

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO



FACULTAD DE INGENIERÍA EN SISTEMAS, ELECTRÓNICA E INDUSTRIAL

MAESTRÍA EN QUÍMICA MENCIÓN QUÍMICA-FÍSICA

Tema: Caracterización de plantas amazónicas con actividad antiofídica por análisis químico.

Trabajo de titulación previo a la obtención del Grado Académico de Magíster en Química mención Química-Física

Modalidad de titulación “PROYECTO DE DESARROLLO”

Autor: Ing. Andrés Sebastián Moreno Ávila

Director: Lic. Gabriela Salazar Mogollón PhD.

Ambato-Ecuador

2022

APROBACIÓN DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

A la Unidad Académica de Titulación de la Facultad de Ingeniería en Sistemas Electrónica e Industrial.

El Tribunal receptor de la Defensa del Trabajo de Titulación presidido por la Ingeniera Elsa Pilar Urrutia Urrutia, Magíster e integrado por los señores: Ingeniera Maribel Cecilia Pérez Pirela, PhD. e Ingeniera Carolina del Rocío Montero Calderón, PhD. Designados por la Unidad Académica de Titulación de la Facultad de Ingeniería en Sistemas, Electrónica e Industrial de la Universidad Técnica de Ambato, para receptor el Trabajo de Titulación con el tema: “*CARACTERIZACIÓN DE PLANTAS AMAZÓNICAS CON ACTIVIDAD ANTIOFÍDICA POR ANÁLISIS QUÍMICO*”, elaborado y presentado por el Ingeniero Andrés Sebastián Moreno Ávila, para optar por el Grado Académico de Magister en Química, Mención Química Física; una vez escuchada la defensa oral del Trabajo de Titulación el Tribunal aprueba y remite el trabajo para uso y custodia en las bibliotecas de la Universidad Técnica de Ambato.

.....

Ing. Elsa Pilar Urrutia Urrutia, Mg.
Presidente y Miembro del Tribunal de Defensa

.....

Ing. Carolina del Rocío Montero Calderón, PhD
Miembro del Tribunal de Defensa

.....

Ing. Maribel Cecilia Pérez Pirela, PhD
Miembro del Tribunal de Defensa

AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

La responsabilidad de las opiniones, comentarios y críticas emitidas en el Trabajo de Titulación presentado con el tema: “Caracterización de plantas amazónicas con actividad antiofídica por análisis químico”, le corresponde exclusivamente a: Ing. Andrés Sebastián Moreno Ávila, Autor bajo la Dirección de: Lic. Gabriela Salazar Mogollón PhD, Directora del Trabajo de Titulación; y el patrimonio intelectual a la Universidad Técnica de Ambato.

Ing. Andrés Sebastián Moreno Ávila

AUTOR

Lic. Gabriela Salazar Mogollón PhD

DIRECTORA

DERECHOS DE AUTOR

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que el Trabajo de Titulación, sirva como un documento disponible para su lectura, consulta y procesos de investigación, según las normas de la Institución.

Cedo los Derechos de mi Trabajo de Titulación, con fines de difusión pública, además apruebo la reproducción de este, dentro de las regulaciones de la Universidad Técnica de Ambato.

Ing. Andrés Sebastián Moreno Ávila

050322006-3

INDICE GENERAL

Contenido

PORTADA.....	i
APROBACIÓN DEL TRABAJO DE TITULACIÓN	ii
AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN	iii
DERECHOS DE AUTOR	iv
INDICE DE TABLAS	viii
INDICE DE FIGURAS.....	x
AGRADECIMIENTO	xi
DEDICATORIA	xii
RESUMEN EJECUTIVO	xiii
EXECUTIVE SUMMARY.....	xv
CAPÍTULO 1	1
EL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN.....	1
1.1. Introducción.....	1
1.2. Justificación.....	3
1.3. Objetivos	4
1.3.1. General	4
1.3.2. Específicos	4
CAPITULO II	5
ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS.....	5
2.1. Envenenamiento antiofídico, problemas y causas del envenenamiento antiofídico	5
2.1.1. Uso y especies frecuentes de plantas con actividad antiofídica.....	6
2.1.2. Uso de la Medicina ancestral como suero antiofídico.	6
2.2. Araceae familia de estudio, <i>Urospatha sagittifolia</i> (Rudge) Schott (Antigua <i>Dracontium</i>), <i>Dracontium spruceanum</i> (Schott) y <i>Philodendron megalophyllum</i> (Schott).....	7
2.2.1 <i>Urospatha sagittifolia</i> (Rudge) Schott (Antigua <i>Dracontium</i>) y <i>Dracontium spruceanum</i> (Schott).....	7
2.2.2 <i>Philodendron megalophyllum</i> (Schott).....	9
2.3. Métodos de Análisis y Caracterización Química.....	11
2.3.1 Extracción sólido líquido.....	11
2.3.2 Separación de fracciones previas a la realización de pruebas fitoquímicas.....	12
2.4 Caracterización Físico-química.....	12

2.4.1 Tamizaje Fitoquímico.	12
2.4.1.1 Compuestos Fenólicos.	13
2.4.2.2 Cumarinas.	14
2.4.2.3 Saponinas.	16
2.4.2.4. Flavonoides.	18
2.4.2.5 Alcaloides.....	19
2.4.2.6 Terpenoides.	21
2.4.2.7 Taninos.	22
2.4.2.8 Antocianinas.....	23
2.4.2.9 Quinonas.	25
2.5 Técnicas analíticas usadas en el análisis de metabolitos secundarios.....	26
2.5.1 Espectroscopía UV - Visible para Compuestos Fenólicos y Flavonoides.	26
2.5.2 UPLC – QTOF-MS en el análisis de Metabolitos Secundarios de plantas con posible actividad antivenómica.	27
2.5.3 GC-MS uso y beneficio en el análisis de metabolitos secundarios en productos naturales.....	30
CAPÍTULO III.....	33
MARCO METODOLÓGICO	33
3.1 Ubicación.	33
3.2 Equipos y Materiales.....	33
3.3 Tipo de Investigación.....	35
3.4 Prueba de Hipótesis.....	36
3.5 Población o muestra.	36
3.6 Recolección de la Información.....	37
3.6.1 Preparación de los Extractos.	37
3.6.2 Marcha Fitoquímica.	37
3.6.3 Cuantificación espectrofotométrica UV-vis.....	39
3.6.4 Identificación Uplc-QToF.....	41
3.7 Procesamiento de la Información y Análisis Estadístico.....	42
3.8 Variables de respuesta o resultados alcanzados.	42
CAPITULO IV.....	43
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	43
4.1 Identificación Botánica de la especie <i>Urospatha sagittifolia</i> (Rudge) Schott (antigua <i>Dracontium</i>).	43
4.2 Análisis Fitoquímico.....	43
4.3 Cuantificación espectrofotométrica UV-vis.....	44

4.4 Identificación Uplc-QToF.....	46
4.4.1 Resultados para la identificación de Flavonoides.	47
4.4.1.1 Flavonoides.	47
4.4.1.2 Alcaloides.....	54
4.4.1.3 Terpenoides.	56
4.4.1.4 Disacáridos.....	60
4.4.1.5 Saponinas.	61
4.4.1.6 Cumarinas.	61
4.4.1.7 Aminoácidos.	62
4.4.2 Resultados para la identificación de Compuestos Fenólicos.	63
4.4.2.1 Compuesto Fenólicos.....	63
4.4.2.2 Flavonoides.	65
4.4.2.3 Terpenoides.	66
4.4.2.4 Alcaloides.....	67
4.4.2.5 Antocianinas.....	68
4.4.3. Resultados de metabolitos secundarios identificados	69
4.5 Verificación de la Hipótesis.	73
4.6 Discusión.....	74
CAPÍTULO V	76
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	76
5.1 Conclusiones.	76
5.2 Recomendaciones.....	77
Bibliografía	78

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Taxonomía de la especie <i>Urospatha sagittifolia</i> (Rudge) Schott	9
Tabla 2. Taxonomía de la especie <i>Dracontium spruceanum</i> (Schott).	9
Tabla 3. Taxonomía de la especie <i>Philodendron megalophyllum</i> (Schott).	10
Tabla 4. Equipos y materiales para análisis Fitoquímico.....	34
Tabla 5. Equipos y materiales para cuantificación UV-vis.....	34
Tabla 6. Equipos y materiales para determinación en UPLC.	35
Tabla 7. Determinación de la curva de Calibración estándar fenoles.....	40
Tabla 8. Determinación curva de calibración estándar flavonoides.	41
Tabla 9. Resultados del Análisis Fitoquímico.	43
Tabla 10. Determinación cuantitativa de Fenoles totales de la especie <i>Urospatha sagittifolia</i> (Rudge) Schott (antigua <i>Dracontium</i>).	45
Tabla 11. Determinación cuantitativa de Flavonoides totales expresados como catequina.	46
Tabla 12. Apiin identificado en extracto de agua.	48
Tabla 13. Isorhamnetin-3-O-neohesperidoside identificado en extracto de agua.....	48
Tabla 14. Quercetin-3-O-neohesperidoside identificado en extracto de agua.	49
Tabla 15. Quercetin-7-O- [β -D-glucopyranosyl (1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranoside] identificado en extracto de agua.....	49
Tabla 16. Quercetin identificado en extracto de agua.....	50
Tabla 17. Rhamnetin identificado en extracto de agua y metanol.	50
Tabla 18. Yuankanin identificado en extracto de agua.	51
Tabla 19. Isorhamnetin identificado en extracto de agua.	51
Tabla 20. Kaempferol-3-glucuronide identificado en extracto de agua.....	52
Tabla 21. Kaempferol-3,7-diglucoside identificado en extracto de agua.	52
Tabla 22. Arecatannin A2 identificado en extracto de metanol.....	53
Tabla 23. Isorhamnetin-3-O-neohesperidoside identificado en extracto de metanol.	53
Tabla 24. Eriodictyol-7-O- β -D-methyl-glucuronopyranodise identificado en extracto de metanol.	54
Tabla 25. Gentiaticetine identificado en extracto de agua.	54
Tabla 26. Vomicine identificado en extracto de agua.....	54
Tabla 27. Isocorynoxine identificado en extracto de agua.	55
Tabla 28. Uncarine A identificado en extracto de agua.	56
Tabla 29. Nigakihemiacetal F identificado en extracto de agua y metanol.	57
Tabla 30. Centaurepensin identificado en extracto de agua.....	57

Tabla 31. Oleanic acid-3-O- β -D-(6'-O-methyl) glucuronide identificado en extracto de agua.	58
Tabla 32. Picrasin F identificado en extracto de agua.	58
Tabla 33. Tanegoside B identificado en extracto de agua.	59
Tabla 34. Ginkgolide J identificado en extracto de agua.	59
Tabla 35. Roseoside identificado en extracto de agua.	60
Tabla 36. α – kojibiose identificado en extracto de agua.	60
Tabla 37. Sucrose identificado en extracto de metanol.	61
Tabla 38. Curculigo Saponin C identificado en extracto de agua.	61
Tabla 39. Apiosylskimmin identificado en extracto de agua.	62
Tabla 40. Heterodendrin identificado en extracto de agua.	62
Tabla 41. Cumambrin A identificado en extracto de agua.	63
Tabla 42. Narirutin identificado en extracto de agua.	64
Tabla 43. Uncarine A identificado en extracto de agua y metanol.	64
Tabla 44. Vomisine identificado en extracto de agua y metanol.	65
Tabla 45. Kurarinone identificado en extracto de agua.	65
Tabla 46. Quercetagetin-3,4-dimethyl ether identificado en extracto de agua.	66
Tabla 47. Lucidenic acid A identificado en extracto de agua.	66
Tabla 48. Ergolide identificado en extracto de agua.	67
Tabla 49. Bruceine E_1 identificado en extracto de agua.	67
Tabla 50. Strychnine identificado en extracto de agua.	68
Tabla 51. Isocorynoxine identificado en extracto de agua.	68
Tabla 52. Delphin identificado en extracto de metanol.	69
Tabla 53. Resultados generales de metabolitos secundarios identificados.	69
Tabla 53. Ensayo de Bartlett etapas.	73
Tabla 54. Test de Anova.	74
Tabla 55. Ensayo de Kruskal-Wallis.	74

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura típica de los compuestos Fenólicos	13
Figura 2. Estructura química de Cumarina	14
Figura 3. Estructura química de la saponina	16
Figura 4. Estructura química flavonoide.....	18
Figura 5. Estructura química alcaloide.....	19
Figura 6. Estructura química terpeno.	21
Figura 7. Estructura química tanino.	22
Figura 8. Estructura química antocianina.....	24
Figura 9. Estructura química quinona.	26
Figura 10. Ubicación de la recolección de la muestra.	33
Figura 11. Recolección de la especie.	36
Figura 12. Curva de Calibración de Compuestos Fenólicos a 755 nm (Ác. Gálico). 45	
Figura 13. Resultados Compuestos Fenólicos a 755.5 nm en UV-visible.....	45
Figura 14. Curva de Calibración de Flavonoides a 510 nm (Catequina).	46
Figura 15. Resultados Flavonoides a 510 nm en UV-visible.....	46

AGRADECIMIENTO

A Dios por bendecirnos la vida, por guiarnos a lo largo de nuestra existencia, ser el apoyo y fortaleza en aquellos momentos de dificultad y de debilidad.

A mi tutora Gabriela Salazar Mogollón PhD, por la dedicación y apoyo que ha brindado a este trabajo, por el respeto a mis sugerencias e ideas y por la dirección y el rigor que ha facilitado a las mismas.

De la misma manera, agradezco al Ing. Joel por guiarme en el desarrollo experimental de mi trabajo.

Agradezco a mi familia en general, por el apoyo que me han brindado durante mis viajes.

Por último, agradezco a la Universidad IKIAM por abrirme las puertas para realizar el proceso experimental de mi trabajo de titulación.

DEDICATORIA

Con cariño y orgullo dedico este proyecto a Dios y las personas que me rodean, que hicieron posible este logro académico, que me motivan y me apoyan para cumplir grandes metas.

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE INGENIERÍA EN SISTEMAS, ELECTRÓNICA E
INDUSTRIAL
MAESTRÍA EN QUÍMICA MENCIÓN QUÍMICA-FÍSICA

TEMA:

Caracterización de plantas amazónicas con actividad antiofídica por análisis químico.

AUTOR: Ing. Andrés Sebastián Moreno Ávila

DIRECTOR: Lic. Gabriela Salazar Mogollón PhD.

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN:

- Seguridad y soberanía alimentaria, Energías Renovables y Desarrollo sostenible.

FECHA: 09 de febrero de 2022

RESUMEN EJECUTIVO

El presente trabajo de investigación tuvo como finalidad analizar e identificar los compuestos metabólicos presentes en la especie *Urospatha sagittifolia* (Rudge) Schott (antigua *Dracontium*), para lo cual la especie vegetal se recolectó en el sector Monte Alegre, de la parroquia rural Puerto Misahuallí, perteneciente al cantón Tena ubicado en la provincia de Napo a una altura de 460.6 m.s.n.m. La identificación taxonómica de la muestra se confirmó en el Herbario INABIO de la ciudad de Quito. La muestra recolectada se secó, minimizó su tamaño y se llevó a extracción sólido-líquido y maceración por varios días con diferentes solventes como: agua, metanol, hexano y cloroformo. Tras estos procesos, se llevó a cabo los análisis químicos pertinentes, así como screening fitoquímico el cual presentó una coloración y un precipitado para dar como positivo a cada una de las pruebas respectivamente siguiendo la metodología idónea. Por consiguiente, se realizó la cuantificación en espectrofotometría UV-vis por medio del Reactivo de Folin-Ciocalteu, dando resultados expresados en 0.1 mg ac. Gálico medido a 755 nm (Compuestos Fenólicos) y 0.25 mg de catequina a 510 nm (Flavonoides). Finalmente se realizó el análisis en Uplc-QToF para los compuestos con mayor afinidad antivenómica como polifenoles y flavonoides, de esta manera se

obtuvo metabolitos secundarios con su respectiva información espectral en ionización positiva y negativa, dando así grupos metabolómicos como: saponinas, alcaloides, antocianinas, cumarinas, fenoles, flavonoides y terpenoides.

Descriptor: Antivenómica, Cromatografía, Plantas Alexitéricas, Metabolitos Secundarios, Screening Fitoquímico.

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE INGENIERÍA EN SISTEMAS, ELECTRÓNICA E
INDUSTRIAL
MAESTRÍA EN QUÍMICA MENCIÓN QUÍMICA-FÍSICA

THEME:

Characterization of amazon plants with antiophytic activity by chemical analysis.

AUTHOR: Ing. Andrés Sebastián Moreno Ávila

DIRECTED BY: Lic. Gabriela Salazar Mogollón PhD

LINE OF RESEARCH:

- Food Security and Sovereignty, Renewable Energy and Sustainable Development

DATE: February 09, 2022

EXECUTIVE SUMMARY

The purpose of this research work was aimed to analyze and identify the metabolic compounds present in the species *Urospatha sagittifolia* (Rudge) Schott (formerly *Dracontium*), for which the plant species was collected in the Monte Alegre sector of the rural parish of Puerto Misahuallí, belonging to the canton Tena located in the province of Napo at an altitude of 460.6 m.a.s.l. The taxonomic identification of the sample was confirmed in the INABIO Herbarium in the city of Quito. The collected sample was dried, its size was minimized and it was taken to solid-liquid extraction and maceration for several days with different solvents such as: water, methanol, hexane and chloroform. After these processes, the pertinent chemical analyses were carried out, as well as phytochemical screening, which presented a coloration and a precipitate to give a positive result for each of the tests, respectively, following the appropriate methodology. Consequently, quantification was carried out in UV-vis spectrophotometry by means of the Folin-ciocalteu Reagent, giving results expressed as 0.1 mg of Gallic acid measured at 755 nm (Phenolic Compounds) and 0.25 mg of catechin at 510 nm (Flavonoids). Finally, the Uplc-QToF analysis was performed for the compounds with the highest antivenom affinity such as polyphenols and

flavonoids, thus obtaining secondary metabolites with their respective spectral information in positive and negative ionization, giving metabolomic groups such as: saponins, alkaloids, anthocyanins, coumarins, phenols, flavonoids and terpenoids.

Keywords: Antivenomics, Chromatography, Alexoteric Plants, Secondary Metabolites, Phytochemical Screening.

CAPÍTULO 1

EL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.1.Introducción

Las plantas son una alternativa actual para buscar nuevos agentes terapéuticos. De hecho, han sido utilizadas desde tiempos remotos con fines curativos, siendo que uno de los anhelos de los seres humanos ha sido siempre intentar combatir enfermedades a través de recursos naturales, lo cual llevó al desarrollo del conocimiento ancestral en forma oral o escrita y de generación en generación a lo largo de la historia, hasta nuestros días. En el Ecuador, especialmente en la región amazónica, existe una gran variedad de serpientes venenosas que afectan a las comunidades de nativos pre-existentes, siendo además estas comunidades las más desprotegidas. Debido a las dificultades geográficas para el traslado de las víctimas hacia los centros de salud aunada al engorroso trabajo de almacenar en los mismos sueros antiofídicos debido a las condiciones específicas de transporte. Una de las especies con mayor reporte de accidentes ofídicos es la perteneciente al género *Bothrops*, esta posee su hábitat en altitudes menores a los 2.500 m.s.n.m, en las zonas tropicales y subtropicales orientales con mayor incidencia en las zonas rurales; es decir, habita en bosques húmedos bajos montañosos, bosques tropicales y lluviosos, lagos y ríos.[1]–[3]

En la actualidad, se utilizan sueros antiofídicos como respuesta rápida para los accidentes ofídicos, los cuales pueden clasificarse en monovalentes o polivalentes de acuerdo a la eficacia contra una o varias especies en un determinado tiempo. Por esta razón, se conoce que un suero antiofídico es un producto de tipo biológico basado en las vacunas desarrolladas por Louis Pasteur con la gran diferencia que no induce inmunidad directa, sino a un animal anfitrión para luego ser transfundido al paciente. Su obtención es mediante la inyección de una pequeña cantidad de veneno blanco en un animal, lo cual generará anticuerpos que atacarán a la molécula activa. Se debe aplicar inmediatamente para neutralizar y detener un daño progresivo ocasionado. Típicamente se conservan en tipo ampollas liofilizadas o en forma líquida en un medio refrigerado. Generalmente los accidentes ofídicos provocan inflamación masiva de la extremidad afectada, ampollas hemorrágicas, necrosis local, mareo, dolor inmediato, ardor, vómito, sudoración, entre otras. En este sentido, el uso de las plantas nativas de

la zona es utilizadas como antiofídico en respuesta a la mordedura de serpiente que tornará como una alternativa atractiva. En este caso, existen estudios etnobotánicos que brindan cierta información seleccionada por diversos grupos étnicos sobre el tratamiento antiofídico utilizando el pedúnculo de *Dracontium* y especies similares. [1]–[4]

Dicho género está constituido por 23 especies, parte de la familia *Araceae* comprendida entre 106 géneros distribuidos en los trópicos húmedos. Ubicada en las zonas de la cordillera de los andes con extensión a México, Paraguay y Nicaragua. Puede llegar a medir 2 metros de altura aproximadamente, posee hojas lobuladas con un peciolo cubierto de anillos con colores opacos-oscuros de similitud a la especie serpentaria *Bothrops*. Conocida en el medio nativo como hierba del jergón, jergón sacha, hurgonpe, magóro o machiguenga, *Urospatha sagittifolia* (Rudge) Schott (Antigua *Dracontium*), entre otros.

Entre las *Dracontium* también contamos con las *Urospatha* que son clasificadas como antiguas *Dracontium*, esta ambigüedad se le atribuye a la misma variabilidad botánica en esta última y a su vez a su gran parecido, sin embargo, algunas pequeñas diferenciaciones la hicieron tomar una nueva identificación en la botánica moderna, mismo así, aun se considera el género *Urospatha* como sinónimo de *Dracontium*.

El uso particular de la población nativa es sobar su cuerpo con la planta antes de entrar a la selva para prevenir la mordedura de serpientes o a su vez untar en el área afectada como ungüento. [5]

Gracias a los conocimientos etnobotánicos, las comunidades nativas latinoamericanas típicamente usan familias de plantas como zingiberáceas validados por estudios previos de su actividad inhibitoria de los efectos del veneno, dentro de esta especie podemos mencionar *Renealmia alpinia* (Rottb.) Maas, *Renealmia aromatica* (Aubl.) Griseb, *Renealmia cernua* (Sw. Ex Roem. & Schult) J.F. Macbr y *Renealmia nicolaioides* Loes. Lo cual, son utilizadas comúnmente las hojas o raíces para ser preparadas en infusiones, machacadas o a su vez el uso del tallo como chupaderas. Además, podemos mencionar que las plantas utilizadas con mayor frecuencia por los nativos en el Ecuador con un alto porcentaje de efectividad comprenden a las especies como *Minthostachys cf. mollis* (Kunth) Griseb, *Pollalesta discolor* (Kunth) Aristeg y

Eleutherine bulbosa también conocidas como Peperina, Pigue y Yahuar Piri Piri respectivamente.[4], [5] Sin embargo, la composición específica de cada una de estas sustancias no está clara y mucho menos de especies psuedo denominadas como *Dracontium*. Aunque una serie de estudios han reportado algunos de los compuestos existentes de cada compuesto, principalmente flavonoides, diterpenos cargados, cumarinas y taninos, aun es una incógnita la composición química de los antes mencionados. [6], [7]

1.2.Justificación

En el Ecuador existe gran variedad de plantas naturales que sirven para el consumo en nuestra dieta alimentaria y también pueden ser usadas como medicina alternativa, lo cual por esta razón se aprovecha sus propiedades tanto físicas como químicas para producir medicamentos naturales. El rescate de los saberes ancestrales medicinales de los pueblos amazónicos ecuatorianos da un aporte en beneficio a los pueblos nativos y la sociedad en general, por lo que se presentan estudios sobre la especie *Dracontium polyphyllum* L. y *Urospatha sagittifolia* (Rudge) Schott (Antigua *Dracontium*) principalmente que ayuda al cuidado y prevención ante una mordedura o picadura de serpientes tipo *Bothrops*. Cabe mencionar que en los pueblos amazónicos del Ecuador existe un porcentaje elevado de accidentes ofídicos, presentando un mayor problema al no existir la producción de sueros teniendo que importar de Costa Rica y Colombia.

En este sentido, el objetivo principal del trabajo es caracterizar los metabolitos secundarios referentes a los compuestos fenólicos, flavonoides, saponinas, quinonas, terpenoides, entre otros presentes en la planta *Urospatha sagittifolia* (Rudge) Schott a través de biblioteca y literatura con la finalidad de verificar la existencia de compuestos que puedan relacionarse con su posible efecto antiveneno, lo cual la capacitaría para su uso como alternativa complementaria para el tratamiento por mordedura de serpiente. Con tal propósito, se realiza la determinación cualitativa de cada compuesto en particular y cuantitativa de cada grupo de metabolitos presentes en la especie mediante marcha Fitoquímica, espectrofotometría UV-VIS y cromatografía líquida de ultra alta resolución acoplada a espectrometría de masas en tándem con tiempo de vuelo (UPLC-QTOFMS).

1.3.Objetivos

1.3.1. General

Caracterizar plantas amazónicas con actividad antiofídica por análisis químico.

1.3.2. Específicos

- Seleccionar un método adecuado para la obtención de los diferentes extractos provenientes de plantas *Urospatha sagittifolia* (Rudge) Schott (*Antigua Dracontium*)
- Caracterizar por análisis químico los compuestos presentes en las plantas amazónicas seleccionadas.
- Evaluar teóricamente los compuestos identificados a fin de relacionar su identidad con su posible actividad antiofídica.
- Determinar las especies vegetales con mayor concentración tentativa de compuestos con actividad antiofídica.

CAPITULO II

ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS

2.1. Envenenamiento antiofídico, problemas y causas del envenenamiento antiofídico

El envenenamiento por serpientes es un problema de salud mundial y una justificación de la morbilidad y diversas pérdidas socioeconómicas. El veneno de serpiente es secretado por las glándulas orales de la serpiente y se inyecta por vía subcutánea o intravenosa a través de los colmillos. Los venenos son solubles en agua, ácidos y tienen un peso específico [8]. La cantidad, la letalidad y la composición de los venenos varían según la edad y la especie de la serpiente, la época del año, la ubicación geográfica y la dieta de la serpiente venenosa. Un veneno de serpiente es una mezcla compleja de proteínas tóxicas como cardiotoxinas, neurotoxinas, metaloproteinasas, nucleotidasas, fosfolipasas, serina proteinasas, nitrato de acetilcolinesterasa, hialuronidasas, fosfomonoesterasa y fosfodiesterasa que se inyectan para inmovilizar a la víctima [9]. Las toxinas causan hemotoxicidad que se describe como un daño a los vasos sanguíneos que resulta en parálisis espontánea sistémica y muscular, miólisis, arritmias, insuficiencia cardíaca y renal [10]. Las manifestaciones clínicas se caracterizan por dolor, edema, equimosis, eritema y necrosis. En casos severos pueden aparecer vesículas o ampollas con contenido seroso y hemorrágico, así como hematemesis y shock hemorrágico. El único tratamiento farmacológicamente válido para los casos de ofidismo es la aplicación de inmunoterapia artificial pasiva, mediante la transferencia de anticuerpos IgG antiveneno, generalmente heterólogos, de origen equino. [11] La serpiente *Bothrops atrox* es conocida como la especie de mayor relevancia médica, responsable del 88% -92% de los casos de ofidismo, provocando morbilidad y dejando secuelas, como amputaciones o laceraciones en las partes afectadas. El daño tisular es causado por varias actividades biológicas de las enzimas del veneno, como los efectos proteolíticos (destrucción de proteínas estructurales), coagulantes, tóxicos vasculares y nefrotóxicos [12].

En la actualidad, la inmunoterapia con suero antiofídico es el pilar del tratamiento informado para el envenenamiento por serpientes. Al mismo tiempo el uso de plantas para abordar los desafíos médicos se ha presenciado desde la antigüedad y está

recuperando forma en la era moderna debido a su seguridad, efectividad, preferencias culturales, bajo costo, abundancia y disponibilidad. Por lo tanto, las plantas pueden ser una alternativa ya que estos pueden atacar efectos secundarios como la hemorragia y edema que no son contornados con los sueros antiofídicos actualmente usados. [13].

2.1.1. Uso y especies frecuentes de plantas con actividad antiofídica.

Los medicamentos herbarios y naturales abarcan las hierbas, material herbario, preparaciones herbarias y productos acabados, que contienen como principios activos partes de plantas u otros materiales vegetales, o combinaciones de esos elementos, su uso está bien establecido y ampliamente reconocido como inocuo y eficaz. El 60 % de los accidentes causados por mordeduras de serpientes son inicialmente tratados por curanderos tradicionales, los cuales utilizan plantas medicinales en diferentes formas según su localización y dificultades geográficas de los lugares vulnerables al accidente.[14], [15]

Además, la producción y distribución de sueros o antivenenos es insuficiente y no existe disponibilidad en el producto en las comunidades y todos los centros de salud encargados. En uno de los estudios más recientes, se indica que existen varias especies con propiedades antiofídicas presentes en la zona amazónica con mayor frecuencia, como *Bixaorellana*, *Ficus nymphaeifolia*, *Struthanthusobicularis*, *Gonzalaguniapanamensis*, *Brownearosademonte*, *Tabebuia rosea*, *Pleopeltispercussa*, *Trichomaneselegans*, *Renalmiaalpinia*, *Heliconia curtispatha*, *Dracontium croatii*, *Dracontium sagittifolius* (Rudge) G.F.W.Meyer, *Urospatha sagittifolia* (Rudge) Schott, *Spathiphyllum sagittifolium* (Rudge) Schott, *Spathiphyllum amazonicum Spruce ex Engl.* y *Citrus limón*) contra la formación de edema, desfibrinación y efecto anticoagulante del veneno de *Bothrops asper*. [16]–[18]

2.1.2. Uso de la Medicina ancestral como suero antiofídico.

La medicina tradicional basada en plantas amazónicas se ha utilizado históricamente para el tratamiento de las picaduras de serpientes. Gracias a este acervo etnobotánico muchos metabolitos secundarios aislados de las plantas han sido ensayados positivamente frente a la acción letal de los venenos, y como resultado de ello un número importante de especies vegetales han demostrado ser efectivos antídotos naturales frente a las serpientes venenosas. Sin embargo, muchos de los remedios

tradicionales de las plantas alexitéricas no han sido ensayados clínicamente, ni se conocen los principios fitoquímicos implicados.[19]–[22]

Los lazos entre la medicina tradicional y la biodiversidad son reforzados por tres procesos[23]:

- Un acercamiento médico que implica esfuerzos nacionales para integrar la medicina tradicional en el sistema institucional de entrega de salud que incluye retos relacionados a seguridad, calidad, eficacia, acceso y regulación.
- Un acercamiento orientado al mercado enfocado en el desarrollo de drogas o la promoción turística de productos y servicios biomédicos como mercancía vendible.
- Un acercamiento enfocado en la comunidad local activado por organizaciones civiles de conservación que utilizan un proceso de movilización de las bases con la ayuda de profesionales de salud, botánicos, conservacionistas y activistas locales.

El suministro de las plantas utilizadas proviene principalmente del mercado local, al proceder el curandero ante una manifestación de mordedura o picadura de serpiente realiza el mismo proceso ancestral e implementa especies con actividad antiofídica conocida por la comunidad, ellos preparan ungüentos, aceites, infusiones o pliegos con hojas, raíces o tallos para su uso directo en la contusión provocada. [1], [24], [25]

2.2. Araceae familia de estudio, *Urospatha sagittifolia* (Rudge) Schott (Antigua *Dracontium*), *Dracontium spruceanum* (Schott) y *Philodendron megalophyllum* (Schott).

2.2.1 *Urospatha sagittifolia* (Rudge) Schott (Antigua *Dracontium*) y *Dracontium spruceanum* (Schott).

Se encontró que las especies de plantas *Urospatha sagittifolia* (Rudge) Schott (Antigua *Dracontium*) y *Dracontium polyphyllum* L. poseen diferentes compuestos de hierbas (ácidos, alcaloides, esteroides, enzimas, péptidos, pigmentos, glicoproteínas y glicósidos, fenoles, pterocarpanos, taninos, terpenoides, quinonoides xantenos y otros compuestos) que son eficaces contra envenenamiento de serpientes neutralizando

diferentes enzimas y toxinas (enzimas procoagulantes, hemorragias, citolíticas o toxinas necróticas, fosfolipasas, hidrolasas, fosfatizantes, proteasas, esterases, acetilcolina esterasa, transaminasa, hialuronidasa, fosfodiesterasa, nucleotidasas y nucleosidasas) en venenos [26]. Debido a instalaciones sanitarias inadecuadas, especialmente en las zonas rurales, la población rural depende en gran medida de un tratamiento alternativo brindado por curanderos tradicionales que tienen conocimientos basados en su cultura, prácticas étnicas y antidotos a base de hierbas. El reino vegetal proporciona una inagotable fuente de varios compuestos a base de hierbas con efectos farmacológicos con potencial actividad antifúngica[27].

De tal manera que las especies *Urospatha sagittifolia* (Rudge) Schott (Antigua *Dracontium*) y *Dracontium polyphyllum* L. pertenecen al género de plantas con flores de la familia *Araceae*. Siendo estas originarias de América tropical central y meridional. Existen en pantanos, sabanas húmedas y aguas salobres. Las hojas de este género miran hacia arriba y tienen forma de flecha [28]. La inflorescencia es muy singular, los cogollos son moteados y alargados, y los extremos son espirales. Las semillas se distribuyen por el agua y tienen una textura parecida al corcho que les permite flotar. También pueden brotar rápidamente en el agua [29].

El nombre angiospermo se basa en las palabras griegas esperma (semilla) y angeion (recipiente o cápsula). En el lenguaje cotidiano hablamos de plantas con flores [30]. Se caracterizan por su modo de reproducción donde los huevos están contenidos en los ovarios y, tras una doble fecundación por el polen masculino, forman frutos y luego semillas. Las partes estériles de la flor, los pétalos y los sépalos, son extremadamente diversas y han adquirido muchas formas y colores durante la evolución[31].

Tabla 1. Taxonomía de la especie *Urospatha sagittifolia* (Rudge) Schott (Antigua *Dracontium*).

<i>Urospatha sagittifolia</i> (Rudge) Schott (Antigua <i>Dracontium</i>)	
Reino:	Plantae
División:	Magnoliophyta
Clase:	Liliopsida
Orden:	Alismatales
Familia:	<i>Araceae</i>
Subfamilia:	Lasioideae
Género:	<i>Urospatha</i>
Especie:	<i>Urospatha sagittifolia</i>
Sigla sp.	(Rudge) Schott

Elaborado por: Autor [32]–[35]

Tabla 2. Taxonomía de la especie *Dracontium spruceanum* (Schott).

<i>Dracontium spruceanum</i> (Schott)	
Reino:	Plantae
División:	Magnoliophyta
Clase:	Liliopsida
Orden:	Alismatales
Familia:	<i>Araceae</i>
Subfamilia:	Lasioideae
Género:	<i>Dracontium</i>
Especie:	<i>Dracontium spruceanum</i>
Sigla sp.	(Schott)

Elaborado por: Autor [7], [36]–[38], [38]

2.2.2 *Philodendron megalophyllum* (Schott).

Philodendron megalophyllum (Schott) mal conocida como *Philodendron speciosum* y a su vez como Filodendro de Chocolate en las comunidades amazónicas, es una especie tipo arbusto perenne del género *Philodendron* perteneciente a la familia de las *aráceas* con una altura de 3 metros que crece en un ambiente de pleno sol y media sombra en climas Subtropicales, tropical de altitud y tropical Húmedo en la zona de Sudamérica,

su propagación es por medio de división de mata y semillas. Posee hojas tipo masivas de contextura gruesa que desarrollan bordes ondulados y crecen a partir de un tronco erguido similar a una palma, con raíces de apoyo basales.[39]–[42] Algunas tribus indígenas del Brasil usaban hojas triturada de dicha especie para anestesiarse a los peces y atraparlos flotando en el agua, la savia posee una gran cantidad de toxicidad debido al género al que pertenece.[39], [43]

En la región occidental se utiliza dicha especie con gran amplitud en el tratamiento causado por envenenamiento de serpientes, su uso tradicional generalmente es mediante la decocción o infusión y administración por vía oral poco después que ocurra la picadura. Estudios indican la eficiencia para bloquear la actividad del veneno *Bothrops sp.*, la eficiencia del tallo de esta especie ha sido demostrada mediante el bloqueo hemorrágico coagulante, fosfolipasas y edemas entre otros. Además, podemos destacar que existe la presencia de metabolitos secundarios como cumarinas, ácidos grasos, taninos hidrolizables, flavonoides y gran cantidad de compuestos fenólicos, así como su actividad antimicrobiana y antioxidante.[44]–[50]

Tabla 3. Taxonomía de la especie *Philodendron megalophyllum* (Schott).

<i>Philodendron megalophyllum</i> (Schott)	
Reino:	Plantae
División:	Magnoliophyta
Clase:	Liliopsida
Orden:	Alismatales
Familia:	<i>Araceae</i>
Subfamilia:	Aroideae
Género:	<i>Philodendron</i> Schott
Especie:	<i>Philodendron deflexum</i> Poepp. Ex Schott
Sigla sp.	(Schott)

Elaborado por: Autor [41]–[43], [51]–[54]

2.3. Métodos de Análisis y Caracterización Química.

Para determinar la composición química de plantas medicinales y conocimiento de sus componentes existen diferentes técnicas de análisis como el tradicional tamizaje fitoquímico, cromatografía de gases, cromatografía de capa delgada, cromatografía de líquidos de alta resolución, espectrofotometría de masas, infrarrojo, resonancia magnética nuclear, entre otras. [55] Para el presente trabajo, utilizaremos métodos cualitativos y cuantitativos, así como el tamizaje fitoquímico basado en la extracción del material vegetal mediante solventes orgánicos de diferentes polaridades y aplicando pruebas de coloración. [56]

El tratamiento de la muestra para el debido análisis fitoquímico es de extrema importancia debido a que ayudará a la gran validez de los resultados y la correcta identificación botánica del material. Adicionalmente, durante su ejecución es importante separar los componentes según su grado de polaridad lo cual facilita la identificación de los mismos por su capacidad para formar uniones de tipo puente hidrógeno y la solubilidad del soluto en un solvente dado. [57], [58] En este sentido, los pasos previos más comunes al tamizaje fitoquímico se presenta a continuación:

2.3.1 Extracción sólido líquido.

La extracción es un paso crucial en la mayoría de los análisis químicos. Implica retirar el analito de su matriz de muestra y pasarlo a la fase requerida para la identificación y cuantificación espectroscópica o cromatográfica. Cuando la muestra es sólida y la fase requerida para el análisis es líquida, el proceso se denomina extracción sólido-líquido. Una forma simple y ampliamente aplicable de extracción sólido-líquido implica combinar el sólido con un disolvente en el que el analito es soluble [59]. El principio para la extracción es que los compuestos solubles de una materia sólida, que existen de una matriz inerte y el agente activo, sean extraídos por un solvente. El extracto se puede incluir en la materia de extracción en forma sólida o líquida. También puede incluirse en células como aceite en semillas oleaginosas o como dispersión fina sobre la materia sólida como la cafeína en el café. Otro método es mediante agitación, en la cual el analito se divide en la fase líquida, que luego puede separarse del sólido mediante filtración. La elección del disolvente debe basarse en la solubilidad del analito objetivo y en el equilibrio de costes, seguridad y preocupaciones

medioambientales[60]. Los factores que pueden influir en la calidad del extracto formado incluyen la selección de las plantas que se utilizan, el procedimiento para realizar las extracciones y la selección de los disolventes utilizados. Las plantas utilizadas para hacer extracciones pueden ser frescas o secas, pero se debe considerar que el proceso de secado puede afectar el contenido de los ingredientes activos en su interior. Las técnicas de secado a menudo se realizan de forma tradicional o mediante el uso de secadores abiertos. La selección de disolventes en la extracción debe tener las siguientes propiedades: la baja toxicidad, se evapora fácilmente a bajas temperaturas, aumenta la velocidad de las extracciones, puede ser conservante, no hará que la extracción sea compleja o dividida. La elección de los disolventes al crear la extracción afectará a la sustancia activa que se disolverá[61].

2.3.2 Separación de fracciones previas a la realización de pruebas fitoquímicas.

La separación de componentes se realiza según el grado de polaridad de los mismos, siendo los extractos más comunes los realizados en agua, metanol, cloroformo y hexano, esto con el intuito de garantizar la extracción e identificación de grupos funcionales con una gran diversidad química estructural.

2.4 Caracterización Físico-química.

2.4.1 Tamizaje Fitoquímico.

Esta técnica también se conoce como cribado Fitoquímico. En este método, los extractos acuosos y orgánicos se preparan a partir de aquellas muestras de plantas que son reservorios de metabolitos secundarios, como hojas, tallos, raíces o corteza. Luego, los extractos de plantas se analizan para detectar la presencia de metabolitos secundarios como alcaloides, terpenos y flavonoides[62], claramente cada ensayo depende directamente del grupo funcional que se desea detectar en las diversas muestras problemas. Siendo así a continuación, se detallan los ensayos fitoquímicos más comúnmente realizados en el análisis de plantas con posible actividad antivenómica.[63], [64]

2.4.1.1 Compuestos Fenólicos.

El grupo fenol proviene de una gran variedad de productos secundarios que sintetizan las plantas, estas sustancias son conocidas como compuestos fenólicos, fenilpropanoides o polifenoles. Son caracterizados por la presencia de un grupo hidroxilo de reacción ácida en su anillo aromático, lo cual comprenden desde los más sencillos como ácidos fenólicos hasta los más complejos polimerizados, como los taninos y la lignina. Este tipo de compuestos se sintetizan a partir del Ácido Shiquimico y Ácido Malónico, además presentan propiedades antisépticas, antiinflamatorias, plaguicidas, antialérgicos, antibacterianos y antifúngicos. Sus principales funciones son actuar como metabolitos esenciales para el crecimiento y reproducción de las plantas, y como agentes protectores frente a la acción de patógenos por su capacidad como antioxidante natural [65],[66],[67].

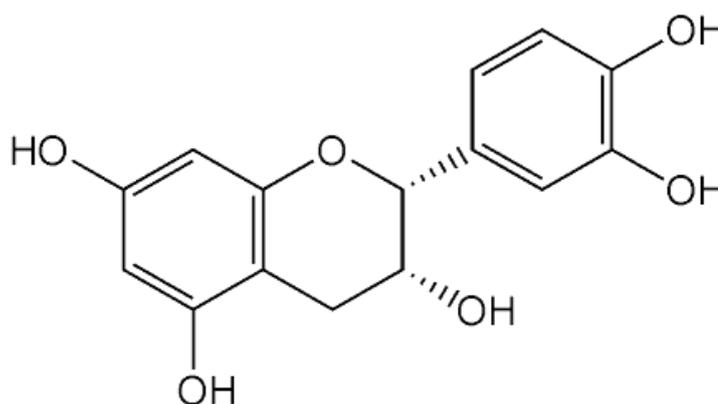


Figura 1. Estructura típica de los compuestos Fenólicos

Para su determinación, se utiliza la prueba de fenoles totales, en la cual el método más común a emplearse es el de Folin-Ciocalteu, en este los polifenoles de las extracciones de plantas reaccionarán con el reactivo propiamente dicho, y forman un complejo azul que puede medirse cuantitativamente mediante espectrofotometría UV-vis [68]. Las reacciones que ocurren son precisas y específicas para algunos compuestos fenólicos. La concentración total de fenoles se calcula en base a la curva de calibración obtenida usando varias concentraciones de ácido gálico y se puede ver a partir del número de mg en equivalentes de ácido gálico (GAE) por gramo de muestra seca[69].

2.4.2.2 Cumarinas.

Las cumarinas son una familia de benzopironas (1,2-benzopironas o 2H-1-benzopiran-2-onas) ampliamente distribuidas en la naturaleza. Representan una familia importante de heterociclos que contienen oxígeno sintético y / o de origen natural, que llevan una estructura típica de benzopirona. Además, son una clase de lactonas construidas estructuralmente por un anillo de benceno fusionado con uno de α -pirona, y esencialmente poseen un sistema conjugado con electrones ricos y buenas propiedades de transporte de carga[70]. La simplicidad y versatilidad del andamio lo convierten en un punto de partida interesante para una amplia gama de aplicaciones[71]. Perfumes y cosméticos que usualmente están compuestos por cumarinas, sin embargo, su papel más relevante se describe en productos naturales, química orgánica y química médica.

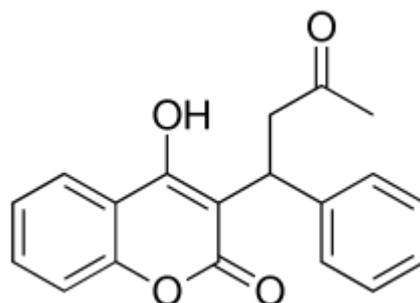


Figura 2. Estructura química de Cumarina

La extracción, síntesis y evaluación se han convertido en un tema extremadamente atractivo y de rápido desarrollo ya que se están estudiando activamente muchos compuestos cumarínicos como candidatos medicinales para fármacos con fuerte actividad antivenómica, farmacológica, baja toxicidad, efectos secundarios, menor resistencia a los fármacos, alta biodisponibilidad, amplio espectro, mejores efectos curativos, entre otros.[72] Se han realizado varios esfuerzos principalmente en el desarrollo de anticoagulantes, antioxidantes, antimicrobianos (antivirales, antifúngicos y antiparasitarios), anticancerígenos, antidiabéticos, analgésicos, agentes anti-neurodegenerativos y antiinflamatorios [73],[74].

Generalmente se encuentran en estado libre en las plantas, ya que son estructuras polares y muchas de ellas pueden sublimarse. También pueden encontrarse en forma de glucósidos, incluidas las estructuras relacionadas con el núcleo de psoraleno [74]. Se caracterizan por la absorción de la luz ultravioleta, lo que da como resultado una

fluorescencia azul muy característica; también son muy fotosensibles, ya que pueden verse alterados por la luz natural [71]. Existen varios métodos para la extracción, generalmente se puede realizar sobre material seco o fresco, con disolventes de diferentes polaridades, según el tipo de estructura. Algunas son escasamente solubles en disolventes apolares[75].

La purificación y separación de las cumarinas contenidas en varios extractos podría realizarse utilizando columnas cromatográficas, utilizando como vehículo óxido de aluminio y como disolvente la serie eluotrópica: benceno-hexano (1: 2,5); benceno; cloroformo; cloroformo-acetona, en proporciones de un gradiente lineal a acetona pura. Para el reconocimiento de las estructuras descritas se describieron algunos ensayos, como aquellos que reconocen las sustituciones fenólicas donde se usa el reactivo de Emerson, revelando color[73].

Se puede observar la presencia de grupos lactona que conducen a cambios de pH en el medio cuando se disuelven en etanol, las soluciones cambian de color cuando se acidifican (el color amarillo desaparece). El anillo de furano se puede reconocer mediante la prueba de Erlich. El extracto se trata con una solución de p-dimetilaminobenzaldehído (etanol al 5%) y luego se acidifica burbujeando ácido clorhídrico gaseoso. El color naranja indica una prueba positiva[75]. También se utiliza la prueba de fluorescencia en la cual la boca de los tubos de ensayo conteniendo las soluciones de cada uno de los extractos se cubren con papel filtro previamente tratado con una solución 1 N de Hidróxido de Sodio,[76] además se coloca los tubos de ensayo durante unos minutos en agua hirviendo y posterior se retirará el papel filtro y examinará bajo la luz ultravioleta en la cual la aparición de fluorescencia indicará la presencia de cumarinas.[77]

Otros métodos de extracción utilizados son: microondas, sonicación y extracción con fluido supercrítico, estas pruebas también proponen la electroforesis capilar para el aislamiento de productos naturales. Por tanto, en el aislamiento y análisis se han utilizado diversos métodos: cromatografía (cromatografía en papel, cromatografía en capa fina, cromatografía de gases y cromatografía líquida de alta resolución), titrimétrica y espectrofotométrica (colorimétrica y polarográfica)[73].

2.4.2.3 Saponinas.

Las saponinas son glucósidos de almidón con complejos componentes de azúcar unidos a 3 grupos hidroxilo. Es un compuesto amorfo blanco o marrón claro que se presenta como polvo con un sabor dulce, que luego tiene un sabor amargo e incluso sabor a quemado ácido. Son llamadas así porque, al igual que el jabón, tienen propiedades espumosas que cuando se mezclan con agua, derivan su nombre de la palabra latina "sapo", que significa jabón[78],[79]. Por ende, son esteroide y todas causan el sabor amargo característico en la materia vegetal. Son consideradas parte del mecanismo de defensa de la planta, sin embargo, la función en la célula vegetal no se ha estudiado exhaustivamente y comprendido. Su papel fue identificado como un compuesto inmerso en la permeabilidad de la membrana, que da como resultado una fuga de células y un efecto citotóxico y antibacteriano[80].

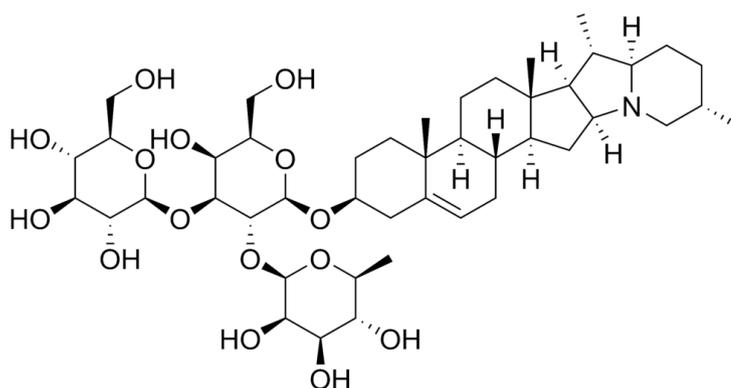


Figura 3. Estructura química de la saponina

Las saponinas son glucósidos anfifílicos compuestos de agliconas hidrófobas unidas a un número variable de cadenas de azúcar hidrófilas. Tienen una conexión con una serie de compuestos que da lugar a sus amplias clasificaciones[78]. La clasificación puede ser difícil de determinar debido a la amplia gama de polaridades causadas por el tipo de aglicona y el número de cadenas de sacáridos, sin embargo, esta complejidad se simplifica caracterizándolos en función del número de cadenas de azúcar[81].

Los compuestos que se encuentran en la materia vegetal tienen efectos significativos sobre el uso de las plantas. Los terpenoides conllevan muchas similitudes con las saponinas, ya que comparten un precursor biológico y se pueden convertir en ellas por

glicosilación, es decir, glicósidos de triterpeno. El aislamiento y caracterización de compuestos bioactivos puede ser logrado mediante diferentes métodos y su extracción de las plantas se considera como uno de los enfoques más sostenibles. Los métodos convencionales utilizados para la extracción incluyen infusión, digestión, maceración, reflujo y extracciones Soxhlet[82]. Sin embargo, estos métodos tienen varias desventajas, por ejemplo, la maceración requiere largos períodos de tiempo de extracción lo que requiere una agitación continua de la solución, así como grandes cantidades de disolvente.

Los métodos modernos incluyen sistemas de extracción por solvente mejorados y acelerados, también conocidos como extracción de líquido presurizado, implica el uso de alta presión y temperatura por lo que las temperaturas elevadas aumentan la difusión de un mínimo de disolvente[83]. La ventaja de utilizar esta técnica es la eficiencia de la velocidad en la extracción del componente. Esta extracción, por lo tanto, se utiliza ampliamente en la investigación farmacéutica y alimentaria. Otro método más rápido y ambientalmente amigable son los que incluyen la extracción asistida por ultrasonido y extracción asistida por microondas. La espectrofotometría se puede utilizar para cuantificar este grupo. Los métodos espectrofotométricos comúnmente usan el ensayo de vainillina-ácido sulfúrico para determinar el total contenido de saponina[78]. La vainillina reacciona con saponinas y ácidos biliares de esteroides que tienen un OH grupo en la posición C-3, en un medio ácido. Esto da cromógenos que son independientes de la naturaleza de las fracciones de azúcar. Estos cromógenos pueden analizarse usando una absorbancia de 455 a 460, 460 a 480 o 544 nm, estos valores de absorbancia son dependientes de la naturaleza de las saponinas[82].

Se pueden reconocer fácilmente por análisis fitoquímicos preliminares como es mediante los ensayos de la espuma, Liebermann – Burchard y ensayos por carbohidratos[84]. Para realizar la prueba de espuma es importante mantener una agitación constante a una solución acuosa de la muestra, se formará una espuma estable como la obtenida al agitar una solución acuosa con jabón lo cual dará como positivo a la presencia de saponinas esteroides[85]. De tal forma que para comprobar el ensayo anterior podemos utilizar la propuesta de Liebermann – Burchard en la cual a la porción esteroide que posee las saponinas dará positivo al tener grupos dienos conjugados reales o potenciales. Para realizar dicho ensayo se debe añadir ácido acético y anhídrido acético contenido ácido sulfúrico en una proporción 50:1, si

presenta una coloración rosada purpura existe la aparición de saponinas triterpenoidales y si el color es azul verdoso existirían saponinas esteroidales. [86]

También podemos identificarlas mediante el reactivo de Salkowski, en la cual se utilizará ácido sulfúrico concentrado y anhídrido acético para obtener coloraciones que van del amarillo al rojo azulado o a la púrpura obteniendo las saponinas indicadas respectivamente. [87], [88]

2.4.2.4. Flavonoides.

Una amplia variedad de metabolitos secundarios, como los flavonoides y las flavonas, son conocidos por sus propiedades antioxidantes y depuradoras anti radicales. La mayoría de los compuestos fenólicos y flavonoides incluyen polifenoles como tocoferoles, flavonoides, derivados del ácido cinámico y otros ácidos orgánicos[89]. Recientemente, estos polifenoles están ganando interés como antioxidantes con potencial para reducir la lesión tisular inducida por radicales libres. Los fenólicos y flavonoides son los compuestos fenólicos activos aislados de plantas superiores. Estos polifenoles muestran una amplia gama de actividades biológicas como propiedades antivenómicas, antiinflamatorias, antioxidantes, anticancerígenas y antimicrobianas, etc.[90].

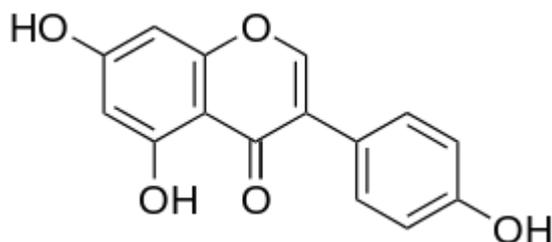


Figura 4. Estructura química flavonoide.

Al hablar de flavonoides se debe entender que son moléculas polifenólicas con propiedades que incluyen captación de radicales libres, inhibición de enzimas hidrolíticas y oxidativas, acción antiinflamatoria, reducción de lípidos y glucosa en sangre y mejora de la inmunidad humana. Los metabolitos antiinflamatorios de las plantas son actualmente el foco de una intensa investigación en el desarrollo de nuevas estrategias preventivas y terapéuticas. Por consiguiente, los métodos para extraer estos compuestos del material de origen son un foco principal de investigación. Los métodos actuales de aislamiento y purificación química utilizados incluyen procesos de

extracción por solvente que utilizan la polaridad del solvente como una técnica de separación principal. Estos métodos incluyen frecuentemente el uso de acetato de etilo, fenol / cloroformo, acuoso y otros enfoques[91].

Para determinar su presencia se puede utilizar reacciones como la de Shinoda, FeCl_3 y NaOH . [92], [93] Para la cual se utilizará limadura de magnesio y HCl concentrado, si se observa un burbujeo intenso por la reacción y la solución adquiere una débil coloración naranja al principio indicará la presencia de flavonoides.[94], [95] Para comprobar con las reacciones de FeCl_3 y NaOH se añadirá directamente gotas de la solución al 4% y 2 % respectivamente la cual puede desarrollar coloraciones como[96]: verde indico, verde negruzco o amarillo intenso que indicará la presencia de flavonoides y negro azulado la presencia de compuestos fenólicos comparativamente. [97], [98]

2.4.2.5 Alcaloides.

Los alcaloides son un gran grupo de compuestos orgánicos naturales que contienen átomos de nitrógeno o grupos amino en sus estructuras. Estos átomos de nitrógeno provocan la alcalinidad de estos compuestos y suelen estar situados en algún sistema de anillo (cíclico). Generalmente se pueden dividir en clases como indoles, quinolinas, isoquinolinas, pirrolidinas, piridinas, pirrolizidinas, tropanos y terpenoides y esteroides[99]. Otro sistema de clasificación está relacionado con la familia de especies de plantas en las que se encuentran. Estos dos sistemas de clasificación diferentes causan confusión entre su distribución biológica y los tipos químicos de alcaloides, porque no existe una correlación inconfundible[100].

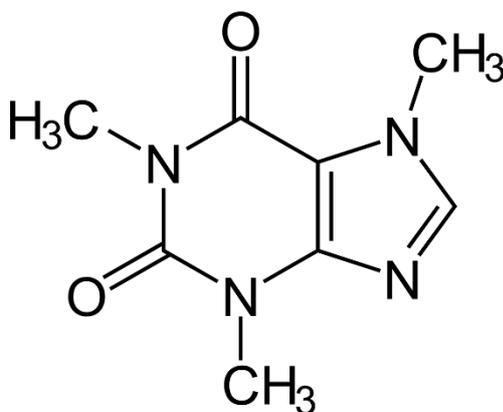


Figura 5. Estructura química alcaloide.

Su nombre proviene originalmente de "álcalis", pueden reaccionar con ácidos y luego formar sales, al igual que los álcalis inorgánicos. Estos átomos de nitrógeno pueden comportarse como una base en reacciones ácido-base. En forma pura suelen ser sólidos cristalinos incoloros e inodoros, pero a veces pueden ser líquidos amarillentos. Muy a menudo, tienen un sabor amargo y ahora se conocen más de 3000 en más de 4000 especies de plantas con su contenido [101].

Estos compuestos son producidos generalmente por muchas especies florales y algunos animales. Las plantas producen y almacenan muchos compuestos orgánicos como aminoácidos, proteínas, carbohidratos, grasas y alcaloides, que generalmente se tratan como metabolitos secundarios. Se almacenan en cada parte de la planta (hojas, tallo, raíz y frutos de las plantas) pero en diferentes cantidades. Se pensaba que son un producto de desecho de las plantas, pero ahora la evidencia sugiere que desempeñan una actividad y función biológica debido a su acción estimulante, defensa natural contra hongos y animales [99].

Tienen diversos efectos fisiológicos: actividad antibacteriana, antimitótica, antiinflamatoria, analgésica, anticancerígena, anestésica local, hipnótica, psicotrópica, antitumoral, antimicrobianas, antifúngicas y muchas otras[100]. Hoy en día, los alcaloides de origen vegetal y animal siguen siendo de gran interés para los químicos orgánicos, biólogos, bioquímicos, farmacólogos y farmacéuticos. Los compuestos bien conocidos incluyen morfina, estricnina, quinina, atropina, cafeína, efedrina y nicotina[99],[100]. Son útiles como ingredientes dietéticos, suplementos y productos farmacéuticos, en medicina y en otras aplicaciones en la vida humana. También son compuestos importantes en la síntesis orgánica para la búsqueda de nuevos compuestos semisintéticos y sintéticos con posiblemente una mejor actividad biológica que los compuestos originales[101].

Algunos tienen propiedades alexitéricas como el ácido aristolóquico, el schumaniofósido y la atropina lo cual tienen actividad antiinflamatoria e inhibe la actividad lítica del veneno y reduce los edemas causados por las fosfolipasas.[102] Por esta razón, este grupo al ser de carácter alcalino pueden formar sales con ácidos diluidos lo cual serán solubles en medio acuoso ácido, pero al reaccionar con sales de metales pesados tienden a insolubilizarse formando precipitados[77], [103]. De este modo, los ensayos químicos más usados para el reconocimiento incluyen varios

ensayos de precipitación con reactivos como: Dragendorff, Mayer, Valser, Reineckato de amonio y Wagner [104]. Ya que a través de estos ensayos podemos identificar compuestos con interés terapéutico como relajante muscular y tranquilizante lo cual actuara como depresores o excitadores frente a una picadura de serpiente.[105]

2.4.2.6 Terpenoides.

Los terpenoides son el grupo más grande de metabolitos secundarios especializados en plantas, son compuestos orgánicos aromáticos y volátiles que están constituidos por subgrupos de acuerdo con el número de unidades de cinco carbonos en sus esqueletos; es decir, hemi- (C₅), mono- (C₁₀) sesqui- (C₁₅), di- (C₂₀), sester- (C₂₅), tri- (C₃₀) y tetra- (C₄₀: carotenoides) terpenoides[106]. Sus estructuras básicas de la columna vertebral son sintetizadas por la enzima terpeno sintasa, después de lo cual se modifican aún más mediante [107]. [108] por ejemplo, hidroxilación, deshidrogenación, acilación o glicosilación, lo que da como resultado una variedad de compuestos químicamente diversos [109].

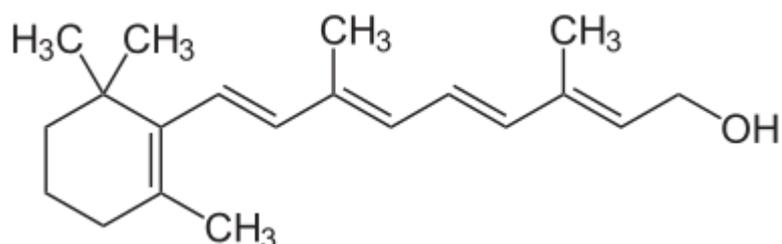


Figura 6. Estructura química terpeno.

Las unidades de isopreno también se utilizan como residuos de prenilo para la modificación de grupos metabólicos como los polifenoles. Estas reacciones de prenilación aumentan la diversidad química de los compuestos fenólicos, y estos compuestos prenilados tienen diversas actividades biológicas. Sin embargo, estos compuestos no se clasifican como terpenoides típicos debido a sus estructuras químicas equívocas, a pesar de ser productos finales del metabolismo isoprenoide[110].

Las funciones principales en las plantas son: la protección a elevadas temperaturas y frente a los insectos o depredadores herbívoros [111]. De este modo para la

determinación de terpenos dentro del tamizaje fitoquímico se utiliza la reacción de Salkowski donde el color rojo se debe a la formación de ácido bi-sulfónico de bi-colestadieno. En esta reacción, el ácido sulfúrico concentrado elimina dos moléculas de agua de dos moléculas de colesterol y se forma bicolestadieno. El ácido sulfúrico se sulfoniza debido a la formación de ácido bisulfónico de bi-colestadieno de color rojo se produce, si hay colesterol presente y esto se extrapola a la presencia de terpenos[112].

2.4.2.7 Taninos.

Los taninos son compuestos fenólicos de alto peso molecular que se encuentran comúnmente en plantas con pesos moleculares que van desde 500 a más de 3000 Da y hasta 20.000 Da. La estructura química es muy diversa y variada. Se han detectado más de 8000 taninos diferentes[113]. Se han encontrado en formas libres y unidas en células vegetales. Se clasifican en hidrolizables y condensados, también se pueden dividir en cuatro grupos principales: galotaninos, elagitaninos, proantocianidinas (taninos condensados) y taninos complejos. En las plantas marinas se han descrito como "florotaninos", incluidos los oligómeros o polímeros de floroglucinol. El contenido puede variar de 0,2 a 25% en peso, dependiendo de la especie de planta, el tiempo de cosecha, el hábitat de las plantas y el método de extracción[114].

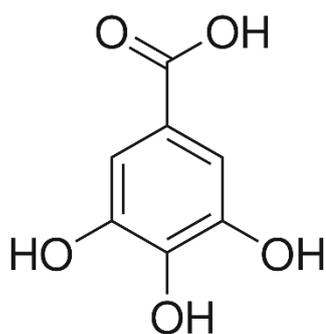


Figura 7. Estructura química tanino.

Se han demostrado diversas bioactividades como antioxidantes, antimicrobianos, antiparasitarios, antibacterianos, antifúngicos, antitumorales, antiinflamatorios, antivirales entre otros.[115] El número de radicales hidroxilo y anillos aromáticos es un parámetro importante para determinar la bioactividad de los mismos. Los grupos orto-dihidroxilo de tanino son una característica importante de los iones metálicos

quelatos[116]. El alto grado de polimerización y el peso molecular juegan un papel importante en la actividad antioxidante[117].

La maceración es una de las técnicas utilizadas para la extracción en plantas medicinales, es la técnica de extracción más simple donde se coloca la muestra en polvo en un recipiente cerrado y se empapa con la cantidad correspondiente de solvente durante un período de tiempo específico hasta que los metabolitos se disuelven en la solución. El rendimiento de la extracción de taninos depende de muchos factores, por ejemplo, el tipo de solvente (índice de polaridad del solvente de Snyder, pKa, pKb), especies de plantas, temperatura y tiempo durante el proceso de extracción y presión en el recipiente[113].

Es posible comprobar la presencia de taninos mediante la reacción de FeCl_3 la cual genera una coloración verde para gelotaninos y café para pseudotaninos.[118] También podemos destacar que al presentar una coloración azul serán taninos hidrolizables, y una coloración verde son no hidrolizables.[119] Otra forma de comprobar la presencia es utilizando la prueba de Stiasny, Gelatina salada o HCl concentrado en la cual presentarán un precipitado blanco en forma de flóculos o copos de color rojizo.[120], [121]

2.4.2.8 Antocianinas.

Forman parte de los compuestos fenólicos que pertenecen a la familia de los flavonoides, son pigmentos naturales que en su mayoría son derivados hidroxilo de sales de flavilio o glucósidos de metoxi. Varían en formas basadas en la unión de ácidos y grupos hidroxilo a los restos de azúcar dentro de su estructura. Las antocianinas que se encuentran en las plantas incluyen: cianidina, delphinidina, pelargonidina, malvidina, peonidina y petunidina.[122] Tienen una estructura iónica y, por tanto, se comportan como indicadores ácido-base revelando coloraciones rojas, violetas y moradas a pH ácido; mientras que a pH alcalino presentan coloraciones azules y verdes [123]. Los valores de pH más bajos proporcionan una mayor estabilidad a las antocianinas. Los cationes de flavilio aumentan la solubilidad de los pigmentos coloreados en agua a pH bajo[124].

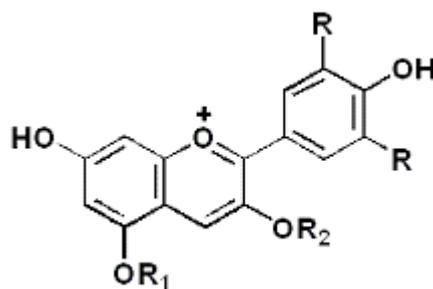


Figura 8. Estructura química antocianina

Varios factores, como el pH, los iones metálicos, la formación de complejos, la luz, la temperatura, las enzimas, los azúcares, el oxígeno y el ácido ascórbico, influyen en la estabilidad de las antocianinas[122]. Este grupo posee diferentes funciones en la planta como la atracción de polinizadores, la protección contra los efectos de la radiación ultravioleta y contra la contaminación viral y microbiana, desempeñando así un papel muy importante al reducir enfermedades coronarias, cancerígenas, antitumorales, antidiabéticos, efectos antiinflamatorios y comportamientos cognitivos [125]. Los efectos terapéuticos de las antocianinas están relacionados con su actividad antioxidante y son efectivas en atrapar especies reactivas del oxígeno, además de inhibir la oxidación de lipoproteínas y la agregación de plaquetas [124].

Es posible utilizar varias estrategias para la caracterización de muestras fenólicas en materiales vegetales. En cualquier caso, las técnicas de extracción y los métodos de aislamiento semi preparativo se suelen aplicar antes de las etapas de separación y cuantificación[126]. Después de las primeras operaciones de secado y de pulverización, se sigue un paso previo de extracción así como un paso preliminar de purificación consecuente; el fraccionamiento de la mezcla para aislar los pigmentos puros y la caracterización final e identificación de los compuestos puros de antocianinas[122][124].

Al igual que los flavonoides, en general, las antocianinas poseen anillos aromáticos que contienen grupos sustituyentes polares y residuos de glucosilo, que en conjunto constituyen una molécula polar. Son de naturaleza más polar, mientras que las agliconas se extraen con alcoholes o con mezclas de alcohol y agua.[127]b Los

disolventes acidificados en frío (disolventes orgánicos polares, agua) en condiciones suaves son utilizados para la extracción de este grupo de metabolito secundario [128]. El disolvente orgánico que se utiliza habitualmente es el metanol. Sin embargo, se pueden utilizar disolventes como acetona, etanol o acetonitrilo[129]. Este sistema de disolventes desnaturaliza las membranas celulares disolviendo y estabilizando también las antocianinas [130][125].

Para identificarlas es posible usar gotas de amoníaco directamente en el extracto, lo cual si la prueba es positiva comenzará a aparecer una decoloración rápida de violeta a amarillo indicando la presencia de compuestos antocianinicos[131]. También podemos obtener mediante la prueba para flavonoides ya que las antocianinas forman parte de ellos.[132]

2.4.2.9 Quinonas.

Las quinonas son metabolitos secundarios aislados principalmente de plantas y tienen un sistema aromático (saturado hexacíclico) de di-ona o dicetona. Generalmente se derivan de la oxidación de hidroquinonas. Son naturales y se distribuyen ampliamente e incluyen benzoquinonas, naftoquinonas, antraquinonas y poliquinonas[133].

- Benzoquinonas: estos son grupos de compuestos que contienen dos grupos carbonilo en un sistema de anillo aromático hexacíclico saturado (anillo de benceno), generalmente en posiciones orto o para (monocíclico)[134].
- Naftoquinonas: se encuentran en cierta medida en los hongos y son extremadamente comunes en las plantas superiores; contienen el núcleo de naftaleno con dos grupos carbonilo en un núcleo, generalmente en la posición orto o para (bicíclica)[135].
- Antraquinonas: son metabolitos fúngicos comunes y también se encuentran en plantas superiores. Son compuestos que contienen el núcleo de antraceno con dos grupos carbonilo, generalmente en el anillo B en posiciones para (tricíclico)[136].
- Poliquinonas: son dímeros de los diferentes tipos de quinonas. Algunas poliquinonas son de origen mixto. El acoplamiento oxidativo intermolecular o intramolecular puede ocurrir con la formación de enlaces carbono-carbono o carbono-oxígeno[135].

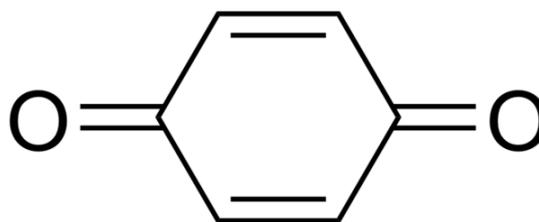


Figura 9. Estructura química quinona.

Las quinonas son una importante familia de productos naturales, están distribuidas ampliamente en plantas y en menor proporción en microorganismos, equinodermos e insectos. Tienen una variedad de efectos biológicos, como actividades antivirales, anticancerígenas, antitumorales, fungicidas, agentes antimaláricos y antimicrobianas, entre otros [137][138].

Los compuestos quinoideos son una clase de intermediarios toxicológicos que pueden crear una variedad de efectos peligrosos en los organismos. Dado que son prolíficos cicladores redox, se utilizan principalmente para la detección, identificación y análisis de procesos o condiciones químicas, biológicas o patológicas, y a menudo en la producción de hidroquinonas, tintes y fungicidas [139].

Pueden ser identificadas por medio del comportamiento ácido – base agregando zinc en polvo y HCl concentrado al extracto crudo con NaOH al 40% dando así una coloración naranja lo que indicará la presencia de las mismas. También podemos identificar con NaOH al 5% y etanol dando un cambio de coloración brusco el cual determinara como positivo para compuestos quinónicos. Por último, la reacción de Borntrager permitirá observar una coloración rosa a roja al utilizar KOH al 5% y acidular con HCl al 20% para la presencia de antraquinonas.

2.5 Técnicas analíticas usadas en el análisis de metabolitos secundarios.

A continuación, detallaremos las técnicas analíticas utilizadas para cuantificar los metabolitos secundarios más distribuidos en el reino vegetal y con mayor actividad antifúngica, siendo estos los Compuestos Fenólicos y Flavonoides [140].

2.5.1 Espectroscopía UV - Visible para Compuestos Fenólicos y Flavonoides.

El uso de luz ultravioleta y visible para la cuantificación de compuestos químicos es una técnica ampliamente utilizada. Debido a sus propiedades bioquímicas y moleculares, los compuestos fenólicos son muy propicios para ser cuantificados por este método. La capacidad del anillo fenólico de absorber la luz ultravioleta es aprovechada para cuantificar estos compuestos. Además de esto, el espectro UV-vis también puede proporcionar información valiosa debido a la naturaleza coloreada de algunos de los compuestos (por ejemplo, Fenoles verdes o flavonoles amarillos). El espectro UV-visible se atribuye así a las transiciones electrónicas que ocurren dentro de los grupos hidroxilo de las moléculas fenólicas, con diferentes transiciones correspondientes a las diferentes subclases. Se han aprovechado varias aplicaciones para cuantificar compuestos fenólicos. Entre estos, el uso de la espectrofotometría UV-visible se destaca como el método más utilizado para estimar el contenido fenólico [141].

Entre las decenas de miles de metabolitos secundarios conocidos hasta la actualidad, se encuentran las sustancias que no absorben la luz ultravioleta en el rango de trabajo normal de 195 nm a 380nm ni en la región visible como los terpenoides, esteroides, ácidos grasos entre otros. [142] Las otras sustancias incluyen grupos que absorben luz en la región ultravioleta de trabajo como son los compuestos con anillos aromáticos, grupos dienos y enona conjugados, compuestos fenólicos y flavonoides [143]-[144].

Para realizar la cuantificación en Compuestos Fenólicos se utilizó el reactivo de Folin-Ciocalteu con una solución de NaOH 0.35 M, además para dicha determinación se realiza una curva de calibración con ácido gálico y se mide a una longitud de onda de 755 nm. [145], [146]. Por su parte, para determinar la cantidad de flavonoides a 510nm se tendrá en cuenta a utilizar NaNO₂ al 5%, AlCl₃ al 10% y NaOH 1M, realizando una curva de calibración con catequina (0.1 mg/ ml).[121]

2.5.2 UPLC – QTOF-MS en el análisis de Metabolitos Secundarios de plantas con posible actividad antivenómica.

Cromatografía líquida de ultra eficiencia acoplada a espectrometría de masas en tándem (UPLC-MS/MS) es una técnica de análisis instrumental que permite la separación, identificación y cuantificación de una gran diversidad de analitos en matrices complejas a nivel de trazas utilizada para muchas aplicaciones que ofrece varias ventajas como un gran poder de resolución, menor tiempo del ciclo de proceso,

mayor sensibilidad, selectividad y menor tiempo de ejecución y menor consumo de disolvente en comparación con cromatografía líquida de alta eficiencia [147]-[148]. Además, su sistema de detección a través del espectrómetro de masas con tiempo de vuelo aumenta considerablemente la sensibilidad de las identificaciones químicas, permitiendo trabajar con fragmentos de relación masa/carga en el orden de cuatro cifras decimales, lo cual incrementa a grandes rasgos la exactitud de la identificación química. De esta manera el TOF-MS es reconocida por ser extremadamente útil en la elucidación de la estructura y la identificación de patrones de fragmentación de los compuestos.[149]

Adicionalmente es altamente usada para análisis de tipo tanto cualitativos como cuantitativos. Estos incluyen identificar compuestos desconocidos, determinar la composición isotópica de elementos en una molécula y determinar la estructura de un compuesto observando su fragmentación. Otros usos incluyen cuantificar componentes en una muestra [150].

A nivel instrumental, es digno mencionar que UPLC logra las ventajas descritas usando una columna de menor tamaño empaquetada con partículas más pequeñas (generalmente inferiores a 2 μm de diámetro) [151]. Debido a que usa partículas más pequeñas dentro de la columna, requiriendo una fuerza mayor para impulsar el solvente y la muestra a través de la columna, lo cual generarán contrapresiones más altas, por lo que requerirá una bomba de mayor capacidad. Por lo tanto, UPLC requiere bombas que puedan funcionar a presiones más altas (6000 psi) que las que se usan en HPLC, siendo este dispositivo el responsable por el paso correcto de la fase móvil a través de la columna [147].

Por otra parte, detectores como el TOF de una sola etapa miden la masa exacta de todos los iones que entran en el tubo de vuelo. Los compuestos se identifican por una combinación de su masa, el patrón isotópico medido y el tiempo de retención cromatográfico. Además, la adición de un cuadrupolo y una célula de colisión a un TOF forma un QTOF, es capaz de aislar y fragmentar iones específicos, así como medir la masa exacta con una mayor exactitud que sus análogos triples cuadrupolos. La fragmentación molecular es ampliamente reproducible, por lo que el patrón de iones producto que se produce en la célula de colisión puede como característica adicional la identificación del ion precursor y así llevar a una mejorada elucidación

estructural. Los sistemas de cromatografía líquida acoplados a los espectrómetros de masas QTOF se utilizan ampliamente en el campo de fármacos y análisis de productos naturales [152], [153].

Este tipo de análisis, ha permitido un crecimiento notable en los procesos de análisis y control de calidad utilizados en los laboratorios de productos naturales en el estudio de metabolitos [77]. Así mismo, han sido de amplia utilidad en el descubrimiento de biomarcadores, ya que cumple con los estrictos requisitos analíticos y proporciona sensibilidad, precisión de masa, rango dinámico y alta resolución; lo que permite la cuantificación y detección de analitos en cantidades, en algunos casos inferiores al picogramo.[148], [154]

Esta técnica proporciona información sobre iones positivos y negativos formados en el proceso de ionización, lo que está ligado a la estructura química de la molécula y la naturaleza de los enlaces. El desarrollo de la técnica combinado con el uso de software y bases de datos permite realizar análisis de plantas con potencial antivenómica [155]. Lo cual ha sido usada con éxito, logrando identificar moléculas pertenecientes a compuestos como aceites esenciales, ácidos grasos, compuestos fenólicos, flavonoides, alcaloides, quinonas, antocianinas, saponinas y cumarinas.[156] Entre ellos se encuentran compuestos como la quercetina, gentiatibetina, apiosyskimmin, rhamnetin, yuankanin y kaempferon entre los principales, que están presentes en plantas alexitéricas.[157]

Además, se puede identificar algunos fragmentos en lo cual se utiliza espectrometría de masas en tándem o MS/MS, en la que después de la ionización por ESI los iones de cargas positivas seleccionan al cuadrupolo y pasan a la celda de colisión inducida, donde se fragmentan en iones más pequeños y una vez fragmentados se separa mediante el detector de tiempo de vuelo TOF, para obtener los espectros que servirán para la identificación de los compuestos pertenecientes a la especie vegetal con posible actividad antiofídica. Esto permite realizar los análisis con un tiempo óptimo, sensibilidad, precisión correcta y adecuada.[158] De este modo, podemos destacar que el uso de dichas técnicas en el descubriendo y tratamiento de plantas naturales con posible actividad antivenómica se ha generalizado como una técnica factible para caracterizar los componentes de mezclas complejas que contengan un gran conjunto de metabolitos secundarios con características químicas muy similares, logrando así

identificar gran cantidad de sustancias con propiedades antiinflamatorias, antioxidantes, antiofídicas, anticancerígena, entre otras [159].

Finalmente, se destacará los estudios recientes más relevantes con el uso de dicha técnica como lo son: *Andrographis paniculata* (Burm. F.) Nees y *Andrographis nallamalayana* JEllis utilizadas tradicionalmente para tratar diversas dolencias como úlceras bucales, fiebre intermitente, inflamación y mordedura de serpiente. Este estudio compara la actividad citotóxica *in vitro* y el perfil fitoquímico del extracto metanólico de *A. nallamalayana* (ANM) y *A. paniculata* (APM) realizando el análisis en UPLC-ESI-QTOF-MS / MS. [140]. También podemos destacar el uso del extracto del tallo de la especie *Bauhinia scandens*.L.[159] utilizado en la medicina ancestral para aliviar dolores, inflamaciones, antipiréticas y coagulación ante la presencia de actividad antiofídica provocada por el género de serpientes *Bungarus multicinctus* en la cual se realiza una investigación acerca de la metabolómica sérica en cerdos miniaturas Bama atacados por la especie mencionada[160]. A su vez, mencionamos estudios de plantas medicinales con actividades y mecanismos como inhibidores de toxinas para el veneno de serpiente como es el caso de *Anacardium humile* [161], *Harpalyce brasiliiana* Benth [162], descritos como fuentes prolíficas de flavonoides.

2.5.3 GC-MS uso y beneficio en el análisis de metabolitos secundarios en productos naturales.

La Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (GC/MS, por sus siglas en inglés) es una técnica analítica dedicada a la separación, identificación y cuantificación de mezclas de sustancias volátiles y semi volátiles, generalmente con un peso molecular por debajo de 1250 Da, y térmicamente estables para que no se degraden en el sistema GC [163], [164]. La separación de dichas sustancias depende de la diferente distribución de las sustancias estudiadas entre las fases móvil y estacionaria que conforman el sistema. Una vez separadas las sustancias son fragmentadas y analizadas en función de su patrón de fragmentación, el cual puede ser comparado con información contenida en una base de datos de espectros de masas para su identificación preliminar. La identificación definitiva, así como la cuantificación de cada sustancia debe hacerse mediante el empleo de sustancia de referencia. Además, los cromatógrafos de gas se asocian frecuentemente a espectrómetros de masas GC-MS para permitir la identificación de los componentes químicos. [165]

Por consecuencia, se delimita que es una técnica ampliamente utilizada en la mayoría de las industrias: por calidad, control en la fabricación de muchos productos, desde automóviles hasta productos químicos y productos farmacéuticos; con fines de investigación, desde el análisis de meteoritos hasta productos naturales; y para la seguridad, desde el medio ambiente hasta los alimentos y la medicina forense [166], [167]

En el estudio de productos naturales derivados de plantas se han considerado durante mucho tiempo una fuente valiosa de compuestos líderes para el desarrollo de fármacos. Los extractos naturales generalmente se componen de cientos a miles de metabolitos, por lo que la bioactividad de los dichos extractos puede representarse por el sinergismo entre varios metabolitos.[168] Al ser conocida como las técnicas más populares para medir los niveles de compuestos orgánicos volátiles y semi volátiles en una amplia variedad de muestras. Debido a esto en GC-MS, los metabolitos polares se derivan para volverlos volátiles y luego se separan por GC. [169]

En este sentido, la metabolómica a través del uso de GC-MS es ideal para identificar y cuantificar metabolitos moleculares pequeños (<1250 daltons), incluidos ácidos pequeños, alcoholes, ácidos hidroxílicos, aminoácidos, azúcares, ácidos grasos, esteroides, catecolaminas, fármacos y toxinas, que a menudo utilizan la derivatización química para hacer que estos compuestos sean lo suficientemente volátiles para la cromatografía de gases, entre estos métodos se conocen la alquilación, acilación, metoximación, trimetilsililación y sililación [169], [170].

Por otra parte, la ionización por impacto de electrones da como resultado patrones de fragmentación altamente reproducibles que son esenciales para experimentos a gran escala. Esto muestra que la metabolómica basada en GC-MS permite integrar fácilmente dos tipos de ensayos, uno de ellos puede ser dirigido para realizar la cuantificación e identificación de metabolitos específicos (*target*), mientras que la metabolómica no dirigida (*untarget*) es aprovechada con la finalidad de descubrir compuestos novedosos, ya que realizan un barrido de m/z completo en un rango definido, esto permite además el uso directo de bibliotecas espectrales y procedimientos operativos estándar validados y estandarizados para obtener una identificación con alta exactitud. [166]

De este modo, una gran ventaja de la GC-MS es su sensible y robustez.[171], [172] Dicho esto, un desafío técnico en la elaboración de perfiles de GC-MS es separar cada señal de metabolito de los picos superpuestos en el cromatograma de GC-MS sin procesar, para ello se encuentran disponibles varios paquetes de software de selección de picos equipados con funciones sofisticadas de deconvolución de picos para tratar datos con un rendimiento relativamente alto de miles de muestras.[168], [171], [173], [174]

Por esta razón, GC-MS es una técnica precisa empleada para la detección de grupos funcionales e identificación de varios compuestos terapéuticos presentes en plantas medicinales con posible actividad antiofídica. De modo que, se han investigado varias especies de plantas alexitéricas como *Hellenia speciosa* [175], *Trixis divaricata* [176], *Aristolochia elegans* [177], *Moringa oleífera* [178], *Helicteres isora* [179], *Melastoma malanbathricum*, *Dracontium spruceanum* (Schott)[180], *Urospatha sagittifolia* (Rudge) Schott (Antigua *Dracontium*) [181], entre otros. Todas las especies mencionadas presentan en sus extractos potentes efectos deletéreos de los venenos de serpientes, no solo por su actividad antihemorrágica, antibacteriana o antiinflamatoria, si no por su contenido metabólico en alcaloides, fenoles totales, entre otros [179], [182].

CAPÍTULO III

MARCO METODOLÓGICO

3.1 Ubicación.

Se procedió a recolectar la muestra de la especie *Urospatha sagittifolia* (Rudge) Schott en el sector Monte Alegre, de la parroquia rural Puerto Misahuallí, perteneciente al cantón Tena ubicado en la provincia de Napo a una altura de 460.6 m.s.n.m en sus coordenadas 1°03'12.5"S 77°39'52.6"W. Posteriormente se entregaron las muestras recolectadas al Laboratorio de Productos Naturales de la Universidad Regional Amazónica, para realizar los distintos análisis químicos respetivos para el desarrollo de la presente investigación. Por otra parte, la determinación taxonómica de la especie se realizó en el Instituto Nacional de Biodiversidad “INABIO”.

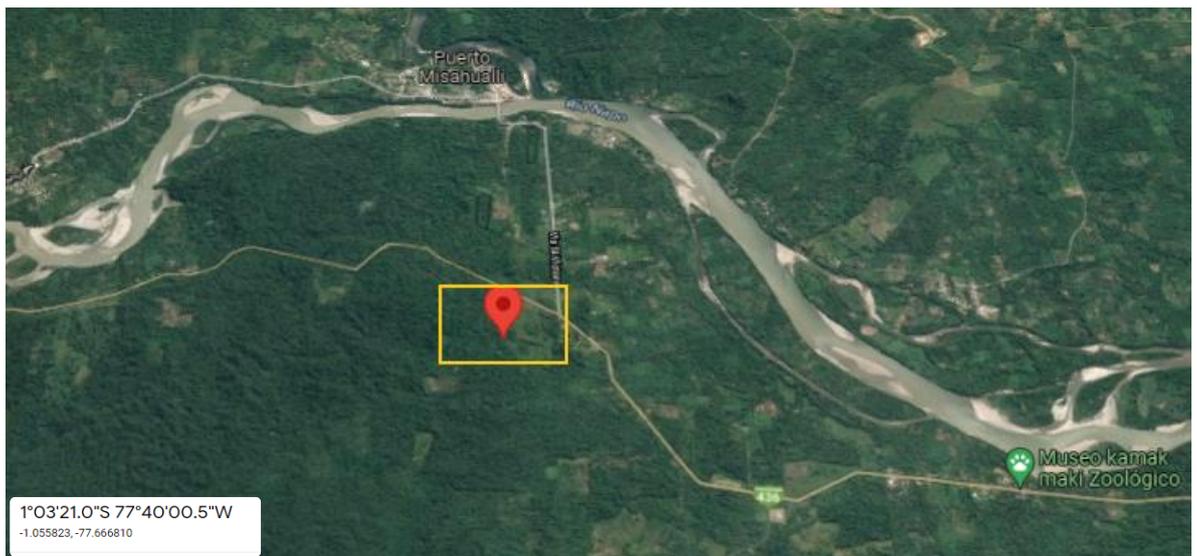


Figura 10. Ubicación de la recolección de la muestra.

3.2 Equipos y Materiales.

- Análisis Fitoquímico.

Tabla 4. Equipos y materiales para análisis Fitoquímico.

Materiales	Equipos	Reactivos
Espátula	Balanza Analítica, RADWAG WTC 600	<i>FeCl₃</i>
Vasos de precipitación de 50, 100 y 500 ml	Bomba de vacío	<i>NaOH</i>
Matraces Aforados de 25, 50 y 100 ml	Estufa, ESCO ISOTHERM OTS-54-8	<i>HCl</i>
Mortero con pistilo	Ultra congelador LEXICON II	<i>H₂SO₄ conct</i>
Probetas de 25 y 50 ml	Liofilizador	<i>NH₃</i>
Matraces Erlenmeyer de 100 y 500 ml	Baño ultrasónico, BRANSON 5800	<i>Reactivo de Dragendorff</i>
Papel Filtro	Agitador vortex, BROBAX MX-S	<i>Reactivo de Mayer</i>
Pipetas micrométricas	Rotavapor, BUCHI Interface I-300	<i>Anhidrido acético</i>
Piseta	Lámpara de luz UV, DORS 50	<i>Cloroformo</i>
Papel aluminio		<i>Metanol</i>
Colador		<i>Hexano</i>
Tubos de ensayo		<i>Agua destilada</i>
Gradilla		<i>Limadura de Magnesio</i>
Vidrio reloj		<i>Etanol</i>
Tubos tipo Falcon		

- Determinación de Compuestos Fenólicos y Flavonoides.

Tabla 5. Equipos y materiales para cuantificación UV-vis.

Materiales	Equipos	Reactivos
Vasos de precipitación de 50, 100 y 500 ml	Balanza Analítica, RADWAG WTC 600	Ácido Gálico
Matraces Aforados de 25, 50 y 100 ml	Baño ultrasónico, BRANSON 5800	Metanol
Probetas de 25 y 50 ml	Agitador vortex, BROBAX MX-S	Catequina
Papel aluminio	Espectrofotómetro UV-1280 SHIMADZU	Agua destilada
Tubos de ensayo		Reactivo de Folin-ciocalteu
Gradilla		<i>NaNO₂</i>
Vidrio reloj		<i>AlCl₃</i>
Tubos de ensayo cónicos de propileno		<i>NaOH</i>
Espátula		<i>Na₂CO₃</i>

Pipetas micrométricas		
Piseta		
Celdas o cubetas de cuarzo, vidrio y plástico 1 ml		

- Análisis UPLC-QTOF-MS para Compuestos Fenólicos y Flavonoides

Tabla 6. Equipos y materiales para determinación en UPLC.

Materiales	Equipos	Reactivos
Espátula	Balanza Analítica, RADWAG WTC 600	Metanol
Tubos de ensayo	Baño ultrasónico, BRANSON 5800	Ácido Fórmico
Viales de vidrio 1.5 ml	Agitador vortex, BROBAX MX-S	Acetonitrilo
Micro filtro 0.45 µm	Cromatógrafo Líquido UPLC con Espectrómetro de Masas QTOF, WATERS XEVO G2-XS Rtof/Tof ACQUITY UPLC H-CLASS/ I-CLASS SERIES SYSTEM.	Agua destilada
Jeringuillas		Leucina
Gradilla		
Vidrio reloj		
Piseta		
Pipetas micrométricas		

3.3 Tipo de Investigación.

El presente trabajo de investigación tiene por objeto caracterizar la especie *Urospatha sagittifolia* (Rudge) Schott por análisis químico, por lo cual para su desarrollo se ha utilizado tipos de investigaciones como: descriptiva, exploratoria, aplicada, cualitativa y cuantitativa. Lo que nos permite y orienta a realizar ensayos de laboratorio para conocer e identificar los metabolitos secundarios por reacciones de color o precipitado, y a su vez por técnicas cromatográficas de identificación química. De otra manera, podemos mencionar el uso de la investigación tipo correlacional por la relación que

existe entre los parámetros utilizados y los resultados obtenidos reportados por diversos autores.

3.4 Prueba de Hipótesis.

Hipótesis alternativa: Es posible relacionar los metabolitos secundarios de la especie *Urospatha sagittifolia* (Rudge) Schott con actividad antiofídica.

Hipótesis nula: No es posible relacionar los metabolitos secundarios de la especie *Urospatha sagittifolia* (Rudge) Schott con actividad antiofídica.

3.5 Población o muestra.

Se determinó la muestra existente en la localización geográfica descrita perteneciente a la Universidad Regional Amazónica con respecto al contrato de marco de acceso a los recursos genéticos del proyecto de investigación científica de la misma. Para lo cual se realizó un muestreo aleatorio tomando en consideración la etapa de maduración de las mismas, se procedió a recolectar las raíces con cuerpo completo de 3 plantas diferentes para la ejecución de los siguientes análisis químicos siguiendo el protocolo mencionado por PPBio Amazonía Oriental[183][184][185].

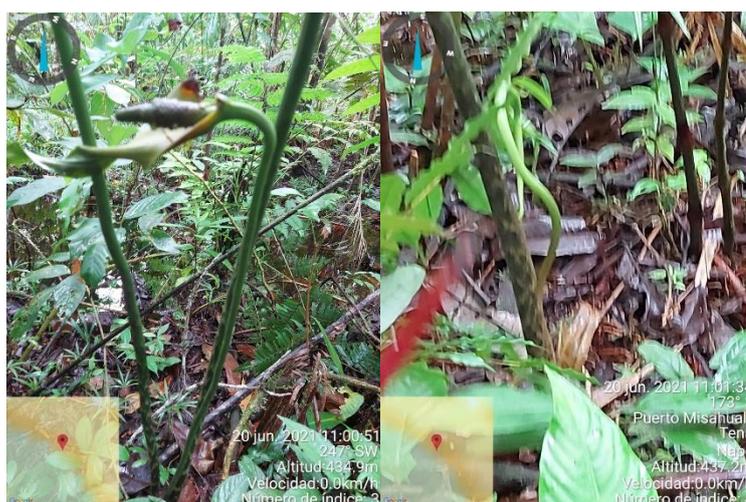


Figura 11. Recolección de la especie.

3.6 Recolección de la Información.

Se utilizaron herramientas para el desarrollo de los extractos con diversos solventes a la especie antes mencionada, para determinar los metabolitos presentes en la misma. A su vez, se cuantificó por espectrofotometría UV-Vis y Cromatografía líquida de alta resolución siguiendo la metodología correspondiente presentada a continuación:

3.6.1 Preparación de los Extractos.

- Después de haber recolectado la muestra, se procedió a lavar con agua destilada para retirar toda impureza presente en la raíz.
- Se colocó 250 g de cada tipo de planta de la especie *Urospatha sagittifolia* (Rudge) Schott en un vaso de precipitación de 500 mL y lo se llevó a una estufa ESCO ISOTHERM OTS-54-8 a 70°C durante 5 días.
- Se redujo el tamaño de partícula de cada una de las raíces y separamos en matraces Erlenmeyer de 100 ml.
- Para obtener el extracto, se colocó solventes como: metanol, hexano y cloroformo. Teniendo en cuenta que el solvente sea el doble de la cantidad de muestra y se procedió a reposar por 14 días.
- Para obtener el extracto de agua procedemos a macerar con agua destilada en un mortero utilizando un pistilo.
- Se procede a congelar la muestra a -80°C utilizando un Ultra-congelador modelo Lexicon II.
- Llevamos a liofilizar durante 7 días a una temperatura -40°C.
- Seguido a la marcha analítica, se llevó a rota vaporar durante varios minutos con las condiciones de cada solvente para concentrar la muestra y no eliminar algunos compuestos volátiles presentes en cada una de las muestras.

3.6.2 Marcha Fitoquímica.

- Saponinas: A una solución de cada uno de los extractos, se sometió a agitación rigurosa durante 30 segundos. Para comprobar la prueba se verificó que durante 3 minutos permanezca la presencia de espuma. Además, se comprobó el método utilizando la reacción de Salkowski, a 2 mg de los extractos agua,

cloroformo, hexano y metanol se añadió 1 mL de H₂SO₄ concentrado. Si presenta un color rojo azulado hasta el púrpura, se considera la presencia de saponinas esteroidales o triterpenoides.[88],[84]

- Terpenoides: Se colocó 1 mL de cloroformo a 2 mg de cada uno de los extractos, se llevó al vortex y sonificación durante 1 minuto cada uno para su homogenización. Luego se añadió 3 gotas de H₂SO₄ concentrado y presentó la formación de una interfaz con anillo rojo confirmando la presencia de Terpenoides. [64], [77]
- Taninos: A 2 mg de cada extracto disuelto en cada uno de los solventes respectivamente, se colocó 4 gotas de una solución de FeCl₃ al 4 %. Si presenta una coloración verde indica la presencia de gelotaninos o a su vez una coloración café la presencia de pseudotaninos.[76]
- Antocianinas: A 1 mg de cada extracto disuelto en 1 mL de agua destilada, se añadió 5 gotas de NH₃ concentrado. La pérdida de color de violeta a amarillo indica la presencia de compuestos antocianinicos. Para corroborar la prueba se procedió a realizar una adición álcali añadiendo 5 gotas de una solución de NaOH al 20% a 2 mg de cada extracto disuelto en agua. Si existe decoloración lenta de violeta azul verdoso y amarillo indica la presencia de fenoles alcalinos o beta-cianinas. Además, para la comprobación de este método se adicionó a la solución anterior 1 mL de HCl 1N lo cual, si presenta la regeneración del color rojo indica la prueba positiva.[131]
- Quinonas: A 2 mg de cada extracto se añadió 200 µl de etanol y 400 µl de NaOH al 5%, el cambio de coloración indica la presencia de compuestos quinónicos.[6], [23], [186]
- Cumarinas: Se realizó la prueba de fluorescencia de tal manera que a la boca de los tubos de ensayo se colocó los extractos de forma homogénea, posterior se colocó un filtro de papel circular tratado previamente con una solución de NaOH al 1 N. Se situó los tubos de ensayo en agua hirviendo durante unos minutos, posterior a eso se retiró el papel filtro y se examinó bajo la luz ultra violeta. La aparición de fluorescencia indica la presencia de cumarinas. Para corroborar el método, se utilizó una solución de NaOH al 10 % en una alícuota del extracto, lo cual presentó una reacción de coloración amarilla que al acidular la solución desaparece.[23], [64], [77], [95]

- **Compuestos fenólicos:** Se realizó la detección de fenoles utilizando la prueba de FeCl_3 al 12.5 %. A 2 mg de cada extracto se disolvió en 1 ml de agua destilada y desionizada, se adicionó 4 gotas de la solución de FeCl_3 en lo cual el cambio de coloración de verde oscuro a azul índigo indica la presencia de fenoles, de manera que el color azul completo indicará que los taninos de la muestra son hidrolizables. Por otro lado, la presencia de taninos condensados en la muestra se confirma por un color verde oscuro. Para comprobar el método, se utilizó 5 gotas de una solución de NaOH al 4% en 5 mg de cada extracto disuelto en agua destilada lo cual presentó un color negro azulado indicando la presencia de fenoles.[6], [58], [76], [93], [186], [187]
- **Flavonoides:** Se utilizó la reacción con FeCl_3 al 4% añadiendo 3 gotas a cada uno de los extractos acuosos, la aparición colorimétrica de verde negruzco indicará la presencia de flavonoides. A su vez al adicionar a 5 mg de cada extracto disuelto en 1 ml de agua destilada 3 gotas de una solución de NaOH al 2%, si la disolución desarrollada presenta una coloración amarilla intensa que al acidular desaparece, confirma la presencia de flavonoides. Para comprobar el método se utilizó el reactivo de Shinoda, en la cual a 1 mL de cada extracto acuoso se añadió limadura de magnesio y 4 gotas de HCl concentrado. Al observar un burbujeo intenso producido por la reacción y que la solución adquiere una débil coloración naranja al principio indica la presencia de flavonoides.[24], [172], [188]
- **Alcaloides:** se utilizó la reacción de Dragendorff, en la cual a 5 mg de a extracto se acidificó con 1 mL de HCl diluido y posteriormente se añadió gota a gota el reactivo de Dragendorff. Si existe la presencia de un precipitado de coloración naranja indica positivo para alcaloides. Para comprobar el método se utiliza la reacción de Mayer, en la cual los precipitados darán una coloración blanca, blanco amarillo o amarillo limón. También existen otros test como la sal de amonio de Reineckato, el reactivo de Bouchardat (solución de yodo yodurado) entre los más comunes. [6], [36], [86], [187]

3.6.3 Cuantificación espectrofotométrica UV-vis.

Para realizar la cuantificación presente se tomó en consideración las referencias bibliográficas actuales en relación a los compuestos con más afinidad a ser

responsables de la actividad antivenómica, sin embargo, el propósito es verificar los compuestos pertenecientes a la especie estudiada por parte de los dos metabolitos mencionados:

- **Compuestos fenólicos:** El contenido fenólico se cuantificó utilizando el reactivo de Folin-Ciocalteu y ácido gálico como estándar para la preparación de la curva de calibración. Se preparó una solución con Metanol al 50% y 100 ppm de Ácido Gálico con agua destilada y desionizada. Se preparó 5 tubos de ensayo con las soluciones estándar y un blanco, se dejó en reposo durante 2 horas. Para la preparación de la muestra se utilizó 2mg de cada extracto disueltos en 50 ml de agua destilada, se tomó una alícuota de 500 μ L de la muestra y se añadió 750 μ L de reactivo de Folin y dejar reposar 5 minutos, posterior se agregó 750 μ L de Na_2CO_3 y dejar reposar 120 minutos. Se midió a una longitud de 755 nm, el reactivo de Folin se utilizó inmediatamente protegiéndolo de la luz y las mezclas de las reacciones. Se presenta la tabla de la preparación de la curva de Ácido Gálico:[78]

Tabla 7. Determinación de la curva de Calibración estándar fenoles.

Curva de Calibración Ácido Gálico						
	1	1.5	2	3	4	mg/L
Estándar Sol. Ác. Gálico	20	30	40	60	80	μ L
RFC (1N) Reactivo Folin-Ciocalteu	250	250	250	250	250	μ L
Na_2CO_3	750	750	750	750	750	μ L
Agua	980	970	960	940	920	μ L

Fuente: Propia.

- **Flavonoides:** El contenido de Flavonoides se cuantificó utilizando una solución estándar de catequina (0.1mg/mL) en la cual se tomaron volúmenes de 0 a 100 μ L para la preparación de la curva de calibración. Para la determinación se utilizó Na_2NO_3 al 5%, AlCl_3 al 10 % y NaOH 1M. Al realizar la preparación de la muestra, se tomó 5 mg de cada extracto disuelto en 50 ml, se adicionó 1250 μ L de agua destilada y desionizada, 75 μ L de Na_2NO_3 y se dejó reposar

por 6 minutos, luego se añadió 150 μL de AlCl_3 y reposó por 5 minutos, finalmente se aforo con 975 μL de agua destilada. Se midió a una longitud de 510 nm y se presenta a continuación la preparación de la curva de calibración:[189]

Tabla 8. Determinación curva de calibración estándar flavonoides.

Curva de Calibración Catequina						
Estándar Sol. Catequina (0.5 mg/mL)	20	40	60	80	100	μL
Agua	1250	1250	1250	1250	1250	μL
Na_2NO_2	75	75	75	75	75	μL
AlCl_3	150	150	150	150	150	μL
NaOH 1 M	500	500	500	500	500	μL
Agua	1005	985	965	945	925	μL

Fuente: Propia.

3.6.4 Identificación Uplc-QToF.

Se realizó la corrida cromatográfica en el Cromatógrafo Líquido UPLC con Espectrómetro de Masas QTOF, WATERS XEVO G2-XS Rtof/Tof ACQUITY UPLC H-CLASS/ I-CLASS SERIES SYSTEM, en la cual se determinaron los compuestos fenólicos y flavonoides en modo positivo y negativo según la siguiente metodología propuesta:

- Flavonoides: Para calibrar el equipo se utilizó una columna C18 en fase reversa a una T° de 40 $^\circ\text{C}$. El tiempo de corrido fue de 15 minutos a un flujo de inyección de 0.3 ml/min en modo positivo y negativo, utilizando fases móviles como Ácido Fórmico y Acetonitrilo respectivamente, las gradientes presentes fueron 95% de A con 5% de B de 0-5 min, 30% de A y 30% de B por 5, 20 y 25 min. Para el ms/ms se aplicó un m/z de 100-1500 con un tiempo de scan de 1 min y una energía de colisión de 20-60 V. Se preparó la muestra de tal manera que a 10 mg de cada extracto se disolvió en 1 mL de agua destilada y se llevó al vortex y sonicación por 30 a 60 segundos a una T° de 50 $^\circ\text{C}$, se tomó 500 μL y se disolvió en 500 μL de Metanol al 70 %. Se pasó por micro-

filtros de 0.45 μm y se colocó en viales de muestra automática con tapones de PTFE. [190]

- **Compuestos Fenólicos:** se utilizó una columna C18 en fase reversa a una T° 35 $^\circ\text{C}$. El tiempo de corrido fue de 23 minutos a un flujo de 0.15 mL/min en modo negativo, se obtuvo como fases móviles Ácido Fórmico y Acetonitrilo respectivamente, las gradientes utilizadas fueron: 85% de A y 15% de B de 1 min, 80% de A y 20% de B en 2.5 min, 75% de A y 25% de B en 7.5 min, 65% de A y 35% de B en 12.5 min, 50% de A con 50% de B en 17 min, 35% de A con 65% de B en 19.50 min y 25% de A con 75% de B en 23 min. Para el MS/MS se aplicó un m/z de 100-1000 con un tiempo de scan de 1 min y una energía de colisión de 15V. Para preparar la muestra se utilizó 10 mg de cada extracto se disolvió en 1 mL de agua destilada y se llevó al vortex y sonificación durante 30 a 60 segundos a una T° de 50 $^\circ\text{C}$, se tomó 500 μL y se disolvió en 500 μL de Metanol al 50 %. Se pasó por micro-filtros de 0.45 μm y se colocó en viales de muestra automática con tapones de PTFE.[191]

3.7 Procesamiento de la Información y Análisis Estadístico.

El presente estudio tuvo como finalidad analizar tres tipos de maduración de la especie *Urospatha sagittifolia* (Rudge) Schott (antigua *Dracontium*), las lecturas se realizaron por duplicado para el análisis fitoquímico, UV-visible, UPLC – QTOF-MS, cada extracto se midió por triplicado y los datos fueron sometidos a un análisis de varianza de una vía (ANOVA), además fueron reportados y comparados entre sí para detectar diferencias significativas empleando el método de Tukey, que será un estimador para ser determinado en base a los grados de libertad y a una probabilidad de error. Donde se evaluó la influencia de los métodos que tiene cada factor para la detección metabolitos secundarios con posible actividad antivenómica.

3.8 Variables de respuesta o resultados alcanzados.

Las variables de respuesta fueron identificadas por el tiempo de corrida de cada método para determinar la posible presencia de metabolitos secundarios con posible actividad antiofídica, de acuerdo a su contenido de saponinas, terpenoides, compuestos fenólicos, alcaloides, quinonas, flavonoides, entre otros.

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este capítulo se describe todos los datos obtenidos de la experimentación de la especie *Urospatha sagittifolia* (Rudge) Schott (antigua *Dracontium*), con su respectiva discusión.

4.1 Identificación Botánica de la especie *Urospatha sagittifolia* (Rudge) Schott (antigua *Dracontium*).

Se recolectaron 500 g de la especie en la localización señalada anteriormente, de los cuales se envió una alícuota al Herbario INABIO, para la determinación taxonómica y botánica de la especie, en tal virtud el informe del herbario reporta: Una vez revisadas las características morfológicas del ejemplar y comparando con los existentes registros en el Herbario, la muestra corresponde a la especie propiamente mencionada, la misma que es nativa del Ecuador como se expresa en el permiso correspondiente para su muestreo respectivo.

4.2 Análisis Fitoquímico.

De acuerdo a la metodología descrita, en la tabla N° 6 se presenta los resultados encontrados cualitativamente mediante reacciones de color y precipitado para los siguientes grupos de metabolitos. En la cual, se utilizó solventes como metanol, cloroformo, hexano y agua durante el proceso de maceración. De este modo, a cada prueba realizada con su respectivo método se colocó las afirmaciones siguientes: (+) positivo o (-) negativo en cada caso de acuerdo a su resultado pertinente.

Tabla 9. Resultados del Análisis Fitoquímico.

METABOLITO	PRUEBA	RESULTADO – EXTRACTO			
		Metanol	Cloroformo	Hexano	Agua
Saponinas	Agitación rigurosa	+	-	-	+
	Salkowski	+	+	-	+
Terpenoides	Ácido Sulfúrico Conc.	+	+	-	+
Taninos	Cloruro Férrico al 10%	+	-	-	+
Antocianinas	Amoníaco	-	-	-	+

	Hidróxido de Sodio al 20%	-	-	-	+
Quinonas	Hidróxido de Sodio al 5%	-	-	-	-
Cumarinas	Fluorescencia	+	-	-	+
	Hidróxido de Sodio al 10%	+	-	-	+
Compuestos Fenólicos	Cloruro Férrico al 12.5%	+	-	-	+
	Hidróxido de Sodio al 4%	+	-	-	+
Flavonoides	Cloruro Férrico al 4%	+	-	-	+
	Shinoda	+	-	-	+
Alcaloides	Dragendorff	-	+	-	-
	Mayer	+	-	-	-

Fuente: Propia.

El análisis fitoquímico realizado a los extractos con diferentes polaridades, indica que los metabolitos secundarios presentes en mayor proporción en la especie *Urospatha sagittifolia* (Rudge) Schott (antigua *Dracontium*), presentan reacción con los solventes con mayor polaridad: metanol y agua.

4.3 Cuantificación espectrofotométrica UV-vis.

Al tomar en consideración las referencias bibliográficas actuales en relación a los compuestos con más afinidad a ser responsables de la actividad antivenómica, se presenta los siguientes resultados por parte de las lecturas de los siguientes metabolitos: compuestos fenólicos y flavonoides. De este modo, se tomó en cuenta los valores de los límites de detección y cuantificación al presentar las siguientes curvas en relación a la concentración y la absorbancia:

- Compuestos Fenólicos:

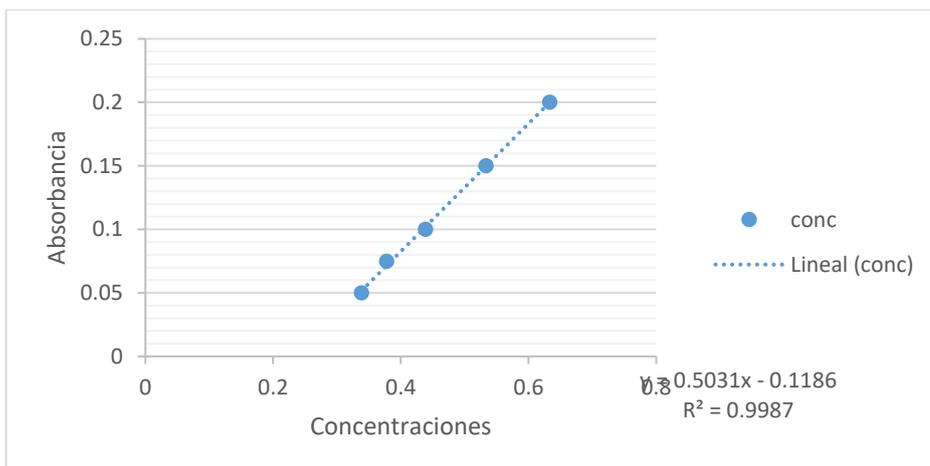


Figura 12. Curva de Calibración de Compuestos Fenólicos a 755 nm (Ác. Gálico).

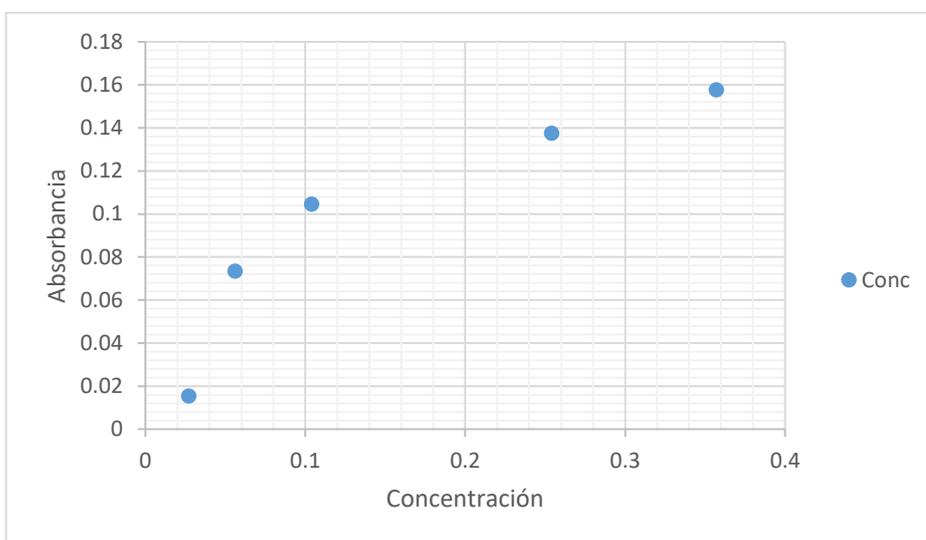


Figura 13. Resultados Compuestos Fenólicos a 755.5 nm en UV-visible.

Tabla 10. Determinación cuantitativa de Fenoles totales de la especie *Urospatha sagittifolia* (Rudge) Schott (antigua *Dracontium*).

DETERMINACIÓN	PLANTA (Raíz)
FENOLES TOTALES (mg ácido gálico / 100 g de muestra)	0.001
DESVIACIÓN ESTÁNDAR	0.075

- Flavonoides:

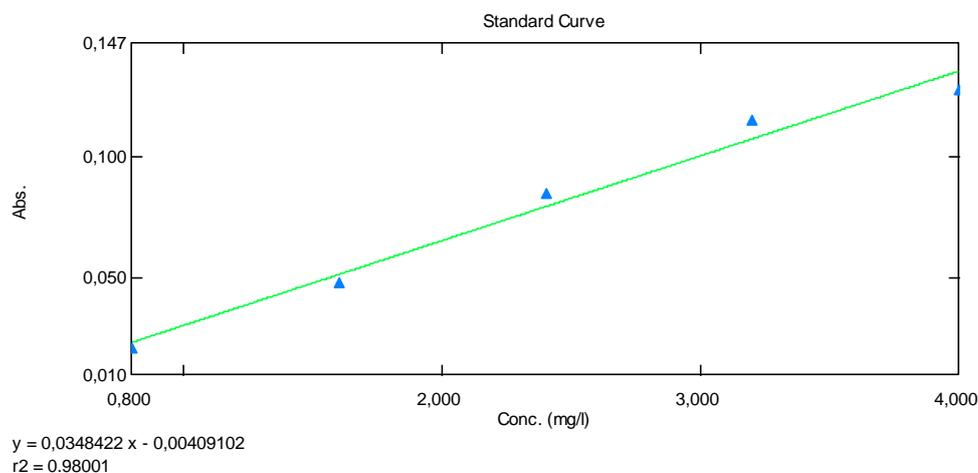


Figura 14. Curva de Calibración de Flavonoides a 510 nm (Catequina).

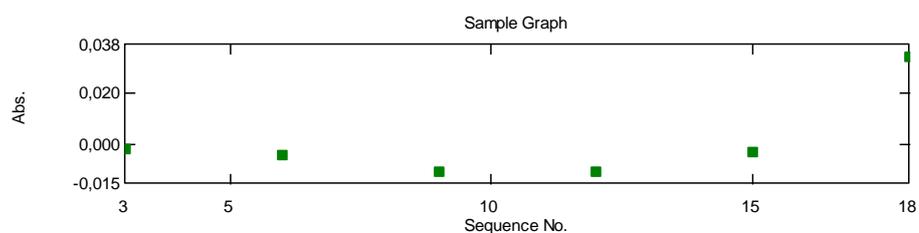


Figura 15. Resultados Flavonoides a 510 nm en UV-visible

Tabla 11. Determinación cuantitativa de Flavonoides totales expresados como catequina.

DETERMINACIÓN	PLANTA (Raíz)
FLAVONOIDES TOTALES EXPRESADOS COMO CATEQUINA (mg catequina / 100 g de muestra)	0.025
DESVIACIÓN ESTÁNDAR	0.154

4.4 Identificación Uplc-QToF.

El análisis realizado por medio del equipo WATERS XEVO G2-XS Rtof/Tof ACQUITY UPLC H-CLASS/ I-CLASS SERIES SYSTEM fue en modo positivo y negativo secuencialmente para obtener una variedad de compuestos por la disposición de sus grupos funcionales, así como es el caso de los compuestos polifenólicos en

modo negativo que tienden a desprotonizarse. Por esta razón, esto permitió identificar tentativamente varios compuestos basados en el tiempo de retención, la masa medida por el equipo, la masa teórica extraída, el error experimental y los iones fragmentados. Una vez obtenidos los datos espectrales, se realizó corridas en el sistema de información científica UNIFI para conocer la composición y nomenclatura de los posibles compuestos existentes en la especie *Urospatha sagittifolia* (Rudge) Schott (antigua *Dracontium*). Además, fueron comparados con otras metabolómicas descritas por varios autores para llegar a una identificación tentativa de sus picos espectrales e iones fragmentados.

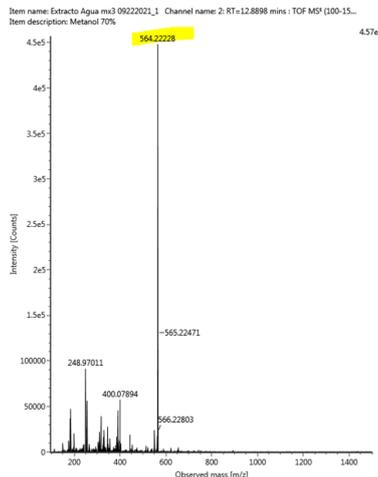
4.4.1 Resultados para la identificación de Flavonoides.

Se obtuvieron varios metabolitos secundarios al seguir la metodología para compuestos flavonoideos como flavonas principalmente y saponinas, cumarinas, alcaloides, aminoácidos, disacáridos y terpenoides secuencialmente. De este modo, podemos mencionar que la especie en sus 3 etapas de maduración contiene capacidad antioxidante y posible actividad antivenómica por la presencia de los grupos metabólicos y sus características al ser antiinflamatorias, antihemorrágicas, antibacterianas, entre otros según su clasificación. A continuación, se presenta en subgrupos los posibles compuestos ordenados según su conjunto metabólico con sus respectivos espectros.

4.4.1.1 Flavonoides.

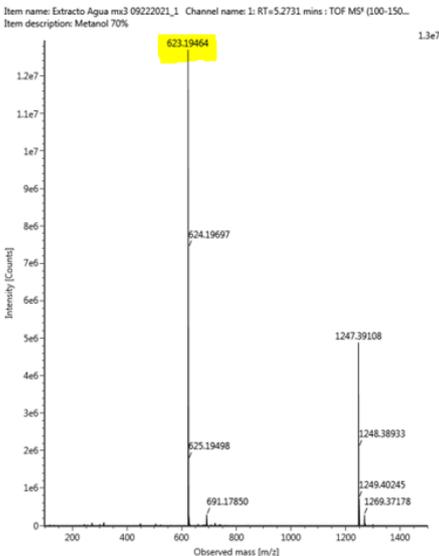
La presencia de flavonoides en la planta posee gran relación en sus 3 etapas de maduración, presenta aparición de las mismas en los extractos de agua y metanol como se presenta a continuación:

Tabla 12. Apiin identificado en extracto de agua.

Nombre: Apiin	Grupo: Flavonoide
Masa Neutral: 564,14701	Espectro: 
Modo: Positivo	
Fragmentos: 433.11130 271.05920	
Referencia: Metlin	

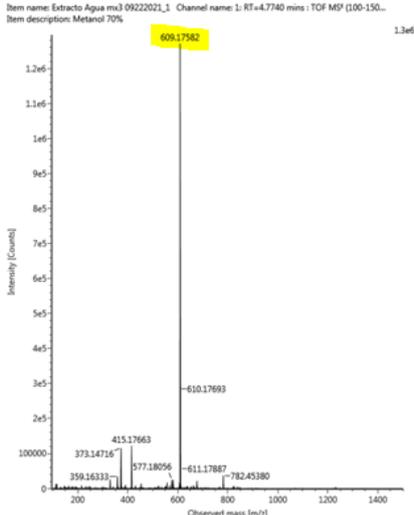
Fuente: Propia.

Tabla 13. Isorhamnetin-3-O-neohesperidoside identificado en extracto de agua.

Nombre: Isorhamnetin-3-O-neohesperidoside	Grupo: Flavonoide
Masa Neutral: 624,16903	Espectro: 
Modo: Negativo	
Fragmentos: 314.042816 299.019958 623.162170 623.204834 315.054077	
Referencia: MoNA - MassBank de América del Norte	

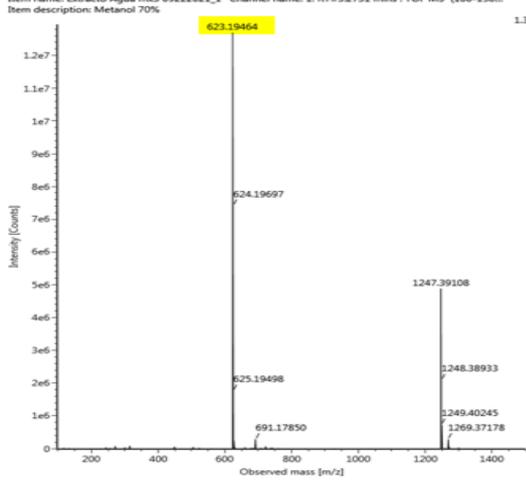
Fuente: Propia.

Tabla 14. Quercetin-3-O-neohesperidoside identificado en extracto de agua.

Nombre: Quercetin-3-O-neohesperidoside	Grupo: Flavonoide
Masa Neutral: 610,15338	Espectro: Item name: Extracto Agua ms3 09222021_1 Channel name: 1: RT=4.7740 mins : TOF MS ⁺ (100-150... Item description: Metanol 70% 
Modo: Negativo	
Fragmentos: 300.026703 271.024048 255.029343 301.030792 272.028473	
Referencia: PubChem	

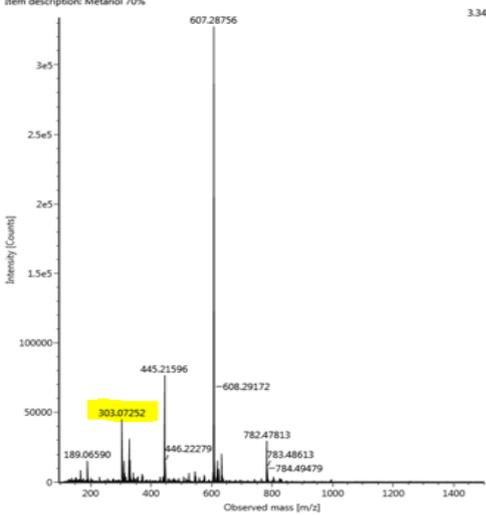
Fuente: Propia

Tabla 15. Quercetin-7-O- [β-D-glucopyranosyl (1→6)- β-D-glucopyranoside] identificado en extracto de agua.

Nombre: Quercetin-7-O- [β-D-glucopyranosyl (1→6)- β-D-glucopyranoside]	Grupo: Flavonoide
Masa Neutral: 626,14830	Espectro: Item name: Extracto Agua ms3 09222021_1 Channel name: 1: RT=5.2731 mins : TOF MS ⁺ (100-150... Item description: Metanol 70% 
Modo: Negativo	
Fragmentos: 303.0502 304.0547 449.1114 465.1163 466.1117	
Referencia: MoNA - MassBank de América del Norte	

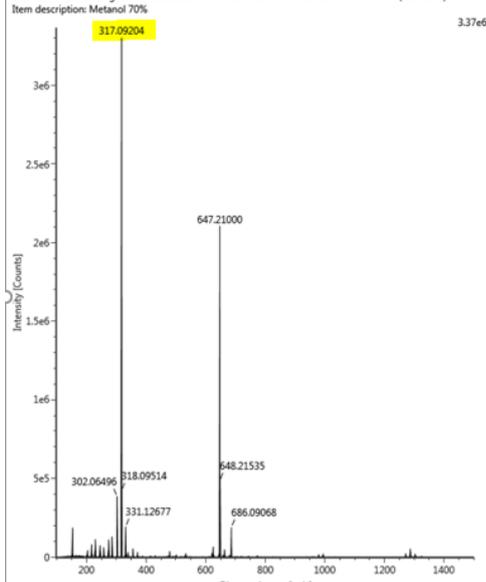
Fuente: Propia

Tabla 16. Quercetin identificado en extracto de agua.

Nombre: Quercetin	Grupo: Flavonoide
Masa Neutral: 302,04256	Espectro: Item name: Extracto Agua mx3 09222021 Channel name: 2: RT=4.7233 mins : TOF MS ⁺ (100-1500)... Item description: Metanol 70% 
Modo: Positivo	
Fragmentos: 271.0612 301.0347 273.0417 302.0432 119.053 151.0039	
Referencia: Metlin	

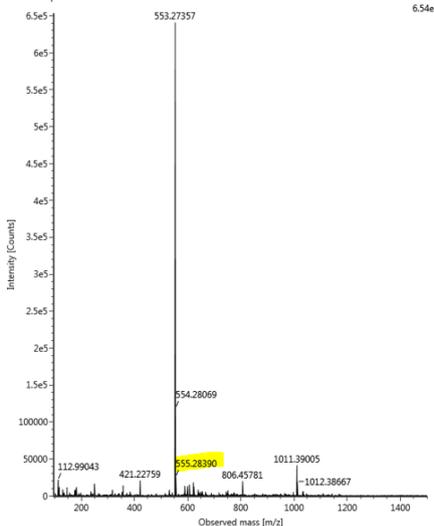
Fuente: Propia

Tabla 17. Rhamnetin identificado en extracto de agua y metanol.

Nombre: Rhamnetin	Grupo: Flavonoide
Masa Neutral: 316,05830	Espectro: Item name: Extracto Agua mx3 09222021 Channel name: 2: RT=5.2901 mins : TOF MS ⁺ (100-1500)... Item description: Metanol 70% 
Modo: Positivo	
Fragmentos: 317.08 318.103 686.0457 319.0313 315.09	
Referencia: MoNA - MassBank de América del Norte	

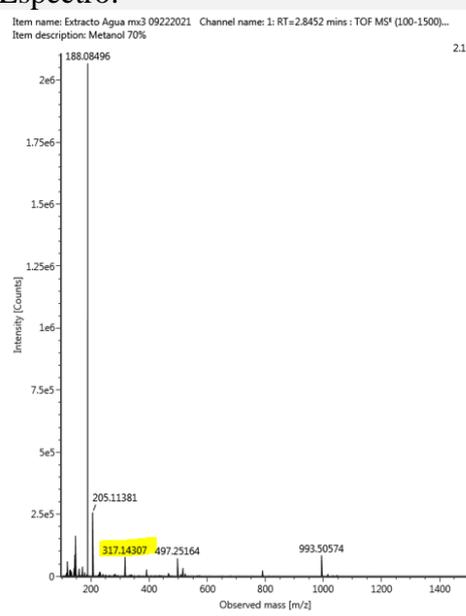
Fuente: Propia

Tabla 18. Yuankanin identificado en extracto de agua.

Nombre: Yuankanin	Grupo: Flavonoide
Masa Neutral: 578,16356	Espectro: Item name: Extracto Agua m/z 09222021_1 Channel name: 1: RT=6.6690 mins : TOF MS ⁺ (100-150... Item description: Metanol 70% 
Modo: Negativo	
Fragmentos: 579.1669 580.1678 581.1712	
Referencia: Metlin, EPA	

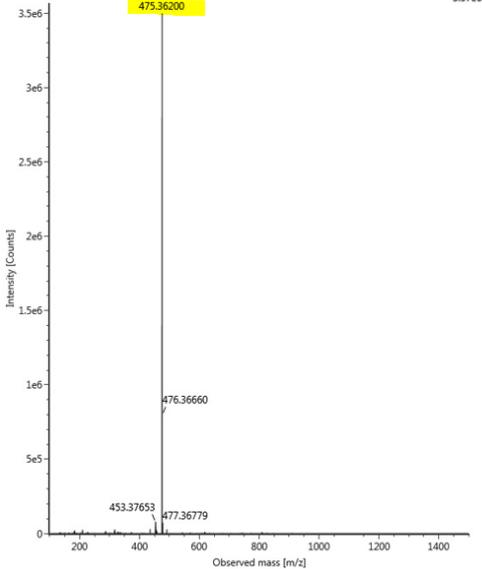
Fuente: Propia

Tabla 19. Isorhamnetin identificado en extracto de agua.

Nombre: Isorhamnetin	Grupo: Flavonoide
Masa Neutral: 316,05830	Espectro: Item name: Extracto Agua m/z 09222021 Channel name: 1: RT=2.8452 mins : TOF MS ⁺ (100-1500)... Item description: Metanol 70% 
Modo: Positivo	
Fragmentos: 317.0817 318.0782 686.0703 319.0872 315.0577	
Referencia: HMDB, PubChem	

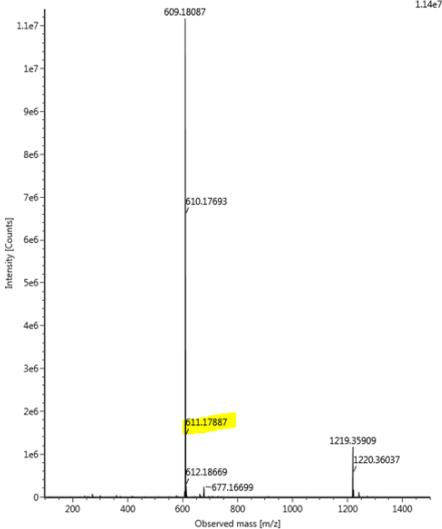
Fuente: Propia

Tabla 20. Kaempferol-3-glucuronide identificado en extracto de agua.

Nombre: Kaempferol-3-glucuronide	Grupo: Flavonoide
Masa Neutral: 464,09548	Espectro: Item name: Extracto Agua ms2 09222021 Channel name: 2: RT=5.0335 mins : TOF MS ¹ (100-1500)... Item description: Metanol 70% 
Modo: Positivo	
Fragmentos: 286.0430 461.0713 229.0455 113.0231	
Referencia: MoNA - MassBank de América del Norte, HMDB	

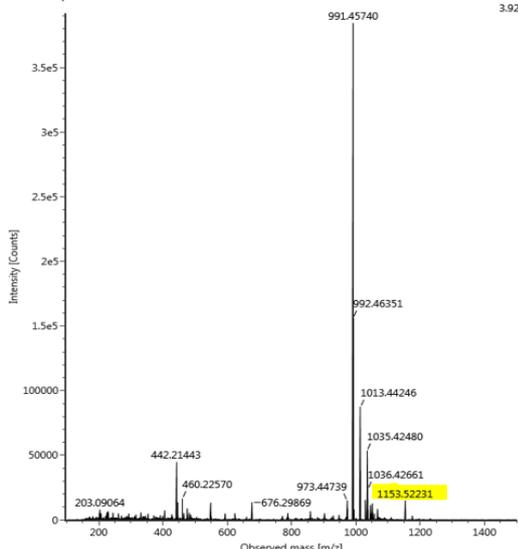
Fuente: Propia

Tabla 21. Kaempferol-3,7-diglucoside identificado en extracto de agua.

Nombre: Kaempferol-3,7-diglucoside	Grupo: Flavonoide
Masa Neutral: 610,15338	Espectro: Item name: Extracto Agua ms2 09222021_1 Channel name: 1: RT=4.7401 mins : TOF MS ¹ (100-1500)... Item description: Metanol 70% 
Modo: Positivo	
Fragmentos: 431.0978 449.1084 593.1506 285.0399	
Referencia: HMDB	

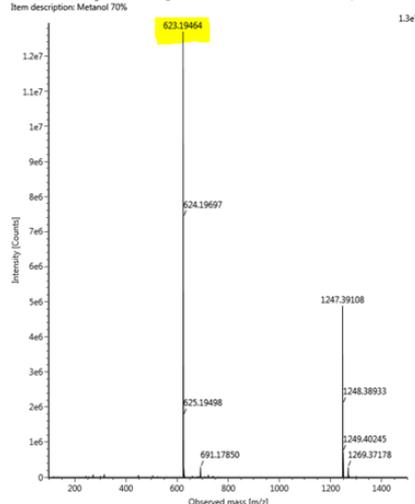
Fuente: Propia

Tabla 22. Arecatannin A2 identificado en extracto de metanol.

Nombre: Arecatannin A2	Grupo: Flavonoide
Masa Neutral: 1154,26920	Espectro: Item name: Extracto Agua mx2 09222021_1 Channel name: 2: RT=2.8085 mins : TOF MS ¹ (100-150... Item description: Metanol 70% 
Modo: Negativo	
Fragmentos: 562.2107 421.1357 215.12.12 197.1118	
Referencia: MoNA - MassBank de América del Norte	

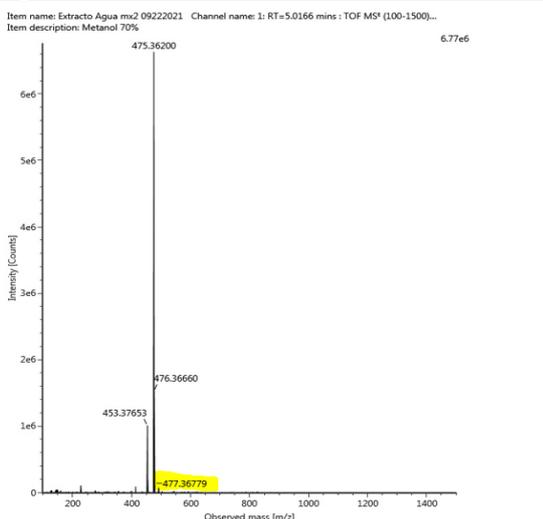
Fuente: Propia

Tabla 23. Isorhamnetin-3-O-neohesperidoside identificado en extracto de metanol.

Nombre: Isorhamnetin-3-O-neohesperidoside	Grupo: Flavonoide
Masa Neutral: 624,16903	Espectro: Item name: Extracto Agua mx3 09222021_1 Channel name: 1: RT=5.2731 mins : TOF MS ¹ (100-150... Item description: Metanol 70% 
Modo: Negativo	
Fragmentos: 314.042816 299.019958 623.162170 623.204834 315.054077	
Referencia: MoNA - MassBank de América del Norte	

Fuente: Propia

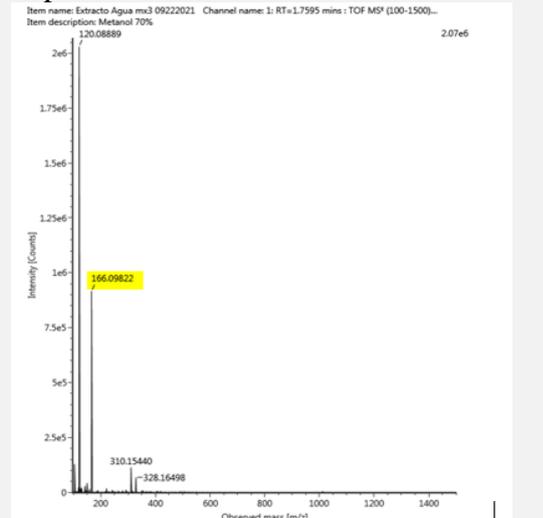
Tabla 24. Eriodictyol-7-O-β-D-methyl-glucuronopyranodise identificado en extracto de metanol.

Nombre: Eriodictyol-7-O-β-D-methyl-glucuronopyranodise	Grupo: Flavonoide
Masa Neutral: 478,11113	Espectro: 
Modo: Negativo	
Fragmentos: 177.0519 484.1387	
Referencia: MoNA - MassBank de América del Norte	

Fuente: Propia

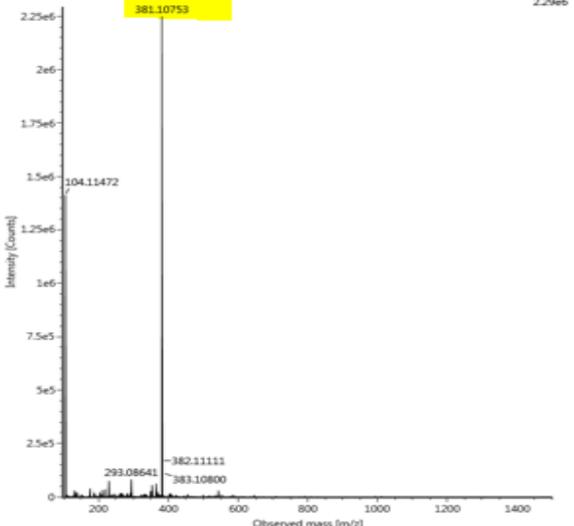
4.4.1.2 Alcaloides.

Tabla 25. Gentiatibetine identificado en extracto de agua.

Nombre: Gentiatibetine	Grupo: Alcaloide
Masa Neutral: 165,07898	Espectro: 
Modo: Positivo	
Fragmentos: 120.0812 166.0861 131.0494 107.0497 149.0594	
Referencia: Metlin, semanticscholar	

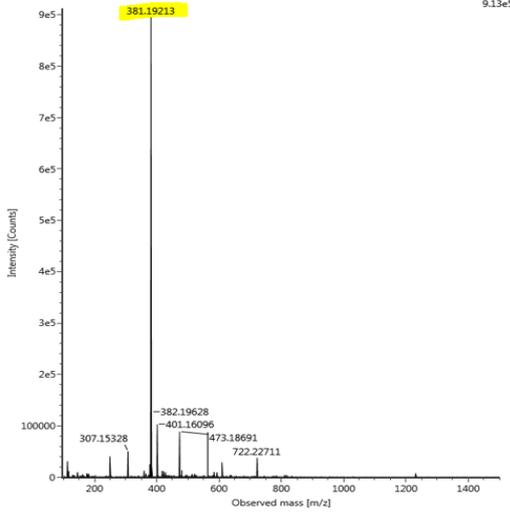
Fuente: Propia.

Tabla 26. Vomisine identificado en extracto de agua.

Nombre: Vomicine	Grupo: Alcaloide
Masa Neutral: 380,17361	Espectro: Item name: Extracto Agua ms3 09222021 Channel name: 1: RT=0.6738 mins : TOF MS ¹ (100-1500)... Item description: Metanol 70% 
Modo: Positivo	
Fragmentos: 160.075455 382.183807 383.185028	
Referencia: Metlin, SpectraBase	

Fuente: Propia.

Tabla 27. Isocorynoxine identificado en extracto de agua.

Nombre: Isocorynoxine	Grupo: Alcaloide
Masa Neutral: 382,18926	Espectro: Item name: Extracto Agua ms3 09222021_1 Channel name: 1: RT=4.4976 mins : TOF MS ¹ (100-1500)... Item description: Metanol 70% 
Modo: Negativo	
Fragmentos: 159.9000 241.1326 187.0858 172.0744 353.1828	
Referencia: Ncbi, Chemical and Pharmaceutical Bulletin Advance Publication	

Fuente: Propia.

Tabla 28. Uncarine A identificado en extracto de agua.

Nombre: Uncarine A	Grupo: Alcaloide
Masa Neutral: 368,17361	Espectro:
Modo: Negativo	
Fragmentos: 369.18243 160.07559 187.08575 337.15482 369.23843	
Referencia: Metlin, PubChem	

Fuente: Propia.

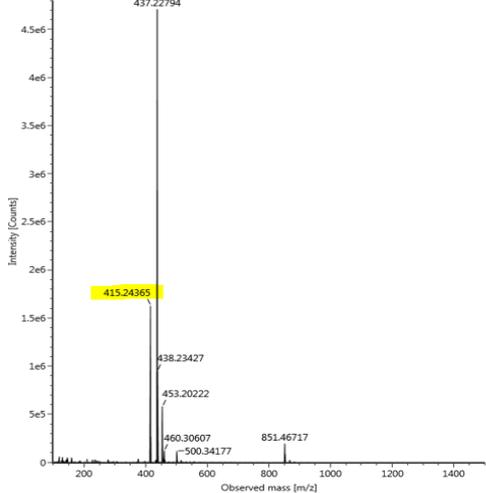
4.4.1.3 Terpenoides.

Tabla 26. Dehydroabietic acid identificado en extracto de agua.

Nombre: Dehydroabietic acid	Grupo: Terpenoide
Masa Neutral: 300,20893	Espectro:
Modo: Positivo	
Fragmentos: 133.100266 109.100365 131.085251 145.100922 67.054420	
Referencia: PubChem	

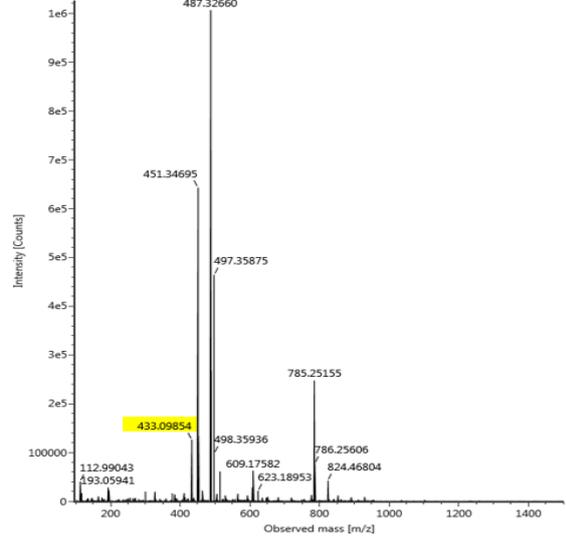
Fuente: Propia.

Tabla 29. Nigakihemiacetal F identificado en extracto de agua y metanol.

Nombre: Nigakihemiacetal F	Grupo: Terpenoide
Masa Neutral: 392,21989	Espectro: Item name: Extracto Metanol mx1 09222021 Channel name: 1: RT=11.9424 mins : TOF MS ⁺ (100-15... Item description: Metanol 70% 
Modo: Positivo	
Fragmentos: 375.1808 303.1203 437.1907 329.1753	
Referencia: HMDB	

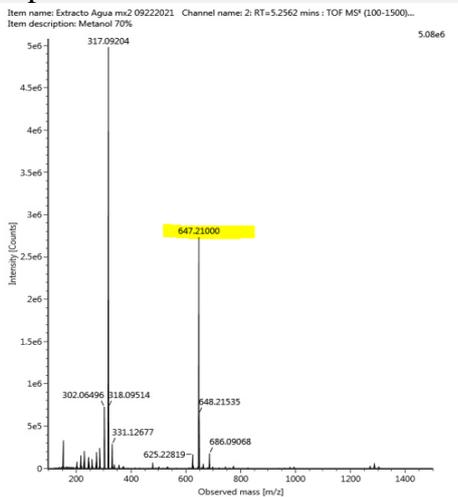
Fuente: Propia.

Tabla 30. Centaurepensin identificado en extracto de agua.

Nombre: Centaurepensin	Grupo: Terpenoide
Masa Neutral: 434,08991	Espectro: Item name: Extracto Agua mx2 09222021_1 Channel name: 1: RT=5.0842 mins : TOF MS ⁺ (100-150... Item description: Metanol 70% 
Modo: Negativo	
Fragmentos: 279.1 201.2	
Referencia: Metlin, MoNA - MassBank	

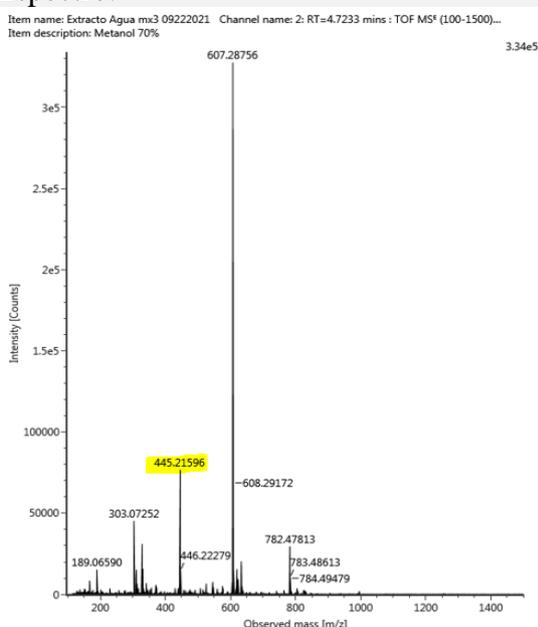
Fuente: Propia.

Tabla 31. Oleanic acid-3-O-β-D-(6'-O-methyl) glucuronide identificado en extracto de agua.

Nombre: Oleanic acid-3-O-β-D-(6'-O-methyl) glucuronide	Grupo: Terpenoide
Masa Neutral: 646,40808	Espectro: Item name: Extracto Agua mx2 09222021 Channel name: 2: RT=5.2562 mins : TOF MS ⁺ (100-1500)... Item description: Metanol 70% 
Modo: Positivo	
Fragmentos: 455.3489 911.7164	
Referencia: Metlin, MoNA – MassBank, HMDB	

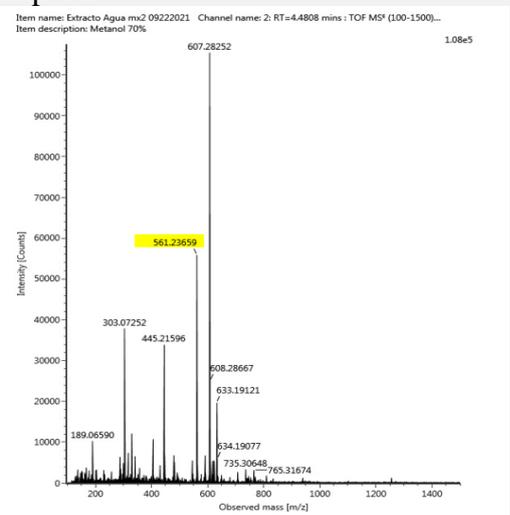
Fuente: Propia.

Tabla 32. Picrasin F identificado en extracto de agua.

Nombre: Picrasin F	Grupo: Terpenoide
Masa Neutral: 422,19407	Espectro: Item name: Extracto Agua mx3 09222021 Channel name: 2: RT=4.7233 mins : TOF MS ⁺ (100-1500)... Item description: Metanol 70% 
Modo: Positivo	
Fragmentos: 405.1913 429.2101 212.1043 141.7386	
Referencia: Metlin, J - Global	

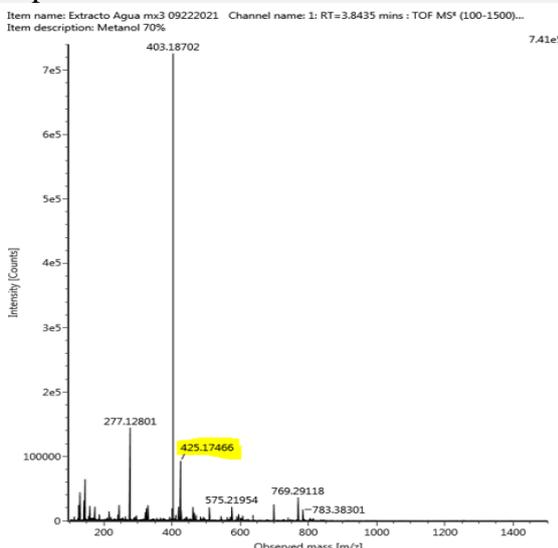
Fuente: Propia.

Tabla 33. Tanegoside B identificado en extracto de agua.

Nombre: Tanegoside B	Grupo: Terpenoide
Masa Neutral: 538.20503	Espectro: 
Modo: Positivo	
Fragmentos: 375.14453 583.20312 328.11688 179.06554 327.13425	
Referencia: PubChem, MoNa MassBank	

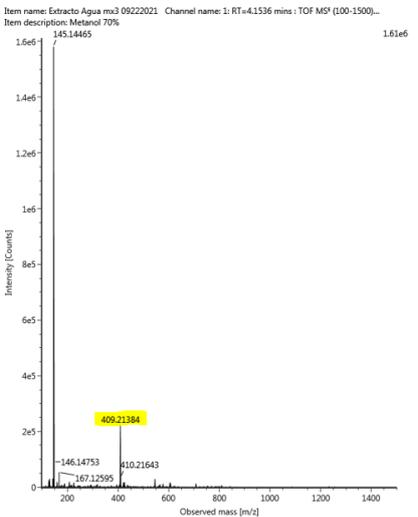
Fuente: Propia.

Tabla 34. Ginkgolide J identificado en extracto de agua.

Nombre: Ginkgolide J	Grupo: Terpenoide
Masa Neutral: 424,13695	Espectro: 
Modo: Positivo	
Fragmentos: 113.0241 125.0248 309.0646 347.1201	
Referencia: MoNa MassBank	

Fuente: Propia.

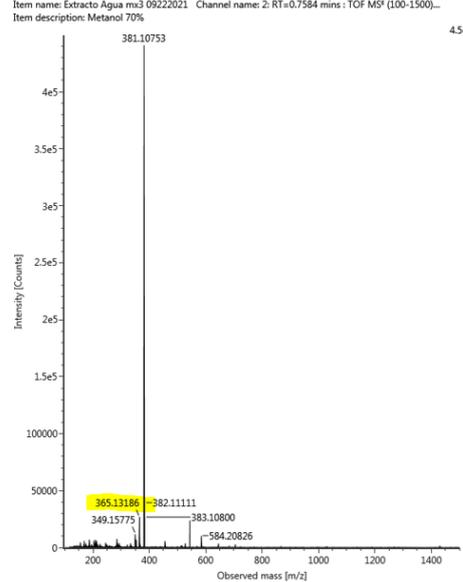
Tabla 35. Roseoside identificado en extracto de agua.

Nombre: Roseoside	Grupo: Terpenoide
Masa Neutral: 386,19407	Espectro: 
Modo: Positivo	
Fragmentos: 207.138336 95.084488 225.149826 123.080757 149.094864	
Referencia: PubChem, SpectraData Base	

Fuente: Propia.

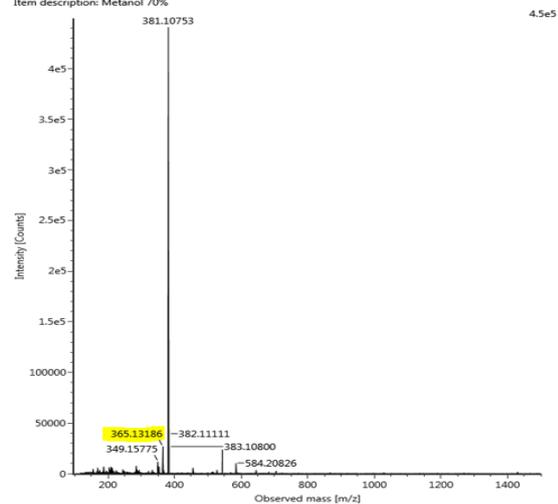
4.4.1.4 Disacáridos.

Tabla 36. α – kojibiose identificado en extracto de agua.

Nombre: α – kojibiose	Grupo: Disacárido
Masa Neutral: 342,11621	Espectro: 
Modo: Positivo	
Fragmentos: 343.1196 344.1205 365.10499	
Referencia: Metlin, PubChem, Pubmed	

Fuente: Propia.

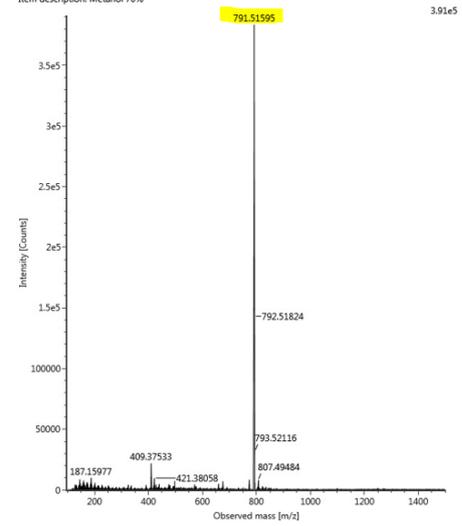
Tabla 37. Sucrose identificado en extracto de metanol.

Nombre: Sucrose	Grupo: Disacárido
Masa Neutral: 342,11621	Espectro: Item name: Extracto Agua m/z 09222021 Channel name: 2: RT=0.7584 mins : TOF MS ⁺ (100-1500)... Item description: Metanol 70% 
Modo: Positivo	
Fragmentos: 341.1084 71.0149 89.0247 101.0245 179.0558	
Referencia: Metlin, PubChem	

Fuente: Propia.

4.4.1.5 Saponinas.

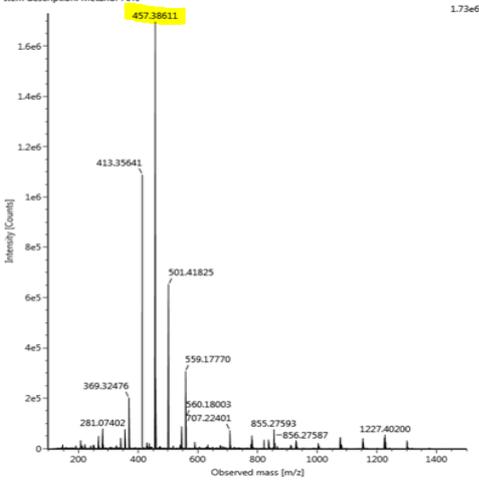
Tabla 38. Curculigo Saponin C identificado en extracto de agua.

Nombre: Curculigo Saponin C	Grupo: Saponina
Masa Neutral: 768,46599	Espectro: Item name: Extracto Agua m/z 09222021 Channel name: 2: RT=9.2212 mins : TOF MS ⁺ (100-1500)... Item description: Metanol 70% 
Modo: Positivo	
Fragmentos: 409.34587 751.46177 675.37560	
Referencia: HMDB, Metlin	

Fuente: Propia.

4.4.1.6 Cumarinas.

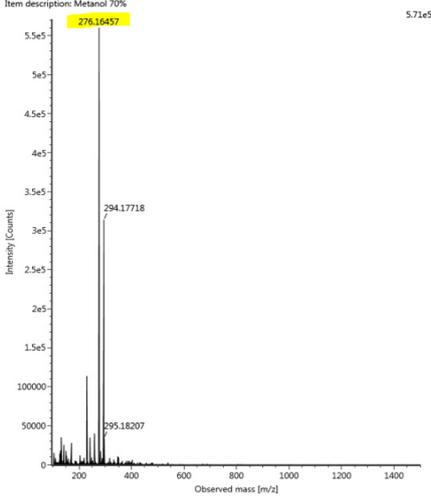
Tabla 39. Apiosylskimmin identificado en extracto de agua.

Nombre: Apiosylskimmin	Grupo: Cumarina
Masa Neutral: 456,12678	Espectro: <small>Item name: Extracto Metanol m1.09222021 Channel name: 2: RT=18.0619 mins : TOF MS⁺ (100-15...</small> <small>Item description: Metanol 70%</small> 
Modo: Positivo	
Fragmentos: 163.038879 164.041931 325.091888 119.048996 107.049461	
Referencia: HMDB, PubChem	

Fuente: Propia.

4.4.1.7 Aminoácidos.

Tabla 40. Heterodendrin identificado en extracto de agua.

Nombre: Heterodendrin	Grupo: Aminoácido
Masa Neutral: 261,12124	Espectro: <small>Item name: Extracto Agua m1.09222021 Channel name: 1: RT=1.1391 mins : TOF MS⁺ (100-1500)...</small> <small>Item description: Metanol 70%</small> 
Modo: Positivo	
Fragmentos: 260.1140 262.1285 226.1085 131.5679 30611.94	
Referencia: Metlin, PubChem	

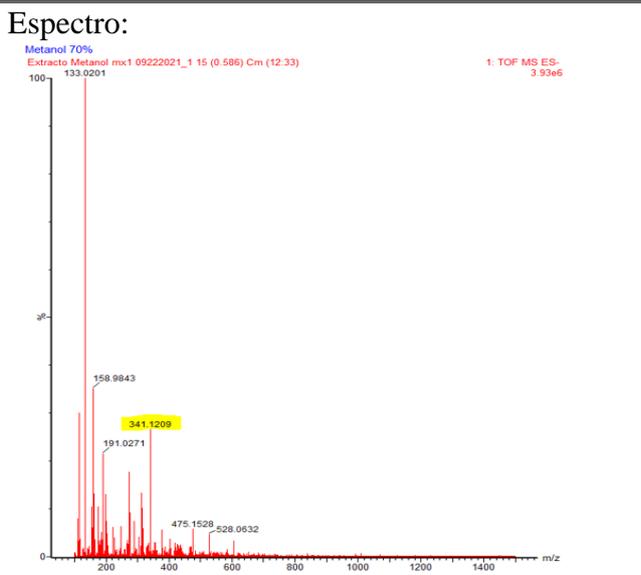
Fuente: Propia.

4.4.2 Resultados para la identificación de Compuestos Fenólicos.

Se identificó diversos metabolitos secundarios con relación entre sí al seguir la metodología descrita para compuestos fenólicos en UPLC, se obtuvo los siguientes compuestos con presencia representativa cualitativa en cada una de las muestras de los extractos de la especie *Urospatha sagittifolia* (Rudge) Schott (antigua *Dracontium*). Los solventes utilizados fueron de fundamental importancia debido a su polaridad y afinidad con cada metabolómica presente en la planta. De este modo a continuación, presentamos una serie de tablas con su respectiva información espectral.

4.4.2.1 Compuesto Fenólicos

Tabla 41. Cumambrin A identificado en extracto de agua.

Nombre: Cumambrin A	Grupo: Compuesto Fenólico
Masa Neutral: 306.14672	Espectro: 
Modo: Positivo	
Fragmentos: 291.1232 289.1440 247.1334 265.1440	
Referencia: TMIC	

Fuente: Propia

Tabla 42. Narirutin identificado en extracto de agua.

Nombre: Narirutin	Grupo: Compuesto Fenólico
Masa Neutral: 580.27921	Espectro:
Modo: Positivo	
Fragmentos: 272.0630 151.0014 579.1707 419.1459 435.5712	
Referencia: HMDB, MoNa MassBank	

Fuente: Propia.

Tabla 43. Uncarine A identificado en extracto de agua y metanol.

Nombre: Uncarine A	Grupo: Compuesto Fenólico
Masa Neutral: 368.17361	Espectro:
Modo: Negativo	
Fragmentos: 369.18243 999 160.07559 174 187.08575 53 337.15482 42 369.23843 30	
Referencia: MoNa MassBank	

Fuente: Propia

Tabla 44. Vomicine identificado en extracto de agua y metanol.

Nombre: Vomicine	Grupo: Compuesto Fenólico
Masa Neutral: 380.17361	Espectro:
Modo: Positivo	
Fragmentos: 160.07545 283.02812 191.05903	
Referencia: HMDB, Metlin	

Fuente: Propia

4.4.2.2 Flavonoides.

Tabla 45. Kurarinone identificado en extracto de agua.

Nombre: Kurarinone	Grupo: Flavonoide
Masa Neutral: 438.20424	Espectro:
Modo: Positivo	
Fragmentos: 179.07397 164.05022 473.17425	
Referencia: PubChem, Metlin	

Fuente: Propia.

Tabla 46. Quercetagenin-3,4-dimethyl ether identificado en extracto de agua.

Nombre: Quercetagenin-3,4-dimethyl ether	Grupo: Flavonoide
Masa Neutral: 346.06887	Espectro:
Modo: Positivo	
Fragmentos: 194.06128 331.04548 317.02976 495.11390	
Referencia: HMDB	

Fuente: Propia.

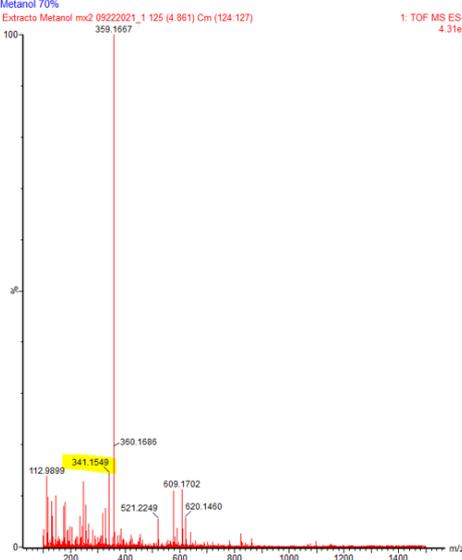
4.4.2.3 Terpenoides.

Tabla 47. Lucidenic acid A identificado en extracto de agua.

Nombre: Lucidenic acid A	Grupo: Terpenoide
Masa Neutral: 458.26684	Espectro:
Modo: Negativo	
Fragmentos: 441.2641 423.2535 254.0967	
Referencia: Metlin	

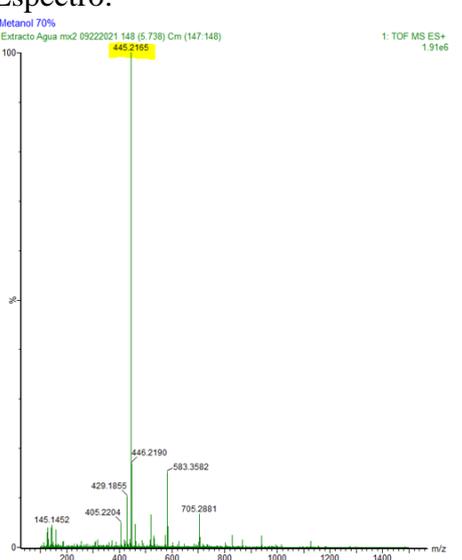
Fuente: Propia.

Tabla 48. Ergolide identificado en extracto de agua.

Nombre: Ergolide	Grupo: Sesquiterpenoides
Masa Neutral: 306.14672	Espectro: Metanol 70% Extracto Metanol m/z 09222021_1 125 (4.861) Cm (124.127) 1. TOF MS ES- 4.31e5 
Modo: Negativo	
Fragmentos: 213.1386 159.0320 341.1126	
Referencia: Metlin, HMDB	

Fuente: Propia.

Tabla 49. Bruceine E_1 identificado en extracto de agua.

Nombre: Bruceine E_1	Grupo: Terpenoide
Masa Neutral: 412.1733	Espectro: Metanol 70% Extracto Agua m/z 09222021_148 (5.738) Cm (147.148) 1. TOF MS ES+ 1.91e6 
Modo: Positivo	
Fragmentos: 381.1544 393.1543 353.2052 265.1517	
Referencia: HMDB	

Fuente: Propia

4.4.2.4 Alcaloides.

Tabla 50. Strychnine identificado en extracto de agua.

Nombre: Strychnine	Grupo: Alcaloide
Masa Neutral: 334.16813	Espectro:
Modo: Positivo	
Fragmentos: 149.0629 184.0757 264.1019 335.1755	
Referencia: Metlin, PubChem	

Fuente: Propia.

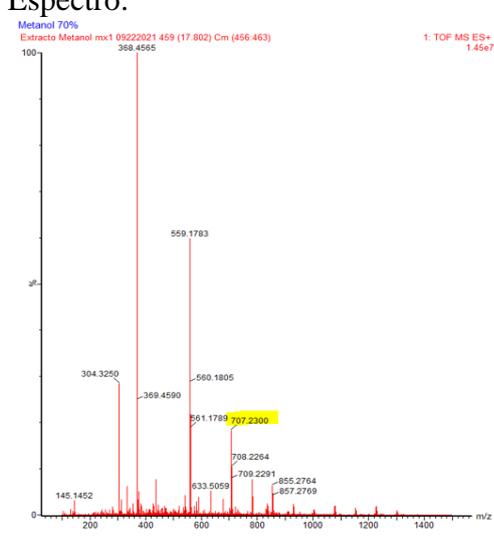
Tabla 51. Isocorynoxine identificado en extracto de agua.

Nombre: Isocorynoxine	Grupo: Alcaloide
Masa Neutral: 382.18926	Espectro:
Modo: Negativo	
Fragmentos: 293.04979 167.03772 249.13850 241.12289	
Referencia: MoNa MassBank	

Fuente: Propia.

4.4.2.5 Antocianinas.

Tabla 52. Delphin identificado en extracto de metanol.

Nombre: Delphin	Grupo: Antocianina
Masa Neutral: 662.12498	Espectro:  <p>Metanol 70% Extracto Metanol mx1 09222021 459 (17.802) Cm (456.463) 1: TOF MS ES+ 1.45e7</p>
Modo: Negativo	
Fragmentos: 625.2708 609.1456 300.029 301.0373	
Referencia: MoNa MassBank	

Fuente: Propia.

4.4.3. Resultados de metabolitos secundarios identificados

Tabla 53. Resultados generales de metabolitos secundarios identificados.

N°	Compuesto	Masa Neutral	Fragmentos	Tiempo de Retención	Modo de ionización
1	Apiin	564,14701	433.11130, 271.05920	12.88	Positivo
2	Isorhamnetin	316.05830	317.0817,318.0782, 686.0703,319.0872, 315.0577	2.84	Positivo
3	Isorhamnetin-3-O-neohesperidoside	624,16903	314.042816,299.0199, 623.162170,623.2048, 315.054077	5.27	Negativo
4	Quercetin-3-O-neohesperidoside	610,15338	300.026703,271.0240, 255.029343,301.3079, 272.028473	4.77	Negativo
5	Quercetin-7-O- [β -D-glucopyranosyl (1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranoside]	626,14830	303.0502,304.0547,44 9.1114,465.1163, 466.1117	5.27	Negativo
6	Quercetin	302,04256	271.0612,301.0347 273.0417,302.0432 119.053,151.0039	4.72	Positivo
7	Rhamnetin	316,05830	317.08,318.103, 686.0457,319.0313, 315.09	5.29	Positivo
8	Yuankanin	578,16356	579.1669,580.1678, 581.1712	6.66	Negativo
9	Kaempferol-3-glucuronide	464,09548	286.0430,461.0713, 229.0455, 113.0231	5.03	Positivo
10	Kaempferol-3,7-diglucoside	610,15338	431.0978, 449.1084, 593.1506, 285.0399	4.74	Positivo

N°	Compuesto	Masa Neutral	Fragmentos	Tiempo de Retención	Modo de ionización
11	Arecatannin A2	1154,3692	562.2107,421.1357, 215.12.12, 197.1118	2.80	Negativo
12	Eriodictyol-7-O-β-D-methyl-glucuronopyranodise	478,11113	177.0519 484.1387	5.01	Negativo
13	Gentiatibetine	154,07898	120.0812,166.0861, 131.0494,107.0497, 149.0594	1.75	Positivo
14	Vomicine	380,17361	160.07545,382.18380, 383.18502	0.67	Positivo
15	Isocorynoxine	382,18926	159.9000,241.1326, 187.0858,172.0744, 353.1828	4.49	Negativo
16	Uncarine	368,17361	369.18243,160.07559 187.08575,337.15482 369.23843	3.41	Negativo
17	Dehydroabietic acid	300,20893	133.100266,109.1003, 131.085251,145.1092, 67.054420	14.97	Positivo
18	Nigakihemiacetal F	392,21889	375.1808,303.1203, 437.1907,329.1753	11.94	Positivo
19	Centaurepensin	434,08991	279.1, 202.2	5.08	Negativo
20	Oleanic acid-3-O-β-D-(6'-O-methyl) glucuronide	646,40808	455.3489 911.7164	5.25	Positivo

N°	Compuesto	Masa Neutral	Fragmentos	Tiempo de Retención	Modo de ionización
21	Picrasin F	422,19407	405.1913,429.2101, 212.1043,141.7386	4.27	Positivo
22	Tanegoside B	538,20503	375.14453,583.20312, 328.11688,179.06554, 327.13425	4.48	Positivo
23	Ginkgolide J	424,13695	113.0241,125.0248, 309.0646, 347.1201	3.84	Positivo
24	Roseoside	386,19407	207.138336,95.084488 ,225.149826,123.0807 57,149.094864	4.15	Positivo
25	α – kojibiose	342,11621	343.1196,344.1205, 365.10499	0.75	Positivo
26	Sucrose	342,1162	341.1084,71.0149, 89.0247,101.0245, 179.0558	0.78	Positivo
27	Curculigo Saponin C	768,46599	409.34587,751.46177, 675.37560	9.22	Positivo
28	Apiosylskimmin	456,12678	163.038879,164.04193 1,325.091888,119.048 996,107.049461	18.06	Positivo
29	Heterodendrin	261,12124	260.1140,262.1285,22 6.1085,131.5679, 30611.94	1.13	Positivo
30	Cumambrin A	306,14672	291.1232,289.1440, 247.1334,265.1440	0.58	Positivo
N°	Compuesto	Masa Neutral	Fragmentos	Tiempo de Retención	Modo de ionización
31	Narirutin	580,27921	272.0630,151.0014, 579.1707,419.1459, 435.5712	5.32	Positivo
32	Kurarinone	438,20424	179.07397,164.05022, 473.17425	5.08	Positivo
33	Quercetagetin-3,4- dimethyl ether	346,06887	194.06128,331.04548, 317.02976, 495.11390	8.89	Positivo
34	Lucidenic acid A	458,26684	441.2641,423.2535, 254.0967	5.73	Negativo
35	Ergolide	306,14672	213.1386,159.0320, 341.1126	4.86	Negativo
36	Bruceine E_1	412,1733	381.1544,393.1543, 353.2052,265.1517	5.73	Positivo
37	Strychnine	334,16813	149.0629,184.0757, 264.1019,335.1755	3.84	Positivo
38	Delphin	662,12498	625.2708,609.1456, 300.029,301.0373	17.802	Negativo

Fuente: Propia.

4.5 Verificación de la Hipótesis.

En la presente investigación se realizaron 3 principales análisis a cada una de las muestras obtenidas de la planta; como: screening fitoquímico, espectrofotométrica UV-vis y UPLC tándem en las distintas etapas de maduración, con el fin de conocer la influencia de la actividad antiofídica con cada uno de los metabolitos secundarios presentes en la planta estudiada. Para lo cual, una vez realizado el análisis estadístico se obtuvo la aceptación de la hipótesis alternativa, estimando así la presencia de grupos metabolómicas en todos los extractos utilizados de la especie *Urospatha sagittifolia* (Rudge) Schott.

Por tal razón, se presenta en la tabla 52 el ensayo de Bartlett utilizado con un valor de p de (0.7326) que ayuda a comprobar la homogeneidad de varianza en los tratamientos anteriormente realizados, con lo cual se continuó a realizar un ensayo estadístico tipo Anova como indica la tabla 53 utilizando una confiabilidad del 95% y $p = 0.991$, lo que indica que en los tratamientos realizados con los diferentes extractos no existen diferencia significativa por lo que se rechaza la hipótesis alternativa. Por tal motivo, se realiza un nuevo ensayo estadístico de Kruskal-Wallis, para lo cual, se evidencia en la tabla 54 que dicho ensayo presenta un valor $p = (0.0005418)$ permitiendo comprobar las diferencias significativas por lo que se aceptó la hipótesis alternativa indicando que al menos uno de los extractos de diferente maduración, tiene actividad alexitéro según los datos obtenidos con los extractos de agua y metanol en todo el proceso metodológico.

Tabla 53. Ensayo de Bartlett etapas.

Ensayo de Bartlett	
Test estadístico:	0.6471
Grados de libertad:	2
Valor de P:	0.7236

Fuente: Propia

Tabla 54. Test de Anova.

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor de F	Pr (>f)
Factor (etapa)	2	0.24	0.118	0.010	0.991
Error residual	24	297.88	12.41		

Fuente: Propia

Tabla 55. Ensayo de Kruskal-Wallis.

Ensayo de Kruskal-Wallis	
Test estadístico:	15.0414
Grados de libertad:	2
Valor de P:	0.0005418

Fuente: Propia

4.6 Discusión.

El efecto antiofídico ha sido evaluado en diversas ocasiones en estudios referentes a plantas medicinales, cuya finalidad es ser empleados como medicina alternativa para tratar distintas enfermedades patológicas debido a su baja toxicidad para el organismo. Por tal motivo, el presente estudio tiene como propósito identificar los metabolitos secundarios presentes en los extractos de agua, metanol, hexano y cloroformo de la raíz de la especie *Urospatha sagittifolia* (Rudge) Schott (antigua *Dracontium*) mediante varios métodos analíticos.

A *Urospatha sagittifolia* se le atribuyen distintas propiedades curativas con mayor similitud a *Dracontium lorentense*, como es el caso de ser antitumorales, antiofídicas, antibacterianas, antioxidantes, antitrómbicos, antihemorrágicos, antiinflamatorias, estimulantes del sistema inmune, entre otros. Dichas especies son muy utilizadas por los pobladores pertenecientes a la región amazónica. Por esta razón, existen investigaciones como la “Determinación de Fenoles y Flavonoides totales en hojas de guayabo (*Psidium guajava* L.)”[192], “Uncaria tomentosa: A Review on Traditional Uses, Bioactive Chemical Constituents and Pharmacological and Toxicological Activities”[193] y “Química de las plantas alexitéras”[194], [195] en la cual, señalan

que las características que deben contener las plantas para ser consideradas como alexíteras es la presencia de fenoles, alcaloides y flavonoides, los mismos compuestos que presentan *Urospatha sagittifolia* (Rudge) Schott (antigua *Dracontium*) y especies como *Dracontium lorentense* (Jergón Sacha), ya que actúan como neutralizantes para el veneno de serpientes *B. atrox*.

De esta manera, se menciona la relación existente entre los metabolitos secundarios de especies con actividad antivenómica y los resultados obtenidos en esta investigación. De tal forma que la presencia de compuestos metabolitos a mencionar, poseen actividad antiofídica al estar presentes en plantas alexitéricas como: limonene en *Aloysia citriodora*[196], Quercetina en *Psidium guajava*[197], Kaempferol y sus derivados en *Oenothera rosea* “Chupasangre”[198], *Arcacia Hindolsii*[199], *E. Faetidum* o *Flaveria bidentis*[200], Gentiaticetine en *H. olivascens* y *H. jamesonii*[193], Luteolina y Apiin en *L. salsa* (Verbenaceae)[198], Ác. Octánico en *Corynaea crassa* (Balanophoraceae)[199]–[201] y Cumambrin en *Lactuca serriola* misma que actúa como efecto antiofídico en serpientes y escorpiones[202].

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones.

- El método propuesto para la obtención de los extractos fue basado en la extracción Sólido-Líquido y por maceración, así como fueron los reportes bibliográficos referentes a *Urospatha sagittifolia* (Rudge) Schott (antigua *Dracontium*).
- La planta seleccionada se caracterizó mediante screening fitoquímico obteniendo resultados de precipitados y color, espectrofotometría UV-vis expresado en mg de ácido gálico (0.001 mg de ac. gálico / 100 g de muestra) y catequina (0.025 mg de catequina / 100 g de muestra), y por último en Uplc-QToF dando como resultado valores espectrales en ionización positiva y negativa para cada uno de los metabolitos secundarios analizados con presencia de varios compuestos de grupos metabólicos como saponinas, cumarinas, antocianinas, alcaloides, terpenoides, azúcares reductores, esteroides, compuestos fenólicos y flavonoides que intervienen en la reducción de hemólisis generado por el veneno de *Bothrops atrox*.
- Los sueros antiofídicos pertenecientes a extractos naturales tienen actividad anti hemolítica, antibacteriana y antiofídica, por lo cual el contenido de flavonoides y polifenoles en los extractos de agua y metanol obtenido de las raíces de las muestras vegetales, indica que son la parte de la planta que posee mayor cantidad de estos compuestos, lo que concuerda con el uso tradicional del fruto de esta especie como alexítera. De este modo, la efectividad de los extractos de las plantas de la especie *Urospatha sagittifolia* (Rudge) Schott (antigua *Dracontium*) es eficaz para validar la utilidad de los mismos como una ayuda de carácter profiláctico en el tratamiento del envenenamiento por mordeduras de serpientes.
- Se encontraron compuestos tentativos con mayor reincidencia en las tres etapas de maduración de la planta tanto en similitud en los extractos de agua y metanol, reconocidos en el sistema de información científica UNIFI y

comparados en portales como Metlin, Mzcloud, Pubchem, Monafiehnlab, Spectrabase, The Human Metabolome Database (HMDB), los compuestos encontrados fueron: quercetin (Flavonoide), Apiin (Flavonoide), Rhamnetin (Flavonoide), Yuankanin (Flavonoide), Kaempferol (Flavonoide), Arecatannin (Flavonoide), Limocitrin (Flavonoide), Cumambrin (Compuesto Fenólico), Narirutin (Compuesto Fenólico), Uncarine (Compuesto Fenólico), Vomisine (Compuesto Fenólico), Gentiaticetine (Alcaloide), Isocorynoxine (Alcaloide), Strychnine (Alcaloide), Delphin (Antocianina), Apiosylskimmin (Cumarina), Curciligol Saponin (Saponina), Sucrose (Azúcar reductor), α -Kijibiose (Azúcar reductor), Tenacissoside (Esteroides), Nigakihemiacetal (Terpenoide), Picrasin (Terpenoide), Roseoside (Terpenoide), Bruceine (Terpenoide), ácido Lucidenic (Terpenoide), entre los principales con características antibacterianas, antiinflamatorias, antimicrobianas, antivenómicas, antitrombóticas.

5.2 Recomendaciones.

- Realizar el estudio con especies similares a *Urospatha sagittifolia* (Rudge) Schott (antigua *Dracontium*), para establecer la influencia en el rendimiento de su actividad antiofídica.
- Determinar qué tipo de secado y tiempo de maceración aumenta el contenido de metabolitos en cada uno de los extractos.

Bibliografía

- [1] V. García, J. Abril, D. Djibeyan, V. Andrade, and F. Ontaneda, “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 The Ecuadorian Amazon and its ancestral knowledge ; the use of the bark extract,” 2016.
- [2] M. García-González and C. O. Morales, “Análisis de la literatura sobre plantas medicinales en Costa Rica (1930-2001),” *Lankesteriana*, vol. 5, no. 1, pp. 3–40, 2005.
- [3] JENNY VERÓNICA CUEVA PUNGACHO, “INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD HEMOLÍTICA DEL VENENO DE *Bothrops atrox* POR LOS EXTRACTOS DE *Tabernaemontana sananho* Ruiz & Pav. Y *Mucuna cf. elliptica* (Ruiz&Pav.) DC.,” *Tesis*, pp. 1–100, 2017.
- [4] J. M. Gutiérrez *et al.*, “El suero antiofídico polivalente producido en Costa Rica: estabilidad y capacidad neutralizante,” *Rev. Costarric. Ciencias Médicas*, vol. 9, núm. 2, 1989., vol. 9, no. 2, pp. 155–169, 1988.
- [5] J. P. JARA CARMEM, LOZADA SILVIA, “Conocimientos, Actitudes Y Prácticas Sobre La Mordedura De Ofidio. Patuca-Morona Santiago, 2014 Tesis,” *Artic. Ecuador*, vol. 1, no. 5, pp. 1–127, 2014.
- [6] R. C. M. CARRIÓN, “INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD HEMOLÍTICA DEL VENENO DE *Bothrops atrox* POR LOS EXTRACTOS DE *Minthostachis cf. mollis* (Kunt) Griseb y *Pollalesta discolor* (Kunt) Aristeg.,” *Tesis*, pp. 1–100, 2017.
- [7] L. L. Rivera-parada and L. L. Rivera-parada, “Caracterización fitoquímica, farmacéutica y alimenticia de Papa culebrera india (*Dracontium spruceanum* (Schott) G.H.Zhu , Araceae) y Sande (*Brosimum utile* (Kunth) Oken , Moraceae) del Jardín Botánico de Plantas Medicinales del CEA de C ORPOAMAZONIA, Moc,” *Corporación para el Desarro. Sosten. del Sur la Amaz. CORPOAMAZONIA*, pp. 1–11, 2009.
- [8] F. O. Ochola, M. O. Okumu, G. M. Muchemi, J. M. Mbaria, and J. K. Gikunju, “Epidemiology of snake bites in selected areas of Kenya,” *Pan Afr. Med. J.*, vol. 29, 2018.
- [9] R. A. Harrison *et al.*, “Preclinical antivenom-efficacy testing reveals potentially disturbing deficiencies of snakebite treatment capability in East Africa,” *PLoS Negl. Trop. Dis.*, vol. 11, no. 10, Oct. 2017.
- [10] S. Jena, R. Swain, and P. P. Rout, “Herbal antidotes : A possible replacement for serum antivenom with effective lead compound using bioinformatics tools Plant Science Research Herbal antidotes : A possible replacement for serum antivenom with effective lead compound using bioinformatics to,” no. August, 2017.
- [11] J. B. Souza *et al.*, “Generation and In-planta expression of a recombinant single chain antibody with broad neutralization activity on *Bothrops pauloensis* snake venom,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 149, pp. 1241–1251, Apr. 2020.

- [12] H. Bailon Calderon *et al.*, “Neutralización de la actividad letal del veneno de serpiente *Bothrops atrox* por suero hiperinmune de llama (lama glama),” *Rev. Peru. Med. Exp. Salud Pública*, vol. 37, no. 3, pp. 446–53, Sep. 2020.
- [13] T. Omara, “Plants Used in Antivenom Therapy in Rural Kenya: Ethnobotany and Future Perspectives,” *Journal of Toxicology*, vol. 2020. Hindawi Limited, 2020.
- [14] C. Maldonado, N. Paniagua, R. Bussmann, F. Zenteno, and A. Fuentes, “La importancia de las plantas medicinales, su taxonomía y la búsqueda de la cura a la enfermedad que causa el Coronavirus (COVID-19),” *Ecol. en Bolív.*, vol. 55, no. 1, pp. 1–5, 2020.
- [15] N. Soria and P. Ramos, “Uso de plantas medicinales en la Atención Primaria de Salud en Paraguay: algunas consideraciones para su uso seguro y eficaz TT - Use of medicinal plants in Primary Health Care in Paraguay: some considerations for its safe and effective use,” *Mem. Inst. Invest. Cienc. Salud*, vol. 13, no. 2, pp. 8–17, 2016.
- [16] F. Andrade, A. Correa, N. García, V. Rodilla, V. Villagrasa, and G. Nuria Linares, *Plantas Medicinales*, vol. 291, no. April. 2020.
- [17] M. Gallegos, “Las plantas medicinales : usos y efectos en el estado de salud de la población rural de Ecuador,” p. 118, 2017.
- [18] D. Tarkowská, E. Krampolová, and M. Strnad, “Plant triterpenoid crosstalk: The interaction of brassinosteroids and phytoecdysteroids in *lepidium sativum*,” *Plants*, vol. 9, no. 10, pp. 1–8, Oct. 2020.
- [19] S. Ramon, C. R. Liz, and B. Cambronero, “Brotación de tubérculos, crecimiento y fenología de *Dracontium gigas*, San Ramón, Costa Rica Tuber sprouting , growth and phenology of *Dracontium gigas*,” vol. 14, no. 23, pp. 61–70, 2014.
- [20] I. Macalupu, “UNIVERSIDAD INCA GARCILASO DE LA VEGA Presentado por,” *Univ. Inca Garcilaso la Vega*, pp. 1–105, 2018.
- [21] J. Gómez-Cardona, C. Gómez-Cabal, and M. L. Gómez-Cabal, “Sueros antiofídicos en Colombia: análisis de la producción, abastecimiento y recomendaciones para el mejoramiento de la red de producción,” *Biosalud*, vol. 16, no. 2, pp. 96–116, 2017.
- [22] “¿Plantas contra mordeduras de serpientes_ ¡Aún no! - América Latina y el Caribe.” .
- [23] A. M. Torres, F. C. B. V. R. V. G. Ricciardi, and E. Dellacassa, *Plantas como antiveneno: del mito al logos*. 2017.
- [24] Ministerio de Salud Pública del Ecuador, “Manejo clínico del Envenamamiento por mordedura de serpientes venenosas y picadura de escorpiones,” *Minist. Salud Pública*, 2017.
- [25] B. E. Enriquez Guerrero, “Saberes y Prácticas Ancestrales sobre la curación de mordedura de serpientes,” *Occup. Med. (Chic. Ill.)*, vol. 53, no. 4, p. 130, 2017.
- [26] World Health Organization, “WHO Guidelines for the Production, Control and Regulation of Snake Antivenom Immunoglobulins,” 2016.

- [27] T. Omara *et al.*, “Antivenin plants used for treatment of snakebites in Uganda: Ethnobotanical reports and pharmacological evidences,” *Trop. Med. Health*, vol. 48, no. 1, Feb. 2020.
- [28] “Urospatha sagittifolia (Rudge) Schott, 1853 var. sagittifolia-Overview.” .
- [29] D. C. Zappi *et al.*, “Growing knowledge: an overview of Seed Plant diversity in Brazil,” *Rodriguésia*, vol. 66, no. 4, pp. 1085–1113, Oct. 2015.
- [30] Ministerio de Ambiente del Ecuador., Flora Web Ecuador, and Pontificia Universidad Católica del Ecuador, “Libro Rojo de Plantas Endémicas del Ecuador,” *Herbario QCA*, 2019. .
- [31] “U. sagittifolia (Rudge) Schott.” [Online]. Available: <http://herbario.up.ac.pa/Herbario/herb/vasculares/view/species/14811/tab/Colecciones/id/37750>.
- [32] “Urospatha sagittifolia (Rudge) Schott.” 2017.
- [33] RHNM, “Red de Herbarios del noroeste de México,” *Portal de internet*. 2020.
- [34] “Urospatha sagittifolia (Rudge) Schott,” 2020. [Online]. Available: <https://www.gbif.org/species/5330131>.
- [35] L. C. L. Tostes, Z. P. Miranda, and L. M. M. Carreira, “Morfologia Polínica de duas Espécies de Urospatha Schott (Araceae), Ocorrente no Estado do Amapá, Brasil,” *Biota Amaz.*, vol. 3, no. 2, pp. 68–73, 2013.
- [36] P. C. Manrique Holguín, “Evaluación in vitro del efecto antimicrobiano y citotóxico del extracto metanólico dracontium lorentense (jergón sacha) sobre cepas de candida albicans (ATCC®10231™), Streptococcus mutans (ATCC®25175™) y Streptococcus sanguinis (ATCC®10556™),” *Univ. Peru. Ciencias Apl.*, 2017.
- [37] “Dracontium spruceanum (Schott) GHZhu - La lista de plantas.” .
- [38] “Dracontium spruceanum (Schott) G.H.Zhu — The Plant List.” .
- [39] M. Lara-Ascencio, M. Andrade-Rodríguez, D. Guillén-Sánchez, H. Sotelo-Nava, and O. G. Villegas-Torres, “Establishment of in vitro aseptic culture of Philodendron xanadu Croat,” *Rev. Cienc. Agron.*, vol. 52, no. 2, pp. 1–9, 2021.
- [40] C. A. A. B. & D. C. Rodríguez, “PLANTAS CON PROPIEDADES ANTIOFÍDICAS DEL DEPARTAMENTO DEL CAQUETÁ-COLOMBIA,” 2021.
- [41] “Philodendron speciosum-1,” 2017. .
- [42] “XL Philodendron Speciosum X Bipinnatifidum Plant in 6” Pot – Kens Philodendrons,” 2020. .
- [43] H. L. Mason, “Araceae. Arum Family,” *A Flora of the Marshes of California*. pp. 324–327, 2021.
- [44] J. L. V. Lameiras *et al.*, “Neutralization of the edema-forming and myotoxic activities of the venom of Potamotrygon motoro Müller and Henle, 1841 (Chondrichthyes – Potamotrygoninae) by antivenoms and circulating

- immunoglobulins,” *Toxicon*, vol. 186, no. April, pp. 126–140, 2020.
- [45] C. L. Henriquez, T. Arias, J. C. Pires, T. B. Croat, and B. A. Schaal, “Phylogenomics of the plant family Araceae,” *Mol. Phylogenet. Evol.*, vol. 75, no. 1, pp. 91–102, 2014.
- [46] Abdullah *et al.*, “Chloroplast genome evolution in the Dracunculus clade (Aroideae, Araceae),” *Genomics*, vol. 113, no. 1, pp. 183–192, 2021.
- [47] N. da Costa Guimarães *et al.*, “Evaluation of the anti-snakebite, antimicrobial and antioxidant potential of *Philodendron megalophyllum* Schott (Araceae), traditionally used in accidents caused by snakes in the western region of Pará, Brazil,” *Toxicon*, vol. 184, no. May, pp. 99–108, 2020.
- [48] C. E. Carón, C. M. A, C. I. Reyes, D. Andi, and P. Francisco, “Etnobotánica Quichua,” vol. 6, pp. 29–55, 2005.
- [49] J. Scapinello *et al.*, “Antinociceptive and anti-inflammatory activities of *Philodendron bipinnatifidum* Schott ex Endl (Araceae),” *J. Ethnopharmacol.*, vol. 236, no. January, pp. 21–30, 2019.
- [50] J. Félix-Silva *et al.*, “Inhibition of local effects induced by *Bothrops erythromelas* snake venom: Assessment of the effectiveness of Brazilian polyvalent bothropic antivenom and aqueous leaf extract of *Jatropha gossypifolia*,” *Toxicon*, vol. 125, pp. 74–83, 2017.
- [51] “*Philodendron speciosum* · NaturaListaCO,” 2021. .
- [52] “*Philodendron speciosum* Schott ex Endl,” 2021. .
- [53] “*Philodendron speciosum* Schott ex Endl,” 2019. .
- [54] “*Philodendron speciosum*,” 2020.
- [55] F. J. Marin, O. L. Torres, G. G. Santafé, and S. M. Robledo, “Estudio Fitoquímico y Evaluación del Potencial Leishmanicida de la Especie *Esenbeckia litoralis* (Rutaceae),” *Inf. Tecnol.*, vol. 27, no. 1, pp. 159–168, 2016.
- [56] S. Rodés Reyes, D. Peña Fuentes, and R. Hermosilla Espinosa, “Tamizaje fitoquímico de extractos y tinturas al 20 % de la raíz y corteza de *Dichrostachys cinerea* L. (Marabú) TT - Phytochemical screening of extracts and 20 % tinctures from root and bark of *Dichrostachys cinerea* L. (Marabú),” *Rev. Cuba. plantas med*, vol. 20, no. 2, pp. 156–166, 2015.
- [57] L. Carvajal-Rojas, Y. Hata-Uribe, N. Sierra-Martinez, and D. Rueda-Niño, “Preliminart phytochemical analisis of Cupatá (*Strycnos schultesiana* krukoff) stems and seeds,” *Rev. Colomb. For.*, vol. 12, pp. 161–170, 2009.
- [58] A. O. Pacheco and J. M. Morán, “CARACTERIZACIÓN FÍSICA Y QUÍMICA DE EXTRACTOS TOTALES DE *Petiveria alliacea* L. con acción ANTIMICROBIANA,” pp. 1–21, 2018.
- [59] S. Albe Slabi *et al.*, “Multi-objective optimization of solid/liquid extraction of total sunflower proteins from cold press meal,” *Food Chem.*, vol. 317, p. 126423, Jul. 2020.
- [60] N. N. Hidayah and S. Z. Abidin, “The evolution of mineral processing in

extraction of rare earth elements using solid-liquid extraction over liquid-liquid extraction: A review,” *Miner. Eng.*, vol. 112, pp. 103–113, Oct. 2017.

- [61] R. Gul, S. U. Jan, S. Faridullah, S. Sherani, and N. Jahan, “Preliminary Phytochemical Screening, Quantitative Analysis of Alkaloids, and Antioxidant Activity of Crude Plant Extracts from *Ephedra intermedia* Indigenous to Balochistan,” *Sci. World J.*, vol. 2017, 2017.
- [62] S. Khalid, A. Shahzad, N. Basharat, M. Abubakar, and P. Anwar, “Phytochemical Screening and Analysis of Selected Medicinal Plants in Gujrat,” *J. Phytochem. Biochem.*, vol. 2, no. 1, pp. 2–4, 2018.
- [63] C. Á. Pazos Santos, Fabiola Valcárcel, “Estrategias y avances en el estudio de toxinas de interes para la biomedicina,” *Biotox*, vol. 66, no. January, pp. 37–39, 2015.
- [64] J. Pectoralis, S. Dulcis, G. Don, J. P. Jacq, and E. Dulcis, “Screening fitoquímico y evaluación de la actividad antimicrobiana de: *Catharanthus Roseus* (L .) G . Don ,” 2017.
- [65] K. Ammor, D. Bousta, S. Jennan, B. Bennani, A. Chaqroune, and F. Mahjoubi, “Phytochemical screening, polyphenols content, antioxidant power, and antibacterial activity of *herniaria hirsuta* from Morocco,” *Sci. World J.*, vol. 2018, 2018.
- [66] N. Aziman, N. Abdullah, Z. Mohd Noor, K. S. Zulkifli, and W. S. S. Wan Kamarudin, “Phytochemical constituents and in vitro bioactivity of ethanolic aromatic herb extracts,” *Sains Malaysiana*, vol. 41, no. 11, pp. 1437–1444, 2012.
- [67] S. B. Rahimah, D. D. Djunaedi, A. Y. Soeroto, and T. Bisri, “The phytochemical screening, total phenolic contents and antioxidant activities in vitro of white oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) preparations,” *Open Access Maced. J. Med. Sci.*, vol. 7, no. 15, pp. 2404–2412, Aug. 2019.
- [68] M. P. Maliński, M. A. Kikowska, A. Soluch, M. Kowalczyk, A. Stochmal, and B. Thiem, “Phytochemical screening, phenolic compounds and antioxidant activity of biomass from *lychnis flos-cuculi* L. In vitro cultures and intact plants,” *Plants*, vol. 10, no. 2, pp. 1–18, 2021.
- [69] D. Sri Rama Murthy, K.; Lakshmi, N.; Raghu Ramulu and ., “BIOLOGICAL ACTIVITY AND PHYTOCHEMICAL SCREENING OF THE OLEORESIN OF *Shorea robusta* Gaertn. f.,” *Trop. Subtrop. Agroecosystems*, vol. 14, no. 3, pp. 787–791, 1997.
- [70] R. S. Kumar, C. Venkateshwar, G. Samuel, and S. G. Rao, “Phytochemical Screening of some compounds from plant leaf extracts of *Holoptelea integrifolia* (Planch .) and *Celestrus emarginata* (Grah .) used by Gondu tribes at Adilabad District ,” vol. 2, no. 8, pp. 65–70, 2013.
- [71] M. Ismail, N.-U. Haq, S. Ali, R. Shaheen, and M. Ghulam, “Qualitative Analysis for Phytochemicals of Selected Medicinal Plants from Gilgit-Baltistan, Pakistan,” *Asian J. Chem.*, vol. 29, no. 8, pp. 1757–1760, 2017.
- [72] R. Roghini and K. Vijayalakshmi, “Phytochemical Screening, Quantitative

- Analysis of Flavonoids and Minerals in Ethanolic Extract of Citrus Paradisi,” *Int. J. Pharm. Sci. Res.*, vol. 9, no. 11, p. 4859, 2018.
- [73] M. J. Matos, L. Santana, E. Uriarte, O. A. Abreu, E. Molina, and E. G. Yordi, “Coumarins — An Important Class of Phytochemicals,” in *Phytochemicals - Isolation, Characterisation and Role in Human Health*, InTech, 2015.
- [74] T. Ojala, *Biological Screening of Plant Coumarins*, no. Aleksanterinkatu 5. 2018.
- [75] G. Jayapriya and F. Gricilda Shoba, “Screening for phytochemical activity of Urechites lutea plant,” *Pelagia Res. Libr. Asian J. Plant Sci. Res.*, vol. 4, no. 6, pp. 20–24, 2014.
- [76] I. A. Herrera-Fuentes, K. L. Quimis-Ponce, N. A. Sorroza-Rojas, F. S. García-Larreta, W. Mariscal-Santi, and R. E. Mariscal-García, “Determinación de Taninos y Cumarinas presente en la planta tres filos,” *Polo del Conoc.*, vol. 2, no. 7, p. 500, 2017.
- [77] Alejandro Martínez M., “Química de Productos Naturales: aspectos fundamentales del metabolismo secundario,” p. 393, 2020.
- [78] L. T. Them *et al.*, “Saponin, Polyphenol, Flavonoid content and α -glucosidase Inhibitory Activity, Antioxidant Potential of Launaea sarmentosa Leaves grown in Ben Tre province, Vietnam,” *IOP Conf. Ser. Mater. Sci. Eng.*, vol. 542, no. 1, p. 012036, Jun. 2019.
- [79] L. K. Muharrami, F. Munawaroh, T. Ersam, and M. Santoso, “PHYTOCHEMICAL SCREENING OF ETHANOLIC EXTRACT: a Preliminary Test on Five Medicinal Plants on Bangkalan,” *J. Pena Sains*, vol. 7, no. 2, pp. 96–102, 2020.
- [80] V. Balamurugan, R. Dhamotharan, and E. Sumathi, “Phytochemical screening, total tannin, saponin content and antibacterial activity of leaf extracts of Erythrina variegata. L.,” *Int. J. Curr. Res.*, vol. 10, no. 6, pp. 1–5, 2018.
- [81] B. M. P. Da Costa Cordeiro *et al.*, “Hexane extract from Spondias tuberosa (Anacardiaceae) leaves has antioxidant activity and is an anti-Candida agent by causing mitochondrial and lysosomal damages,” *BMC Complement. Altern. Med.*, vol. 18, no. 1, p. 284, Oct. 2018.
- [82] M. Mohlakoana and A. Moteetee, “Southern African Soap Plants and Screening of Selected Phytochemicals and Quantitative Analysis of Saponin Content,” *Resources*, vol. 10, no. 10, p. 96, 2021.
- [83] A. Ahumada, A. Ortega, D. Chito, and R. Benítez, “Saponinas de quinua (Chenopodium quinoa Willd.): un subproducto con alto potencial biológico,” *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, vol. 45, no. 3, pp. 438–469, 2016.
- [84] D. Carranco, “Análisis de las Propiedades Surfactantes de Saponinas Obtenidas de los Frutos de Sapindus saponaria L.,” 2017.
- [85] E. B. Garamendez Castillo and R. J. Marthans Rojas, “Determinación de la actividad de las sapogeninas presentes en Patalus mollis (pepino de mar) frente a Candida albicans,” *Repos. la Univ. Nac. Mayor San Marcos*, p. 9, 2020.

- [86] S. Hernández-Doño *et al.*, “Actividad larvicida de especies vegetales de la flora salvadoreña para el control de *Aedes aegypti* Larvicidal,” *Rev. Científica Multidiscip. La Univ. El Salvador - Rev. Minerva*, vol. 3, no. 1, pp. 65–80, 2020.
- [87] L. Marruffo, “Extracción de las saponinas obtenidas a partir de las hojas de *Baccharis Emarginata* para la elaboración de un champú biodegradable,” 2019.
- [88] W. Burga and C. Sangay, “Comparación de la concentración de saponinas entre *Chenopodium quinoa* ‘quinua’ y *Quillaja saponaria* ‘choloque,” p. 101, 2018.
- [89] S. Sankhalkar and V. Vernekar, “Quantitative and Qualitative analysis of Phenolic and Flavonoid content in *Moringa oleifera* Lam and *Ocimum tenuiflorum* L.,” *Pharmacognosy Res.*, vol. 8, no. 1, pp. 16–21, Jan. 2016.
- [90] J. Hayat *et al.*, “Phytochemical screening, polyphenols, flavonoids and tannin content, antioxidant activities and FTIR characterization of *Marrubium vulgare* L. from 2 different localities of Northeast of Morocco,” *Heliyon*, vol. 6, no. 11, p. e05609, Nov. 2020.
- [91] S. Osmić, S. Begić, and V. Mičić, “The Effect of Concentration of Methanol as a Solvent on the Antioxidative Activity of Sage Extract,” in *Lecture Notes in Networks and Systems*, vol. 42, Springer, 2019, pp. 480–490.
- [92] L. C. Chávez *et al.*, “SCREENIN G FITOQUIMICO DE FLAVONOIDES EN CLAVO HUASCA (*Tynanthus Polyanthus*. Sandwith Bureau) DE LA LOCALIDAD DE SAN BERNARDO, TAMBOPATA, MADRE DE DIOS, PERÚ,” *Biodivers. Amaz.*, 2021.
- [93] S. C. Martínez-Villegas *et al.*, “Estudio fitoquímico preliminar de la dieta caprina y determinación de flavonoides en leche de cabra,” *Alianzas y Tendencias BUAP*, vol. 6, no. 23, pp. 37–51, 2021.
- [94] J. S. Ramírez-Navas, “Extracción de flavonoides totales de la envoltura externa de cebolla roja (*Allium cepa*),” *UGCiencia*, vol. 22, no. 1, p. 119, 2016.
- [95] S. C. G. MOREANO, “Síntesis de nanopartículas de plata utilizando como agente reductor los flavonoides, polifenoles y azúcares reductores presentes en el extracto acuoso de las hojas de *Baccharis latifolia* (Chilca),” 2019.
- [96] T. Tyagi and M. Agarwal, “Phytochemical screening and GC-MS analysis of bioactive constituents in the ethanolic extract of *Pistia stratiotes* L. and *Eichhornia crassipes* (Mart.) solms,” *J. Pharmacogn. Phytochem.*, vol. 6, no. 1, pp. 195–206, 2017.
- [97] T. Akther, M. S. Khan, and S. Hemalatha, “Extraction of flavonoids from various parts of *couroupita guianensis* and its efficacy against pathogenic bacteria,” *Asian J. Pharm. Clin. Res.*, vol. 10, no. 4, pp. 354–358, 2017.
- [98] N. Jiangseubchatveera, S. Liawruangrath, A. Teerawutgulrag, D. Santiarworn, S. G. Pyne, and B. Liawruangrath, “Phytochemical screening, phenolic and flavonoid contents, antioxidant and cytotoxic activities of *Graptophyllum pictum* (L.) Griff,” *Chiang Mai J. Sci.*, vol. 44, no. 1, pp. 193–202, 2017.
- [99] J. Kurek, “Introductory Chapter: Alkaloids - Their Importance in Nature and for Human Life,” in *Alkaloids - Their Importance in Nature and Human Life*, IntechOpen, 2019.

- [100] D. J. Murphy, "Alkaloids," in *Encyclopedia of Applied Plant Sciences*, vol. 2, Elsevier Inc., 2016, pp. 118–124.
- [101] S. L. Taylor and S. L. Hefle, "Naturally Occurring Toxicants in Foods," in *Foodborne Diseases: Third Edition*, Elsevier Inc., 2017, pp. 327–344.
- [102] V. B. Ricciardi Verrastro, "Evaluación fitoquímica y biológica (actividades antimicrobiana y alexitérica) de extractos de *Cissampelos pareira*," *Univ. Nac. del Nord. Fac. Ciencias Exactas y Nat. y Agrimens.*, 2020.
- [103] D. C. Valoyes and L. Palacios Palacios, "Patrones de uso de las plantas medicinales en el Chocó y Cauca (Colombia)," *Cienc. en Desarro.*, vol. 11, no. 2, pp. 85–96, 2020.
- [104] B. S. Riveros, J. Luis, B. A. Manayay, and E. Aurora, "ACTIVIDAD DIURÉTICA DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE LAS HOJAS DE *Asclepia curassavica* (L) (GLOBITO) EN RATAS ALBINAS HOLTZMAN," 2020.
- [105] G. F. Biancucci and A. Strobl, "Manual de Procedimientos analíticos Toxicológicos Para Laboratorios de Baja Complejidad," p. 186, 2017.
- [106] G. Bian, T. Ma, and T. Liu, "In Vivo Platforms for Terpenoid Overproduction and the Generation of Chemical Diversity," in *Methods in Enzymology*, vol. 608, Academic Press Inc., 2018, pp. 97–129.
- [107] D. Tholl, "Biosynthesis and biological functions of terpenoids in plants," *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, vol. 148, pp. 63–106, 2015.
- [108] M. B. Isah, N. Tajuddeen, M. I. Umar, Z. A. Alhafiz, A. Mohammed, and M. A. Ibrahim, "Terpenoids as Emerging Therapeutic Agents: Cellular Targets and Mechanisms of Action against Protozoan Parasites," in *Studies in Natural Products Chemistry*, vol. 59, Elsevier B.V., 2018, pp. 227–250.
- [109] D. Jones, G. O. Ormondroyd, S. F. Curling, C. M. Popescu, and M. C. Popescu, "Chemical compositions of natural fibres," in *Advanced High Strength Natural Fibre Composites in Construction*, Elsevier Inc., 2017, pp. 23–58.
- [110] B. A. S. Reyes, E. C. Dufourt, J. Ross, M. J. Warner, N. C. Tanquilut, and A. B. Leung, "Selected Phyto and Marine Bioactive Compounds: Alternatives for the Treatment of Type 2 Diabetes," in *Studies in Natural Products Chemistry*, vol. 55, Elsevier B.V., 2017, pp. 111–143.
- [111] I. Letchumanan, S. C. B. Gopinath, and M. K. M. Arshad, "Natural resources for nanoparticle synthesis," in *Nanoparticles in Analytical and Medical Devices*, Elsevier, 2021, pp. 45–57.
- [112] D. A. Nagegowda and P. Gupta, "Advances in biosynthesis, regulation, and metabolic engineering of plant specialized terpenoids," *Plant Science*, vol. 294, Elsevier Ireland Ltd, May-2020.
- [113] D. Xuan Cuong *et al.*, "Tannins: Extraction from Plants," in *Tannins - Structural Properties, Biological Properties and Current Knowledge*, IntechOpen, 2020.
- [114] A. T. Morey *et al.*, "Antifungal Activity of Condensed Tannins from

- Stryphnodendron adstringens: Effect on Candida tropicalis Growth and Adhesion Properties,” *Curr. Pharm. Biotechnol.*, vol. 17, no. 4, pp. 365–375, Feb. 2016.
- [115] Q. Huang, X. Liu, G. Zhao, T. Hu, and Y. Wang, “Potential and challenges of tannins as an alternative to in-feed antibiotics for farm animal production,” *Anim. Nutr.*, vol. 4, no. 2, pp. 137–150, 2018.
- [116] R. Saengrayap, A. Tansakul, and G. S. Mittal, “Effect of far-infrared radiation assisted microwave-vacuum drying on drying characteristics and quality of red chilli,” *J. Food Sci. Technol.*, vol. 52, no. 5, pp. 2610–2621, Apr. 2015.
- [117] R. Naima *et al.*, “Comparison of the impact of different extraction methods on polyphenols yields and tannins extracted from Moroccan Acacia mollissima barks,” *Ind. Crops Prod.*, vol. 70, pp. 245–252, Aug. 2015.
- [118] M. Mattonai and E. Ribechini, “Fast screening for hydrolysable and condensed tannins in lignocellulosic biomass using reactive Py-GC/MS with in situ silylation,” *J. Anal. Appl. Pyrolysis*, vol. 135, no. May, pp. 242–250, 2018.
- [119] J. A. H. REYES, “INTENSIDAD DE PASTOREO Y CONTENIDO DE TANINOS, DEGRADABILIDAD RUMINAL Y DIGESTIBILIDAD IN VITRO DE PARASTREPHIA LEPIDOPHYLLA (WEDD) CABRERA,” 2013.
- [120] S. Vaca, A. González, Y. Maldonado, W. Fernandes, and P. Cuevas, “Importancia de los taninos en especies del género Quercus como metabolitos secundarios asociados a defensa contra insectos herbívoros,” *Biologicas*, vol. 18, no. 1, pp. 10–20, 2016.
- [121] D. R. R. Zevallos, “ESTUDIO FITOQUÍMICO CUALITATIVO PRELIMINAR Y CUANTIFICACIÓN DE FLAVONOIDEOS Y TANINOS DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE HOJAS DE Desmodium vargasianum Schubert PRELIMINARY QUALITATIVE FITOCHEMICAL STUDY AND QUANTIFICATION OF FLAVONOIDS AND TANNINS OF ETHANOLIC EXT,” *Rev Soc Quím Perú*, vol. 84, no. 2, 2017.
- [122] M. Landi, M. Tattini, and K. S. Gould, “Multiple functional roles of anthocyanins in plant-environment interactions,” *Environ. Exp. Bot.*, vol. 119, pp. 4–17, Nov. 2015.
- [123] L. J. Cooney, H. M. Schaefer, B. A. Logan, B. Cox, and K. S. Gould, “Functional significance of anthocyanins in peduncles of Sambucus nigra,” *Environ. Exp. Bot.*, vol. 119, pp. 18–26, Nov. 2015.
- [124] Y. Lin *et al.*, “Anthocyanins contribute to fruit defense against postharvest green mold,” *Postharvest Biol. Technol.*, vol. 181, Nov. 2021.
- [125] J. Martín, M. J. Navas, A. M. Jiménez-Moreno, and A. G. Asuero, “Anthocyanin Pigments: Importance, Sample Preparation and Extraction,” in *Phenolic Compounds - Natural Sources, Importance and Applications*, InTech, 2017.
- [126] L. Ngamwonglumlert, S. Devahastin, and N. Chiewchan, “Natural colorants: Pigment stability and extraction yield enhancement via utilization of

- appropriate pretreatment and extraction methods,” *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, vol. 57, no. 15. Taylor and Francis Inc., pp. 3243–3259, Oct-2017.
- [127] M. Rabanal-Atalaya and A. Medina-Hoyos, “Analysis of anthocyanins in the purple corn (*Zea mays* L.) from Peru and its antioxidant properties,” *Terra Latinoam.*, vol. 39, pp. 1–12, 2021.
- [128] H. E. Khoo, A. Azlan, S. T. Tang, and S. M. Lim, “Anthocyanidins and anthocyanins: Colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits,” *Food Nutr. Res.*, vol. 61, no. 1, 2017.
- [129] D. Li, P. Wang, Y. Luo, M. Zhao, and F. Chen, “Health benefits of anthocyanins and molecular mechanisms: Update from recent decade,” *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, vol. 57, no. 8, pp. 1729–1741, May 2017.
- [130] V. Bendokas *et al.*, “Anthocyanins: From plant pigments to health benefits at mitochondrial level,” *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, vol. 60, no. 19, pp. 3352–3365, Oct. 2020.
- [131] M. B. Condori, J. marcos A. Aro, V. J. Huamani, and R. C. Cutipa, “Antocianinas, compuestos fenólicos y capacidad antioxidante del mio – mio (*Coriaria ruscifolia* L.),” vol. 20, no. 4, pp. 419–428, 2018.
- [132] M. Aguilera-Otíz, M. del C. Reza-Vargas, R. G. Chew-Madinaveita, and J. A. Meza-Velázquez, “Propiedades Funcionales De Las Antocianinas,” *Biotecnia*, vol. 13, no. 2, p. 16, 2011.
- [133] G. Lenaz and M. L. Genova, “Quinones,” in *Encyclopedia of Biological Chemistry: Second Edition*, Elsevier Inc., 2013, pp. 722–729.
- [134] A. Laohavisit *et al.*, “Quinone perception in plants via leucine-rich-repeat receptor-like kinases,” *Nature*, vol. 587, no. 7832, pp. 92–97, Nov. 2020.
- [135] M. Körner, P. Slaby, and M. Albert, “Quinones shuffling the CARDS,” *Nature Plants*, vol. 6, no. 9. Nature Research, pp. 1074–1075, Sep-2020.
- [136] L. C. da S. Malheiros, J. C. P. de Mello, and W. L. R. Barbosa, “Eleutherine Plicata – Quinones and Antioxidant Activity,” in *Phytochemicals - Isolation, Characterisation and Role in Human Health*, InTech, 2015.
- [137] J. L. Bolton, T. L. Dunlap, and B. M. Dietz, “Formation and biological targets of botanical o-quinones,” *Food Chem. Toxicol.*, vol. 120, pp. 700–707, Oct. 2018.
- [138] J. L. Bolton and T. Dunlap, “Formation and biological targets of quinones: Cytotoxic versus cytoprotective effects,” *Chemical Research in Toxicology*, vol. 30, no. 1. American Chemical Society, pp. 13–37, Jan-2017.
- [139] Y. C. Tsao, Y. J. Chang, C. H. Wang, and L. Chen, “Discovery of isoplumbagin as a novel nqo1 substrate and anti-cancer quinone,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 21, no. 12, pp. 1–17, Jun. 2020.
- [140] N. Goel *et al.*, “A comparative assessment of: In vitro cytotoxic activity and phytochemical profiling of *Andrographis nallamalayana* J.L.Ellis and *Andrographis paniculata* (Burm. f.) Nees using UPLC-QTOF-MS/MS

- approach,” *RSC Adv.*, vol. 11, no. 57, pp. 35918–35936, 2021.
- [141] J. Luis Aleixandre-Tudo and W. du Toit, “The Role of UV-Visible Spectroscopy for Phenolic Compounds Quantification in Winemaking,” in *Frontiers and New Trends in the Science of Fermented Food and Beverages*, IntechOpen, 2019.
- [142] S. Bayar, “IDENTIFICACIÓN DE ESTRUCTURAS DE NATURALEZA FLAVÓNICA MEDIANTE ESPECTROSCOPIA UV-VIS A PARTIR DE ESTÁNDARES DE FLAVONOIDES.” 2018.
- [143] Y. Baca, V. Chavez, S. Fernández, H. Montoya, and M. Torres, “Determinación de Nitritos por Espectrofotometría UV visible en Productos Embutidos de tipo Jamón,” *Cienc. Lat. Rev. Científica Multidiscip.*, vol. 5, no. 2, pp. 2299–2308, 2021.
- [144] J. L. Aleixandre-Tudo, A. Buica, H. Nieuwoudt, J. L. Aleixandre, and W. Du Toit, “Spectrophotometric Analysis of Phenolic Compounds in Grapes and Wines,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 65, no. 20, pp. 4009–4026, May 2017.
- [145] L. Saletti-cuesta *et al.*, “DETERMINACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS FENOLICOS EN FLORES DE TARAXACUM OFFICINALE, MEDIANTE HPLC-DAD-MS Y ENSAYOS COLORIMETRICOS UV-VIS.” 2020.
- [146] T. Guerrero, P. Vejarano, and R. Ochoa, “Tamizaje fitoquímico y cuantificación de flavonoides totales de las hojas y flores de *Malachra alceifolia* Jacq.,” *Investig. y Amaz.*, vol. 4, pp. 70–75, 2015.
- [147] R. da S. Silveira *et al.*, “Determination of phenolic and triterpenic compounds in *Jatropha gossypifolia* L by Ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometric (UHPLC-MS/MS),” *Brazilian J. Pharm. Sci.*, vol. 56, pp. 1–12, Apr. 2020.
- [148] M. Rahman, *Application of Computational Methods in Isolation of Plant Secondary Metabolites*. Elsevier Inc., 2018.
- [149] H. Khan and J. Ali, “UHPLC/Q-TOF-MS technique: Introduction and applications,” *Lett. Org. Chem.*, vol. 12, Jun. 2015.
- [150] S. Barbosa, G. Campmajó, J. Saurina, L. Puignou, and O. Núñez, “Determination of Phenolic Compounds in Paprika by Ultrahigh Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry: Application to Product Designation of Origin Authentication by Chemometrics,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 68, no. 2, pp. 591–602, Jan. 2020.
- [151] H. Faccin, R. F. Loose, C. Viana, O. A. Lameira, and L. M. De Carvalho, “Determination of phenolic compounds in extracts of Amazonian medicinal plants by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry,” *Anal. Methods*, vol. 9, no. 7, pp. 1141–1151, Feb. 2017.
- [152] Y. H. Joo, M. H. Nam, N. Chung, and Y. K. Lee, “UPLC-QTOF-MS/MS screening and identification of bioactive compounds in fresh, aged, and browned *Magnolia denudata* flower extracts,” *Food Res. Int.*, vol. 133, no. September 2019, p. 109192, 2020.

- [153] X. Duan, L. Pan, Q. Bao, and D. Peng, "UPLC-Q-TOF-MS study of the mechanism of THSWD for breast cancer treatment," *Front. Pharmacol.*, vol. 10, no. January, pp. 1–13, 2020.
- [154] G. Chawla and C. Ranjan, "Principle, Instrumentation, and Applications of UPLC: A Novel Technique of Liquid Chromatography," *Open Chem. J.*, vol. 3, no. 1, pp. 1–16, 2016.
- [155] P. Noriega, G. Gortaire, and E. Osorio, "Mass Spectrometry and Its Importance for the Analysis and Discovery of Active Molecules in Natural Products," *Intech*, vol. 32, no. tourism, pp. 137–144, 2021.
- [156] N. Altunaga-pérez, "Caracterización fitoquímica y actividad antioxidante total de diferentes extractos de *Tithonia diversifolia* (Hemsl) A. Gray," *Pastos y Forrajes*, vol. 42, no. 3, pp. 243–248, 2019.
- [157] C. Carazzone, "especie *Bothrops atrox* de Colombia Tabla de contenido," 2016.
- [158] E. A. Venegas Casanova, "Evaluación fitoquímica preliminar del extracto metanólico y etanólico de las flores de *Cordia lutea* Lam. (Boraginaceae) y su capacidad antioxidante," *Arnaldoa*, vol. 26, no. 1, pp. 359–368, 2019.
- [159] N. U. Emon *et al.*, "Chemical, biological and protein-receptor binding profiling of *Bauhinia scandens* L. stems provide new insights into the management of pain, inflammation, pyrexia and thrombosis," *Biomed. Pharmacother.*, vol. 143, no. September, p. 112185, 2021.
- [160] Z. Huang *et al.*, "Serum metabolomics of Bama miniature pigs bitten by *Bungarus multicinctus*," *Toxicol. Lett.*, vol. 350, pp. 225–239, 2021.
- [161] T. R. Costa *et al.*, "Gallic acid anti-myotoxic activity and mechanism of action, a snake venom phospholipase A2 toxin inhibitor, isolated from the medicinal plant *Anacardium humile*," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 185, no. June, pp. 494–512, 2021.
- [162] M. de C. N. D. Pontes *et al.*, "Harpalyce brasiliensis Benth: A prolific source of bioactive flavonoids with antiophidic potential," *Phytochem. Lett.*, vol. 41, no. December 2020, pp. 158–167, 2021.
- [163] N. Pino, R. Álvarez, and G. Prado, "Determinación De Metabolitos Secundarios Por Cromatografía En Capa Delgada a Especies Con Uso Etnomedicinal Como Estrategia Pedagógica En El Aula De Clase Determination of Secondary Metabolites By Thin Layer Chromatography on Species With Ethnomedicinal U," *Rev. Asoc. Col. Cienc.(Col)*, vol. 29, pp. 30–37, 2017.
- [164] E. Stashenko, C. Ruiz, F. Tunarosa, and J. Martínez Morales, "Estudio comparativo por gc-ms de metabolitos secundarios volátiles de dos quimiotipos de *Lippia origanoides* h.b.k., obtenidos por diferentes técnicas de extracción.," *Sci. Tech.*, vol. 13, no. 33, pp. 325–328, 2007.
- [165] N. S. Jayamohan, P. K. P, and K. Jayachandra, "Surveillance of In vitro Antioxidant and Anthelmintic Activity of Methanolic Extract of *Syzygium Cumini* Bark (Myrtaceae) * Correspondence Info :," *Ijpp*, vol. 3, no. 2, pp. 56–62, 2013.
- [166] D. Juchelka, J. Griep-Raming, T. F. Scientifi, T. Piper, and M. Thevis, "A

Unique Tool for Metabolite Research - Q Exactive GC coupled with IRMS (QE GC-IRMS),” *thermo Sci.*, vol. application.

- [167] F. Nas *et al.*, “A comparative GC–MS analysis of bioactive secondary metabolites produced by halotolerant *Bacillus* spp. isolated from the Great Sebkhah of Oran,” *Int. Microbiol.*, vol. 24, no. 3, pp. 455–470, 2021.
- [168] F. C. Neto *et al.*, “Dereplication of natural products using GC-TOF mass spectrometry: Improved metabolite identification by spectral deconvolution ratio analysis,” *Front. Mol. Biosci.*, vol. 3, no. SEP, pp. 1–13, 2016.
- [169] M. A. Salem *et al.*, “Metabolomics in the context of plant natural products research: From sample preparation to metabolite analysis,” *Metabolites*, vol. 10, no. 1, pp. 1–30, 2020.
- [170] N. Ivanova, V. Gugleva, M. Dobрева, I. Pehlivanov, S. Stefanov, and V. Andonova, “We are IntechOpen , the world ’ s leading publisher of Open Access books Built by scientists , for scientists TOP 1 %,” *Intech*, vol. i, no. tourism, p. 13, 2016.
- [171] S. Sanchez and A. L. Demain, “Secondary Metabolites,” *Compr. Biotechnol. Second Ed.*, vol. 1, pp. 155–167, 2011.
- [172] A. Ma and X. Qi, “Mining plant metabolomes: Methods, applications, and perspectives,” *Plant Commun.*, vol. 2, no. 5, p. 100238, 2021.
- [173] X. Li, S. Munir, Y. Xu, Y. Wang, and Y. He, “Combined mass spectrometry-guided genome mining and virtual screening for acaricidal activity in secondary metabolites of *Bacillus velezensis* W1,” *RSC Adv.*, vol. 11, no. 41, pp. 25441–25449, 2021.
- [174] S. Louw, L. Kandjengo, and M. G. Knott, “Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) combined with retention index prediction for the rapid identification of Halogenated monoterpenes from a Namibian *Plocamium* species,” *Nat. Prod. Commun.*, vol. 12, no. 2, pp. 207–211, 2017.
- [175] R. R., “GC-MS Analysis of Bioactive Compounds in Ethanolic Leaf Extract of *Hellenia speciosa* (J.Koenig) S.R. Dutta,” *Appl. Biochem. Biotechnol.*, pp. 1–13, 2021.
- [176] A. M. Torres, F. Camargo, G. Ricciardi, B. R. Verrastro, and E. Dellacassa, “Relevance of *Trixis divaricata* Essential Oil in the Inhibition of the Coagulant Activity of *Bothrops diporus* Venom,” *J. Essent. Oil Bear. Plants*, vol. 24, no. 5, pp. 1192–1199, Sep. 2021.
- [177] K. M. Alois, G. C. Sangiwa, C. M. Marciale, and M. G. Sahini, “Phytochemical constituents and larvicidal efficacy of leaf extracts of *Aristolochia elegans* (Aristolochiaceae),” *South African J. Bot.*, vol. 146, pp. 383–394, 2022.
- [178] S. Adeyemi *et al.*, “Anti-hemorrhagic activity of ethanol extract of *Moringa oleifera* leaf on envenomed albino rats,” *Sci. African*, vol. 12, p. e00742, 2021.
- [179] P. Singh, M. Yasir, and R. Shrivastava, “Ethnopharmacologic screening of medicinal plants used traditionally by tribal people of Madhya Pradesh, India, for the treatment of snakebites,” *J. Herb. Med.*, vol. 29, p. 100483, 2021.

- [180] M. Cristina *et al.*, “Antiofídicos amazónicos naturales como estrategia terapéutica contra el envenenamiento,” pp. 1–27, 2019.
- [181] L. Cassia *et al.*, “Comparative morpho-anatomy of *Urospatha Schott* inflorescence (*Araceae*) occurring in the State of Amapá , Brazil,” pp. 1–7, 2019.
- [182] P. Sophiya, B. K. Kiran, N. S. Lohith, F. Ali, A. D. Sathisha, and K. K. Dharmappa, “GC-MS analysis, adme toxicity and in silico studies of some isolated compounds from *Melastoma malabathricum* leaves against SPLA2 inhibition,” *Appl. Biol. Res.*, vol. 23, no. 1, pp. 26–36, 2021.
- [183] “PPBio Amazônia Oriental _ Programa de Biodiversidad de Investigación,” 2020. .
- [184] C. U. U. y H. N. (Eds) León-Yáñez, S., R. Valencia, N. Pitmam, L. Endara, “Libro Rojo de Plantas Endémicas del Ecuador.,” *Publicaciones del Herbario QCA, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito.*, 2019. [Online]. Available: <https://bioweb.bio/floraweb/librorojo>.
- [185] Secretaría Técnica de la Circunscripción Territorial Especial Amazónica., “Plan Integral para la Amazonía 2021-2035.,” p. 109, 2021.
- [186] V. Cavaller *et al.*, “VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA DE CUANTIFICACIÓN DE VITAMINA B1 POR EL MÉTODO DE HPLC EN HARINA DE TRIGO FORTIFICADA,” *הגות עלון*, vol. 26, no. 3, pp. 3149–3155, 2018.
- [187] D. Gioconda, M. García, and D. Ph, “Caracterización agronómica y de polifenoles totales en segregantes interespecíficos (*Solanum betaceum* x *Solanum unilobum*),” 2019.
- [188] N. Medina-Torres, T. Ayora-Talavera, H. Espinosa-Andrews, A. Sánchez-Contreras, and N. Pacheco, “Ultrasound assisted extraction for the recovery of phenolic compounds from vegetable sources,” *Agronomy*, vol. 7, no. 3, 2017.
- [189] T. Venkatesan, Y. W. Choi, and Y. K. Kim, “Impact of Different Extraction Solvents on Phenolic Content and Antioxidant Potential of *Pinus densiflora* Bark Extract,” *Biomed Res. Int.*, vol. 2019, 2019.
- [190] F. P. Busardò, C. Kyriakou, E. Marchei, R. Pacifici, D. S. Pedersen, and S. Pichini, “Ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UHPLC–MS/MS) for determination of GHB, precursors and metabolites in different specimens: Application to clinical and forensic cases,” *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 137, pp. 123–131, Apr. 2017.
- [191] D. Cheaib *et al.*, “Study of the selectivity and bioactivity of polyphenols using infrared assisted extraction from apricot pomace compared to conventional methods,” *Antioxidants*, vol. 7, no. 12, Dec. 2018.
- [192] C. Lorena, A. Ressaissi, and M. L. Serralheiro, “Bioactives from *Psidium guajava* leaf decoction: LC-HRMS-MS-Qtof identification, bioactivities and bioavailability evaluation,” *Food Chem. Adv.*, vol. 1, p. 100003, 2022.
- [193] G. E. Batiha, A. M. Beshbishy, and L. Wasef, “*Uncaria tomentosa* (Willd . ex Schult .) : A Review on Traditional Uses, Bioactive Chemical Contituents,” no. April, pp. 1–12, 2020.

- [194] J. Perugachi Cahueñas, “Evaluación del Carbono en Cangahuas con diferente tiempo de habilitación, tipo de cultivo y tipo de nutrición del suelo,” 2015.
- [195] K. Biemann, “Structure Determination of Natural Products by Mass Spectrometry,” *Annu. Rev. Anal. Chem.*, vol. 8, pp. 1–19, 2015.
- [196] M. I. Cáceres, G. A. Ricciardi, A. M. Torres, B. V. Ricciardi, S. Ferrero, and E. Dellacassa, “In vitro Anti-snake Venom Activities of *Aloysia citriodora* Palau: New Possibilities for a Known Aromatic Plant,” *J. Essent. Oil-Bearing Plants*, vol. 20, no. 1, pp. 132–140, 2017.
- [197] C. A. Rentería Jiménez, “Determinación de la efectividad de una composición etnofarmacológica a base de seis extractos de plantas medicinales para el tratamiento de la hipertensión arterial,” *Rev. Bioetnia*, vol. 7, no. 2, pp. 120–127, 2020.
- [198] V. Cavallaro, “Plantas de la región como fuente potencial de metabolitos secundarios inhibidores de colinesterasa,” no. 0291, p. 4595130, 2015.
- [199] M. R. Calixto Cotos, “Evaluación de los componentes bioactivos, actividad inhibitoria hialuronidasa y la capacidad antioxidante de *Pourouma cecropiifolia* C. Martius ‘Uvilla Amazónica,’” p. 174, 2020.
- [200] L. M. Preciado, J. Comer, V. Núñez, P. Rey-Suárez, and J. A. Pereañez, “Inhibition of a snake venom metalloproteinase by the flavonoid myricetin,” *Molecules*, vol. 23, no. 10, pp. 1–15, 2018.
- [201] G. Pilco, D. Vinuesa, K. Acosta, and A. Torres, “Actividad Inhibitoria De La Hialuronidasa Del Extracto Hidroalcohólico De *Piper Peltatum*/Hyaluronidase Inhibitor Activity in Hydroalcoholic Extracts of *Piper Peltatum*,” *KnE Eng.*, vol. 2020, pp. 247–259, 2020.
- [202] B. Bouimeja *et al.*, “Studies on antivenom activity of *Lactuca serriola* methanolic extract against *Buthus atlantis* scorpion venom by in vivo methods,” *South African J. Bot.*, vol. 125, pp. 270–279, 2019.