

Artículo Científico / Scientific Article

Inhibición de los efectos coagulante, fosfolipasa A₂ y proteolítico del veneno de *Bothrops asper* por plantas usadas tradicionalmente en Centroamérica

Inhibition of the coagulant, phospholipase A₂ and proteolytic effects of Bothrops asper venom by plants traditionally used in Central America

Patricia Saravia-Otten^{1*}, Rosario Hernández¹, Nereida Marroquín², Gabriela García¹, Max Mérida², Sully Cruz², Nohemí Orozco³, Armando Cáceres⁴, José M. Gutiérrez⁵

¹Escuela de Química Biológica, ²Escuela de Química Farmacéutica, y ³Escuela de Química, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala, ⁴Laboratorio de Investigación de Productos Naturales Farmaya, Guatemala, ⁵Instituto Clodomiro Picado, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica, Costa Rica.

*Autor al que se dirige la correspondencia: psaravia02@gmail.com

Recibido: 23 de marzo 2017 / Revisión: 28 de abril 2017 / Aceptado: 30 de octubre 2017

Resumen

Existen pocos estudios científicos que demuestren el valor terapéutico de las plantas usadas en la medicina tradicional centroamericana para tratar el envenenamiento ofídico. En este estudio se evaluó la capacidad de los extractos etanólicos de nueve plantas de uso etnomédico en Centroamérica (*Acacia hindsii*, *Aristolochia maxima*, *Bursera simaruba*, *Cissampelos pareira*, *Eryngium foetidum*, *Hamelia patens*, *Pimenta dioica*, *Piper peltatum* y *Sansevieria hyacinthoides*) para inhibir el efecto coagulante del veneno de *Bothrops asper*. Tres de ellas (*B. simaruba*, *E. foetidum* y *P. dioica*) también fueron evaluadas en cuanto a su capacidad inhibitoria de los efectos fosfolipasa A₂ (PLA₂) y proteolítico del veneno. Las plantas fueron colectadas en Guatemala, secadas, extraídas con etanol y los efectos inhibitorios evaluados in vitro después de preincubar concentraciones variables de extracto con concentraciones fijas de veneno. Los resultados demostraron que ninguno de los extractos logró inhibir los efectos coagulante y PLA₂, pero los extractos clorofilados de *P. dioica* y *E. foetidum* inhibieron efectivamente la actividad proteolítica del veneno. El tamizaje fitoquímico, mediante ensayos macro y semimicrométricos de cromatografía en capa fina, demostró la presencia de metabolitos secundarios reportados con actividad anti-proteolítica (flavonoides, antocianinas, catequinas y taninos) en la composición química de los extractos de *E. foetidum* y *P. dioica*. Su efecto sobre el veneno se evaluó mediante electroforesis SDS-PAGE, demostrándose que no está mediado por degradación proteolítica de los componentes del veneno. El aislamiento y caracterización específica de sus metabolitos secundarios en futuros estudios, permitirá determinar el mecanismo de acción inhibitoria ejercido por estos extractos.

Palabras claves: Plantas antiofídicas, antidotos, Guatemala, mordedura de serpiente, envenenamiento ofídico

Abstract

Medicinal plants have been traditionally used in Central America to treat snakebite envenomations, however, very few scientific studies aimed to demonstrate their efficacy and safety have been performed. In this study, ethanolic extracts of nine plants used in the region by traditional healers in snakebite cases (*Acacia hindsii*, *Aristolochia maxima*, *Bursera simaruba*, *Cissampelos pareira*, *Eryngium foetidum*, *Hamelia patens*, *Pimenta dioica*, *Piper peltatum* and *Sansevieria hyacinthoides*) were evaluated for their ability to inhibit the coagulant effect induced by the venom of the snake *Bothrops asper*. Three of these extracts (*B. simaruba*, *E. foetidum* and *P. dioica*) were also evaluated for their inhibitory effect on the phospholipase A₂ (PLA₂) and proteolytic activities of the venom. Plants were collected in Guatemala, dried, extracted with ethanol, and their inhibitory effects were evaluated in vitro after pre-incubation of several amounts of each extract with a challenge concentration of venom. Results showed that none of the extracts inhibited the coagulant and PLA₂ effects; however, chlorophyllated extracts of *E. foetidum* and *P. dioica* effectively inhibited the proteolytic activity of the venom. Phytochemical analysis of these extracts, conducted by macrometric assays and semimicroanalysis by thin layer chromatography, identified secondary metabolites (flavones, anthocyanins, catequines and tannins) whose anti-proteolytic activities have been widely reported. SDS-PAGE analysis demonstrated that the mechanism of inhibition is not related to proteolytic degradation of the venom proteins by the plant extracts. Further studies are needed to isolate and identify the active venom inhibitory compounds of these plants, aimed to understand their mechanism of action.

Key words: Antiophidic plants, traditional medicine, Guatemala, snakebite, antidotes

Introducción

Se ha estimado que en Centroamérica ocurren aproximadamente 5,500 casos anuales de mordedura de serpiente (Gutiérrez, 2014). Sin embargo, el problema podría ser mayor, ya que el accidente ofídico sucede más frecuentemente en áreas rurales, alejadas de los centros de salud, por lo que un número indeterminado de víctimas no es registrado (Giovannini & Howes, 2017). Los casos más serios de envenenamiento se producen por mordedura de serpientes de la familia Viperidae, especialmente *Bothrops asper*, siendo los más afectados jóvenes trabajadores agrícolas que son mordidos mientras desempeñan sus labores (Gutiérrez, 2014).

Los envenenamientos por *B. asper* se caracterizan por una serie de alteraciones locales que aparecen rápidamente en el sitio de la mordedura, como edema, hemorragia, mionecrosis y dermonecrosis (Gutiérrez, Rucavado, Chaves, Díaz, & Escalante, 2009b), así como alteraciones sistémicas caracterizadas por coagulopatía, hemorragia, choque cardiovascular y en casos severos la muerte (Gutiérrez, Escalante, & Rucavado, 2009a). Frecuentemente se observan alteraciones en la hemostasia, que dan lugar a trombocitopenia, desfibrin(ogen)ación y coagulación intravascular diseminada (Rucavado et al., 2005). Los componentes del veneno responsables de estos efectos locales y sistémicos son las metaloproteinasas dependientes de zinc (*snake venom metalloproteinases*, SVMPs), las fosfolipasa A₂ (PLA₂) (Angulo & Lomonte, 2009) y en menor proporción las serina proteinasas (Gutiérrez, 2002).

La administración temprana de antivenenos, o sueros antiofídicos, es el tratamiento validado para el manejo del envenenamiento ofídico, sin embargo, su uso presenta dificultades en áreas rurales, especialmente en regiones donde los servicios de salud no cubren la totalidad de la población o están alejados de los lugares donde ocurren las mordeduras por serpientes (Gutiérrez, 2010). Esta situación, aunada a aspectos culturales, incide en que gran parte de la población afectada en Latinoamérica busque la ayuda de curanderos para tratar la mordedura de serpiente con antídotos preparados con plantas de acuerdo a sus recetas tradicionales. Estos pueden ser aplicados en forma de toma de infusiones o jugos, o bien, como baños y emplastos sobre el área afectada (Coe & Anderson, 2005; Hay, 2002; Otero et al., 2000). En la medicina tradicional centroamericana se ha reportado el uso de 208 especies vegetales para

el tratamiento de la mordedura de serpiente; sin embargo, existen muy pocos estudios que hayan evaluado, de manera rigurosa, su eficacia para inhibir los efectos del envenenamiento ofídico, de tal forma que puedan usarse de forma eficaz y segura por los afectados (Giovannini & Howes, 2017).

Este estudio es la continuación de un trabajo previo (Saravia-Otten et al., 2015), en el cual se demostró que, de los extractos etanólicos de seis plantas de uso etnomédico en Guatemala (*Acacia hindsii* Benth, *Aristolochia maxima* Jacq., *Cissampelos pareira* L., *Hamelia patens* Jacq., *Piper peltatum* L. y *Sansevieria hyacinthoides* Druce), solamente el de *S. hyacinthoides* posee alguna capacidad inhibitoria (< 25%) del efecto PLA₂ del veneno de *B. asper*. Asimismo, únicamente los extractos de *P. peltatum* y *C. pareira* inhibieron pobremente (< 50%) el efecto proteolítico del veneno. Debido a que las dos pruebas de tamizaje utilizadas en el estudio anterior evalúan únicamente la capacidad de los extractos vegetales para inhibir las principales toxinas del veneno responsables de los efectos locales, en el presente estudio se evaluó la capacidad de las seis plantas para inhibir el efecto coagulante (potencialmente desfibrin(ogen)ante) del veneno. Para ampliar el número de plantas en estudio, se incluyeron tres especies (*Eryngium foetidum* L., *Pimenta dioica* (L.) Merr y *Bursera simaruba* (L.) Sarg) seleccionadas por uso etnomédico para el tratamiento de mordedura de serpiente en Centroamérica (Castro et al., 1999; Coe & Anderson, 2005; Hay, 2002). Los extractos etanólicos de estas tres plantas también fueron tamizados en cuanto a su capacidad para inhibir los efectos PLA₂ y proteolítico del veneno.

Se realizó un análisis fitoquímico preliminar de los extractos de todas las especies, con el objetivo de correlacionar la presencia de metabolitos secundarios con las bioactividades detectadas. Además, para evaluar si el mecanismo de acción inhibitoria de estos extractos estaba mediado por la degradación proteolítica de las principales proteínas del veneno, se realizó un análisis por electroforesis SDS-PAGE.

Materiales y métodos

Selección y colecta de especies vegetales

El proceso de selección y colecta de *A. hindsii*, *A. maxima*, *C. pareira*, *H. patens*, *P. peltatum* y *S. hyacinthoides* se describe en Saravia-Otten y colaboradores (2015). Adicionalmente se seleccionaron tres especies

usadas en Centroamérica para el tratamiento de mordedura de serpiente (*B. simaruba*, *E. foetidum* y *P. dioica*) según su disponibilidad, abundancia y capacidad de recolección en Guatemala. La colecta se realizó con base en un muestreo estratificado, preferencial y por conveniencia en lugares donde se tienen las especies

bajo cultivo o por manejo, en regiones del país en donde el accidente ofídico es frecuente (Tabla 1 y Figura 1). La recolección, embalaje y transporte se realizó conforme a los principios de las buenas prácticas de colecta y el proceso conforme a las técnicas convencionales de secado y molienda.

Tabla 1
 Datos de recolección de las plantas del proyecto

Familia / Especie (número de registro) ^a	Nombre común	Parte colectada	Lugar de colecta Coordenadas Altitud
Burseraceae / <i>Bursera simaruba</i> (L.) Sarg. (CFEH ^a 1386)	Palo jiote	Corteza	Ecoparcela el Kakawatal, Samayac, Suchitepéquez N 14° 33' 08.4"; O 091° 28' 02.8" 453 m.snm ^b
Apiaceae / <i>Eryngium foetidum</i> L. (CFEH 1387)	Samat	Hojas	Aldea Plan Grande Quehueche, Livingston, Izabal N 15° 50' 02.6"; O 088° 49' 02.1" 85 m.snm ^b
Myrtaceae / <i>Pimenta dioica</i> (L.) Merr. (CFEH 1388)	Pimienta gorda	Hojas	Comunidad de Barra Lámpara, Livingston, Izabal N 15° 46' 56.76"; O 088° 47' 29.94" 13 m.snm ^b

Nota. ^aCFEH: *Cemat Farmaya ethnobotanical herbarium*. ^bm.snm: metros sobre el nivel del mar.

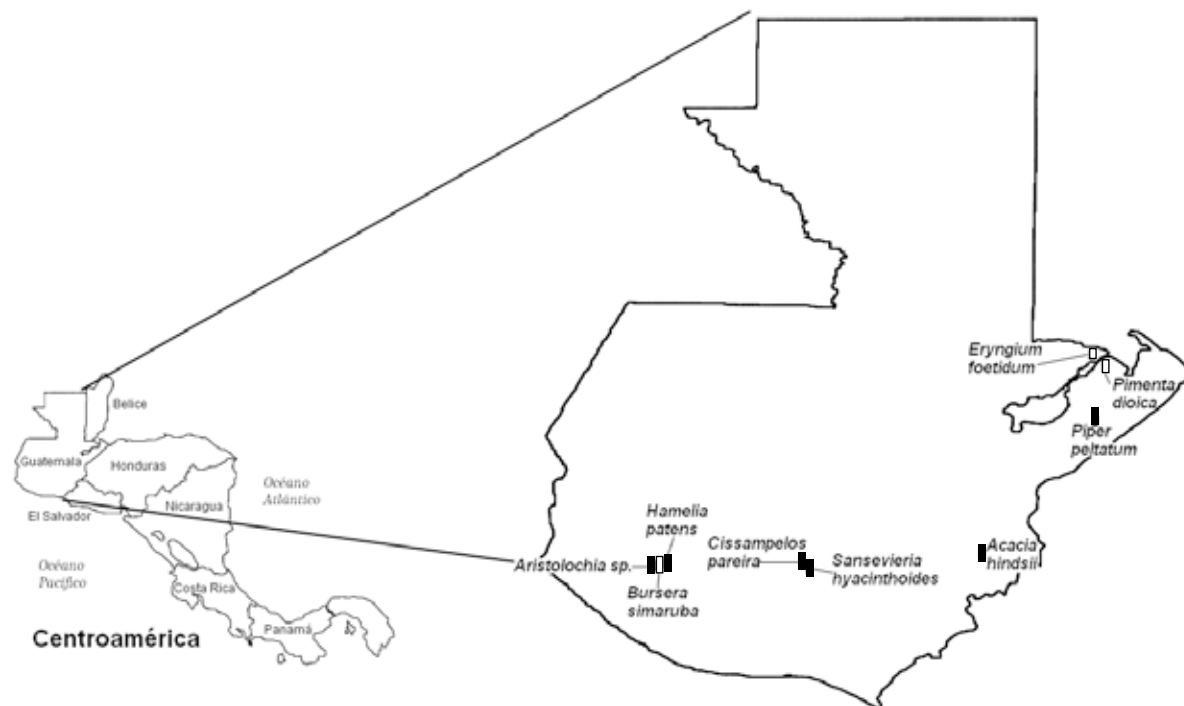


Figura 1. Lugares de colecta en Guatemala de las nueve especies vegetales evaluadas en el proyecto. Los rectángulos negros indican las regiones en las cuales se colectaron las especies vegetales reportadas en Saravia-Otten y colaboradores (2015) y los rectángulos blancos las de las especies colectadas en el presente estudio.

Obtención de extractos vegetales

Se prepararon extractos etanólicos por percolación continua a partir de 200 g de material vegetal según Kuklinski (2000) y el Ministerio de Sanidad y Consumo (2002). Cada extracto concentrado se transfirió a un cristalizador, se colocó en una desecadora para eliminar el disolvente restante, se pesó y se determinó el porcentaje de rendimiento, tomando en cuenta el peso final del extracto seco dividido el material vegetal pesado multiplicado por 100.

Desclorofilación de extractos vegetales

Se utilizó la metodología descrita por Coll y Bowden (1986) y Fernandes y colaboradores (1997) con algunas modificaciones. Se pesaron 10 g de extracto seco y se disolvieron en 300 ml de metanol frío, se filtró al vacío para eliminar partículas. Se agregó 100 ml de agua destilada fría y se dejó reposar 15-20 min en frío. Se filtró al vacío en una columna empacada de celite empleando una mezcla de metanol:agua (1:1) para favorecer el proceso. El filtrado se fraccionó en una ampolla de decantación con tres lavados de 100 ml cada uno con hexano; luego se realizaron tres lavados con diclorometano de 100 ml cada uno. La mezcla metanol:agua (desclorofilada) que quedó en la ampolla fue filtrada sobre sulfato de sodio anhidro. Cada una de las tres fracciones fue secada, pesada y almacenada en congelación (-20°C) hasta su uso.

Veneno de *B. asper*

Se utilizó una mezcla de veneno colectado en el serpiente del Instituto Clodomiro Picado, Universidad de Costa Rica, el cual fue obtenido a partir de no menos de 40 especímenes adultos provenientes de la región del Pacífico de Costa Rica. La mezcla de veneno fue centrifugada, liofilizada y almacenada a -20°C hasta su uso. Estudios previos realizados por Saravia y colaboradores (2001b), demostraron que el perfil toxicológico del veneno de las serpientes de Costa Rica, es similar al de las especies guatemaltecas.

Disolución de extractos vegetales

Los extractos vegetales etanólicos, de consistencia viscosa grado miel, se disolvieron en una solución tampón de fosfatos (PBS) pH 7.2 utilizando 1-10%

(v/v) de Tween-80 como emulsionante, según el procedimiento reportado por Saravia-Otten y colaboradores (2015). Cada disolución fue identificada, distribuida en alícuotas y almacenada en congelación (-20°C) hasta su uso.

Tamizaje fitoquímico preliminar

Se determinó la presencia de taninos en los extractos etanólicos mediante la técnica macrométrica de tubos descrita por Kuklinski (2000). La presencia de flavonoides, antocianinas y catequinas fue determinada por medio de cromatografía en capa fina sobre una cromatoplaque de silicagel 60 F₂₅₄ de acuerdo a la metodología descrita en Ministerio de Sanidad y Consumo (2002) y Wagner y Bladt (1996); los estándares fueron quercetina, rutina, ácido clorogénico e hiperósido. Las cumarinas se determinaron también por cromatografía en capa fina sobre una cromatoplaque de silicagel 60 F₂₅₄ según el método descrito por Lock (1994), utilizando estándares de ácido p-cumárico y cumarina.

Determinación de las concentraciones de reto (CR) de veneno

Para las pruebas de inhibición de la actividad proteolítica y PLA₂ se utilizaron como CR 1.25 y 0.03 µg/µl de veneno, respectivamente (Saravia-Otten et al., 2015). Para establecer la CR de veneno para las pruebas de inhibición de la actividad coagulante, inicialmente se estableció la Dosis Coagulante Mínima-Plasma (DCM-P, cantidad de veneno que induce coagulación del plasma citratado en 60 s) utilizando el ensayo de concentración-actividad descrito por Theakston y Reid (1983). La CR (2.15 x 10⁻³ µg/µl) se preparó con la cantidad de veneno equivalente a dos DCM-P (Gené, Roy, Rojas, Gutiérrez, & Cerdas, 1989).

Actividades intrínsecas de los extractos determinadas por ensayos de concentración-actividad

Antes de enfrentar el veneno con los extractos vegetales se evaluaron las actividades intrínsecas de cada uno, utilizando ensayos de concentración-actividad, con el fin de determinar los niveles de extracto que podrían utilizarse sin provocar dichos efectos, que invalidarían los resultados de las pruebas de inhibición.

Actividad coagulante y anticoagulante intrínseca

Se evaluó utilizando plasma humano citratado según el método de Theakston y Reid (1983). El plasma se preincubó a 37°C por 3 min, luego se enfrentó a diferentes concentraciones de los extractos vegetales (0.05-0.86 µg/µl) manteniendo las mezclas en incubación y se determinó el tiempo de coagulación con un cronómetro. Como control negativo (0% de actividad) se utilizó PBS, el control positivo fue una solución de trombina (2.7 UNIH/ml). Debido a que algunos extractos vegetales pueden presentar efecto anticoagulante intrínseco, se realizó una curva concentración-actividad incubando por 30 min a 37°C una concentración fija de trombina (2.7 UNIH/ml) con las mismas concentraciones de extractos evaluadas en la prueba de coagulación intrínseca (0.05-0.86 µg/µl). Posteriormente cada una de las mezclas se agregó a plasma humano citratado preincubado por 3 min a 37°C, y se determinó el tiempo de coagulación con un cronómetro, manteniendo las mezclas en incubación. Como control de coagulación se utilizó una mezcla de trombina (2.7 UNIH/ml) incubada con PBS y como control de no coagulación se usó solo PBS (Saravia, Cáceres, Velásquez, & Lara, 2001a). En ambas pruebas se reportaron como anticoagulantes aquellas concentraciones de extracto que no presentaron formación de un coágulo evidente luego de 60 min de incubación una vez que se agregó la mezcla conteniendo trombina.

Actividad PLA₂ intrínseca

Se evaluó mediante el ensayo de titulación que utiliza fosfatidilcolina de yema de huevo como sustrato descrito por Dole (1956) con las modificaciones realizadas por Gutiérrez, Lomonte, Chaves, Moreno y Cerdas (1986). El sustrato se incubó con diversas concentraciones de los extractos vegetales (0.78-12.5 µg/µl) a 37°C. Los ácidos grasos liberados se extrajeron con una mezcla de heptano: H₂O: H₂SO₄ y se titularon con NaOH. La actividad se expresó como µeq/mg/min. Como control negativo se utilizó PBS (0% de actividad) y como control positivo la CR de veneno (0.03 µg/µl) establecida previamente.

Actividad proteolítica intrínseca

Debido a que el color verde intenso de los extractos vegetales podría interferir con la prueba colorimétrica de proteólisis descrita por Wang, Shih y Huang

(2004), se analizaron los extractos vegetales con y sin clorofila para evaluar si la eliminación de este pigmento mejoraba la discriminación de la prueba. Se determinó el espectro de absorción de cada uno y se evaluó la capacidad proteolítica de los extractos sobre azocaseína como se describe en Saravia-Otten y colaboradores (2015). Como blanco de reactivos se utilizó PBS-Tween 80, el control positivo fue la CR de veneno (1.25 µg/µl) y el control negativo contenía PBS. La interferencia del color de los extractos se eliminó con un control interno para cada concentración con la solución tampón de trabajo sin azocaseína y cada una de las concentraciones del extracto evaluado. La actividad proteolítica de cada extracto se calculó restando al valor de absorbancia de cada concentración ensayada de extracto (3.9-62.5 µg/µl), la absorbancia de su control interno y del blanco de reactivos. La actividad proteolítica del control positivo (100% de actividad) se determinó restando la absorbancia del control negativo (0% de actividad) al valor de absorbancia del tubo que contenía la CR de veneno.

Pruebas de inhibición

Se utilizó el ensayo de preincubación descrito por Gutiérrez y colaboradores (1990), el cual consiste en incubar la CR del veneno con concentraciones variables del extracto. Para los ensayos de inhibición de las actividades PLA₂ y coagulante, las CR se enfrentaron a los extractos a razón veneno:extracto (p:p) de 1:400 hasta 1:25. Para los ensayos de inhibición de la actividad proteolítica se utilizaron razones de veneno:extracto (p:p) de 1:50 hasta 1:3.125. Estas relaciones se seleccionaron en base a estudios previos (Saravia et al., 2001a; Saravia-Otten et al., 2015). Para cada experimento se prepararon los controles correspondientes, según la metodología previamente descrita para los ensayos de concentración-actividad; las mezclas y controles se incubaron por 30 min a 37°C, al cabo de los cuales se estudió la actividad neutralizante de cada efecto empleando el ensayo de concentración-actividad. En los casos en los que hubo inhibición se calculó la concentración efectiva media del extracto (CE₅₀, concentración de extracto capaz de inhibir el 50% del efecto estudiado). Los resultados de los experimentos de inhibición se expresaron en términos porcentuales donde el 100% correspondió a la inhibición total del efecto evaluado y el 0% a un efecto de igual magnitud al inducido por el veneno solo.

Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Los extractos que demostraron capacidad neutralizante de alguno de los efectos estudiados fueron incubados a 37°C por 30 min con el veneno en proporción 1:20 (veneno:extracto, p:p). Luego se cargaron 10 µl de cada una de las mezclas en un gel de poliacrilamida al 12% y la electroforesis se corrió en condiciones reducidas a 150 V por 1 h (Laemmli, 1970). Las proteínas se tiñeron con azul brillante de Coomassie. Se comparó el patrón electroforético del veneno frente al patrón de las mezclas veneno:extracto.

Diseño y análisis estadístico

Para la determinación de actividades de extractos vegetales se realizó un diseño de bloques no aleatorizados. Los tratamientos correspondieron a las concentraciones de extracto evaluadas en las pruebas de actividad intrínseca y a las relaciones veneno:extracto en las pruebas de inhibición. Los ensayos se realizaron en tres días diferentes (bloques), con cinco réplicas por ensayo por conveniencia, para un total de quince lecturas. Los resultados de la actividad coagulante intrínseca y de inhibición del efecto coagulante del veneno se evaluaron por la prueba de hipótesis binomial, con un nivel de significancia de $\alpha = .05$. Los resultados de las actividades proteolítica y PLA₂ intrínsecas se evaluaron por un análisis de varianza de dos vías (Andeva) de cada tratamiento frente al control negativo (PBS), con un nivel de significancia $\alpha = .05$. Cuando este análisis demostró que existían diferencias significativas, se realizó la prueba de comparaciones de Dunnett de cada tratamiento frente al control negativo (PBS).

El análisis de las pruebas de inhibición de los efectos proteolíticos y PLA₂ del veneno se realizó mediante un análisis de regresión de la curva concentración-actividad para determinar el mejor modelo de ajuste, con un nivel de significancia de $\alpha = .05$. Con base en este modelo, se calculó para cada extracto la CE₅₀ con un intervalo de confianza del 95%. Para la determinación de la actividad proteolítica de extractos vegetales sobre proteínas del veneno, se realizó un análisis descriptivo del patrón electroforético de las mezclas veneno:extracto, en comparación con el patrón observado en el veneno solo.

Resultados

Recolección, secado y obtención de extractos etanólicos de las plantas.

De cada planta (*B. simaruba*, *E. foetidum* y *P. dioica*) se colectó la parte que se utiliza en el tratamiento popular de la mordedura de serpiente, según revisión de literatura (Castro et al., 1999; Coe & Anderson, 2005; Hay, 2002). Se depositó una muestra en el Herbario CFEH del Laboratorio de Productos Naturales Farmaya y se le asignó un número de registro (Tabla 1). El material seco se extrajo con etanol, obteniéndose rendimientos del 15-69%.

Actividades coagulante y anticoagulante intrínsecas de las plantas y pruebas de inhibición

Se determinaron las actividades coagulante y anticoagulante intrínsecas sobre plasma citratado de los extractos etanólicos de las nueve plantas del proyecto, demostrándose que ninguno de los extractos presentaba actividades intrínsecas significativamente diferentes a las presentadas por los controles negativos ($p > .05$). Asimismo, en los ensayos de inhibición realizados utilizando las relaciones de CR:extracto establecidas para este estudio, se demostró que ninguno de los extractos neutralizó el efecto coagulante del veneno ($p < .001$) (datos no mostrados).

Actividad PLA₂ intrínseca de las plantas y pruebas de inhibición

La actividad PLA₂ intrínseca se determinó incubando diferentes concentraciones de cada extracto con el sustrato, y se comparó con la presentada por el control negativo. Se demostró que el extracto de *B. simaruba* presenta actividad PLA₂ intrínseca a todas las concentraciones estudiadas, siendo la más alta (12.5 µg/µl) la que mostró mayor actividad (4.2%, IC 95% [1.97, 6.47]). Aunque la actividad intrínseca mostrada por esta planta no fue significativamente diferente a la actividad del control negativo ($p = .076$), según los criterios de inclusión establecidos en el estudio, este extracto no fue analizado en las pruebas de inhibición (datos no mostrados). Al analizarse la capacidad inhibitoria del extracto de *P. dioica*, se encontró que ninguna de las concentraciones enfrentadas al veneno inhibió efectivamente

el efecto PLA₂ ($p = .624$). De igual manera, las concentraciones del extracto de *E. foetidum* enfrentados al veneno, carecieron de capacidad inhibitoria (datos no mostrados).

Actividad proteolítica intrínseca de las plantas y pruebas de inhibición

Se demostró que los extractos clorofilados y desclorofilados de *B. simaruba* presentaban una actividad proteolítica intrínseca significativamente mayor a la del control negativo ($p < .05$) a todas las concentraciones estudiadas (datos no mostrados), por lo que no se evaluaron en las pruebas de inhibición.

Por otro lado, ninguno de los extractos de *P. dioica* o *E. foetidum* presentaron actividad proteolítica intrínseca significativa ($p > .05$) cuando se compararon con el control negativo. Como se muestra en la Tabla 2, por medio de un análisis de regresión lineal de los

resultados obtenidos en las pruebas de inhibición del efecto proteolítico del veneno, se calcularon las ecuaciones que mejor describen el comportamiento de los datos de las curvas de concentración-actividad de cada uno de los extractos ($p < .001$). En el caso de los extractos con clorofila de *P. dioica* y *E. foetidum*, el análisis de regresión lineal también mostró un coeficiente de determinación (r^2) superior a .9, indicando que el comportamiento de los datos era lineal. Los resultados obtenidos mostraron que ambos extractos inhibieron efectivamente el efecto proteolítico del veneno a las relaciones veneno:planta ensayadas, ya que se obtuvieron valores de CE₅₀ de 44.20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, IC 95% [40.55, 48.23] de *P. dioica* y 62.18 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, IC 95% [55.52, 69.92] de *E. foetidum* (Tabla 2). En la misma Tabla, se muestra que los extractos sin clorofila de estas dos plantas no alcanzaron la CE₅₀ a las concentraciones evaluadas en el estudio. En este caso, el análisis de regresión demostró que, aunque la ecuación calculada para la prueba con

Tabla 2
Capacidad de los extractos etanólicos del estudio para inhibir el efecto proteolítico del veneno de *B. asper*

Extracto etanólico	Neutralización actividad proteolítica del veneno				
	Ecuación ^a	r^{2b}	p^c	IC 95% ^d	CE ₅₀ [IC 95%] ^e
<i>P. dioica</i> con clorofila	$y = 1.219x - 3.854$.956	< .001	Límite inferior: $y = 1.280x - 1.885$ Límite superior: $y = 1.157x - 5.824$	44.20 [40.55, 48.23]
<i>P. dioica</i> sin clorofila	$y = 0.088x + 5.790$.263	< .001	Límite inferior: $y = 0.122x + 6.896$ Límite superior: $y = 0.053x + 4.683$	503.73 [353.11, 847.66]
<i>E. foetidum</i> con clorofila	$y = 0.681x + 7.679$.904	< .001	Límite inferior: $y = 0.732x + 9.343$ Límite superior: $y = 0.629x + 6.014$	62.18 [55.52, 69.92]
<i>E. foetidum</i> sin clorofila	$y = 0.475x + 3.525$.831	< .001	Límite inferior: $y = 0.525x + 5.138$ Límite superior: $y = 0.425x + 1.912$	97.87 [85.48, 113.19]

Nota. Los resultados de los ensayos de inhibición del efecto proteolítico del veneno se evaluaron mediante un análisis de regresión lineal de las curvas de concentración-actividad con un nivel de significancia de $\alpha = .05$. ^aEcuación que representa el modelo de regresión lineal que mejor describe el comportamiento de los resultados obtenidos. ^bCoefficiente de determinación. ^cModelo lineal de regresión significativo a un nivel de .05. ^dEcuaciones que delimitan el intervalo de confianza al 95% de la ecuación del modelo de regresión lineal. ^eConcentración efectiva media expresada en μg de extracto/ μl , entre corchetes se muestran los valores de los intervalos de confianza.

el extracto desclorofilado de *P. dioica* era significativa ($p < .001$), el coeficiente de determinación era muy bajo ($r^2 = .262$), por lo que la CE_{50} calculada ($503.73 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, IC 95% [353.11, 847.66]) no es necesariamente representativa del valor real, lo cual se refleja en la amplitud de los intervalos de confianza. Por otro lado, la ecuación derivada del análisis del extracto desclorofilado de *E. foetidum* también fue significativa ($p < .001$), y aunque su coeficiente de determinación ($r^2 = .831$) fue inferior a .9, puede considerarse que el comportamiento de los datos guarda una mejor linealidad que en el caso de *P. dioica*. Según el modelo, su CE_{50} fue de $97.87 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, IC 95% [85.48, 113.19], un valor cercano al del extracto con clorofila. Los extractos clorofilados de *P. dioica* y *E. foetidum* lograron la inhibición del 71.48% IC 95% [65.98, 76.99] y 49.28% IC 95% [47.14, 51.42] del efecto del veneno respectivamente, cuando se utilizaron en la relación veneno: extracto más alta (1:50 p:p), mientras que el extractos desclorofilados, evaluados en la misma proporción veneno:extracto, inhibieron solamente el 10.7% IC 95% [9.52, 11.88] y 33.45% IC 95% [29.98, 36.92] del efecto, respectivamente (datos no mostrados).

Análisis electroforético

El análisis por electroforesis SDS-PAGE del veneno de *B. asper* demostró la presencia de las bandas características del veneno de especímenes adultos de la región del Pacífico de Costa Rica, las cuales corresponden a proteínas de masas moleculares relativas entre 14 y 70 kDa (Alape-Girón et al., 2009). Cuando el veneno fue preincubado con los extractos de las plantas que demostraron actividad neutralizante del efecto proteolítico (*P. dioica* y *E. foetidum*), el patrón de bandas no mostró cambios en las mezclas veneno:planta en comparación con el patrón del control de veneno solo (Figura 2). No se detectaron bandas de proteínas en los extractos vegetales (datos no mostrados).

Tamizaje fitoquímico

Todas las especies vegetales del estudio presentaron flavonoides, antocianinas, catequinas en su composición química, los taninos estuvieron presentes en cuatro de ellas (*B. simaruba*, *E. foetidum*, *H. patens* y *P. dioica*), mientras que las cumarinas se detectaron en *A. maxima* (corteza), *B. simaruba*, *C. pareira*, *H. patens* y *P. peltatum* (Tabla 3).

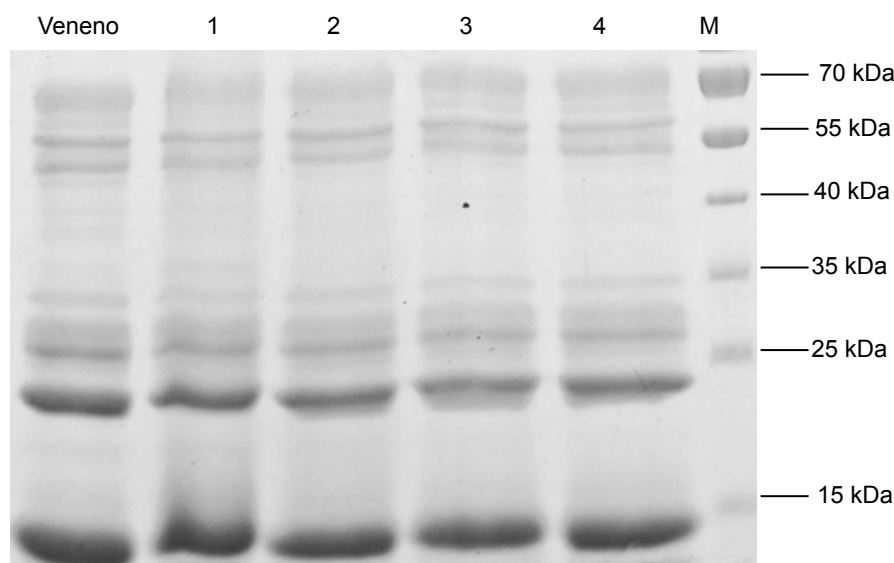


Figura 2. Electroforesis SDS-PAGE del veneno de *Bothrops asper* crudo y preincubado con extractos vegetales. El veneno se preincubó con extractos etanólicos en proporciones veneno:extracto (1:20 p:p) a 37°C por 30 min. En un gel de poliacrilamida al 12% se cargaron en cada pozo $10 \mu\text{l}$ de cada mezcla conteniendo: *Pimenta dioica* con (1) y sin clorofila (2); *Eryngium foetidum* con (3) y sin clorofila (4). Como control se cargó veneno solo (veneno). Marcador de peso molecular (M). La electroforesis se corrió en condiciones reductoras a 150 V por 1 h.

Tabla 3
Tamizaje fitoquímico de las plantas del estudio

Extracto etanólico	Flavonoides, catequinas y antocianinas ^a	Taninos ^b	Cumarinas ^c
<i>A. hindsii</i> (corteza)	+ ^d	- ^d	-
<i>A. maxima</i> (hojas)	+	-	-
<i>A. maxima</i> (corteza)	+	-	+
<i>B. simaruba</i> (corteza)	+	+	+
<i>C. pareira</i> (raíz)	+	-	+
<i>E. foetidum</i> (hojas)	+	+	-
<i>H. patens</i> (hojas)	+	+	+
<i>P. dioica</i> (hojas)	+	+	-
<i>P. peltatum</i> (hojas)	+	-	+
<i>S. hyacinthoides</i> (hojas)	+	-	-

Nota. ^aLa presencia de flavonoides y antocianinas se evaluó en los extractos etanólicos mediante cromatografía en capa fina, revelador de productos naturales y polietilenglicol. ^bLos taninos se determinaron mediante técnicas macrométricas de tubos por reacción de formación de precipitado. ^cLa detección de cumarinas se realizó mediante cromatografía en capa fina con revelador KOH 5%. ^dSe reporta la presencia (+) o ausencia (-) de los metabolitos estudiados.

Discusión

El complejo cuadro clínico desencadenado por la mordedura de *B. asper* es el resultado de la acción de varios componentes del veneno. Las PLA₂s son las principales responsables de la mionecrosis producida por el veneno, la cual produce pérdida del tejido muscular; además, sus acciones farmacológicas incluyen la inducción de edema, anticoagulación in vitro y citotoxicidad (Angulo & Lomonte, 2009). Las SVMPS son responsables de la hemorragia local y sistémica que caracteriza el envenenamiento; además inducen mionecrosis, edema, dermonecrosis, desfibrinogénesis secundaria al consumo de factores de coagulación y fibrino(geno)lisis (Gutiérrez, Rucavado, & Escalante, 2010). Las serina proteinasas tienen acción principalmente sobre proteínas de la cascada de la coagulación, tales como la de tipo trombina sobre el fibrinógeno, activación del plasminógeno, fibrinogénesis, inducción de la agregación plaquetaria e hipotensión. La acción combinada sobre la hemostasia de las serina proteinasas tipo trombina y metaloproteinasa con actividad activadora de protrombina del veneno de *B. asper* resulta en la formación de microtrombos, con agotamiento de fibrinógeno plasmático (desfibrin(ogen)ación) y degradación de fibrina (Rucavado et al., 2005).

Por ello, la búsqueda de compuestos naturales efectivos para el tratamiento del envenenamiento inducido por las serpientes *Bothrops* se ha enfocado en aquellos que logren la inhibición de los principales componentes del veneno de forma rápida y segura (Carvalho et al., 2013; Santhosh et al., 2013). Los extractos vegetales pueden contener varios compuestos químicos capaces de inhibir los efectos tóxicos de los venenos de serpiente por acción directa, tales como inhibidores enzimáticos, quelantes, inactivadores químicos o inmunomoduladores (Mors, do Nascimento, Ruppelt, & Alvares, 2000). También se ha sugerido que pueden producir inactivación del veneno por proteólisis directa (Mourão et al., 2014; Núñez et al., 2004). Por esta razón, en este estudio se realizaron pruebas para determinar la presencia de flavonoides, antocianinas, catequinas, taninos y cumarinas en los extractos etanólicos de las especies vegetales, con el objetivo de correlacionar la presencia de dichos metabolitos con las bioactividades presentadas.

Los bioensayos demostraron que ninguno de los extractos (*A. hindsii*, *A. maxima*, *B. simaruba*, *C. pareira*, *E. foetidum*, *H. patens*, *P. dioica*, *P. peltatum* y *S. hyacinthoides*) presentó actividad coagulante y/o anticoagulante intrínseca a las concentraciones evaluadas. Estos resultados difieren de los obtenidos en un estudio

anterior realizado con plantas guatemaltecas (Saravia et al., 2001a), en donde los extractos acuosos y etanólicos de *D. contrajerva* demostraron actividad coagulante intrínseca, y los acuosos de *N. lobata* y *E. odoratum* actividad anticoagulante intrínseca. Sin embargo, las concentraciones de extractos utilizadas fueron mayores (0.1-5 mg) a las utilizadas en este estudio, por lo que existe la posibilidad de que el efecto intrínseco de las plantas sobre la hemostasia sea dependiente de la concentración (Houghton & Skari, 1994). Esta noción podría ser sustentada además por el hecho de que los extractos de *A. maxima* (corteza), *B. simaruba*, *C. pareira*, *H. patens* y *P. peltatum* posean cumarinas además de flavonoides en su composición química, pero no demostraron actividad anticoagulante. Los flavonoides están comúnmente asociados con cumarinas y además han demostrado efectos antiplaquetario y anticoagulante (Ryu et al., 2013).

Asimismo, ninguno de los extractos mostró capacidad inhibitoria del efecto coagulante a las proporciones veneno: extracto (p:p) evaluadas. Aunque estas proporciones resultaron efectivas anteriormente con plantas nativas de Guatemala (Saravia et al., 2001a), debe considerarse que otros estudios han reportado el uso de concentraciones más altas de extractos vegetales para la inhibición del efecto coagulante (Houghton & Skari, 1994; Patiño et al., 2012). Esto sugiere nuevamente que la capacidad inhibitoria pudiera ser dependiente de la concentración del extracto, pero deberá evaluarse, en futuros estudios, que las concentraciones que resulten efectivas en ensayos *in vitro* sean biológicamente relevantes y de uso seguro para los afectados.

La inhibición del efecto coagulante del veneno se ha atribuido a la presencia de flavonoides, ya que tienen una amplia gama de bioactividades, entre ellas la de inhibir la actividad enzimática de serina proteinasas como trombina, plasmina y tripsina, posiblemente mediante un acoplamiento molecular que induce el bloqueo del sitio activo de la enzima (Jedinák, Maliar, Grančai, & Nagy 2006). Además, se ha descrito que las cumarinas pueden inhibir serina proteinasas (Pochet, Frédérick, & Masereel, 2004). Aunque el análisis fitoquímico demostró la presencia de estos metabolitos en las especies del estudio, los resultados obtenidos sugieren que posiblemente su concentración sea insuficiente para inhibir las toxinas del veneno, ya que se utilizaron concentraciones relativamente bajas del extracto en estos experimentos. Podría considerarse también que el etanol no permitió la extracción total de estos metabolitos, ya que algunos estudios han demostrado que la mayor

cantidad de flavonoides y polifenoles generalmente son extraídos con acetona (Singh, Singh, Banu, & Salim, 2013).

Existen reportes de plantas y moléculas activas que inhiben efectivamente las PLA₂s miotóxicas de los venenos de algunas serpientes de la familia Viperidae (Carvalho et al., 2013). Los metabolitos a los cuales se les ha atribuido su actividad son principalmente compuestos fenólicos, esteroideos y terpenoides (Santosh et al., 2013; Soares et al., 2005). Si bien ha sido propuesta una inhibición competitiva por parte de estos compuestos hacia las enzimas mencionadas (Lättig et al., 2007), también podría pensarse en un mecanismo de inhibición por la formación de complejos inactivos entre la enzima y los compuestos en mención, o bien por la quelación del Ca²⁺ requerido por las PLA₂s para su ciclo catalítico. Es posible sugerir que los compuestos polifenólicos pueden precipitar proteínas y formar complejos con metales como el Ca²⁺ lo cual explicaría la disminución en la actividad PLA₂ (Leanpolchareanchai, Pithayanukul, Bavovada, & Saparpakorn, 2009). En Colombia y Costa Rica se han descrito plantas con acción inhibitoria de la actividad PLA₂ del veneno de *B. asper* y de miotoxinas PLA₂ aisladas, como es el caso de *Piper umbellatum* L. y *P. peltatum* L. (Lomonte, León, Angulo, Rucavado, & Núñez, 2009). En el presente estudio se demostró que el extracto de *B. simaruba* presentó actividad PLA₂ intrínseca a todas las concentraciones evaluadas y que los extractos de *P. dioica* y *E. foetidum* no inhibieron el efecto PLA₂ del veneno. Aunque la presencia de los compuestos fenólicos en los extractos sugeriría alguna actividad anti PLA₂, estos resultados son similares a los obtenidos anteriormente en el estudio de plantas guatemaltecas, en donde no se logró detectar inhibición efectiva de esta actividad (Saravia et al., 2001a; Saravia-Otten et al., 2015). Estos hallazgos sugieren que variaciones en el lugar y época de colecta, factores ambientales como humedad, temperatura y suelo, así como el estado fenológico de la planta, hayan influido en la cantidad de metabolitos presentes en los especímenes estudiados (Ramakrishna & Ravinshankar, 2011).

Debido a la importancia del efecto proteolítico de las SVMs en la producción de la hemorragia local y sistémica que caracteriza el envenenamiento, así como en otros efectos fisiopatológicos, se evaluó la capacidad de los extractos etanólicos de *P. dioica* y *E. foetidum* (con y sin clorofila) para inhibir este efecto *in vitro*. Los resultados de las pruebas de inhibición demostraron que los extractos con clorofila de *P. dioica* (CE₅₀ = 44.20 µg/µl) y *E. foetidum* (CE₅₀ = 62.18 µg/µl)

inhibieron efectivamente la actividad del veneno a las concentraciones ensayadas en el estudio, mientras que sus extractos desclorofilados demostraron tener menor potencia, particularmente el de *P. dioica*.

En Costa Rica, el estudio realizado por Castro y colaboradores (1999) identificó la presencia de catequinas, flavonas, antocianinas y taninos condensadas en los extractos vegetales que inhibieron efectivamente la hemorragia local inducida en ratones por la inyección de veneno de *B. asper*. La habilidad neutralizante del efecto hemorrágico en ese y otros estudios (Mouroao et al., 2014; Santhosh et al., 2013) se ha asociado principalmente a la presencia de flavonoides, los cuales podrían quelar el átomo de zinc requerido para que las metaloproteinasas ejerzan su acción hemorrágica. Los resultados obtenidos con el extracto etanólico clorofilado de *P. dioica* de Guatemala correlacionan con los hallazgos de Castro y colaboradores (1999), en donde se reportó que los extractos de *P. dioica* inhiben completamente la hemorragia local. Se demostró además en el presente estudio, que los componentes de los extractos vegetales de *P. dioica* y *E. foetidum* no tenían efecto proteolítico sobre las proteínas del veneno. Estos resultados sugieren entonces que la capacidad neutralizante de la proteólisis evidenciada por los extractos de *P. dioica* y *E. foetidum*, podría deberse a la presencia de los metabolitos secundarios reportados con bioactividad antiproteolítica (flavonoides, antocianinas, catequinas y taninos) en su composición, y que el mecanismo de inhibición posiblemente sea mediado por la quelación de zinc. Asimismo, que la pérdida de bioactividad observada en los extractos desclorofilados, puede atribuirse a la pérdida de moléculas lipofílicas activas durante el proceso de desclorofilación, tales como los terpenoides, saponinas y esteroides.

La actividad proteolítica intrínseca de los extractos de *B. simaruba*, la cual podría potenciar la actividad proteolítica del veneno, no correlacionó con hallazgos previos, ya que su actividad antihemorrágica in vivo fue demostrada por Castro y colaboradores (1999). Coe y Anderson (2005) reportan además que la decocción de corteza o toda la planta de *B. simaruba* es utilizada de forma oral para tratar los efectos secundarios del envenenamiento por mordedura de serpientes en la región este de Nicaragua, en donde *B. asper* es abundante. Además de considerarse los factores de variación mencionados anteriormente para explicar estas diferencias entre estudios, debe tomarse en cuenta que los antídotos tradicionales se preparan con mezclas complejas de plantas (Giovannini & Howes, 2017), en las que podría

producirse sinergia entre sus compuestos bioactivos (Ahmad & Aqil, 2007).

En conclusión, se demostró que los extractos de *P. dioica* y *E. foetidum* inhiben efectivamente el efecto proteolítico del veneno de *B. asper*. Aunque se identificaron metabolitos secundarios que podrían estar relacionados con su capacidad inhibitoria, el aislamiento de estos compuestos requiere más estudios, pues solo así se podrá determinar el mecanismo directo por el cual se ven inhibidas las actividades que ocasiona el veneno. De igual forma, la evaluación de los extractos acuoso y acetónico de las plantas de este estudio podrían arrojar información más exacta sobre su capacidad para inhibir el efecto coagulante del veneno, ya que los extractos completos presentan en su composición química los metabolitos secundarios necesarios para inhibir serina- y metaloproteinasas. Aunque ninguna de las plantas guatemaltecas evaluadas demostró capacidad inhibitoria del efecto PLA₂ del veneno, es necesario realizar más estudios científicos para determinar su verdadero valor terapéutico, ya que, al utilizarse en combinación con otras plantas, según la forma tradicional de preparación de los antídotos, podría potenciarse su acción.

Agradecimientos

Agradecemos a Libny Pernillo, Federico Nave y Balmore Valladares por su valiosa colaboración, así como al Instituto Clodomiro Picado (Universidad de Costa Rica) por haber suministrado el veneno de *B. asper* utilizado en este trabajo. Esta investigación fue cofinanciada por la Digi-Usac-2016, Proyecto: 4.8.63.1.82.

Referencias

- Ahmad, I., & Aqil, F. (2007). In vitro efficacy of bioactive extracts of 15 medicinal plants against ES βL-producing multidrug-resistance enteric bacteria. *Microbiological Research*, 162(3), 264-275. doi:10.1016/j.micres.2006.06.010
- Alape-Girón, A., Flores-Díaz, M., Sanz, L., Madrigal, M., Escolano, J., Sasa, M., & Calvette, J. (2009). Studies on the venom proteome of *Bothrops asper*: Perspectives and applications. *Toxicon*, 54(7), 938-948. doi:10.1016/j.toxicon.2009.06.011
- Angulo, Y., & Lomonte, B. (2009). Biochemistry and toxicology of toxins purified from the venom of the snake *Bothrops asper*. *Toxicon*, 54(7), 949-957. doi:10.1016/j.toxicon.2008.12.014

- Carvalho, B. M. A., Santos, J. D. L., Xavier, B. M., Almeida, J. R., Resende, L. M., Martins, W., ... Marchi-Salvador, D. P. (2013). Snake venom PLA₂s inhibitors isolated from Brazilian plants: Synthetic and natural molecules. *BioMed Research International*, 2013,153045. doi: 10.1155/2013/153045
- Castro, O., Gutiérrez, J. M., Barrios, M., Castro, I., Romero M., & Umaña, E. (1999). Neutralización del efecto hemorrágico inducido por veneno de *Bothrops asper* (Serpentes: Viperidae) por extractos de plantas tropicales. *Revista de Biología Tropical*, 47(3), 605-616.
- Coe, F. G., & Anderson, G. J. (2005). Snakebite ethnopharmacopoeia of eastern Nicaragua. *Journal of Ethnopharmacology*, 96, 303-323. doi: 10.1016/jep.2004.09.026
- Coll, J., & Bowden, B. (1986). The application of vacuum liquid chromatography to the separation of terpene mixtures. *Journal of Natural Products*, 49(5), 934-936.
- Dole, V. P. (1956). A relation between non-esterified fatty acids in plasma and the metabolism of glucose. *Journal of Clinical Investigation*, 35, 150-154. doi:10.1021/np50047a033
- Fernandes, A. M., Prado, A. L., Barata, L. E. S., Paulo M. Q., Azevedo, N. R., & Ferri P. H. (1997). A method to separate lignoid from *Virola* leaves. *Phytochemical Analysis*, 8(1), 18-21.
- Gené, J. A., Roy, A., Rojas, G., Gutiérrez, J. M., & Cerdas, L. (1989). Comparative study on coagulant, defibrinating, fibrinolytic and fibrinogenolytic activities of Costa Rican crotaline snake venoms and their neutralization by a polyvalent antivenom. *Toxicon*, 27(8), 841-848. doi:10.1016/0041-0101(89)90096-2
- Giovannini, P., & Howes, M. -J. R. (2017). Medicinal plants used to treat snakebite in Central America: Review and assessment of scientific evidence. *Journal of Ethnopharmacology*, 199, 240-256. doi: 10.1016/j.jep.2017.02.011
- Gutiérrez, J. M. (2002). Comprendiendo los venenos de serpientes: 50 años de investigaciones en América Latina. *Revista de Biología Tropical*, 50, 377-394.
- Gutiérrez, J. M. (2010). Snakebite envenomation in Central America. En S. Mackessy (Ed.), *Handbook of Venoms and Toxins of Reptiles* (pp. 492-505). Boca Raton: CRC Press.
- Gutiérrez, J. M. (2014). Current challenges for confronting the public health problem of snakebite envenoming in Central America. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 20(7). doi:10.1186/1678-9199-20-7
- Gutiérrez, J. M., Escalante, T., & Rucavado, A. (2009a). Experimental pathophysiology of systemic alterations induced by *Bothrops asper* snake venom. *Toxicon*, 54(7), 976-987. doi:10.1016/j.toxicon.2009.01.039.
- Gutiérrez, J. M., Lomonte, B., Chaves, F., Moreno, E., & Cerdas, L. (1986). Pharmacological activities of a toxic phospholipase A isolated from the venom of the snake *Bothrops asper*. *Comparative Biochemistry and Physiology C*, 84(1), 159-164.
- Gutiérrez, J. M., Rojas, G., Lomonte, B., Gené, J. A., Chaves, F., Alvarado, J., & Rojas, E. (1990). Standardization of assays for testing the neutralizing ability of antivenoms. *Toxicon*, 28(10), 1127-1129. doi:10.1016/0041-0101(90)90110-S
- Gutiérrez, J. M., Rucavado, A., Chaves, F., Díaz, C., & Escalante, T. (2009b). Experimental pathology of local tissue damage induced by *Bothrops asper* snake venom. *Toxicon*, 54(7), 958-975. doi:10.1016/j.toxicon.2009.01.038
- Gutiérrez, J. M., Rucavado, A., & Escalante, T. (2010). Snake venom metalloproteinases: Biological roles and participation in the pathophysiology of envenomation. En S. P. Mackessy (Ed.), *Handbook of venoms and toxins of reptiles* (pp. 115-138). Boca Raton: CRC Press.
- Hay, J. O. (2002). Estudio etnofarmacológico de plantas utilizadas en la medicina tradicional para el tratamiento de leishmaniasis cutánea, del paludismo y de la mordedura de serpientes, en tres departamentos de Guatemala. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala, Service de Coopération au Développement, Institut de Recherche pour le Développement.

- Houghton, P. J., & Skari, M. P. (1994). The effect on blood clotting of some west African plants used against snakebite. *Journal of Ethnopharmacology*, *44*(2), 99-108. doi:10.1016/0378-8741(94)90075-2
- Jedinák, A., Maliar, T., Gran čai, D., & Nagy, M. (2006). Inhibition activities of natural products on serine proteases. *Phytotherapy Research*, *20*, 214-217. doi:10.1002/ptr.1836
- Kuklinski, C. (2000). *Farmacognosia. Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural*. Barcelona: Omega.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, *227*, 680-685. doi:10.1038/227680a0
- Lättig, J., Böhl, M., Fischer, P., Tischer, S., Tietböhl, C., Menschikowski, M., ... Pisabarro, M. T. (2007). Mechanism of inhibition of human secretory phospholipase A2 by flavonoids: Rationale for lead design. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, *21*(8), 473-483. doi:10.1007/s10822-007-9129-8
- Leanpolchareanchai, J., Pithayanukul, P., Bavovada, R., & Saparpakorn, P. (2009). Molecular docking studies and anti-enzymatic activities of *Thai mango* seed kernel extract against snake venoms. *Molecules*, *14*(4), 1404-1422. doi:10.3390/molecules14041404
- Lock, O. (1994). *Investigación Fitoquímica* (2ª. ed.). Lima, Perú: Fondo Editorial.
- Lomonte, B., León, G., Angulo, Y., Rucavado, A., & Núñez, V. (2009). Neutralization of *Bothrops asper* venom by antibodies, natural products and synthetic drugs: Contributions to understanding snakebite envenomings and their treatment. *Toxicon*, *54*(7), 1012-1028. doi:10.1016/j.toxicon.2009.03.015
- Ministerio de Sanidad y Consumo, Agencia Española de Medicamentos. (2002). *Real Farmacopea Española* (2ª. ed.). Madrid: Boletín Oficial del Estado
- Mors, W. B., do Nascimento, M. C., Ruppelt Pereira, B. M., & Alvares Pereira, N. (2000). Plant natural products active against snake bite – the molecular approach. *Phytochemistry*, *55*(6), 627-642. doi:10.1016/S0031-9422(00)00229-6
- Mourão, V., Serra, A. N., Veras, R. H., Varjao, J. L., Almeida, J. D., Luckwu, R., ... Dos-Santos, M. C. (2014). A comparison of the ability of *Bellucia dichotoma* Cogn. (Melastomataceae) extract to inhibit the local effects of *Bothrops atrox* venom when pre-incubated and when used according to traditional methods. *Toxicon*, *85*, 59-68. doi:10.1016/j.toxicon.2014.04.009
- Núñez, V., Otero, R., Barona, J., Saldarriaga, M., Osorio, R. G., Fonnegra, R., A., ... Quintana, J. C. (2004). Neutralization of the edema-forming, defibrinating and coagulant effects of *Bothrops asper* venom by extracts of plants used by healers in Colombia. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, *37*(7), 969-977. doi:10.1590/S0100-879X2004000700005
- Otero, R., Fonnegra, R., Jiménez, S. L., Núñez, V., Evans, N., Alzate, S. P., ... Vélez, H. N. (2000). Snakebites and ethnobotany in the northwest region of Colombia Part I: Traditional use of plants. *Journal of Ethnopharmacology*, *71*(3), 493-504.
- Patiño, A. C., López, J., Aristizábal, M., Quintana, J. C., & Benjumea, D. (2012). Efecto inhibitorio de extractos de *Renealmia alpina* Rottb. Maas (*Zingiberaceae*) sobre el veneno de *Bothrops asper* (mapaná). *Biomédica*, *32*(3), 365-374. doi:10.7705/biomedica.v32i3.591
- Pochet, L., Frédérick, R., & Masereel, B. (2004). Coumarin and isocoumarin as serine protease inhibitors. *Current Pharmaceutical Design*, *10*(30), 3781-3796. doi:10.2174/1381612043382684
- Ramakrishna, A., & Ravishankar, G. A. (2011). Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant Signaling & Behavior*, *6*(11), 1720-1731. doi:10.4161/psb.6.11.17613
- Rucavado, A., Soto, M., Escalante, T., Loria, G. D., Armi, R., & Gutiérrez, J. M. (2005). Thrombocytopenia and platelet hypoaggregation induced by *Bothrops asper* snake venom. Toxins involved and their contribution to metalloproteinase-induced pulmonary hemorrhage. *Thrombosis and Haemostasis*, *94*(1), 123-131. doi:10.1160/TH05-02-0112
- Ryu, R., Jung, U. J., Kim, H. J., Lee, W., Bae, J. S., Park, Y. B., & Choi, M. S. (2013). Anticoagulant

- and antiplatelet activities of *Artemisia princeps* Pampanini and its bioactive components. *Preventive Nutrition and Food Science*, 18(3), 181-187. doi:10.3746/pnf.2013.18.3.181
- Santhosh, M. S., Hemshekhar, M., Sunitha, K., Thushara, R. M., Jnaneshwari, S., Kemparaju, K., & Girish, K. S. (2013). Snake venom induced local toxicities: Plant secondary metabolites as an auxiliary therapy. *Mini Reviews in Medical Chemistry*, 13, 106-123. doi:10.2174/1389557511307010106
- Saravia-Otten, P., Hernández, R., Gutiérrez, J. M., Mérida, M., & Cáceres, A. (2015). Evaluación de la capacidad neutralizante de extractos de plantas de uso popular en Guatemala como antídotos para el envenenamiento por la mordedura de *Bothrops asper*. *Ciencia, Tecnología y Salud*, 2(2), 25-37.
- Saravia, P., Cáceres, A., Velásquez, R., & Lara, O. (2001a) *Plantas con actividad antiofídica en Guatemala. I. Identificación y evaluación de su capacidad neutralizante* (FODECYT No. 47-99). Guatemala: Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.
- Saravia, P., Rojas, E., Escalante, T., Arce, V., Chaves, E., Velásquez, R., ... Gutiérrez, J. M. (2001b). The venom of *Bothrops asper* from Guatemala: Toxic activities and neutralization by antivenoms. *Toxicon*, 39(2-3), 401-405. doi: 10.1016/50041-0101(00)00122.7
- Singh, S., Singh, D. R., Banu, S., & Salim, K. M. (2013). Determination of bioactives and antioxidant activity in *Eryngium foetidum* L.: A traditional culinary and medicinal herb. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B. Biological Sciences*, 83(3), 453-460. doi:10.1007/s40011-012-0141-y
- Soares, A. M., Tícli, F. K., Marcussi, S., Lourenço, M. V., Januário, A. H., Sampaio, S. V., ... Pereira, P. S. (2005). Medicinal plants with inhibitory properties against snake venoms. *Current Medicinal Chemistry*, 12(22), 2625-2641.
- Theakston, R. D. G., & Reid, H. A. (1983). Development of a simple standard assay procedures for the characterization of snake venoms. *Bulletin of World Health Organization*, 61(6), 949-956.
- Wang, W.-J., Shih C.-H., & Huang, T.-F. (2004). A novel P-I class metalloproteinase with broad substrate-cleaving activity, agkistlysin, from *Agkistrodon acutus* venom. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 324, 224-230. doi:10.1016/j.bbrc.2004.09.031
- Wagner, H. & Bladt, S. (1996). *Plant Drug Analysis*. Berlin: Springer Verlag.