



UNIVERSIDAD REGIONAL AMAZÓNICA IKIAM
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA VIDA
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

**EVALUACIÓN DE LA INHIBICIÓN DE LAS ACTIVIDADES
ENZIMÁTICAS Y COAGULANTE DE *BOTHROPS ATROX* POR
EL EXTRACTO DE *PIPTOCOMA DISCOLOR* (KUNTH) PRUSKI**

Proyecto de investigación previo a la obtención del Título de:
INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

AUTOR: ASHLY GABRIELA MICOLTA YÉPEZ

TUTOR: PhD. JOSÉ RAFAEL DE ALMEIDA

Napo - Ecuador

2022

**DECLARACIÓN DE DERECHO DE AUTOR, AUTENTICIDAD Y
RESPONSABILIDAD**

Yo, **ASHLY GABRIELA MICOLTA YÉPEZ**, con documento de identidad N° **0850033226** declaro que los resultados obtenidos en la investigación que presento en este documento final, previo a la obtención del título de Ingeniería en **Biotecnología**, son absolutamente inéditos, originales, auténticos y personales.

En virtud de lo cual, el contenido, criterios, opiniones, resultados, análisis, interpretaciones, conclusiones, recomendaciones y todos los demás aspectos vertidos en la presente investigación son de mi autoría y de mi absoluta responsabilidad.

Tena, 2 de diciembre del 2022.



Ashly Gabriela Micolta Yépez

CI. 0850033226

AUTORIZACION DE PUBLICACION EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL

Yo, ASHLY GABRIELA MICOLTA YÉPEZ, con documento de identidad N° 0850033226, en calidad de autor/a y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación: EVALUACIÓN DE LA INHIBICIÓN DE LAS ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS Y COAGULANTE DE *BOTHROPS ATROX* POR EL EXTRACTO DE *PIPTOCOMA DISCOLOR* (KUNTH) PRUSKI, de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN, reconozco a favor de la Universidad Regional Amazónica Ikiam una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Así mismo autorizo a la Universidad Regional Amazónica Ikiam para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el Repositorio Institucional de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación superior.

Tena, 2 de diciembre del 2022.



Ashly Gabriela Micolta Yépez

CI. 0850033226

CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DE TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR

Certifico que el Trabajo de Integración Curricular Titulado: **EVALUACIÓN DE LA INHIBICIÓN DE LAS ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS Y COAGULANTE DE *BOTHROP* *ATROX* POR EL EXTRACTO DE *PIPTOCOMA DISCOLOR* (KUNTH) PRUSKI**, en la modalidad: Tesis, fue realizado por: Ashly Gabriela Micolta Yépez, bajo mi dirección.

El mismo ha sido revisado en su totalidad y analizado por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto, cumple con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad Regional Amazónica Ikiam, para su entrega y defensa.

Tena, 2 de diciembre del 2022.

Firma



Firmado electrónicamente por:
**JOSE RAFAEL
DE ALMEIDA**

José Rafael de Almeida

CI. 1757448954

DEDICATORIA

A Carmen Yépez, mi madre, que me apoyó durante toda la carrera y siempre me incentivó a ser mejor día a día con un “esfuérzate y sé valiente”, gracias por no dejarme rendir.

A mi padre Gervis Micolta y mis hermanos Karina, Darío y Gervis que siempre velaron por mi bienestar, me aconsejaron y apoyaron en lo que necesitaba. A mis sobrinos, pilares fundamentales en mi vida esperando que mis logros los incentiven a ser mejores siempre.

A mis tías Carmela y Zoila, sin su apoyo y sus palabras de aliento nada de esto hubiera sido posible.

AGRADECIMIENTO

A mis familiares por su apoyo incondicional durante todo este proceso de crecimiento profesional.

A mis maestros que dejaron huella durante mi vida estudiantil y aportaron sus conocimientos. A Rafael de Almeida, no solo profesor y tutor de este trabajo de investigación, si no también amigo y apoyo fundamental para mi desarrollo como biotecnóloga y como persona.

A María Cristina Peñuela por su acompañamiento durante las primeras fases del proyecto y su conocimiento compartido como Botánica para la identificación y colecta del material vegetal.

A Joel Medina y Nina Espinosa de los Monteros, quienes aportaron con su conocimiento como técnicos de laboratorio durante todo este proceso. A Jefferson Pastuña quien aportó con su conocimiento para los ensayos fitoquímicos.

Gracias a mis compañeros del grupo de toxinología que hicieron del laboratorio un ameno refugio. A mis amigos, parte de toda mi vida universitaria, gracias por los buenos momentos y los recuerdos creados.

TABLA DE CONTENIDO

CARÁTULA

DECLARACIÓN DE DERECHO DE AUTOR, AUTENTICIDAD Y RESPONSABILIDAD..... ii

AUTORIZACION DE PUBLICACION EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL..... iii

CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DE TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR..... iv

DEDICATORIA..... v

AGRADECIMIENTO..... vi

TABLA DE CONTENIDOS..... vii

ÍNDICE DE TABLAS..... ix

ÍNDICE DE FIGURAS..... ix

ÍNDICE DE ANEXOS..... x

RESUMEN..... xiii

ABSTRACT..... xiv

CAPÍTULO I. MARCO TEÓRICO..... 1

1.1 Antecedentes..... 1

1.2 Envenenamiento Bothrópico..... 2

1.3 Accidentes Ofídicos en Ecuador..... 3

1.4 Tratamiento Frente al Envenenamiento por Serpientes..... 4

1.4.1 Plantas Alexíteras..... 5

1.5 *Piptocoma discolor* (Kunth) Pruski..... 6

1.5.1 Descripción general..... 6

1.5.1 Distribución..... 6

1.6 Planteamiento del Problema..... 7

1.7 Justificación de la Investigación..... 8

1.8 Objetivos de la Investigación..... 9

1.8.1 Objetivo General..... 9

1.8.2 Objetivos Específicos..... 9

CAPÍTULO II. MARCO METODOLÓGICO..... 10

2.1 Obtención de Material Vegetal y Veneno..... 10

2.1.1 Material Vegetal:..... 10

2.1.2 Material Animal:..... 11

2.2 Perfil Bioquímico..... 11

2.2.1 Electroforesis..... 11

2.2.2	Fraccionamiento de Pool de Veneno y Extracto.....	12
2.2.2.1	Purificación del Extracto.....	12
2.2.2.2	Fraccionamiento de Proteínas.....	13
2.3	Ensayos Enzimáticos.....	13
2.3.1	Actividad Proteolítica.....	14
2.3.2	Actividad Fosfolipásica.....	14
2.3.3	Actividad de las Serinproteasas.....	15
2.4	Evaluación de la Actividad Coagulante.....	15
2.4.1	Actividad Coagulante y de Neutralización.....	15
2.5	Análisis Fitoquímico de <i>P. discolor</i>.....	16
2.5.1	Determinación Cualitativa de Flavonoides y Polifenoles.....	16
2.5.1.1	Determinación Cualitativa de Flavonoides.....	16
2.5.1.2	Determinación Cualitativa de Alcaloides.....	17
2.5	Determinación Cuantitativa de Flavonoides y Polifenoles.....	17
2.5.2.1	Determinación Cuantitativa de Flavonoides.....	17
2.5.2.2	Determinación Cuantitativa de Polifenoles.....	18
2.5.3	Determinación de la Metabolómica de <i>P. discolor</i>.....	18
2.5.3.1	Espectrometría de Masas.....	18
2.5.3.2	Análisis del Metaboloma con MS-DIAL.....	19
2.6	Análisis Estadístico.....	20
CAPÍTULO III. RESULTADOS.....		21
3.1	Obtención de Extractos Vegetales.....	21
3.2	Perfil Bioquímico del Pool de Venenos de <i>B. atrox</i> y de <i>P. discolor</i>.....	21
3.3	SDS- PAGE de la Interacción Veneno/Extracto.....	23
3.4	Evaluación de la Actividad Enzimática.....	24
3.4.1	Evaluación de la Inhibición de la Actividad Enzimática.....	24
3.4.2	Evaluación de la Inhibición de la Actividad Enzimática.....	25
3.5	Evaluación de la Actividad Coagulante.....	26
3.5.1	Actividad Coagulante del Veneno de <i>B. atrox</i>.....	26
3.5.2	Inhibición de la Actividad Coagulante del Veneno.....	26
3.6	Determinación Fitoquímica y Metabolómica.....	27
3.6.1	Determinación Cualitativa de Flavonoides y Alcaloides.....	27
3.6.2	Determinación Cuantitativa de Flavonoides y Polifenoles.....	28
3.6.3	Espectrometría de Masas.....	28
3.6.4	Identificación de Metabolitos con Posible Acción Antiveneno.....	30
CAPÍTULO IV. DISCUSIÓN.....		32
CAPÍTULO V. CONCLUSIÓN.....		40

CAPÍTULO VI. RECOMENDACIONES.....	41
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	42
ANEXOS.....	42

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla No. 1 Inhibición de la actividad coagulante en minutos del veneno de <i>B. atrox</i>	27
Tabla No. 2 Determinación fitoquímica del extracto acuoso de corteza de <i>P. discolor</i>	28
Tabla No. 3 Cuantificación de Flavonoides y Polifenoles presentes en <i>P. discolor</i>	28
Tabla No.4 Identificación de metabolitos presentes la corteza de <i>P. discolor</i>	29
Tabla No.5 Metabolitos en <i>P. discolor</i> con posible propiedad antiofídica.....	30

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura No. 1 Casos de mordeduras de serpiente en Ecuador.....	4
Figura No. 2 Excicata del árbol de <i>P. discolor</i> y su distribución geográfica.....	7
Figura No. 3 Perfiles cromatográficos de las muestras por HPLC.....	22
Figura No. 4 Gel de electroforesis en poliacrilamida (SDS PAGE).....	23
Figura No. 5 Inhibición de la actividad enzimática del veneno por <i>P. discolor</i>	24
Figura No. 6 Inhibición de la actividad enzimática del veneno por <i>P. discolor</i>	25
Figura No. 7 Actividad Coagulante del pool de venenos de <i>Bothrops atrox</i>	26

ÍNDICE DE ANEXOS

Tabla n°1.	Valores de la intensidad de las bandas del gel de electroforesis (SDS PAGE) obtenidos por ImageJ.
Tabla n°2.	Datos de los picos del perfil cromatográfico del pool de venenos de <i>B. atrox</i> , obtenidos por HPLC.
Tabla n°3.	Datos de los picos del perfil cromatográfico del extracto acuoso de <i>P. discolor</i> , obtenidos por RP HPLC.
Tabla n°4.	Datos de los picos del perfil cromatográfico de la interacción extracto acuoso/veneno sin incubación previa, obtenidos por RP HPLC.
Tabla n°5.	Datos de los picos del perfil cromatográfico de la interacción extracto acuoso/veneno incubado por 30 minutos a 37°C, obtenidos por RP HPLC.
Tabla n°6.	Datos de la actividad enzimática de las fosfolipasas del veneno <i>B. atrox</i> por la interacción con el extracto acuoso de <i>P. discolor</i> .
Tabla n°7.	Datos de la actividad enzimática de las serinproteasas del veneno <i>B. atrox</i> por la interacción con el extracto acuoso de <i>P. discolor</i> .
Tabla n°8.	Datos de la actividad enzimática caseinolítica del veneno <i>B. atrox</i> por la interacción con el extracto acuoso de <i>P. discolor</i> .
Tabla n°9.	Datos de la actividad enzimática de las serinproteasas del veneno <i>B. atrox</i> por la interacción con el extracto etanólico de <i>P. discolor</i> .
Tabla n°10.	Datos de la actividad enzimática de las fosfolipasas del veneno <i>B. atrox</i> por la interacción con el extracto etanólico de <i>P. discolor</i> .
Tabla n°11.	Datos de la actividad enzimática Caseinolítica del veneno <i>B. atrox</i> por la interacción con el extracto etanólico de <i>P. discolor</i> .
Figura No 1.	Determinación de flavonoides en extracto acuoso de <i>P. discolor</i> .
Figura No 2.	Determinación de alcaloides en el extracto acuoso de <i>P. discolor</i> .
Figura No 3.	Perfil cromatográfico del extracto acuoso de la corteza de <i>Piptocoma discolor</i> obtenido por UPLC-MS/MS.
Figura No 4.	Metabolito 1,2-bencenediol identificado en el cromatograma del extracto acuoso de la corteza de <i>P. discolor</i> por UPLC-MS/MS.
Figura No 5.	Metabolito ácido ortoaminobenzoico identificado en el cromatograma del extracto acuoso de la corteza de <i>P. discolor</i> obtenido por UPLC-MS/MS.
Figura No 6.	Metabolito ácido p-hidroxibenzoico identificado en el cromatograma

del extracto acuoso de la corteza de *P. discolor* obtenido por UPLC-MS/MS.

- Figura No 7.** Metabolito ácido dihidroxibenzoico identificado en el cromatograma del extracto acuoso de la corteza de *P. discolor* obtenido por UPLC-MS/MS.
- Figura No 8.** Metabolito 4-hidroxi-3- metoximandelato identificado en el cromatograma del extracto acuoso de la corteza de *P. discolor* obtenido por UPLC-MS/MS.
- Figura No 9.** Metabolito carnosina identificado en el cromatograma del extracto acuoso de la corteza de *P. discolor* obtenido por UPLC-MS/MS.
- Figura No 10.** Metabolito dihidrojasmonato de metilo identificado en el cromatograma del extracto acuoso de la corteza de *P. discolor* obtenido por UPLC-MS/MS.
- Figura No 11** Metabolito manosa-6-fosfato identificado en el cromatograma del extracto acuoso de la corteza de *P. discolor* obtenido por UPLC-MS/MS.
- Figura No 12** Metabolito L-sacaropina identificado en el cromatograma del extracto acuoso de la corteza de *P. discolor* obtenido por UPLC-MS/MS.
- Figura No 13** Metabolito luteolina identificado en el cromatograma del extracto acuoso de la corteza de *P. discolor* obtenido por UPLC-MS/MS.
- Figura No 14.** Metabolito zearalenona identificado en el cromatograma del extracto acuoso de la corteza de *P. discolor* obtenido por UPLC-MS/MS.
- Figura No 15** Metabolito 5-aminoimidazol-4- carboxamida-1- ribofuranosil 5'-monofosfato identificado en el cromatograma del extracto acuoso de la corteza de *P. discolor* obtenido por UPLC-MS/MS.
- Figura No 16** Metabolito maltitol identificado en el cromatograma del extracto acuoso de la corteza de *P. discolor* obtenido por UPLC-MS/MS.
- Figura No 17.** Metabolito ácido clorogénico identificado en el cromatograma del extracto acuoso de la corteza de *P. discolor* obtenido por UPLC-MS/MS.
- Figura No 18.** Metabolito malvidina-3- galactósido identificado en el cromatograma del extracto acuoso de la corteza de *P. discolor* obtenido por UPLC-MS/MS.
- Figura No 19.** Metabolito malvidina-3, 5-di-Ocloruro de glucósido identificado en el cromatograma del extracto acuoso de la corteza de Piwi obtenido por UPLC-MS/MS.

Figura No 20. Metabolito procianidina C1 identificado en el cromatograma del extracto acuoso de la corteza de *P. discolor* obtenido por UPLC-MS/MS.

Figura No 21. Metabolito cianidina-3-O-(6"-O- (E-p-coum)-2"-O- (beta-xilopiranosil)- beta glucopiranosido)-5-O-beta-glucopiranosido identificado en el cromatograma del extracto acuoso de la corteza de *P. discolor* obtenido por UPLC-MS/MS.

Figura No 22. Metabolito petunidina-3-O-(6"-O- (4'''-O-E-coum)-alfa ramnopiranosil-beta glucopiranosil)- 5-O beta-sal de trifluoroacetato de glucopiranosido identificado en el cromatograma del extracto acuoso de la corteza de Piwi obtenido por UPLC-MS/MS.

RESUMEN

La incidencia de accidentes ofídicos por *Bothrops atrox* es considerado un problema de importancia en países tropicales como Ecuador. La Amazonía ecuatoriana es caracterizada por una alta diversidad biológica y cultural y la etnofarmacología considera relevante el estudio de plantas como alternativa antiofídica, en esta región. Una especie pionera y abundante es el árbol localmente conocido como piwi (*Piptocoma discolor*) utilizado como potencial antiveneno. Con el objetivo de conocer los efectos de los extractos de la planta ante la actividad enzimática y toxicológica del envenenamiento por mordeduras de serpientes, se evaluaron los perfiles del veneno y de la planta mediante cromatografía y electroforesis, la inhibición enzimática utilizando sustratos sintéticos y cromogénicos, la actividad coagulante del veneno y su inhibición por medio del extracto tanto acuoso como etanólico, la composición del extracto mediante un tamizaje fitoquímico cuantitativo y cualitativo, y los posibles metabolitos secundarios mediante espectrometría de masas. Encontrándose que las actividades catalíticas de las principales enzimas del veneno fueron inhibidas hasta un 79% por el extracto acuoso y hasta un 90% por el extracto etanólico de la corteza de Piwi. La propiedad antiveneno de esta planta está modulada principalmente por metabolitos del grupo de los polifenoles, primordialmente los flavonoides, taninos y antocianinas, sustancias capaces de inhibir la actividad de las enzimas PLA₂, SVSPs, SVMPS y la actividad coagulante del veneno bothrópico. Con lo cual, también se espera que la planta tenga inhibición frente a los efectos sistémicos y locales mediante tratamientos *in vivo*.

PALABRAS CLAVE: plantas, antiveneno, enzimas, toxinología, etnofarmacología.

ABSTRACT

Ophidian accidents by *Bothrops atrox* is considered an important problem in tropical countries such as Ecuador. The Ecuadorian Amazon is characterized by a high biological and cultural diversity and ethnopharmacology considers relevant the study of plants as an antiophidic alternative in this region. A pioneer and abundant specie is the tree, locally known as Piwi (*Piptocoma discolor*), used as a potential antivenom. In order to analyze the effects of plant extracts on the enzymatic and toxicological activity of snakebite envenomation, we evaluated the venom and plant profile by chromatography and electrophoresis, the enzymatic inhibition using synthetic and chromogenic substrates, the coagulant activity of the venom and its inhibition by both aqueous and ethanolic extract, the composition of the extract by quantitative and qualitative phytochemical screening, and the possible secondary metabolites by mass spectrometry. It was found that the catalytic activities of the main venom enzymes were inhibited up to 79% by the aqueous extract and up to 90% by the ethanolic extract of Piwi bark. The antivenom property of this plant is modulated mainly by metabolites of the polyphenol group, primarily flavonoids, tannins and anthocyanins, substances capable of inhibiting the activity of PLA2 enzymes, SVSPs, SVMPs and the coagulant activity of botryotopic venom. Thus, the plant is also expected to inhibit systemic and local effects by *in vivo* treatments.

KEYWORDS: plants, antivenom, enzymes, toxinology, ethnopharmacology.

CAPÍTULO I. MARCO TEÓRICO

1.1 Antecedentes

Las mordeduras de serpientes han amenazado y preocupado constantemente a la sociedad. Se estima que se producen entre 1.8 y 2.7 millones de envenenamientos por accidentes ofídicos en el mundo anualmente. Los efectos de los accidentes ofídicos causan, anualmente a nivel mundial cerca de 400 mil discapacidades permanentes y alrededor de 125 mil muertes humanas [11]. Por esta razón, la Organización Mundial de la Salud (OMS) coloca a los envenenamientos por mordedura de serpiente en la categoría de enfermedades desatendidas, siendo una de las primeras en su lista, evidenciando su posición prioritaria y su magnitud principalmente en países en vía de desarrollo [1].

En las selvas tropicales y en zonas rurales se encuentran poblaciones con bajos recursos económicos, vulnerables a sufrir accidentes ofídicos. El 70% del territorio ecuatoriano tiene características favorables a la presencia de diversas especies de serpientes [2]. De acuerdo con estadísticas epidemiológicas en el país, en los últimos años han ocurrido entre 1400 y 1800 accidente anuales con incidencia de 9,1 casos por 100 000 habitantes y mortalidad de 0,07 por cada 100 000 habitantes [1].

Entre las serpientes que generan mayor ocurrencia de estos accidentes en la Amazonía se destacan las llamadas “equis”, cuyo nombre científico es *Bothrops atrox*, de la familia *Viperidae* [2]. El veneno de esta serpiente está constituido principalmente por enzimas proteolíticas, membranolíticas y degradadoras de tejido muscular, que por lo tanto generan alteraciones fisiopatológicas locales y sistemáticas en el sitio de la mordedura [3]. Otros efectos locales son el dolor intenso, formación de edema eritematoso, equimosis, flictenas hemorrágicas y necrosis con infección secundaria. Entre los efectos sistemáticos predominan la toxicidad vascular, fallas renales, fallas en la coagulación sanguínea y hemorragias [3].

Según la organización mundial de la salud (OMS), el único tratamiento científicamente válido contra la mordedura de serpientes venenosas es el suero antiofídico, del cual no se dispone de una manufactura local en Ecuador desde el año 2014 [1]. Debido a la incidencia de estos accidentes ofídicos y la falta de recursos para tratarlos, se ha vuelto

extremadamente necesaria la búsqueda sustancias o de plantas alexíteras que contrarresten el efecto de las toxinas presentes en los venenos de las serpientes [4].

De manera general, la constitución bioquímica de estas plantas muestra una característica en común representada por la habilidad de poseer actividad analgésica, otras con actividad antiinflamatoria o ambas [5]. Cabe destacar que algunos extractos de plantas presentan el potencial de modular las acciones de enzimas al secuestrar compuestos metálicos necesarios para su activación. Entre estas están las enzimas proteolíticas y fosfolipasas, siendo principales protagonistas de la mayor parte de los efectos del veneno como edema, miotoxicidad, procoagulación y hemorragia [6].

Con el objetivo de conocer sobre nuevos productos que contrarresten los efectos del accidente ofídico, es de suma importancia considerar las vivencias tradicionales en comunidades amazónicas del Ecuador. Ya que, el estudio y análisis de plantas reportadas con efectos neutralizantes de veneno debe ser una prioridad de la investigación.

1.2 Envenenamiento Bothrópico

En aspectos generales, las especies del género *Bothrops*, se caracterizan por ocasionar efectos ante su envenenamiento como inflamación, hiperemia, necrosis, coagulación, colapso cardiovascular y disminución de plaquetas, hemorragia y nefrotoxicidad [7]. Dichos efectos son principalmente inducidos por las enzimas, proteasas, hialuronidasas, proteínas no enzimáticas, aminoácidos, péptidos, nucleótidos, aminas biogénicas y otros componentes inorgánicos [7]. Debido a la interacción de este conjunto de moléculas, el envenenamiento producido por estas serpientes genera complicaciones a nivel sistemático del cuerpo humano y daños locales. Entre los efectos se destacan edema, hemorragia y necrosis [7]. Sin embargo, la composición del veneno y los efectos que estos ocasionan varía significativamente de acuerdo con varios factores. Entre estos factores están la especie, cantidad de veneno inoculado, y factores en general del individuo afectado como tamaño, peso y edad, alterando la eficacia de la evaluación clínica de los distintos cuadros tóxicos [8].

El veneno de *B. atrox*, tiene en su composición toxinas como metaloproteinasas, fosfolipasas A₂, serinproteasas, I aminoxidasa y desintegrinas [9]. Según Palma, et al. (2021), en Ecuador la composición de los perfiles proteómicos de esta especie evidencia

mayor presencia de metaloproteasas del tipo III (III SVMPs) y de tipo I (I SVMPs) [9]. Dichas enzimas son descritas como altamente hemorrágicas debido a que son capaces de escindir fácilmente los componentes de la matriz extracelular, causando daño a la microvasculatura [10]. Es decir, se presentan efectos sistemáticos como disturbios de la coagulación sanguínea, además de shock y falla renal [7]. Cabe destacar que existe evidencia de la variación entre las isoformas de las toxinas presentes en los venenos de los individuos de esta especie, según la localidad geográfica [9]; esto implica que al usar un antídoto o el antiveneno, las dosis deberían variar de acuerdo con la evaluación del accidente ofídico.

1.3 Accidentes Ofídicos en Ecuador

En América, las serpientes de mayor importancia médica son las “víboras” de la familia *Viperidae* y las “corales” de la familia *Elapidae* [12]. Las características climáticas del Ecuador favorecen el crecimiento de serpientes venenosas y no venenosas. Se han identificado 44 especies de serpientes potencialmente venenosas y peligrosas para la población ecuatoriana [11]. *Bothrops atrox* es la especie responsable del 70% de accidentes registrados en el país anualmente [13].

Datos epidemiológicos del Ministerio de Salud Pública de Ecuador (MSP) demuestran que para el año 2021 hubo un total de 1556 casos de mordedura de serpientes y hasta la semana 28 del presente año se han notificado un total de 771 casos (**Figura 1**). De acuerdo con cifras epidemiológicas, en el Ecuador las regiones Costa y Amazonía muestran mayor número de accidentes ofídicos, que afectan principalmente a agricultores, jornaleros y campesinos debido a sus actividades laborales [2]. Como se puede observar en las **Figuras 1A y 1B**, las provincias con mayor incidencia de casos de ofidismo en Ecuador son Manabí, Orellana y Morona Santiago.

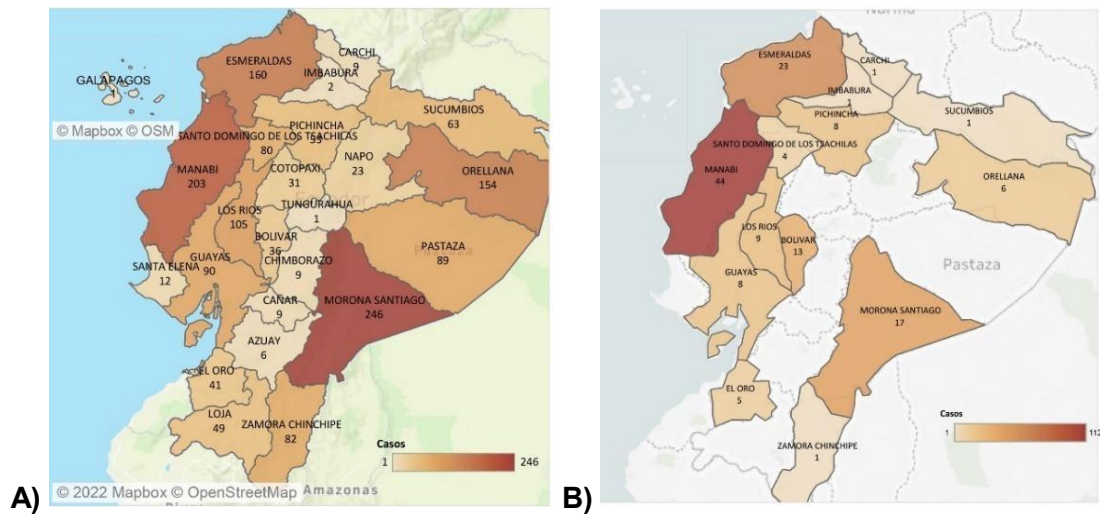


Figura No. 1 Casos de mordeduras de serpiente en Ecuador, año 2021 y parte del año 2022.
Fuente: MSP, 2022 [14,15].

En la **Figura 1** se muestran: **A)** Casos de mordedura de serpientes por provincia, año 2021. **B)** Casos de mordedura de serpientes por provincia hasta SE 28, año 2022.

1.4 Tratamiento Frente al Envenenamiento por Serpientes

En la actualidad, el único tratamiento aprobado y validado preclínicamente frente a los accidentes ofídicos a nivel mundial, es el suero antiofídico. Este producto biológico de alta relevancia es fabricado a partir de la molécula o fragmentos F(ab')₂ de inmunoglobulinas purificadas a partir del plasma de caballos hiperinmunizados con cocteles de venenos de diversas serpientes [13]. La producción de antivenenos es extensa a nivel mundial y se lleva a cabo en países latinos como Costa Rica, Venezuela, Colombia, México, Perú, Brasil y Argentina [16].

En Ecuador, la producción fue suspendida en el año 2014 por problemas con las buenas prácticas de manufactura [16]. El tratamiento actual para los accidentes ofídicos en este país es el antiveneno trivalente liofilizado importado del Instituto Clodomiro Picado (ICP) de la Universidad de Costa Rica [9]. En la producción de este suero se inmunizan caballos con venenos de *Bothrops asper*, *Crotalus simus* y *Lachesis stenophrys*, por lo es un tratamiento antiveneno polivalente que actúa frente a la afección generada por varias especies [9]. Dicho tratamiento es considerado muy eficaz, sin embargo, su administración tiene ciertas desventajas a considerar tales como: reacciones adversas, variaciones de lotes de fabricación, la necesidad de mantener cadenas de frío y la necesidad de un profesional especializado para su administración [17].

Debido a la dificultad para acceder a los tratamientos con antivenenos y dado que la mayoría de los accidentes ofídicos ocurren en zonas rurales, donde la accesibilidad a los centros de salud y medicamentos es frecuentemente limitada, las comunidades recurren a curanderos [1]. Los curanderos en las comunidades comúnmente usan los recursos proporcionados por la naturaleza, como las plantas, como parte del tratamiento [1]. Por esta razón, se destacan los saberes ancestrales como una valiosa fuente de información para el tratamiento en estos sectores. Su importancia radica no solo en salvar vidas al tener una opción rápida y de fácil acceso, sino que además favorece al desarrollo social, económico y ambiental de las poblaciones rurales [18].

1.4.1. Plantas Alexíteras

Uno de los tratamientos mayormente reconocido por los saberes ancestrales es el uso de las plantas en la medicina tradicional. En este caso, se hablan de las plantas alexíteras, las cuales se consideran plantas que tienen la capacidad de aliviar los síntomas complejos de un accidente ofídico [19]. Entre los síntomas que pueden aliviar estas plantas se destacan el dolor, inflamación, infección, sangrado y otros efectos recurrentes en el envenenamiento por la mordedura de animales ponzoñosos [19].

Históricamente, las plantas con propiedades neutralizantes son de gran importancia en las zonas alejadas de las ciudades, donde no hay fácil acceso a centros de salud [4]. Cabe destacar que, aunque se conozca el uso de gran variedad de estas plantas, varias no han sido científicamente analizadas. Por ejemplo, sus efectos sobre los venenos no han sido comprobados *in vitro* ni *in vivo*. Tampoco se ha determinado su composición química, los metabolitos encargados de estas actividades, ni se han caracterizado estructuralmente. En virtud de lo expuesto, estas investigaciones son necesarias para el desarrollo de antivenenos inspirados en materiales vegetales que puedan contrarrestar la letalidad y/o los efectos de los venenos de diversas especies de serpientes [20].

Entre los componentes que se encuentran en plantas alexíteras están los flavonoides, isoflavonoides, taninos, cumarinas, entre otros [20]. Dichos componentes inhiben las actividades antiinflamatorias, antitumoral, antihepatotóxica, antiarrítmica producidas por el veneno [5]. El ácido aristólico, por ejemplo, tiene actividad antiinflamatoria, inhibe la actividad lítica del veneno y reduce los edemas ocasionados por la acción de las

fosfolipasas presentes en los venenos [20]. Otros alcaloides como la tetrandina y las pareirubinas A y B también presentan propiedades analgésicas, antiinflamatorias y febrífugas [5]. Los esteroides y triterpenoides también tienen la capacidad de formar compuestos que al combinarse inhiben la hemólisis [5]. Esteroides como el sitosterol, estigmasterol y diterpenoides derivados del neo-cleorodano son capaces de inhibir las propiedades proteolíticas y hemorrágicas del envenenamiento [20]. Además, otros compuestos fenólicos como los ácidos hidroxibenzoicos y sus éteres metílicos al unirse con puentes de hidrógeno o uniones covalentes más fuertes ocupan sitios críticos e inhiben la acción de varias enzimas presentes en el veneno [5].

1.5 *Piptocoma discolor* (Kunth) Pruski

En Ecuador, el árbol de *Piptocoma discolor*, conocida como Piwi, es una planta con potencial efecto neutralizante frente al envenenamiento por mordedura de serpientes.

1.5.1 Descripción General

El Piwi es una especie perteneciente a la familia Asteraceae caracterizado por alcanzar los 30 m de altura, es de madera blanda y rápido crecimiento [21]. Esta especie requiere luz directa del sol para su desarrollo y se encuentra en bosques secundarios tempranos y tardíos, en estado de sucesión temprana [23, 24]. En el Ecuador habita con mayor densidad en bosques secundarios de las provincias amazónicas de Napo y Pastaza a una altura de 500 m.s.n.m y temperatura promedio de 20°C [26]. Estudios etnobiológicos sobre la familia Asteracea en Colombia lo señala con actividad antimalárica [77], además en un informe sobre plantas medicinales señala las hojas del Piwi con gran utilidad para tratar las diarreas infecciosas en Colombia, Costa Rica y Perú [78]; en Perú también existen estudios realizados donde la savia del tallo de *P. discolor* ha sido reportada como antigripal [79]. En Ecuador, esta especie es reconocida por su variable uso como: árbol maderable, para construcción, combustible, carpintería, artesanías y medicinal contra mordeduras de serpientes y sus inflamaciones, para lo cual usan la corteza del tallo [27, 28].

1.5.2 Distribución

En el Servicio de Información sobre Biodiversidad Mundial (GBIF) existen 1670 registros georreferenciados del árbol de *Piptocoma discolor* (Kunth) Pruski desde el sur

de México en Centro América, hasta Bolivia, y algunos registros en Brasil en Sur América [22]. Habita zonas donde hay alta pluviosidad, por ello se encuentra en los bosques húmedos tropicales. En Ecuador, la distribución del Piwi se encuentra en el bosque pie montano y cordillera oriental colindando con la región amazónica [25].

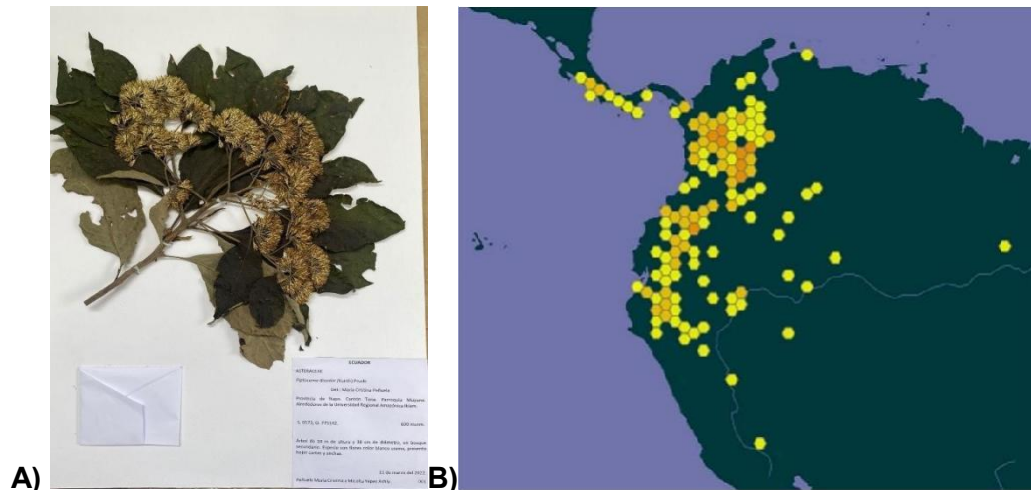


Figura No. 2 Excicata del árbol de *Piptocoma discolor* depositada en el herbario del INABIO (QCNE-026-2022) y su distribución a nivel mundial.

Fuente: GBIF, 2022 [22].

1.6 Planteamiento del Problema

Desde el punto de vista de salud pública, los accidentes ofídicos constituyen un problema de gran importancia. Debido a la prevalencia constante de factores como: el número de casos anuales, el complejo cuadro clínico derivado de la acción directa del veneno y las secuelas físicas sobre la población [5]. Estos factores son considerados importantes e invalidantes ante este problema de salud pública.

En el territorio ecuatoriano se encuentran cerca de 223 especies de serpientes, de las cuales 17% son venenosas. Además, debido al crecimiento demográfico y expansión rural hacia las áreas naturales, Ecuador se presenta como parte de los países con mayor riesgo de accidentes ofídicos en Latinoamérica [4]. En países como Ecuador, con gran cantidad de territorio rural y accidentes ofídicos, se considera de suma importancia la búsqueda de alternativas que complementen el tratamiento basado en antivenenos.

Entre estas alternativas se destacan las plantas alexíteras, cuyos componentes funcionan como inhibidores de los efectos tóxicos del veneno, lo cual genera una estrategia valiosa en el futuro de la medicina moderna [4]. A nivel etnobotánico, en la

Amazonía ecuatoriana, sobre todo en la provincia de Pastaza se destaca el uso del extracto de la corteza del árbol de Piwi (*Piptocoma discolor*) como bebida medicinal, para tratar los efectos del veneno de serpientes en los pobladores de dicha región [4]. Sin embargo, esta planta y gran parte de estos productos naturales usados por las comunidades amazónicas como parte de sus saberes ancestrales no han sido científicamente estudiados.

1.7 Justificación de la Investigación

El envenenamiento por mordedura de serpientes, según la OMS, está clasificada como una de las enfermedades tropicales desatendidas [1]. Anualmente se producen 5,4 millones de casos, de los cuales entre 1,8 y 2,7 millones causan envenenamiento. Se reportan entre 81 410 y 137 880 muertes y el triple de amputaciones y discapacidades permanentes [(1)]. Con relación a esto, se considera que esta enfermedad debería ser controlada por los gobiernos de los países con mayor incidencia de accidentes ofídicos. Ya que, ya que a pesar de su baja tasa de mortalidad, tiene un impacto socioeconómico elevado al presentar complicaciones en pacientes con un cuadro clínico que incluye deformidades, amputaciones, coagulopatías y hemorragias [73]. Los principales síntomas clínicos del veneno de la especie *B. atrox*, una de las especies con mayor incidencia de casos en Ecuador, son: hemorragias, trastornos de coagulación de la sangre, shock, insuficiencia renal y efectos como la necrosis y la infección bacteriana, capaces de ocasionar una discapacidad permanente en el individuo mordido por esta serpiente [80].

El único tratamiento disponible para revertir los efectos del envenenamiento por mordedura de serpiente es la inmunoterapia, constituido por fragmentos de inmunoglobulinas purificadas con anticuerpos obtenidos por inmunización de caballos [5]. Este tratamiento, a pesar de que disminuye el daño local y sistémico del envenenamiento, también es propenso a desarrollar reacciones adversas. Científicamente se reconoce que todos los productos de suero de caballo poseen la capacidad de estimular reacciones tempranas de hipersensibilidad como ciertas alergias y/o retardadas como la enfermedad del suero [74, 29]. En la actualidad, los científicos han investigado y puesto a prueba varias terapias que son alternativas eficaces contra el ofidismo [75]. Entre ellas se destaca la terapia a base de metabolitos derivados de plantas, que busca el diseño de inhibidores a base de plantas contra las toxinas del veneno, especialmente aquellas que inducen el daño local, potenciando la

etnofarmacología como una herramienta base para la medicina [76].

En la Amazonía ecuatoriana, particularmente en Pastaza se cuenta con el conocimiento de nativos que refieren el uso del extracto de la corteza de Piwi como bebida para tratar los efectos de los accidentes ofídicos en la zona [28]. También cabe destacar que esta especie es reconocida por su variable uso como árbol maderable, construcción, combustible, carpintería, artesanal y medicinal [27]. En Ecuador el árbol es más utilizado como maderable que como medicinal. Además, a nivel mundial no existe evidencia científica sobre su efecto como inhibidor de las principales enzimas causantes de los efectos del veneno de serpientes. Sumado a lo expuesto, Ecuador no presenta una soberanía en la producción de los antivenenos, lo que puede dejar a su población, principalmente amazónica, vulnerable a esta enfermedad tropical desatendida.

1.8 Objetivos de la Investigación

1.8.1 Objetivo General

Analizar la acción neutralizante del extracto de *Piptocoma discolor* frente a la coagulación sanguínea del veneno de *B. atrox*, así como identificar las principales enzimas tóxicas del veneno inhibidas.

1.8.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar bioquímicamente la interacción entre *P. discolor* y el veneno *B. atrox*.
- Evaluar la capacidad del extracto de inhibir enzimas fosfolipasas, metaloproteasas y serinproteasas presentes en el veneno de *B. atrox*.
- Caracterizar el efecto antivenómico del extracto de *Piptocoma discolor* frente a la acción coagulante inducida por el veneno de *B. atrox*.
- Determinar los principales componentes del extracto de *Piptocoma discolor* responsables de su propiedad antiofídica.

CAPÍTULO II. MARCO METODOLÓGICO

La metodología de la presente investigación se dividirá en cinco etapas: obtención del material vegetal a analizar, perfil bioquímico, ensayos enzimáticos, perfil de coagulación y neutralización, determinación fitoquímica y metabolómica.

2.1 Obtención de Material Vegetal y Veneno.

2.1.1 Material Vegetal:

Con la autorización del “Permiso recolección de especímenes de Especies de la diversidad biológica MAATE-DBI-CM-2021-0180”, se recolectaron muestras de *Piptocoma discolor* cerca de la Universidad Regional Amazónica Ikiam -URAI- (25°NE, 0°57'3" S 77°51'42"O), a 600 m.s.n.m. Se extrajeron 210 g de corteza del tallo para elaborar los extractos. Se limpió previamente la zona del tallo que se recolectó para obtener la muestra sin restos de musgos, se utilizó guantes y machete para ello. La muestra fue transportada al laboratorio de productos naturales de la URAI, se utilizaron bolsas ziploc y un cooler para mantener la temperatura y que no haya pérdida de propiedades organolépticas de la planta. Además, se recolectaron muestras de ramas de la planta en estado de floración que fueron entregadas al Herbario Nacional de Ecuador del INABIO con número de depósito: QCNE-026-2022.

En el laboratorio de química de productos naturales de la Universidad Regional Amazónica Ikiam se tomó la muestra de la corteza de *P. discolor* y se lavó con agua destilada para eliminar cualquier residuo. La muestra inicialmente se dejó secar a temperatura ambiente por 48 horas, luego se secó con una corriente de aire de 40°C en una estufa por 24 horas más. Posteriormente se trituro la corteza seca usando un molino manual para granos [30].

2.1.1.1 Elaboración de los Extractos a Partir del Material Vegetal

El extracto acuoso se obtuvo por medio de maceración con agua destilada por 48 horas. La mezcla se filtró usando papel filtro N° 2, un embudo Büchner y un matraz Erlenmeyer conectado a una bomba de succión. A continuación, el líquido obtenido se secó en un rotavaporador hasta obtener una muestra viscosa [31]. Finalmente, con

ayuda de un concentrador de muestras al vacío modelo miVac se llevó a concentrar la muestra obteniendo un residuo de aspecto pastoso. En el caso del extracto etanólico, como pretratamiento se realizó una maceración con etanol al 96% durante 48 horas, luego se siguió el mismo procedimiento antes mencionado.

2.1.2 Material Animal:

Las muestras de veneno liofilizado de *B. atrox* fueron obtenidos mediante colaboración con la Universidad Indoamérica. El profesor Dr. David Salazar, especialista en serpientes ecuatorianas, fue responsable de la identificación de los especímenes, de los cuales se obtuvieron los venenos usados en el presente trabajo. Para los ensayos se usó un pool de venenos de *B. atrox* de diversos lugares del Ecuador. La colecta de los venenos se realizó bajo los permisos de investigación MAE-DNB-CM-2015-0017 y MAE-DNB-CM-2019-0115 obtenidos del Ministerio del Ambiente de Ecuador.

2.2 Perfil Bioquímico.

2.2.1 Electroforesis.

Se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS PAGE). Se caracterizó la composición del veneno, del extracto acuoso y de la incubación veneno/extracto acuoso en proporciones 1:10, 1:20, 1:40, 1:80. Las muestras fueron tratadas de la siguiente manera: la muestra de veneno consistió en 0,02 mg de pool de veneno de *B. atrox* en 60 µL de buffer de carga (0,075 M Tris-HCl, pH 6,8; 10% (v:v) glicerol, 4% (m:v) SDS, 0,001% (m:v) de azul de bromofenol). Para los estudios de incubación veneno/extracto acuoso se realizaron las medidas necesarias para cada proporción; en el caso de la muestra de proporción 1:10 se usó 0,02 mg de veneno:0,2 mg de extracto, la muestra de proporción 1:20 consistió en 0,02 mg de veneno:0,4 mg de extracto, para la proporción 1:40 se usó 0,02 mg de veneno:0,8 mg de extracto, y en la proporción 1:80 se usó 0,02 mg de veneno:1,6 mg de extracto y cada muestra fue diluida en 60 µL de buffer de carga. Por último, en el caso del extracto puro se usó la cantidad de extracto acuoso antes mencionada para cada proporción y se disolvieron en 60µL de buffer de carga. Posteriormente, a cada muestra tanto de veneno solo, de la incubación veneno/extracto acuoso en proporciones 1:10, 1:20, 1:40, 1:80 y del extracto acuoso solo a diferentes proporciones se les adicionaron 5 µL de solución de DTT 1M y se llevaron al termo bloque a 95°C por 5 minutos [9].

Se armó una cámara de electroforesis vertical Mini-PROTEAN marca BIO-RAD. Siguiendo la metodología de Palma, et al. 2021 [9]. El gel de electroforesis estaba conformado por: un gel de apilamiento que consistió en bis-acrilamida (30:0,8) 5%; 0,06 M Tris-HCl, pH 6,8; 0,1 % (m:v) SDS; 0,15% (m:v) persulfato de amonio; 0,02(v:v) TEMED y un gel de corrida que contenía bis-acrilamida (30:0,8) 12%; 0,5 M Tris- HCl, pH 8,8; 4 % (m:v) SDS; 0,05% (m:v) persulfato de amonio; 0,35% (v:v) TEMED, esto con la finalidad de separar las muestras en condiciones reductoras. El buffer de corrida para la cámara de electroforesis consistió en 0,025 M Tris-HCl, pH 8,3; 0,18 M glicina, 1% (m:v) SDS.

Se usó un marcador molecular Spectral multicolor Broad Range Protein Ladder marca ThermoFisher en el primer pocillo del gel, con el objetivo de identificar los pesos moleculares de las bandas. Los siguientes pocillos contenían 60 µL de las muestras previamente preparadas. Luego, se conectaron los electrodos a la cámara de electroforesis y se usó con un voltaje de 120 V durante 7 horas. Finalmente, para visualizar las bandas el gel fue teñido con colorante azul brillante de Coomassie durante 24 horas manteniendo la agitación continua durante este tiempo. Luego, el gel fue desteñido con decolorante compuesto por metanol 40% y ácido acético 10% y constante agitación durante 6 horas hasta observar el gel transparente y las bandas coloreadas. Se usaron los softwares ImageJ y Gel Analyzer para analizar las diferencias de intensidad de las bandas.

2.2.2. Fraccionamiento de Pool de Veneno y Extracto.

2.2.2.1 Purificación del Extracto.

El extracto acuoso de la corteza fue tratado con el objetivo de eliminar impurezas y poder evaluarlo luego por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y de ultra resolución (UPLC), para ello se empleó extracción en fase sólida (SPE). Primero, se tomaron 5 mg de extracto y se disolvieron en 10 mL de agua destilada. Los cartuchos de polímeros multiusos Oasis HLB fueron activados adicionando 5 mL de metanol grado HPLC, 3 mL de agua destilada y 5 mL de una solución de HCl 0,01 M. Luego, se adicionaron 15 mL de la muestra a separar, seguidos de 5 mL de metanol grado HPLC y por último 10 mL de una mezcla agua – metanol proporción 1:1 [32]. El líquido recogido se secó en una estufa de aire a 45°C por 48 horas y finalmente se llevó al concentrador de muestras

miVac marca Genevac SP Scientific.

2.2.2.2 *Fraccionamiento de Proteínas.*

Se fraccionaron las proteínas presentes en el pool de veneno de *B. atrox*, el extracto acuoso de *P. discolor* y la interacción veneno/extracto acuoso por medio de cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP HPLC). El tratamiento de las muestras se realizó de la siguiente manera: para la muestra de veneno se usaron 2,7 mg del pool disueltos en 200 µL de una solución (ácido trifluoroacético (TFA) al 0,1% y acetonitrilo (ACN) 5%). En la muestra de extracto se usaron 2,7 mg de extracto acuoso disueltos en 200 µL de una solución (TFA 0,1% y ACN 5%). Para el fraccionamiento de extracto/veneno se usaron dos muestras en una proporción 1:1 de 2,7 mg de veneno y 2,7 mg de extracto acuoso disueltos en 200 µL de una solución (TFA 0,1% y ACN 5%), una de las muestras extracto/veneno fue previamente incubada durante 30 minutos a 37°C y la otra muestra no tuvo incubación. Luego, las cuatro muestras se centrifugaron durante 10 minutos a 13 000 x g.

A continuación, se tomaron 198 µL de sobrenadante para inyectarlo en un inyector 510/B automático del cromatógrafo líquido (HPLC) con un sistema de bombas binario (Waters 1525) equipado con el detector 2489 UV/Vis (Waters), el cual se monitoreó a 214 nm. Se usó una columna Phenomenex Jupiter C18 (250 mm × 4,6 mm, tamaño de partícula de 5 µm, 30 Å). Se emplearon dos fases móviles, la fase móvil A consistió en TFA al 0,1% y la fase móvil B consistió en ACN más TFA 0,1%. El flujo de elución fue de 1 mL/min y las fracciones fueron colectadas manualmente en base a los picos de absorbancia representativos del cromatograma [9]. Los cromatogramas fueron evaluados basados en la comparación de la altura y el área del pico en las diferentes condiciones evaluadas.

2.3 Ensayos Enzimáticos.

Los ensayos enzimáticos fueron realizados en el lector de microplacas GloMax Discover marca Promega. Cada ensayo se evaluó a diferente longitud de onda recomendada por literatura y con sustratos cromogénicos específicos para cada uno. Las muestras consistieron en un blanco de agua, un control positivo de 0,02 mg veneno, cuatro muestras de veneno/extracto acuoso, cuatro muestras de veneno/extracto etanólico. Ambas en proporciones 1:10 (0,02 mg de veneno:0,2 mg de extracto), 1:20 (0,02 mg de

veneno:0,4 mg de extracto), 1:40 (0,02 mg de veneno:0,8 mg de extracto), y 1:80 (0,02 mg de veneno:1,6 mg de extracto). Por último, cuatro muestras de solo extracto acuoso y etanólico, en las proporciones y cantidades antes mencionadas.

La solución de veneno por pocillo se realizó en una concentración 0,001 mg/μL. Se diluyeron 0,02 mg de veneno en 20 μL de buffer A (50 mM Tris-HCl, pH 8,0). Para la solución de los extractos se tomaron muestras de 0,2; 0,4; 0,8 y 1,6 mg de cada extracto (acuoso y etanólico). Cada muestra se diluyó en 20 μL de solución salina tamponada con fosfato (PBS 1X, pH 7,2) para los ensayos con el extracto acuoso. En el caso del extracto etanólico se diluyó cada muestra en 20 μL de una mezcla en proporción 1:3 (v/v) de dimetilsulfóxido (DMSO) y PBS 1X a pH 7,2. La actividad enzimática del control positivo (veneno solo), fue considerada como 100%. Finalmente, se analizaron los resultados tomando en cuenta el porcentaje de actividad que inhibió el extracto frente al veneno. Los ensayos fueron repetidos dos veces y las muestras evaluadas por triplicado en las microplacas.

2.3.1 Actividad Proteolítica.

Siguiendo la metodología de Palma, et al. 2021 [9], el ensayo se llevó a cabo usando azocaseína (Sigma Aldrich) como sustrato cromogénico específico. Esta solución de sustrato se preparó con 5 mg de azocaseína en 1 mL de buffer A (50 mM Tris-HCl, pH 8,0). El ensayo comenzó usando tubos Eppendorf donde se colocaron 90 μL de la solución de sustrato azocaseína, 20 μL de veneno y 20 μL de extracto tomando en cuenta las proporciones 1:10, 1:20, 1:40 y 1:80 veneno:extracto. El control positivo tuvo 20 μL de veneno y 20 μL de agua, en el blanco se colocaron 40 μL de agua en vez de las muestras y en los ensayos de extracto solo se sustituyó el veneno por 20 μL de agua. Los tubos con las muestras antes señaladas se incubaron durante 90 minutos en baño maría a 37°C. Posteriormente se agregaron 200 μL de ácido tricloroacético (TCA) al 5% a cada muestra, se centrifugaron durante 5 minutos a 8000 rpm. Finalmente, se tomaron 150 μL del sobrenadante de cada tubo y se colocaron en cada pocillo de la microplaca. Luego a cada pocillo se añadieron 150 μL de NaOH 0,5 M y se procedió a medir la absorbancia a 450 nm en el lector de microplacas a una temperatura de 37°C.

2.3.2 Actividad Fosfolipásica.

El ensayo se realizó usando una solución de sustrato cromogénico específico que

consistió en 3,1 mg de ácido benzoico 4-nitro-3 [octanoiloxi] (NOBA) con 1 mL de acetonitrilo y 10 mL de buffer Tris HCl 10 mM con CaCl_2 1 M y NaCl 10 mM a un pH 7,8. En una microplaca se mezclaron 20 μL de veneno más 20 μL de extracto y 220 μL de solución de sustrato, el control positivo tuvo 20 μL de veneno y 20 μL de agua, en el caso del blanco se inyectaron 40 μL de agua en vez de las muestras y para los ensayos solo con extracto se sustituyó el veneno por 20 μL de agua. Se procedió a leer las absorbancias cada 10 minutos a 410 nm mientras se incubaba la microplaca a una temperatura de 37°C [9].

2.3.3 Actividad de las Serinproteasas.

Con el objetivo de evaluar la actividad de las enzimas del veneno frente al sustrato cromogénico Benzoil-Arginil-p-nitroanilida (BapNA), la solución de sustrato consistió en una mezcla de 2,18 mg de BapNA en 50 μL de DMSO y 5 mL de buffer Tris-HCl 0,5 M pH 8,1. Cada pocillo de la microplaca se inyectaron con 200 μL de la solución de sustrato, 20 μL de veneno, 20 μL de extracto y 30 μL de buffer A, en el caso del blanco se inyectaron 40 μL de agua en lugar de las muestras, para los ensayos solo con extracto se sustituyó el veneno por 20 μL de agua y en el control positivo se colocaron 20 μL de veneno y 20 μL de agua. Se midió la actividad en el lector de microplacas a 410 nm cada 10 minutos mientras se incubó a 37°C [33].

2.4 Evaluación de la Actividad Coagulante.

2.4.1 Actividad Coagulante y de Neutralización.

Se realizaron dos ensayos de actividad coagulante, el primero se basó en determinar la dosis coagulante mínima (DCM) del pool de *B. atrox*. DCM se define como la dosis de veneno que induce coagulación del plasma en 60 segundos. Se diluyó el veneno en PBS (en concentración 1X), en las siguientes concentraciones 0,005:1 (0,5 $\mu\text{g/mL}$); 0,01:1 (1 $\mu\text{g/mL}$); 0,02:1 (2 $\mu\text{g/mL}$); 0,04:1 (4 $\mu\text{g/mL}$); 0,08:1 (8 $\mu\text{g/mL}$); 0,095:1 (9,5 $\mu\text{g/mL}$) y 0,1:1 (10 $\mu\text{g/mL}$). El procedimiento se realizó de acuerdo con Gutiérrez, et al. 2015, se extrajo sangre humana en tubos con citrato de sodio y luego se centrifugaron a 2000 x g durante 10 minutos para obtener el plasma. Después, se agregaron 200 μL de plasma anticoagulado con citrato de sodio y se llevó a incubar por 5 minutos a 37°C para simular la temperatura corporal. Luego, se agregaron 100 μL de la solución de veneno a las diferentes concentraciones (los ensayos se realizaron por triplicado y se

usó como control negativo PBS concentración 1X). Finalmente se determinó el tiempo de coagulación con ayuda de un cronómetro [29].

En el segundo ensayo de actividad coagulante se analizó el efecto del extracto de Piwi tanto acuoso como etanólico para inhibir la acción coagulante del pool del veneno. Se tomó como control la DCM del pool obtenido del ensayo anterior. Se analizaron cuatro muestras de veneno:extracto en proporciones: 1:10 (9,5 µg/mL de veneno:95 µg/mL de extracto), 1:20 (9,5 µg/mL de veneno:190 µg/mL de extracto), 1:40 (9,5 µg/mL de veneno:380 µg/mL de extracto), y 1:80 (9,5 µg/mL de veneno:760 µg/mL de extracto). Los valores de inhibición de coagulación fueron obtenidos siguiendo el protocolo de acuerdo con Gutiérrez, et al, 2015, descrito anteriormente. Para cada muestra se realizaron ensayos por triplicado.

2.5 Análisis Fitoquímico de *P. discolor*.

2.5.1 Determinación Cualitativa de Flavonoides y Alcaloides.

2.5.1.1 Determinación Cualitativa de Flavonoides

Se realizaron tres ensayos para evaluar la presencia de flavonoides en el extracto acuoso de la corteza de Piwi. En los tres ensayos se usaron 2,5 mg de quercetina como control positivo; 10,1 mg de extracto acuoso de planta como muestra a analizar y 5 gotas de agua destilada como control negativo.

Ensayo con NaOH/HCl: A las tres muestras: control positivo, negativo y extracto, se les colocó 2 mL de NaOH al 4%, se homogeneizaron las mezclas mediante vórtex de 3000 rpm durante 1 minuto. Seguidamente, se colocaron 10 gotas de HCl (0,1M) y se observó el cambio de coloración. El ensayo se consideró positivo si la muestra se volvió incolora [34].

Ensayo con FeCl₃: A las muestras de control positivo, negativo y extracto se les colocó 2 mL de agua destilada. Se homogenizaron las mezclas mediante vórtex de 3000 rpm durante 1 minuto. Los tubos fueron colocados en ultrasonido a 38 °C por 5 minutos. Luego, se colocó a los tubos 5 gotas de solución FeCl₃ al 1% y se observó el cambio de coloración. El ensayo fue considerado positivo si las muestras tomaron intensos colores verde, violeta, azul o negro [35].

Ensayo de Shinoda: A los tubos de control positivo, negativo y extracto se les colocó 1 mL de HCl concentrado. Se homogenizaron las mezclas mediante vórtex de 3000 rpm durante 1 minuto. Seguidamente, a los tubos se les colocaron 10 mg de Magnesio metálico. Se homogenizó la mezcla con un vórtex durante 30 segundos y se dejó reposar por 5 minutos. Posteriormente, se colocó 1 mL de alcohol amílico, se realizó un vórtex de 30 segundos y los tubos fueron centrifugados a 2000 rpm por 2 minutos para acelerar la separación de las fases. El ensayo fue considerado positivo si el sobrenadante en las muestras presentó coloraciones: amarillo, naranja o rojizo [36].

2.5.1.2 Determinación Cualitativa de Alcaloides

La evaluación de alcaloides en el extracto de Piwi inició preparando el reactivo Wagner. Este reactivo se preparó en 25 mL de agua destilada, se usaron 317,5 mg de yodo y 503,6 mg de yoduro de potasio [37]. A la vez se preparó 25 mL de una solución de HCl al 10 %. Se dispensó 6,76 mL de HCl concentrado (37%) en un balón aforado de 25 mL y se aforó el material con agua destilada.

Posteriormente, se pesó 10 mg del extracto para ensayo Dragendorff y Wagner. Adicional, para cada ensayo se usaron 5 mg de atropina como control positivo y 5 gotas de agua como control negativo. A todos los tubos se añadieron 2 mL de HCl al 10 % y se homogenizó mediante vórtex 2000 rpm durante 30 segundos. Se colocaron los tubos al baño María (51.3°C) por 10 minutos. Luego, se centrifugaron los tubos de ensayos a 2000 rpm por 5 minutos y con una pipeta se retiró el sobrenadante de cada tubo. Se ajustó a pH de las muestras a 6 con amoníaco al 10%. Finalmente, a cada muestra se les añadieron 5 gotas de reactivo Dragendorff (Marca: SIGMA-ALDRICH; Lote #BCBM2462V) y Wagner (previamente preparado) respectivamente a cada tubo y se observó la coloración. El ensayo fue considerado positivo si se presentó un precipitado color marrón rojizo [34].

2.5.2 Determinación Cuantitativa de Flavonoides y Polifenoles.

2.5.2.1 Determinación Cuantitativa de Flavonoides.

La determinación cuantitativa de flavonoides totales en extractos de Piwi se realizó con una solución de tricloruro de aluminio 2% y una solución madre de quercetina de

0,5 mg/mL. Primero, se hizo una curva de calibración de quercetina a partir de la solución madre de 0,5 mg/mL, para lo cual se prepararon soluciones seriadas de quercetina de 5, 10, 20, 30, 40,50 µg/mL. Finalmente, la cuantificación de flavonoides totales se obtuvo añadiendo 1 mL de la solución de extracto acuoso de *P. discolor* 4,47 mg/mL en tubos de ensayo de 5 mL y se mezcló con 1 mL de la solución de tricloruro de aluminio (2%). Todo este proceso se realizó por triplicado para cada concentración de solución de quercetina. Luego, se realizó un vórtex de 3000 rpm por 5 segundos y se dejó en reposo y oscuridad durante 10 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se leyó la absorbancia a 438 nm en un espectrofotómetro (Marca: SHIMADZU; Modelo: UV-1280) [38].

2.5.2.2 Determinación Cuantitativa de Polifenoles.

Para la determinación cuantitativa de polifenoles totales en extractos de Piwi, se usó una solución madre de ácido gálico de 5 mg/mL. Antes de la determinación, se realizó una curva de calibración de ácido gálico con soluciones de 25, 50, 100, 200 y 400 µg/mL a partir de la solución madre, las cuales se aforaron con agua destilada hasta alcanzar un volumen total de 1 mL en cada tubo Eppendorf. Finalmente, para la cuantificación de fenoles totales se añadieron 100 µL de solución del extracto acuoso de *P. discolor* a concentraciones 4,44; 3,81 y 3,47 mg/mL en tubos de ensayo de 5 mL y se mezclaron con 40 µL de reactivo Folin-Ciocalteu's, seguido de 860 µL de agua destilada. Se realizó un vórtex a velocidad máxima por 15 segundos y se dejó reposar durante 5 minutos. Después, se agregaron 100 µL de la solución carbonato de sodio (7%) y 900 µL de agua destilada. Se realizó un vórtex a velocidad máxima por 30 segundos y se dejó reposar en oscuridad durante 60 minutos. Este proceso se realizó por triplicado para cada concentración de solución de ácido gálico. Finalmente, se leyó la absorbancia a 750 nm en un espectrofotómetro (Marca: SHIMADZU; Modelo: UV-1280) [38].

2.5.3 Determinación de la Metabolómica de *P. discolor*.

2.5.3.1 Espectrometría de Masas.

Los análisis de espectrometría de masas fueron realizados por medio de cromatografía líquida de ultra rendimiento (UPLC) acoplado a un MS/MS cuadrupolo con tiempo de vuelo Q-TOF, equipado con una fuente de electropulverización. La condición óptima para la separación de polifenoles se estableció utilizando una columna ACQUITY UPLC

BEH C18 (50 mm × 2,1 mm, 1,7 µm). Se usó una fase móvil A: 0,1% v/v Ácido Fórmico (AF) en H₂O y como fase móvil B: Acetonitrilo (ACN) 99,9% más AF 0,1%. El gradiente de elución utilizado fue: fase móvil A (FMA) al 99 % a los 0 min, se redujo al 80 % de FMA en 10 min, se disminuyó al 75% en 20 min, y al 65 % a los 25 minutos, finalmente la FMA se mantuvo al 50% a partir de los 35 min. El flujo de elución fue de 0,25 mL/min, el volumen de inyección fue 10 µL y la columna se mantuvo a temperatura ambiente [39].

Por otro lado, la ionización por electropulverización (ESI) en modo negativo empleó como gases nitrógeno y argón. En esta fuente de electropulverización, el flujo de gas fue de 5 mL/min y eluyó bajo los siguientes parámetros: capilaridad 0,50; temperatura de gas 350°C, presión del nebulizador 45 psi, temperatura de gas envolvente 350°C y un flujo de gas de desolvatación de 890 a 900 L/h.

Finalmente, el método de adquisición se llevó a cabo por el método DIA (Adquisición independiente de datos) en 35 minutos con una polaridad negativa y el análisis en modo sensible. Además, los rangos de masas de adquisición fueron de 100 Da a 1200 Da, con un tiempo de escaneo de 1,5 segundos y la altura mínima de detección de los picos fue de 3000 amplitud y 0,1 Da [40]. La fragmentación de compuestos se siguió con el modo de adquisición de datos MS^E, se realiza por MS/MS usando una disociación inducida por colisión (CID), la energía mínima de colisión fue de 6 eV para MS1 con una rampa de 20 a 30 eV para MS2.

2.5.3.2 *Análisis del Metaboloma con MS-DIAL.*

La correlación e identificación de metabolitos se realizó usando el programa MS-DIAL, un compilado de varias bases de datos incluidas massbank, respect y riken. Se realizó el curado de datos mediante la identificación de los metabolitos con un puntaje de relación igual o superior al 80% en MS1 y entre los fragmentos del metabolito (MS2) y los fragmentos de coincidencia con la biblioteca. Además, se excluyeron aquellos que presentaban mucho ruido en el cromatograma de los fragmentos. Se verificó que cada metabolito sea el mismo en todas las energías de colisión y se tuvo en cuenta las moléculas identificadas con aductos mediante el uso de bases de datos como PubChem. Finalmente, los metabolitos del extracto de *P. discolor* obtenidos del curado de datos fueron analizados bibliográficamente para conocer sus propiedades fitoquímicas y su posible acción antiofidica.

2.6 Análisis Estadístico

Para el tratamiento de los resultados obtenidos en los ensayos enzimáticos y coagulación se empleó Minitab Statistical Software, donde se realizó el análisis de varianza (ANOVA) One Way y la prueba Tukey, en los cuales el intervalo de confianza fue de 0,95 y el nivel de significancia fue de $p \leq 0,05$.

CAPÍTULO III. RESULTADOS

3.1 Obtención de Extractos Vegetales

Se recolectaron 210 g de corteza del tallo del árbol de *Piptocoma discolor*, de los cuales se obtuvieron 139,3 g después de ser secado y triturado.

3.2 Perfil Bioquímico del Pool de Venenos de *B. atrox* y del Extracto de la Corteza de *P. discolor*.

Los picos más evidentes en el perfil bioquímico del veneno de *B. atrox* son los picos 1, 2, 6, 14, 15, 21, 22, 27, 28, 31 y 32 obtenidos en un tiempo de retención alrededor de los minutos 18, 19, 37, 56, 58, 68, 69, 80, 81, 83 y 84 respectivamente (**Figura 3A**). Estos picos sugieren el predominio de fosfolipasas A_2 , serinproteasas y metaloproteasas tipo III y tipo I características del veneno bothrópico (**Figura 3A**). Por otro lado, el extracto de la corteza de Piwi presenta un pico evidente, el pico número 1 con tiempo de retención de 4.67 minutos. Además, se observó un conjunto de picos no definidos y bastantes agrupados a partir del minuto 17 hasta el minuto 24 (**Figura 3B**). A pesar de la baja calidad de separación de compuestos en el cromatograma de *P. discolor*, este no se mejoró debido a que el objetivo era observar el perfil del extracto bajo las mismas condiciones del veneno. Lo cual fue necesario para evidenciar la presencia del extracto en el cromatograma de la interacción extracto/veneno y evaluar como varían los picos pertenecientes al perfil del veneno.

Las **Figuras 3C** y **3D** muestran la disminución del tamaño de los picos comparado con el fraccionamiento del veneno de *B. atrox* y la incidencia de picos en los primeros minutos, correspondientes a los componentes del extracto de *P. discolor*. De la misma manera se observa que la interacción del extracto con el veneno cambia el perfil de elución del veneno. El patrón de separación cromatográfica es incluso más evidente en el tratamiento veneno/extracto preincubado por 30 minutos a 37°C (**Figura 3D**). Se destaca la disminución del tamaño de picos 6, 14, 15, 21, 22 y 23 del perfil cromatográfico del veneno (**Figura 3A**), que de acuerdo con el tiempo de retención corresponden a los picos 25, 33, 35, 37, 38 y 39 del perfil cromatográfico del tratamiento veneno/extracto (**Figura 3D**). La diferencia entre el tamaño de los picos del cromatograma en cuanto a su altura y área es evidenciada en la **Figura 3** y la **Tablas**

2, 3, 4 y 5 de Anexos. Además, los picos 21, 23 y 24 (**Figura 3D**) representan la aparición de nuevos picos de menor tamaño que no estaban presentes en el veneno puro.

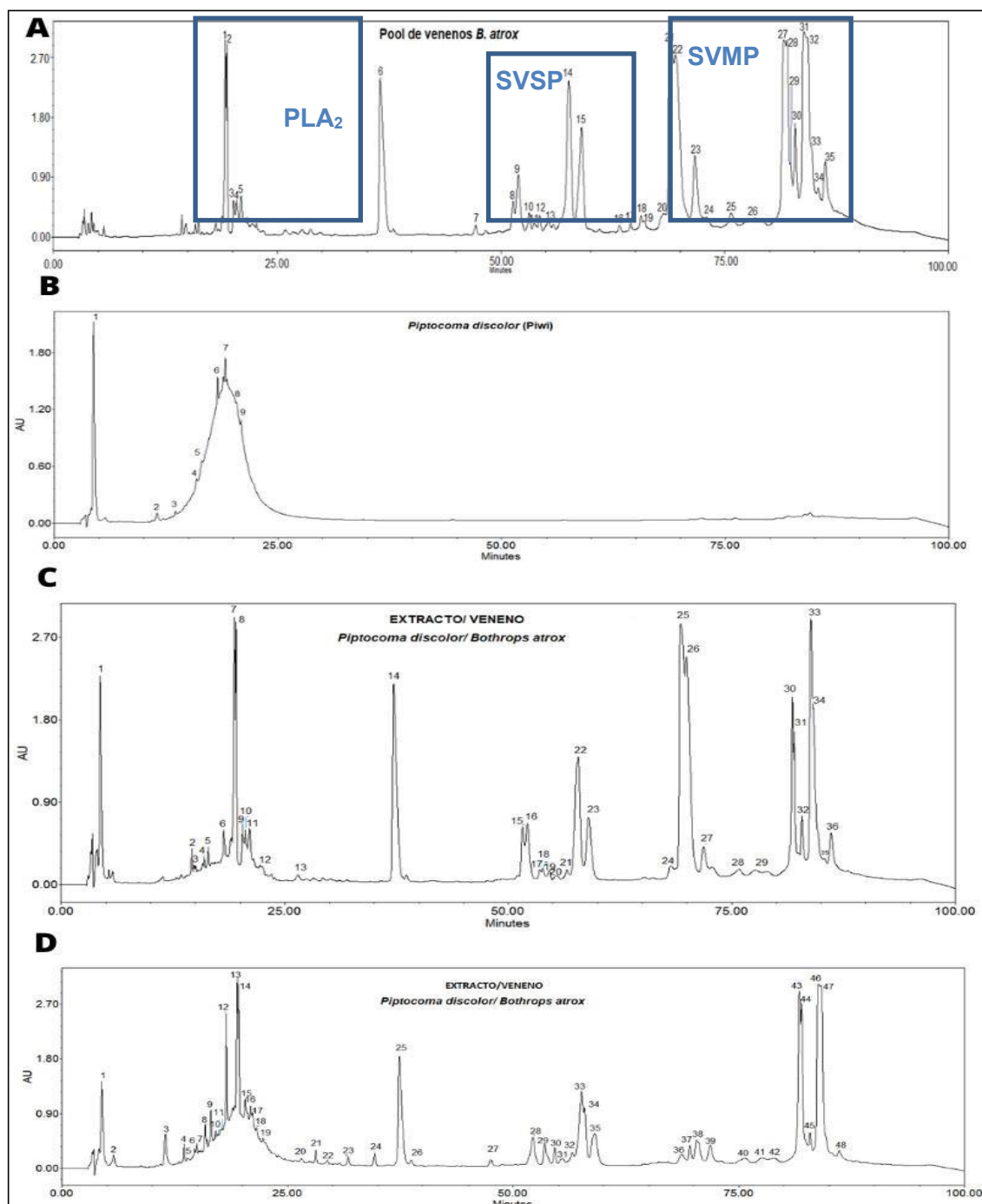


Figura No. 3 Perfiles cromatográficos de las muestras por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC).
Realizado por: Ashly Micolta, 2022.

En la **Figura 3** se muestran: **A)** Pool de venenos de *B. atrox*. **B)** Extracto acuoso de *P. discolor*. **C)** Interacción extracto acuoso/veneno sin incubación previa. **D)** Interacción

extracto acuoso/veneno incubado por 30 minutos a 37°C. Las siglas PLA2: fosfolipasas A₂, SVSP: serinproteasas y SVMP: metaloproteasas.

3.3 SDS- PAGE de la Interacción Veneno/Extracto.

La **Figura 4** de SDS-PAGE mostró los componentes del veneno crudo de *B. atrox*. De acuerdo con los valores del peso molecular, se observan metaloproteinasas, serinproteasas, I aminoxidasas y fosfolipasas A₂, las cuales son relacionadas a las actividades enzimáticas de este veneno. Además, se observa que el extracto acuoso de *Piptocoma discolor* contiene proteínas de un peso molecular de 26 kDa la cual se conserva a lo largo de todos los tratamientos. El tratamiento con extracto a proporción 1:80 es el que demuestra mayor cantidad de esta de acuerdo con la intensidad de la banda (**Tabla n°1 de Anexos**).

Por otro lado, se observa la disminución de la intensidad de la banda correspondiente a las serinproteasas con un peso molecular entre 40 y 50 kDa (banda 3, rectángulo de líneas punteadas de color verde). Cabe destacar que la intensidad de las bandas 1, 2, 3, 4, 5, 6 del veneno disminuyen al interactuar con el extracto en una proporción 1:10. Sin embargo, la intensidad aumenta conforme aumenta la proporción de extracto usado (**Tabla n°1 de Anexos**).

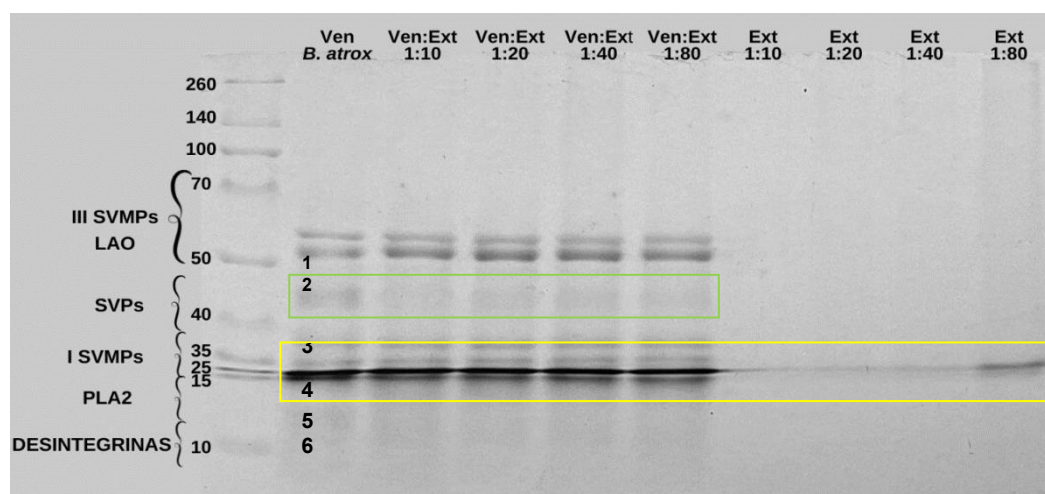


Figura No. 4 Gel de electroforesis en poliacrilamida (SDS PAGE). Perfil del veneno de *B. atrox*,interacción veneno/extracto acuoso de Piwi y del extracto acuoso solo.
Realizado por: Ashly Micolta, 2022.

En la **Figura 3**, las muestras fueron evaluadas a diferentes proporciones. Al lado izquierdo se observa el marcador molecular, y los rangos de las familias de proteínas asociadas al veneno.

3.4 Evaluación de la Actividad Enzimática por la Interacción Veneno/Extracto

3.4.1 Evaluación de la Inhibición de la Actividad Enzimática por el Extracto Acuoso.

La actividad enzimática del veneno bothrópico de esta especie es disminuida por la acción de los metabolitos presentes en la corteza del árbol de Piwi (**Figura 5**). Las actividades fosfolipásica, caseinolítica y de las serinproteasas presentan una inhibición proporcional a la cantidad de extracto, en el caso de la actividad fosfolipásica es inhibida desde un 41,23% hasta un 70,63% (**Figura 5A**), la actividad serinproteasa de 26,99% a 50,13% (**Figura 5B**) y en la actividad caseinolítica su inhibición va desde 18,38% a un 45,44% (**Figura 5C**).

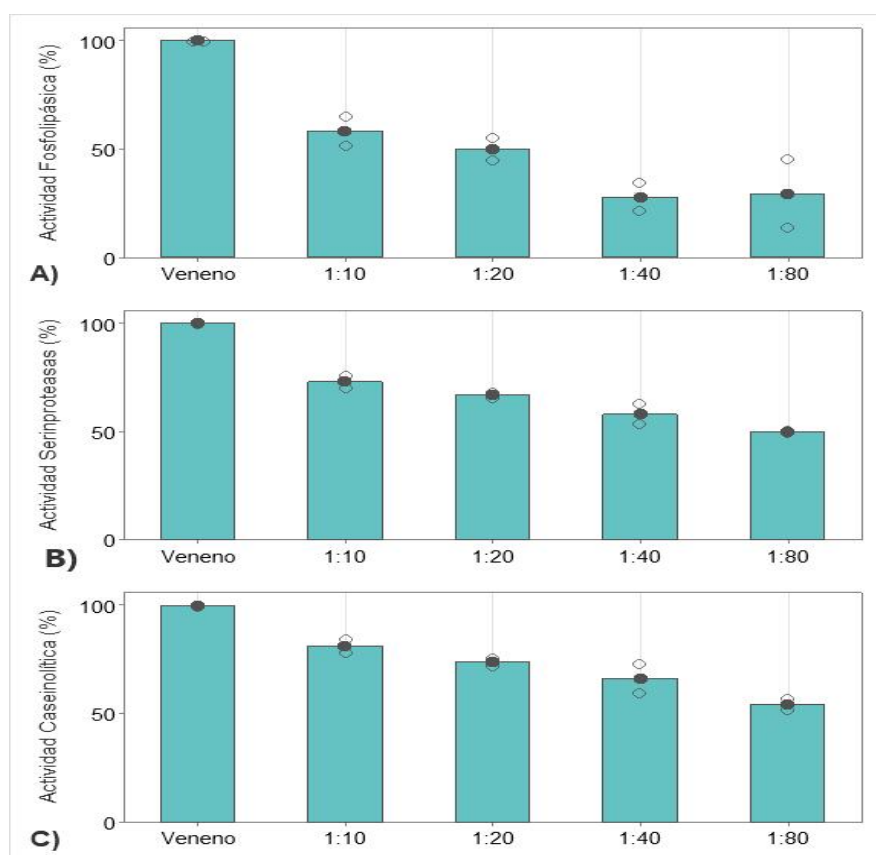


Figura No. 5 Inhibición de la actividad enzimática del veneno por la interacción con el extracto acuoso de *P. discolor*.

Realizado por: Ashly Micolta, 2022

En la **Figura 5** se muestran: **A)** Actividad fosfolipásica, **B)** Serinproteasa, **C)** Caseinolítica, representadas por la cantidad de actividad inhibida por la interacción veneno/extracto acuoso a diferentes proporciones del 100% de actividad que representa

el venenocrudo. *= Se determinaron diferencias estadísticas significativas comparada con el veneno con una $p \leq 0,05$ por la prueba de Tukey.

3.4.2 Evaluación de la Inhibición de la Actividad Enzimática por el Extracto Etanólico.

El extracto etanólico de la corteza del árbol de Piwi presentó inhibición de la actividad fosfolipásica y caseinolítica proporcional a la cantidad de extracto con valores desde 14,26% a 68,86% y 1,55% a un 90,93% respectivamente. En el caso de la actividad de las serinproteasas se observa que el extracto etanólico tiene una mayor inhibición para estas enzimas, para los cuatro tratamientos a diferentes concentraciones de extracto se obtuvo una inhibición de la actividad alrededor del 80% (**Figura 6B**).

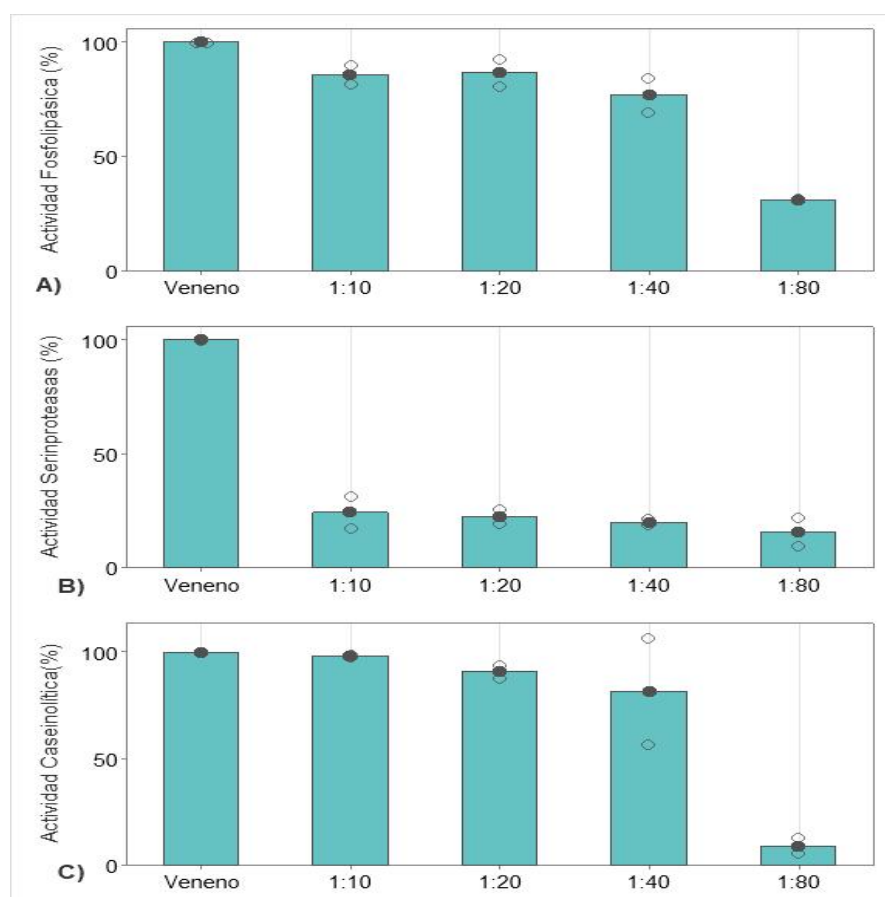


Figura No. 6 Inhibición de la actividad enzimática del veneno por la interacción con el extracto etanólico de *P. discolor*.
Realizado por: Ashly Micolta, 2022.

En la **Figura 6** se muestran: **A)** Actividad fosfolipásica, **B)** serinproteasa, **C)** caseinolítica, representadas por la cantidad de actividad inhibida por la interacción

veneno/extracto etanólico a diferentes proporciones del 100% de actividad que representa el veneno crudo. *= Se determinaron diferencias estadísticas significativas comparada con el veneno con una $p \leq 0,05$ por la prueba de Tukey.

3.5 Evaluación de la Actividad Coagulante

3.5.1 Actividad Coagulante del Veneno de *B. atrox*.

En la **Figura 7** se observa como el tiempo de la actividad coagulante disminuye proporcionalmente a la concentración de veneno, es decir a mayor concentración de veneno el tiempo de coagulación disminuye. La concentración mínima necesaria del pool de veneno de *B. atrox* para coagular el plasma en 60 segundos fue de 9,5 µg/mL.

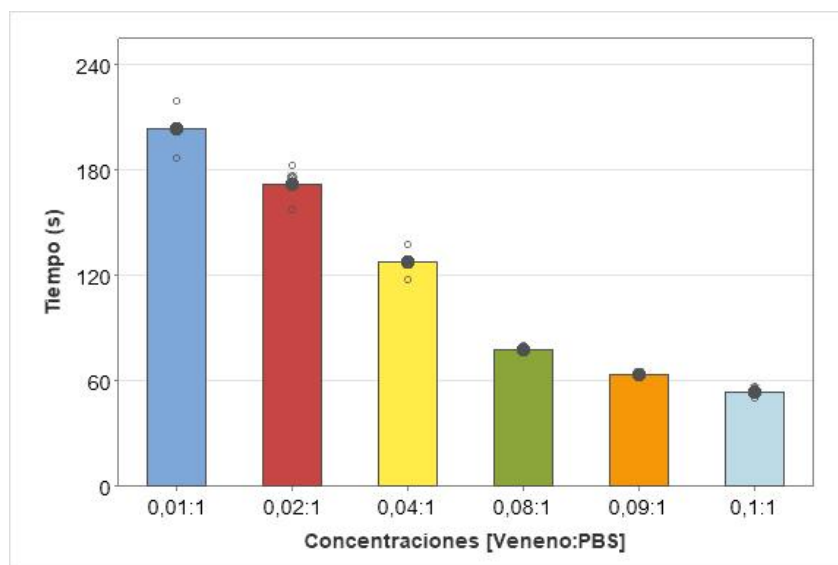


Figura No. 7 Actividad Coagulante del pool de venenos de *Bothrops atrox* a diferentes concentraciones.

Realizado por: Ashly Micolta, 2022.

En la **Figura 5** se muestran los resultados expresados por medio de ANOVA conjunto a la prueba Tukey y se determinó la Dosis Coagulante Mínima del veneno de *B. atrox* (barra naranja). *= Se determinaron diferencias estadísticas significativas entre las diferentes proporciones con una $p \leq 0,05$.

3.5.2 Inhibición de la Actividad Coagulante del Veneno de *B. atrox* por los Extractos de *P. discolor*.

De acuerdo con la **Tabla 1** la actividad coagulante del veneno a una concentración de

9,5 µg/mL fue de 65,67 s y 63,66 s. El extracto acuoso tuvo mayor eficiencia ralentizando el tiempo de coagulación del veneno hasta más de 250 s, en el caso del extracto etanólico el tiempo también se ralentizó, pero solo hasta 92 s. El extracto etanólico de *Piptocoma discolor* demostró menor efecto inhibitorio de la actividad coagulante que el extracto acuoso.

Tabla No. 1 Inhibición de la actividad coagulante en minutos del veneno de *B. atrox* 9.5×10^{-5} L/mL por el extracto acuoso y etanólico de *P. discolor* a diferentes proporciones veneno/extracto.

Muestras	Actividad Coagulante (s)	Muestras	Actividad Coagulante (s)
PBS	SA	PBS	SA
0.095:1 (veneno)	65,67 s $\pm$ 2,31	0.095:1 (Veneno)	63,66 s $\pm$ 2,5
1:10 (Ven:ExtAc)	110 s $\pm$ 3 *	1:10 (Ven:ExtEt)	71,67 s $\pm$ 4,73 *
1:20 (Ven:ExtAc)	144,33 s $\pm$ 4,04 **	1:20 (Ven:ExtEt)	85 s $\pm$ 4,58 *
1:40 (Ven:ExtAc)	168,33 s $\pm$ 7,64 **	1:40 (Ven:ExtEt)	84,33 s $\pm$ 4,04 *
1:80 (Ven:ExtAc)	250 s $\pm$ 10 **	1:80 (Ven:ExtEt)	92 s $\pm$ 1,73 *
1:10 ExtAc + PBS	SA	1:10 ExtEt + PBS	SA
1:20 ExtAc + PBS	SA	1:20 ExtEt + PBS	SA
1:40 ExtAc + PBS	SA	1:40 ExtEt + PBS	SA
1:80 ExtAc + PBS	SA	1:80 ExtEt + PBS	SA

Realizado por: Ashly Micolta, 2022.

En la **Tabla 1** se muestran los resultados son expresados como la media $\pm$ SD (n=3) y sin actividad como SA. *= Diferencias estadísticas significativas ($p \leq 0,05$) comparada con el veneno. **= Diferencias estadísticas altamente significativas ($p \leq 0,05$) comparada con el veneno.

3.6 Determinación Fitoquímica y Metabolómica.

3.6.1 Determinación Cualitativa de Flavonoides y Alcaloides.

La muestra del extracto de la corteza de *P. discolor* según los ensayos cualitativos tiene presencia de flavonoides catalogada de moderada a abundante (**Tabla No 2**). En el ensayo de NaOH/HCl una solución amarilla que se vuelve incolora al agregar ácido clorhídrico indica la presenciade flavonoides. El ensayo de cloruro férrico presentó

resultado positivo cuando las muestras toman intensos colores verde, violeta, azul o negro. Finalmente, el ensayo Shinoda se considera positivo cuando el alcohol amílico se colorea de amarillo, naranja, carmelita o rojo; intenso en todos los casos. La muestra fue negativa para alcaloides mediante ensayo Dragendorff y Wagner, ya que no hubo un cambio de coloración significativo al añadir los reactivos (**Tabla No 2**). En la **Tabla 2 +** significa presente y – significa ausente.

Tabla No. 2 Determinación fitoquímica del extracto acuoso de corteza de *P. discolor*.

Fitoquímico	Nombre del ensayo	+/-
Flavonoides	Ensayo de NaOH/HCl	+
	Ensayo de Cloruro Férrico	+
	Ensayo de Shinoda	+
Alcaloides	Ensayo de Dragendorf y Wagner	-

Realizado por: Ashly Micolta, 2022.

3.6.2 Determinación Cuantitativa de Flavonoides y Polifenoles.

De acuerdo con la **Tabla No 2**, la muestra de extracto acuoso de Piwi presentó flavonoides en su composición. Conociendo que muchos flavonoides son parte del grupo de polifenoles se propuso cuantificar la cantidad de polifenoles en la muestra de Piwi. En la **Tabla No 3**, se observa que en el extracto acuoso de la corteza de Piwi hay un porcentaje de 8,766% de polifenoles y 0,605% de flavonoides.

Tabla No 3 Cuantificación de Flavonoides y Polifenoles presentes en el extracto acuoso de la corteza de *Piptocoma discolor*.

Metabolitos de interés	[µg/mg Extracto]	% [mg/mg Extracto]
Flavonoides	6,048	0,605
Polifenoles	87,664	8,766

Realizado por: Ashly Micolta, 2022.

3.6.3 Espectrometría de Masas

Se lograron caracterizar 19 metabolitos presentes en el Piwi por medio de UPLC-MS/MS que fueron emparejadas con un puntaje total de similitud entre los fragmentos del metabolito (MS2) y los fragmentos de coincidencia con la biblioteca de mínimo 80%. Además, según información obtenida en bibliografía se corroboró que gran parte de estos metabolitos pertenecen al grupo de polifenoles, flavonoides y ácidos benzoicos. De acuerdo con la literatura, los metabolitos presentes en el extracto de la corteza de

Piptocoma discolor tienen propiedades farmacológicas siendo en gran parte antioxidantes y antiinflamatorios.

Tabla No. 4 Identificación de metabolitos presentes la corteza de *Piptocoma discolor* mediante el software MS-DIAL, su clasificación y propiedades farmacológicas.

Id	% de Similitud	Metabolito	Grupo	Propiedades	Cita
1	81,77	1,2-bencenediol	Polifenol estilbeno	Genotoxina, aleloquími-co, antioxidante, antiinflamatorio, cardiopro-ector, antimutagénico, anticancerígeno.	[41]
3	83,10	Ácido orto-aminobenzoico	Ácido benzoico	Propiedades multidi-reccionales que pueden afectar el sistema hemostático	[43]
4	90,24	Ácido P hidroxibenzoico	Ácido benzoico	Antioxidante y antiinflamatorio	[44]
5	93,22	4-hidroxi-3-metoximandelato	Polifenoles	Metabolito terminal de las catecolaminas; epinefrina; y norepinefrina.	[48]
6	81,06	Carnosina	Dipéptido	Antioxidante, quelante de metales tóxicos y antiglicación,	[49]
7	91,19	Dihidrojasmonato de metilo	Aromático	Fragancias	[50]
8	82,00	Manosa 6-fosfato	Intermediario metabólico	Señal de orientación clave para las proteínas precursoras de la hidrolasa destinadas al transporte a los lisosomas	(2)
9	98,13	L-sacaropina	Intermediario metabólico	Intermediario de degradación de la lisina en plantas.	(3)
10	86,88	Luteolina	Flavonoides	Antioxidante, eliminador de radicales libres y antiinflamatorio, modu-lador del sistema inmunológico.	[52]
11	81,45	Zearalenona	Macrólido	Micotoxina, fitoes-trógeno, promotor del cáncer de mama	[53]
12	99,86	5-aminoimidazol-4-carboxamida-1-ribofuranosil 5'-monofosfato	Intermediario metabólico	Efectos antiproliferativos.	[54]
13	97,07	Maltitol	Alcohol	Edulcorante	[55]
14	80,76	Ácido clorogénico	Polifenoles	Antioxidantes y quimio-preventivas, activación del sistema inmunitario y potencia la activación y proliferación de linfocitos T cito-tóxicos, macrófagos y células asesinas naturales.	[56]
15	90,43	Malvidina-3-galactósido	Taninos/ Flavonoides	Antioxidante	[59]
16	84,94	Malvidin-3, 5-di-O-cloruro de glucósido	Taninos/ Flavonoides	Protegen contra ciertos tipos de cáncer y otras enfermedades relacio-nadas	[61]

				con la edad.	
17	97,92	Procianidina C1	Polifenoles	Metabolito, antiinflamatorio, agente antioxidante, inhibidor de la lipoxigenasa.	[62]
18	98,06	Cianidina-3-O-(6"-O-(E-p-coum)-2"-O-(beta-xilopiranosil)-beta-glucopiranosido)5-O-beta-glucopiranosido	Antiocianidina/ Flavonoides	Pigmentos, antioxidantes.	[63]
19	90,80	Petunidina-3-O-(6"-O-(4"-O-E-coum)alfarnopiranosibet aglucopiranosil-5-O-beta-sal de trifluoroacetato de glucopiranosido	Antiocianidina/ Flavonoides	Pigmentos, antioxidantes.	[64]

Realizado por: Ashly Micolta, 2022.

3.6.4 Identificación de Metabolitos con Posible Acción Antiveneno

Del cribado fitoquímico de los 19 metabolitos encontrados en el extracto de Piwi con ayuda de la espectrometría de masas (**Tabla 4**), se pudieron reconocer 10 con posible potencial antiofídico de acuerdo con las propiedades de cada uno de ellos según literatura previa (**Tabla 5**). Entre el potencial primordial de estos metabolitos se destacan la inhibición de actividad enzimática de las metaloproteasas (SVMPS), serinproteasas (SVSP) y fosfolipasas (PLA2), además de su actividad antioxidante, antiinflamatoria, cardioprotector y activación del sistema inmunitario. Cabe destacar que, metabolitos con importante acción antiofídica como el ácido gentísico, ácido homogenetísico, kaempferol-3-O-alfa-L-ramnósido y procianidina B2, también fueron encontrados en la espectrometría de masas, sin embargo, no se tomaron en cuenta en las tablas debido a que su porcentaje de similitud con la base de datos fue de menos del 80%. Lo cual hace dudoso el hecho de que estos formen parte de esta planta.

Tabla No. 5 Metabolitos presentes en el extracto de *Piptocoma discolor* con posible propiedad antiofídica.

% de Similitud	Metabolito	Grupo	Propiedades	Cita
81,77	1,2-bencenediol	Polifenol estilbeno	Genotoxina, aleloquímico, antioxidante, antiinflamatorio, cardioprotector, antimutagénico y anticancerígeno.	[41, 65]
90,24	Ácido P hidroxibenzoico	Ácido benzoico	Antioxidante y antiinflamatorio	[44, 65]
93,22	4-hidroxi-3-metoximandelato	Polifenoles	Metabolito terminal de las catecolaminas; epinefrina; y norepinefrina.	[48, 65]

86,88	Luteolina	Flavonoides	Antioxidante, eliminador de radicales libres y antiinflamatorio, modulador del sistema inmunológico. Inhibidor de PLA ₂ Enzimática, letalidad y hemorragia	[52, 67, 68]
80,76	Ácido clorogénico	Polifenoles	Antioxidantes y quimiopreventivas, activación del sistema inmunitario y potencia la activación y proliferación de linfocitos t citotóxicos, macrófagos y células asesinas naturales. El ácido clorogénico también inhibe la actividad de las metaloproteinasas de la matriz. Inhibidor de SVMPS Inhibidor de PLA ₂ Letalidad y enzimática	[56, 66, 68, 69]
90,43	Malvidina-3-galactósido	Taninos/ flavonoides	Antioxidante Inhibidor de SVMPS, SVSP, PLA ₂ .	[59, 70]
84,94	Malvidin-3, 5-di-O-cloruro de glucósido	Taninos/ flavonoides	Protegen contra ciertos tipos de cáncer y otras enfermedades relacionadas con la edad. Inhibidor de SVMPS, SVSP, PLA ₂ .	[61, 70]
97,92	Procianidina C1	Polifenoles	Metabolito, agente antiinflamatorio, antioxidante, inhibidor de la lipoxigenasa.	[62, 71]
98,06	Cianidina-3-O-(6''-(E-p-coum)-2''-O-(beta-xilopiranosil)-beta-glucopiranosido-5-O-beta-glucopiranosido	Antocianinas/ flavonoides	Pigmentos, antioxidantes. Inhibidor de SVMPS, antihemorrágico.	[63, 72]
90,80	Petunidina-3-O-6''-O-(4''-O-E-coum)-alfa-mnopiranosil-beta-glucopiranosil)-5-O-beta-sal de trifluoroacetato de glucopiranosido	Antocianinas/ flavonoides	Pigmentos, antioxidantes. Inhibidor de SVMPS, antihemorrágico.	[64, 72]

Realizado por: Ashly Micolta, 2022.

CAPÍTULO IV. DISCUSIÓN

La presente investigación usó un pool de venenos de *B. atrox* de varias ciudades del Ecuador previamente caracterizados por nuestro grupo de investigación. Según Palma, et al. 2021, varios venenos de Mera, Tena y Yasuní presentaron diferencia en la actividad catalítica de toxinas y los perfiles bioquímicos, donde hubo venenos que necesitaron mayor dosis de antiveneno para neutralizar su acción que otros [9]. Por esta razón, los ensayos de esta investigación usaron un pool de estos venenos en el cual se tuvo variabilidad para conocer su comportamiento y actividad en general. El uso de un pool de venenos permite un análisis de amplio espectro del uso de la corteza de Piwi como antiofídica.

Inicialmente se buscó un perfil bioquímico del pool de venenos de *B. atrox* por medio de cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP HPLC), en la cual se observaron los picos de las proteínas en mayor cantidad del veneno. Además, una electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) con las bandas que identificaban a las proteínas por su peso molecular. El pool presentaba las proteínas características de los venenos de *B. atrox* identificadas por Palma, et al, 2021 [9]. Se observó la presencia de fosfolipasas A₂, desintegrinas y lectinas tipo C de tamaño molecular 13-16kDa, metaloproteasas (PI SVMP) correspondiente a 23-33 kDa, serinproteasas (SVSP) de tamaño 31-38 kDa y I aminoxidasas y metaloproteasas del tipo III de tamaño 46-58 kDa. De igual manera, en estudios de venenos de esta especie se evidencia que el componente mayoritario es la denominada “triada característica” que forma parte del 70% del veneno donde están las metaloproteasas, serinproteasas y fosfolipasas A₂. El otro 30% del veneno es conformado por L-aminoxidasas, desintegrinas, lectinas tipo c y otros compuestos [81].

El perfil proteómico obtenido en esta investigación evidenció la abundancia de metaloenzimas como PI SVMP y PIII SVMP en el veneno de esta especie demostrando bandas en la muestra de veneno y una gran cantidad de picos evidentes de las fracciones del veneno que aparecieron a partir del minuto 60. Lo cual es similar a estudios previos de venenos de *B. atrox* en los que se reconoce que su componente mayoritario son las PIII SVMP [9]. Por lo tanto, los venenos usados para este pool se consideran como una muestra representativa de la especie *B. atrox* en la región amazónica del Ecuador. Estudios previos sobre la actividad enzimática del veneno de

la especie *B. atrox* en Ecuador respaldan la presencia de actividad caseinolítica, proteolítica y fosfolipasa A₂ en estos [9,17]. Así también se destaca la presencia de L aminoxidasas que dan color característico amarillo a los venenos de las serpientes del género *Bothrops*, entre ellas la *B. pictus* [82]. Lo cual está corroborado en la presente investigación por las toxinas que han sido encontradas en el gel SDS PAGE y en el cromatograma. La presencia de estas enzimas en el veneno provoca efectos como edema, mionecrosis, dermonecrosis, inflamación y hemorragia [7].

Los extractos de *P. discolor* parecen inhibir la acción de las enzimas presentes en el veneno. El extracto etanólico fue capaz de inhibir hasta valores alrededor de 70%, 85% y 90% las actividades de las enzimas fosfolipasas A₂, serinproteasas y caseinolíticas respectivamente. De igual manera el extracto acuoso fue capaz de inhibir hasta un 70% la actividad de las fosfolipasas A₂ y alrededor de 50% en el caso de las actividades de serinproteasas y caseinolíticas. Lo cual es similar a lo encontrado en investigaciones donde se corrobora la inhibición de las actividades enzimáticas de los venenos de serpientes por otros extractos de plantas. Entre ellos se tienen: las raíces de *Mimosa pudica* que neutraliza las enzimas tóxicas, la letalidad y miotoxicidad del veneno de *Naja kaouthia* obteniendo mejores resultados con el extracto acuoso [83]. Lo cual difiere con los datos obtenidos con *P. discolor*, ya que en esta planta el extracto etanólico presentó mayor inhibición. Resultados similares se observan en el extracto metanólico de la *Leucas aspera* que posee actividad antiveneno contra las enzimas de *Naja naja* y respalda su uso tradicional contra las mordeduras de serpientes [84]. Otro ejemplo, es el extracto acuoso de *Mandevilla velutina*, capaz de inhibir totalmente la actividad de la fosfolipasa del veneno de *Crotalus durissus terrificus* y solo una inhibición parcial de *Bothrops* [85]. De igual manera, se puede observar que el extracto tanto etanólico como acuoso de *P. discolor* también presentaron una inhibición parcial (alrededor del 70%) de la actividad de las fosfolipasas de *B. atrox*.

En cuanto a *B. atrox*, existen estudios donde la actividad enzimática de esta especie también ha sido inhibida por otros extractos acuosos de plantas, tales como *Bellucia dichotoma*, *Conarus favosus*, *Plathymenia reticulata* que fueron capaces de inhibir completamente la actividad fosfolipasa A₂ [86]. También, los extractos de la corteza *Brownea rosademonte* y *Pleopeltis percuissa* lograron inhibir la actividad proteolítica de este veneno [87]. En Ecuador, los extractos etanólicos de plantas como *Urospatha sagittifolia*, encontrada en la amazonía, presenta reducción significativa de las actividades catalíticas de las fosfolipasas A₂, serinproteasas y metaloproteasas del

veneno de *B. atrox* con valores de inhibición de 81,3%, 19,8% y 48% [17]. El extracto etanólico de *P. discolor* fue capaz de inhibir valores hasta alrededor de 70%, 85% y 90% respectivamente para las actividades antes mencionadas. Estos valores indican que esta planta presenta una mejor actividad inhibitoria de las enzimas presentes en el veneno de esta especie de serpiente.

En lo que respecta a la actividad coagulante de los venenos de serpientes, los principales componentes que presentan esta actividad son: las serinproteasas (SVSPs) que convierten el fibrinógeno en fibrina y las que activan la protrombina, metaloproteasas (SVMPs) que activan la protrombina y son dependientes del Zinc y las que activan el factor X de la cascada de coagulación y las SVSPs que activan el factor V de la cascada de coagulación [29, 88]. El pool de venenos de la especie de *B. atrox* evaluado en esta investigación contiene gran cantidad de SVSPs y SVMPs en su perfil proteómico. De la misma manera, el accidente ofídico por el género *Bothrops* es conocido por su actividad coagulante. En la presente investigación el pool de venenos evaluado tuvo un valor de 9,5 µg/mL como la dosis mínima para que el veneno coagule en 60 segundos.

Los extractos acuoso y etanólico de *Piptocoma discolor* presentaron inhibición en cuanto a la actividad coagulante del veneno, retrasando el tiempo de coagulación hasta después de 250 s en el caso del extracto acuoso y 92 s en el caso del extracto etanólico. Efectos similares fueron encontrados en otras investigaciones sobre extractos de plantas alexitéricas. Por ejemplo, el extracto metanólico de *Serjania erecta* y sus fracciones lograron retrasar el tiempo de coagulación del plasma por el veneno de *Bothrops jararacussu* en una proporción 1:30. En este ensayo, las fracciones aisladas fueron más eficientes inhibiendo la coagulación del plasma hasta más de 50 minutos [89]. El extracto acuoso de las hojas de *Casearia sylvestris* también aumentó el tiempo de coagulación del plasma causado por venenos de *B. jararacussu*, *B. moojeni* y *B. neuwiedi* [90] y de varias fosfolipasas aisladas [91]. En el caso de Ecuador, existen análisis de actividad anticoagulante de los extractos de las hojas *Minthostachys cf. Mollis* (nombre común muña) y *Tabernaemontana sanano* (nombre común sikta o kunapi) [92]. Además, ensayos previos de los extractos de las cortezas de *Pollalesta discolor* (Piwi) y *Adenostemma lavenia* también demostraron la capacidad anticoagulante del plasma frente al veneno de *B. atrox* [93].

El análisis electroforético por SDS PAGE y la cromatografía obtenida por RP HPLC permitieron conocer cambios en la composición del veneno durante el tratamiento con el extracto acuoso de *P. discolor*. Las bandas de las proteínas presentes en el veneno demostraron degradación al ser tratadas con el extracto acuoso de *P. discolor*. La banda correspondiente a las SVSPs de peso molecular entre 40 y 50 kDa presenta mayor degradación e inhibición con la proporción 1:10 de veneno/extracto. Este fenómeno también se puede notar en la disminución del tamaño de los picos de la cromatografía del tratamiento veneno/extracto. Esto significa que el tamaño de las proteínas presentes en el veneno está disminuyendo gracias a la acción del extracto. Cabe destacar que estas proteínas son las principales influyentes en la actividad coagulante del veneno, por lo cual la intensidad de estas bandas es compatible con los datos de inhibición de la actividad coagulante por ambos extractos.

Además, en todas las muestras se presenta una banda de 25 kDa con mayor intensidad en la proporción 1:80 de extracto solo. Este fenómeno demuestra la presencia de proteínas en el extracto, que al presentarse en todos los ensayos con veneno probablemente significa que no interactúan con las proteínas del veneno de *B. atrox*. Algo similar ocurre en ensayos sobre *Urospatha sagittifolia* y su potencial inhibitorio frente al veneno de *B. atrox* [17].

Por otro lado, el estudio de los metabolitos secundarios de las plantas es de gran importancia para la antivenómica y tiene repercusión en la farmacología. Existe evidencia de que muchas de estas estructuras químicas de las plantas son capaces de interactuar con objetivos macromoleculares [96]. El tamizaje fitoquímico cualitativo del extracto de *P. discolor* revela que está compuesto de metabolitos secundarios de importancia para la actividad antiofídica tales como polifenoles y sobre todo flavonoides. Estudios previos presentan resultados similares, ya que determinan que esta especie posee una alta cantidad de polifenoles, flavonoides y catequinas [19]. Considerando también la baja cantidad de otros compuestos como ácidos grasos, triterpenos y carencia de resinas, saponinas, quinonas, alcaloides, compuestos lactónicos, entre otros [19]. Algo similar se observó en la presente investigación, ya que el extracto acuoso de *P. discolor* no presentó alcaloides como parte de sus componentes.

En plantas de la familia *Asteraceae* los compuestos fenólicos son los principales precursores de la acción antiofídica, responsables de la inhibición del veneno de serpientes [68]. Estas sustancias son capaces de unirse a proteínas por uniones de

puentes de hidrógeno covalentes ocupando sitios de unión críticos que favorece la inhibición de enzimas [5]. Metabolitos como el ácido clorogénico (presente en el extracto acuoso de *P. discolor*) y el ácido rosmánico demostraron potencial antiofídico frente a *B. leucurus* [94]. El primer inhibidor interactuó con el sitio de unión del Zn^{2+} de las SVMp y el segundo inhibidor mencionado tuvo el mismo mecanismo, pero con las PLA₂ [94]. Fenómeno similar al encontrado en la presente investigación, ya que el extracto de Piwi con presencia de ácido clorogénico en su metaboloma, inhibió la actividad enzimática de las serinproteasas un 85% en el caso del extracto etanólico y un 50% el extracto acuoso. Además, estos metabolitos al igual que el ácido homogentísico y ácido gentísico, han demostrado en estudios de otras plantas alexíteras ser inhibidores de la 5-lipoxigenasa (5 LOX) [66]. Debido a esto, pueden considerarse como fármacos potenciales para aliviar patologías como la inflamación [66]. Por ejemplo, el hongo *Pleurotus ostreatus*, contiene estos fenoles que se acoplan a esta enzima bloqueando su sitio activo e inhibiendo el proceso inflamatorio en el organismo [66]. Además, su potencial actividad inhibitoria de 5-lipoxigenasa (5-LOX) podría estar relacionada con la formación de puentes de hidrógeno [66]. Por otro lado, polifenoles como la procianidina B2 y procianidina C1 (encontrada en el extracto analizado de Piwi), han demostrado que su presencia en plantas como *Antidesma bunius* le otorga propiedades antioxidantes importantes con potencial en la farmacología [71].

Cabe destacar que, los ácidos gentísico, homogentísico y la procianidina B2 están presente en la espectrometría de masas de la planta de Piwi realizada en esta investigación. Sin embargo, su porcentaje de similitud de los fragmentos de iones con la base de datos fue menor a un 80% por lo cual la duda de la presencia en el extracto de *Piptocoma discolor* es bastante grande. Por lo tanto, es necesario realizar una investigación más a fondo sobre la presencia de estos metabolitos en la planta.

Otros compuestos fenólicos parte del grupo de ácidos hidroxibenzoicos y sus éteres metílicos son considerados compuestos muy activos, por ejemplo, el catecol que pueden formar quinonas que condensan con proteínas resultando una copolimerización entre estos [5]. Entre este grupo también se encuentra el ácido 2-hidroxi-4-metoxibenzoico, el cual en un estudio donde fue aislado de la planta medicinal de la india *Hemidesmus indicus* demostró su actividad antiveneno [65]. Este metabolito, es un adyuvante positivo de la terapia con anticuerpos polivalente comercial ya que demostró un aumento de la capacidad de neutralización de la letalidad y la hemorragia provocada por el veneno [65]. En el Piwi no se encontraron el catecol ni el ácido 2-hidroxi-4-metoxibenzoico en

su metaboloma. Sin embargo, se encontraron el 2- bencenodiol, ácido p-hidroxibenzoico y el 4-hidroxi-3-metoximandelato pertenecientes a este importante grupo de sustancias, esto hace alusión a una probable actividad antiveneno similar a los metabolitos anteriormente mencionados.

El grupo de los flavonoides también son parte de los compuestos fenólicos, y son precursores de la acción antiofídica al ingerirse. Los flavonoides metabolizan su acción por la microflora intestinal, mediante hidrólisis de los glicósidos y la ruptura del anillo produciendo ácidosfenólicos de esta manera son capaces de inhibir la inflamación ocasionada por los venenos [5]. Estudios en Brasil demuestran que especies con gran cantidad de flavonoides como *Morus nigra* L tienen efectos antiinflamatorios y analgésicos frente al envenenamiento por *Bothrops jararacussu* [95]. De manera similar la determinación fitoquímica del extracto de Piwi en la presente investigación presenta gran cantidad de flavonoides, lo que hace alusión a la propiedad del extracto de inhibir la actividad del veneno. Cabe mencionar que el mecanismo de acción de este grupo de metabolitos consiste en su habilidad para unirse a metales como el Zn^{2+} o el Ca^{2+} inhibiendo la actividad tóxica del veneno [73].

Los flavonoides como luteolina (presente en extracto de *P. discolor*), kaempferol-3-O-alfa-L-ramnósido, y otros flavonoides como rutina y quercetina son considerados fuertes inhibidores de la lipoxigenasa [67], además reducen el edema inducido por el veneno de *B. jararacussu* [95]. Estos compuestos imponen su efecto inhibitor del veneno por medio de interacciones hidrofóbicas de aminoácidos y de anillos de la estructura proteica de las enzimas como las PLA₂ [67], además, disminuyen la letalidad y la hemorragia ocasionada por el envenenamiento [68]. La actividad fosfolipásica inhibida por el extracto de Piwi fue de 90% en el extracto etanólico y un 70% en el extracto acuoso, probablemente por la acción de estos metabolitos luteolina y kaempferol-3-O-alfa-L-ramnósido encontrados en el extracto. Sin embargo, la presencia del kaempferol-3-O-alfa-L-ramnósido en la planta de Piwi es dudosa debido a que su porcentaje de similitud de los fragmentos de iones con la base de datos fue menor a un 80%.

El análisis fitoquímico del extracto de *P. discolor* también indicó la presencia de dos flavonoides del tipo antocianinas como cianidina-3-O-(6"-O-(E-p-coum)-2"-O-(beta-xilopiranosil)- beta-glucopiranosido)-5-O-beta-glucopiranosido y petunidina-3-O- Sal de trifluoroacetato de (6"-O-(4'''-O-E-coum)-alfa-ramnopiranosil-beta-glucopiranosil)-5-O-beta-glucopiranosido. Las antocianinas presentes en las plantas muestran posible

actividad antihemorrágica ya que interfieren con el zinc del sitio activo de las metaloproteinasas, además disminuyen la fragilidad capilar y tienen acciones antiinflamatorias [72].

Además, compuestos como malvidina-3-galactósido y malvidina-3, cloruro de 5-di-O-glucósido presentes en el extracto de Piwi son flavonoides parte del grupo de los taninos. Los taninos también presentan actividades biológicas como antioxidantes, antiinflamatoria, antialérgica, antihipertensiva y antimicrobiana y las plantas con estos compuestos son empleadas en la medicina tradicional como tratamiento para la diarrea, hipertensión, reumatismo, hemorragias, quemaduras y procesos inflamatorios [70]. Los ensayos de taninos aislados frente a venenos de *B. atrox* realizados *in vivo* e *in vitro* sugieren que inhiben la actividad fosfolipásica [70]. Algo similar ocurre con los ensayos enzimáticos de las fosfolipasas en el presente ensayo evaluados con el extracto de Piwi. Además, estudios revelan que los taninos actúan como agentes quelantes del calcio presentes en esta enzima e inhiben las propiedades coagulantes del veneno de esta especie al unirse a través de puentes de hidrógeno a las serinproteasas [70]. De igual manera, la actividad coagulante del veneno en esta investigación ha sido inhibida por el extracto acuoso de Piwi al retrasar la coagulación del plasma hasta 250 segundos, probablemente debido a la presencia en el extracto de metabolitos del grupo taninos.

Además de los polifenoles, el segundo grupo de metabolitos con mayor importancia en la actividad antiofídica luego de estos son los terpenos [68]. Por ejemplo, el diterpenoide derivado del neo-cleorodano es capaz de inhibir la actividad proteolítica y hemorrágica del veneno [20]. Sin embargo, no se realizó ensayos de terpenos para el extracto de Piwi. En orden de importancia, luego vienen los alcaloides, glicósidos modificados, saponinas, entre otros [68]. Los compuestos del grupo de los alcaloides, por ejemplo, el ácido aristolóquico tienen actividad antiinflamatoria. Además, inhiben la actividad lítica del veneno y reduce los edemas de las fosfolipasas A₂ [20]. A pesar de que la actividad fosfolipásica ha sido notablemente inhibida por el extracto *P. discolor*, no se encontraron alcaloides presentes en el extracto analizado.

Cabe destacar que, el emparejamiento de los metabolitos encontradas en el extracto de *P. discolor* con los metabolitos de la base de datos del programa MS-DIAL fue mínimo un 80% de similitud, sin embargo, el puntaje total de similitud varía de compuesto a compuesto dependiendo de la fragmentación de iones. Enfatizando esto, se tienen

como referencia a estos metabolitos para una revisión bibliográfica de estudios previos sobre sus propiedades. Se tomó en cuenta que pertenecen a grupos de sustancias con potencial antiveneno y su similitud, sin embargo, son necesarios estudios que profundicen el análisis metabolómico de estas plantas. El análisis de los metabolitos aislados permite validar el potencial inhibidor enzimático y toxicológico de esta especie frente a los envenenamientos por mordedura de serpientes como la especie *Bothrops atrox*.

Cabe destacar que es necesario validar la acción del Piwi por medio de ensayos *in vivo*, no solo como pre-incubación sino también como dosis desafío (teniendo en cuenta la dosis letal de veneno) y post tratamiento (inyectando primero veneno y luego el tratamiento). Estos ensayos permitirán conocer el potencial de la planta frente a otros daños ocasionados por el accidente ofídico como: actividad miotóxica, edema, hemorragia y letalidad.

CAPÍTULO V. CONCLUSIÓN

A través de este estudio se demostró que el extracto de *Piptocoma discolor* inhibe las toxinas del veneno de la serpiente *B. atrox*, una de las más incidentes en el país. Bioquímicamente, la planta de Piwi logró disminuir las bandas en la electroforesis en gel y los picos de la cromatografía de las serinproteasas, metaloproteasas tipo III y metaloproteasas tipo I, determinando así la interacción positiva entre la planta y el veneno *B. atrox*.

La propiedad neutralizante *in vitro* del extracto de *Piptocoma discolor* está modulado principalmente por metabolitos del grupo de los fenoles, primordialmente los flavonoides, taninos y antocianinas. Estas sustancias probablemente inhiben la actividad de las enzimas PLA₂, SVSPs, SVMPs y sus efectos hemorrágicos, inflamatorios y letales, por medio del bloqueo de los sitios activos de las toxinas al unirse a metales como el Zn²⁺ o el Ca²⁺.

Metabolitos como 1,2-bencenediol, ácido p-hidroxibenzoico, 4-hidroxi-3-metoximandelato, luteolina, ácido clorogénico, malvidina-3-galactósido, Malvidin-3, 5-di-o cloruro de glucósido, procianidina C1, encontrados en *P. discolor* y su interacción con el veneno de *B. atrox* permitió la inhibición de amplio espectro de la actividad de las enzimas fosfolipasas, metaloproteasas y serinproteasas presentes en el veneno. Las actividades catalíticas de estas enzimas fueron inhibidas hasta un 70% por el extracto acuoso del Piwi y hasta un 90% en el caso del extracto etanólico.

La acción neutralizante de esta planta fue evidente frente a la coagulación sanguínea provocada por el veneno de *B. atrox*. Se logró identificar las principales enzimas tóxicas inhibidas como metaloproteasas y serinproteasas, componentes del veneno de esta especie y causantes de la coagulación como efecto principal y característico no solo de la especie sino también de todo el género *Bothrops*.

CAPÍTULO VI. RECOMENDACIONES

Se considera importante en un futuro realizar ensayos de neutralización *in vivo* de las actividades tóxicas de los venenos. De esta manera verificar la eficacia del extracto de la corteza del árbol de *Piptocoma discolor* frente a los efectos de la mordedura de *B. atrox* como la letalidad, actividad miotóxica, hemorragia y edema que dan un mayor acercamiento a la realidad usando un modelo animal como objetivo. Además, realizar ensayos con dosis desafío y post tratamiento, que simulen a la situación real de un enfrentamiento a un envenenamiento por accidente ofídico.

Es necesario evaluar la capacidad de inhibición enzimática de *P. discolor* frente a venenos de diferentes especies y géneros de serpientes para conocer si la efectividad de este es de amplio espectro y pueden ser usados para especies diferentes a *Bothrops atrox* y los venenos bothróticos. Además, sería útil validar efectos de la planta como adyuvante, actuando en sinergia con el antiveneno comercial. Por otro lado, es de suma importancia seguir con el aislamiento de los metabolitos encontrados y evaluación de la acción de cada uno de ellos contra los efectos del accidente ofídico tanto a nivel enzimático como toxicológico.

.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Torres-Carvajal O, Pazmiño-Otamendi G, Ayala-Varela F, Salazar-Valenzuela D. Reptiles del Ecuador. [Internet]. Version 2022.1. 2022 [citado 2022 ago 10]. Available from: <<https://bioweb.bio/faunaweb/reptiliaweb>>
2. Creagh Bandera I, Pérez Ferreiro Y del C, Gámez Sánchez D, Dueñas Moreira O. Características clínico epidemiológicas de los accidentes ofídicos. Ecuador, 2014. IntraMed Journal [Internet]. 2014 [citado 2022 ago 13];1–7. Available from: https://www.researchgate.net/profile/Donelia-Gamez-Sanchez/publication/337636255_ACCIDENTE_OFIDICO_EN_EL_ECUADOR/links/5de186f3299bf10bc3314311/ACCIDENTE-OFIDICO-EN-EL-ECUADOR.pdf
3. Lovera A, Bonilla C, Hidalgo J. Efecto neutralizador del extracto acuoso de *Dracontium lorentense* (JERGÓN SACHA) sobre la actividad letal del veneno de *Bothrops atrox*. Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública. Rev Peru Med Exp Salud Publica. 2006;23(3):177–81.
4. Valarezo García C, Jaramillo Abril D, Djabayan Djibeyan P, Vásconez Andrade P, Falconi Ontaneda F. La amazonia ecuatoriana y sus saberes ancestrales; el uso del extracto de corteza del árbol de Piwi (*Pictocoma discolor*) un saber singular en el accidente ofídico. Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas [Internet]. 2016;47(4):26–34. Available from: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57956612002>
5. Torres A, Camargo F, Ricciardi B, Ricciardi G. Plantas como antiveneno: del mito al logos. Universitarias. Montevideo: Comisión Sectorial de Investigación Científica (csic) de la Universidad de la República.; 2015.
6. Strauch MA, Tomaz MA, Monteiro-Machado M, Ricardo HD, Cons BL, Fernandes FFA, et al. Antiphidic activity of the extract of the Amazon plant *Humirianthera ampla* and constituents. J Ethnopharmacol. 2013 ene 9;145(1):50–8.
7. Niño R. Análisis comparativo del contenido proteico de venenos de serpientes de la familia Viperidae de diferentes regiones de Colombia mediante el empleo de cromatografía líquida y electroforesis [Facultad de Medicina]. [Bogotá D.C., Colombia]: Universidad Nacional de Colombia; 2018.
8. Nogués MP, Rojo ; C, M^a S.; De L, Ruiz V, Encinas Cerezo MT. ESTUDIO DEL VENENO DE SERPIENTES: TIPOS Y TRATAMIENTOS SNAKES VENOMS: KINDS AND TREATMENTS. Revista Complutense de Ciencias Veterinarias. 2008;2(2).
9. Palma Patiño RS, Salazar-Valenzuela D, Medina-Villamizar E, Mendes B, Proaño-Bolaños C, da Silva SL, et al. *Bothrops atrox* from Ecuadorian Amazon: Initial analyses of venoms from individuals. Toxicon. 2021 abr 15;193:63–72.
10. Herrera C, Escalante T, Voisin MB, Rucavado A, Morazán D, Macêdo JKA, et al. Tissue Localization and Extracellular Matrix Degradation by PI, PII and PIII Snake Venom Metalloproteinases: Clues on the Mechanisms of Venom-Induced Hemorrhage. PLoS Negl Trop Dis. 2015 abr 24;9(4).
11. Vargas HL, Carrasco AM, Carrasco ÁM, Jiménez SI, Ortiz AD, Mora RM, et al. Epidemiological profile of patients with poisoning by snakes at the hospital José María Velasco Ibarra, Ecuador. Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica. 2021;40(3):314–6.
12. Terán M del C, Lomonte B. Actividad letal de seis venenos de serpientes de importancia médica en el Ecuador. Rev Ecuat Med Cienc Biol. 2016 nov 30;37(2).
13. Monteiro WM, Contreras-Bernal JC, Bisneto PF, Sachett J, Mendonça da Silva I, Lacerda M, et al. *Bothrops atrox*, the most important snake involved in human envenomings in the Amazon: How venomomics contributes to the knowledge of snake biology and clinical toxinology. Toxicon X. 2020 jun 1;6.
14. Ministerio de Salud Pública. SUBSECRETARÍA DE VIGILANCIA DE LA SALUD PÚBLICA DIRECCIÓN NACIONAL DE VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA SUBSISTEMA DE VIGILANCIA SIVE-ALERTA EFECTOS TÓXICOS AÑO 2021 [Internet]. 2022 [citado 2022 ago 13]. Available from: <https://www.salud.gob.ec/wp-content/uploads/2022/01/GACETA-GENERAL-EFECTOS-TOXICOS-POR-QUIMICOS-SE-52.pdf>
15. Ministerio de Salud Pública. MORDEDURA DE SERPIENTES T63.0 Ecuador, SE 28, 2022 [Internet]. Subsecretaría Nacional de Vigilancia de la Salud Pública. Dirección Nacional de Vigilancia Epidemiológica. 2022 [citado 2022 ago 13]. Available from: https://www.salud.gob.ec/wp-content/uploads/2022/07/EFTX-SE_28.pdf
16. Fan HW, Vigilato MAN, Pompei JCA, Gutiérrez JM. Situation of public laboratories manufacturing antivenoms in Latin America. Revista Panamericana de Salud Pública/Pan American Journal of Public Health. 2019;43.
17. Vera-Palacios AL, Sacoto-Torres JD, Hernández-Altamirano JA, Moreno A, Peñuela-Mora MC, Salazar-Valenzuela D, et al. A First Look at the Inhibitory Potential of *Urospatha sagittifolia* (Araceae) Ethanolic Extract for *Bothrops atrox* Snakebite Envenomation. Toxins (Basel) [Internet]. 2022 jul 17;14(7):496. Available from: <https://www.mdpi.com/2072-6651/14/7/496>
18. Alexander Jiménez Cabrera P, Hernández Juárez M, Espinosa Sánchez G, Mendoza Castelán G, Bell Torrijos Almazán M. Los saberes en medicina tradicional y su contribución al desarrollo rural: estudio de caso Región Totonaca, Veracruz* Knowledge in traditional medicine and its contribution

- rural development: case study Totonac region, Veracruz. Vol. 6, Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas. 2015.
19. Muñoz R. Inhibición de la actividad hemolítica del veneno de *Bothrops atrox* por los extractos de *Mintostachys* cf. *Mollis* (Kunt) Griseb y *Pollalesta discolor* (Kunt) Aristeg. [Quito]: UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA SEDE QUITO; 2017.
 20. Antonio López Sáez J, Soto JP. Plantas alexitéricas: antídotos vegetales contra las picaduras de serpientes venenosas. *MEDICINA NATURISTA*. 2009;3(1):17–24.
 21. Catálogo de la Biodiversidad. *Piptocoma discolor* [Internet]. SiB Colombia. Catálogo de la Biodiversidad. 2022 [citado 2022 ago 13]. Available from: <https://catalogo.biodiversidad.co/file/56e3e79c83c45700544e3e10/summary>
 22. Global Biodiversity Information Facility. *Piptocoma discolor* (Kunth) Pruski [Internet]. Global Biodiversity Information Facility. 2022 [citado 2022 ago 13]. Available from: <https://www.gbif.org/es/species/3122128>
 23. Reynel C, Pennington RT, Flores C, Daza A. Árboles útiles de la Amazonia peruana y sus usos; un manual con apuntes de identificación, ecología y propagación de las especies. . 2023;
 24. Cardona Naranjo F, Higueta H, Gómez Hoyos S, Roldán Palacio F. Flora de Embalses. Centrales Hidroeléctricas de ISAGEN en el Oriente Antioqueño San Carlos, Jaguas y Calderas. Antioquia; 2001.
 25. Tanguila. Estudio de la distribución geográfica y fenología de *Piptocoma discolor* Kunth. [Chimborazo]: Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.; 2020.
 26. González J, Papue E, González A, Borja V. Crecimiento y conservación de *Piptocoma discolor* (Pigüe) en la Provincia de Pastaza, Ecuador Growth and conservation of *Piptocoma discolor* (Pigüe) in the Province of Pastaza-Ecuador. *Revista Cubana de Ciencias Forestales* [Internet]. 2018 sep 14;6(3):366–79. Available from: <http://cfores.upr.edu.cu/index.php/cfores/article/view/380/366>
 27. Changoluiza L, Grefa I. Conocimientos culturales relacionados con las especies arbóreas de las comunidades de nuevo mundo y san virgilio de la provincia de Pastaza. [Puyo]: Universidad Estatal Amazónica; 2019.
 28. Aguinda J. Estudio etnobotánico de especies vegetales en las explotaciones agropecuarias del cantón Santa Clara. [Puyo]: Universidad Estatal Amazónica; 2015.
 29. José María Gutiérrez, Alexandra Rucavado, Gabriela Solano, Bruno Lomonte, María Herrera, Álvaro Segura, et al. MÉTODOS PARA EL ESTUDIO DE ACTIVIDADES TÓXICAS DE VENENOS DE SERPIENTES. En: Estrategias y Avances en el Estudio de Toxinas de Interés para la Biomedicina. 2015. p. 19–45.
 30. Ospina J, Ospina J, Bacca C. ANÁLISIS FITOQUÍMICO PRELIMINAR DE LAS HOJAS DE LA ESPECIE *Columnea picta* (CAPITANA), PLANTA UTILIZADA POR LA COMUNIDAD AWÁ CUAQUIER COMO ANTIOFÍDICA. *Revista Cubana de Química*. 2007;XIX(2):59–63.
 31. Granda N. Actividad alexitérica de los extractos de *costus pulverulentus* C. Presi *Desmodium adscendens* (Sw.) DC., *Begonia glabra* Aubl., sobre el veneno de *Bothrops asper* (Equis). Quito; 2015.
 32. Sarria Villa RA, Gallo Corredor JA, Benítez Benítez R. Extracción de compuestos fenólicos y contenido de catequina en cortezas de tres especies forestales del Cauca-Colombia. *Entre cienciae ingeniería*. 2021 jun 30;15(29):19–27.
 33. Ortiz C, Lazo F, Bellido C, Gonzales E, Yalerqué A. Variaciones en las actividades enzimáticas del veneno de la serpiente *Bothrops atrox* "jergón", de tres zonas geográficas del Perú. *Revista peruana de medicina experimental y salud pública* . 2012;29(2):198–205.
 34. Adedapo A, Adewuyi T, Sofidiya M. Phytochemistry, anti-inflammatory and analgesic activities of the aqueous leaf extract of *Lagenaria breviflora* (Cucurbitaceae) in laboratory animals. Vol. 61, *Rev.Biol. Trop. (Int. J. Trop. Biol. ISSN*. 2013.
 35. Akther T, Khan MS, Hemalatha S. Extraction of flavonoids from various parts of *couroupita guianensis* and its efficacy against pathogenic bacteria. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. 2017 abr 1;10(4):354–8.
 36. Paján M, Villalón C, Escalona JC, Bordies A, Valdés R. Determinación de los posibles tipos de flavonoides presentes en el limo medicinal, materia prima. 2002;XIV:16.
 37. Villagomez Iñiguez AV. Efectos inhibitorios de los extractos de hojas de *Morus* sp. en la actividadde alfa-glucosidasa. 2007 [citado 2022 ago 13]; Available from: <http://repositorio.espe.edu.ec/jspui/handle/21000/2205>
 38. Wang W, Li J, Zhang H, Wang X, Fan J, Zhang X. Phenolic compounds and bioactivity evaluationof aqueous and methanol extracts of *Allium mongolicum* Regel. *Food Sci Nutr*. 2019 feb 1;7(2):779–87.
 39. Bajkacz S, Baranowska I, Buszewski B, Kowalski B, Ligor M. Determination of Flavonoids and Phenolic Acids in Plant Materials Using SLE-SPE-UHPLC-MS/MS Method. *Food Anal Methods*. 2018 dic 1;11(12):3563–75.
 40. Tada I, Chaleckis R, Tsugawa H, Meister I, Zhang P, Lazarinis N, et al. Correlation-Based Deconvolution (CorrDec) to Generate High-Quality MS2 Spectra from Data-Independent Acquisition in Multisample Studies. *Anal Chem* [Internet]. 2020 ago 18 [citado 2022 ago 28];92(16):11310–7.

- Available from: <https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/acs.analchem.0c01980>
41. catecol | C₆H₆O₂ - PubChem [Internet]. National Center for Biotechnology Information . [citado 2022 ago 13]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Catechol>
 42. Ácido succínico | C₄H₆O₄ - PubChem [Internet]. National Center for Biotechnology Information . [citado 2022 ago 13]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Succinic-acid>
 43. Human Metabolome Database: Showing metabocard for 2-Aminobenzoic acid (HMDB0001123) [Internet]. The Metabolomics Innovation Centre. [citado 2022 ago 13]. Available from: <https://hmdb.ca/metabolites/HMDB0001123#references>.
 44. Ácido 4-hidroxibenzoico | C₇H₆O₃ - PubChem [Internet]. National Center for Biotechnology Information. [citado 2022 ago 13]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4-Hydroxybenzoic-acid>
 45. cinamato | C₉H₇O₂ - PubChem [Internet]. National Center for Biotechnology Information . [citado 2022 ago 13]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Cinnamate>
 46. Ácido 2,5-dihidroxibenzoico | C₇H₆O₄ - PubChem [Internet]. National Center for Biotechnology Information . [citado 2022 ago 13]. Available from: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2_5-Dihydroxybenzoic-acid
 47. Homogentisic acid | C₈H₈O₄ - PubChem [Internet]. National Center for Biotechnology Information. [citado 2022 ago 13]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Homogentisic-acid>
 48. Ácido vanililmandélico | C₉H₁₀O₅ - PubChem [Internet]. National Center for Biotechnology Information . [citado 2022 ago 13]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Vanillylmandelic-acid>
 49. Carnosine | C₉H₁₄N₄O₃ - PubChem [Internet]. National Center for Biotechnology Information. [citado 2022 ago 13]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Carnosine>
 50. dihidrojasmonato de metilo, 24851-98-7 [Internet]. TGSC Information System. . [citado 2022 ago 13]. Available from: <http://www.thegoodscentscompany.com/data/rw1015272.html>
 51. Guanosina | C₁₀H₁₃N₅O₅ - PubChem [Internet]. National Center for Biotechnology Information . [citado 2022 ago 13]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Guanosine>
 52. Luteolina | C₁₅H₁₀O₆ - PubChem [Internet]. National Center for Biotechnology Information . [citado 2022 ago 13]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Luteolin>
 53. Zearalenone | C₁₈H₂₂O₅ - PubChem [Internet]. National Center for Biotechnology Information . [citado 2022 ago 13]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Zearalenone>
 54. Daignan-Fornier B, Pinson B. 5-Aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribofuranosyl 5'-monophosphate (AICAR), a highly conserved purine intermediate with multiple effects. Vol. 2, Metabolites. MDPI AG; 2012. p. 292–302.
 55. Maltitol | C₁₂H₂₄O₁₁ - PubChem [Internet]. National Center for Biotechnology Information . [citado 2022 ago 13]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/493591>
 56. Chlorogenic acid | C₁₆H₁₈O₉ - PubChem [Internet]. National Center for Biotechnology Information . [citado 2022 ago 13]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1794427>
 57. Afzelin | C₂₁H₂₀O₁₀ - PubChem [Internet]. National Center for Biotechnology Information . [citado 2022 ago 13]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5316673>
 58. Prunin | C₂₁H₂₂O₁₀ - PubChem [Internet]. National Center for Biotechnology Information . [citado 2022 ago 13]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Prunin>
 59. Mostrando el compuesto Malvidin 3-galactoside (FDB017212) - FooDB [Internet]. The Metabolomics Innovation Centre. [citado 2022 ago 13]. Available from: <https://foodb.ca/compounds/FDB017212>
 60. Procianidina B2 | C₃₀H₂₆O₁₂ - PubChem [Internet]. National Center for Biotechnology Information . [citado 2022 ago 13]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/122738>
 61. Malvidin-3,5-diglucoside | C₂₉H₃₅O₁₇ - PubChem [Internet]. National Center for Biotechnology Information . [citado 2022 ago 13]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/441765>
 62. Procyanidin C1 | C₄₅H₃₈O₁₈ - PubChem [Internet]. National Center for Biotechnology Information. [citado 2022 ago 13]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/169853>
 63. Cyanidin-3-O-(6''-O-(E-p-coum)-2''-O-(beta-xylopyranosyl)-beta-glucopyranoside)-5-O-beta-glucopyranoside | C₄₁H₄₅O₂₂ - PubChem [Internet]. National Center for Biotechnology Information . [citado 2022 ago 13]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6602295>
 64. Petunidin-3-O-(6''-O-(4'''-O-E-coum)-alpha-rhamnopyranosyl-beta-glucopyranosyl)-5-O-beta-glucopyranoside trifluoroacetate salt | C₄₃H₄₉O₂₃ - PubChem [Internet]. National Center for Biotechnology Information . [citado 2022 ago 13]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6540681>
 65. Alam MI, Gomes A. Adjuvant effects and antiserum action potentiation by a (herbal) compound 2-hydroxy-4-methoxy benzoic acid isolated from the root extract of the Indian medicinal plant 'sarsaparilla' (*Hemidesmus indicus* R. Br.). Toxicon. 1998 oct 1;36(10):1423–31.
 66. Delgado YB, Rojas Vargas J, Morales González I, Quevedo HM. Evaluación in silico del efecto de compuestos fenólicos de *Pleurotus ostreatus* sobre la enzima 5-lipoxigenasa (5-LOX). Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas [Internet]. 2021;40. Available from: <https://orcid.org/0000->

0002-7149-5069

67. Aliyu Kankara I, Abdullahi I, Aminu Paulina G. Ethnomedicinal plants: A source of phytochemical compounds against snake venom PLA₂ s activity. J Pharmacogn Phytochem [Internet]. 2020;9(2):1270–5. Available from: www.phytojournal.com
68. Adrião AAX, dos Santos AO, de Lima EJSP, Maciel JB, Paz WHP, da Silva FMA, et al. Plant-Derived Toxin Inhibitors as Potential Candidates to Complement Antivenom Treatment in Snakebite Envenomations. Front Immunol. 2022 may 9;13.
69. Silva DP da, Ferreira S de S, Torres-Rêgo M, Furtado AA, Yamashita F de O, Diniz EA da S, et al. Antiophidic potential of chlorogenic acid and rosmarinic acid against Bothrops leucurus snake venom. Biomedicine and Pharmacotherapy. 2022 abr 1;148.
70. SILVA WCRD. Potencial antiofídico de taninos isolados de *Plathymenia reticulata* Benth. sobre as principais atividades enzimáticas e biológicas induzidas pela peçonha de *Bothrops atrox*. [Santarém, Pará]: Universidade Federal do Oeste do Pará; 2014.
71. Shariful Islam M, Sharif Ahammed M, Islam Sukorno F, Ferdowsy Koly S, Morad Biswas M, Hossain S. A review on phytochemical and pharmacological potentials of *Antidesma bunius*. J Anal Pharm Res. 2018 oct 24;7(5).
72. Castro O, Gutiérrez JM, Barrios M, Castro I, Romero M, Umaña E. Neutralización del efecto hemorrágico inducido por veneno de *Bothrops asper* (Serpentes: Viperidae) por extractos de plantas tropicales. Rev Biol Trop [Internet]. 1999 [citado 2022 ago 13];47(3):605–16. Available from: http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-77441999000300036&lng=en&nrm=iso&tlng=es
73. de Souza JF, de Oliveira EC, da Silva ACR, da Silva VP, Coelho Kaplan MA, Figueiredo MR, et al. Potential use of extract of the plant *Schwartzia brasiliensis* (choisy) bedell ex gir.-Cañas against the toxic effects of the venom of *Bothrops jararaca* or *B. jararacussu*. Biomedicine and Pharmacotherapy. 2020 may 1;125.
74. Snakebite antivenom. Meyler's Side Effects of Drugs: The International Encyclopedia of Adverse Drug Reactions and Interactions. 2006 ene 1;3155–7.
75. Thwin MM, Samy RP, Satyanarayanajois SD, Gopalakrishnakone P. Venom neutralization by purified bioactive molecules: Synthetic peptide derivatives of the endogenous PLA₂ inhibitory protein PIP (a mini-review). Toxicon [Internet]. 2010 dic 15 [citado 2022 ago 13];56(7):1275–83. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20045432/>
76. Félix-Silva J, Silva-Junior AA, Zucolotto SM, Fernandes-Pedrosa MDF. Medicinal Plants for the Treatment of Local Tissue Damage Induced by Snake Venoms: An Overview from Traditional Useto Pharmacological Evidence. Vol. 2017, Evidence-based Complementary and Alternative Medicine. Hindawi Limited; 2017.
77. Enrique J, Carvajal H. Análisis fitoquímico y de actividad antimalárica de dos especies del género *Cecropia* [Facultad de Ciencias]. [Bogotá, Colombia]: Universidad Nacional de Colombia; 2012.
78. Gupta MP. THE FUTURE OF PRODUCTS OF THE ANDEAN HIGH PLATEAU AND CENTRAL VALLEYS. MEDICINAL PLANTS ORIGINATING IN THE ANDEAN HIGH PLATEAU AND CENTRAL VALLEYS REGION OF BOLIVIA, ECUADOR AND PERU. 2006.
79. Clavo M. Plantas Medicinales: Usadas por mujeres Nativas y Mestizas en la Región Ucayali. . Pucallpa: Ivita. 2003;1.
80. Smalligan R, Cole J, Brito N, Laing GD, Mertz BL, Manock S, et al. Crotaline snake bite in the Ecuadorian Amazon: Randomised double blind comparative trial of three South American polyspecific antivenoms. Br Med J. 2004 nov 13;329(7475):1129–33.
81. Öhler M, Georgieva D, Seifert J, von Bergen M, Arni RK, Genov N, et al. The venomics of bothrops alternatus is a pool of acidic proteins with predominant hemorrhagic and coagulopathic activities. J Proteome Res [Internet]. 2010 may 7 [citado 2022 ago 13];9(5):2422–37. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/pr901128x>
82. Lazo E. CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA, BIOLÓGICA Y MOLECULAR DE LA L-AMINOÁCIDO OXIDASA DEL VENENO DE LA SERPIENTE PERUANA *Bothrops pictus* “JERGÓN DE COSTA”. [Lima, Perú]: UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS ; 2014.
83. Mahanta M, Mukherjee AK. Neutralisation of lethality, myotoxicity and toxic enzymes of *Naja kaouthia* venom by *Mimosa pudica* root extracts. J Ethnopharmacol [Internet]. 2001 [citado 2022 ago 13];75(1):55–60. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11282444/>
84. Gopi K, Renu K, Jayaraman G. Inhibition of *Naja naja* venom enzymes by the methanolic extract of *Leucas aspera* and its chemical profile by GC-MS. Toxicol Rep. 2014 ene 1;1:667–73.
85. Biondo R, Pereira AMS, Marcussi S, Pereira PS, França SC, Soares AM. Inhibition of enzymatic and pharmacological activities of some snake venoms and toxins by *Mandevilla velutina* (Apocynaceae) aqueous extract. Biochimie. 2003;85(10):1017–25.
86. Valeacute ria M o de M, Luciana AF de S, Ricardo B de O, Ana MM da S, Hipoacute crates de MC, Milton N da S, et al. Inhibition of the principal enzymatic and biological effects of the crude venom of *Bothrops atrox* by plant extracts. Journal of Medicinal Plants Research. 2013 ago 17;7(31):2330–7.
87. Otero R, Núñez V, Barona J, Fonnegra R, Jiménez SL, Osorio RG, et al. Snakeites and ethnobotany in the northwest region of Colombia. Part III: neutralization of the haemorrhagic effect of *Bothrops atrox* venom. J Ethnopharmacol [Internet]. 2000 [citado 2022 ago 13];73(1–2):233–41. Available from:

- <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11025161/>
88. Markland FS. Snake venoms and the hemostatic system. *Toxicon* [Internet]. 1998 dic [citado 2022 ago 13];36(12):1749–800. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9839663/>
 89. Marcussi S, Pereira PS. Neutralization of pharmacological and toxic activities of *Bothrops jararacussu* snake venom and isolated myotoxins by *Serjania erecta* methanolic extract and its fractions *The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*. Rodríguez González II. 2011;17(1):85–93.
 90. Borges MH, Soares AM, Rodrigues VM, Oliveira F, Fransheschi AM, Rucavado A, et al. Neutralization of proteases from *Bothrops* snake venoms by the aqueous extract from *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae). *Toxicon*. 2001;39(12):1863–9.
 91. helena marcia, Borges MH, Soares AM, Rodrigues VM, Andrião-Escarso SH, Diniz H, et al. Effectsof aqueous extract of *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) on actions of snake and bee venoms and on act Related papers Effects of aqueous extract of *Casearia syl6estris* (Flacourtiaceae) on actions of snake and bee venoms and on activity of phospholipases A 2 [Internet]. Vol. 127, *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*. 2000. Available from: www.elsevier.com/locate/cbpb
 92. León K. ACTIVIDAD ALEXITERA DE *Tabernaemontana sananho* Ruiz & Pav. (Kunapi) y *Minthostachys cf. mollis* (kunth) Griseb (Kurarina) SOBRE EL VENENO DE *Bothrops atrox* ("Pitalala"). [Quito]: UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA SEDE QUITO; 2017.
 93. Almeida D. ACTIVIDAD ALEXÍTERA DE *Adenostemma lavenia* L. (KUNTZE) Y *Pollalesta discolor* (KUNT) ARISTEG. SOBRE EL VENENO DE *Bothrops atrox* (PITALALA). [Quito]: Universidad Politécnica Salesiana; 2018.
 94. Silva DP da, Ferreira S de S, Torres-Rêgo M, Furtado AA, Yamashita F de O, Diniz EA da S, et al. Antiophidic potential of chlorogenic acid and rosmarinic acid against *Bothrops leucurus* snake venom. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 2022 abr 1;148.
 95. Ribeiro AEAS, Soares JMD, Silva HAL, Wanderley CW de S, Moura CA, de Oliveira-Junior RG, et al. Inhibitory effects of *Morus nigra* L. (Moraceae) against local paw edema and mechanical hypernociception induced by *Bothrops jararacussu* snake venom in mice. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 2019 mar 1;111:1046–56.
 96. Mors WB, Célia Do Nascimento M, Ruppelt Pereira BM, Alvares Pereira N. Plant natural products active against snake bite - The molecular approach. *Phytochemistry*. 2000 nov 30;55(6):627–42.
 97. Romano PS. Posibles roles de los receptores a manosa-6-fosfato durante la organogénesis. [Mendoza]: Universidad Nacional de Cuyo; 2003.
 98. Revelles O. Caracterización de las rutas de catabolismo de l-lisina en *Pseudomonas putida* KT2440. Universidad de Granada; 2005.
 99. Organización Mundial de la Salud. Mordeduras de serpientes venenosas [Internet]. 2021 [cited 2022 Nov 9]. Available from: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/snakebite-envenoming>

ANEXOS

Tabla n°1. Valores de la intensidad de las bandas del gel de electroforesis en poliacrilamida (SDS PAGE) obtenidos por ImageJ. Perfil del pool de veneno de *B. atrox*, la interacción veneno/extracto acuoso de Piwi y del extracto acuoso solo a diferentes proporciones.

Muestras	Veneno	Veneno:Extracto acuoso				Extracto acuoso			
	Veneno <i>B. atrox</i>	1:10	1:20	1:40	1:80	1:10	1:20	1:40	1:80
1	21268.3 ₁	28056.56	26724.66	27509.31	28157.56	-	-	-	-
2	14212.8 ₅	22421.68	25030.61	25237.31	24862.80	-	-	-	-
3	20561.9 ₀	16101.31	17509.68	18459.95	19995.61	-	-	-	-
4	17574.1 ₄	23567.85	24855.31	28151.51	31049.63	-	-	-	-
5	17186.0 ₂	25324.94	25065.02	29256.92	31321.92	-	-	-	-
6	19444.8 ₆	27030.41	26585.05	26697.76	26564.83	304.43	2042.13	3679.03	12951.51
7	24617.2 ₇	22316.29	21345.46	24117.76	23631.00	-	-	-	-

Realizado por: Ashly Micolta, 2022.

Tabla n°2. Datos de los picos del perfil cromatográfico del pool de venenos de *B. atrox*, obtenidos por HPLC.

	Tiempo de retención (min)	Área (μV*sec)	% Área	Altura (μV)
1	19.190	27382586	3.30	2784966
2	19.364	22146140	2.67	2741311
3	20.083	3290290	0.40	357585
4	20.448	2888128	0.35	245936
5	20.966	5172875	0.62	375940
6	36.496	76469070	9.21	2329021
7	47.161	2391482	0.29	136930
8	51.316	4901103	0.59	295802
9	51.938	16266662	1.96	659193
10	53.135	4300692	0.52	251801
11	53.699	1409817	0.17	73414
12	54.321	2778562	0.33	200393
13	55.274	3033483	0.37	102265
14	55.846	869069	0.10	61955
15	57.568	71313739	8.59	2109810
16	58.992	46844873	5.64	1459016
17	63.227	1964322	0.24	100341
18	64.451	1616464	0.19	106934
19	65.620	1617816	0.19	130475
20	66.011	755016	0.09	59517
21	68.119	7242932	0.87	176414
22	68.862	99010016	11.92	2707262
23	69.478	110722442	13.33	2509623
24	71.645	27869311	3.36	914325
25	73.008	1430973	0.17	52996
26	75.705	6104288	0.73	178444
27	77.717	9104853	0.37	77124
28	81.568	61756480	7.44	2442253
29	81.896	46564180	5.61	2349720
30	82.289	4246235	0.51	405297
31	82.859	13155310	1.58	984874
32	83.837	67012757	8.07	2445014
33	84.182	61312096	7.38	2353170
34	85.448	1706864	0.21	130364
35	86.230	15253206	1.84	614484

Realizado por: Ashly Micolta, 2022.

Tabla n°3. Datos de los picos del perfil cromatográfico del extracto acuoso de *P. discolor*, obtenidos por RP HPLC.

	Tiempo de retención (min)	Área (μV*sec)	% Área	Altura (μV)
1	4.667	25789427	3.94	2106736
2	11.506	1872550	2.06	290852
3	14.016	1624820	2.70	471378
4	15.906	8872550	2.06	290852
5	16.516	11624820	2.70	471378
6	18.244	90565462	21.04	1477479
7	19.130	120574335	28.01	1805523
8	20.304	133812672	31.09	1496856
9	21.561	45843135	10.65	708699

Realizado por: Ashly Micolta, 2022.

Tabla n°4. Datos de los picos del perfil cromatográfico de la interacción extracto acuoso/veneno sin incubación previa, obtenidos por RP HPLC.

	Tiempo de retención (min)	Área (μV*sec)	% Área	Altura (μV)
1	4.55	27189829	3.94	2106736
2	14.599	2124531	0.31	274952
3	14.953	1835012	0.27	99944
4	16.299	1120881	0.16	140113
5	17.032	2683855	0.39	242897
6	18.167	7453036	1.08	408412
7	19.356	28213131	4.09	2721574
8	19.526	20743601	3.15	2675078
9	20.256	5414491	0.79	448659
10	20.567	4130716	0.60	384348
11	20.697	1485041	0.22	228439
12	21.050	8072965	1.17	412825
13	26.903	1284177	0.19	88208
14	37.176	66967238	9.71	2155948
15	51.601	11773104	1.71	547412
16	52.142	17304902	2.51	589900
17	53.528	1561361	0.23	102606
18	53.858	2589752	0.38	116596
19	54.602	2166431	0.31	103053
20	55.409	1135259	0.16	39830
21	56.581	2754450	0.40	100509
22	57.677	55397469	3.68	1267230
23	58.975	26165064	3.79	681015
24	68.153	4168363	0.60	119853
25	69.287	102518932	14.87	2756105
26	69.935	92943121	13.48	2393305
27	71.859	11311473	1.64	312196
28	75.824	1982259	0.29	54350

29	77.624	2005689	0.29	40794
30	81.786	43976603	3.48	1858106
31	82.256	2398713	0.35	155800
32	82.851	10177677	1.48	560101
33	83.852	56372831	8.17	2706834
34	84.104	38041880	5.52	1735001
35	85.381	2176984	0.32	97974
36	86.124	10133667	1.47	371066

Realizado por: Ashly Micolta, 2022.

Tabla n°5. Datos de los picos del perfil cromatográfico de la interacción extracto acuoso/veneno incubado por 30 minutos a 37°C, obtenidos por RP HPLC.

	Tiempo de retención (min)	Área (μV*sec)	% Área	Altura (μV)
1	4.423	27189829	3.94	2106736
2	5.399	1134461	0.21	175234
3	12.599	2124531	0.30	349752
4	13.853	1983855	0.30	293944
5	14.249	1120881	0.16	140113
6	14.442	182835	0.12	112897
7	15.199	210881	0.17	310110
8	16.132	2838551	0.35	642897
9	16.467	6453036	1.00	808412
10	17.235	2314201	0.32	779820
11	17.522	2611234	0.34	761684
12	18.356	18213131	3.09	2665532
13	19.526	28213131	4.19	3102174
14	19.993	21745601	3.85	3076707
15	20.256	4454431	0.69	948659
16	20.567	4130716	0.60	884348
17	20.697	1485041	0.22	628439
18	21.050	8072965	1.17	452825
19	21.503	1284177	0.19	388208
20	26.023	1385127	0.22	88208
21	27.128	1074167	0.15	98628
22	28.012	1287166	0.19	58506
23	31.923	1284177	0.19	55608
24	34.005	1376576	0.21	98208
25	37.176	9877258	7.81	1855948
26	38.609	1096735	0.16	59294
27	47.161	239482	0.27	36930
28	51.231	11773104	1.71	547412
29	52.514	17304902	2.51	589900
30	54.028	1561361	0.23	102606
31	55.858	1135259	0.16	39830
32	56.602	2754450	0.40	100509

33	55.409	25397469	3.68	1297230
34	56.581	26165064	3.79	1181015
35	58.577	21124531	3.00	349752
36	68.648	15311472	2.00	219853
37	69.573	13724530	1.77	392105
38	70.312	23234431	3.08	499305
39	71.813	11311473	1.64	412196
40	75.670	1982259	0.29	54350
41	77.563	1013619	0.17	40794
42	78.917	1009829	0.18	40794
43	81.706	33976603	3.38	1858106
44	81.996	2488713	0.55	155800
45	82.876	10323177	1.52	671066
46	83.825	56372831	8.17	2706834
47	84.087	38041880	5.52	1735001
48	86.139	10133667	1.47	371066

Realizado por: Ashly Micolta, 2022.

Tabla n°6. Datos de la actividad enzimática de las fosfolipasas del veneno *B. atrox* por la interacción con el extracto acuoso de *P. discolor*.

Factor	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
Veneno	2	100,0	0,0	(78,1; 121,9)
1:10	2	58,21	9,27	(36,32; 80,10)
1:20	2	49,86	7,22	(27,97; 71,75)
1:40	2	27,84	9,12	(5,95; 49,73)
1:80	2	29,4	22,4	(7,5; 51,3)

Desv.Est. agrupada = 12,0443

Realizado por: Ashly Micolta, 2022.

Tabla n°7. Datos de la actividad enzimática de las serinproteasas del veneno *B. atrox* por la interacción con el extracto acuoso de *P. discolor*.

Factor	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
Veneno	2	100,0	0,0	(93,5; 106,5)
1:10	2	73,01	3,92	(66,50; 79,52)
1:20	2	67,00	1,80	(60,50; 73,51)
1:40	2	58,03	6,70	(51,53; 64,54)
1:80	2	49,875	0,813	(43,367; 56,383)

Desv.Est. agrupada = 3,58047

Realizado por: Ashly Micolta, 2022.

Tabla n°8. Datos de la actividad enzimática caseinolítica del veneno *B. atrox* por la interacción con el extracto acuoso de *P. discolor*.

Factor	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
Veneno	2	100,0	0,0	(90,8; 109,2)
1:10	2	81,62	4,67	(72,38; 90,86)
1:20	2	74,03	2,69	(64,78; 83,27)
1:40	2	66,56	9,28	(57,32; 75,80)
1:80	2	54,56	3,75	(45,32; 63,81)

Desv.Est. agrupada = 5,08358

Realizado por: Ashly Micolta, 2022.

Tabla n°9. Datos de la actividad enzimática de las serinproteasas del veneno *B. atrox* por la interacción con el extracto etanólico de *P. discolor*.

Factor	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
Veneno	2	100,0	0,0	(88,4; 111,6)
1:10	2	24,33	9,99	(12,75; 35,90)
1:20	2	22,47	4,58	(10,89; 34,05)
1:40	2	20,05	1,65	(8,47; 31,62)
1:80	2	15,65	8,91	(4,07; 27,23)

Desv.Est. agrupada = 6,37053

Realizado por: Ashly Micolta, 2022.

Tabla n°10. Datos de la actividad enzimática de las fosfolipasas del veneno *B. atrox* por la interacción con el extracto etanólico de *P. discolor*.

Factor	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
Veneno	2	100,0	0,0	(87,9; 112,1)
1:10	2	85,74	6,05	(73,67; 97,81)
1:20	2	86,47	8,53	(74,40; 98,53)
1:40	2	76,99	10,53	(64,92; 89,05)
1:80	2	31,140	0,212	(19,072; 43,208)

Desv.Est. agrupada = 6,63898

Realizado por: Ashly Micolta, 2022.

Tabla n°11. Datos de la actividad enzimática Caseinolítica del veneno *B. atrox* por la interacción con el extracto etanólico de *P. discolor*.

Factor	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
Veneno	2	100,0	0,0	(70,4; 129,6)
1:10	2	98,451	0,779	(68,895; 128,007)
1:20	2	90,99	4,24	(61,43; 120,55)
1:40	2	81,8	35,7	(52,3; 111,4)
1:80	2	9,07	5,35	(-20,49; 38,63)

Desv.Est. agrupada = 16,2604

Realizado por: Ashly Micolta, 2022.

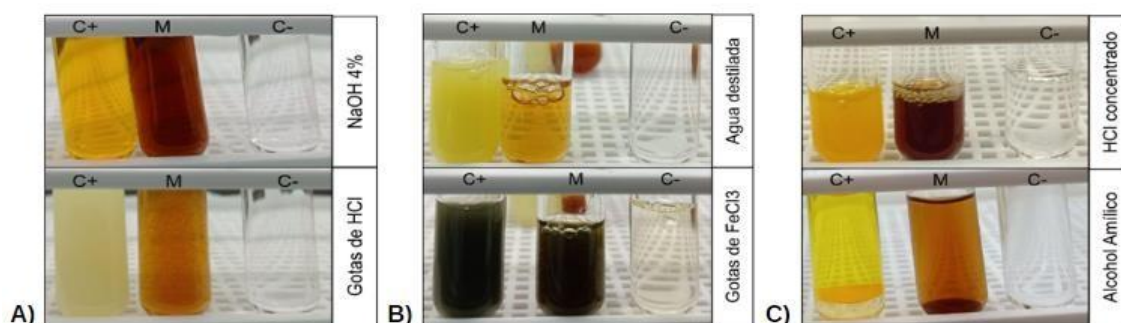


Figura No 1. Determinación de flavonoides en extracto acuoso de corteza de *P. discolor*. A) Ensayo NaOH/HCl, B) Ensayo de Cloruro Férrico, C) Ensayo Shinoda. Donde *P. discolor* es la muestra interés, quercetina como control positivo y agua como control negativo.

Realizado por: Ashly Micolta, 2022.

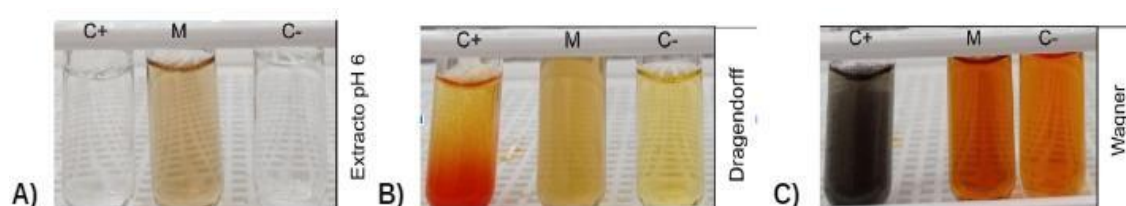


Figura No 2. Determinación de la presencia de alcaloides en el extracto acuoso de *P. discolor*. A) Ajuste de pH a 6 del extracto en HCl al 10 %. B) Ensayo con reactivo Dragendorff. C) Ensayo con reactivo Wagner. Donde el control positivo fue atropina, la muestra (M) fue *P. discolor* y el control negativo de agua destilada.

Realizado por: Ashly Micolta, 2022.

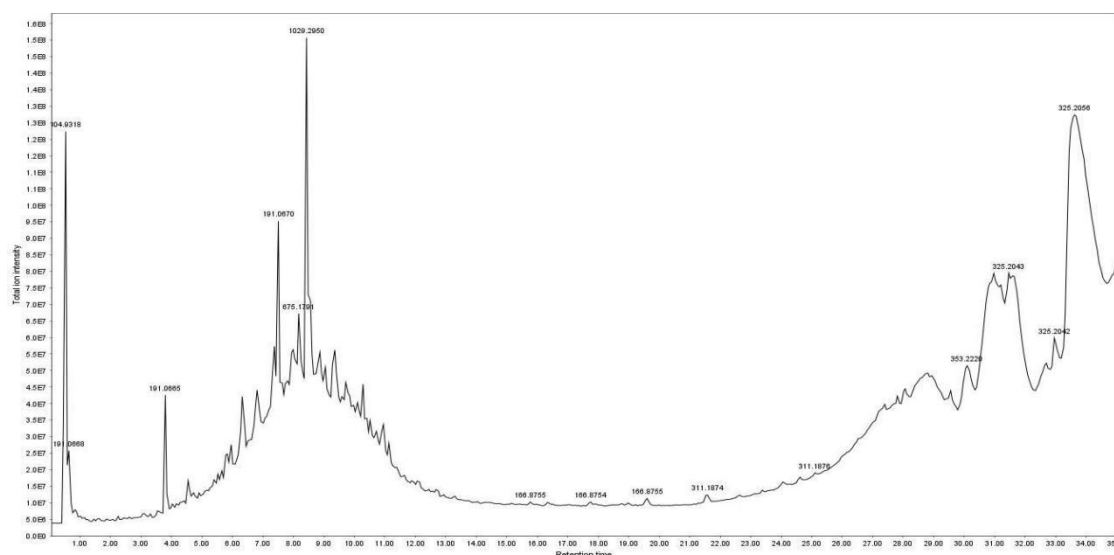


Figura No 3. Perfil cromatográfico del extracto acuoso de la corteza de *Piptocoma discolor* obtenido por UPLC-MS/MS.

Realizado por: Ashly Micolta, 2022.

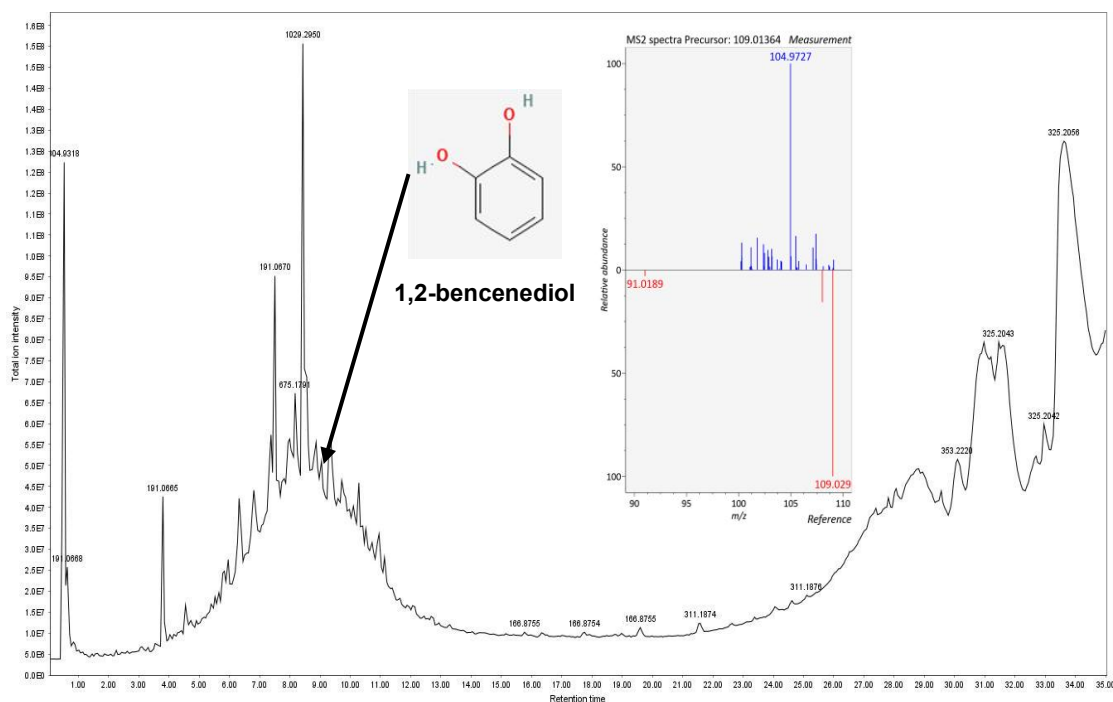


Figura No 4. Metabolito 1,2-benzenediol identificado en el cromatograma del extracto acuoso de la corteza de *P. discolor* obtenido por UPLC-MS/MS. **Cromatograma MS2 del metabolito en la muestra (azul) y los fragmentos de coincidencia con la biblioteca (rojo).**

Realizado por: Ashly Micolta, 2022.

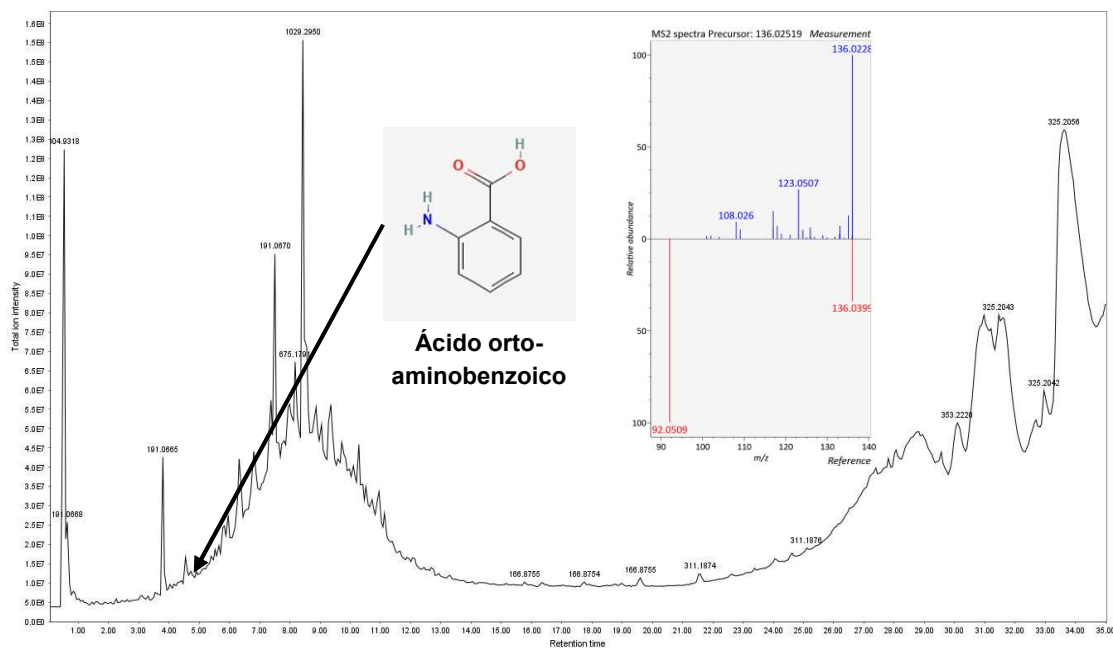


Figura No 5. Metabolito ácido ortoaminobenzoico identificado en el cromatograma del extracto acuoso de la corteza de *P. discolor* obtenido por UPLC-MS/MS. **Cromatograma MS2 del metabolito en la muestra (azul) y los fragmentos de coincidencia con la biblioteca (rojo).**

Realizado por: Ashly Micolta, 2022.

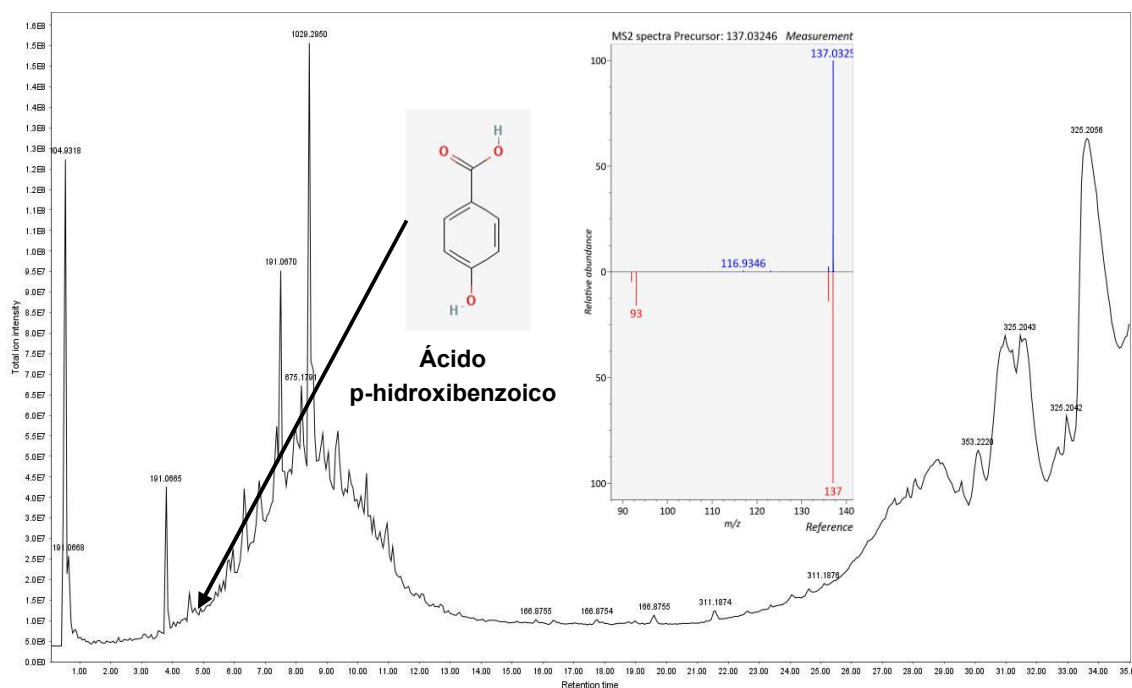


Figura No 6. Metabolito ácido p-hidroxibenzoico identificado en el cromatograma del extracto acuoso de la corteza de *P. discolor* obtenido por UPLC-MS/MS. **Cromatograma MS2 del metabolito en la muestra (azul) y los fragmentos de coincidencia con la biblioteca (rojo).**

Realizado por: Ashly Micolta, 2022.

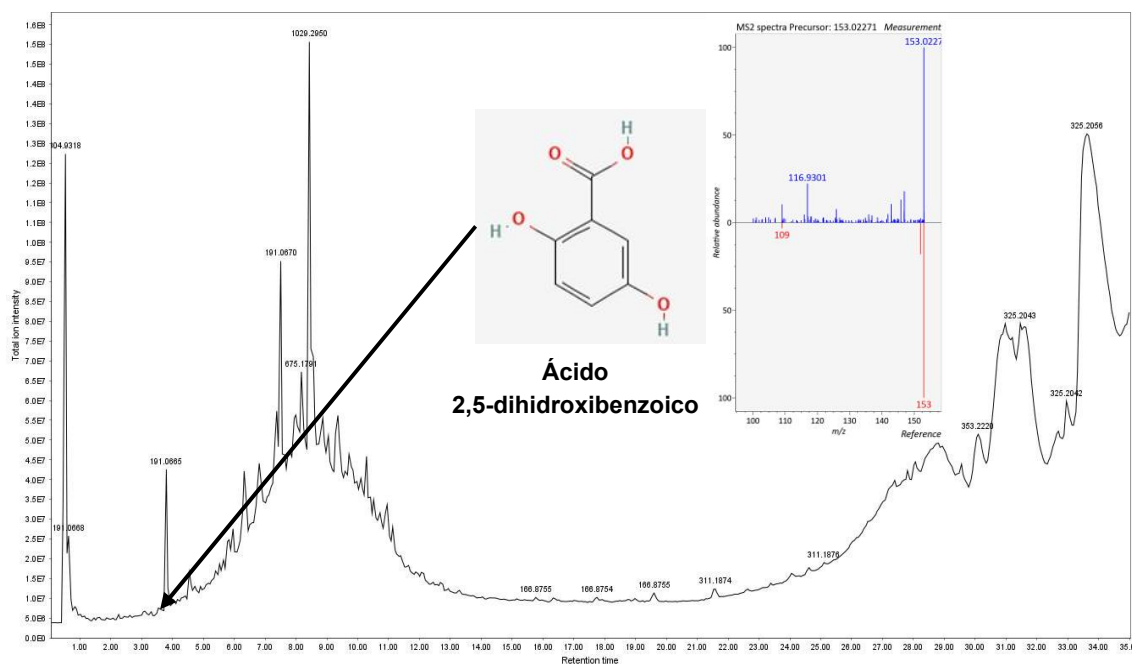


Figura No 7. Metabolito ácido dihidroxibenzoico identificado en el cromatograma del extracto acuoso de la corteza de *P. discolor* obtenido por UPLC-MS/MS. **Cromatograma MS2 del metabolito en la muestra (azul) y los fragmentos de coincidencia con la biblioteca (rojo).**

Realizado por: Ashly Micolta, 2022.

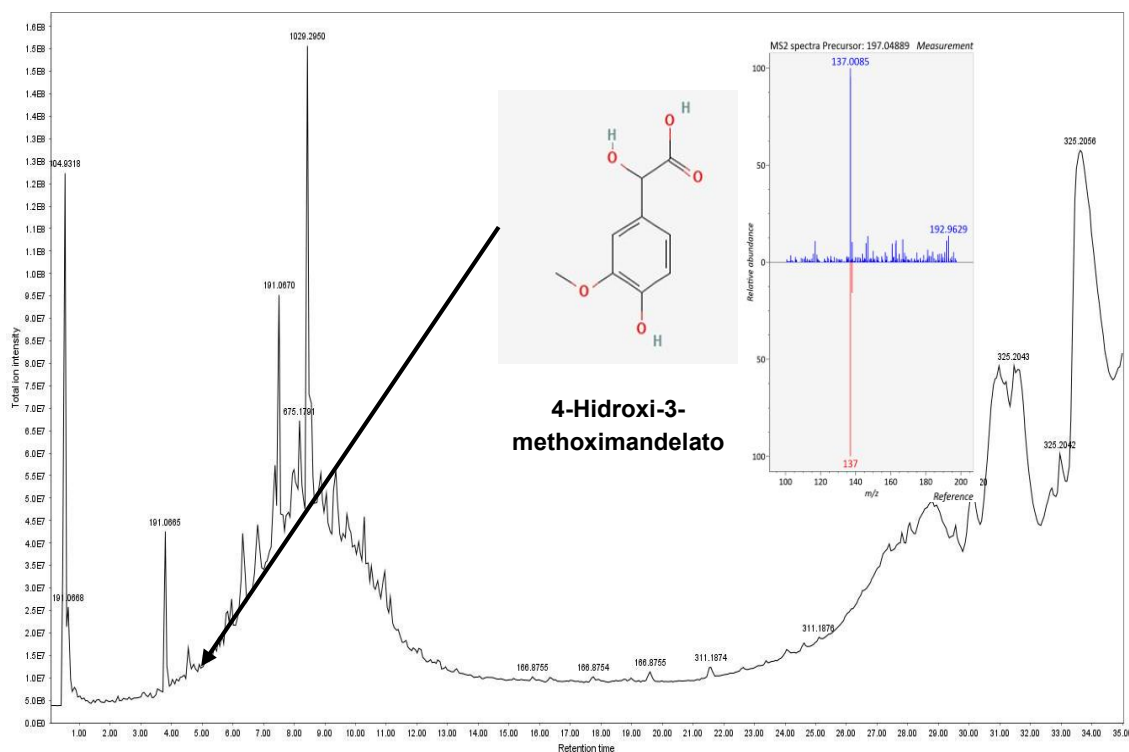


Figura No 8. Metabolito 4-hidroxi-3- metoximandelato identificado en el cromatograma del extracto acuoso de la corteza de *P. discolor* obtenido por UPLC-MS/MS. **Cromatograma MS2 del metabolito en la muestra (azul) y los fragmentos de coincidencia con la biblioteca (rojo).**

Realizado por: Ashly Micolta, 2022.

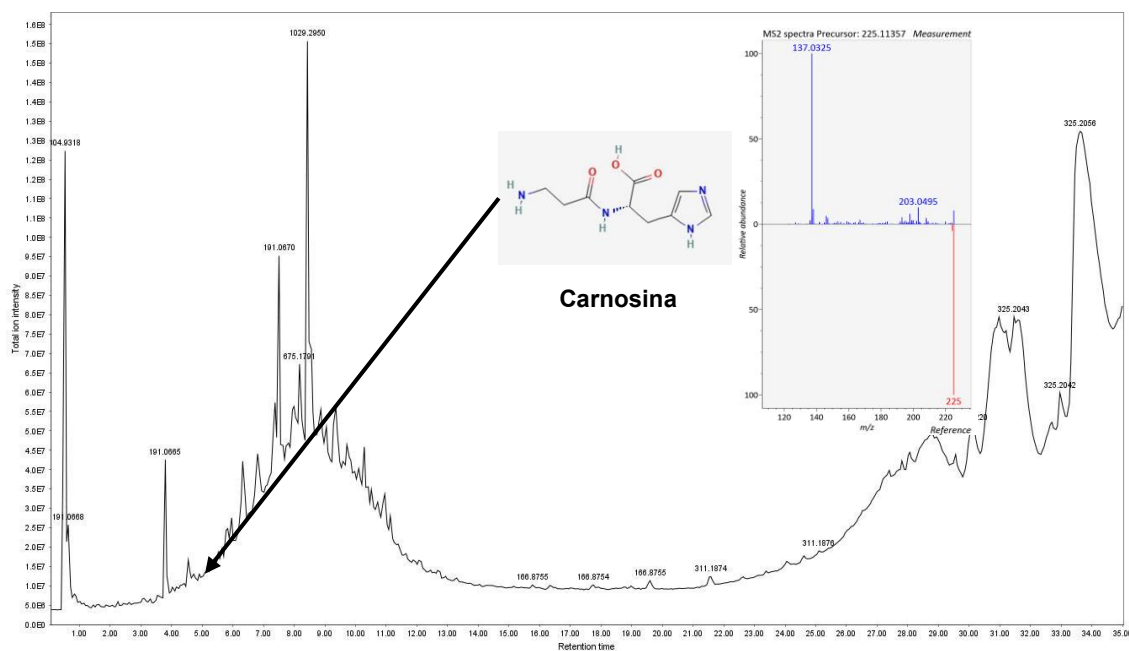


Figura No 9. Metabolito carnosina identificado en el cromatograma del extracto acuoso de la corteza de *P. discolor* obtenido por UPLC-MS/MS. **Cromatograma MS2 del metabolito en la muestra (azul) y los fragmentos de coincidencia con la biblioteca (rojo).**

Realizado por: Ashly Micolta, 2022.

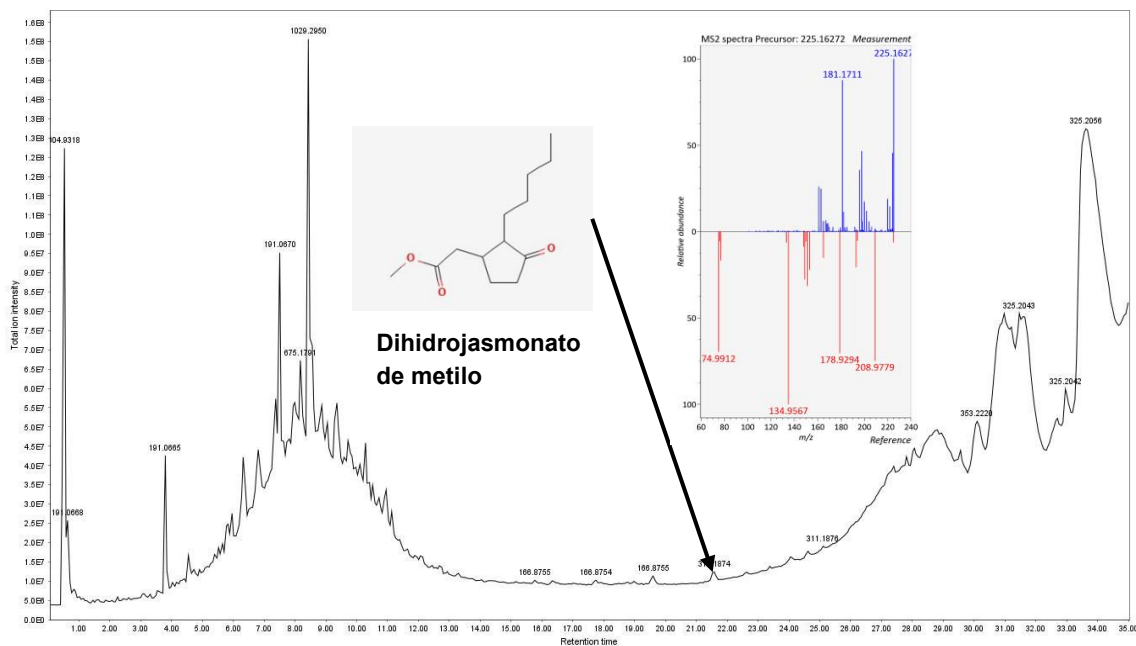


Figura No 10. Metabolito dihidrojasmonato de metilo identificado en el cromatograma del extracto acuoso de la corteza de *P. discolor* obtenido por UPLC-MS/MS. **Cromatograma MS2 del metabolito en la muestra (azul) y los fragmentos de coincidencia con la biblioteca (rojo).**

Realizado por: Ashly Micolta, 2022.

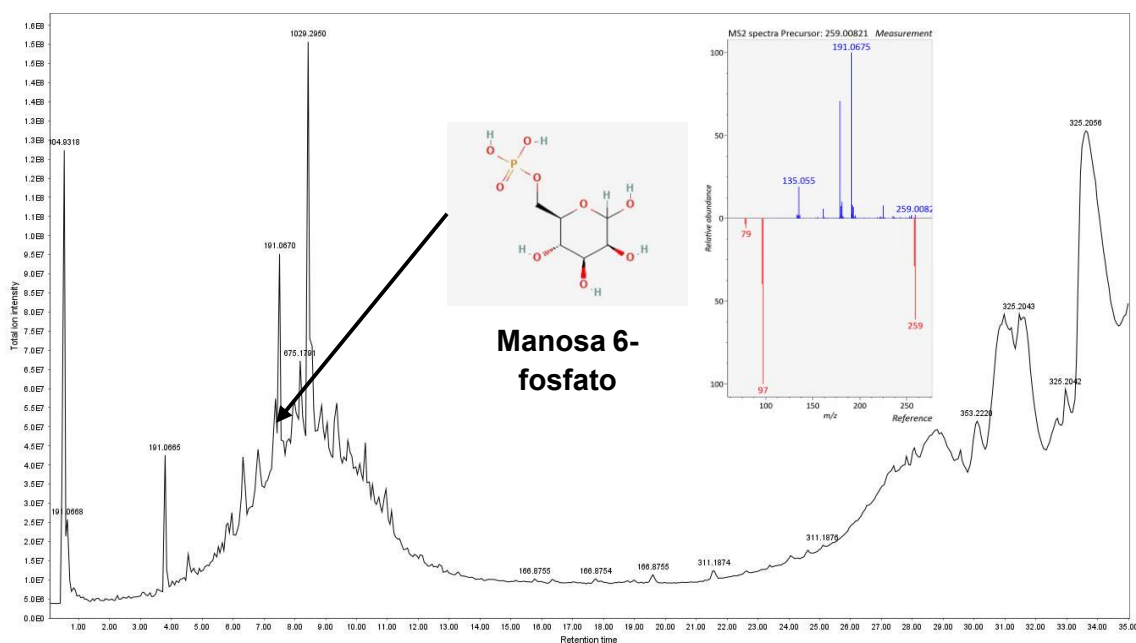


Figura No 11. Metabolito manosa-6-fosfato identificado en el cromatograma del extracto acuoso de la corteza de *P. discolor* obtenido por UPLC-MS/MS. **Cromatograma MS2 del metabolito en la muestra (azul) y los fragmentos de coincidencia con la biblioteca (rojo).**

Realizado por: Ashly Micolta, 2022.

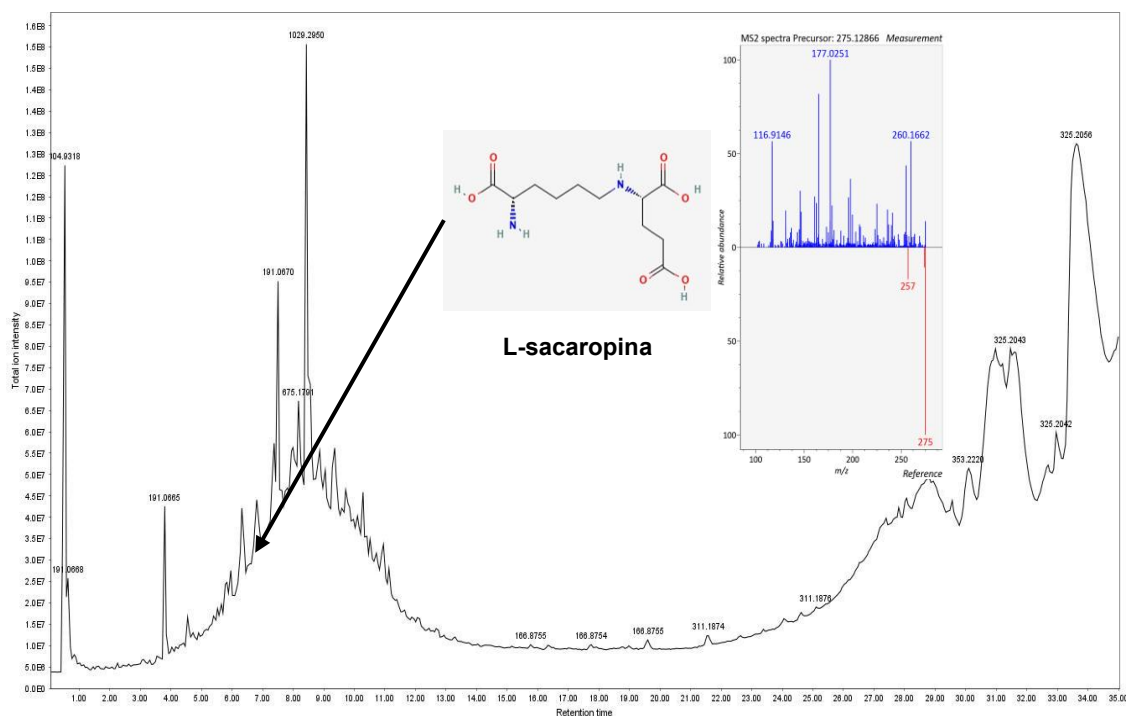


Figura No 12. Metabolito L-sacarpina identificado en el cromatograma del extracto acuoso de la corteza de *P. discolor* obtenido por UPLC-MS/MS. **Cromatograma MS2 del metabolito en la muestra (azul) y los fragmentos de coincidencia con la biblioteca (rojo).**

Realizado por: Ashly Micolta, 2022.

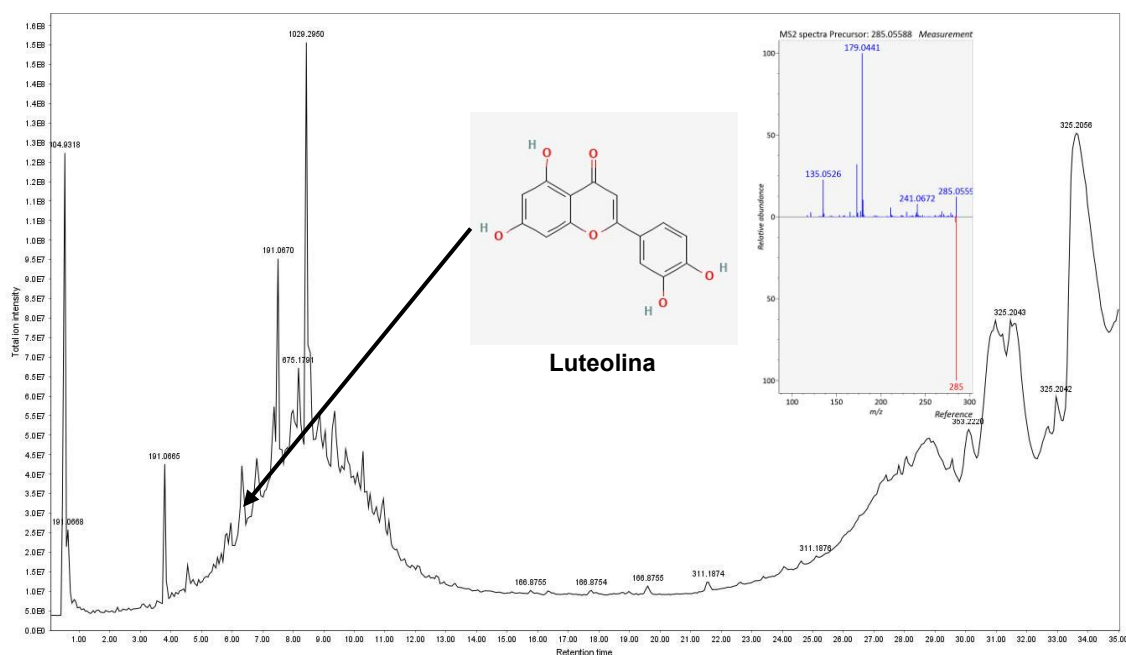


Figura No 13. Metabolito luteolina identificado en el cromatograma del extracto acuoso de la corteza de *P. discolor* obtenido por UPLC-MS/MS. **Cromatograma MS2 del metabolito en la muestra (azul) y los fragmentos de coincidencia con la biblioteca (rojo).**

Realizado por: Ashly Micolta, 2022.

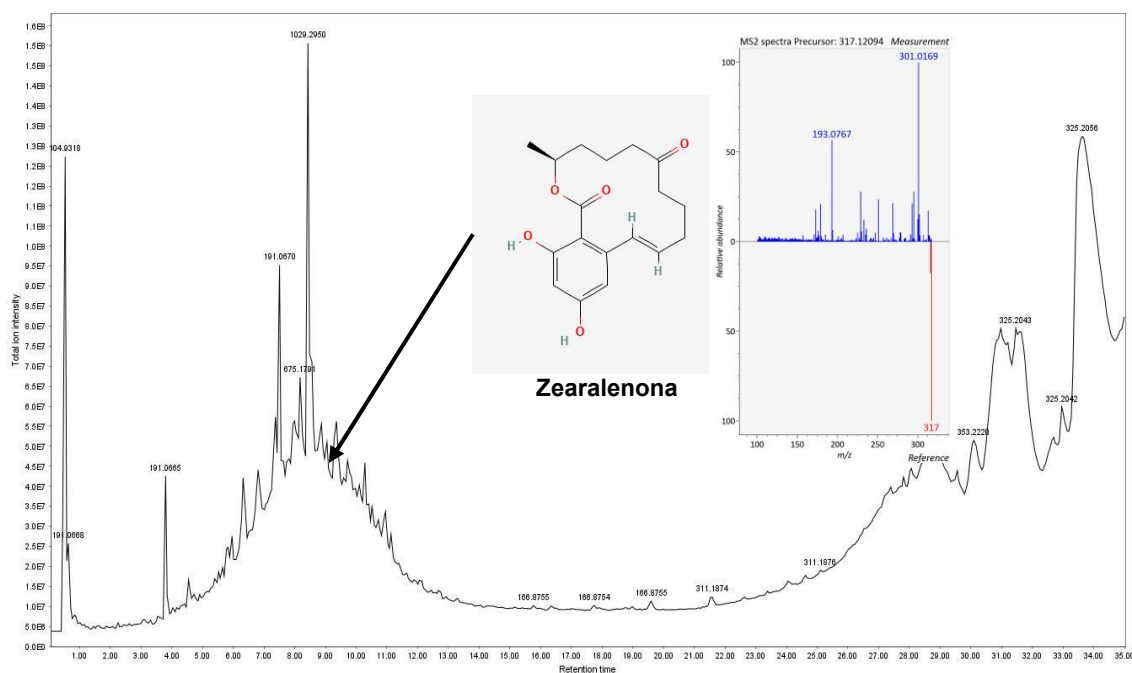


Figura No 14. Metabolito zearelenona identificado en el cromatograma del extracto acuoso de la corteza de *P. discolor* obtenido por UPLC-MS/MS. **Cromatograma MS2 del metabolito en la muestra (azul) y los fragmentos de coincidencia con la biblioteca (rojo).**

Realizado por: Ashly Micolta, 2022.

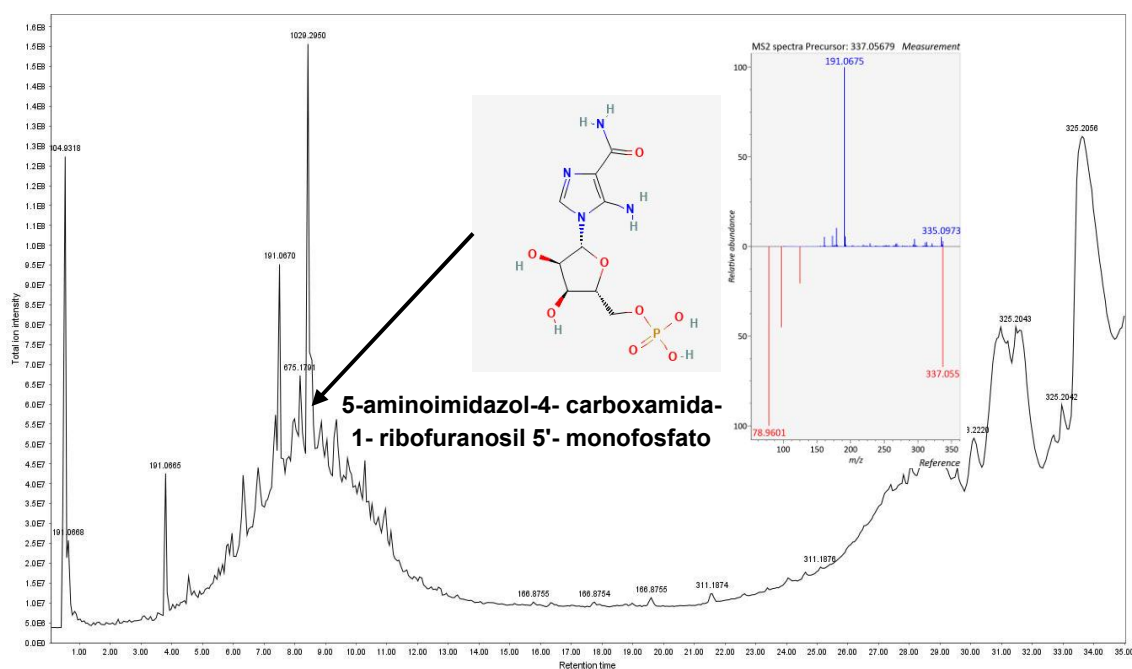


Figura No 15. Metabolito 5-aminoimidazol-4- carboxamida-1- ribofuranosil 5'- monofosfato identificado en el cromatograma del extracto acuoso de la corteza de *P. discolor* obtenido por UPLC-MS/MS. **Cromatograma MS2 del metabolito en la muestra (azul) y los fragmentos de coincidencia con la biblioteca (rojo).**

Realizado por: Ashly Micolta, 2022.

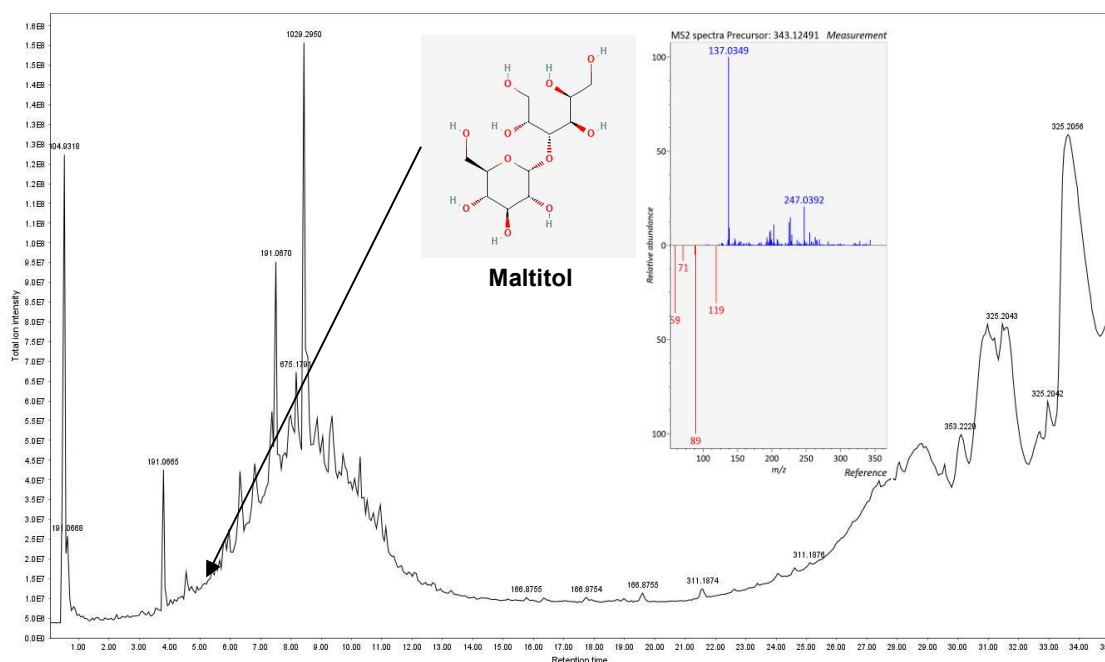


Figura No 16. Metabolito maltitol identificado en el cromatograma del extracto acuoso de la corteza de *P. discolor* obtenido por UPLC-MS/MS. **Cromatograma MS2 del metabolito en la muestra (azul) y los fragmentos de coincidencia con la biblioteca (rojo).**

Realizado por: Ashly Micolta, 2022.

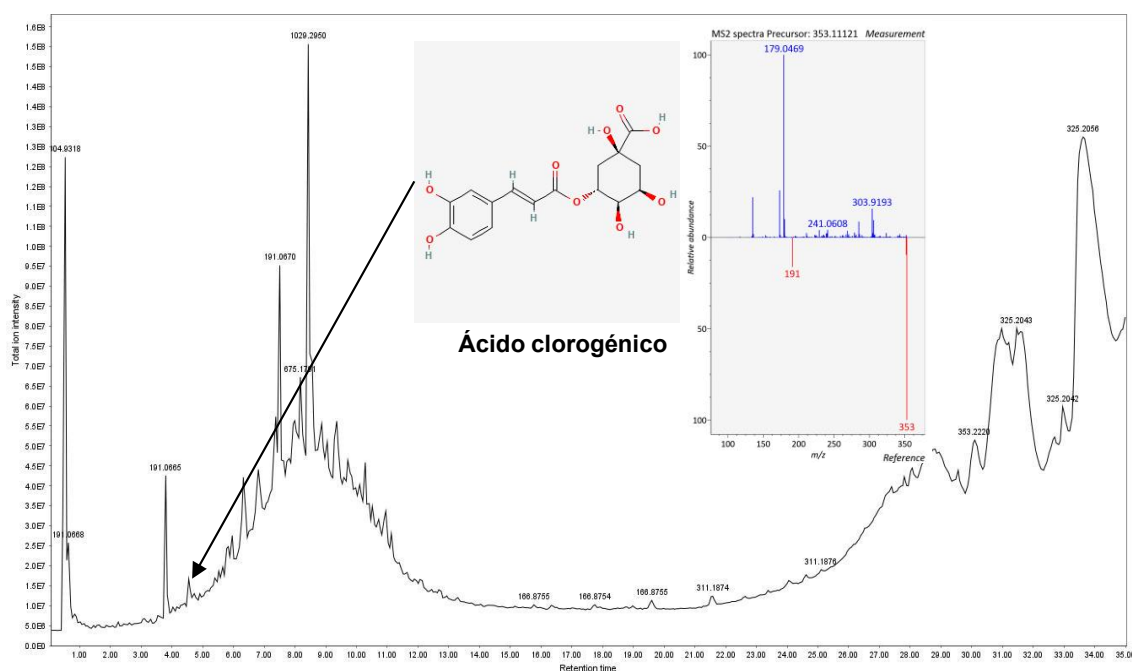


Figura No 17. Metabolito ácido clorogénico identificado en el cromatograma del extracto acuoso de la corteza de *P. discolor* obtenido por UPLC-MS/MS. **Cromatograma MS2 del metabolito en la muestra (azul) y los fragmentos de coincidencia con la biblioteca (rojo).**

Realizado por: Ashly Micolta, 2022.

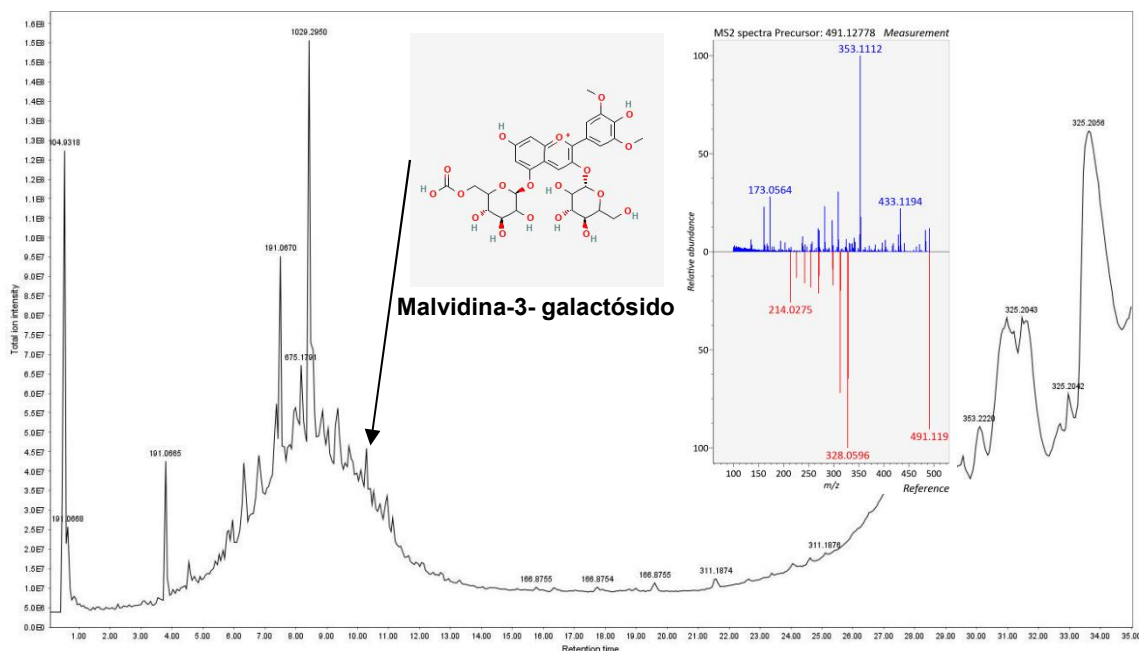


Figura No 18. Metabolito malvidina-3- galactósido identificado en el cromatograma del extracto acuoso de la corteza de *P. discolor* obtenido por UPLC-MS/MS. **Cromatograma MS2 del metabolito en la muestra (azul) y los fragmentos de coincidencia con la biblioteca (rojo).**

Realizado por: Ashly Micolta, 2022.

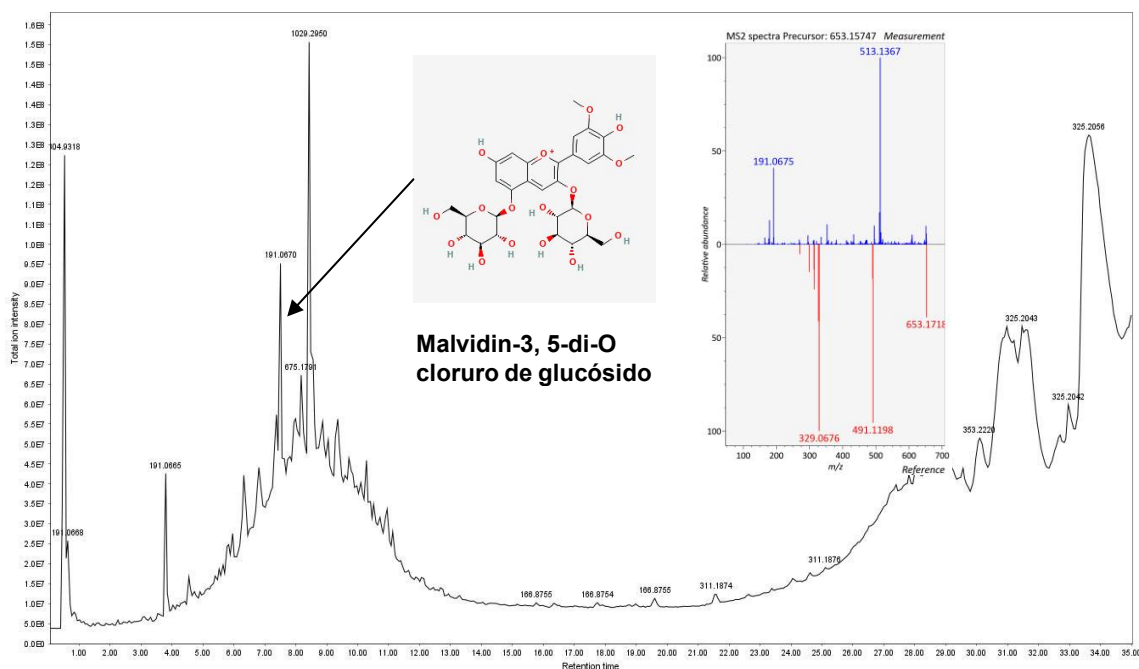


Figura No 19. Metabolito malvidin-3, 5-di-Ocloruro de glucósido identificado en el cromatograma del extracto acuoso de la corteza de *P. discolor* obtenido por UPLC-MS/MS. **Cromatograma MS2 del metabolito en la muestra (azul) y los fragmentos de coincidencia con la biblioteca (rojo).**

Realizado por: Ashly Micolta, 2022.

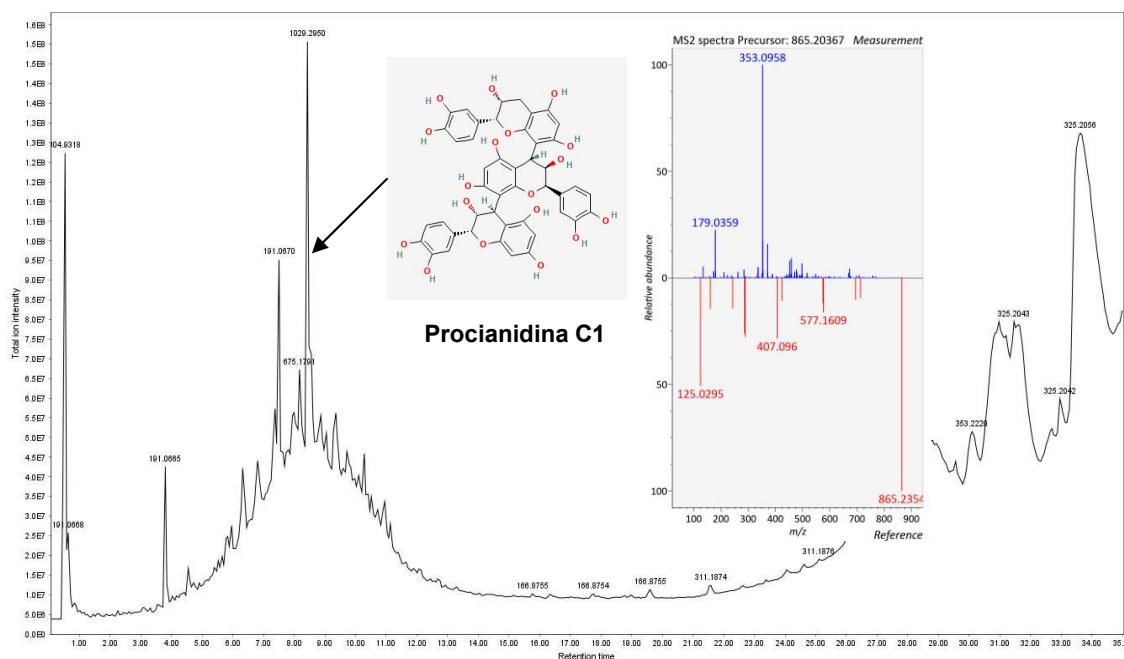


Figura No 20. Metabolito procianidina C1 identificado en el cromatograma del extracto acuoso de la corteza de *P. discolor* obtenido por UPLC-MS/MS. **Cromatograma MS2 del metabolito en la muestra (azul) y los fragmentos de coincidencia con la biblioteca (rojo).**

Realizado por: Ashly Micolta, 2022.

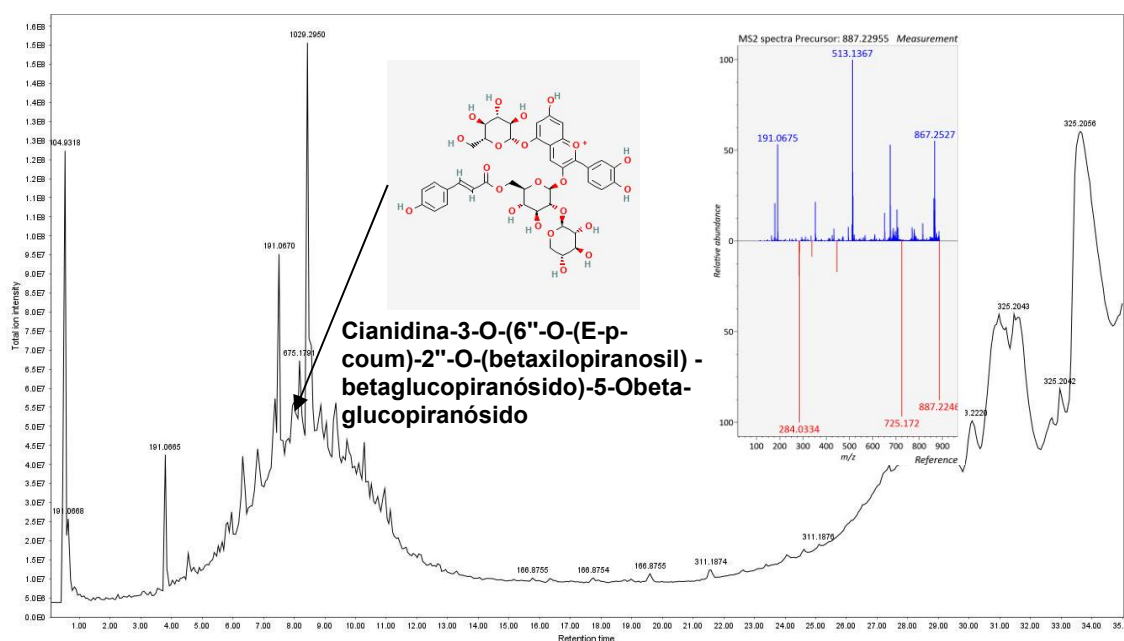


Figura No 21. Metabolito cianidina-3-O-(6''-O-(E-p-coum)-2''-O-(beta-xilopiranosil)-beta-glucopiranosido)-5-O-beta-glucopiranosido identificado en el cromatograma del extracto acuoso de la corteza de *P. discolor* obtenido por UPLC-MS/MS. **Cromatograma MS2 del metabolito en la muestra (azul) y los fragmentos de coincidencia con la biblioteca (rojo).**

Realizado por: Ashly Micolta, 2022.

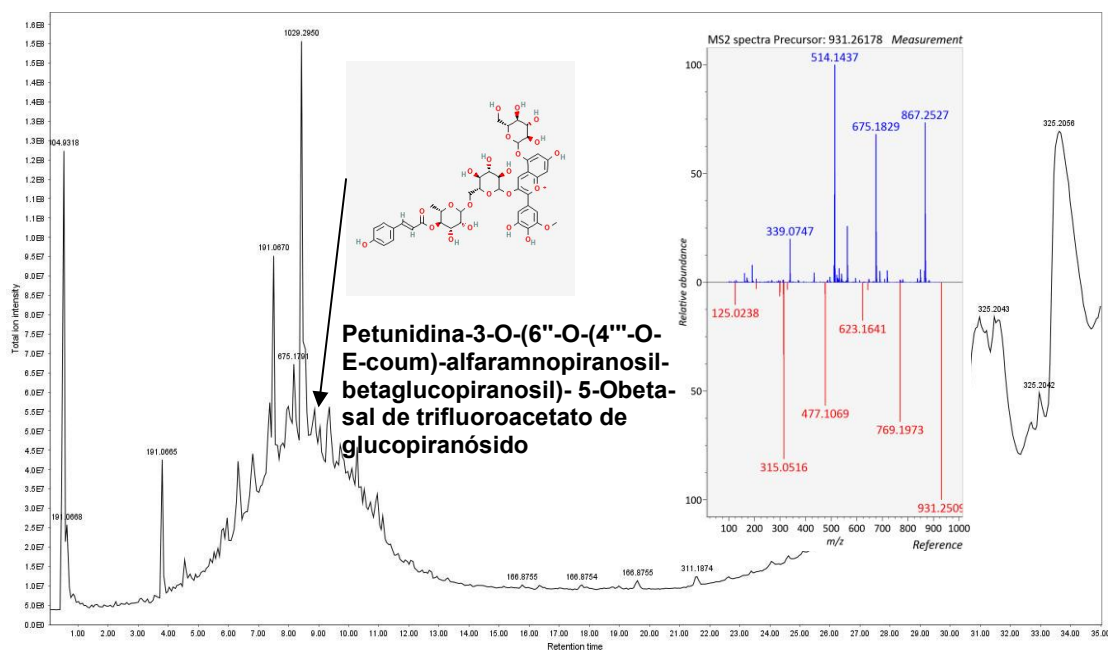


Figura No 22. Metabolito petunidina-3-O-(6''-O-(4'''-O-E-coum)-alfa ramnopiranosil-beta glucopiranosil)- 5-O beta-sal de trifluoroacetato de glucopiranosido identificado en el cromatograma del extracto acuoso de la corteza de *P. discolor* obtenido por UPLC-MS/MS. **Cromatograma MS2 del metabolito en la muestra (azul) y los fragmentos de coincidencia con la biblioteca (rojo).**

Realizado por: Ashly Micolta, 2022.