



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA**

**“DETERMINACIÓN DE LA INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD  
ENZIMÁTICA DEL VENENO DE DOS ESPECIES DE  
SERPIENTES (*Bothrops spp.*) POR *Cordyline fruticosa*”**

**TRABAJO DE TITULACIÓN**

**TIPO:** Trabajo Experimental

Presentado para optar al grado académico de:

**BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA**

**AUTORA:** MARIZA LISSET DÍAZ VALDIVIEZO

**DIRECTOR:** BQF. DIEGO RENATO VINUEZA TAPIA, M.Sc.

Riobamba – Ecuador

2020

© 2020, Mariza Lisset Díaz Valdiviezo

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, Mariza Lisset Díaz Valdiviezo declaro que el presente trabajo de titulación es de mi autoría y los resultados del mismo son auténticos. Los textos en el documento que provienen de otras fuentes están debidamente citados y referenciados.

Como autora asumo la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este trabajo de titulación; El patrimonio intelectual pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo

Riobamba, 20 de enero 2020.



**Mariza Lisset Díaz Valdiviezo**

**CI: 150072139-2**

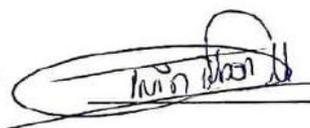
**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA**  
**CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA**

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 spp.*) POR *Cordyline fruticosa***”, realizado por la señora Mariza Lisset Díaz Valdiviezo 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**

Dr. Tubón Usca Irvin Ricardo  
**PRESIDENTE DEL TRIBUNAL**



\_\_\_\_\_

BQF. Vinueza Tapia Diego Renato, M.Sc.  
**DIRECTOR/A DEL TRABAJO DE TITULACION**



\_\_\_\_\_

BQF. Pilco Bonilla Gisela Alexandra, M.Sc.  
**MIEMBRO DE TRIBUNAL**



\_\_\_\_\_

## **DEDICATORIA**

A mis Padres Gustavo y Mariana por su ejemplo de perseverancia y apoyo constante. Además, por ser mi ejemplo a seguir y brindarme sus sabios consejos, así como estar presentes en cada etapa de mi vida.

**Mariza**

## AGRADECIMIENTO

Agradezco primero a Dios, por ayudarme en los momentos que más lo necesité, y por acompañarme en este camino para ser profesional.

A mis queridos padres Gustavo Díaz y Mariana Valdiviezo por apoyarme siempre, quiero seguir sus pasos, son el mejor ejemplo.

A mis hermanas Kelmy, Dayanara y Marazca, por estar conmigo en las buenas y en las malas, por enseñarme que acompañadas se realizan mejor las cosas.

A mi esposo David y a mi hijo Sebastián por ser mi felicidad más grande y mi razón de ser.

Quiero agradecer al Sr. Gabriel Grefa y su Sra. esposa Mercedes Mamallacta pertenecientes a la comunidad Kichwa de Santo Domingo, cantón Archidona, provincia de Napo; quienes abrieron las puertas de su hogar y me supieron compartir saberes ancestrales que fueron muy importantes en el desarrollo de esta presente investigación.

A mi tutor Diego Vinueza quién me ha guiado y me ha inculcado en la realización este proyecto.

Gracias a todos por formar parte de lo que soy ahora, Dios les bendiga siempre.

**Mariza**

## TABLA DE CONTENIDO

<b>RESUMEN</b> .....	<b>xiv</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>xv</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>1 MARCO TEÓRICO</b> .....	<b>6</b>
1.1 Serpientes .....	6
1.2 Familia Viperidae (víboras).....	6
1.2.1 <i>Dentadura solenoglifa</i> .....	7
1.3 Toxina.....	7
1.4 <i>Bothrops atrox</i> (Pitalala) .....	8
1.5 <i>Bothrops asper</i> (Terciopelo) .....	9
1.6 Ofidiotoxicosis.....	11
1.7 Aspectos de accidentes ofídicos.....	11
1.8 Suero antiofídico.....	12
1.9 Etnomedicina .....	13
1.10 Biodiversidad del Ecuador.....	13
1.11 Uso de la biodiversidad .....	14
1.12 Actividad biológica de las plantas .....	14
1.13 Planta medicinal .....	15
1.14 Droga vegetal .....	15
1.15 Farmacoetnología .....	15
1.16 Familia Asparagaceae .....	15
1.17 <i>Cordyline fruticosa</i> (Marpindo) .....	16
1.17.1 <i>Nombres comunes</i> .....	17
1.17.2 <i>Descripción botánica</i> .....	17
1.17.3 <i>Usos</i> .....	17
1.18 Fosfolipasa .....	17
1.19 Hialuronidasa .....	18
<b>2 MARCO METODOLÓGICO</b> .....	<b>19</b>
2.1 Lugar de la investigación .....	19
2.2 Recolección de la materia vegetal.....	19
2.3 Identificación botánica .....	19
2.4 Equipos, materiales y reactivos .....	20

2.4.1	<i>Equipos</i> .....	20
2.4.2	<i>Materiales</i> .....	20
2.4.3	<i>Reactivos</i> .....	21
2.5	<b>Técnicas y Métodos</b> .....	22
2.5.1	<i>Acondicionamiento del material vegetal</i> .....	23
2.5.2	<i>Control de calidad</i> .....	23
2.5.3	<i>Preparación del extracto de hojas secas de Cordyline fruticosa</i> .....	25
2.5.4	<i>Evaluación de la actividad inhibitoria</i> .....	25
2.5.5	<i>Procesamiento de datos</i> .....	27
2.5.6	<i>Análisis estadístico</i> .....	28
3	<b>MARCO DE RESULTADOS, DISCUSIÓN Y ANÁLISIS</b> .....	29
3.1	<b>Control de calidad del material vegetal</b> .....	29
3.2	<b>Tamizaje fitoquímico</b> .....	30
3.3	<b>Determinación de la Fosfolipasa A2</b> .....	31
3.4	<b>Actividad de la Hialuronidasa</b> .....	34
3.5	<b>Actividad caseinolítica</b> .....	37
3.6	<b>Actividad coagulante</b> .....	39
3.7	<b>Análisis estadístico</b> .....	40
3.7.1	<i>Inhibición de la Fosfolipasa A2</i> .....	40
3.7.2	<i>Inhibición de la hialuronidasa</i> .....	45
3.7.3	<i>Inhibición de la actividad caseinolítica</i> .....	50
3.7.4	<i>Inhibición de la actividad coagulante</i> .....	55
	<b>CONCLUSIONES</b> .....	60
	<b>RECOMENDACIONES</b> .....	61
	<b>GLOSARIO</b>	
	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	
	<b>ANEXOS</b>	

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1-1:</b> Manifestaciones según el accidente bothrópico .....	12
<b>Tabla 2-1:</b> Taxonomía.....	16
<b>Tabla 1-3:</b> Resultados de los parámetros de calidad de hojas de <i>Cordyline fruticosa</i> .....	29
<b>Tabla 2-3:</b> Resultados del tamizaje fitoquímico, extracto de hojas de <i>C. fruticosa</i> . ....	30
<b>Tabla 3-3:</b> Actividad de la fosfolipasa presente en la toxina de serpientes <i>B.atrox</i> y <i>B. asper</i> . .	31
<b>Tabla 4-3:</b> Inhibición de la FLA2 presente en las toxinas de <i>B.atrox</i> y <i>B. asper</i> por suero antiofídico y el extracto. ....	33
<b>Tabla 5-3:</b> Inhibición de la hialuronidasa presente en las toxinas de <i>B. atrox</i> y <i>B. asper</i> mediante suero antiofídico y el extracto de <i>C. fruticosa</i> . ....	34
<b>Tabla 6-3:</b> Inhibición de la actividad caseinolítica en la toxina de las serpientes <i>B. atrox</i> y <i>B. asper</i> mediante <i>C. fruticosa</i> y suero antiofídico polivalente. ....	37
<b>Tabla 7-3:</b> Actividad coagulante de las toxinas de <i>B. atrox</i> y <i>B. asper</i> .....	39
<b>Tabla 8-3:</b> Inhibición de la actividad coagulante.....	39
<b>Tabla 9-3:</b> Inhibición de la fosfolipasa A2 en la toxina de <i>B. atrox</i> con Suero antiofídico y <i>C. fruticosa</i> .....	40
<b>Tabla 10-3:</b> Análisis estadístico. Inhibición la toxina de <i>B. atrox</i> , ANOVA. ....	41
<b>Tabla 11-3:</b> Datos de la inhibición de la fosfolipasa A2 en la toxina de <i>B. asper</i> con Suero antiofídico Vs <i>Cordyline fruticosa</i> .....	43
<b>Tabla 12-3:</b> Análisis estadístico. Inhibición de la fosfolipasa A2 en la toxina de <i>B. asper</i> , ANOVA. ....	43
<b>Tabla 13-3:</b> Inhibición de la hialuronidasa en la toxina de <i>B. atrox</i> . Suero antiofídico Vs <i>Cordyline fruticosa</i> .....	45
<b>Tabla 14-3:</b> Análisis estadístico. Inhibición de la hialuronidasa en la toxina de serpiente de <i>B. atrox</i> , ANOVA.....	46
<b>Tabla 15-3:</b> Datos de la inhibición de la hialuronidasa en la toxina de <i>B. asper</i> . Suero antiofídico Vs <i>Cordyline fruticosa</i> .....	48
<b>Tabla 16-3:</b> Análisis estadístico. Inhibición de la hialuronidasa en la toxina de serpiente <i>B. asper</i> , ANOVA. ....	48
<b>Tabla 17-3:</b> Inhibición de la actividad caseinolítica en la toxina de <i>B. atrox</i> . Suero antiofídico Vs <i>Cordyline fruticosa</i> .....	50
<b>Tabla 18-3:</b> Análisis estadístico. Inhibición de la actividad caseinolítica en la toxina de <i>B. atrox</i> , ANOVA.....	51

<b>Tabla 19-3:</b> Datos de la inhibición de la actividad caseinolítica en la toxina de <i>B. asper</i> . Suero antiofídico Vs <i>Cordyline fruticosa</i> .....	52
<b>Tabla 20-3:</b> Análisis estadístico. Inhibición de la actividad caseinolítica en la toxina de <i>B. asper</i> , ANOVA.....	53
<b>Tabla 21-3:</b> Datos de la inhibición de la actividad coagulante en la toxina de <i>B. atrox</i> . S. antiofídico Vs <i>C. fruticosa</i> .....	55
<b>Tabla 22-3:</b> Análisis estadístico. Inhibición de la actividad coagulante en la toxina de <i>B. atrox</i> , ANOVA.....	56
<b>Tabla 23-3:</b> Datos de la inhibición de la actividad coagulante en la toxina de <i>B. asper</i> . Suero antiofídico Vs <i>Cordyline fruticosa</i> .....	57
<b>Tabla 24-3:</b> Análisis estadístico. Inhibición de la actividad coagulante en la toxina de <i>B. asper</i> , ANOVA.....	58

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1-1:</b> Dentadura solenoglifa .....	7
<b>Figura 2-1:</b> Hábitat de distribución de <i>Bothrops atrox</i> . .....	8
<b>Figura 3-1:</b> <i>Bothrops atrox</i> .....	9
<b>Figura 4-1:</b> Hábitat de distribución de <i>Bothrops asper</i> . .....	10
<b>Figura 5-1:</b> <i>Bothrops asper</i> . .....	10
<b>Figura 6-1:</b> Mordedura de serpiente .....	11
<b>Figura 7-1:</b> Suero antiofídico .....	13
<b>Figura 8-1:</b> <i>Cordyline fruticosa</i> (Marpindo) .....	16

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1-3:</b> Actividad de la fosfolipasa presente en las toxinas. ....	32
<b>Gráfico 2-3:</b> Inhibición de actividad de la fosfolipasa mediante el extracto de <i>C. fruticosa</i> .....	33
<b>Gráfico 3-3:</b> Porcentaje de inhibición de la hialuronidasa en la toxina de <i>B. atrox</i> .....	35
<b>Gráfico 4-3:</b> Porcentaje de inhibición de la hialuronidasa en la toxina de <i>B. asper</i> .....	36
<b>Gráfico 5-3:</b> Inhibición de la actividad caseinolítica en la toxina de <i>B. atrox</i> . ....	37
<b>Gráfico 6-3:</b> Inhibición de la actividad caseinolítica en la toxina de <i>B. asper</i> . ....	38
<b>Gráfico 7-3:</b> Gráfico de cajas. Inhibición de la fosfolipasa en la toxina de <i>B. atrox</i> .....	42
<b>Gráfico 8-3:</b> Gráfico de cajas. Inhibición de la fosfolipasa de la toxina de <i>B. asper</i> .....	44
<b>Gráfico 9-3:</b> Gráfico de cajas. Inhibición de la hialuronidasa de la toxina de <i>B. atrox</i> .....	47
<b>Gráfico 10-3:</b> Gráfico de cajas. Inhibición de la hialuronidasa de la toxina de <i>B. asper</i> .....	49
<b>Gráfico 11-3:</b> Gráfico de cajas. Inhibición de la actividad caseinolítica en la toxina de serpiente de <i>B. atrox</i> .....	52
<b>Gráfico 12-3:</b> Gráfico de cajas. Inhibición de la actividad caseinolítica en la toxina de serpiente de <i>B. asper</i> .....	54
<b>Gráfico 13-3:</b> Gráfico de cajas. Inhibición de la actividad coagulante en la toxina de <i>B. atrox</i> .56	
<b>Gráfico 14-3:</b> Gráfico de cajas. Inhibición de la actividad coagulante en la toxina de <i>B. asper</i> 58	

## ÍNDICE DE ANEXOS

**ANEXO A:** RECOLECCIÓN DE LA MATERIA VEGETAL

**ANEXO B:** CONTROL DE CALIDAD DE LAS HOJAS SECAS DE *C. fruticosa*.

**ANEXO C:** TAMIZAJE FITOQUÍMICO

**ANEXO D:** EXTRACCIÓN DEL EXTRACTO DE LAS HOJAS SECAS DE *C. fruticosa*.

**ANEXO E:** RECOLECCIÓN DEL VENENO DE *B. atrox* Y *B. asper*

**ANEXO F:** LIOFILIZACIÓN DE LA TOXINA DE LA SERPIENTE *B. atrox* Y *B. asper*

**ANEXO G:** DETERMINACIÓN DE LOS ENSAYOS

**ANEXO H:** GUÍA DE MOVILIZACIÓN DE ESPECÍMENES DE FLORA Y FAUNA PARA  
*C. fruticosa*

**ANEXO I:** CERTIFICADO DE IDENTIFICACIÓN DE LA ESPECIE VEGETAL

## RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue determinar la actividad inhibitoria del extracto de *Cordyline fruticosa* sobre el veneno de dos especies de serpientes *Bothrops atrox* y *Bothrops asper* sobre las enzimas hialuronidasa, fosfolipasa y actividades de la toxina sobre la proteína caseína y la coagulación. Para evaluar la inhibición de estas enzimas se utilizó la toxina a una concentración de 20 mg disuelto en un buffer de potasio fosfato monobásico y potasio fosfato dibásico, para que el tratamiento sea similar a las condiciones del organismo humano. Los sustratos usados para realizar los diferentes ensayos fueron: ácido hialurónico, emulsión lipoproteica de yema de huevo al 45%, caseína y fibrinógeno. Para determinar la actividad de la hialuronidasa procedente de la toxina se empleó como sustrato ácido hialurónico determinando la reducción de turbidez con bromuro de cetil-trimetil amonio. En el caso de la fosfolipasa se usó una emulsión lipoproteica de yema de huevo al 45% con buffer Tris – HCl y cloruro de calcio a un pH de 7.4 midiéndose el tiempo de coagulación. Para determinar la actividad caseinolítica se empleó caseína en buffer Tris- HCl a un pH de 8.5 precipitándolo con ácido tricloroacético previo a leer su absorbancia. Mientras que, para determinar la actividad coagulante se empleó fibrinógeno en buffer Tris-HCl a pH de 7.4 incubándolo y luego midiendo el tiempo de coagulación. Una vez obtenidos los resultados de cada ensayo, se compararon las muestras obtenidas con suero antiofídico polivalente y se obtuvo que, la hialuronidasa es mayormente inhibida con el extracto de las hojas secas de *Cordyline fruticosa* en un 4.46% más con respecto al suero antiofídico, cabe recalcar que la actividad caseinolítica es inhibida en concentraciones muy bajas, mientras que, la actividad de la fosfolipasa A<sub>2</sub> y la actividad coagulante es inhibida en concentraciones muy bajas y hay una diferencia de ralentización en los tiempos de coagulación. Los análisis estadísticos demostraron que, en la inhibición de la fosfolipasa, la actividad caseinolítica y la actividad coagulante presentan el mismo efecto que el suero antiofídico, mientras que, la inhibición de la hialuronidasa por *Cordyline fruticosa* tiene una diferencia significativa con respecto al suero antiofídico. Esta investigación genera expectativas para futuras investigaciones sobre los efectos inhibidores de las enzimas presentes en el veneno usando el extracto de esta planta estudiada ya que tiene potencial inhibitorio.

**Palabras clave:** <BIOQUÍMICA>, <PRODUCTOS NATURALES>, <INHIBICIÓN ENZIMÁTICA>, <VENENO DE SERPIENTE (*Bothrops atrox* y *Bothrops asper*)>, <MARPINDO (*Cordyline fruticosa*)>.



## ABSTRACT

This research is aimed at determining an inhibitory activity originated from *Cordyline fruticosa* plant extract based on *Bothrops atrox* and *Bothrops asper* poisonous snake species in the enzyme hyaluronidase, phospholipase, toxin activities on casein, protein, and coagulation. For assessing the enzyme inhibition, a toxin was used in an individual concentration of approximately 20 mg dissolved into a potassium phosphate monobasic buffer and potassium phosphate dibasic, so this treatment is similar to the human organism real conditions. The substrates used to perform the different tests were: hyaluronic acid, 45% egg yolk lipoprotein emulsion, casein, and fibrinogen. To determine the activity of hyaluronidase from toxin, hyaluronic acid was used as a substrate determining the turbidity reduction with cetyl trimethyl ammonium bromide. In the case of phospholipase, a 45% egg yolk lipoprotein emulsion with Tris-HCl buffer and calcium chloride at a pH of 7.4 was used, measuring the coagulation time. In order to determine the caseinolytic activity, in a Tris-HCl buffer was used at a pH of 8.5, precipitating it with trichloroacetic acid before reading its absorbance. Whereas, to establish the coagulation activity, fibrinogen in a Tris-HCl buffer was used at a pH of 7.4, incubating it and then measuring the coagulation time. Once the results of each test were obtained, the samples obtained were compared with polyvalent antiofidic serum and it was obtained that, hyaluronidase is mostly inhibited with the extract of the dried leaves of *Cordyline fruticosa* in a 4.46% more with respect to the anti-phytic serum. It should be noted that the caseinolytic activity is inhibited at very low concentrations, while the activity of phospholipase A2 and the coagulant activity is inhibited at very low concentrations and there is a difference in slowdown in coagulation times. Statistical analyses showed that, in the inhibition of phospholipase, so that caseinolytic and coagulation activity have the same effect as the anti-phytic serum, whereas, the inhibition of hyaluronidase by *Cordyline fruticosa* has a significant difference with respect to the antophytic serum. This research generates expectations for future investigations on inhibitory effects of the enzymes present in the poison using extract of this studied plant since it has inhibitory potential.

**Keywords:** <BIOCHEMISTRY>, <NATURAL PRODUCTS>, <ENZYMATIC INHIBITION>, <SNAKE POISON (*Bothrops atrox* and *Bothrops asper*)>, <MARIPINDO (*Cordyline fruticosa*)>.



# INTRODUCCIÓN

## Antecedentes

Desde los inicios de la especie humana las plantas han desempeñado un papel significativo en la vida del hombre y, han sabido cubrir sus necesidades básicas como alimento, vivienda, medicina, incluyendo el papel esencial en los rituales espirituales (Celis et al., 2008, p.97). Las plantas son capaces de protegerse gracias a que sintetizan metabolitos secundarios, entre estos compuestos se destacan fenoles, flavonoides, terpenos, alcaloides, polipéptidos, lectinas y aceites esenciales (Celis et al., 2008, p.97). Estos metabolitos secundarios ayudan a su supervivencia ya que le brinda actividad antimicrobiana y antioxidante (Sepúlveda, 2003, p.355).

La familia *Asparagaceae* está distribuida en las diferentes regiones tropicales, son ricas en esteroides, se utiliza comúnmente para el tratamiento de enfermedades como reumatismo, disentería (Ponou et al., 2019, p.454), asma, dolor de cabeza, dolores óseos, erupciones cutáneas (Lim, 2015, p.631), laringitis e inflamaciones de las glándulas mamarias (Fouedjou et al., 2014, p.62). Se ha demostrado, que las hojas tienen tiramina, ácido shikímico y ácido quínico según el caso de la planta *Cordyline fruticosa*; además, posee actividad antioxidante, antimicrobiana y anticancerígena (Lim, 2015, p.630).

Las plantas del género *Cordyline* poseen una fuente de saponinas esteroidales y glucósidos de colestano (pueden ser de tres subclases tipo espirostano, colestano y furostano). Estas plantas han llamado la atención a través de los años ya que poseen actividad citotóxica, antifúngica, antimicrobiana y antitumorales probadas *in vivo* (Fouedjou et al., 2014, p.62).

La actividad citotóxica se debe a la actividad del espirostano y también a las saponinas de cadena abierta presentes en *C. fruticosa* (Fouedjou et al. 2014, p.62). Existen nuevos compuestos y fueron

investigados por la actividad citotóxica presente en *C. fruticosa* contra las líneas celulares tumorales MDA-MB 231 (adenocarcinoma de mama humano), A375 (melanoma maligno humano) y HCT116 (carcinoma de colon humano) obteniendo actividad citotóxica contra la línea celular HCT116 (Ponou et al., 2019, p. 458). Esta planta se usa de forma medicinal; sin embargo, ninguno de sus usos inscritos incluye el tratamiento para tumores. Desde 1993, se data de la bioactividad antiproliferativa presente en esta planta debido a la presencia de la timidina; ya que, al ser un nucleósido natural ayuda a inhibir el crecimiento del linfoma y de las células que producen el cáncer de mama de manera selectiva (Ooi y Sima 1993, p.576).

## **Identificación del problema**

En el mundo existen cinco millones de personas aproximadamente que son mordidas por serpientes, de los cuales un 50% demanda de un tratamiento para evadir desenlaces fatales y secuelas graves para la salud; ya que, se requiere de antídotos eficaces para evitar los efectos tóxicos causadas por las mordeduras (OMS, 2019).

El mayor desafío es la fabricación de antídotos que sean adecuados para las mordeduras de serpientes. Actualmente, son pocos los países que fabrican los antídotos de manera adecuada y los fabricantes dependen de productores comunes que no siempre se enfocan en las variaciones de las toxinas de las variedades de serpientes (OMS, 2019).

En Ecuador existen diversas características climáticas y geográficas que son únicas en el mundo, razón por la cual, se favorece la existencia de diversos ecosistemas a nivel de este país (Mena, 2014, p.2), siendo aptos para la presencia de especies que son potencialmente venenosas y muy peligrosas para la vida humana (Ministerio de Salud Pública, 2017, p.13). En el Ecuador, existen 230 variedades de especies de serpientes de las cuales 35 son venenosas. Las serpientes del género *Bothrops spp.*, conocidas como equis y pitalala son las responsables del mayor número de accidentes que provocan a nivel nacional, ya que pueden estar presentes en campos agrícolas y su mordedura causa envenenamiento que va de un rango leve hasta un rango grave (Ministerio de Salud Pública, 2017, p.14).

Según estudios realizados, sólo de los años 2015 al 2017 se registró un total de 3.996 accidentes por mordeduras de serpientes. Según el reporte del SIVE-ALERTA (Sistema Integrado de Vigilancia Epidemiológica correspondiente a emergencias sanitarias), la población más afectada eran personas de 20 a 49 años de edad de sexo masculino, siendo el 16.8% clasificados como mordeduras graves (Ministerio de Salud Pública, 2017, p.16). Las sustancias que posee la toxina de estas serpientes son enzimas como: hialuronidasa, fosfolipasa A2 y L-aminoácido oxidasa, lo que le permite inmovilizar a la presa causando alteraciones sistémicas, produciendo hemorragias y manifestaciones locales como inflamación, destrucción de tejido y dolor (Gutiérrez, 2002, p.379).

Una de las soluciones es la aplicación de sueros antiofídicos pero su costo es muy elevado y su acceso es limitado por lo que, se propone el uso de plantas que han sido aplicadas como solución a estos accidentes como por ejemplo la planta *Cordyline fruticosa* (Asparagaceae) conocida como marpindo (Ooi et al., 1993, p.576). Se ha reconocido que una concentración de  $10^{-5}$  M de timidina inhibió la replicación de células EL4 y disminuyó la viabilidad celular después de 12-24 horas, dando un efecto específico para un nucleósido. Los cultivos celulares que fueron tratados indicaron un aumento de células en fase S y una disminución en las células en fase G1 (Ooi et al., 1993, p.578).

Diferentes estudios explican que se ha aislado de las hojas de *C. fruticosa* la aglicona del glucósido de colestano, es decir, (22 S) -colest-5-eno-1  $\beta$ , 3  $\beta$ , 7  $\beta$ , 16  $\beta$ , 22-pentol que ha demostrado una actividad citotóxica débil contra células de leucemia en comparación con etopósido (Yokosuka, Suzuki y Mimaki 2012, p.275).

### **Justificación del estudio**

Ecuador es un país mega diverso y posee una gran variedad de ecosistemas, además posee una gran variedad de especies por km<sup>2</sup> a nivel de Sudamérica (Suárez, 1997, p.21). De acuerdo con su ubicación geográfica y la variedad climática existente, el país posee propiedades únicas, por tal motivo las plantas son usadas para tratar distintas enfermedades por nuestros ancestros a base de

remedios caseros como infusiones, brebajes o preparados (Valencia, 2000). Por este motivo, se considera importante realizar un estudio sobre las plantas de uso ancestral.

La especie vegetal *Cordyline fruticosa* tiene una amplia distribución en el sureste de Asia y Papua Nueva Guinea, fue transportada a través de gran parte del Océano Pacífico por los polinesios primitivos. Actualmente se cultiva y, en ocasiones, se naturaliza en el noreste de Australia, Nueva Zelanda y en islas del Pacífico (Lim, 2015, p.629). Hoy en día la utilización de plantas medicinales favorece a las personas que son afectadas por la medicina convencional y estas optan por usar plantas medicinales a usar más químicos en su cuerpo además de que favorece a su economía y las terapias naturales producen, en algunos casos, mejores resultados (Hualpa, 2016, p.15).

Este trabajo de investigación se fundamentó en una revisión exhaustiva de artículos científicos, referente a la inhibición de la actividad enzimática de la toxina de las serpientes, planteándonos la necesidad de instaurar un método alternativo que nos permita mejorar la calidad de vida de la población. De igual manera esta investigación ayuda al fortalecimiento de saberes ancestrales y a través de la etnobotánica es posible rescatar la mayoría de los conocimientos que con el pasar del tiempo se ha ido perdiendo.

## **OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN**

### **Objetivo General**

- Determinar la actividad inhibitoria de *Cordyline fruticosa* sobre el veneno de 2 especies de serpientes (*Bothrops spp.*).

### **Objetivos Específicos**

- Determinar la calidad de las hojas de *Cordyline fruticosa* mediante ensayos fisicoquímicos.
- Obtener el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Cordyline fruticosa*.
- Identificar cualitativamente los compuestos presentes en el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Cordyline fruticosa* mediante el tamizaje fitoquímico.
- Determinar la actividad inhibitoria de *Cordyline fruticosa* sobre el componente enzimático del veneno de dos especies de serpientes (*Bothrops spp.*).

# CAPÍTULO I

## 1 MARCO TEÓRICO

### 1.1 *Serpientes*

Las serpientes son pertenecientes al grupo de los reptiles dentro del reino animal, su principal característica es que tienen todo su cuerpo cubierto por escamas. Éstas carecen de miembros de locomoción por lo que son animales que se arrastran por el suelo para llegar a un determinado sitio, además, se caracterizan por que pueden nadar y trepar árboles, también porque tienen un cerebro pequeño por lo que atacan de manera instintiva cuando se sienten amenazadas (OPS & OMS, 2009, p.12). Las serpientes se pueden dividir en dos grandes grupos: venenosas y no venenosas. Las venenosas se clasifican en vipéridos (víboras) y elápidos (coral); mientras que, las no venenosas pueden ser colúbridos (culebras) y booideos (boas) (Orduna et al. 2007, p.7). En este estudio nos enfocaremos en los vipéridos ya que es nuestro fin estudiar acerca de las toxinas de serpientes.

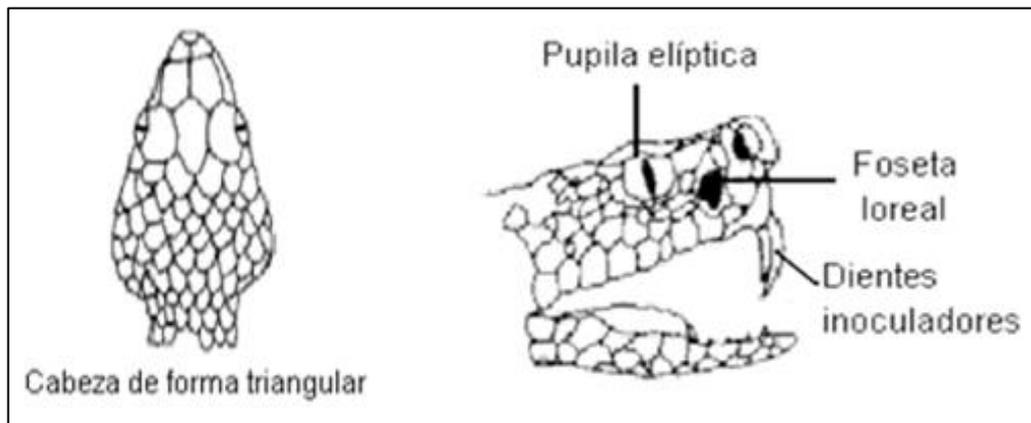
### 1.2 *Familia Viperidae (víboras)*

Son denominadas “víboras verdaderas” ya que todas las serpientes que corresponden a esta familia tienen toxinas letales. Esta familia se clasifica en dos géneros: *Crotalus* y *Bothrops*. La reproducción es ovovivípara. Al momento de atacar estas serpientes se enrollan en espiral, lo hacen así para proyectar su cabeza hacia su presa de manera muy rápida. Según su clasificación, por la dentadura pertenecen al grupo de solenoglifas, siendo el más eficiente y evolucionado para inyectar su toxina (Orduna et al. 2007, p10). Las serpientes que corresponden a esta familia son los géneros *Bothriechis*, *Bothrops*, *Bothrocophias*, *Bothriopsis*, *Lachesis* y

*Porthidium* pueden encontrarse fácilmente en campos agrícolas y cuando se sienten en peligro éstas serpientes atacan y ocasionan accidentes provocando envenenamientos leves a graves (Ministerio de Salud Pública, 2017, p.14). La toxina de la familia *Viperidae* tiene grandes cantidades de proteínas distintas de estas se destacan las enzimas que son las que generalmente causan la muerte (De Souza et al. 2015).

### 1.2.1 *Dentadura solenoglifa*

Los dientes de las serpientes con esta dentadura son huecos, están fijados al hueso maxilar superior móvil (es similar a una aguja hipodérmica). Cuando las serpientes están en descanso la dentadura se encuentra de manera horizontal cubierta por un pliegue de mucosa. Cuando muerden, el hueso maxilar proyecta los dientes hacia adelante haciendo que sea un ataque mucho más eficaz y así la toxina se inocular eficientemente en su presa (Orduna et al. 2007, p.11).



**Figura 1-1:** Dentadura solenoglifa

Realizado por: Díaz, Mariza, 2020.

### 1.3 *Toxina*

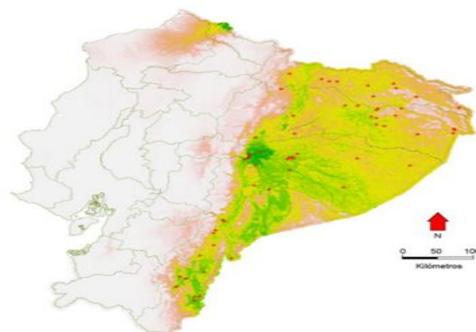
La toxina es una secreción salival de tipo serosa, está formada por una mezcla de enzimas, metaloproteínas y otros componentes que son capaces de afectar al sistema y órganos del cuerpo humano produciendo alteraciones en la coagulación, daños hísticos, daños musculares, afecta

también al aparato cardiovascular y sobre todo al sistema nervioso central. Las toxinas difieren entre sí dependiendo de cada género debido a sus propiedades biológicas (Orduna et al. 2007, p.6). La toxina se aloja en las glándulas productoras de veneno, conectadas hacia el conducto interno que posee el diente, provocando alteraciones en el sistema e incluso la muerte (Orduna et al. 2007, p.17).

La toxina posee compuestos bioquímicos complejos entre ellos están: citolisinas y proteolisinas (alteran las células de la sangre e incrementan la permeabilidad vascular), coagulantes sanguíneos, anticoagulantes y aglutininas (altera a la membrana de los eritrocitos, se activan factores de coagulación y fenómenos hemorrágicos), antibactericina (se paraliza la actividad fagocitaria), neurotoxinas A y B (afecta al sistema cardiorrespiratorio), colinesterasa y anticolinesterasa, miotoxinas y cardiotoxinas (favorece al shock, despolariza la fibra muscular esquelética cardíaca), hialuronidasa (ayuda a la propagación de la toxina en el organismo), colagenasa y elastasa (necrotizante), fosfolipasa y fosfodiesterasa (Ministerio de Salud Pública, 2007, p.15).

#### 1.4 *Bothrops atrox* (Pitalala)

Se distribuye en la región Oriente del Ecuador. Conocida también como equis del oriente, vívora barba amarilla, pitalalas y shishis. Se distribuye desde el nivel desde los 177 m hasta los 1242 msnm (Ministerio de Salud Pública, 2017, p.29).



**Figura 2-1:** Hábitat de distribución de *Bothrops atrox*.

**Fuente:** Ministerio de Salud Pública, 2017, p.28

**Realizado por:** Díaz, Mariza, 2020.

Es una víbora de tamaño mediano, por lo general las hembras son mucho más largas que los machos. La cabeza es en forma triangular, de color verde oliva más oscura que el cuerpo, presenta una línea marrón oscura desde la parte lateral del ojo hasta la comisura de la boca, el iris es de color dorado o bronce, la cabeza puede presentar de colores crema a amarillo o a su vez de amarillo a amarillo grisáceo con manchas o sin ellas. Puede diferenciarse de las demás *Bothrops* debido a sus escamas ventrales, iris dorado, lengua negra y la franja post orbital que está marcada por un borde blanco o crema (Betancourt et al. 2018, p.8).

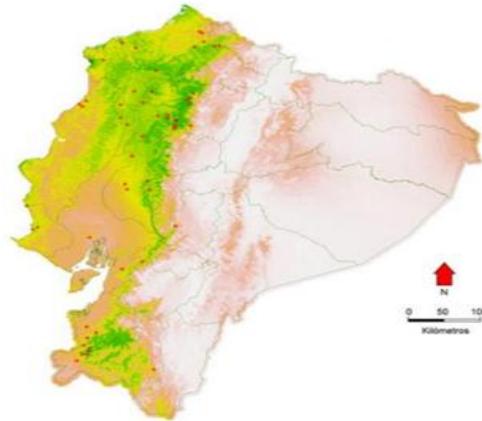


**Figura 3-1:** *Bothrops atrox*.

Realizado por: Díaz, Mariza, 2020.

### 1.5 *Bothrops asper* (Terciopelo)

Se distribuye en la región occidental del Ecuador. Conocida también como equis de occidente, cuatro narices, pachona, rabo de hueso o rabo fino, hojas podridas, terciopelos o víboras barba amarilla. Se distribuye ampliamente a partir del nivel del mar hasta los 1900 m de altura (Ministerio de Salud Pública, 2017, p.28)



**Figura 4-1:** Hábitat de distribución de *Bothrops asper*.

**Fuente:** Ministerio de Salud Pública, 2017, p.28

**Realizado por:** Díaz, Mariza, 2020.

Esta serpiente puede encontrarse escondida en cuevas o troncos podridos en el bosque, por lo general es nocturna por lo que en la mañana pasa durmiendo. Su cabeza es triangular (signo de que es venenosa), tiene una foseta loreal, su pupila es de manera vertical y es inconfundible ya que su mandíbula inferior es amarilla. Su dieta está especificada de roedores, aves y anfibios. Está considerada como la más letal del país gracias a su toxina (muy activo y tóxico) y la responsable de la mayor cantidad de accidentes ofídicos en América Central (OPS & OMS, 2009, p.13).



**Figura 5-1:** *Bothrops asper*.

**Realizado por:** Díaz, Mariza, 2020.

## 1.6 *Ofidiotoxicosis*

La ofidiotoxicosis o envenenamiento ofídico es por causa de una mordedura de serpientes venenosas, que, inoculan una sustancia tóxica la cual lesiona los tejidos y ocasionan alteraciones fisiopatológicas (Castrillón et al. 2007, p.98).



**Figura 6-1:** Mordedura de serpiente

Realizado por: Díaz, Mariza, 2020.

## 1.7 *Aspectos de accidentes ofídicos*

Las serpientes inoculan la toxina en sus víctimas al momento de morder, el cual es una mezcla de proteínas y polipéptidos que resulta ser muy tóxica gracias a las enzimas presentes en la toxina y dependerá del género, edad y especie del animal que ataca (Ministerio de Salud Pública, 2007, p.11).

Variables de la víctima: es más peligroso para: los niños y personas de bajo peso ya que se basa en la superficie corporal y recibirán mayores cantidades de toxina, personas con diabetes, hipertensión y problemas de circulación y también dependerá mucho del sitio de la mordedura (Ministerio de Salud Pública, 2007, p.11).

VARIABLES DEL AGRESOR (SERPIENTE VENENOSA): Dependerá mucho del tamaño, de la especie, la edad, profundidad de la mordedura, tiempo de penetración y el estado actual del animal agresor (Ministerio de Salud Pública, 2007, p.11).

La toxina por su concentración de factores anticoagulantes y mio-necrotizantes tiene acción coagulante, proteolítica, mio-necrotizante y citóxica. El accidente bothrópico puede ser: leve, moderado o severo (Ministerio de Salud Pública, 2007, p.12).

**Tabla 1-1:** Manifestaciones según el accidente bothrópico

Manifestaciones del género <i>Bothrops</i> .			
	Leve	Moderado	Severo
Reacción	Local moderada	-	Local importante
Dolor	Leve	Intenso	Intenso
Edema	Ligero	Moderado	Progresivo
Signos hemorrágicos	-	-	+
Otros	-	Ruboración, calor, presencia o ausencia de equimosis y flictenas	Hay flictenas, necrosis superficial o profunda, vértigo, cefalea, náusea, shock, oliguria o anuria
Tratamiento con suero antiofídico	No específico	Específico	Específico

Se recomienda realizar pruebas de coagulación cada 6 horas.

**Fuente:** Ministerio de Salud Pública, 2007.

**Realizado por:** Díaz, Mariza, 2020.

## 1.8 *Suero antiofídico*

Es una solución purificada obtenida del plasma de los caballos que son inoculados con la toxina de las serpientes y se utiliza dependiendo la severidad del caso (Ministerio de Salud Pública, 2017, p.20). Es específico en el tratamiento de accidentes ofídicos ya que neutraliza la toxina de forma específica debido a que los sueros antiofídicos son elaborados con las toxinas de las serpientes. Su administración debe ser dentro de las 24 horas desde la mordedura. Puede provocar reacciones adversas ya que es obtenido de equinos, pudiendo desencadenar reacciones inmediatas como rash, náusea, vómito, prurito, urticaria y reacciones anafilácticas con riesgo de muerte (Ministerio de Salud Pública, 2007, p.24). Existen diversos tipos de suero antiofídico como: antibothrópico, trivalente antibothrópico, anticrotálico y antilachésico, antilachésico monovalente y anti coral o antimicrúrico. Su administración debe ser por vía intravenosa de forma lenta (Ministerio de Salud Pública, 2007, p.25).



**Figura 7-1:** Suero antiofídico

Realizado por: Díaz, Mariza, 2020.

## 1.9 *Etnomedicina*

La etnomedicina no es más que el conjunto de saberes y técnicas que son transmitidos de manera tradicional y son usados para prevenir y curar distintas enfermedades (Granara, 2017, p.5).

## 1.10 *Biodiversidad del Ecuador*

A Ecuador se lo considera como uno de los países más biodiversos a nivel mundial. La gran variedad de los ecosistemas se debe gracias a la Cordillera de los Andes que se encuentra

atravesando el país y da lugar a pisos altitudinales cada uno presenta su microclima y también sus tipos de suelos. El callejón interandino, cruzado por cadenas montañosas (páramos), en dónde, en cuyo interior se encuentran los valles; en conjunto, la presencia de valles secos y montañas bajas llegan a los 4000 m de altura; su flora y fauna se ha ido adaptando a las condiciones que existe de las corrientes marinas de Humboldt y a las corrientes cálidas del norte. La presencia de volcanes activos en donde se forma micro ambientes con su adecuada flora y fauna acondicionadas a las circunstancias necesarias siendo parte de la generación de nuevas especies (Bravo, 2011, p.23).

### 1.11 *Uso de la biodiversidad*

En el país existen aproximadamente 5172 plantas útiles, esto quiere expresar que 3 de cada 10 plantas son utilizadas por las personas para diferentes cosas. El 60% de total de estas plantas es de uso medicinal, el 55% es usada para la fabricación de materiales, el 30% pertenecen a las plantas que son comestibles y el 20% son usadas para distintos rituales, indicando una sumatoria mayor al 100% debido a que algunas plantas tienen más de un uso (Bravo, 2011, p.62).

### 1.12 *Actividad biológica de las plantas*

Algunas plantas poseen metabolitos secundarios debido a que reservan una porción de carbono para la síntesis de moléculas, respecto a los metabolitos secundarios, estos no se encuentran en algunas plantas, mientras que, los metabolitos primarios están presentes en todas las plantas. Algunas de las funciones de sus metabolitos secundarios es actuar como repelentes de animales o como medio protector a agentes externos y actúan como toxinas, pesticidas o amargos (Ávalos y Pérez, 2009, p.120). Las plantas que poseen actividad biológica han sido utilizadas por ser fuente de productos terapéuticos para tratar alguna enfermedad que puede ser leve o moderada y coadyuvantes según sea el caso. Según la OMS (Organización Mundial de la Salud) define a la planta medicinal como al uso de una o más partes para uso terapéutico (Baulies y Torres, 2012, p.151).

### 1.13 *Planta medicinal*

Se la define como la especie vegetal que presenta principios activos con actividad farmacológica destinada a usarse con fines terapéuticos (Osorio, 2009, p.3).

### 1.14 *Droga vegetal*

Es una parte representativa de la planta medicinal en dónde se encuentra mayor principio activo siendo las hojas, flores, tallos, raíz (Baulies y Torres, 2012, p.153).

### 1.15 *Farmacoetnología*

Se centra en el estudio de plantas siendo en diferentes pueblos y culturas; las plantas medicinales usadas son registradas a nivel de Sudamérica y debido a su diversidad que puede ser de flora y genética. Su uso desciende ya que existe un cambio en su estilo de vida. Para elegir a una planta los científicos se basan en criterios etnofarmacológicos (Osorio, 2009, p.21).

### 1.16 *Familia Asparagaceae*

Son arbustos o hierbas perennes con rizomas desarrollados, raíces carnosas o tuberosas, tallos erectos, hojas alternas muy simples sésiles a menudo prolongadas, flores actinomorfas, bisexuales, erectas, fruto globoso, pedicelos articulados, flores estaminadas y de pocas semillas (Hurrell y Delucchi, 2012, p.1).

1.17 *Cordyline fruticosa* (Marpindo)



**Figura 8-1:** *Cordyline fruticosa* (Marpindo)

Realizado por: Díaz, Mariza, 2020.

Esta planta es perteneciente a la familia Asparagaceae, originaria del sureste de Asia y Papúa Nueva Guinea, fue trasladada a través del Océano Pacífico por los originarios polinesios. Actualmente se cultiva y, en ocasiones, se naturaliza en el noreste de Australia, Nueva Zelanda y las Islas existentes en el Pacífico (Lim, 2015, p.627).

Taxonomía

**Tabla 2-1:** Taxonomía

Nombre Científico	<i>Cordyline fruticosa</i>
Reino	Plantae
Phylum	Tracheophyta
Clase	Equisetopsida
Orden	Asparagales
Familia	Asparagaceae
Genero	<i>Cordyline</i>
Especie	<i>C. fruticosa</i>

Fuente: Trópicos, 2019

Realizado por: Díaz, Mariza, 2020

### **1.17.1 Nombres comunes**

Es conocida como marpindo, drácena o polinesia.

### **1.17.2 Descripción botánica**

Plantas erectas, arbustos de hoja perenne que crecen hasta 3 m de altura. Tallo leñoso, esbelto, con anillos foliares y rizomas subterráneos con forma de tubérculos agrandados. Hojas abigarradas presentando mezclas de rojo, rosa, púrpura; oblongo-lanceolado, elíptico-lanceolato o estrechamente oblongo; 25–50 × 5–10 cm, con una vena media que se eleva abaxialmente; el ápice de la hoja es aristato. Pecíolo 10–30 cm, canalizado abaxialmente, con vástago de la base dilatada y otras bases del pecíolo. Las hojas se agrupan en mechones en la parte superior de los tallos leñosos en la madurez (Lim, 2015, p.627).

### **1.17.3 Usos**

*Cordyline fruticosa* posee actividad antioxidante, antimicrobiana y tiene actividad anticancerígena. Lo utilizan comúnmente para la tos, fiebre, diarrea, como desinfectante para heridas, abortiva, anticonceptiva, dolores óseos. Además de medicinal resulta muy útil como vestimenta o para los techos de las casas (Lim, 2015, p.628).

## **1.18 Fosfolipasa**

La fosfolipasa A2 (FLA2) es parte de la familia de enzimas que participan en el suplemento de fosfolípidos de membrana, además se encargan de generar sustancias bioactivas como son: lisofosfolípidos, mediadores lipídicos de inflamación y ácidos grasos libres. Se conocen de 2 clases de fosfolipasas las FLA2 citosólicas o también conocidas como intracelulares (FLA2 c) o de masa molecular elevada y FLA2 de secreción (FLA2 s) o también llamadas de masa molecular

pequeña (Rodríguez et al., 2002, p.121). Las formas extracelulares en animales letales en serpientes son muy abundantes de FLA2 al igual que en sitios de inflamación. En las serpientes la FLA2 está presente en la toxina y tiende a provocar efectos fisiológicos tales como: en la digestión, miotoxicidad, neurotoxicidad y provoca efectos anticoagulantes. Las FLA2 es secretada por células mesenquimatozas: células de Paneth, células mesagiales, osteoblastos, neutrófilos, hepatocitos, condriocitos macrófagos y células musculares lisas de vasos sanguíneos (Rodríguez et al., 2002, p.123). Las FLA<sub>2</sub> c tienen preferencia por fosfolípidos que contienen ácido araquidónico (AA) que se encuentra esterificado en sn-2 de la molécula del glicerol; las FLA<sub>2</sub> s tienen preferencia por los del grupo polar sn-3 del glicerol fosfatidil teniendo un favoritismo por los fosfolípidos localizados internamente en la hoja de las membranas (Rodríguez et al., 2002, p.124).

### 1.19 *Hialuronidasa*

La hialuronidasa es una enzima que se encarga de la hidrólisis del ácido hialurónico, separa el Carbono 1 de la glucosamina del Carbono 4 del ácido glucorónico promoviendo el movimiento de los fluidos y ayudando a su absorción, se encuentra en las toxinas de las serpientes, escorpiones, abejas y avispa (Flores y Sigall, 2011, p.292). La cicatrización y el retraso de la curación se debe a los incrementos de hialuronidasa y ácido hialurónico ya que son capaces de incrementar la permeabilidad vascular haciendo que algunos fármacos sean más accesibles hacia los tejidos (Fierro et al., 2017, p.209).

## CAPÍTULO II

### 2 MARCO METODOLÓGICO

#### 2.1 *Lugar de la investigación*

La presente investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Productos Naturales de la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

#### 2.2 *Recolección de la materia vegetal*

Se realizó la recolección de hojas de *Cordyline fruticosa* en estado de fructificación en la parroquia San Pablo, comunidad Santo Domingo del Cantón Archidona en la Finca Amiruka, provincia del Napo; alrededor de las 16h30 del mes de julio del 2019.

Previo a la recolección se realizó la debida documentación y se gestionó la Guía de Movilización de Especímenes de Flora y Fauna Silvestre Nro. 62-06-2019-VS-DPAN-MAE en calidad de Investigación dentro del Convenio Marco de Acceso a Recursos Genéticos MAE-DNB-CM-2018-0086 mencionado "ESTUDIO DE LA BIODIVERSIDAD EN EL ECUADOR, ECOLOGÍA, CONSERVACIÓN Y SU USO POTENCIAL USO SOSTENIBLE".

#### 2.3 *Identificación botánica*

La identificación del espécimen se realizó en el Herbario de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo por el Ing. Jorge Caranqui, botánico responsable.

## 2.4 *Equipos, materiales y reactivos*

### 2.4.1 *Equipos*

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

### 2.4.2 *Materiales*

- Tubos de vidrio de 10 mL, 30 mL
- Cápsulas de porcelana
- Puntas de pipeta Thermo Scientific™
- Gradilla
- Termo de acero inoxidable
- Couler-hielera
- Espátula
- Vasos de precipitación
- Pinzas para cápsula de porcelana
- Embudo
- Trípode
- Papel aluminio
- Balones esmerilados de 1000 mL
- Balones de aforo de 10 mL, 25 mL y 100 mL
- Frascos color ámbar
- Mascarilla
- Guantes
- Probeta de 25 mL y 100 mL
- Papel filtro
- Reverbero.

#### 2.4.3 *Reactivos*

- 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

- 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
- Solución de tricloruro férrico al 5% en solución salina
- Solución al 2% de ninhidrina en agua
- Cinta de magnesio metálico
- Alcohol amílico
- Hielo
- Éter dietílico
- Etanol 96%
- 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
- Ácido tricloro acético al 5%
- Fibrinógeno
- Toxina de *Bothrops atrox* y *Bothrops asper* liofilizado
- Suero antiofídico

## 2.5 *Técnicas y Métodos*

### 2.5.1 *Acondicionamiento del material vegetal*

Se realizó la limpieza del material vegetal (en este caso las hojas de *Cordyline fruticosa*) y se desecó a una temperatura de 35 °C en una estufa durante 24 horas. Se procedió a triturar la muestra en un triturador de cuchillas, de aproximadamente de 2-3 mm. El material seco fue conservado en bolsas ziploc en condiciones adecuadas hasta su posterior análisis.

### 2.5.2 *Control de calidad*

Se realizó mediante procedimientos descritos por Miranda et al. (1992, pp. 31-45). Los procedimientos se llevaron a cabo por triplicado.

#### 2.5.2.1 *Determinación de la humedad*

Se realizó a través del método gravimétrico que consiste en:

- Tomar 2 g de muestra y ponerlo en una cápsula de porcelana previamente tarada a 105 °C (masa constante).
- Desecar a 105 °C durante un tiempo de 3 horas.
- Llevar la cápsula a la desecadora y dejar enfriar
- Pesar
- Colocar otra vez en la estufa y dejar reposar por 1 hora.
- Volver a pesar hasta que se obtenga una masa constante (Miranda, 1992, p. 32).

#### **Cálculo:**

$$\% \text{ Humedad} = \frac{M_2 - M_1}{M_2 - M} \times 100 \text{ (Ecuación 1)}$$

Dónde:

$M_2$  = peso de la cápsula con la muestra

$M_1$  = peso de la cápsula con la muestra desecada

$M$  = peso de la cápsula vacía tarada

#### 2.5.2.2 *Determinación de cenizas totales*

Se realizó por el método gravimétrico:

- Tomar 2 g de muestra y colocar en un crisol (previamente tarado)
- Carbonizar la muestra, en la mufla por 2 horas a una temperatura de 600 °C
- Una vez obtenido un polvo de color blanquecino se enfría en el desecador
- Pesarse hasta obtener un valor constante (Miranda, 1992. p. 32).

Cálculos:

$$\% \text{ Cenizas} = \frac{M_2 - M_1}{M_1 - M} \times 100 \text{ (Ecuación 2)}$$

Dónde:

$M_2$  = peso de la cápsula con la ceniza

$M_1$  = peso de la cápsula con la porción

$M$  = peso de la cápsula vacía tarada

#### 2.5.2.3 *Tamizaje Fitoquímico*

Para la realización del tamizaje fitoquímico se procedió a pesar 20 g de hojas secas y en polvo de *Cordyline fruticosa*, sucesivamente por maceración de 48 horas (cada uno) se extrajo el extracto con éter dietílico, etanol 96% y agua destilada. Se realizó el tamizaje fitoquímico de los extractos etéreo, etanólico y acuoso para la detección cualitativa de metabolitos secundarios como: grasas, alcaloides, quinonas, azúcares reductores, catequinas, esteroides/terpenoides, resinas, saponinas, taninos y fenoles, lactonas y cumarinas, mucílagos, aminoácidos, flavonoides y principios amargos. Se procedió a realizar mediante procedimientos descritos por Miranda et al. (1992, pp. 31-45).

### **2.5.3 Preparación del extracto de hojas secas de *Cordyline fruticosa***

Para la preparación del extracto de las hojas se realizó lo siguiente:

- Colocar 50 g de hojas de *Cordyline fruticosa* (una vez molido) en 600 ml de etanol al 70%.
- Macerar por 24 horas
- Filtrar
- Obtener el residuo del filtrado mediante un rotavapor

### **2.5.4 Evaluación de la actividad inhibitoria**

#### **2.5.4.1 Inhibición de la actividad de fosfolipasa A2**

Se emplea como sustrato una emulsión lipoproteica de la yema de huevo 1.5 mL.

- Colocar 1.5 mL de la solución lipoproteica de yema de huevo en un tubo de ensayo.
- Adicionar 100 µl de muestra (toxina + antitoxina).
- Incubar por 60 minutos a 37 °C.
- Someter los tubos a un baño de agua hirviendo.
- Medir el tiempo de coagulación (Vidal y Stoppani, 1971, p.544).

#### 2.5.4.2 *Inhibición de la actividad de la Hialuronidasa*

Se usa como sustrato ácido hialurónico 0.5 mg/mL con buffer acetato de sodio 0.07 M y NaCl 0.15 M y llevarlo a pH de 5.0.

- Colocar 1 mL del sustrato de ácido hialurónico ajustado a pH 5.0 en un tubo de ensayo.
- Adicionar 100 µl de muestra (toxina + antitoxina).
- Incubar por 15 minutos a 37.5 °C.
- Añadir 2 mL de BCTA (determina la reducción de la turbidez).
- Colocar la muestra en una cubeta para espectrofotómetro.
- Medir la absorbancia a 400 nm (Di Ferrante, 1956, p.304).

La inhibición de la hialuronidasa se calcula mediante la siguiente ecuación (ecuación 3).

Fórmula:

$$\% \text{ Inhibición de la hialuronidasa} = \frac{Abs_C - Abs_M}{Abs_C} \text{ (Ecuación 3)}$$

Dónde:

Abs<sub>C</sub>= Absorbancia control

Abs<sub>M</sub>= Absorbancia de la muestra

#### 2.5.4.3 *Inhibición de la actividad caseinolítica*

Se usa como sustrato la caseína al 2% en buffer Tris-HCl 0.2 M a pH de 8.5.

- Colocar 1 mL de solución de caseína
- Adicionar 100 µl de muestra (toxina + antitoxina).

- Incubar a 37 °C por 30 minutos.
- Añadir 2 mL de ácido tricloroacético (ATC) a 0.44M.
- Centrifugar por 20 segundos.
- Leer la absorbancia (280 nm) en una celda de cuarzo (Yarlequé et al., 2008, p.170).

Porcentaje de inhibición se calculó mediante la ecuación 4.

Fórmula:

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{Abs_C - Abs_M}{Abs_C} \times 100 \text{ (Ecuación 4)}$$

Dónde:

Abs<sub>C</sub>= Absorbancia control

Abs<sub>M</sub>= Absorbancia de la muestra

Abs<sub>N</sub>= Absorbancia del control negativo

#### 2.5.4.4 *Inhibición de la actividad coagulante*

Usar como sustrato fibrinógeno 2.97 mg/mL en buffer Tris-HCl 0.05 M a un pH 7.4.

- Colocar el sustrato en el tubo de ensayo.
- Incubar a 37 °C durante 10 minutos.
- Adicionar 100 µl de muestra (toxina + antitoxina) a distintas concentraciones.
- Medir tiempos de coagulación en segundos (Yarlequé et al., 2008, p.170).

#### 2.5.5 *Procesamiento de datos*

Los resultados de las diferentes pruebas fueron procesados en Excel para verificar la inhibición de las enzimas que se encuentran en la toxina gracias al extracto que se usó de la planta en esta investigación. Además, se calculó el porcentaje inhibitorio de la hialuronidasa y la actividad caseinolítica, siendo los resultados medidos mediante un espectrofotómetro luego los representamos gráficamente mediante una regresión lineal.

#### **2.5.6 *Análisis estadístico***

Se utilizó el programa de análisis de varianza de Anova con el programa estadístico “R” para analizar los datos. R es un programa que permite efectuar todo tipo de cálculos manejado por comandos especiales.

Anova se utiliza para el control de métodos analíticos lo que nos permite realizar un análisis de múltiples poblaciones según el objetivo que tenga cada estudio, pudiéndose realizar un análisis para una muestra con diferentes tratamientos o a su vez se puede comparar varios métodos con diferentes características de diversos analistas entre sí.

## CAPÍTULO III

### 3 MARCO DE RESULTADOS, DISCUSIÓN Y ANÁLISIS

En este capítulo se muestran los resultados expuestos en el Capítulo II.

#### 3.1 *Control de calidad del material vegetal*

**Tabla 1-3:** Resultados de los parámetros de calidad de hojas de *Cordyline fruticosa*.

	% Humedad	% Cenizas Totales	% Cenizas Solubles en Agua	% Cenizas Solubles en Ácido
Hojas de <i>C. fruticosa</i>	9.0968 ± 0.0049	4.7347 ± 0.0054	0.5595 ± 0.0164	2.2935 ± 0.4405
Referencia Farmacopea Británica	7 – 14	Hasta 12	7	5

Realizado por: Díaz, Mariza, 2020.

Se valoró los diferentes parámetros de calidad del extracto de las hojas secas de *Cordyline fruticosa* por lo que se determinó que el porcentaje de humedad fue de 9.09% y es considerado un valor normal ya que la referencia de la Farmacopea Británica está de 7-14%. De la misma forma, la cantidad de cenizas totales fue de 4.73% y comparado con el valor estándar de la Farmacopea Británica es  $\leq 12\%$  siendo considerado un parámetro normal. La cantidad de cenizas solubles en agua y cenizas insolubles en Ácido es de 0.55% y 2.29%, respectivamente con lo que se encuentra dentro de los parámetros de referencia de la Farmacopea Británica, determinando así la pureza de la materia vegetal.

La presencia de agua en la materia vegetal es la principal causa del deterioro de las muestras vegetales ya que ayuda a la activación de las enzimas, y por ende las condiciones permiten la proliferación de microorganismos por lo que se considera óptimo, mantener un bajo contenido de humedad para lograr una estabilidad idónea. Los resultados en el control de la calidad de las hojas secas de *Cordyline fruticosa* se presenta en la Tabla 1-3, los mismos que están dentro de los rangos establecidos por la Farmacopea Británica, lo que nos certifica la idoneidad del material vegetal para posteriores ensayos.

### 3.2 Tamizaje fitoquímico

El tamizaje fitoquímico fue realizado mediante apreciaciones visuales de coloración y precipitación para detectar la presencia de metabolitos secundarios en los extractos de hojas secas de *C. fruticosa* para lo cual se utilizó solventes como: éter dietílico, etanol y agua destilada.

**Tabla 2-3:** Resultados del tamizaje fitoquímico, extracto de hojas de *C. fruticosa*.

Ensayo realizado	Extracto etéreo	Extracto alcohólico	Extracto acuoso	Metabolito presente
Dragendorff	+	+	+	Alcaloides
Mayer	+	++	+	
Wagner	+	++	+	
Liebermann-Burchard	++	++	NA	Esteroides/Terpenos
Cloruro férrico	NA	Verde intenso-negro	-	Taninos y fenoles
Borntrager	NA	+++	NA	Quinonas
Sudán	+++	NA	NA	Aceites y grasas
Baljet	-	+++	NA	Lactonas y cumarinas
	NA	-	NA	Catequinas
Fehling	NA	+	+	Azúcares reductores
	NA	-	NA	Resinas
Ninhidrina	NA	-	NA	Aminoácidos

Espuma	NA	-	+	Saponinas
Shinoda	NA	+	+	Flavonoides
	NA	NA	-	Mucílagos
	NA	NA	+	Principios amargos

(+++) Reacción de gran intensidad; (++) Reacción de mediana intensidad; (+) Reacción de baja intensidad; (-) No detectado; (NA) No aplica.

Realizado por: Díaz, Mariza, 2020.

Los resultados que fueron obtenidos del tamizaje fitoquímico se exponen en la tabla 2-3, en el cual se destaca la presencia de alcaloides, esteroides y terpenos, quinonas, aceites y grasas, lactonas y cumarinas, azúcares reductores, saponinas y flavonoides; la presencia de estos metabolitos se debe gracias a la solubilidad de estos compuestos en los diferentes solventes utilizados.

Los hallazgos expuestos en la Tabla 2-3 se asemeja a otra investigación en dónde se encuentra e identifica: espirostando y saponinas de cadena abierta, quercetina 3-O-b-D-glucopiranosido conocida, la quercetina 3-O- [6-trans-p-coumaroil] -b-D-glucopiranosido, apigenina 8-C-b-D-glucopiranosido, la quercetina 3-rutinósido y el farrerol (Fouedjou et al., 2014, p:62).

### 3.3 *Determinación de la Fosfolipasa A2*

Los resultados de la actividad de la FLA2 se representa en la siguiente tabla:

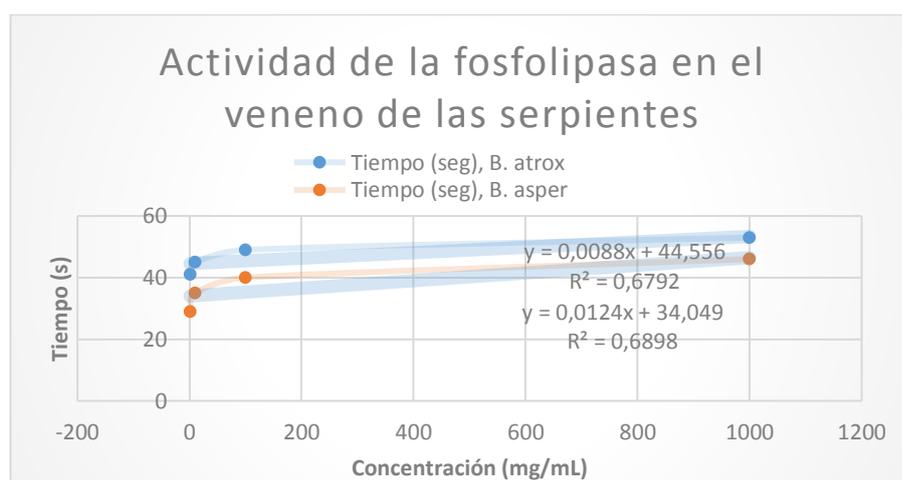
**Tabla 3-3:** Actividad de la fosfolipasa presente en la toxina de serpientes *B.atrox* y *B. asper*.

Concentración (ppm)	Toxinas	
	Tiempo (s) <i>B.atrox</i> (1 µl)	Tiempo (s) <i>B. asper</i> (1 µl)
1000	53	46

100	49	40
10	45	35
01	41	29

Realizado por: Díaz, Mariza, 2020.

En la tabla 3-3 nos indica que el tiempo de coagulación es mucho más rápido en el caso de la toxina de *B. asper* a una concentración muy baja, por lo que, se establece que a menor concentración el tiempo de coagulación es mucho más rápida.



**Gráfico 1-3:** Actividad de la fosfolipasa presente en las toxinas.

Realizado por: Díaz, Mariza, 2020.

En el gráfico 1-3 se puede observar los diferentes tiempos de coagulación que tienen las toxinas estudiadas en esta investigación, teniendo un menor tiempo de coagulación la toxina de la serpiente *B. asper* con respecto a la toxina de *B. atrox*.

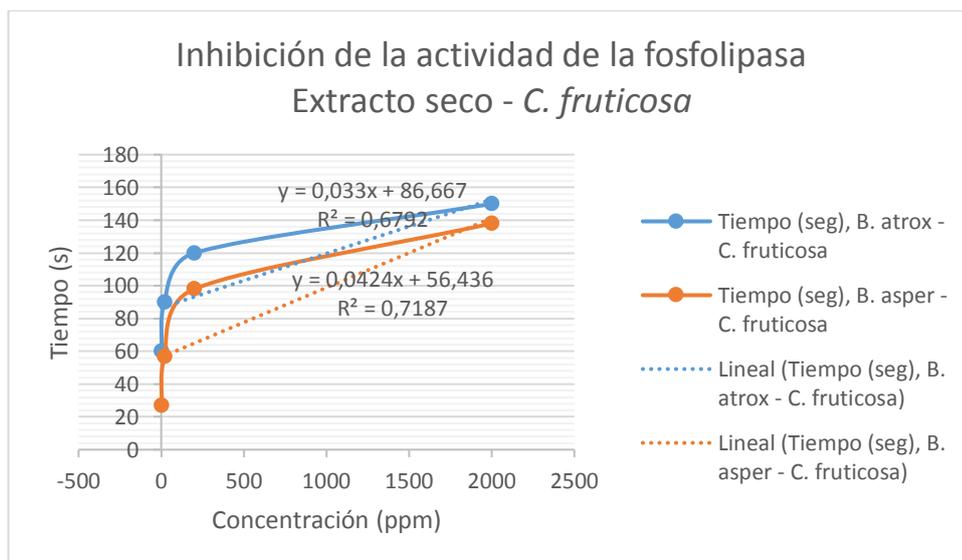
A continuación, se presenta los resultados de la inhibición de la fosfolipasa A2 en las toxinas de *B. atrox* y *B. asper* mediante el extracto de la planta seca de *C. fruticosa* con respecto al suero antiofídico.

**Tabla 4-3:** Inhibición de la FLA2 presente en las toxinas de *B.atrox* y *B. asper* por suero antifúngico y el extracto.

Concentración de toxina (ppm)	Suero antifúngico +Toxina (1 ppm)		Extracto +Toxina (1 ppm)		Control
	Tiempo (min) <i>B.atrox</i>	Tiempo (min) <i>B. asper</i>	Tiempo (min) <i>B.atrox</i>	Tiempo (min) <i>B. asper</i>	Concentración: 1000 ppm
	2000	820	455	150	138
200	518	301	120	98	0:53
20	278	164	90	57	<i>B. asper</i> - Tiempo (seg)
2	81	61	60	27	0:48

Realizado por: Díaz, Mariza, 2020.

En la tabla 4-3 se puede observar los tiempos de coagulación del sustrato utilizado que fue la proteína lipoproteica de yema de huevo, se aprecia también que el extracto no tiene la misma potencia que el suero antifúngico pero que si es capaz de ralentizar el tiempo de coagulación en comparación con la muestra de las toxinas



**Gráfico 2-3:** Inhibición de actividad de la fosfolipasa mediante el extracto de *C. fruticosa*

Realizado por: Díaz, Mariza, 2020.

En el gráfico 2-3 se puede observar que la toxina de *B. asper* junto con el extracto de las hojas secas de *C. fruticosa* tiene una potencia superior respecto a la toxina de *B. atrox* con el extracto utilizado, ya que, reacciona de una forma más rápida y es muy similar a las muestras de las toxinas. Sin embargo, la relación que cumple el extracto con la toxina de *B. atrox* es la de ralentizar su acción.

## Discusión

El extracto obtenido de las hojas secas de *C. fruticosa* inhibe la FLA2 mayormente en la toxina de *B. atrox* con respecto al de *B. asper*; y según datos de otras investigaciones se aprecia que a mayor concentración de extracto vegetal tiene una mejor probabilidad de inhibición de la fosfolipasa, esto también dependerá de la parte de la planta, que se emplee para el extracto etanólico ya que se pueden concentrar los compuestos en las diferentes partes de la planta (Mack-Wen et al. 2009).

### 3.4 Actividad de la Hialuronidasa

A continuación, se presentan los datos de la inhibición de la hialuronidasa presente en la toxina de las serpientes mediante la aplicación de suero antiofídico o el extracto de *Cordyline fruticosa* obtenida mediante una lectura de 400 nm en el espectrofotómetro.

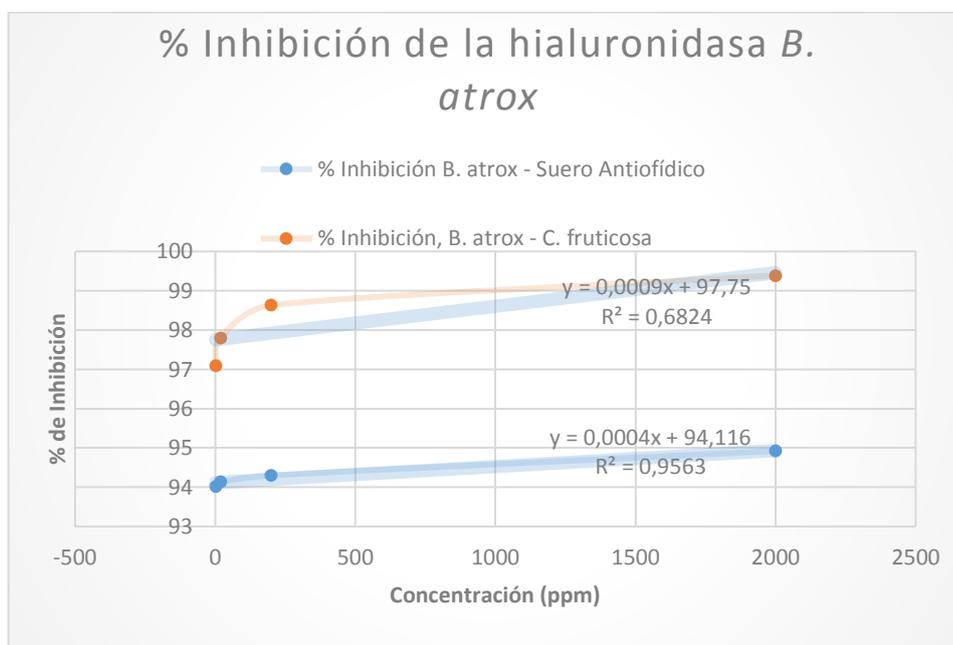
**Tabla 5-3:** Inhibición de la hialuronidasa presente en las toxinas de *B. atrox* y *B. asper* mediante suero antiofídico y el extracto de *C. fruticosa*.

% Inhibición				
Concentración (ppm)	Suero antiofídico + Toxina		Extracto +Toxina	
	<i>B. atrox</i> (%)	<i>B. asper</i> (%)	<i>B. atrox</i> (%)	<i>B. asper</i> (%)
2000	94.9219	94.8661	99.3862	97.5446
200	94.3014	94.1370	98.6301	96.8219
20	94.1335	93.9720	97.7933	96.2863

2	94.0148	93.5911	97.0869	96.2394
---	---------	---------	---------	---------

Realizado por: Díaz, Mariza, 2020

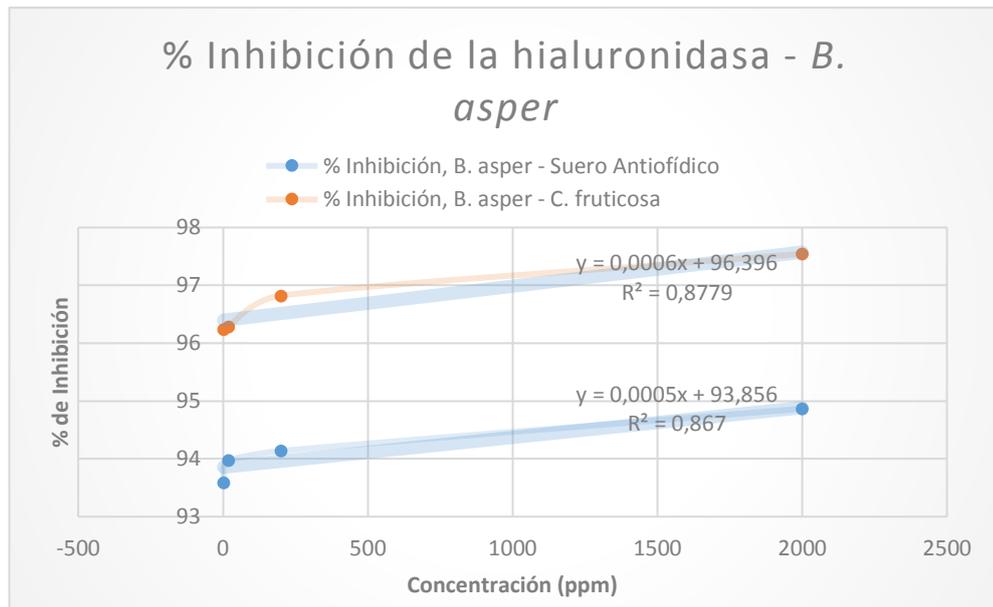
En la tabla 5-3 se visualiza que las absorbancias del suero antiofídico son un poco menores con respecto a las que contiene el extracto de las hojas secas de *C. fruticosa*. A continuación, se presentan las gráficas de la inhibición de las toxinas tanto de *B. atrox* como de *B. asper*.



**Gráfico 3-3:** Porcentaje de inhibición de la hialuronidasa en la toxina de *B. atrox*

Realizado por: Díaz, Mariza, 2020.

En la gráfica 3-3 se puede observar que el extracto de *C. fruticosa* tiene una mejor inhibición (99.38%) hacia la hialuronidasa de la toxina de *B. atrox* con un 4% mayor al suero antiofídico, mientras que, el suero antiofídico inhibe la hialuronidasa en un 94.92% en la toxina de *B. atrox*.



**Gráfico 4-3:** Porcentaje de inhibición de la hialuronidasa en la toxina de *B. asper*.

Realizado por: Díaz, Mariza, 2020.

En el gráfico 4-3 se puede notar que el extracto de *C. fruticosa* tiene una mejor inhibición (97.54%) hacia la hialuronidasa de la toxina de *B. asper* con respecto al suero antiofídico con un 3% mayor a este. Se puede notar también que a concentraciones más bajas la inhibición es mucho mayor.

## Discusión

Al comparar los resultados de esta investigación con otros estudios de especies vegetales en el Ecuador, se puede apreciar que la tendencia es muy similar ya que a medida que la concentración de la toxina es mayor la actividad baja y a una menor concentración la actividad se potencia. Esto se debe a que los compuestos presentes tienden a saturar los sitios de acción de la enzima lo que dificulta una inhibición completa de la enzima, sin embargo a lo largo del estudio se aprecia que a concentraciones disminuidas los componentes actúan mejor inhibiendo la hialuronidasa (Sánchez 2015).

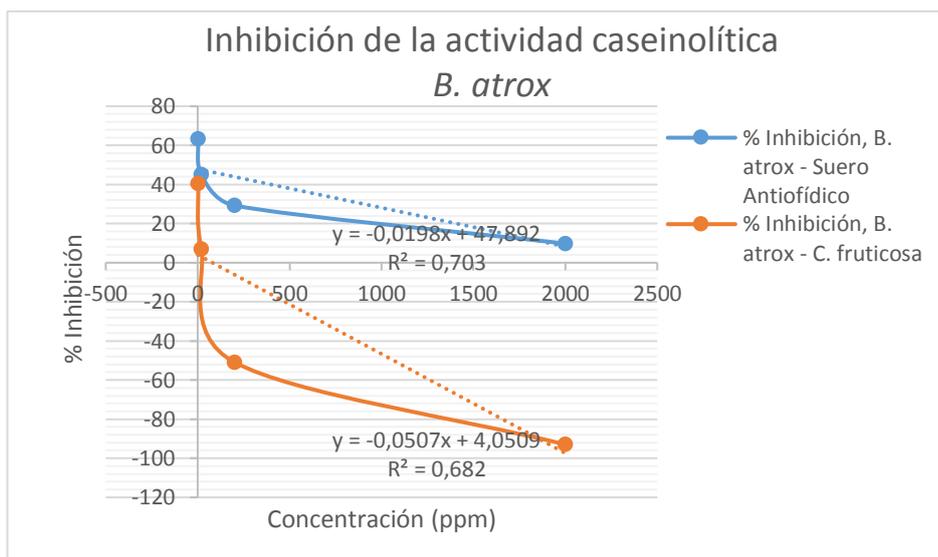
### 3.5 Actividad caseinolítica

Se presentan los datos de la inhibición caseinolítica en la toxina de las serpientes ya mencionadas con el suero antiofídico y el extracto de hojas secas de *C. fruticosa*.

**Tabla 6-3:** Inhibición de la actividad caseinolítica en la toxina de las serpientes *B. atrox* y *B. asper* mediante *C. fruticosa* y suero antiofídico polivalente.

% Inhibición				
Concentración (ppm)	Suero antiofídico + Toxina		Extracto +Toxina	
	<i>B. atrox</i>	<i>B. asper</i>	<i>B. atrox</i>	<i>B. asper</i>
2000	9.7561	11.5942	-92.9825	-67.4157
200	29.2683	30.4348	-50.8772	-8.9888
20	45.1220	46.3768	7.0175	37.0787
2	63.4146	60.8696	40.3509	75.2809

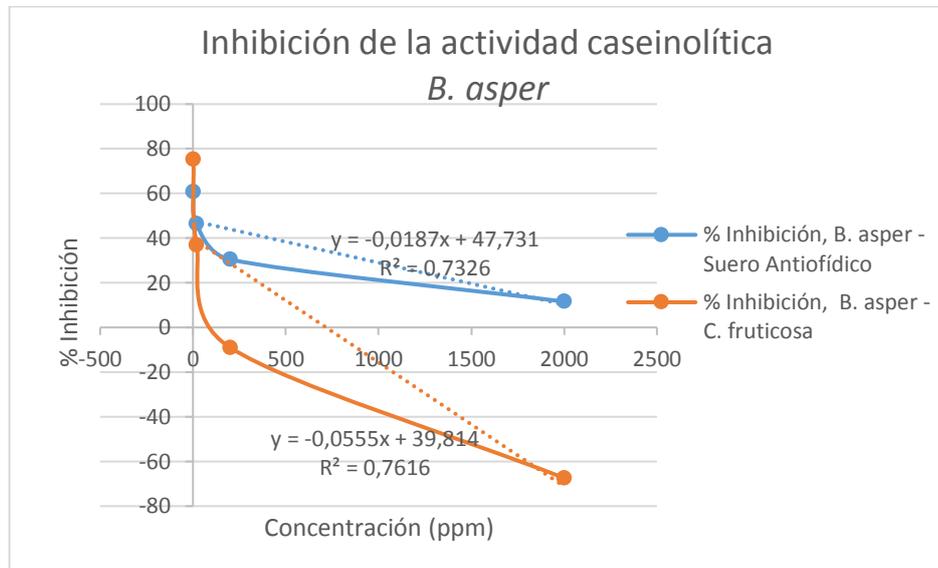
Realizado por: Díaz, Mariza, 2020.



**Gráfico 5-3:** Inhibición de la actividad caseinolítica en la toxina de *B. atrox*.

Realizado por: Díaz, Mariza, 2020.

En la gráfica 5-3 se observa que el extracto de *C. fruticosa* inhibe la actividad caseinolítica en la toxina de *B. atrox* a una concentración de 2 ppm con el 40%, observándose que, a concentraciones bajas la inhibición es mucho mayor.



**Gráfico 6-3:** Inhibición de la actividad caseinolítica en la toxina de *B. asper*.

Realizado por: Díaz, Mariza, 2020

En la gráfica 6-3 se observa que el extracto de *C. fruticosa* inhibe mucho mejor (en el caso de la toxina de *B. asper*) a una concentración de 2 ppm con el 75%, según estos datos obtenidos se interpreta que, a concentraciones bajas la inhibición de la actividad caseinolítica en la toxina de *B. asper* es mayor, incluso es mucho mayor a la inhibición del suero antiofídico.

### Discusión:

En el caso del materia vegetal utilizado, éste inhibe la toxina solo a concentraciones muy bajas de 2 ppm, mientras que, en estudios comparados de la inhibición de la actividad de las toxinas de serpientes en ratones se ha demostrado que si existen extractos vegetales como *Persea americana* que llegan a inhibir esta actividad en su totalidad sin causar lesiones y que también

dependerá la parte de la planta que se tome en cuenta para la realización del extracto etanólico (Castro et al. 1999).

### 3.6 *Actividad coagulante*

En la siguiente tabla se exponen los datos de la actividad coagulante como también la inhibición de la misma mediante el extracto de *Cordyline fruticosa* comparado con el del suero antiofídico polivalente.

**Tabla 7-3:** Actividad coagulante de las toxinas de *B. atrox* y *B. asper*

Concentración (ppm)	Tiempo, Toxina de <i>B. atrox</i> (s)	Tiempo, Toxina de <i>B. asper</i> (s)
1000	8	7

**Realizado por:** Díaz, Mariza, 2020.

En la tabla 7-3 se puede observar que la actividad coagulante de la toxina sin extracto ni suero antiofídico es mucho más rápido, siendo el que se coagula en menor tiempo la toxina de *B. asper*.

**Tabla 8-3:** Inhibición de la actividad coagulante

Concentración (ppm)	SUERO ANTIOFÍDICO		C. fruticosa	
	Tiempo (s), Toxina de <i>B. atrox</i>	Tiempo (s), Toxina de <i>B. asper</i>	Tiempo (s), Toxina de <i>B. atrox</i>	Tiempo (s), Toxina de <i>B. asper</i>
2000	18	20	8	11
200	51	51	24	28
20	99	99	51	59
2	220	218	82	109

**Realizado por:** Díaz, Mariza, 2020.

En la tabla 8-3 notamos que la inhibición de la actividad coagulante es baja con respecto al suero antiofídico, sin embargo, la inhibición de la actividad coagulante con el extracto de *C. fruticosa* es mayor en el caso de la toxina de *B. asper* en relación con la toxina de *B. atrox* que tiene un tiempo de coagulación mucho más corto.

## Discusiones

El extracto de *C. fruticosa* mostró una ligera inhibición en tanto a la toxina de *B. asper* a la actividad coagulante de la toxina de *B. atrox*, es muy importante recalcar que la coagulación de la sangre es crucial en el estado tóxico que se puede encontrar el paciente ya que la actividad de la enzima es muy similar a la de la trombina siendo capaz de liberar partes de la cadena de fibrinógeno  $\alpha$  y  $\beta$  y con esto se formaría el coágulo y si los efectos de un envenenamiento de esta clase de serpientes en el paciente no se inhibe con eficacia puede conducir a la muerte si no se tiene el tratamiento adecuado (Yarlequé et al. 2008).

### 3.7 *Análisis estadístico*

#### 3.7.1 *Inhibición de la Fosfolipasa A2*

En la tabla descrita a continuación se indica la inhibición de la FLA2 en la toxina de serpientes mediante el suero antiofídico y *C. fruticosa*.

**Tabla 9-3:** Inhibición de la fosfolipasa A2 en la toxina de *B. atrox* con Suero antiofídico y *C. fruticosa*

Concentración (ppm)	Tiempo (s), <i>B. atrox</i> - Suero Antiofídico	Tiempo (s), <i>B. atrox</i> - <i>C. fruticosa</i>
2000	820	150

200	518	120
20	278	90
2	81	60

Realizado por: Díaz, Mariza, 2020.

## Prueba de ANOVA

A continuación, se indica un análisis estadístico de la inhibición de la Fosfolipasa A2 en la toxina de *B. atrox* mediante *C. fruticosa* y suero antiofídico polivalente.

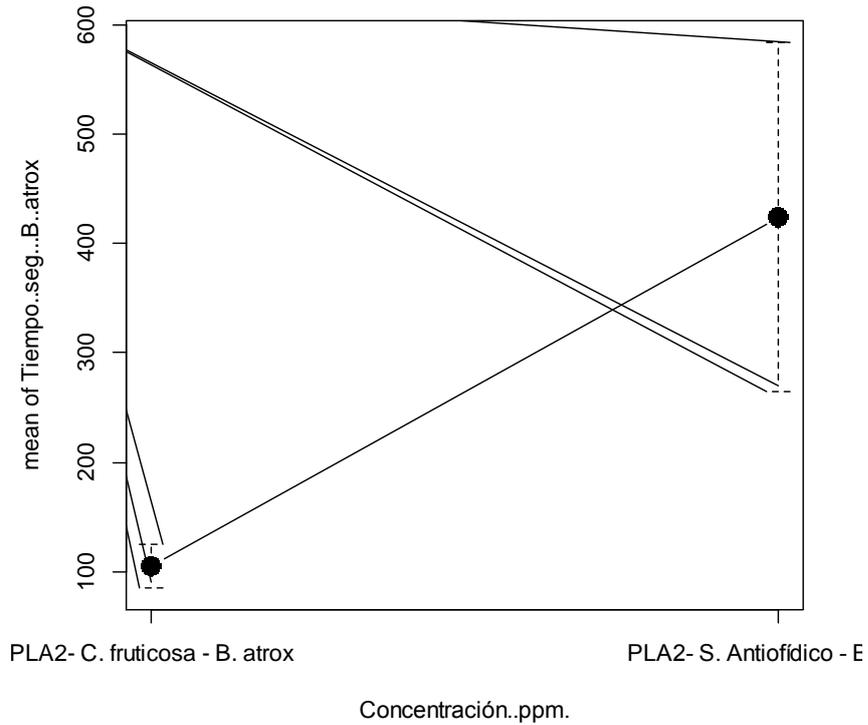
H<sub>0</sub>:  $\bar{X}$  Tiempo de coagulación de la emulsión lipoproteica de yema de huevo con el suero antiofídico en la toxina de *B. atrox* =  $\bar{X}$  Tiempo de coagulación de la emulsión lipoproteica de yema de huevo con el extracto de *C. fruticosa* en la toxina de *B. atrox*

H<sub>1</sub>:  $\bar{X}$  Tiempo de coagulación de la emulsión lipoproteica de yema de huevo con el suero antiofídico en la toxina de *B. atrox*  $\neq$   $\bar{X}$  Tiempo de coagulación de la emulsión lipoproteica de yema de huevo con el extracto de *C. fruticosa* en la toxina de *B. atrox*

**Tabla 10-3:** Análisis estadístico. Inhibición la toxina de *B. atrox*, ANOVA.

F. Var.	Df	Sum Sq	Mean Sq	F. value	Pr (>F)
Concentración (ppm)	1	203841	203841	3.957	0.0938
Error	6	309117	51519		
Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1					
Nivel	N	Media	Desv. Est.		
FLA2 – <i>C. fruticosa</i> – <i>B. atrox</i>	4	105	38.730		
FLA2 – S, Antiofídico – <i>B. atrox</i>	4	424.3	318.652		

Realizado por: Díaz, Mariza, 2020.



**Gráfico 7-3:** Gráfico de cajas. Inhibición de la fosfolipasa en la toxina de *B. atrox*

Realizado por: Díaz, Mariza, 2020.

## Análisis

Los datos conseguidos se analizaron para evaluar si existe o no diferencias significativas entre el extracto utilizado y el suero antiofídico. Se realizó el test de ANOVA, el cual indica que hay diferencia entre los análisis de grupos. Para realizar el test ANOVA se utilizó un  $(\alpha) = 0.05$  y en función del valor calculado de  $Pr(>F) = 0.0938$  se puede concluir que debemos rechazar la  $H_0$  por consiguiente, las dos muestras son estadísticamente diferentes (Rosner, 2015).

A continuación, se presenta los datos obtenidos de la inhibición de la FLA2 en la toxina de *B. asper*

**Tabla 11-3:** Datos de la inhibición de la fosfolipasa A2 en la toxina de *B. asper* con Suero antiofídico Vs *Cordyline fruticosa*

Concentración (ppm)	Tiempo (s), <i>B. asper</i> - Suero Antiofídico	Tiempo (s), <i>B. asper</i> - <i>C. fruticosa</i>
2000	455	138
200	301	98
20	164	57
2	61	27

Realizado por: Díaz, Mariza, 2020.

### Prueba ANOVA

Continuando, se indica un análisis estadístico de la inhibición de la Fosfolipasa A2 en la toxina de *B. asper* mediante el extracto de hojas secas de *C. fruticosa* y suero antiofídico polivalente.

H<sub>0</sub>:  $\bar{X}$  Tiempo de coagulación de la emulsión lipoproteica de yema de huevo con el suero antiofídico en la toxina de *B. asper* =  $\bar{X}$  Tiempo de coagulación de la emulsión lipoproteica de yema de huevo con el extracto de *C. fruticosa* en la toxina de *B. asper*

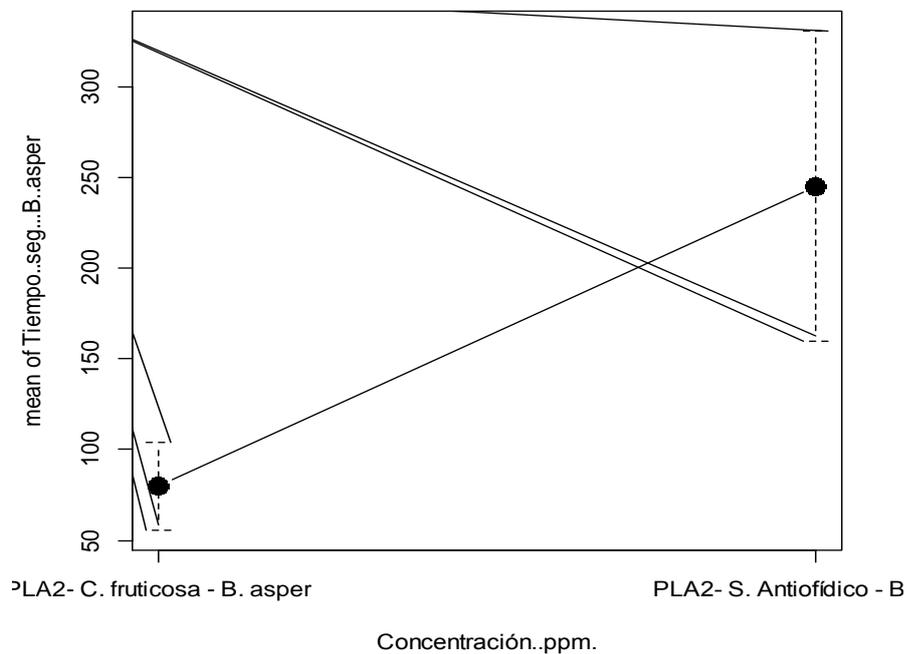
H<sub>1</sub>:  $\bar{X}$  Tiempo de coagulación de la emulsión lipoproteica de yema de huevo con el suero antiofídico en la toxina de *B. asper*  $\neq$   $\bar{X}$  Tiempo de coagulación de la emulsión lipoproteica de yema de huevo con el extracto de *C. fruticosa* en la toxina de *B. asper*

**Tabla 12-3:** Análisis estadístico. Inhibición de la fosfolipasa A2 en la toxina de *B. asper*, ANOVA.

F. Var.	Df	Sum Sq	Mean Sq	F. value	Pr (>F)
Concentración (ppm)	1	54615	54615	3.460	0.112
Error	6	94679	15780		
Total	7	149294			

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1			
Nivel	N	Media	Desv. Est.
FLA2 – C. fruticosa – <i>B. asper</i>	4	80	48.4
FLA2 – S, Antiofídico – <i>B. asper</i>	4	245.3	170.9

Realizado por: Díaz, Mariza, 2020.



**Gráfico 8-3:** Gráfico de cajas. Inhibición de la fosfolipasa de la toxina de *B. asper*

Realizado por: Díaz, Mariza, 2020.

## Análisis

Para realizar el test ANOVA se utilizó un  $(\alpha) = 0.05$  y en función del valor calculado de  $Pr(>F) = 0.112$  se puede concluir que debemos rechazar la  $H_0$  por consiguiente, las dos muestras son estadísticamente diferentes (Rosner, 2015).

## Discusión

En el análisis de la inhibición de la Fosfolipasa A2, según los resultados estadísticos proporcionados por ANOVA, el tratamiento a la muestra de la toxina *B. atrox* y *B. asper* usando el extracto de *C. fruticosa* y el suero antiofídico estadísticamente tendrían el mismo efecto, sin embargo el tiempo de coagulación con el extracto es menor en comparación con el suero antiofídico, pero es mayor el tiempo de coagulación con respecto a la muestra de las toxinas, teniendo en cuenta que, el tiempo de coagulación con respecto al extracto y la toxina de *B. atrox* es un 37% mayor que el tiempo de coagulación del extracto con la toxina de *B. asper*.

### 3.7.2 Inhibición de la hialuronidasa

En la tabla descrita a continuación se presentan los datos de la inhibición de la hialuronidasa en la toxina de *B. atrox* mediante el suero antiofídico polivalente o el extracto de *C. fruticosa*.

**Tabla 13-3:** Inhibición de la hialuronidasa en la toxina de *B. atrox*. Suero antiofídico Vs *Cordyline fruticosa*

Concentración (ppm)	% Inhibición <i>B. atrox</i> - Suero Antiofídico	% Inhibición, <i>B. atrox</i> - <i>C. fruticosa</i>
2000	94.9219	99.3862
200	94.3014	98.6301
20	94.1335	97.7933
2	94.0148	97.0869

Realizado por: Díaz, Mariza, 2020.

## Prueba de ANOVA

A continuación, se indica un análisis estadístico del porcentaje de la inhibición de la hialuronidasa en la toxina de *B. atrox*.

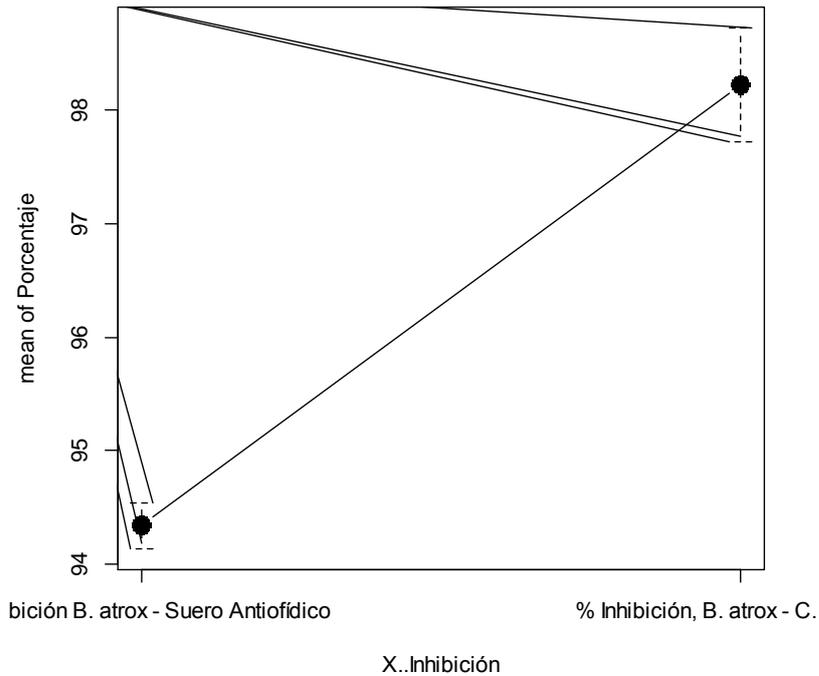
H<sub>0</sub>:  $\bar{X}$  Porcentaje de inhibición de la hialuronidasa en la toxina de *B. atrox* con el suero antiofídico  
 =  $\bar{X}$  Porcentaje de inhibición de la hialuronidasa en la toxina de *B. atrox* con el extracto de *C. fruticosa*

H<sub>1</sub>:  $\bar{X}$  Porcentaje de inhibición de la hialuronidasa en la toxina de *B. atrox* con el suero antiofídico  
 ≠  $\bar{X}$  Porcentaje de inhibición de la hialuronidasa en la toxina de *B. atrox* con el extracto de *C. fruticosa*

**Tabla 14-3:** Análisis estadístico. Inhibición de la hialuronidasa en la toxina de serpiente de *B. atrox*, ANOVA

F. Var.	Df	Sum Sq	Mean Sq	F. value	Pr (>F)
Concentración (ppm)	1	30.128	30.13	51.91	0.000362 ***
Error	6	3.483	0.58		
Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1					
Nivel	N	Mean	Desv. Est.		
FLA2 – <i>C. fruticosa</i> – <i>B. atrox</i>	4	98.224			0.999
FLA2 – S, Antiofídico – <i>B. atrox</i>	4	94.342			0.403

Realizado por: Díaz, Mariza, 2020.



**Gráfico 9-3:** Gráfico de cajas. Inhibición de la hialuronidasa de la toxina de *B. atrox*

Realizado por: Díaz, Mariza, 2020.

### Análisis

Para realizar el test ANOVA se utilizó un  $\alpha = 0.05$  y en función del valor calculado de  $\Pr(>F) = 0.000362$  por lo tanto no hay suficiente evidencia para rechazar la  $H_0$  por consiguiente, las dos muestras son estadísticamente iguales (Rosner, 2015).

A continuación, se indica los datos del porcentaje de la inhibición de la hialuronidasa en la toxina de *B. asper* mediante el suero antiofídico polivalente o el extracto de hojas secas de *C. fruticosa*.

**Tabla 15-3:** Datos de la inhibición de la hialuronidasa en la toxina de *B. asper*. Suero antiofídico Vs *Cordyline fruticosa*

Concentración (ppm)	% Inhibición, <i>B. asper</i> - Suero Antiofídico	% Inhibición, <i>B. asper</i> - <i>C. fruticosa</i>
2000	94.8661	97.5446
200	94.1370	96.8219
20	93.9720	96.2863
2	93.5911	96.2394

Realizado por: Díaz, Mariza, 2020.

### Prueba de ANOVA

$H_0$ :  $\bar{X}$  Porcentaje de inhibición de la hialuronidasa en la toxina de *B. asper* con el suero antiofídico =  $\bar{X}$  Porcentaje de inhibición de la hialuronidasa en la toxina de *B. asper* con el extracto de *C. fruticosa*

$H_1$ :  $\bar{X}$  Porcentaje de inhibición de la hialuronidasa en la toxina de *B. asper* con el suero antiofídico  $\neq$   $\bar{X}$  Porcentaje de inhibición de la hialuronidasa en la toxina de *B. asper* con el extracto de *C. fruticosa*

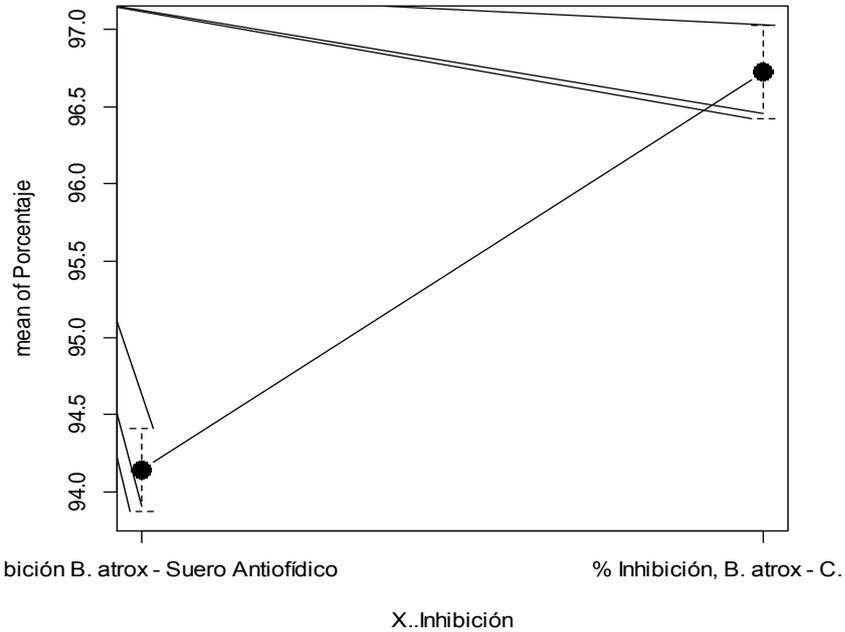
Análisis estadístico con R de la inhibición de la hialuronidasa en la toxina de *B. asper*.

**Tabla 16-3:** Análisis estadístico. Inhibición de la hialuronidasa en la toxina de serpiente *B. asper*, ANOVA.

F. Var.	Df	Sum Sq	Mean Sq	F. value	Pr (>F)
Concentración (ppm)	1	13.329	13.329	40.67	0.000699
Error	6	1.966	0.328		

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1			
Nivel	N	Mean	Desv. Est.
FLA2 – C. fruticosa – <i>B. asper</i>	4	96.723	0.608
FLA2 – S, Antiofídico – <i>B. asper</i>	4	94.141	0.534

Realizado por: Díaz, Mariza, 2020.



**Gráfico 10-3:** Gráfico de cajas. Inhibición de la hialuronidasa de la toxina de *B. asper*

Realizado por: Díaz, Mariza, 2020.

**Análisis**

Para realizar el test ANOVA se utilizó un  $(\alpha) = 0.05$  y en función del valor calculado de  $Pr(>F) = 0.000699$  por lo tanto no hay suficiente evidencia para rechazar la  $H_0$  por consiguiente, las dos muestras son estadísticamente iguales (Rosner, 2015).

**Discusión**

En el análisis de la inhibición de la hialuronidasa, según los resultados estadísticos proporcionados por ANOVA, con el tratamiento a la muestra a la toxina *B. atrox* y *B. asper* usando el extracto de *C. fruticosa* y el suero antiofídico estadísticamente tiene diferencias significativas, por tanto el efecto de la aplicación del tratamiento mediante el extracto de *C. fruticosa* y el suero antiofídico tendría un efecto diferente, sin embargo tomando en consideración el porcentaje de inhibición del extracto es mucho mejor en un 4% en comparación con el suero antiofídico.

### 3.7.3 Inhibición de la actividad caseinolítica

En la siguiente tabla se expresa los datos de la inhibición de la actividad caseinolítica en la toxina de *B. atrox*.

**Tabla 17-3:** Inhibición de la actividad caseinolítica en la toxina de *B. atrox*. Suero antiofídico Vs *Cordyline fruticosa*

Concentración (ppm)	% Inhibición, <i>B. atrox</i> - Suero Antiofídico	% Inhibición, <i>B. atrox</i> - <i>C. fruticosa</i>
2000	9.7561	-92.9825
200	29.2683	-50.8772
20	45.1220	7.0175
2	63.4146	40.3509

Realizado por: Díaz, Mariza, 2020.

### Prueba de ANOVA

H<sub>0</sub>:  $\bar{X}$  Porcentaje de inhibición de la actividad caseinolítica en la toxina de *B. atrox* con el suero antiofídico =  $\bar{X}$  Porcentaje de inhibición de la actividad caseinolítica en la toxina de *B. atrox* con el extracto de *C. fruticosa*

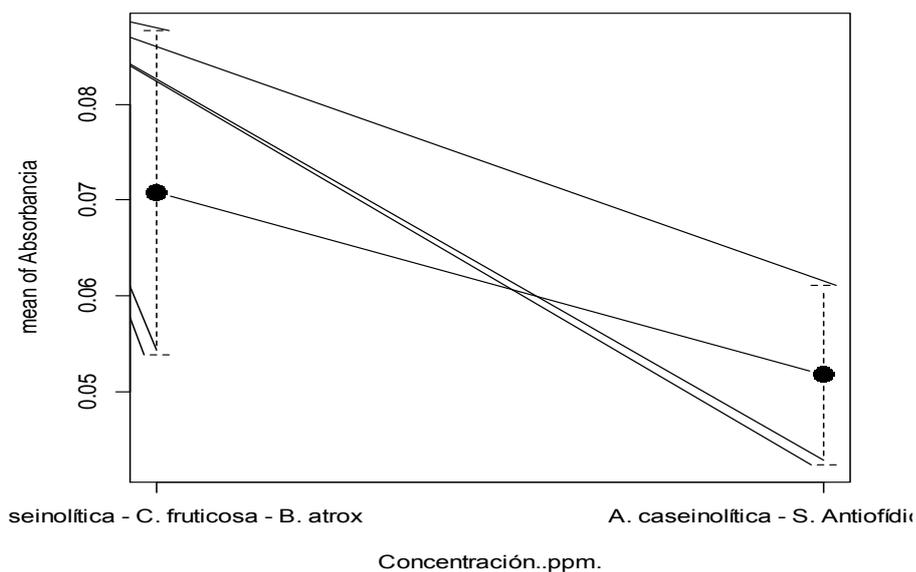
H<sub>1</sub>:  $\bar{X}$  Porcentaje de inhibición de la actividad caseinolítica en la toxina de *B. atrox* con el suero antiofídico  $\neq$   $\bar{X}$  Porcentaje de inhibición de la actividad caseinolítica en la toxina de *B. atrox* con el extracto de *C. fruticosa*

A continuación, se indica un análisis estadístico en R de la inhibición de la actividad caseinolítica en la toxina de *B. atrox*.

**Tabla 18-3:** Análisis estadístico. Inhibición de la actividad caseinolítica en la toxina de *B. atrox*, ANOVA

F. Var.	Df	Sum Sq	Mean Sq	F. value	Pr (>F)
Concentración (ppm)	1	0.000722	0.0007220	0.964	0.364
Error	6	0.004491	0.0007486		
Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1					
Nivel	N	Mean	Desv. Est.		
FLA2 – <i>C. fruticosa</i> – <i>B. atrox</i>	4	0.07075	0.03386		
FLA2 – S, Antiofídico – <i>B. atrox</i>	4	0.05175	0.01873		

Realizado por: Díaz, Mariza, 2020.



**Gráfico 11-3:** Gráfico de cajas. Inhibición de la actividad caseinolítica en la toxina de serpiente de *B. atrox*

Realizado por: Díaz, Mariza, 2020.

## Análisis

Para realizar el test ANOVA se utilizó un  $(\alpha) = 0.05$  y en función del valor calculado de  $Pr(>F) = 0.364$  se puede concluir que debemos rechazar la  $H_0$  por consiguiente, las dos muestras son estadísticamente diferentes. (Rosner, 2015).

Seguido, se indica los datos del porcentaje de la inhibición de la actividad caseinolítica en la toxina de *B. asper*.

**Tabla 19-3:** Datos de la inhibición de la actividad caseinolítica en la toxina de *B. asper*. Suero antiofídico Vs *Cordyline fruticosa*

Concentración (ppm)	Absorbancia, <i>B. asper</i> - Suero Antiofídico	Absorbancia, <i>B. asper</i> - <i>C. fruticosa</i>
2000	11.5942	-67.4157

200	30.4348	-8.9888
20	46.3768	37.0787
2	60.8696	75.2809

Realizado por: Díaz, Mariza, 2020.

## Prueba de ANOVA

$H_0$ :  $\bar{X}$  Porcentaje de inhibición de la actividad caseinolítica en la toxina de *B. asper* con el suero antiofídico =  $\bar{X}$  Porcentaje de inhibición de la actividad caseinolítica en la toxina de *B. asper* con el extracto de *C. fruticosa*

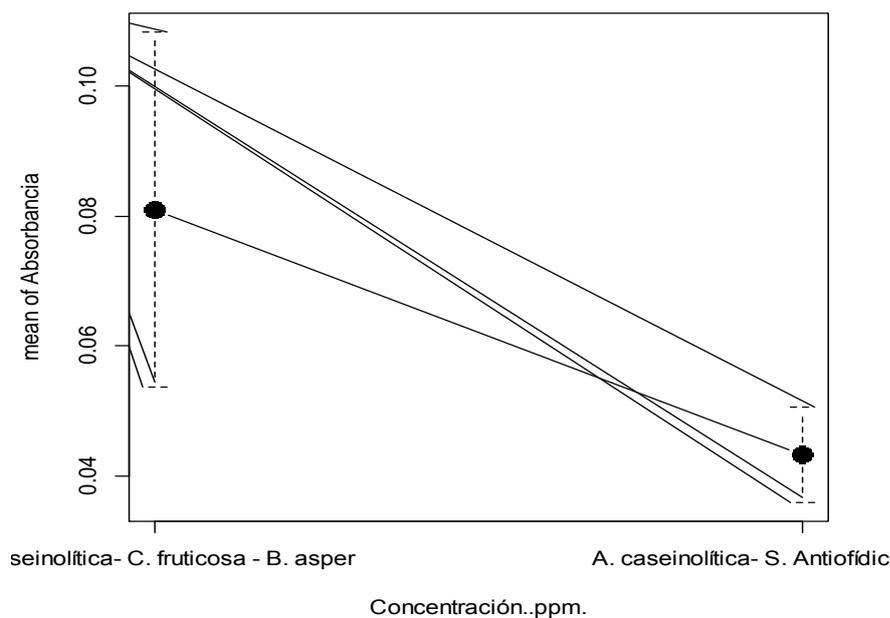
$H_1$ :  $\bar{X}$  Porcentaje de inhibición de la actividad caseinolítica en la toxina de *B. asper* con el suero antiofídico  $\neq$   $\bar{X}$  Porcentaje de inhibición de la actividad caseinolítica en la toxina de *B. asper* con el extracto de *C. fruticosa*

Continuando, se indica un análisis estadístico con R de la inhibición de la actividad caseinolítica en la toxina de *B. asper*.

**Tabla 20-3:** Análisis estadístico. Inhibición de la actividad caseinolítica en la toxina de *B. asper*, ANOVA.

F. Var.	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr (>F)
Concentración (ppm)	1	0.002850	0.002850	1.776	0.231
Error	6	0.009627	0.001605		
Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1					
Nivel	N	Mean	Desv. Est.		
FLA2 – <i>C. fruticosa</i> – <i>B. asper</i>	4	0.08100		0.05473	
FLA2 – S, Antiofídico – <i>B. asper</i>	4	0.04325		0.01461	

Realizado por: Díaz, Mariza, 2020.



**Gráfico 12-3:** Gráfico de cajas. Inhibición de la actividad caseinolítica en la toxina de serpiente de *B. asper*

Realizado por: Díaz, Mariza, 2020.

## Análisis

Para realizar el test ANOVA se utilizó un  $(\alpha) = 0.05$  y en función del valor calculado de  $\text{Pr}(>F) = 0.231$  se puede concluir que debemos rechazar la  $H_0$  por consiguiente, las dos muestras son estadísticamente diferentes. (Rosner, 2015).

## Discusión

En el análisis de la inhibición de la actividad caseinolítica, según los resultados estadísticos proporcionados por ANOVA, el tratamiento a la muestra de la toxina de *B. atrox* y *B. asper* usando el extracto de *C. fruticosa* y el suero antiofídico estadísticamente tendrían el mismo efecto, sin embargo, en el análisis a nivel de laboratorio al usar el extracto de *Cordyline fruticosa* inhibe

la toxina a concentraciones muy bajas de 2 ppm con el 75% de inhibición en comparación con el suero antiofídico que es el tratamiento adecuado para una ofidiotoxicosis pero a concentraciones más altas el extracto de *C. fruticosa* su porcentaje de inhibición es nulo.

### 3.7.4 Inhibición de la actividad coagulante

**Tabla 21-3:** Datos de la inhibición de la actividad coagulante en la toxina de *B. atrox*. S. antiofídico Vs *C. fruticosa*

Concentración (ppm)	Tiempo (s), Toxina de <i>B. atrox</i> - Suero Antiofídico	Tiempo (s), Toxina de <i>B. atrox</i> - <i>C. fruticosa</i>
2000	18	8
200	51	24
20	99	51
2	220	82

Realizado por: Díaz, Mariza, 2020.

### Prueba de ANOVA

$H_0$ :  $\bar{X}$  Porcentaje de inhibición de la actividad coagulante en la toxina de *B. atrox* con el suero antiofídico =  $\bar{X}$  Porcentaje de inhibición de la actividad coagulante en la toxina de *B. atrox* con el extracto de *C. fruticosa*

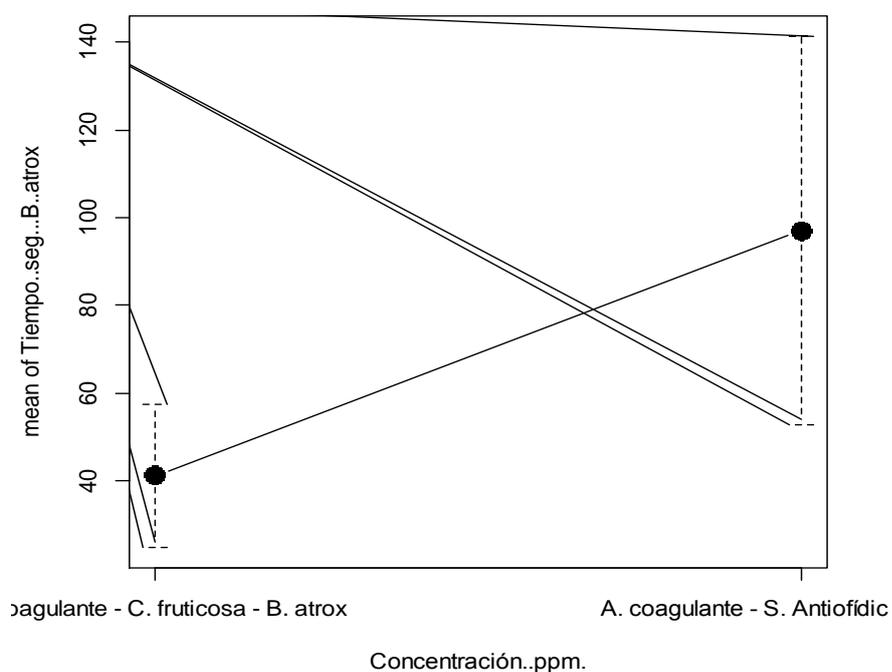
$H_1$ :  $\bar{X}$  Porcentaje de inhibición de la actividad coagulante en la toxina de *B. atrox* con el suero antiofídico  $\neq$   $\bar{X}$  Porcentaje de inhibición de la actividad coagulante en la toxina de *B. atrox* con el extracto de *C. fruticosa*

A continuación, se indica un análisis estadístico de la inhibición de la actividad coagulante con la toxina de *B. atrox*.

**Tabla 22-3:** Análisis estadístico. Inhibición de la actividad coagulante en la toxina de *B. atrox*, ANOVA

F. Var.	Df	Sum Sq	Mean Sq	F. value	Pr (>F)
Concentración (ppm)	1	6216	6216	1.4	0.282
Error	6	26649	4441		
Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1					
Nivel	N	Mean	Desv. Est.		
FLA2 – C. fruticosa – <i>B. atrox</i>	4	41.250	32.450		
FLA2 – S. Antiofídico – <i>B. atrox</i>	4	97.000	88.490		

Realizado por: Díaz, Mariza, 2020.



**Gráfico 13-3:** Gráfico de cajas. Inhibición de la actividad coagulante en la toxina de *B. atrox*

Realizado por: Díaz, Mariza, 2020.

## Análisis

Para realizar el test ANOVA se utilizó un  $(\alpha) = 0.05$  y en función del valor calculado de  $\Pr(>F) = 0.282$  se puede concluir que debemos rechazar la  $H_0$  por consiguiente, las dos muestras son estadísticamente diferentes (Rosner, 2015).

En la tabla siguiente, se indica los datos del porcentaje de la inhibición de la actividad coagulante en la toxina de *B. asper*.

**Tabla 23-3:** Datos de la inhibición de la actividad coagulante en la toxina de *B. asper*. Suero antiofídico Vs *Cordyline fruticosa*

Concentración (ppm)	Tiempo (s), Toxina de <i>B. asper</i> - Suero Antiofídico	Tiempo (s), Toxina de <i>B. asper</i> - <i>C. fruticosa</i>
2000	20	11
200	51	28
20	99	59
2	218	109

Realizado por: Díaz, Mariza, 2020.

### Prueba de ANOVA

$H_0$ :  $\bar{X}$  Porcentaje de inhibición de la actividad coagulante en la toxina de *B. asper* con el suero antiofídico =  $\bar{X}$  Porcentaje de inhibición de la actividad coagulante en la toxina de *B. asper* con el extracto de *C. fruticosa*

$H_1$ :  $\bar{X}$  Porcentaje de inhibición de la actividad coagulante en la toxina de *B. asper* con el suero antiofídico  $\neq$   $\bar{X}$  Porcentaje de inhibición de la actividad coagulante en la toxina de *B. asper* con el extracto de *C. fruticosa*

A continuación, se indica un análisis estadístico de la inhibición de la actividad coagulante con la toxina de *B. asper*.

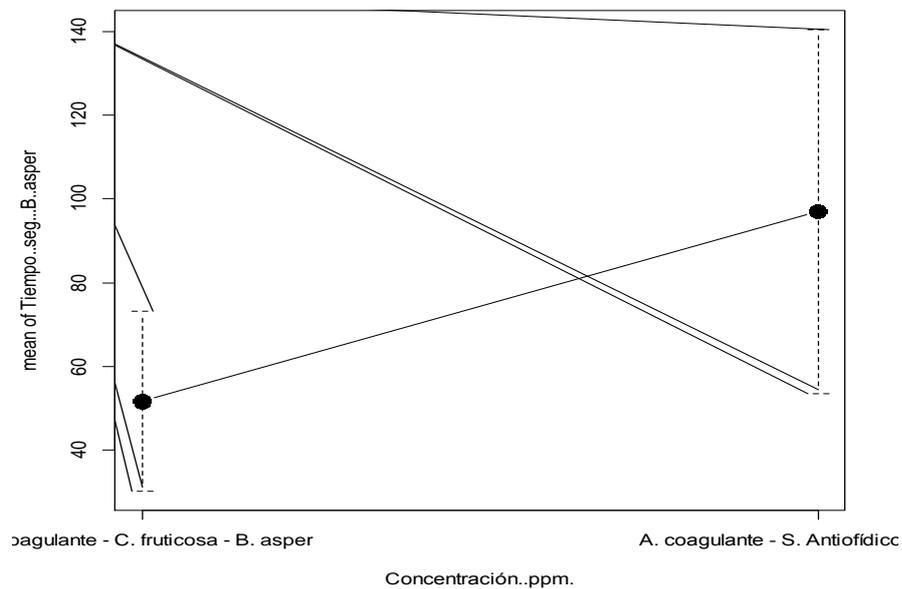
**Tabla 24-3:** Análisis estadístico. Inhibición de la actividad coagulante en la toxina de *B. asper*, ANOVA

F. Var.	Df	Sum Sq	Mean Sq	F. value	Pr (>F)
Concentración (ppm)	1	4095	4095	0.87	0.387
Error	6	28245	4707		

Signif. codes: 0 '\*\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Nivel	N	Mean	Desv. Est.
FLA2 – C. fruticosa – <i>B. asper</i>	4	51.750	43.030
FLA2 – S, Antiofídico – <i>B. asper</i>	4	97.000	86.970

Realizado por: Díaz, Mariza, 2020.



**Gráfico 14-3:** Gráfico de cajas. Inhibición de la actividad coagulante en la toxina de *B. asper*

Realizado por: Díaz, Mariza, 2020.

## Análisis

Para realizar el test ANOVA se utilizó un  $(\alpha) = 0.05$  y en función del valor calculado de  $\text{Pr}(>F) = 0.387$  se puede concluir que debemos rechazar la  $H_0$  por consiguiente, las dos muestras son estadísticamente diferentes (Rosner, 2015).

## **Discusión**

En el análisis de la inhibición de la actividad coagulante, según los resultados estadísticos proporcionados por ANOVA, el tratamiento a la muestra de la toxina *B. atrox* y *B. asper* usando el extracto de *C. fruticosa* y el suero antiofídico estadísticamente tendrían el mismo efecto, sin embargo el tiempo de coagulación con el extracto de *C. fruticosa* es menor en comparación con el suero antiofídico, pero es mayor el tiempo de coagulación con respecto a la muestra de las toxinas, teniendo en cuenta que, el tiempo de coagulación con respecto al extracto y la toxina de *B. asper* es un 55% mayor que el tiempo de coagulación del extracto con la toxina de *B. atrox*.

## CONCLUSIONES

- Se determinó la actividad inhibitoria del extracto etanólico de hojas secas de *Cordyline fruticosa* sobre la fosfolipasa A2, hialuronidasa, actividad caseinolítica y actividad coagulante en la toxina de *Bothrops atrox* y *Bothrops asper*; obteniendo una mayor inhibición de la hialuronidasa presente en la toxina.
- Según el control de calidad realizado en las hojas de *C. fruticosa* y los valores obtenidos de Humedad, Cenizas Totales, Cenizas Solubles en Agua e Insolubles en Ácido Clorhídrico; están dentro de los límites establecidos en la Farmacopea Británica.
- El tamizaje fitoquímico de las hojas de *C. fruticosa* indicó la presencia de metabolitos secundarios, principalmente de: alcaloides, esteroides y terpenos, flavonoides, quinonas, aceites y grasas, lactonas y cumarinas, azúcares reductores y saponinas.
- Se determinó, mediante el análisis estadístico que, la inhibición fue mayor sobre la actividad hialuronidásica y la actividad de la FLA2 de la toxina de la serpiente *Bothrops atrox* en relación con la toxina de *Bothrops asper* cuando se aplica el extracto etanólico de hojas secas de *Cordyline fruticosa*.

## RECOMENDACIONES

- Al momento de realizar el análisis enzimático es indispensable tener un espacio limpio ya que esto puede afectar a los análisis.
- Se recomienda a las personas que hacen uso de esta planta para los casos de mordeduras de serpientes en este caso de *B. atrox* y *B. asper* limitar su uso, ya que en algunos casos *C. fruticosa* podría variar la acción de la toxina en el organismo.
- Debido a que los ensayos en la presente investigación se realizó con el extracto etanólico de *C. fruticosa* se recomienda realizarlo con compuestos aislados.

## **GLOSARIO**

### **Abreviaturas**

**°C** Grados Celsius

**μl** Microlitro

**mL** Mililitro

**mg** Miligramos

**M** Molar

**mM** Milimolar

**ppm** Parte por millón

**min** Minuto

**seg** Segundo

**km** Kilómetro

**nm** Nanómetro

**Abs** Absorbancia

**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

**SIVE ALERTA** Sistema Integrado de Vigilancia Epidemiológica correspondiente  
a Emergencias Sanitarias

**FLA2** Fosfolipasa A<sub>2</sub>

**MDA-MB 231** Adenocarcinoma de mama humano

**A375** Melanoma maligno humano

**HCT116** Carcinoma de colon humano

## **Términos**

**Antídoto:** Conjunto de medicamento que impide, mejora o hace desaparecer algunos síntomas debido a diversos mecanismos actuando sobre el tóxico; no está libre de efectos secundarios (Garrigues y Vega 2013)

**Antioxidante:** Es aquel que forma parte del consumo diario y está presente en los alimentos, estos pueden prevenir efectos adversos de algunas sustancias en nuestro organismo (Coronado H et al. 2015)

**Carcinoma:** Es un grupo de células anormales, reconocido histológicamente, permaneciendo en su lugar de origen y es muy probable que estas células se vuelvan cancerígenas. Enfermedad metastásica sin detección (Sánchez et al. 2006)

**Citotoxicidad:** Es un daño celular que es provocado por ciertos anticuerpos o a su vez por células tóxicas. Es una respuesta inmune para defender al organismo contra agentes infecciosos (Universidad de Navarra 2019).

**Edema:** Es la acumulación de líquido en el intersticio o en los tejidos y se debe a causas como lesiones y favoreciendo a la retención de líquidos y de sodio en una zona localizada (Flores et al., 2014, p.51).

**Equimosis:** Son lesiones cutáneas tipo hematoma, se caracteriza por que tiene depósito de sangre debajo de la piel y esta se encuentra de manera intacta (Jiménez et al., 2016,p.1).

**Flictena:** O también conocida como ampolla, puede estar llena de líquido. Las causas comunes son quemaduras, lesiones o traumatismos (Bellido y Fernández, 2012, p.1).

**Inflamación:** Es una reacción que desencadena el organismo como defensa del mismo y tiene la capacidad de adaptar al organismo a circunstancias que no son normales. Es una respuesta a una lesión tisular (Vega, 2008, p.1).

**Necrosis:** Es la muerte del tejido a causa de una lesión o una enfermedad, se la considera irreversible ya que la sangre no llega hacia el tejido (Agudelo y López, 2010, p.2).

**Reacción anafiláctica:** Ocurre cuando la persona a desarrollado algún tipo de alergia a un componente y se puede presentar con erupción cutánea, náusea y vómitos, dificultad para respirar y por último shock (Rubio et al., 2003, p.104).

## BIBLIOGRAFÍA

**AGUDELO, M.E.R. y LÓPEZ, M.R.**, 2010. La necrosis, un mecanismo regulado de muerte celular. , vol. 23, no. 2, pp. 13. ISSN 0121-0793.

**ÁVALOS, A. y PÉREZ, E.**, 2009. Metabolismo secundario de plantas. 3, vol. 2, pp. 119-145. ISSN 1989-3620.

**BAULIES, G. y TORRES, R.**, 2012. Actualización en fitoterapia y plantas medicinales. *FMC. Formación Médica Continuada en Atención Primaria*, vol. 19, no. 3, pp. 149-160. ISSN 1134-2072.

**BELLIDO, M.J.C. y FERNÁNDEZ, P.M.G.**, 2012. Lesiones cutáneas ampollosas. , vol. 18, pp. 3.

**BETANCOURT, E., DIAZ, J., ANGARITA, T., MOLINA, E.C.G. y DÍAZ, R.**, 2018. *Bothrops atrox* (Linnaeus, 1758). , vol. 4, pp. 7-23.

**BRAVO, E.**, 2011. *La Biodiversidad en el Ecuador* [en línea]. Cuenca-Ecuador: Editorial Universitaria Abya-Yala. ISBN 978-9978-10-168-1. Disponible en: <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/6788/1/La%20Biodiversidad.pdf>.

**CASTRILLÓN, D., ACOSTA, J., HERNÁNDEZ, E. y ALONSO, L.**, 2007. Envenenamiento ofídico. *1*, vol. 23, pp. 96-111. ISSN 0120-5552.

**CASTRO, O., GUTIÉRREZ, J.M., BARRIOS, M., CASTRO, I., ROMERO, M. y UMAÑA, E.**, 1999. Neutralización del efecto hemorrágico inducido por veneno de *Bothrops asper*(Serpentes: Viperidae) por extractos de plantas tropicales. *Revista de Biología Tropical*, vol. 47, no. 3, pp. 605-616. ISSN 0034-7744.

**CELIS, Á., MENDOZA, C., PACHÓN, M., CARDONA, J. y DELGADO, W.**, 2008. Extractos vegetales utilizados como biocontroladores con énfasis en la familia Piperaceae. Una revisión. , pp. 97-105.

**CORONADO H, M., VEGA Y LEÓN, S., GUTIÉRREZ T, R., VÁZQUEZ F, M. y RADILLA V, C.**, 2015. Antioxidantes: perspectiva actual para la salud humana. *Revista chilena de nutrición*, vol. 42, no. 2, pp. 206-212. ISSN 0717-7518. DOI 10.4067/S0717-75182015000200014.

**DE SOUZA, L.L., STRANSKY, S., GUERRA-DUARTE, C., FLOR-SÁ, A., SCHNEIDER, F.S., KALAPOTHAKIS, E. y CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C.,** 2015. Determination of Toxic Activities in Bothrops spp. Snake Venoms Using Animal-Free Approaches: Correlation Between In Vitro Versus In Vivo Assays. *Toxicological Sciences*, vol. 147, no. 2, pp. 458-465. ISSN 1096-6080. DOI 10.1093/toxsci/kfv140.

**DI FERRANTE, N.,** 1956. Turbidimetric measurement of acid mucopolysaccharides and hyaluronidase activity. *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 220, no. 1, pp. 303-306. ISSN 0021-9258.

**FIERRO, L., CAMPOS, N., CONTRERAS, J., ESPINOZA, S., LÓPEZ, I., MÁRQUEZ, R., RAMÍREZ, M., VERAS, E. y RODRÍGUEZ, A.,** 2017. Productos enzimáticos (hialuronidasa, colagenasa y lipasa) y su uso en dermatología. *3*, vol. 61, pp. 206-219. *Dermatol Rev Mex*

**FLORES, B., FLORES, I. y LAZCANO, M.,** 2014. Edema: enfoque clínico. *1*, vol. 30, pp. 51-55. *Medicina Interna de México*

**FLORES, H.V. y SIGALL, D.A.,** 2011. Hialuronidasa: aplicaciones dermatológicas. *4*, vol. 9, pp. 292-294.

**FOUEDJOU, R.T., TEPONNO, R.B., QUASSINTI, L., BRAMUCCI, M., PETRELLI, D., VITALI, L.A., FIORINI, D., TAPONDJOU, L.A. y BARBONI, L.,** 2014. Steroidal saponins from the leaves of *Cordyline fruticosa* (L.) A. Chev. and their cytotoxic and antimicrobial activity. *Phytochemistry Letters*, vol. 7, pp. 62-68. ISSN 18743900. DOI 10.1016/j.phytol.2013.10.001.

**GARRIGUES, M. y VEGA, L.,** 2013. *Guía de administración de antídotos y antagonistas* [en línea]. 1era Ed. Albacete: s.n. [Consulta: 10 diciembre 2019]. ISBN 84-695-7049-8. Disponible en: [http://www.chospab.es/area\\_medica/farmacia\\_hospitalaria/profesional/guiaAntidotos/doc/guia\\_antidotos\\_2014.pdf](http://www.chospab.es/area_medica/farmacia_hospitalaria/profesional/guiaAntidotos/doc/guia_antidotos_2014.pdf). Servicio de Farmacia Complejo Hospitalario Universitario de Albacete

**GRANARA, A.,** 2017. *Medicina Tradicional & Etnomedicina*. [en línea]. S.I. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/316656465\\_Medicina\\_Tradicional\\_Etnomedicina](https://www.researchgate.net/publication/316656465_Medicina_Tradicional_Etnomedicina).

**GUTIÉRREZ, J.M.,** 2002. Comprendiendo los venenos de serpientes: 50 años de investigaciones en América Latina. *REVISTA DE BIOLOGÍA TROPICAL*, vol. 2, pp. 377-394.

**HUALPA, M.C.O.,** 2016. *Mordeduras de serpientes, factores de riesgo y complicaciones atendidas en Ciatox- Guayaquil, periodo 2014-2016* [en línea]. Guayaquil-Ecuador: Universidad

de Guayaquil. Disponible en: <http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/18580/1/TESIS%201.pdf>.

**HURRELL, J. y DELUCCHI, G.**, 2012. FAMILIA ASPARAGACEAE. *ieeff*, vol. 11, no. 9, pp. 1-12. ISSN 0327 – 506X. HERBARIO MCNS

**JIMÉNEZ, J.C.J., ALVARADO, S.T.C. y MORALES, L.S.**, 2016. EVALUACIÓN MÉDICO LEGAL DE LAS EQUIMOSIS CUTANEAS. , vol. 33, no. 1, pp. 9. ISSN 1409-0015.

**LIM, T.K.**, 2015. Cordyline fruticosa. En: T.K. LIM, *Edible Medicinal and Non Medicinal Plants* [en línea]. Dordrecht: Springer Netherlands, pp. 627-632. [Consulta: 13 noviembre 2019]. ISBN 978-94-017-9510-4. Disponible en: [http://link.springer.com/10.1007/978-94-017-9511-1\\_18](http://link.springer.com/10.1007/978-94-017-9511-1_18).

**MACK-WEN, V., RICO, L., ALARCÓN, J. y PEREAÑEZ, J.**, 2009. Inhibición in vitro del veneno de *B. asper* con extractos etanolicos de *Brownea ariza B* (Caesalpiniaceae). *I*, vol. 18, pp. 43-48. ISSN 0121-4004.

**MENA, V.G.**, 2014. Metodología de evaluación de confort térmico exterior para diferentes pisos climáticos en Ecuador. , pp. 15.

**MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA**, 2007. *Manual de normas y procedimientos sobre prevención y tratamiento de accidentes ocasionados por mordedura de serpientes* [en línea]. 2007. S.l.: s.n. Disponible en: [https://aplicaciones.msp.gob.ec/salud/archivosdigitales/documentosDirecciones/dnn/archivos/MANUAL%20DE%20NORMAS%20PROCEDIM.%20PREVENC.MORDEDURA%20DE%20SERPIENTES\(1\).pdf](https://aplicaciones.msp.gob.ec/salud/archivosdigitales/documentosDirecciones/dnn/archivos/MANUAL%20DE%20NORMAS%20PROCEDIM.%20PREVENC.MORDEDURA%20DE%20SERPIENTES(1).pdf).

**MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA**, 2017. *Manejo clínico de pacientes con mordeduras de serpientes venenosas y picaduras de escorpiones. Protocolo basado en la evidencia*. Primera edición. Quito: Dirección Nacional de Prevención y Control y Dirección Nacional de Normatización: s.n. ISBN 978-9942-30-499-5.

**OMS**, 2019. Mordeduras de serpientes venenosas. [en línea]. [Consulta: 13 noviembre 2019]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/snakebite-envenoming>.

**OOI, S.O., SIM, K.Y., CHUNG, M.C. y KON, O.L.**, 1993. Selective antiproliferative effects of thymidine. *Experientia*, vol. 49, no. 6-7, pp. 576-581. ISSN 0014-4754. DOI 10.1007/bf01955167.

**OOI, S.O. y SIMA, K.Y.**, 1993. Selective antiproliferative effects of thymidine. , pp. 6.

**OPS & OMS**, 2009. *Manual para la identificación, prevención y tratamiento de mordeduras de serpientes venenosas en Centro América. Volumen I: Guatemala* [en línea]. 2009. S.l.: s.n. Disponible en: file:///C:/Users/Mariza/Desktop/manualidentificacion-spa.pdf.

**ORDUNA, T., LLOVERAS, S., ROODT, A., GARCÍA, S., HAAS, A., MORENO, I., PENNA, A. y SAGARDOYBURU, S.**, 2007. Guía de prevención, diagnóstico, tratamiento y vigilancia epidemiológica de los envenenamientos ofídicos. [en línea]. [Consulta: 17 noviembre 2019]. Disponible en: [http://www.ecofield.net/Legales/Salud\\_publica/res34-07\\_MS.htm](http://www.ecofield.net/Legales/Salud_publica/res34-07_MS.htm).

**OSORIO, E.**, 2009. *Aspectos básicos de farmacognosia* [en línea]. 2009. S.l.: s.n. [Consulta: 18 noviembre 2019]. Disponible en: [https://www.academia.edu/16696556/Aspectos\\_b%C3%A1sicos\\_de\\_farmacognosia](https://www.academia.edu/16696556/Aspectos_b%C3%A1sicos_de_farmacognosia).

**PONOU, B.K., TEPONNO, R.B., TAPONDJOU, A.L., LACAILLE-DUBOIS, M.-A., QUASSINTI, L., BRAMUCCI, M. y BARBONI, L.**, 2019. Steroidal saponins from the aerial parts of *Cordyline fruticosa* L. var. strawberries. *Fitoterapia*, vol. 134, pp. 454-458. ISSN 0367-326X. DOI 10.1016/j.fitote.2019.03.019.

**RODRÍGUEZ, Y.C.V., DÍAZ, M.B., ÁLVAREZ, J.L.L. y GONZÁLEZ, M.**, 2002. Origen e importancia de la fosfolipasa A2 de secreción. *36*, vol. 2, pp. 121-128.

**ROSNER, B.**, 2015. *Fundamentals of Biostatistics*. S.l.: Cengage Learning. ISBN 978-1-305-46551-0.

**RUBIO, C., LASA, E., ARROABARREN, E., GARRIDO, S., GARCÍA, B.E. y TABAR, A.I.**, 2003. Anafilaxia. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*, vol. 26, pp. 103-110. ISSN 1137-6627.

**SÁNCHEZ, A.**, 2015. “EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD CICATRIZANTE IN VITRO. , pp. 81.

**SÁNCHEZ, C., SÁNCHEZ, A., MAXIMIANO ALONSO, C., HURTADO NUÑO, A. y SÁNCHEZ YUSTE, M.R.**, 2006. Carcinoma de origen desconocido: diagnóstico y manejo terapéutico. *Oncología (Barcelona)*, vol. 29, no. 3, pp. 11-22. ISSN 0378-4835. DOI 10.4321/S0378-48352006000300002.

**SEPÚLVEDA, G.**, 2003. La Participación de los Metabolitos Secundarios en la Defensa de las Plantas. , pp. 355-363.

Tropicos. *Trópicos* [en línea], 2019. [Consulta: 18 noviembre 2019]. Disponible en: <https://www.tropicos.org/Name/18401647>.

**UNIVERSIDAD DE NAVARRA**, 2019. ¿Qué es citotoxicidad? *Clínica Universidad de Navarra* [en línea]. [Consulta: 10 diciembre 2019]. Disponible en: <https://www.cun.es/diccionario-medico/terminos/citotoxicidad>.

**VALENCIA, R.**, 2000. Ecuador Terra Incognita - flora del ecuador. *Ecuador Terra Incognita* [en línea]. [Consulta: 14 noviembre 2019]. Disponible en: [http://www.terraecuador.net/revista\\_6/6\\_nuestra\\_flora2.htm](http://www.terraecuador.net/revista_6/6_nuestra_flora2.htm).

**VEGA, G.**, 2008. Inflamación. *Rev Fac Med UNAM* [en línea], vol. 51, no. 5. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/facmed/un-2008/un085k.pdf>.

**VIDAL, J.C. y STOPPANI, A.O.M.**, 1971. Isolation and purification of two phospholipases A from Bothrops venoms. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 145, no. 2, pp. 543-556. ISSN 0003-9861. DOI 10.1016/S0003-9861(71)80014-0.

**YARLEQUÉ, A., VIVAS, D., INGA, R., RODRÍGUE, E., SANDOVAL, G.A., PESSAH, S. y BONILLA, C.**, 2008. Acción del antiveneno botrópico polivalente sobre las actividades proteolíticas presentes en los venenos de serpientes peruanas. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, vol. 25, no. 2, pp. 169-172. ISSN 1726-4634.

**YOKOSUKA, A., SUZUKI, T. y MIMAKI, Y.**, 2012. New Cholestane Glycosides from the Leaves of *Cordyline terminalis*. *CHEMICAL & PHARMACEUTICAL BULLETIN*, vol. 60, no. 2, pp. 275-279. ISSN 0009-2363, 1347-5223. DOI 10.1248/cpb.60.275.

## ANEXOS

### ANEXO A: RECOLECCIÓN DE LA MATERIA VEGETAL



*Cordyline fruticosa* en estado de fructificación. Finca Amiruka. Parroquia: Santo Domingo – Archidona - Napo.

### ANEXO B: CONTROL DE CALIDAD DE LAS HOJAS SECAS DE *C. fruticosa*.



Hojas desecadas de *Cordyline fruticosa*



Obtención de humedad de las hojas secas de *Cordyline fruticosa*



Obtención de cenizas totales



Filtración de cenizas totales para la obtención de cenizas solubles en agua.



Filtración de cenizas totales para la obtención de cenizas insolubles en ácido.

### ANEXO C: TAMIZAJE FITOQUÍMICO



Tamizaje fitoquímico del extracto etéreo.



Tamizaje fitoquímico del extracto alcohólico.



Tamizaje fitoquímico del extracto acuoso.

**ANEXO D: EXTRACCIÓN DEL EXTRACTO DE LAS HOJAS SECAS DE *C. fruticosa*.**



Concentración del extracto bruto en el rotavapor a presión reducida a 60°C



Extracto total seco de *Cordyline fruticosa*

**ANEXO E: RECOLECCIÓN DEL VENENO DE *B. atrox* Y *B. asper***



Cavidad bucal de las serpientes



*Bothrops atrox*



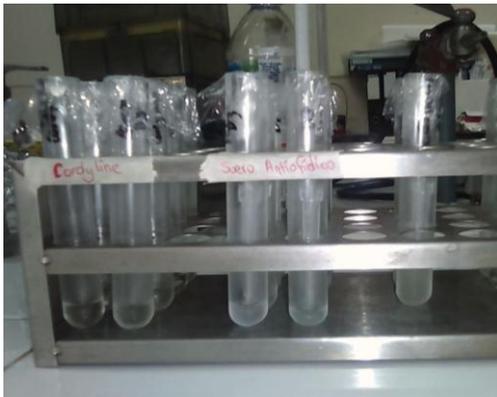
*Bothrops asper*

## ANEXO F: LIOFILIZACIÓN DE LA TOXINA DE LA SERPIENTE *B. atrox* Y *B. asper*

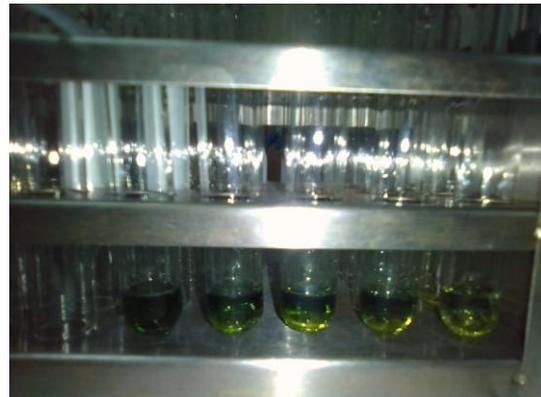


Liofilización de la toxina de *Bothrops atrox* y *Bothrops asper* en un microlifilizador

## ANEXO G: DETERMINACIÓN DE LOS ENSAYOS



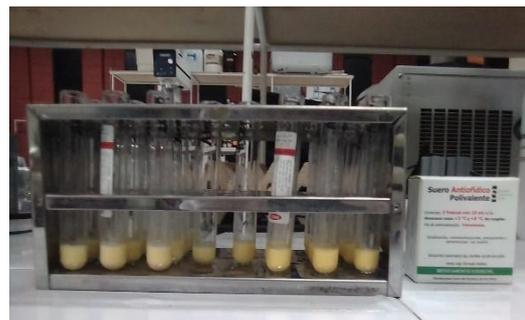
Preparación de las muestras (toxina + extracto, toxina + suero antiofídico y grupo control)



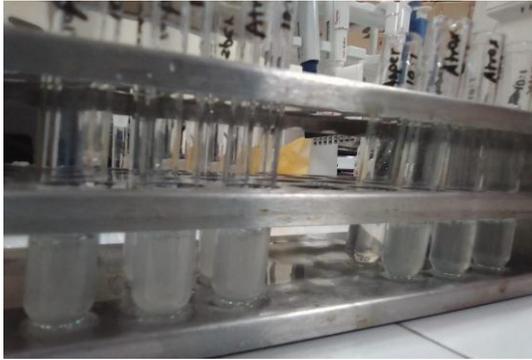
Determinación de proteínas (toxina + suero antiofídico)



Determinación de la Fosfolipasa A<sub>2</sub> (toxina + extracto seco)



Determinación de la Fosfolipasa A<sub>2</sub> (toxina + Suero antiofídico)



Actividad de la Hialuronidasa (toxina + extracto seco)



Actividad de la Hialuronidasa (toxina + Suero antiofídico)



Actividad Caseinolítica (toxina + extracto seco)



Actividad Caseinolítica (toxina + suero antiofídico)



Actividad Coagulante (toxina + extracto seco)



Actividad Coagulante (toxina + suero antiofídico)

**ANEXO H: GUÍA DE MOVILIZACIÓN DE ESPECÍMENES DE FLORA Y FAUNA PARA  
C. fruticosa**

MINISTERIO DEL AMBIENTE



**GUÍA DE MOVILIZACIÓN DE ESPECÍMENES DE FLORA Y  
FAUNA SILVESTRE**

**Nro. 62-06-2019-VS-DPAN-MAE**

**Fecha de emisión:** 26 de Junio de 2019

**Fecha de movilización:** 29 de junio de 2019 **Válido hasta:** 29 de Junio de 2019 **Hora:** 23H00

La Dirección Provincial del Ambiente de Napo **Autoriza a** Diego Vinueza con C.I. 0603187154, Investigadora de la Escuela Superior Politécnica Chimborazo **a la movilización de especímenes de Fauna ( ), Flora ( X ) desde:** El cantón Tena, provincia de Napo **hacia:** La ciudad de Riobamba, a La Escuela Superior Politécnica de Chimborazo ESPOCH, provincia de Chimborazo, **de acuerdo al siguiente detalle:**

NOMBRE CIENTIFICO	NOMBRE COMUN	DESCRIPCIÓN DEL ESPECIMEN O PARTE CONSTITUTIVA	ESTADO	CANTIDAD
Por identificar	planta	Planta de la familia Asparagaceae	Muestra preservado en Papel periódico	1
<b>TOTAL 01 muestras de plantas</b>				<b>1</b>

**Observaciones:**

Los especímenes o elementos constitutivos se movilizarán en:

**Vehículo:** Chevrolet (Aveo) **RUC:** X **Placa:** TBF 1239

**Conductor:** Gustavo Díaz **C.I.** 1801706639

**Los especímenes van en calidad de:**

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

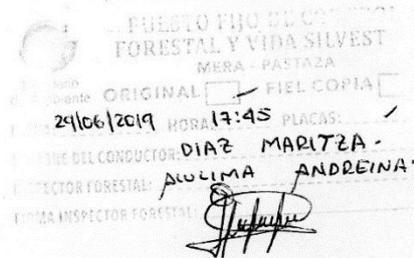
Comercio ( ) Nombre del centro de manejo .....

Investigación ( X ) Nombre de la Investigación: ESTUDIO DE LA BIODIVERSIDAD EN WEL ECUADOR, ECOLOGÍA, CONSERVACIÓN Y SU POTENCIAL USO SOSTENIBLE MAE-DNB-CM-2018-0086

Firma de responsabilidad:

**Ing. Carlos Rivadeneyra**  
**Director Provincial del Ambiente Napo**

Firma del beneficiario.....  
J.O.



## ANEXO I: CERTIFICADO DE IDENTIFICACIÓN DE LA ESPECIE VEGETAL



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

Ofc.No.062.CHEP.2019

29 de julio del 2019

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 a la señorita Díaz Valdiviezo Mariza Lisset con CI: 150072139-2, tesista de Bioquímica y Farmacia, se identificó: *Cordyline fruticosa* (L.) A. Chev. Esta especie es introducida, se revizó en los registros del herbario y se ingresará a la colección del herbario en un tiempo no determinado 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.



Ing. Jorge Caranqui Msc.  
BOTANICO  
HERBARIO ESPOCH

FACULTAD DE  
RECURSOS  
NATURALES

CHIMBORAZO

**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**  
**DIRECCIÓN DE BIBLIOTECAS Y RECURSOS PARA**  
**EL APRENDIZAJE Y LA INVESTIGACIÓN**  
**UNIDAD DE PROCESOS TÉCNICOS**  
**REVISIÓN DE NORMAS TÉCNICAS, RESUMEN Y BIBLIOGRAFÍA**

**Fecha de entrega:** 28 / 01 / 2020

<b>INFORMACIÓN DEL AUTOR/A (S)</b>
<b>Nombres – Apellidos:</b> Mariza Lisset Díaz Valdiviezo
<b>INFORMACIÓN INSTITUCIONAL</b>
<b>Facultad:</b> Ciencias
<b>Carrera:</b> Bioquímica y Farmacia
<b>Título a optar:</b> Bioquímica Farmacéutica
<b>f. Analista de bibliotecas responsable:</b>