y si se encuentran en cautiverio. Al analizar la tabla 11-3, los resultados indican que en una concentración de 1000 ppm, la serpiente *B. microphthalmus* presentó un valor de 37,2 mg/dl, mientras que la serpiente *B. asper* presentó un valor de 113.5 mg/dl. Estos valores sugieren que las serpientes mantenidas en cautiverio pueden estar predispuestas a adquirir enfermedades y tener un sistema inmunológico debilitado. Por lo tanto, este análisis puede ser un indicador de que las serpientes pueden estar enfermas (Instituto Nacional de Salud et al, 2002, pág.43).

4.5.6. Determinación de proteínas presentes en el suero antiofídico

Tabla 4-12: Determinación de proteínas presentes en el suero antiofídico

ppm Concentración	Suero antiofídico
1000	112.8 mg/dl
500	53.8 mg/dl
100	7.1 mg/dl

Realizado por: Castillo, Gabriela, 2022.

La cantidad de proteínas que presenta el suero antiofídico son importantes para la respuesta inmune del organismo en la fabricación de inmunoglobulinas IgG del animal de experimentación, estas proteínas se encuentran combinadas con las proteínas de las toxinas de las serpientes, que llegan a ser neutralizadas por ello hay que certificar la producción de los sueros antiofídicos para cada especie de serpiente y familia a la que pertenezcan.

4.6. Análisis estadístico

4.6.1. Análisis descriptivo de los grupos

En el estudio realizado, se analizaron medidas de dispersión, posición (tendencia central) y forma con el objetivo de obtener información sobre la distribución de los datos. La asimetría y curtosis se utilizaron para estudiar la normalidad de la distribución de los datos, mientras que se hizo hincapié en la media y la varianza debido a que se utilizaron en el cálculo del estadístico T de Student. El análisis descriptivo se llevó a cabo por grupos de estudio.

Tabla 4-13: Análisis descriptivo de los grupos

<i>ESTADÍSTICOS DESCRIPTIVOS</i>	Venenos mg/10ml	Suero Antiofídico	<i>B. Asper</i> tiempo (s)	<i>B. Microphthalmus</i> tiempo (s)
<i>Media</i>	2,85	1,35	56,17	52,33
<i>Error típico</i>	1,61	0,74	7,67	4,50
<i>Mediana</i>	0,75	0,75	48	51
<i>Moda</i>	0,5	1	#N/D	#N/D
<i>Desviación estándar</i>	3,94	1,82	18,78	11,02
<i>Varianza de la muestra</i>	15,56	3,32	352,57	121,47
<i>Curtosis</i>	1,75	5,28	1,71	-0,07
<i>Coefficiente de asimetría</i>	1,58	2,25	1,49	0,69
<i>Rango</i>	9,9	4,9	50	30
<i>Mínimo</i>	0,1	0,1	40	40
<i>Máximo</i>	10	5	90	70
<i>Suma</i>	17,1	8,1	337	314
<i>Cuenta</i>	6	6	6	6

Realizado por: Castillo, Gabriela, 2022.

La variable "venenos" presenta un valor promedio de 2.85 mg por cada 10 ml, una mediana de 0.75 mg/10ml y una moda de 0.5 mg/10ml. Además, tiene una desviación estándar de 3.94mg/10ml. Para realizar una comparativa, se deben cumplir con los supuestos de homogeneidad y normalidad. En este sentido, se debe prestar atención a los valores de asimetría y curtosis, los cuales deben estar próximos a cero para una distribución simétrica y mesocúrtica. En el caso de los datos de venenos, los valores de asimetría y curtosis son 1.58 y 1.75, respectivamente. Esto indica que la distribución es asimétrica positiva y mesocúrtica en torno a una distribución normal. Además, la variable presenta un valor mínimo de 0.1 y un máximo de 10.

Con relación a la variable de suero antiofídico, se puede observar un valor promedio de 1.35mg por cada 10 ml, con una mediana de 0.75mg/10ml y una desviación estándar de 1.82mg/10ml. Al comparar los valores, es necesario cumplir con los supuestos de homogeneidad y normalidad. En este sentido, se debe prestar atención a que los valores de asimetría y curtosis estén próximos a cero, lo que indica una distribución simétrica y una curva mesocúrtica. En el caso del suero antiofídico, los valores de asimetría y curtosis son 2.25 y 5.28, respectivamente. Esto indica una distribución asimétrica positiva y una curva leptocúrtica en torno a la distribución normal. Además, la variable tiene un valor mínimo de 0.1 y un máximo de 5.

4.6.1.1. Actividad de la fosfolipasa A₂

Al iniciar el estudio de la actividad de la fosfolipasa, se analizó la actividad de las toxinas de *B. asper* y *B. microphthalmus*. En el estudio, se encontró un valor medio superior para *B. asper* con 56.17 segundos en comparación con *B. microphthalmus* con 52.33 segundos, lo que sugiere preliminarmente que *B. microphthalmus* tiene una actividad más rápida contra las toxinas. Además, la mediana del tiempo de activación de *B. microphthalmus* fue de 51 segundos, mientras que la mediana de *B. asper* fue de 48 segundos. Ambas distribuciones presentan asimetría positiva y son mesocúrticas. Se observó que ambas especies tienen un valor mínimo de 40 segundos; sin embargo, *B. asper* presenta un valor máximo de 90 segundos, que es 20 segundos más que el valor máximo de *B. microphthalmus*.

Tabla 4-2: Inhibición de la Fosfolipasa A₂ presente en toxinas

<i>Estadísticos Descriptivos</i>	<i>I. Asper</i>	<i>I. Microphthalmus</i>	<i>II. Asper</i>	<i>II. Microphthalmus</i>
Media	263,33	285,00	341,67	336,67
Error típico	90,25	91,35	107,78	116,58
Mediana	160	210	275	275
Moda	#N/D	#N/D	#N/D	#N/D
Desviación estándar	221,06	223,76	264,00	285,56
Varianza de la muestra	48866,67	50070,00	69696,67	81546,67
Curtosis	-1,13	-0,68	-1,39	2,42
Coefficiente de asimetría	0,96	0,89	0,61	1,47
Rango	540	560	660	790
Mínimo	60	80	60	70
Máximo	600	640	720	860
Suma	1580	1710	2050	2020
Cuenta	6	6	6	6

Realizado por: Castillo, Gabriela, 2022.

En el estudio de la inhibición de la fosfolipasa mediante la combinación de la toxina con suero antiofídico, se observó que *B. microphthalmus* inhibe la fosfolipasa con mayor eficacia que *B. asper*, con valores medios de 285 y 263.33 unidades, respectivamente. Además, *B. asper* presenta una mejor mediana de inhibición, con 210 unidades en comparación con 160 unidades para *B. microphthalmus*. Ambas distribuciones son aproximadamente normales, con una baja asimetría

de 0.89 para *B. microphthalmus* y 0.96 para *B. asper*, y con una curtosis negativa para ambas especies, lo que sugiere una cierta tendencia a ser platicúrticas. *B. microphthalmus* tiene un rango mayor que *B. asper*, con un valor mínimo de 80 unidades y un valor máximo de 640 unidades, mientras que *B. asper* tiene un rango de 60 a 600 unidades, respectivamente.

En el análisis de la actividad de la fosfolipasa en presencia de la toxina y el extracto de Piwi, se encontró que, en promedio, *B. microphthalmus* inhibió menos la fosfolipasa que *B. asper*, con valores promedio de 336.67 y 341.67 unidades, respectivamente. Ambas especies de serpientes comparten la misma mediana de 275 unidades. Se observó que ambas distribuciones son aproximadamente normales, con una baja asimetría de 1.47 para *B. microphthalmus* y 0.61 para *B. asper*. La distribución de *B. asper* tiene una curtosis negativa, lo que sugiere que puede ser platicúrtica. En cambio, la distribución de *B. microphthalmus* tiende a ser leptocúrtica. Además, *B. microphthalmus* presenta un rango mayor que *B. asper*, con un mínimo de 70 y un máximo de 860 unidades, mientras que *B. asper* tiene un mínimo de 60 y un máximo de 720 unidades.

4.6.1.2. Actividad de la hialuronidasa

Tabla 4-3: Inhibición de la actividad de la hialuronidasa presente en las toxinas

Estadísticos Descriptivos	<i>T.</i>	<i>T.</i>	<i>TT.</i>	<i>TT.</i>
	<i>Asper</i>	<i>Microphthalmus</i>	<i>Asper</i>	<i>Microphthalmus</i>
Media	97,61	96,81	97,78	97,80
Error típico	0,55	0,12	0,53	0,41
Mediana	97,6836	96,781	97,88255	97,53345
Moda	#N/D	#N/D	#N/D	#N/D
Desviación estándar	1,35	0,29	1,30	1,01
Varianza de la muestra	1,81	0,08	1,70	1,02
Curtosis	-0,05	-0,49	-1,24	0,40
Coefficiente de asimetría	0,53	-0,23	-0,22	0,88
Rango	3,6068	0,7862	3,4486	2,8231
Mínimo	96,1404	96,3788	95,9649	96,6574
Máximo	99,7472	97,165	99,4135	99,4805
Suma	585,638	580,8469	586,6537	586,8227
Cuenta	6	6	6	6

Realizado por: Castillo, Gabriela, 2022.

Para el caso de la toxina hialuronidasa más el suero antiofídico los valores en promedio son muy similares, 96.81 para *B. Microphthalmus* y 97.61 unidades para *B. Asper*, ambos comparten una

mediana similar de 97.68 para *B. Asper* y 96.781 para *B. Microphthalmus*, una desviación estándar de 1.35 y 0.29 para *Asper* y *Microphthalmus*. A nivel de distribución normal ambos son bastante cercanos a esta con una asimetría negativa baja para *B. Microphthalmus* y una asimetría positiva baja para *B. Asper*, en cuanto a curtosis ambas se aproximan a ser mesocúrticas. *B. Microphthalmus* tiene un rango muy corto de 0.7862, en comparación al 3.61 de *B. Asper*, con un máximo de 96.14 y un máximo de 99.75 para *Asper*, contra el mínimo de 96.37 y máximo de 97.165 de *B. Microphthalmus*.

Con respecto a la toxina más el extracto Piwi, *B. Microphthalmus* es en promedio 0.02 unidades mayor con 97.80 versus 97.78 de *B. Asper*, sus medianas no son muy distintas, con *B. Microphthalmus* 97.53 y *B. Asper* 97.88. Existe una desviación de 1.30 para *B. Asper* y 1.01 de *B. Microphthalmus*. En el caso de normalidad ambas son aproximadamente normales, con un coeficiente de asimetría de -0.22 en *B. Asper* y 0.88 en *B. Microphthalmus* ambas son aproximadamente simétricas, con respecto a su curtosis, *B. Asper* es platicúrtica y *B. Microphthalmus* es mesocúrtica. Con un rango menor *B. Microphthalmus* tiene un valor mínimo de 96.65 y un máximo de 99.48 unidades, *B. Asper* con un rango de 3.45 tiene un valor mínimo de 95.96 y un máximo de 99.41.

4.6.1.3. Actividad caseinolítica

Tabla 4-164: Inhibición de la actividad caseinolítica presente en las toxinas

Estadísticos	C.	C.	CC.	CC.
Descriptivos	<i>Asper</i>	<i>Microphthalmus</i>	<i>Asper</i>	<i>Microphthalmus</i>
Media	249586,67	249025,50	221113,50	231317,67
Error típico	83072,90	92140,70	51591,78	51453,15
Mediana	282087,5	262479	250520,5	265405
Moda	#N/D	#N/D	#N/D	#N/D
Desviación estándar	203486,23	225697,69	126373,53	126033,97
Varianza de la muestra	41406644776,27	50939446211,90	15970269997,50	15884561881,87
Curtosis	-1,43	-0,76	-1,53	-1,76
Coefficiente de asimetría	-0,19	0,10	-0,50	-0,52
Rango	535287	621757	316680	300716
Mínimo	-24705	-49411	47085	70627
Máximo	510582	572346	363765	371343

Suma	1497520	1494153	1326681	1387906
Cuenta	6	6	6	6

Realizado por: Castillo, Gabriela, 2022.

En cuanto a la inhibición de la actividad caseinolítica en toxinas con suero antiofídico, se observó que *B. asper* presenta un valor promedio mayor de 249586.67 y una mediana de 282087.5. Por otro lado, *B. microphthalmus* presenta un valor promedio de 249025.50 y una mediana de 262479. No se encontraron valores repetidos, por lo que no existe moda en ambos casos. En cuanto a la distribución normal, ambas distribuciones se aproximan, con un valor de asimetría y curtosis para *B. asper* de -0.19 y -1.43, lo que indica una distribución asimétrica negativa y platicúrtica. Para *B. microphthalmus*, la distribución es platicúrtica y ligeramente asimétrica positiva con valores de -0.76 y 0.10, respectivamente.

En cuanto a la inhibición de la actividad caseinolítica en las toxinas de *B. asper* y *B. microphthalmus* utilizando el extracto Piwi, se encontró que el promedio de inhibición en *B. microphthalmus* fue mayor con 231317.67 en comparación con *B. asper* con 221113.50. Además, la mediana de inhibición en *B. microphthalmus* fue de 265405, mientras que la mediana de *B. asper* fue de 250520.5. En ambas especies, no se encontraron valores repetidos, por lo que carecen de moda. En cuanto a la distribución normal, ambas son aproximadamente normales, con una asimetría de -0.5 y una curtosis de -1.53 para *B. asper*, lo que sugiere una distribución con asimetría negativa y platicúrtica. Asimismo, *B. microphthalmus* presenta una asimetría de -0.52, también negativa, y una curtosis de -1.76, lo que indica que su distribución es platicúrtica.

4.6.1.4. Actividad coagulante

Tabla 4-17: Inhibición de la actividad coagulante presente en las toxinas

Estadísticos	CO.	CO.	COC.	COC.
Descriptivos	Asper	Microphthalmus	Asper	Microphthalmus
<i>Media</i>	36,17	42,50	33,17	37,00
<i>Error típico</i>	2,66	3,43	3,21	2,48
<i>Mediana</i>	36	42,5	34	38
<i>Moda</i>	#N/D	#N/D	#N/D	#N/D
<i>Desviación estándar</i>	6,52	8,41	7,86	6,07
<i>Varianza de la muestra</i>	42,57	70,70	61,77	36,80
<i>Curtosis</i>	-0,55	-1,39	-0,17	-1,86
<i>Coficiente de asimetría</i>	0,35	-0,11	-0,48	-0,31

Rango	18	22	22	15
Mínimo	28	31	21	29
Máximo	46	53	43	44
Suma	217	255	199	222
Cuenta	6	6	6	6

Realizado por: Castillo, Gabriela, 2022.

En el caso de la toxina más suero antiofídico, *B. Microphthalmus* tiene un valor promedio superior al de *B. Asper* con 42.50 unidades en comparación al de *B. Asper* de 36.17, la mediana de *B. Microphthalmus* es de igual forma sobresaliente con 42.50 sobre los 2.66 de *B. Asper*. La desviación estándar es de 42.5 unidades para *B. Microphthalmus* y 6.52 de *B. Asper*. Ambas poseen curtosis negativa con -0.55 para *B. Asper* y -1.39 para *B. Microphthalmus*. La asimetría es negativa para *B. Microphthalmus* y positiva para *B. Asper*. El valor mínimo de *B. Asper* es de 28 y un máximo de 46, en cambio, para *B. Microphthalmus* el valor mínimo es de 31 y el máximo es 53, el valor del rango de *B. Microphthalmus* es mayor que el de *B. Asper*.

Para el caso de la toxina con el extracto de Piwi, el valor promedio de *B. Microphthalmus* es 37 contra 33.17 de *B. Asper*, similar ocurre con su mediana donde *B. Microphthalmus* es 38 versus 34 de *Asper*. En cuanto a su distribución normal, se puede considerar que *B. asper* y *B. microphthalmus* son platicúrticas ligeramente. Además, ambas distribuciones presentan asimetría negativa en relación con su media.

4.6.2. Análisis comparativo entre grupos

Se empleó la prueba T de Student para identificar las diferencias entre las medias de los grupos y determinar si estaban dentro del nivel de significancia del 5% (0.05). Para realizar la prueba, se tuvieron en cuenta dos supuestos importantes ya que se trata de una prueba paramétrica:

- **Supuesto de Normalidad:** La variable tienen una distribución aproximadamente normal
- **Supuesto de igualdad de varianzas:** O también descrito como homogeneidad de varianzas entre las variables a comparar.

En este apartado, se empleó el lenguaje de programación R con su entorno R-Studio para realizar tres análisis fundamentales: normalidad, igualdad de varianzas y el test de interés.

Para normalidad: Test de Shapiro

H_0 : La muestra proviene de una poblacion con distribucion normal

H_a : La muestra no proviene de una poblacion con distribucion normal

Ecuación 4-1: Varianzas

Para un nivel de significancia del 0.05, se requerirá que el valor-p obtenido sea mayor que el nivel de significancia mencionado anteriormente.

Código:

shapiro.test (Variable 1)

shapiro.test (Variable 2)

Para igualdad de varianzas: Test de Fisher

$$H_0: \sigma_a^2 = \sigma_b^2$$

$$H_a: \sigma_a^2 \neq \sigma_b^2$$

Ecuación 4-2: Igualdad de varianzas: Test de Fisher

En el estudio también se consideró la igualdad de las varianzas, lo cual se puede demostrar mediante una simple ecuación:

$$H_0: \sigma_a^2 - \sigma_b^2 = 0$$

$$H_a: \sigma_a^2 - \sigma_b^2 \neq 0$$

Ecuación 4-3: La diferencia de varianzas es igual a cero

Cualquiera de estos es completamente valido y se llega al mismo resultado.

De manera análoga, el valor p obtenido debe ser mayor al nivel de significancia anteriormente propuesto (0.05), esto indicara que las varianzas son iguales y se puede proceder con el test T.

El código que se empleó en R fue:

var.test (Variable 1, Variable 2)

Para comparar medias: Test T de Student.

$$H_0: \mu_a = \mu_b$$

$$H_0: \mu_a = \mu_b$$

$$H_0: \mu_a = \mu_b$$

$$H_a: \mu_a \neq \mu_b$$

$$H_a: \mu_a > \mu_b$$

$$H_a: \mu_a < \mu_b$$

Ecuación 4-4: Comparación de medias: Test T de Student

Existen estas tres posibilidades de contraste donde, acorde al fenómeno de estudio se utilizó la hipótesis adecuada con el fin de garantizar los resultados obtenidos en laboratorio.

El código a empleado fue:

t.test (Variable 1, Variable 2, paired = TRUE)

A continuación, se presenta una tabla resumen de los resultados para cada variable. Se incluye información sobre la normalidad y homogeneidad de varianzas, así como los resultados del Test T para cada par de variables.

Tabla 4-18: Resumen de los valores p

Tabla resumen de los valores p segmentado por grupos de estudio					
Toxina con		Normalidad	Varianza	T-Test	Resultado
	Venenos mg/10ml	0,1288	0,2113	0,03125	Los promedios de suero y veneno son diferentes
	Suero Antiofidico	0,1183			
	B. Asper (µL)	0,2895	0,974	0,01094	La actividad de la fosfolipasa en Microphthalmus es menor a Asper
	B. Microphthalmus (µL)	0,9775			
Suero Antiofidico	I. Asper	0,1193	0,882	0,008123	La inhibición de la fosfolipasa A2 presente en Microphthalmus es mayor a Asper
	I. Microphthalmus	0,3058			
Extracto Piwi	II. Asper	0,4446	0,781	0,0239	La inhibición de la fosfolipasa A2 presente en Microphthalmus es mayor a Asper
	II. Microphthalmus	0,5395			
Suero Antiofidico	T. Asper	0,6769	0,4538	0,006965	La inhibición de la actividad de la hialuronidasa presente en las toxinas Asper es mayor que en Microphthalmus
	T. Microphthalmus	0,05298			
Extracto Piwi	TT. Asper	0,9966	0,9791	6,713E-05	La inhibición de la actividad de la hialuronidasa presente en las toxinas Microphthalmus es mayor que Asper
	TT. Microphthalmus	0,9365			
Suero Antiofidico	C. Asper	0,603	0,9113	0,03229	La inhibición de la actividad caseinolítica presente en las toxinas Asper es mayor que Microphthalmus
	C. Microphthalmus	0,6264			
Extracto Piwi	CC. Asper	0,4326	0,9365	0,005317	La inhibición de la actividad caseinolítica presente en las toxinas Microphthalmus es mayor que Asper
	CC. Microphthalmus	0,3298			
Suero Antiofidico	CO. Asper	0,9586	0,5912	0,001172	La inhibición de la actividad coagulante presente en las toxinas Asper es mayor que Microphthalmus
	CO. Microphthalmus	0,8919			
Extracto Piwi	COC. Asper	0,9584	0,5837	0,01129	La inhibición de la actividad coagulante presente en las toxinas Microphthalmus es mayor que Asper
	COC. Microphthalmus	0,5846			

Realizado por: Castillo, Gabriela, 2022.

Por último, se incluyeron las gráficas correspondientes a cada par en el estudio, permitiendo identificar la interacción entre ellas a partir de las diferentes dosis aplicadas.

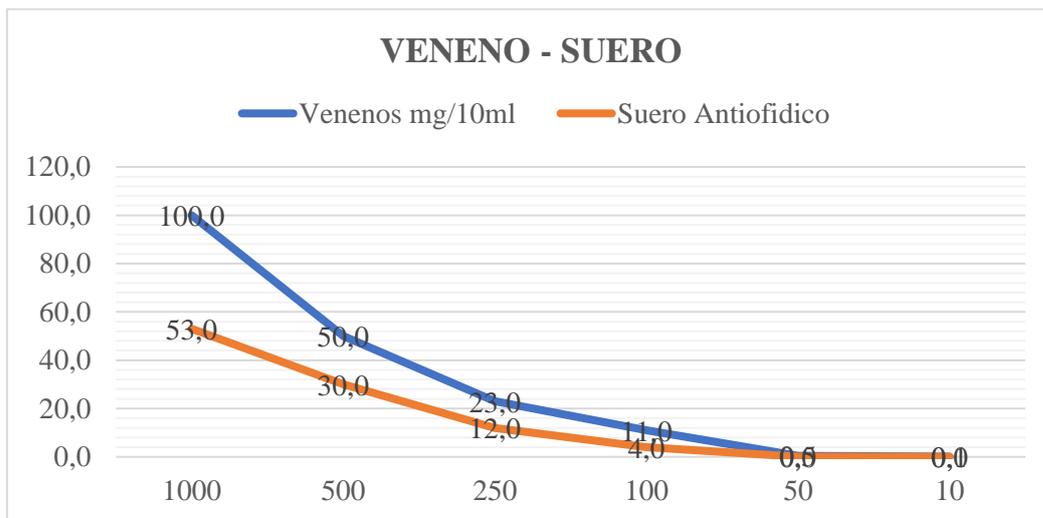


Ilustración 4-9: Veneno-Suero antiofídico

Realizado por: Castillo, Gabriela, 2022.

Se identificó que los valores del veneno eran superiores en comparación con los del suero. Como conclusión, se encontró mediante la prueba t que existía una diferencia significativa entre sus promedios.

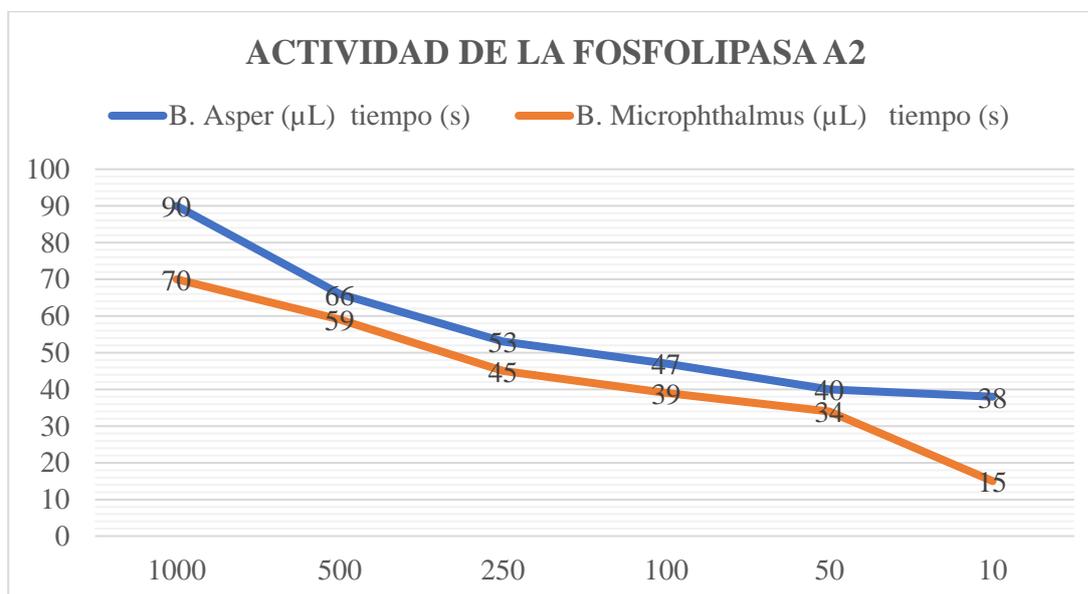


Ilustración 4-10: Actividad de la Fosfolipasa A2

Realizado por: Castillo, Gabriela, 2022.

En cuanto a la actividad de la fosfolipasa A2, se encontraron valores más bajos en *B. Microphthalmus* en comparación con *B. Asper*. Al medir el tiempo de respuesta, se pudo concluir que *B. Microphthalmus* tenía una respuesta más rápida que *B. Asper*.

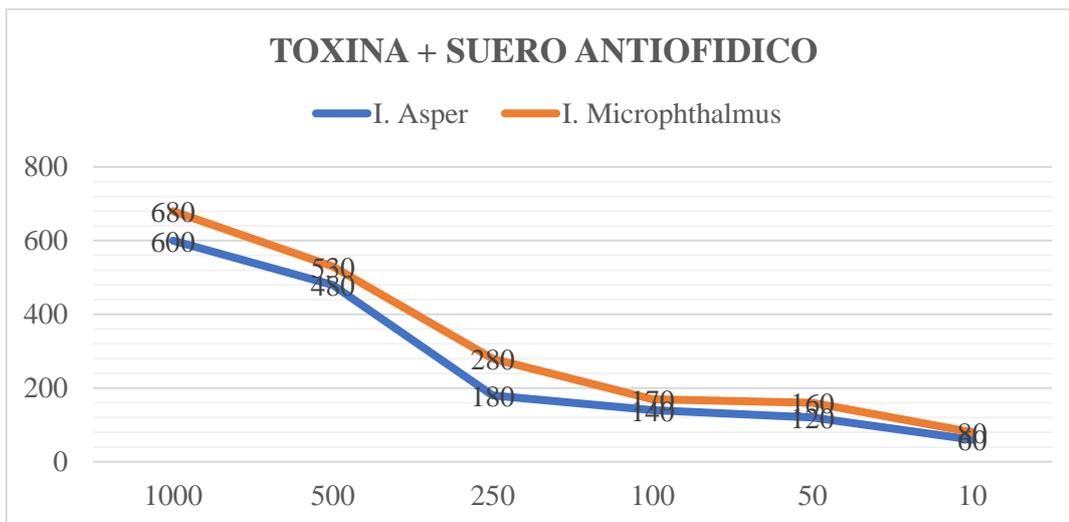


Ilustración 4-11: Inhibición de la Fosfolipasa A₂ en Toxinas con Suero Antiofídico

Realizado por: Castillo, Gabriela, 2022.

La inhibición de la fosfolipasa A₂ presente en toxinas con suero antiofídico muestra mayores valores para *Microphthalmus*, corroborando lo estudiado anteriormente en los test pertinentes.

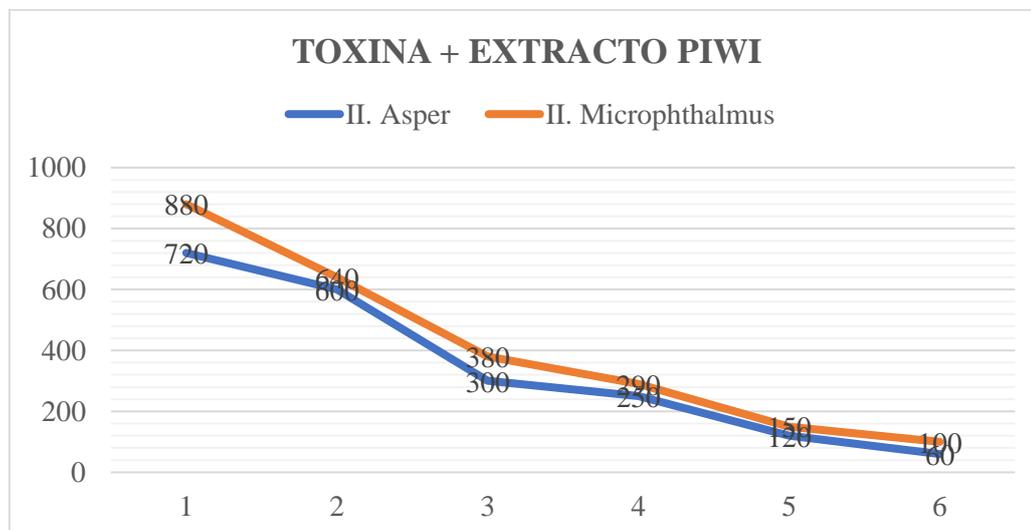


Ilustración 4-12: Inhibición de la fosfolipasa A₂ presente en toxinas con Extracto Piwi

Realizado por: Castillo, Gabriela, 2022.

Se pudo observar una mayor inhibición de la fosfolipasa A₂ presente en las toxinas mediante el uso del extracto piwi en la especie *B. Microphthalmus* en comparación con la especie *B. Asper*. Estos hallazgos fueron respaldados estadísticamente y se presentan en la tabla de resumen correspondiente.

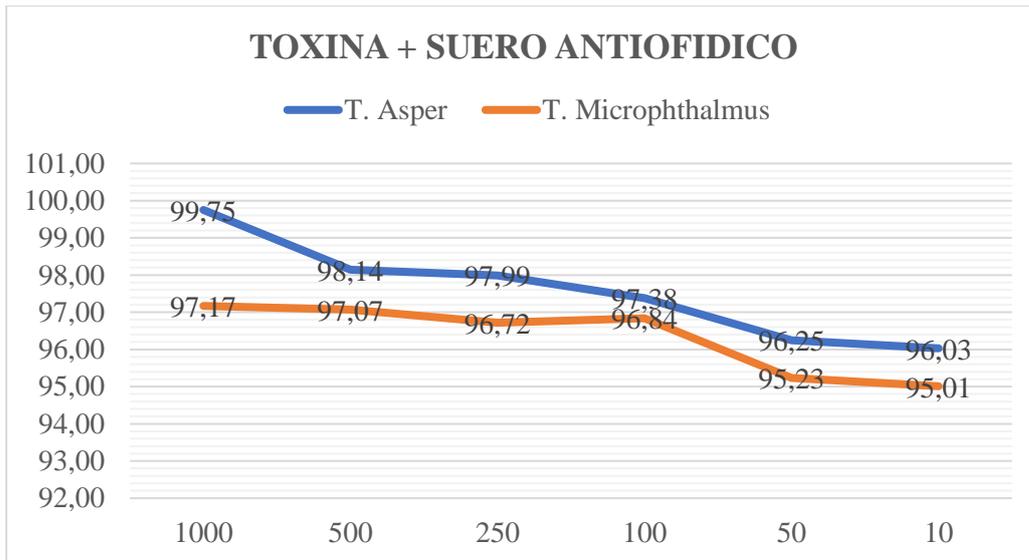


Ilustración 4-13: Inhibición de la actividad de la hialuronidasa presente en las toxinas con Suero Antiofídico

Realizado por: Castillo, Gabriela, 2022.

En el estudio se encontró que la inhibición de la actividad de la hialuronidasa presente en las toxinas fue mayor en *B. asper* que en *B. microphthalmus* cuando se utilizó suero antiofídico. Esto indica que la capacidad de inhibición de la hialuronidasa fue mayor en *B. asper* en comparación con *B. microphthalmus*.

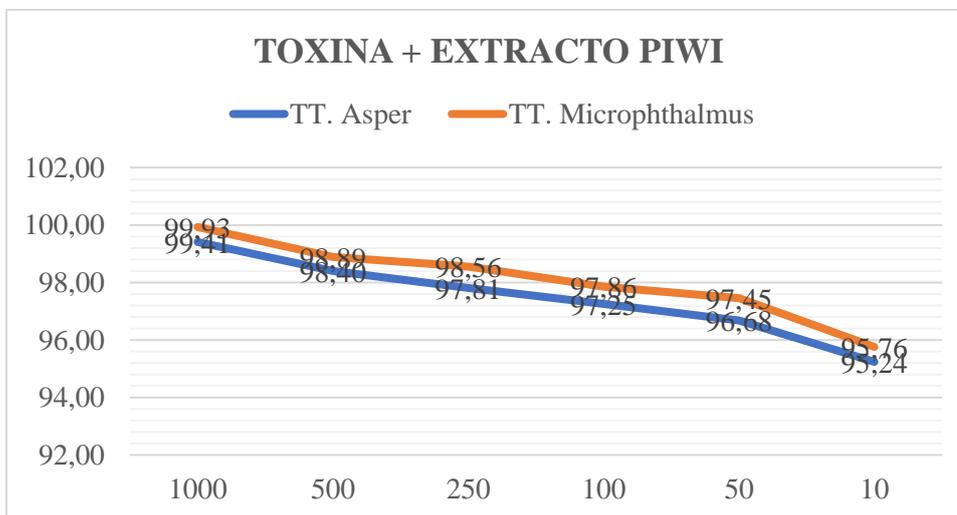


Ilustración 4-14: Inhibición de la actividad de la hialuronidasa presente en las toxinas con Extracto Piwi

Realizado por: Castillo, Gabriela, 2022.

Se encontró que la inhibición de la actividad de la hialuronidasa presente en las toxinas con el extracto de Piwi es mayor en *B. Microphthalmus*.

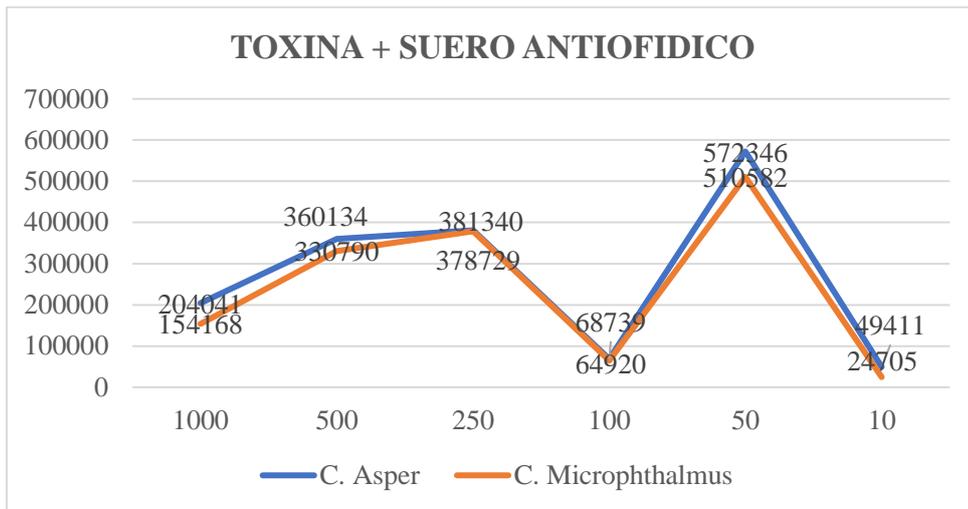


Ilustración 4-15: Inhibición de la actividad caseinolítica presente en las toxinas con Suero Antiofídico

Realizado por: Castillo, Gabriela, 2022.

La investigación reveló que la inhibición de la actividad caseinolítica en las toxinas fue mayor en *B. Asper* cuando se utilizó suero antiofídico. Además, se encontró que a medida que se disminuía la dosis de suero antiofídico, la actividad de las toxinas también disminuía. Sin embargo, se observó un aumento en la actividad de las toxinas en concentraciones de 50 ppm.

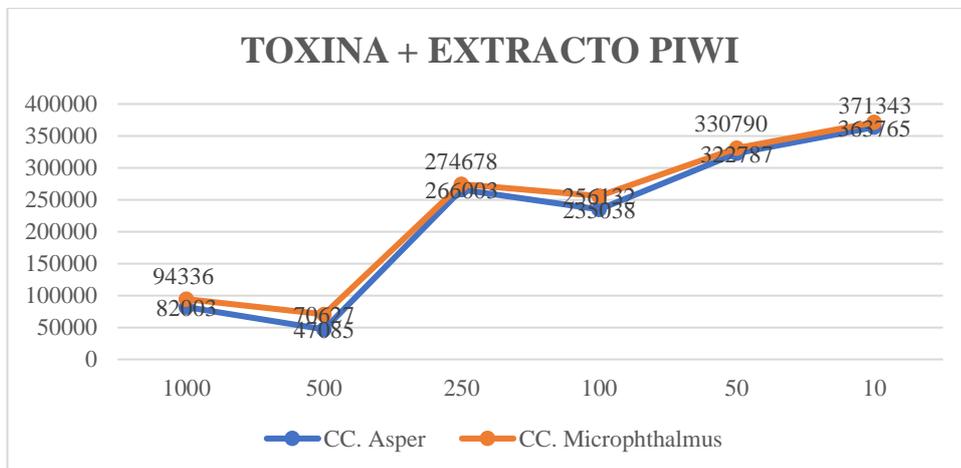


Ilustración 4-16: Inhibición de la actividad caseinolítica presente en las toxinas con Extracto Piwi

Realizado por: Castillo, Gabriela, 2022.

Se encontró que la inhibición de la actividad caseinolítica en las toxinas con el extracto Piwi fue mayor en *B. Microphthalmus*. Además, se observó que esta inhibición aumentaba a medida que disminuía la concentración.

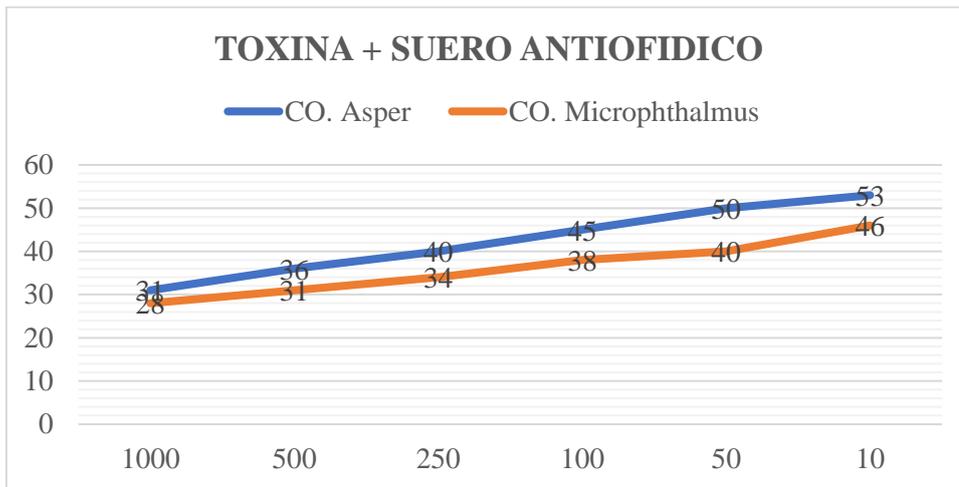


Ilustración 4-17: Inhibición de la actividad coagulante presente en las toxinas con Suero Antiofídico

Realizado por: Castillo, Gabriela, 2022.

La inhibición de la actividad coagulante presente en las toxinas con suero antiofídico es mayor en *B. Asper* y crece conforme decrece la concentración.

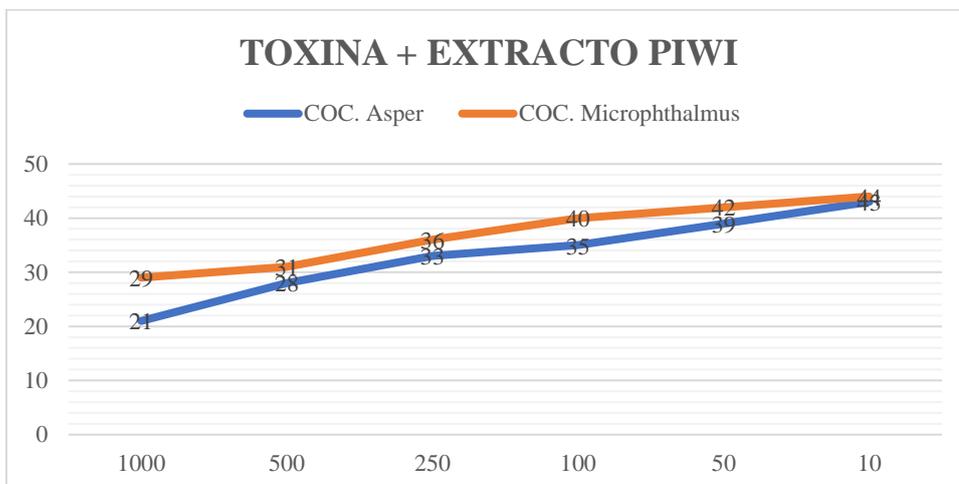


Ilustración 4-18: Inhibición de la actividad coagulante presente en las toxinas con Extracto Piwi

Realizado por: Castillo, Gabriela, 2022.

La inhibición de la actividad coagulante presente en las toxinas con extracto piwi es superior en *b. Microphthalmus* y esta aumenta conforme merma la concentración.

CAPÍTULO V

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

- Se ejecutó el control de calidad de la materia prima vegetal de la corteza del árbol *Piptocoma discolor*, los resultados adquiridos en los ensayos se encuentran dentro de los valores determinados por Farmacopea Británica.
- Al determinar la cantidad de fenoles 1043 mgEAG/l y flavonoides 44mg/IEQ presentes en el extracto hidroalcohólico de *Piptocoma discolor*, permiten pronosticar que tendrá una buena capacidad antiofídica por presentar: compuestos grasos, alcaloides, lactonas, cumarinas, quinomas, triterpenos, taninos del tipo (pirocatecolólicos y pirogalotánicos), polifenoles y flavonoides que refieren una posibilidad de una creación de un suero antiofídico a base de plantas.
- Se determinó que las concentraciones utilizadas para el presente estudio del extracto hidroalcohólico de *Piptocoma discolor*, tienen una actividad inhibitoria enzimática sobre las toxinas de las serpientes (*Bothrops asper*, *Bothrops microphthalmus*) en los métodos espectrofotómetros y de tiempo.
- Se comprobó por medio del análisis estadístico, la inhibición de las enzimas presentes en las toxinas de las serpientes (*Bothrops asper*, *Bothrops microphthalmus*), indicando que hubo una mayor inhibición enzimática de la hialuronidasa, FLA₂, coagulante y caseína en la toxina de la serpiente *Bothrops microphthalmus* en comparación la toxina de *Bothrops asper* al utilizar el extracto hidroalcohólico de la corteza de cuándo se aplica el extracto *Piptocoma discolor*.
- Se comprobó cuantitativamente las proteínas totales presentes en las toxinas de las serpientes (*Bothrops asper*, *Bothrops microphthalmus*) y del suero antiofídico, las proteínas de las toxinas nos permiten determinar el estado de salud, metabolismo y su sistema inmune para lo cual realizar un suero antiofídico con una eficacia superior sobre estas proteínas.

5.2. Recomendaciones

- Se recomienda a las personas que ocupan la corteza del árbol *Piptocoma discolor* para la manipulación en los casos por mordeduras de serpientes como la *B. asper* y *B. microphthalmus* delimitando su uso, debido a la toxicidad que puede causar en el organismo al utilizar en altas concentraciones.
- Es aconsejable realizar más estudios sobre el árbol *Piptocoma discolor* que pertenece a la familia *Asteraceae* debido que no existe estudios realizados anteriormente sobre sus propiedades medicinales y ancestrales.
- Se aconseja realizar más estudios con el árbol *Piptocoma discolor* en la inhibición de las enzimas presentes en las toxinas de las diferentes familias de serpientes venenosas de nuestro país.
- Para realizar los diferentes ensayos sobre la inactivación de las enzimas presentes en las toxinas de las serpientes, hay mantener el área de trabajo limpia sin impurezas y en óptimas condiciones de igual forma con los materiales a utilizar para no alterar el análisis por la sensibilidad que presentan las enzimas.

GLOSARIO

Foseta loreal: Son unos orificios que se localizan cerca de los orificios nasales, son utilizadas como una cámara térmica que le permite detectar el calor de sus presas a una distancia de 40cm (Darbaniyan et al. 2021 pág. 4).

Toxina: Comúnmente conocido como veneno, este es una combinación de proteínas emponzoñas que han ido evolucionando al pasar el tiempo, las serpientes lo utilizan para inmovilizar y matar a sus presas (De Roodt et al. 2005 pág. 11).

Miotoxinas: Son una cadena larga de 42-135 aminoácidos presentes, en las toxinas de las serpientes de la familia *Viperidae* que mejoran su toxicidad y actividad fosfolipasa (María Gutiérrez y Cerdas 1984, pag. 5).

Edema: Es la acumulación de líquido en el intersticio o en los tejidos causado por el traumatismo que facilita la retención de líquido, sodio en varias zonas localizadas (Flores et al., 2014, pág.51).

Equimosis: Son lesiones cutáneas, caracterizadas por el depósito de sangre debajo de la piel, y la herida está intacta. (Jiménez et al., 2016, pág.1).

Inflamación: Es una respuesta que activa el papel protector del cuerpo, es la capacidad del cuerpo para adaptarse a circunstancias inusuales. Es una respuesta al daño en los tejidos (Vega, 2008, pág.1).

Necrosis: Es la muerte de los tejidos por alguna lesión o enfermedad se considera irreversible porque la falta de sangre en los tejidos (Agudelo y López, 2010, pág.2).

BIBLIOGRAFÍA

1. **ALMEIDA, D.** Actividad alexítera de *adenostemma lavenia* l. (kuntze) y *pollalesta discolor* (kunt) aristeg. Sobre el veneno de *bothrops atrox* (pitalala) [En línea] (Trabajo de titulación). (Titulación) Universidad Politécnica Salesiana, Quito, Ecuador. 2018. págs. 20- 23. [Consulta: 2022-02-07]. Disponible en: <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/15658/1/UPS-QT12802.pdf>.
2. **AMARU BIOPARQUE CUENCA.** *Víbora Macanchi: Zoo Bioparque Amaru* [en línea] Cuenca-Ecuador. 2019. [Consulta: 14 noviembre 2021]. Disponible en: <https://www.zoobioparqueamaru.com/nuestros-animales/reptiles/>.
3. **AMARU.** *Cóndor andino: Zoo Bioparque Amaru* [en línea] Cuenca - Ecuador: Amaru Bioparque, 2018. [Consulta: 14 noviembre 2021]. Disponible en: <https://www.zoobioparqueamaru.com/>.
4. **BENÍTEZ CRUZ, G.** *Farmacognosia*. Ecuador: AndesEnciclopedias, 2021, págs. 1-13.
5. **BIOENCICLOPEDIA.** *Serpiente - Información y Características*. [en línea]. Ecuador: Andes Ediciones, 2015. [Consulta: 13 enero 2019]. Disponible en: <https://www.bioenciclopedia.com/serpiente/>.
6. **CAMPBELL, J.A. & LAMAR, W.W.** *The venomous reptiles of the Western Hemisphere*. Argentina: Manos Libros, 2004, págs. 477-870.
7. **CAMPOS FELIPE y ARROYO FRANK.** *Cenizo (Piptocoma discolor) iNaturalist Ecuador. género Piptocoma* [en línea]. Ecuador: Edito S/A, 2019. [Consulta: 5 febrero 2022]. Disponible en: <https://ecuador.inaturalist.org/taxa/545760-Piptocoma-discolor>.
8. **DARBANIYAN, F. Et al.** "Soft Matter Mechanics and the Mechanisms Underpinning the Infrared Vision of Snakes". *Matter* [en línea], 2021, 4(1), págs. 241-252. [Consulta: 7 febrero 2022]. ISSN 2590-2385. Disponible en: <https://www.investigacionyciencia.es/revistas/investigacion-y-ciencia/supernovas-extremas-821/la-visin-infrarroja-de-las-serpientes-19461>.
9. **DE ROODT, A.R. Et al.** "Toxicidad de venenos de serpientes de importancia médica en

- México". *Gaceta Medica de Mexico* [en línea], 2005, 141(1), págs. 13-21. [Consulta: 7 febrero 2022]. ISSN 0016-3813. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0016-38132005000100003.
10. **DÍAZ PAICO, L.Y.** Evaluación de las diferencias de las monografías de drogas vegetales entre las Farmacopeas Oficiales, como referente para el proyecto de Fitofarmacopea Peruana, CENSI - 2017 [en línea]. [En línea] (Trabajo de titulación). (Titulación) Universidad Politécnica Salesiana, Quito, Ecuador. 2018. págs. 7- 13. [Consulta: 2022-02-07]. Disponible en: <http://dspace.ups.edu.ec/handle/UNITRU/11146>.
 11. **ERAZO, G., Et al.** "El uso de pigüe (Piptocoma discolor) por los pequeños productores de Napo, Ecuador". *Brief* [en línea], 2014, 26(26), págs. 1-6. [Consulta: 9 enero 2022]. ISSN 1254-7477. Disponible en: <https://docplayer.es/12364469-El-uso-de-pigue-piptocoma-dicolor-por-los-pequenos-productores-de-napo-ecuador.html>.
 12. **EVELYN, D. y BRUSSEL, V.** *Ofidismo*. [en línea]. Ecuador: Sin Lineas edit, 2011. [Consulta: 16 diciembre 2022]. Disponible en: <http://ambiental.uaslp.mx/Urgencias/Serpientes.pdf>.
 13. **GALLEGOS ZURITA, M.** "Las plantas medicinales: principal alternativa para el cuidado de la salud, en la población rural de Babahoyo, Ecuador". *Scielo* [en línea], 2016, 77(4), págs. 3-27. [Consulta: 28 noviembre 2022]. ISSN 1025-5583. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1025-55832016000400002&lng=es&nrm=iso&tlng=es.
 14. **GARCÍA, V. Et al.** "La amazonia ecuatoriana y sus saberes ancestrales ; el uso del extracto de corteza del árbol de Piwi (Piptocoma discolor) un saber singular en el accidente ofídico The Ecuadorian Amazon and its ancestral knowledge ; the use of the bark extract". *Rev Mex Cienc Farm* [en línea], 2019, 47(4), págs. 26-34. [Consulta: 20 diciembre 2022]. ISSN. 2541-8541. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57956612002>.
 15. **GARMAN M.** *Sistema Integrado de Información Taxonómica* [en línea]. Ecuador: Santillan, 1883. [Consulta: 11 enero 2022]. Disponible en: https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=585769#null.

16. **GELLIN CABALLERO, Israel, pág.** *El uso de pigo (Piptocoma discolor) por los pequeños productores de Napo, Ecuador: Manejo sostenible de una especie pionera de madera para los medios de vida locales.* [en línea]. Ecuador: NapoEdit, 2014. [Consulta: 14 enero 2022]. Disponible en: <http://www.cifor.org/library/4424/el-uso-de-pigo-piptocoma-dicolor-por-los-pequenos-productores-de-napo-ecuador-manejo-sostenible-de-una-especie-pionera-de-madera-para-los-medios-de-vida-locales>.
17. **IVAS, D. et al.** *Acción del antiveneno botrópico polivalente sobre las actividades proteolíticas presentes en los venenos De serpientes peruanas* [en línea]. Perú: Pacha Libros, 2015. [Consulta: 30 noviembre 2022]. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1726-46342008000200002&script=sci_arttext&tlng=pt.
18. **MALLA GUTIÉRREZ, J. y CERDAS, L.** "Mecanismo de acción de miotoxinas aisladas de venenos de serpientes". *Revista UCE*, vol.5, n°4 (1984), págs. 1-9.
19. **MENDOZA, J. C. et al.** 2008. "Efecto del antiveneno botrópico sobre las actividades De fosfolipasa a 2 , L-aminoácido oxidasa Y hialuronidasa De los venenos De serpientes peruanas". *Rev Peru Med Exp Salud Publica* [en línea], 2008, 25(2), págs. 174-174. [Consulta: 17 diciembre 2022]. ISSN 2698-0102. Disponible en: https://www.researchgate.net/profile/Silvia_Pessah/publication/256296409_Action_of_polivalent_bothropic_antivenom_on_proteolytic_activities_from_Peruvian_snake_venoms/links/0d0d9b34f275cc8e389efef2/Action-of-polivalent-bothropic-antivenom-on-proteolytic-a.
20. **MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA DEL ECUADOR y GOBIERNO DE LA REPÚBLICA DEL ECUADOR,** *Manejo clínico del envenamiento por mordeduras de serpientes venenosas y picaduras de escorpiones. Protocolo basado en evidencia* [en línea]. S.l.: s.n. [Consulta: 17 diciembre 2022]. Ecuador: Alix Edit, 2017. Disponible en: https://aplicaciones.msp.gob.ec/salud/archivosdigitales/documentosDirecciones/dnn/archivos/AC_00153_2017_21_NOV.pdf.
21. **MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA DEL ECUADOR y GOBIERNO DE LA REPÚBLICA DEL ECUADOR,** *Manejo clínico del envenamiento por mordeduras de serpientes venenosas y picaduras de escorpiones. Protocolo basado en evidencia* [en línea]. S.l.: s.n. [Consulta: 9 diciembre 2018]. Ecuador: Alix Edit, 2017. Disponible en: https://aplicaciones.msp.gob.ec/salud/archivosdigitales/documentosDirecciones/dnn/archivos/AC_00153_2017_21_NOV.pdf.

s/AC_00153_2017 21 NOV.pdf.

22. **MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA DEL ECUADOR.** *Normas manejo de Accidentes Ofídicos*. [en línea]. Ecuador: Andes S/A, 2008. [Consulta: 17 diciembre 2022]. Disponible en:
[https://aplicaciones.msp.gob.ec/salud/archivosdigitales/documentosDirecciones/dnn/archivos/MANUAL DE NORMAS PROCEDIM. PREVENC.MORDEDURA DE SERPIENTES\(1\).pdf](https://aplicaciones.msp.gob.ec/salud/archivosdigitales/documentosDirecciones/dnn/archivos/MANUAL_DE_NORMAS_PROCEDIM_PREVENC.MORDEDURA_DE_SERPIENTES(1).pdf).
23. **MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA DEL ECUADOR.** *Normas manejo de Accidentes Ofídicos* [en línea]. Ecuador: Alix Edit, 2008. [Consulta: 9 diciembre 2022]. Disponible en:
[https://aplicaciones.msp.gob.ec/salud/archivosdigitales/documentosDirecciones/dnn/archivos/MANUAL DE NORMAS PROCEDIM. PREVENC.MORDEDURA DE SERPIENTES\(1\).pdf](https://aplicaciones.msp.gob.ec/salud/archivosdigitales/documentosDirecciones/dnn/archivos/MANUAL_DE_NORMAS_PROCEDIM_PREVENC.MORDEDURA_DE_SERPIENTES(1).pdf).
24. **MOHAPATRA, B. et al.** "Mortalidad por mordedura de serpiente en la India: una encuesta de mortalidad representativa a nivel nacional". *Neglected Tropical Diseases* [en línea], 2011, 5(4), págs. 3-6. [Consulta: 11 diciembre 2022]. ISSN 1935-2727. Disponible en:
<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0001018>.
25. **MOHAPATRA, B. et al.** Snakebite Mortality in India: A Nationally Representative Mortality Survey. *Neglected Tropical Diseases* [en línea]. Argentina: Santilla Edit, 2011. [Consulta: 17 diciembre 2022]. Disponible en:
<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0001018>.
26. **NINA CUEVA, O. et al.** "Biochemical characterization of Bothrops roedingeri Mertens, 1942 snake venom and its edematogenic, hemorrhagic, and myotoxic activities". *Biomedica*, [en línea]. 2020, 40(4), págs. 682-683. [consulta: 20 diciembre 2022]. ISSN 25907379. Disponible en: 10.7705/BIOMEDICA.5228.
27. **NORYL TAMAYO, A.** "Bothrocophias microphthalmus". *Biosciencie* [en línea], 2008, 2(1), págs. 2004-2005. [Consulta: 14 noviembre 2022]. ISSN. 1021-1458. Disponible en:
[https://bioweb.bio/faunaweb/reptiliaweb/FichaEspecie/Bothrocophias microphthalmus](https://bioweb.bio/faunaweb/reptiliaweb/FichaEspecie/Bothrocophias_microphthalmus).
28. **OSORIO HUALPA, Michael Crhistopher.** *Mordeduras de serpientes, factores* [en línea]. Ecuador: Publish Ecuador, 2016. [Consulta: 17 diciembre 2022]. Disponible en:

http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/18580/1/TESIS_1.pdf.

29. **PEREAÑEZ J. et al.** "Inhibición de las actividades proteolítica, coagulante y hemolítica indirecta inducidas por el veneno de *Bothrops asper* por extractos etanólicos de tres especies de heliconias". *Vitae* [en línea], 2008, 15(1), págs. 157-164. [Consulta: 18 diciembre 2022]. ISSN 0121-4004. Disponible en: <http://aprendeenlinea.udea.edu.co/revistas/index.php/vitae/article/view/780>.
30. **PEREAÑEZ J. et al.** "Inhibición de las actividades proteolítica, coagulante y hemolítica indirecta inducidas por el veneno de *Bothrops asper* por extractos etanólicos de tres especies de heliconias". *Vitae* [en línea], 2008, 15(1), págs. 157-164. [Consulta: 30 noviembre 2022]. ISSN. 0121-4004. Disponible en: <http://aprendeenlinea.udea.edu.co/revistas/index.php/vitae/article/view/780/672>.
31. **PÉREZ, A.** *Ofidico: biología de las serpientes. Manual ofidico* [en línea]. Ecuador: BookGreen, 2012. [Consulta: 13 noviembre 2022]. Disponible en: <http://manual-ofidico.blogspot.com/2012/08/biologia-de-las-serpientes-en-el.html>.
32. **SÁNCHEZ, E. et al.** "Caracterización bioquímica y biológica del veneno de la serpiente Neotropical Macagua (*Bothrops Colombiensis*) de la región de Barlovento, estado Miranda, Venezuela". *Rev. cuba. med. trop* [en línea], 2015, 67(2), págs. 10-23. [Consulta: 14 enero 2022]. ISSN. 0375-0760. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602015000200008.
33. **SOLER, D. et al.** "Aspectos toxinológicos y clínicos de la mordedura por serpientes venenosas en animales domésticos". *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia* [en línea], 2017, 53(2), págs. 105-115. [Consulta: 13 enero 2022]. ISSN. 0120-2952. Disponible en: http://www.bioatividade.hpg.ig.com.br/denticao_ofidios.
34. **STEVENS, pág.F.** *Angiosperm Phylogeny Website*. [en línea]. Chile: Ediciones frontera, 2018. [Consulta: 9 enero 2022]. Disponible en: <http://www.mobot.org/MOBOT/Research/APweb/orders/asteralesweb.htm#Asteraceae>.
35. **VALAREZO-SEVILLA, D. et al.** "Accidente ofídico en pacientes del Hospital Básico de Jipijapa (Manabí-Ecuador)". *Rev. Holguín* [en línea], 2017, 21(3), págs. 647-656. [Consulta: 10 diciembre 2022]. ISSN. 1560-4381. Disponible en:

http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1560-43812017000300004.

36. **VALENCIA, Renato.** Ecuador Terra Incognita - flora del ecuador. *e-travelware* [en línea]. Ecuador: Ediciones Ambato, 2020. [Consulta: 17 diciembre 2022]. Disponible en: http://www.terraecuador.net/revista_6/6_nuestra_flora.htm.
37. **VANACLOCHA, B.** Et al. *La fitoterapia racional*. España: MicroBooks, 2017, págs. 2-17.
38. **VIZUETE, C.** *Bionova* [en línea], Ecuador: Libros colección. 2018. [Consulta: 2 enero 2022]. Disponible en: <http://www.bionova.org.es/biocast/documentos/tema14.pdf>
39. **ZÚÑIGA CARRASCO, Janett Caro.** 2013. "Aspectos clínicos y epidemiológicos de la mordedura de serpientes en México". *Medigraphic* [en línea], 2013, 6(4), págs. 125-136. [Consulta: 20 diciembre 2022]. Disponible en: www.medigraphic.com/emiswww.medigraphic.org.mx.

ANEXOS

ANEXO A: RECOLECCIÓN DE LA MATERIA PRIMA VEGETAL PIWI



Piptocoma discolor en fase de crecimiento y obtención de la materia vegetal
Provincia de Napo - Tena - Archidona

ANEXO B: CONTROL DE CALIDAD DE LA CORTEZA SECA DE *PIPTOCOMA DISCOLOR*



Corteza desecada de *Piptocoma discolor*.



Corteza triturada de *Piptocoma discolor*.



Obtención de humedad de la corteza



Obtención de cenizas totales

ANEXO C: TAMIZAJE FITOQUÍMICO



Tamizaje fitoquímico del extracto acuoso



Tamizaje fitoquímico del extracto hidroalcohólico.



Tamizaje fitoquímico del extracto etéreo

ANEXO D: EXTRACCIÓN DEL EXTRACTO DE LA CORTEZA DE *PIPTOCOMA DISCOLOR*.



Obtención del extracto concentrado de la corteza de *Piptocoma discolor*, en el rotavapor.

ANEXO E: RECOLECCIÓN DE LAS TOXINAS DE *B. ASPER* Y *B. MICROPHTHALMUS*



B. Microphthalmus



B. Asper

ANEXO F: LIOFILIZACIÓN DE LAS TOXINAS DE *B. ASPER* Y *B. MICROPHTHALMUS*



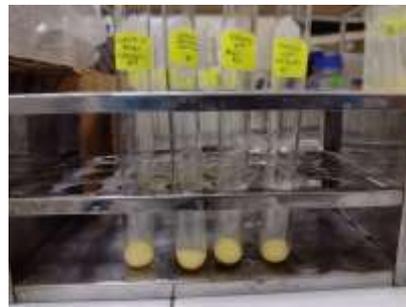
TOXINA DE *B. Asper*



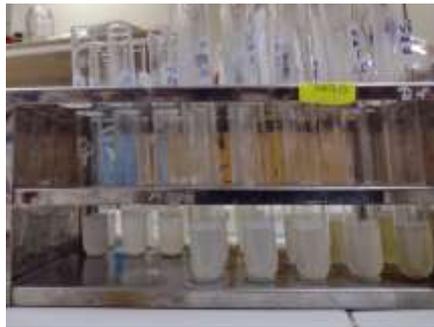
TOXINA DE *B. Microphthalmus*

ANEXO G: DETERMINACIÓN DE LA INHIBICIÓN ENZIMÁTICA DE LAS TOXINAS

- Determinación de la inhibición de la actividad de la Fosfolipasa A₂ {(Toxina + suero antifídico) y (Toxina + Extracto concentrado)}



- Determinación de la inhibición en la actividad de la Hialuronidasa {(Toxina + suero antifídico) y (Toxina + Extracto concentrado)}



- Determinación de la inhibición en la actividad de Caseinólisis {(Toxina + suero antifídico) y (Toxina + Extracto concentrado)}



- Determinación de la inhibición en la actividad de Coagulante {(Toxina + suero antiofidico) y (Toxina + Extracto concentrado)}

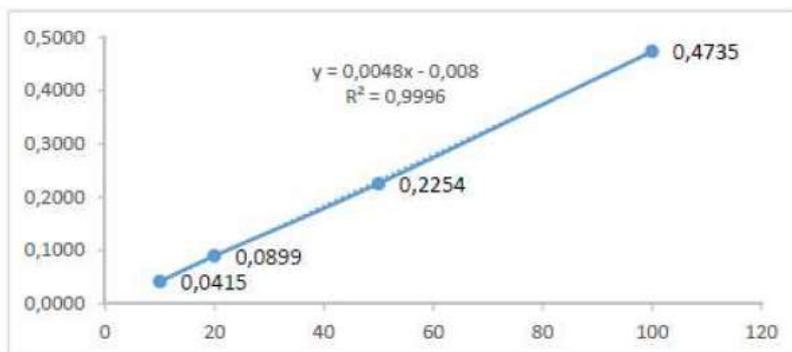


- Determinación de las proteínas presentes en las toxinas y el suero antiofidico



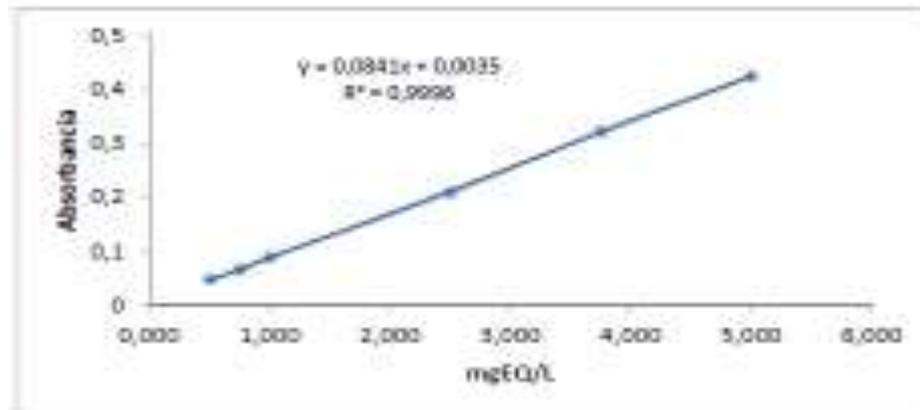
ANEXO H: CURVA DE CALIBRACIÓN DEL REACTIVO DE FOLIN-CIOCALTEU

Muestra	Abs	Conc. Mg EAG/L	Dilución	mgEAG/L	Promedio
St 10	0,0415	10			
St 20	0,0899	20			
St 50	0,2254	50			
St 100	0,4735	100			
22-861	0,0960	21,7	50	1085	1043
22-861 Dup	0,0879	20,0	50	1001	



ANEXO I: CURVA DE CALIBRACIÓN DE LA QUERCETINA

CURVA DE CALIBRACION						
Quercetina		50 mg/L				
Muestra	V (ul)	V AcDNA (ul)	V Al(NO3)3 (ul)	V final (ml)	Abs	Conc. mgEQ/L
St 1	100	500	500	10	0,0477	0,500
St 2	150	500	500	10	0,0656	0,750
St 3	200	200	200	10	0,0885	1,000
St 4	500	200	200	10	0,2086	2,500
St 5	750	200	200	10	0,322	3,750
St 6	1000	200	200	10	0,4239	5,000
Pendiente					0,0840821	
Ordenada					0,005512	
r2					0,9996328	



ANEXO J: AUTORIZACIÓN DE MOVILIZACIÓN DE ESPECÍMENES DE FLORA Y FAUNA SILVESTRE



**Ministerio del Ambiente, Agua
y Transición Ecológica**

AUTORIZACIÓN DE MOVILIZACIÓN DE ESPECÍMENES DE FLORA Y FAUNA SILVESTRE

Nro. 42-08-2022-V8-OTTEIDZ8-MAAE

Fecha de emisión: 04 de agosto de 2022
 Fecha de movilización: 06 de agosto de 2022
 Válido hasta: 06 de agosto de 2022 Hora: 23H00

La Dirección Zonal 8 Napo del Ministerio del Ambiente y Agua y Transición Ecológica Autoriza a: Diego Renato Vinuesa Tapie con C.I. N° 0603187154, Investigador de la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO, a la movilización de especímenes de: Muestras Biológicas (X), Fauna (), Flora (X) desde: Cantón Archidona, provincia de Napo hacia: La ciudad de Riobamba a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, cantón Riobamba, Provincia de Chimborazo, Panamericana Sur Km 1 1/2 de acuerdo al siguiente detalle:

Observaciones:

NOMBRE CIENTÍFICO	NOMBRE COMUN	DESCRIPCIÓN DEL ESPECÍMEN O PARTE CONSTITUTIVA	ESTADO	CANTIDAD
Pithecolobium discolor	Plát	Muestras de la familia Asteraceae	Muestra preservada en papel periódico y en una funda ziploc	6
TOTAL 01 muestras de plantas				6

Los especímenes de fauna silvestre se movilizarán en:

Vehículo: CHEVROLET CORSA Placas: H03 0669

Responsable Movilización: Gabriela Castillo C.I. 0808838868

Los especímenes van en calidad de:

Traslado al centro de manejo () Nombre del centro de manejo:

Recolección (X) Nombre de la Recolección: "ESTUDIO DE LA BIODIVERSIDAD EN EL ECUADOR, ECOLOGÍA, CONSERVACIÓN Y SU POTENCIAL USO SOSTENIBLE" MAE-ONB-CM-2018-0086

Firma de responsabilidad:



Ing. Christian Alfredo Merino Castro
RESPONSABLE OFICINA TÉCNICA TENA
 DIRECCIÓN ZONAL 8 NAPO

ANEXO K: IDENTIFICÓ: CERTIFICADO DE IDENTIFICACIÓN DE PIPTOCOMA DISCOLOR



HERBARIO POLITECNICA CHIMBORAZO (CHEP)
ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL CHIMBORAZO
Panamericana sur Km 1, fono: (03) 2 998-200 ext. 700123, jcaranqui@ysbaa.com
Riobamba Ecuador

Ofc.No.010.CHEP.2022

05 de Mayo del 2022

Msc. Karen Acosta

**RESPONSABLE TÉCNICA
CONTRATO MARCO DE ACCESO A LOS RECURSOS GENÉTICOS**

Reciba un atento y cordial saludo, por medio de la presente certifico que dentro del Contrato Marco de Acceso a los Recursos Genéticos asignado con el: Nro-MAE-DNB-CM-2018-0086, que la señorita Castillo Mora Jennifer Gabriela con Cí: 060333865-8, tesista de Bioquímica y Farmacia, se identificó: *Piptocoma discolor*. Esta especie es nativa, se revisó en el herbario y se archivarán en el lapso de un año para los fines pertinentes. Es todo cuanto puedo decir en honor a la verdad y la interesada puedo usar el presente certificado como crea conveniente

Atte.

JORGE
MARCELO
CARANQUI
ALDAZ

Firmado digitalmente
por JORGE MARCELO
CARANQUI ALDAZ
Fecha: 2022.05.05
09:09:17 -05'00'

Ing. Jorge Caranqui Msc.
Responsable
HERBARIO ESPOCH

HERBARIO
POLITECNICO
ESPOCH
FACULTAD DE
RECURSOS
NATURALES



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
CERTIFICADO DE CUMPLIMIENTO DE LA GUÍA PARA
NORMALIZACIÓN DE TRABAJOS DE FIN DE GRADO

Fecha de entrega: 23 / 02 / 2024

INFORMACIÓN DEL AUTOR
Nombres – Apellidos: Jennifer Gabriela Castillo Mora
INFORMACIÓN INSTITUCIONAL
Facultad: Ciencias
Carrera: Bioquímica y Farmacia
Título a optar: Bioquímica Farmacéutica
<div style="text-align: center;"> Firmado digitalmente por: DIEGO RENATO VINUEZA TAPIA</div> <p>Firma del Director del Trabajo de Titulación</p> <div style="text-align: center;"> Firmado digitalmente por: KAREN LISSETH</div> <p>Firma del Asesor del Trabajo de Titulación</p>