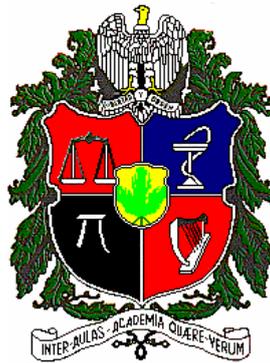


**ESPECIES VEGETALES DE USO ANTIOFÍDICO EN LAS ESTRIBACIONES
DE LA SIERRA NEVADA DE SANTA MARTA: INVENTARIO
ETNOBOTÁNICA Y EVALUACIÓN BIOLÓGICA**



WILLINTON ANDRES BARRANCO PÉREZ.

Biólogo

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA, SEDE MEDELLÍN

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

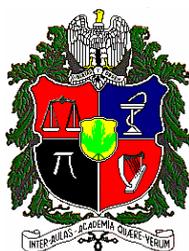
OCTUBRE 2010.

**ESPECIES VEGETALES DE USO ANTIOFÍDICO EN LAS ESTRIBACIONES
DE LA SIERRA NEVADA DE SANTA MARTA: INVENTARIO
ETNOBOTÁNICA Y EVALUACIÓN BIOLÓGICA**

**TESIS DIRIGIDA PARA OPTAR AL TÍTULO:
MAGÍSTER EN BOSQUES Y CONSERVACIÓN AMBIENTAL**

**POR:
WILLINTON ANDRES BARRANCO PÉREZ.
Biólogo**

**DIRECTOR:
PhD.MAURICO SANCHEZ SAENZ.
Profesor Asociado Departamento de Ciencias Forestales**



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA, SEDE MEDELLÍN

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

OCTUBRE DEL 2010.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín, a los doctores Mauricio Sánchez y Tatiana Lobo, a la Dirección de investigaciones sede Medellín (DIME) por la financiación del proyecto “Especies vegetales de uso antiofídico en las estribaciones de la Sierra Nevada de Santa Marta: inventario etnobotánica y evaluación biológica” a la Fundación Prosierra Nevada de Santa Marta por la cofinanciación, Armando calvano, Yadira Tinoco. A la Universidad de Antioquia en especial a los grupos de Ofidismo y escorpionismo, doctora Vitemina Núñez, a la ingeniera química Maritza Culma, al profesor Juan Carlos Quintana Msc, al grupo de Química orgánica de productos naturales, a los doctores Fernando Echeverri López y Edwin Correa, a la Universidad del Magdalena, Herbario (UTMC), profesor Eduino Carbone Msc, biólogo Héctor García Quiñonez y Elda Garrido, Msc Jeiner Castellanos Barliza, por el aporte significativo para realizar este trabajo. Un reconocimiento especial a los informantes que fueron los a portantes de todo el conocimiento tradicional: Montenegro, Pueblo bello, Cesar, Julio Cesar Daza, Rosario Alvarado, Pueblo Bello Cesar, Mary Bolaños, José Alvarado, Edinzón Gutiérrez, José Antonio Nieves, en las Casitas, Juan y medio, Guajira, Eder Rodríguez Peralta, Rafael Mendoza, Moreneros, Juan y medio, Guajira, Jorge Eliecer Lujan, San Pedro de la Sierra, Magdalena, Rafael Mendoza , Abelino Serrano, Ramiro Ramírez, Luis Racimes, el Mico, San Pedro de la Sierra, Magdalena, Carmen Botello.

TABLA DE CONTENIDO

PRESENTACIÓN	1
ESPECIES DE USO ANTIOFÍDICO EN ALGUNAS COMUNIDADES CAMPESINAS DE LAS ESTRIBACIONES DE LA SIERRA NEVADA DE SANTA MARTA	2
RESUMEN	2
INTRODUCCIÓN	3
MATERIALES Y MÉTODOS	4
Área de estudio	4
Toma de información etnobotánica	5
Colección, preservación y determinación del material botánico	6
RESULTADOS	7
Conjunto de especies utilizadas localmente	7
Especies más importantes	9
DISCUSIÓN	16
Producción de hojarasca fina	15
Retorno potencial de nutrientes vía hojarasca foliar	16
Reabsorción de nutrientes foliares y eficiencia en su uso	19
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	18
ANEXO 1.	21
EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE EXTRACTOS VEGETALES UTILIZADOS EN LA SIERRA NEVADA DE SANTA MARTA CONTRA EL VENENO DE LA ESPECIE <i>Bothrops asper</i>	22
RESUMEN	22
INTRODUCCIÓN	23
MATERIALES Y MÉTODOS	24
Venenos y reactivos	24
Material vegetal	24
Preparación de los extractos	25
Análisis fitoquímico y fraccionamiento de la especie con mayor actividad	25

<i>Efecto inhibitorio de actividad de fosfolipasas A₂</i>	25
<i>Electroforesis SDS-PAGE</i>	26
<i>Inhibición de la actividad proteolítica sobre la caseína</i>	26
<i>Inhibición de la actividad hemolítica indirecta</i>	26
<i>Actividad citotóxica del extracto de Equisetum bogotense</i>	27
Análisis de los datos	27
RESULTADOS	28
<i>Inhibición de la actividad proteolítica sobre la caseína</i>	30
<i>Fraccionamiento de Equisetum bogotense</i>	30
<i>Efecto inhibitorio de actividad de fosfolipasas A₂, en fracciones de Equisetum bogotense</i>	30
<i>Inhibición de la actividad hemolítica indirecta, en fracciones de Equisetum bogotense</i>	31
<i>Citotoxicidad de las fracciones de Equisetum bogotense</i>	32
<i>Análisis fitoquímico preliminar de Equisetum bogotense</i>	33
DISCUSIÓN	34
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	38

PRESENTACIÓN GENERAL

En el año 2004 el Ministerio de Protección Social de Colombia, declaró la emergencia sanitaria por insuficiencia de suero antiofídico en el país, y hasta la fecha se ha mantenido. Por otra parte en el reporte 2007-2009 se encontró que la región del Caribe Colombiano presentó los más altos índices de accidentes ofídicos, y a partir de esto se crea la necesidad de buscar soluciones para las regiones más apartadas que son las más vulnerables a este flagelo.

En la región del Caribe colombiano, desde tiempos ancestrales se ha desarrollado conocimiento en medicina tradicional, y en la Sierra Nevada de Santa Marta (SNSM) y sus alrededores, dos grupos importantes de conocedores o médicos tradicionales se deben destacar: los mamos de las comunidades indígenas Arahuaca, Kogui y wiwa, y los curanderos de los pueblos de las tierras bajas del Magdalena Grande en Cesar, Guajira y Magdalena. Con el fin de contribuir en la búsqueda de soluciones a la problemática generada por el accidente ofídico, los grupos de investigación de Biodiversidad, Uso y Conservación de la Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín, y el de Ofidismo y Escorpionismo de la Universidad de Antioquia, formularon el proyecto (**Especies vegetales de uso antiofídico en las estribaciones de la Sierra Nevada de Santa Marta: inventario etnobotánico y evaluación biológica**). Los resultados del estudio se presentan condensados a continuación en dos capítulos o apartados, bajo el formato de artículos científicos. En el primero se presenta un estudio etnobotánico en algunas de las comunidades campesinas de las estribaciones de la Sierra Nevada de Santa Marta, que reporta el conocimiento de trece informantes señalados por la comunidad como los mejores sabedores para tratar el accidente ofídico, obteniéndose los nombres de las plantas utilizadas, sus partes, posología, dietas y terapias adjuntas para el tratamiento del accidente con plantas locales. El segundo, presenta los resultados de la evaluación *in vitro* contra el veneno de *B. asper* de las cinco especies de plantas establecidas en el primer capítulo como las más citadas o usadas en las estribaciones de la SNSM, y un estudio fitoquímico preliminar de la especie que presentó mayor capacidad inhibitoria contra el veneno.

CAPÍTULO I

Especies de uso antiofídico en algunas comunidades campesinas de las estribaciones de la Sierra Nevada de Santa Marta **Species of use against Snake in some rural communities of the foothills of the Sierra Nevada of Santa Marta**

Willinton Barranco-Pérez^{1,3} & Mauricio Sánchez Sáenz^{2,3}

¹ Estudiante de Maestría en Bosques y Conservación Ambiental,
wbarranco66@yahoo.es.

² Profesor Asociado

³ Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín, Facultad de Ciencias
Agropecuarias, Medellín, Colombia.

RESUMEN

En los poblados campesinos de San Pedro (Magdalena), Pueblo Bello (Cesar) y Juan y Medio y Las Casitas (Guajira), localizados sobre las estribaciones de la Sierra Nevada de Santa Marta, se entrevistaron un total 13 curanderos señalados por cada comunidad como los mejores en el manejo del accidente ofídico. En suma, se estableció que reportan con base en nombres vulgares un total de 72 plantas para controlar los efectos de la mordedura de distintas especies de serpiente, pero de ellas solo 22 se colectaron para determinación. Con base en la intensidad de citación (método del consenso) se logró establecer que las especies más importantes fueron *Cissampelos pareira* (contragavilana), *Aristolochia máxima* (contracapitana), *Austroeupatorium inulaefolium* (contragavilana vallenata), *Mucuna cf. pruriens* (ojo de buey o pica, pica) y *Equisetum bogotense* (cola de caballo). También se registra el uso frecuente de *Aloe vera* como coayudante en el proceso de cicatrización. El accidente ofídico se maneja mediante el suministro de extractos alcohólicos de una o varias plantas en diferentes dosis, la imposición de dietas que pueden incluir el aislamiento en cuarentena del paciente y el

uso de otras especies de plantas para ayudar en los procesos de recuperación de los tejidos afectados.

Palabras clave: plantas antiofídicas, Sierra Nevada, etnobotánica, curanderos

ASBTRATC

In them they populated peasants of San Pedro (Mary Magdalene), Beautiful Town (to Cease) and Juan and Medium and The little Houses (Guajira), located on the foothills of the Saw Snowfall of Holy Marta, they were interviewed a total 13 faith healers indicated by each community as the better in the management of the accident ofídico. In short, was established that they report based on common names a total of 72 plants to control the effects of the bite of different species of snake, but of them alone 22 they were collected for decision. Based on the intensity of citation (method of the consensó) managed to establish that the most important species were *Cissampelos pareira* (contragavilana), *Aristolochia maximum* (contracapitana), *Austroeupatorium inulaefolium* (contragavilana vallenata), *Mucuna cf. pruriens* (porthole or magpie, magpie) and *Equisetum bogotense* (ponytail). Also the frequent use of Aloe edge is registered like the co-assistant in the process of scar formation. The accident ofídico is handled by means of the supply of alcoholic statements of an or several plants in different dose, the imposition of diets that can include the isolation in quarantine of the patient and the use of other species of plants to help in the processes of recovery of the weavings affected.

INTRODUCCIÓN

La vida del hombre desde tiempos remotos ha estado ligada a las plantas, siendo fuentes de alimento, vestido e implementos que de una u otra forma suministran bienestar físico o social. Especialmente han sido determinantes en la preparación de medicamentos para tratar distintas dolencias y enfermedades (1), generándose un gran número de farmacopeas alrededor del mundo. La región del Caribe colombiano no ha sido ajena al uso de estos recursos y al desarrollo de conocimientos en medicina tradicional (2), pudiéndose establecer para la zona de la Sierra Nevada de Santa Marta (SNSM) y sus alrededores, dos grupos importantes de conocedores o médicos tradicionales: los mamos de las comunidades indígenas Arahuaca, Kogui y wiwa, y los curanderos de los pueblos de las tierras bajas del Magdalena Grande en Cesar, Guajira y Magdalena (3). El conocimiento de estos últimos es el resultado de la influencia multirracial presente en la región, y que por la vía de la tradición oral ha pasado de generación en generación incrementándose y conservándose hasta el presente para beneficio de la población local (4).

Con el avance de la medicina moderna y la revolución industrial, se han desarrollado medicamentos para la mayoría de enfermedades, particularmente en países desarrollados (5). Sin embargo, la ciencia ha dejado de lado muchas dolencias que aquejan a países en vías de desarrollo, siendo en la mayoría de casos los habitantes de áreas rurales los más afectados, por lo que éstos han conservado el uso de plantas como primera y algunas veces única opción en el tratamiento. Uno de estos casos es el envenenamiento por mordedura de serpientes, tratado específicamente desde hace más de un siglo mediante sueroterapia con antivenenos (6), que en la mayoría de los casos no resuelven todos los problemas originados, ya que tienen limitadas capacidades de neutralización de efectos locales tales como hemorragia, edema y mionecrosis (7, 8, 9).

En Colombia, el 60% de los accidentes por mordeduras de serpientes son inicialmente tratados por curanderos tradicionales utilizando plantas medicinales en diferentes formas (10), uso que se da como respuesta a la localización distante y a las dificultades

geográficas para desplazar a las víctimas hasta los centros de atención hospitalaria. De otra parte, la producción y distribución de sueros o antivenenos es insuficiente, y no hay disponibilidad del producto en todas las comunidades afectadas e instituciones de salud encargadas (11).

Los extractos de plantas constituyen una rica fuente de compuestos farmacológicamente activos, y algunos de ellos han sido reportados como antagonistas a la actividad de varios venenos crudos y toxinas purificadas (12, 13). El uso local de plantas es importante y podría facilitar el desarrollo de agentes fito-terapéuticos de bajo costo (14), así como ayudar a solucionar en alguna medida las dificultades de producción y distribución de fármacos necesarios en las regiones más apartadas. Hasta el presente, sin embargo, no se ha elaborado un producto natural o derivado de estos, efectivo como droga medicada para pacientes envenenados. Esfuerzos para identificar nuevos agentes con actividad contra el veneno de serpiente son muy importantes para la salud pública (15).

Con base en lo anterior se plantearon como objetivos del presente estudio, determinar el conjunto de especies utilizadas como antiofídicas en algunas comunidades campesinas de las estribaciones de la Sierra Nevada de Santa Marta, documentar los aspectos más importantes relacionados con dicho uso y establecer en términos de conocimiento tradicional cuales son las cinco especies de mayor utilización.

MATERIALES Y METODOS

Área de estudio

En las estribaciones de la Sierra Nevada de Santa Marta (SNSM), macizo aislado de la Cordillera de los Andes que se eleva abruptamente hasta los 5.757 msnm, se localizan un gran número de pequeños asentamientos humanos pertenecientes a los departamentos del Magdalena, el Cesar y la Guajira. La población objeto de la presente investigación correspondió a las comunidades campesinas de los Municipios de San Pedro de la Sierra (10°54'16.51''N 74°02'54.72''O) en el Departamento del Magdalena, de Pueblo Bello (10°25'14.02''N y 73°35'5.83''O) en el Departamento del Cesar y de

Juan y Medio (11°07'2.42''N y 73°00'12.72''O) y las Casitas (11°03'9.25''N y 73°03'19.89''O) en el Departamento de la Guajira (Figura 1).



Figura 1. Localización de las municipalidades donde se realizó el trabajo

Toma de información etnobotánica

La información etnobotánica fue recogida entre Febrero de 2008 y Enero de 2010, adelantando previamente reuniones en cada una de las comunidades campesinas para presentar la propuesta, indicando los objetivos, explicando los métodos y haciéndose énfasis en la importancia de los resultados.

Se consultaron en total 13 informantes señalados por los habitantes como los mejores reconocedores o sabedores del uso de plantas en el accidente ofídico. Con cada informante seleccionado se procedió a realizar la toma de información mediante encuestas semi-estructuradas (anexo 1), siguiendo metodologías estándar (16). Se pretendió abarcar todos los aspectos generales sobre el accidente ofídico, tales como las plantas utilizadas, las más importantes o eficientes, métodos de preparación, combinaciones más frecuentes, vías de administración y dosis. A partir de las encuestas se estableció cuales fueron las cinco (5) especies más nombradas o citadas, método del

consenso de informantes (17), para considerarlas o seleccionarlas en el desarrollo de evaluaciones posteriores en laboratorio (ver capítulo 2).

Colección, preservación y determinación del material botánico

Las especies reportadas como útiles fueron buscadas en compañía de cada uno de los informantes en huertos caseros, en la vegetación cercana a las viviendas correspondiente a matorrales y bosques en diferentes estados de sucesión. De aquellas que pudieron ser localizadas se tomaron las respectivas notas de campo (descripción botánica general, estado reproductivo, fecha y sitio) y se colectaron tres ejemplares botánicos que fueron numerados, prensados y preservados en alcohol al 70%. Estos últimos fueron secados a una temperatura de 75°C durante 48 horas, determinados en el herbario de la Universidad del Magdalena (UTMC) por el especialista Eduino Carbono y registrados e ingresados a la colección (UTMC 12542- 12563).

RESULTADOS

Conjunto de especies utilizadas localmente

Con base en los nombres vulgares se reportaron 72 etno-especies de plantas utilizadas por los informantes contra la mordedura de serpientes venenosas, y de ellas se encontraron y colectaron en campo 22 solamente. Para estas últimas, entre las partes utilizadas se reportaron con mayor frecuencia las hojas y los tallos, y solo en algunos contados casos los frutos y las raíces (Tabla 1). La extracción mediante alcohol destilado artesanalmente (conocido como churo o chirrinche) es el método utilizado siempre para preparar la planta o conjunto de plantas y posteriormente tomar la bebida producida en dosis variables. El uso de cataplasmas sobre las heridas causadas por la mordedura de serpientes con la misma planta o plantas no es tan frecuente, y se prefiere emplear otras plantas como co-ayudantes en el tratamiento (Sábila y Limón criollo). Las especies más nombradas o consideradas importantes por los informante fueron en su orden *Cissampelos pareira* (contragavilana,) con 12 citaciones, *Aristolochia maxima* (contracapitana) con 12 citaciones, *Mucuna* cf. *pruriens* (Ojo de buey o pica-pica) con 8 citaciones, *Austro eupatorium inulaefolium* (contragavilana vallenata) con 7 citaciones y *Equisetum bogotense* (cola de caballo) con 6 citaciones (Tabla 1)

Tabla 1. Especies antiofidicas de uso más frecuente en las estribaciones de la Sierra Nevada de Santa Marta

Familia – especie	Nombre vulgar	Parte usada	Forma de uso	Citaciones
Menispermaceae - <i>Cissampelos pareira</i> L.	Contragavilana	H-T	EA , CT	12
Aristolochiaceae - <i>Aristolochia máxima</i> Jacq.	Contracapitana	H-T-R	EA , CT	12
Fabaceae - <i>Mucuna</i> cf. <i>pruriens</i> (L.) DC.	Ojo de buey	H-T- Fr	EA	8
<i>Austro eupatorium inulaefolium</i> Kunth	Contragavilana vallenata	H-T	EA , CT	7
Equisetaceae - <i>Equisetum bogotense</i> Kunth	Cola de caballo	H-T	EA	6
Polypodiaceae - <i>Polypodium</i> sp	Kalaguala	H	EA	5
Asteraceae - <i>Diplostephium weddellii</i> S.F. Blake	Romero	H	EA	3
Amaranthaceae*	Tilo	H	EA	3
Plantaginaceae - <i>Plantago major</i> L.	Llantén de la Sierra	H	EA	2
Asteraceae - <i>Ambrosia cumanensis</i> Kunth.	Altamisa	H-T	EA	2
Verbenaceae - <i>Lippia</i> sp	Orégano fino	H	EA	2
Euphorbiaceae - <i>Euphorbia tithymaloides</i> L.	Pitamo real	H-T-Fr	EA	2
Clusiaceae - <i>Clusia</i> sp	Rampacho	H-Fr	EA , CT	2
Lamiaceae - <i>Lepechinia bullata</i> (Kunth) Epling	Salvia	H	EA	2
Asteraceae - <i>Stevia lucida</i> Lag.	Jarrilla	H-T	EA	2
Lamiaceae - <i>Obtegomeria caerulescens</i> (Benth.) Doroszenko & P D. Cantino	Tomillo	H	EA	2
Fabaceae - <i>Senna reticulata</i> (Willd.) H.S. Irwin & Barneby	Bajaguito	H-T-R	EA , CT	1
Adoxaceae - <i>Sambucus nigra</i> L.	Asauco	H	EA	1
Brassicaceae - <i>Lepidium costarricense</i> Thell.	Mastuerzo	H-T	EA	1
Lamiaceae - <i>Plectranthus amboinicus</i> (Lour.) Spreng.	Orégano de la Sierra	H	EA	1
Co-ayudantes				
Liliaceae - <i>Aloe vera</i> (Linn) Burm. f.	Sábila	H	CT	6
Rutaceae - <i>Citrus</i> sp	Limón criollo	Fr	CT	6

H: hojas, T: tallo, R: raíz, Fr: fruto, EA: Extracción alcohólica, CT: Cataplasma.

Especies más importantes

Del conjunto de nombres reportados y de especies colectadas, se estableció que las cinco más importantes son las que se describen a continuación, incluyendo una sexta especie que aparece siempre en terapias colaterales o como co-ayudante:

***Cissampelos pareira* L.**

Familia botánica: Menispermaceae

Nombre vulgar: Contragavilana

Descripción: Bejuco herbáceo a ligeramente leñoso con hojas simples, alternas y de forma casi circular; flores amarillo verdosas pequeñas y poco llamativas; frutos de hasta 6 mm de color rojo o amarillo (Figura 2). Es poco frecuente en la zona de estudio y crece en rastrojos y bosque desarrollado de tierras bajas cálidas y húmedas.

Uso: Las hojas y ocasionalmente los tallos en extracto alcohólico se dan como toma, la cocción de los mismos se aplica en forma de cataplasma sobre la zona afectada. También se puede utilizar en mezcla con otras plantas para mejorar la acción. En la literatura se reportan un sin número de usos (analgésica, febrífuga, anti diarreica, expectorante, diurética, etc.) en diferentes culturas pero se resalta la coincidencia como antiofídica en diferentes pueblos de Amazonía (Ecuador y Perú) y de Centroamérica (México y Guatemala).



Figura 2. *Cissampelos pareira* (fuente: http://www.nybg.org/bsci/belize/Cissampelos_pareira_2.jpg)

***Aristolochia maxima* Jacq.**

Familia botánica: Aristolochiaceae

Nombre vulgar: Contracapitana

Descripción: Bejuco herbáceo de olor agradable con hojas simples y alternas, de forma oblonga y espatulada, dispuestas en espiral. Las flores se presentan en racimo y son de color café a morado con pintas blancas; los frutos son capsulas que al secar liberan semillas aladas y de forma acorazonada que se dispersan por el viento (Figura 3). Está presente en el monte alto de regiones cálidas durante todo el año pero en especial después de las lluvias, siendo escaso en la Sierra Nevada de Santa Marta.

Uso: las hojas, los tallos y las raíces han sido empleados milenariamente para combatir el veneno de serpientes, y suele aplicarse en combinaciones con contragavilana y otras plantas. En decocción se aplica directamente sobre el área de la mordedura como cataplasma.



Figura 3. *Aristolochia máxima* (Fuente:

http://www.google.com.co/imgres?imgurl=http://www.discoverlife.org/IM/I_SP/0003/320/Aristolochia_maxima_flower,I_SP309.jpg
g)

***Mucuna cf. pruriens* (L.) DC.**

Nombre vulgar: Ojo de buey.

Descripción: Bejuco herbáceo que puede crecer como rastrero o trepar por otras plantas. Posee hojas compuestas trifoliadas, alternas y con estipulas. Flores con pétalos púrpura, el fruto es una legumbre cubierta con pubescencia amarilla que ocasiona rasquiña. Florece en épocas de lluvia y produce fruto en épocas secas (Figura 4). Es originaria del Asia y se extiende por todo el trópico del nuevo mundo.

Uso: En extracción alcohólica se utilizan las hojas, los tallos y en especial las semillas. Se puede mezclar con otras plantas para hacer una contra bien fuerte. Se refieren en la

literatura otra serie de usos importantes de esta especie como en el manejo del mal de Parkinson, incremento en la producción de hormona del crecimiento y aumento de la libido.



Figura 4. *Mucuna* cf. *Pruriens* (Fuente: <http://fitonutricion.files.wordpress.com/2010/04/mucuna-pruriens-fruit.jpg>)

Especie indeterminada (Familia Asteraceae)

Nombre vulgar: Contragavilana vallenata.

Descripción: Arbusto de más o menos 1.5 metros de altura, con hojas simples lobuladas y alternas, que presenta inflorescencias amarillas. Es común en rastrojos de zonas altas y ocasionalmente se encuentra cultivada en los jardines de las casas.

Uso: Las hojas y los tallos son empleados en extracto alcohólico para contrarrestar la acción de los venenos la culebra cascabel (*Crotalus durissus*) y de la mapána (*Bothrops atrox*). Se puede mezclar con contragavilana y otras plantas para mejorar sus efectos.

***Equisetum bogotense* Kunth**

Nombre vulgar: Cola de caballo

Descripción: Arbustiva de hasta 1.7 metros de altura, posee tallos articulados, delgados, firmes y huecos (Figura 5). Crece en zonas húmedas y se encuentra en clima frío y templado.

Uso: Además de la mordedura de culebra mapaná, se utiliza toda la planta en forma de cocimiento para el dolor de cintura y contra afecciones de las vías urinarias. Por los altos contenidos de sílice en sus tallos se utiliza para limpiar platería y ollas.



Figura 5. *Equisetum bogotense* (Fuente: http://floradechile.cl/imag/aLaCampana/img_1299.jpg)

***Aloe vera* (Linn) Burm. f.**

Nombre vulgar: Sábila.

Descripción: Planta crasa con hojas dispuestas en espiral formando una roseta, poseen espinas en el margen y alcanza a crecer hasta los 50 centímetros de altura (Figura 6). Tiene olor particular y es de amplia distribución desde zonas frías hasta cálidas y se cultiva en los jardines y patios.

Uso: los tejidos crasos de las hojas, denominados comúnmente cristales, se utilizan en cataplasma frío para ayudar a cicatrizar las heridas producidas en el accidente ofídico.



Figura 6. *Aloe vera* (Fuente:

http://www.google.com.co/imgres?imgurl=http://blogs.hola.com/viviresunplacer/aloe_vera_400x371.jpg)

Manejo local del accidente ofídico

Se describe a continuación los aspectos más relevantes y la secuencia aproximada que siguen los diferentes curanderos en el manejo del accidente:

- Preparación y almacenamiento de los extractos

Las hojas, los tallos y ocasionalmente los frutos o las raíces de las plantas utilizadas como antiofídicas se depositan en envases de vidrio de colores rojo, verde o transparente (esto mejora la calidad) y se les agrega alcohol de preparación local conocido como chirrinche o churo para la extracción del principio curativo. Posteriormente, se colocan bajo a la influencia los rayos lunares (sereno) y solares por varios días, hasta obtener un concentrado que es llamado “contra”. El número de especies de plantas utilizadas depende de cada informante y puede variar entre 1 y 60, pero lo más frecuente es combinar entre 2 y 6. La obtención de extractos por cocción es poco frecuente debido a que las plantas no están disponibles todo el año y a que por este método en el almacenamiento se pierde la efectividad del producto.

- Vía de administración y terapia adjunta

Lo más frecuente es suministrar en dosis variables por vía oral los extractos alcohólicos almacenados o recientemente preparados. Otra forma, menos común, es la aplicación de cataplasmas calientes o fríos preparados en agua sobre los orificios producidos por la mordedura y las heridas o daños generados en los tejidos por el veneno. La aplicación del extracto de limón para contrarrestar las infecciones después del accidente ofídico, la aplicación de sábila para recuperar el tejido perdido y lograr una buena cicatrización, además de la utilización de la hoja de coca para tranquilizar al paciente, son las terapias adjuntas más utilizadas.

- Posología y dietas

Las dosis de los extractos alcohólicos o acuosos varían según el estado del paciente (directamente relacionado con el tiempo), la edad, el sexo, su contextura, la ingesta de comida o bebidas antes del accidente y el tipo de serpiente causante de la mordedura. De otra parte, parece existir una relación inversa entre el número de plantas utilizadas y el volumen de “contra” suministrado, siendo más bajo este último cuando el número de

plantas combinadas es mayor. Al parecer la suma de aquellas hace que la preparación sea más potente y se requiera una dosis menor. En general suelen suministrar para iniciar el tratamiento entre 50 y 1000 mililitros de extracto, dando tomas posteriores que varían según la evolución del paciente y que tienden a ser de menor volumen si hay respuesta positiva (50 a 200 mililitros).

Las dietas representan un factor importante para el tratamiento del accidente ofídico en la medicina tradicional de las estribaciones de la Sierra Nevada de Santa Marta, y el seguirlas con todo rigor incide en un resultado exitoso. Estas se pueden clasificar en tres categorías dependiendo de la intensidad del accidente, la primera es una dieta sencilla que consiste en la suspensión de alimentos altos en grasas y sales; la segunda es una dieta moderada en la que además se interrumpe la ingesta de alimentos derivados de lácteos y solo se permite el consumo de pescado preparado en agua y sin ningún aditivo; y la tercera es una dieta fuerte en la que junto con lo suspendido en las anteriores se prohíbe el consumo de todo tipo de carne y se aísla al paciente por cuarenta días permitiéndole solo contacto con el curandero. Esta última puede incluir también purgantes de sal al término del tratamiento.

- Aspectos etnomédicos y etnofarmacológicos

Los informantes clasifican o determinan los nombres de las serpientes según la región, lo que para ellos resulta importante al momento de seleccionar las plantas aplicadas en el tratamiento antiofídico. Entre los nombre más comunes podemos encontrar los siguientes: mapána rabo seco, mapána, rabo blanco, mapána de agua, mapána de río, mapána de tierras frías, cascabel, cuatro narices, cabeza de candado, coral, coralito, víboras de tierra caliente y víboras de tierra fría. Por otra parte, los curanderos para seguir el tratamiento tienen en cuenta el origen del accidente ofídico, ya que si ocurre en jornal de trabajo puede ser menos relevante y tratarse con facilidad, pero cuando es ocasionado por envidias o castigos se puede complicar el tratamiento. Los síntomas tratados por los curanderos generalmente son los mismos, malestar general, alteración de los nervios, dolor de cabeza, vómitos, sangrado, inflamaciones, diarrea, convulsiones, alucinaciones y laceraciones en la piel. Los curanderos expresan que sus

tratamientos no generan respuestas contraproducentes en los pacientes y en casos muy raros hay presencia de vómito al suministrarlos.

- Tratamiento mágico religioso

Otro aspecto descrito por los curanderos son los rezos y oraciones que se pueden aplicar para el mejoramiento del paciente, quien requiere según ellos de un estado de preparación mental y espiritual para lograr una conexión con la naturaleza y aprovechar de mejor manera los principios curativos de las plantas. De otra parte, la colecta de las plantas se debe adelantar en época de luna creciente previo agradecimiento a la madre tierra y a la planta misma. Resulta importante para el curandero saber si el paciente ha sido atendido por otro curandero ya que si este es el caso, el no puede hacer nada, por que incurre en el “contrapunteo” que puede ocasionar la muerte del paciente o la pérdida de la capacidad curativa del curandero. Otra causa para no atender al paciente es que la mordedura sea ocasionada por una culebra “supuesta”, la cual tiene origen en la magia negra y solo puede tratarse por la misma persona que la originó.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Los habitantes de las estribaciones de la Sierra Nevada de Santa Marta usan ampliamente sus recursos y poseen un conocimiento singular en el concepto de salud, enfermedad y sanación (18). En el presente estudio, con el reporte de 72 especies vegetales utilizadas en el manejo del accidente ofídico por los curanderos de dicha región, se confirma tal aseveración. Este número de especies es relativamente alto y comparable al de estudios realizados en los departamentos de Antioquia y Chocó con comunidades indígenas y negras, en los que se registran 101 especies reconocidas por un número mayor de informantes (20) a los considerados aquí. Haciendo salvedad al número de informantes y a los esfuerzos de muestreo (13), existe una cierta tendencia a presentarse números parecidos de especies en diferentes regiones, por ejemplo en el este de Nicaragua se registran 81 especies con esta aplicación (20).

Los curanderos de la zona de estudio utilizan especialmente las hojas y los tallos de las plantas, reportando solo unas pocas en las que también se emplean los frutos y las

raíces, coincidiendo con esta práctica para otras regiones y otras especies de uso medicinal (21). La preparación de extractos vegetales antiofídicos por cocción y maceración no es usual para los curanderos de la región como si lo es para otros sitios en el neotrópico (10, 20), y en las estribaciones de la Sierra la extracción en alcohol artesanal (chirrinche) es la norma. Esta sustancia se utiliza también para tratar laceraciones en la piel y preparar pociones de plantas que son aplicadas para enfermedades parasitarias, intestinales y analgésicas, Debe operar en esta preferencia algún aspecto ligado a la cultura, ya que es una característica propia de la región y no se registra para otros sitios (22).

Para incluir en los extractos los curanderos suelen mencionar una amplia oferta de plantas que puede alcanzar hasta las 60 (23), probablemente como resultado de la alta diversidad de la zona, pero la tendencia general es a preferir unas pocas tal vez porque están presentes la mayor parte del año, o porque que se preservan mejor (“contras”) o por la efectividad comprobada tradicionalmente. Las prácticas establecidas por los curanderos en la preparación de extractos para uso antiofídico tales como la toma de las partes de las plantas cuando la luna se encuentra en creciente, el depositar los extractos en botellas de vidrio de varios colores y exponerlos a la luna y el sol por varios días, son comunes con las seguidas en el procesamiento de la mayoría de plantas medicinales y se encuentran extendidas en todos los departamentos que comprenden la Sierra Nevada de Santa Marta (2).

En el manejo del paciente, para los curanderos uno de los aspectos importantes del éxito es recomendar una dieta especial y prácticamente en todo tipo de tratamiento, no solo en el accidente ofídico, las dietas son utilizadas en la medicina tradicional de la Región Caribe de Colombia, aplicándolas según la enfermedad y la evolución presentada por el paciente (4). El tratamiento por parte de los curanderos locales es casi siempre la única alternativa que tienen las comunidades indígenas y campesinas para afrontar las diferentes necesidades en salud, y dentro de las nuevas generaciones existe poco interés en aprender y perpetuar estas prácticas, haciéndose por tanto necesario documentar y rescatar todo el conocimiento sobre las especies utilizadas, las formas de manejo y las enfermedades que pueden ser tratadas por estos métodos. De otra parte es necesario

realizar estudios para validar experimentalmente el uso de dichas plantas y facilitar así el desarrollo de agentes fitoterapéuticos de bajo costo y ayudar a solucionar en alguna medida las dificultades de producción y distribución de fármacos necesarios en las regiones más apartadas (14, 15).

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

(1) Newman, D.J., Cragg, G., Snader, K.M. 2003. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *Journal of Natural Products* 66:1022-1037.

(2) Pinilla, M.N. 1993. Estudio etnobotánico preliminar con las comunidades campesinas de la vereda de río frío, vertiente occidental de la Sierra Nevada de Santa Marta. Fondo para la protección del medio ambiente "José Celestino Mutis". Pp 22-64.

(3) Barranco, W. 2005. Evaluación de las plantas utilizadas contra el veneno de serpientes en el Departamento del Magdalena, Colombia. Tesis de grado Universidad Del Magdalena. Pp 22-37.

(4) Caballero, M.R. 1995. Etnobotánica en las comunidades negras e indígenas del delta del río Patía, Colombia. Tesis de grado Universidad de Tecnológica del Chocó. Pp 14-32.

(5) Borges, M.H., Alves, D.L.F., Raslan, D.S., Piló-Velosos, D., Rodrigues, V.M., Homsí-Brandeburgo, M.I., & Lima, M.E. 2005. Neutralizing properties of *Musa paradisiaca* L. (Musaceae) juice on phospholipase A₂, myotoxic, hemorrhagic and lethal activities of crotalidae venoms. *Journal of Ethnopharmacology* 98:21-29.

(6) Dietrich, M. 2000. Notes on the traditional use of plants to treat snake bite in northern Papua New Guinea. *Toxicon* 38:299-302.

(7) Lomonte, B., Lungren, J., Johansson, B., & Bagge, U. 1994. The dynamics of local tissue damage induced by *Bothrops asper* snake venom and myotoxin II on the mouse cremaster muscle: an intravital and electron microscopic study. *Toxicon* 32:41-55.

- (8) Gowda, T.V. 1997. Interaction of snake venom phospholipases A₂ with plant isolates. En: Kini, R.M. (Editor). *Venom Phospholipase A₂ Enzymes: Structure, Function and Mechanisms*. Wiley, Chichester, England. Pp 205-221.
- (9) Melo, P.A. & Ownby, C.L. 1999. Ability of wedelolactone, heparin, and p-bromophenacyl bromide to antagonize the myotoxic effects of two crotaline venoms and their PLA₂ myotoxins. *Toxicon* 37:199-215.
- (10) Otero, R., Núñez, V., Jiménez, S.L., Fonnegra, R., Osorio, R.G. & García, M.E. 2000a Snakebites and ethnobotany in the northwest region of Colombia: Part I: Traditional use of plants. *Journal of Ethnopharmacology* 71(3):493-504.
- (11) Nuñez, V., Otero, R., Barona, J., Saldarriaga, M., Osorio, R.G. & Fonnegra, R. 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* 37:969-977.
- (12) Mors, W.B., Nascimento, M.C., Parente, J.P., Da Silva, M.H., Melo, P.A. & Suárez-Kurtz, G. 1989. Neutralization of lethal and myotoxic activities of South American rattlesnake venom by extracts and constituents of the plant *Eclipta prostrata* (Asteraceae). *Toxicon* 27 (9):1003-1009.
- (13) Otero, R., Núñez, V., Jiménez, S.L., Fonnegra, R., Osorio, R.G., García, M.E. & Díaz, A. 2000b. Snakebites and ethnobotany in the northwest region of Colombia: Part II: Neutralization of lethal and enzymatic effects of *Bothrops atrox* venom. *Journal of Ethnopharmacology* 71:505-511.
- (14) Elisabetsky, E. 1991. Sociopolitical, economical and ethical issues in medicinal plant research. *Journal of Ethnopharmacology* 32:235-239.
- (15) Otero, R., Tobón, G.S., Gómez, L.F., Osorio, R.G., Valderrama, R.D., Urreta, J.E., Molina, S., Arboleda, J.J. 1992. Accidente ofídico en Antioquia y Chocó. Aspectos

clínicos y epidemiológicos. (Marzo de 1989- febrero de 1990). Acta Médica Colombiana 17:229-249.

(16) Alexiades, M.N. 1996. Collecting ethnobotanical data: an introduction to Basic concepts and techniques. Advances in Economic Botany 10: 53-94.

(17) Adu-tutu, M., Afful, Y., Asante-Appiah, K., Lieberman, D., Hall, J.B., Elvin-Lewis, M. 1979. Chewing Stick Usage in Southern Ghana. Economic Botany 33(3):320-328.

(18) Carbone, E. 1987. Estudios Etnobotánicos entre Los Koguis de la Sierra Nevada De Santa Marta. Tesis de grado. Universidad nacional de Colombia. Fundación Prosierra Nevada de Santa Marta. Pp 12-38.

(19) Otero, R., Núñez, V., Barona, J., Fonnegra, R., Jiménez, S.L. & Osorio, R.G. 2000c. Snakebites and ethnobotany in the northwest region of Colombia. Part III: Neutralization of the haemorrhagic effect of *Bothrops atrox* venom. Journal of Ethnopharmacology 73(1-2): 233-241.

(20) Coe, F. G. & Anderson, G. J. 2005. Snakebite ethnopharmacopoeia of eastern Nicaragua. Journal of Ethnopharmacology 96:303-323.

(21) Pérez, A.E. 1996. Plantas útiles de Colombia. 5^a edición del centenario, Bogotá. Fondo FEN Colombia. Vol.1. Pp 56-87.

(22) Cruz, V.Z. & Cotes, C.J. 1989. Uso popular de las plantas medicinales de la ciudad de Santa Marta. Tesis de grado Universidad del Magdalena. Pp 22-42.

(23) Reichel, I. & Gartner, A. 1988. Investigación en medicina tradicional, vereda el Congo, Cuenca rio frio. Fundación Prosierra Nevada de Santa Marta. Pp 10-38.

ANEXO 1. INFORMACIÓN ETNOBOTÁNICA POR CADA PLANTA

COMUNIDAD: _____ INFORMANTE: _____
Edad: _____ Sexo: _____ Colección botánica: _____ Muestra para ensayos: _____
Hábitat: Silvestre _____ cultivada _____ Nombre indígena: _____ Fecha: _____

PREPARACIÓN Y ALMACENAMIENTO

- Parte(s) de la(s) planta(s) usada(s): _____
- Otros ingredientes (adición en mezcla, solventes): _____
- Cantidades usadas: _____
- Método de procesamiento: 1. Jugo o zumo _____ 2. Macerado _____ 3. Polvo _____ 4. Infusión caliente _____
5. Infusión fría _____ 6. Decocción _____ 7. Jarabe _____ 8. Extracción alcohólica _____ 9. Ungüento _____
10. Otro _____
- Almacenamiento (fresca o se puede almacenar): _____
- Notas o variaciones: _____

VÍA DE ADMINISTRACIÓN

- Interna: 1. Oral _____ 2. Inhalada _____ 3. Otra _____
- Externa: 1. Mascar y escupir _____ 2. Vaporización (baño de vapor) _____ 3. Soplar sobre área afectada _____
4. Baño de hierbas _____ 5. Cataplasma _____ 6. Emplasto _____ 7. Compresa _____ 8. Frotación _____
9. Otra _____
- Notas: _____

DOSIS (cantidades, frecuencia y tiempo de tratamiento): _____

OTRAS TERAPIAS ADJUNTAS

- Baños: _____ Dieta: _____ Masajes: _____ Recitaciones: _____ Ritual de curación: _____ Otros rituales: _____
Notas: _____

ASPECTOS ETNOMÉDICOS Y ETNOFARMACOLÓGICOS

- Nombre de la picadura (escritura y traducción literal): _____

- Etimología (explicación de las causas): _____

- Síntomas tratados (acción específica de plantas: inflamación, dolor de cabeza, vómito, etc.): _____

- Respuesta a la terapia (alucinaciones, vómito, diarrea, contraindicaciones): _____

- Acción farmacológica supuesta: _____

CAPÍTULO II

Evaluación biológica de extractos vegetales utilizados en las estribaciones de la Sierra Nevada de Santa Marta contra el veneno de la serpiente *Bothrops asper*.

Biological evaluation of vegetable statements utilized in the foothills of the Sierra Nevada of Santa Marta against the poison of the snake *Bothrops asper*

Willinton Barranco Pérez^{1,4} Vitelbina Nuñez² & Tatiana Lobo Echeverri^{3,4}

¹ Estudiante de Maestría en Bosques y Conservación Ambiental wbarranco66@yahoo.es, Departamento de Ciencias Forestales

² Profesora Asociada, Escuela microbiología, Universidad de Antioquia

³ Profesora Asociada, Departamento de Química, Facultad de Ciencias.

⁴ Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín.

RESUMEN

La mordedura de serpientes constituye un problema de salubridad importante en muchos países tropicales y subtropicales, con un estimado de 2,5 millones de personas envenenadas cada año. En Colombia las especies *Bothrops asper* y *Bothrops atrox* son las causantes del 70 al 90 % de los accidentes registrados. Se estima que el 60 % de estos accidentes son inicialmente tratados por curanderos tradicionales utilizando plantas medicinales en diferentes preparaciones. Este estudio evaluó la capacidad inhibitoria de cinco especies contra el efecto proteolítico y hemolítico indirecto inducido por el veneno de *B. asper* en ensayos *in vitro*. Las especies, que fueron seleccionadas de acuerdo a su uso en la medicina tradicional por parte de las comunidades campesinas de la Sierra Nevada de Santa Marta, fueron, *Aristolochia máxima*, *Cissampelos pareira*, *Equisetum bogotense*, *Mucuna cf pruriens* y *Austroeupatorium inulaefolium*. La planta *E. bogotense* mostró los mayores porcentaje de inhibición contra la actividad de las fosfolipasas A₂ (42,29 %), así como la mayor

precipitación de las proteínas en un rango de masas moleculares de 28,2 y 94,43 KDa. Al fraccionar el extracto de *E. bogotense* se obtuvieron cinco fracciones, las cuales presentaron un porcentaje de inhibición de $36,6 \pm 1,07$ a $46,1 \pm 13,6$. Adicionalmente se detectaron algunos núcleos por métodos cualitativos, principalmente alcaloides, esteroides y/o triterpenos, taninos, cumarinas y leucoantocianidinas.

ASBTRATC

The bite of snakes constitutes a problem of important salubrity in many subtropical and tropical countries, with a reckoned of 2.5 million people poisoned each year. In Colombia the species *Bothrops asper* and *Bothrops atrox* are the causes from the 70 to the 90% of the registered accidents. It is estimated that the 60% of these accidents are initially treated by traditional faith healers utilizing medicinal plants in different preparations. This study evaluated the inhibitory capacity of five species against the effect proteolytic and hemolytic indirect induced by the poison of *B. asper* in trials or vitro. The species, that were selected according to their use in the traditional medicine on the part of the rural communities of the Sierra Nevada of Santa Marta, they were, *Aristolochia maximum*, *Cissampelos pareira*, *Equisetum bogotense*, *Mucuna cf pruriens* and *Austroeupatorium inulaefolium*. The plant *E. bogotense* showed the greater percentage of inhibition against the activity of the fosfolipasas A2 (42.29%), as well as the greater haste of the proteins in a rank of molecular masses of 28.2 and 94.43 KDa. To the fraccionar the statement of *E. bogotense* five fractions were obtained, which presented a percentage of inhibition of 36.6 ± 1.07 to 46.1 ± 13.6 . Additionally some nuclei by qualitative methods were detected, chiefly alkaloids, steroids and/or triterpenos, tannins, cumarinas and leucoantocianidinas.

Palabras Claves: Sierra Nevada de Santa Marta, plantas antiofídicas, veneno, *Bothrops*, Fosfolipasa A₂.

INTRODUCCIÓN

La mordedura de serpiente constituye uno de los problemas de salubridad más importante en numerosos países tropicales y subtropicales, con un estimado de 2,5 millones de personas envenenadas cada año (1). En Colombia, las especies *Bothrops asper* y *Bothrops atrox* son las causantes del 70 al 90 % de los accidentes registrados (2, 3), y sus venenos inducen efectos locales y sistémicos que ponen en peligro la vida humana (4,5,6). La seroterapia o administración intravenosa de inmunoglobulinas equinas u ovinas, descubierta hace más de 100 años (7,8), es el principal tratamiento contra el envenenamiento por mordedura de serpientes, pero su acción tiene una

eficiencia limitada en la neutralización de efectos locales como hemorragia, edema y mionecrosis, debido a su rápida instalación(9,10).

En Colombia, el 60 % de los accidentes causados por mordeduras de serpientes son inicialmente tratados por curanderos tradicionales, los cuales utilizan plantas medicinales en diferentes formas (11). La utilización frecuente de plantas para el tratamiento antiofídico se debe a la localización distante y las dificultades geográficas de los lugares vulnerables al accidente. Además la producción y distribución de sueros o antivenenos es insuficiente y no hay disponibilidad del producto en todas las comunidades e instituciones de salud encargadas (12). Para contribuir a esta problemática se han realizados estudios para evaluar el uso tradicional de varias plantas registradas como antiofídicas, en los departamentos de Antioquia y Chocó, registraron 101 plantas utilizadas como antiofídicas por las comunidades locales (11). La evaluación de 75 de estas se detectó en 31 especies, actividad para neutralizar el veneno de *B. asper* (13). En uno de los estudios más recientes se evaluó la actividad de 12 plantas (*Bixa orellana*, *Ficus nymphaeifolia*, *Struthanthus orbicularis*, *Gonzalagunia panamensis*, *Brownea rosademonte*, *Tabebuia rosea*, *Pleopeltis percussa*, *Trichomanes elegans*, *Renealmia alpinia*, *Heliconia curtispatha*, *Dracontium croatii* y *Citrus limon*) contra la formación de edema, defibrinación y efecto anticoagulante del veneno de *Bothrops asper*, obteniéndose en todos los casos neutralización parcial de la formación de edema entre el 58 al 76 %. Asimismo en este estudio, 10 especies presentaron un porcentaje de neutralización del 100 % frente al efecto defibrinante y nueve incrementaron el tiempo de coagulación inducido por el veneno (14). Por otra parte, en la Sierra Nevada de Santa Marta se identificaron 26 especies de plantas usadas como antiofídicas por la etnia Kogui (15), De estas solo se evaluaron *Aristolochia anguicida* y *Mucuna pruriens* contra el veneno de *B. atrox*, las cuales presentaron actividad inhibitoria *in Vitro* del efecto hemolítica indirecto (16).

Dado todo lo anterior, se da la necesidad de buscar alternativas e investigar acerca de inhibidores de los efectos ocasionados a nivel local por el veneno de las serpientes, como la necrosis y la pérdida de tejidos afectados. Dichas opciones pueden ser útiles para el desarrollo de terapias que puedan complementar la actividad de los antivenenos (17). Es así, como el objetivo de este estudio fue el de evaluar la capacidad inhibitoria contra el veneno de *B. asper*, de los extractos vegetales de cinco especies seleccionadas,

de acuerdo al uso dado por comunidades campesinas de la Sierra Nevada de Santa Marta.

MATERIALES Y METODOS

Venenos y reactivos

El veneno fue una mezcla homogénea, obtenida por ordeño manual de 40 especímenes adultos de *B. asper* procedentes de los departamentos de Antioquia y Chocó, mantenidos en cautiverio en el serpentario de la Universidad de Antioquia. El veneno fue centrifugado, el sobrenadante liofizado y congelado a 70° C hasta su uso. Todos los reactivos y solventes utilizados fueron grado reactivo o analítico (Marca Merck®).

Material vegetal

Las especies seleccionadas para evaluación *in vitro* fueron, *Aristolochia máxima* Jacq, (Aristolochiaceae), *Cissampelos pareira* L (Menispermaceae), *Equisetum bogotense* Kunth (Equisetaceae), *Mucuna cf. pruriens* L (Fabaceae) y *A. inulaefolium*. Todo el material vegetal fue colectado en el municipio de Pueblo Bello departamento del Cesar, Colombia (10°25'05 N, 073°35'07 W). La determinación taxonómica de los ejemplares fue realizada en el herbario de la Universidad del Magdalena (UTMC) por el especialista Eduino Carbone, y los ejemplares fueron registrados e ingresados a la colección (UTMC 12542-12544, 12549, 12551 respectivamente). Posteriormente, se colectaron en campo entre 2000 y 3000 gramos en peso húmedo de cada planta para la evaluación en el laboratorio.

Preparación de los extractos

Las muestras vegetales fueron secadas en una estufa convencional a 37° C durante 48 horas, posteriormente se molieron y se tomaron 500 gramos de peso seco. Las muestras fueron sometidas a un proceso de percolación con etanol al 96 % durante 12 horas, mediante el uso de un equipo de Soxhlet. Finalmente, el solvente de las muestras fue evaporado por medio de un rotaevaporador (Buchi R-124®).

Análisis fitoquímico y fraccionamiento de la especie con mayor actividad

El análisis fitoquímico preliminar de los extractos para la detección de metabolitos secundarios, se efectuó de acuerdo con los métodos propuesto por Sanabria & Domínguez (18, 19). Se hicieron pruebas para la detección de alcaloides, esteroides y/o terpenoides, flavonoides, naftoquinonas, antroquinonas, saponinas, taninos y cumarinas. Para la especie con actividad más promisoría, se realizó un fraccionamiento en columna utilizando Sephadex LH-20 como fase sólida. El extracto se eluyó de forma isocrática con hexano: diclorometano: metanol (5:3:1). Para detectar el perfil cromatográfico de las fracciones, se corrieron placas de sílica gel (capa fina), con sistemas de solventes de diferente polaridad tales como, hexano: acetona (3,5:1,5), hexano: acetato de etilo (4:1) y diclorometano: metanol (4:1). Posteriormente, las placas fueron visualizadas usando revelador universal (H₂SO₄ 10 %).

Efecto inhibitorio de actividad de fosfolipasas A₂

Para este ensayo, se siguió el método descrito por Dole (20) con algunas modificaciones. A 1 mL de yema de huevo (sustrato) se le agregaron 100 µL de una mezcla variable de cada extracto con 20 µg del veneno, esto fue incubado a 37° C por 30 minutos. Después, se le agregó una mezcla de extracción con hexano para extraer los ácidos grasos liberados, los cuales fueron titulados con NaOH 0,018 N y azul de timol en etanol como indicador. Cada prueba fue replicada tres veces y los resultados fueron expresados como promedios.

Electroforesis SDS-PAGE

La electroforesis fue realizada sobre geles de poliacrilamida al 12 % en condiciones no reducidas, como lo describe Laemmli (21). Se incubaron 40 µg de veneno con 400 µg de cada extracto (relación 1: 10) durante 30 minutos a 37° C. Posteriormente las muestras se corrieron en una cámara Mini Protean-II® (Bio Rad) durante 60 minutos a 150 voltios. El veneno y los extractos solos fueron incubados en los mismos tiempos y corridos en las mismas condiciones. Las proteínas fueron coloreadas empleando azul Coomssie R 250.

Inhibición de la actividad proteolítica sobre la azocaseína.

Utilizando como control positivo una DPm (Dosis Proteolítica mínima de 10 µg para el veneno de *B. asper*), se preincubaban (30 min/37°C) con una relación de veneno: extracto (1:10); en la prueba de inhibición, 100 µL de azocaseína (10mg/mL) y 20 µL de la mezcla veneno: extracto se incubaban (90 min/37°C) previo a la adición de ácido tricloroacético al 5% para detener la reacción. Una vez logrado este objetivo, los tubos son centrifugados (2.000 rpm/5 min) y 100 µL de sobrenadante son transferidos a pozos de platos de 96 pocillos de fondo plano en los que posteriormente se agregan 100 µL de NaOH 0.5M antes de la lectura de la absorbancia a 280 nm en un lector de ELISA (AWARNES, Stat Fax 3200) contra un blanco de reactivos, según el micrométodo de azocaseína propuesto por Wang *et al* (22).

Inhibición de la actividad hemolítica indirecta

Se utilizó el método de agarosa-yema de huevo-eritrocitos, descrito por Lomonte y Gutiérrez (23). Se determinó como dosis hemolítica indirecta mínima (DHIm) del veneno de *B. asper*, aquella dosis que generó un halo de hemólisis de 20 mm de diámetro después de 20 horas de incubación. Los ensayos de inhibición se llevaron a cabo incubando mezclas de cantidades variables de las fracciones del extracto activo con una DHIm del veneno a 37° C por 30 minutos. Los experimentos fueron realizados por triplicado.

Actividad citotóxica del extracto de *Equisetum bogotense*

En este ensayo se utilizó la línea celular C2C12 de mioblastos de músculo esquelético de ratón (ATCC CRL-1772). Estas células fueron mantenidas en un medio de crecimiento, DME (Medio de Tagle modificado por Dulbecco), suplementado con suero fetal bovino (SBF) al 15 %. La cuantificación de la citotoxicidad se realizó adicionando 150 µL de medio de ensayo (DME con 1 % SBF) con concentraciones variables del veneno completo de *B. asper* a células cultivadas en platos de 96 pozos. Después de 3 h de incubación a 37° C, se tomaron muestras de sobrenadante y se midió la actividad de la enzima deshidrogenada láctica (LDH; EC1.1.127) liberada, utilizando un método cinético (Wiener LDH-P UV). Los experimentos de inhibición se llevaron a cabo

mediante preincubación del veneno con el extracto crudo de *E. bogotense* o sus fracciones previos a su adicción a las células. Los ensayos se realizaron por triplicado.

Análisis de los datos

Con el programa estadístico PRISMA 4.2, se realizó un ANOVA de una vía seguido por un test de Bonferroni, para comparar las muestras con los controles positivos (veneno solo), realizados en la prueba del efecto inhibitorio de actividad de fosfolipasa A₂ obtenido con cada extracto. Los ensayos fueron realizados por triplicado y los resultados se expresaron como la media ± S.E.M (error estándar de la media). Se consideraron diferencias significativas cuando $p < 0,05$.

RESULTADOS

Efecto inhibitorio de actividad de fosfolipasas A₂

Los porcentajes de inhibición de la actividad de los extractos vegetales contra el veneno de *B. asper* siguieron la siguiente secuencia: *E. bogotense* > *C. pareira* > *M. cf. pruriens* > *A. inulaefolium* > *A. máxima*. La especie *E. bogotense* mostró el mayor porcentaje de inhibición con un valor de 42,29 % y *A. máxima* el menor porcentaje con 11,54 % (Tabla 1).

Tabla 1. Inhibición de la actividad enzimática del veneno de *B. asper*

Extractos crudos					
Ensayos	<i>A. maxima</i>	<i>C. pareira</i>	<i>E. bogotense</i>	<i>M. cf. pruriens</i>	<i>A. inulaefolium</i>
Porcentaje de inhibición de PLA₂ (Dole)	11,54±1,6	28,85±5,4	42,29±1,2	17,28±6.2	15,34±7,8

Los resultados se presentan como la media ± SEM del porcentaje de inhibición de ensayos llevados a cabo por triplicado.

Electroforesis de los extractos vegetales

La electroforesis del veneno de *B. asper* y los extractos vegetales (Figura 1), se puede observar que en *E. bogotense* causa una precipitación de las proteínas en un rango de masas moleculares 28,2 y 94,43 KDa aproximadamente Figura 1A, carril 7, por otro lado se presentan la desaparición de bandas entre 31KDa y 97KDa , aproximadamente para las especies *M. cf. pruriens* y *A. inulaefolium*.

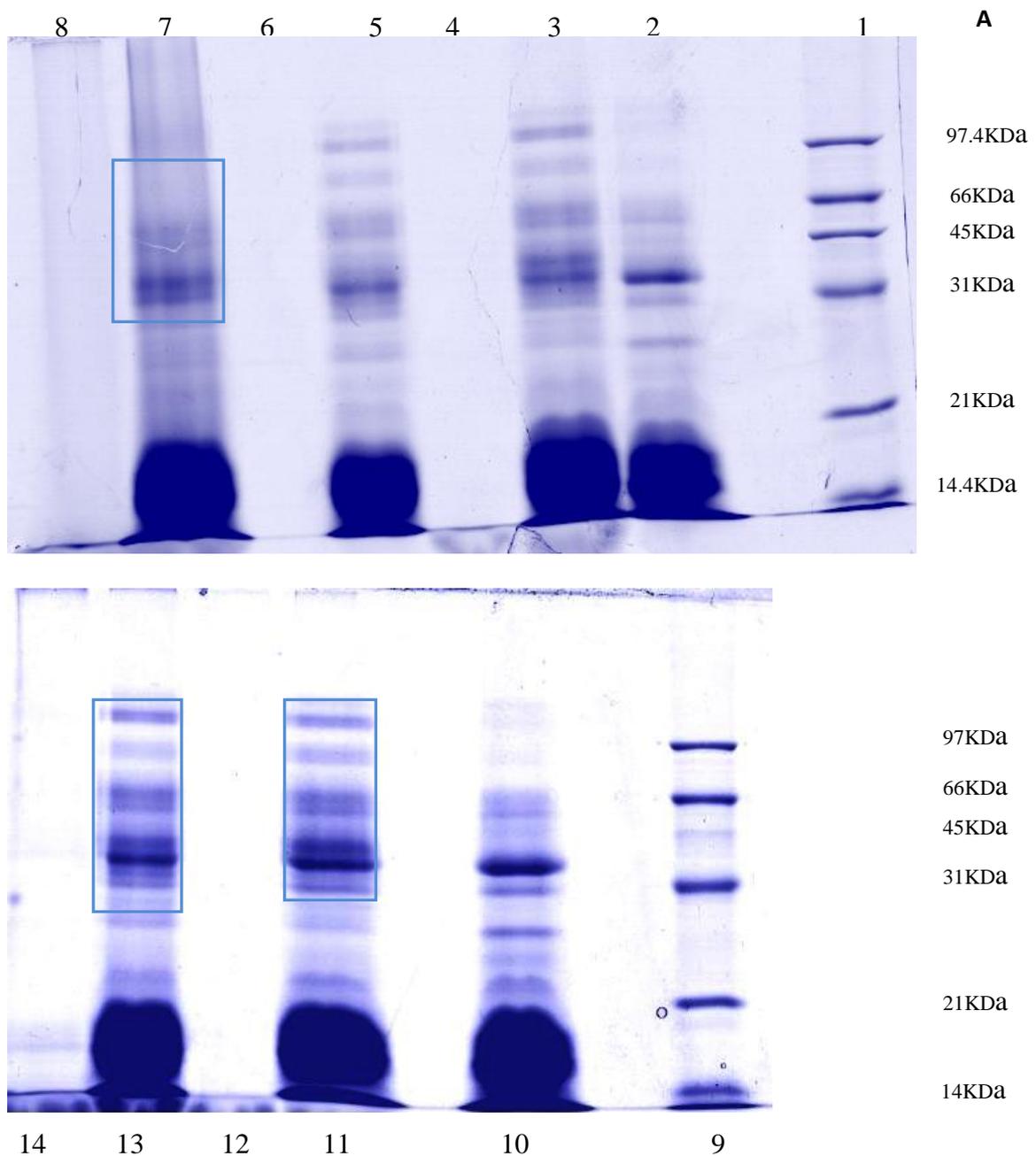


Figura 1. Extractos vegetales. **A.** 1: Marcador de peso molecular, 2: Veneno, 3: *Cissampelos pareira* + Veneno, 4: *C. pareira*, 5: *Aristolochia maxima* + veneno, 6: *Aristolochia maxima*, 7: *Equisetum bogotense*+veneno, 8: *Equisetum bogotense*, 9: Marcador de peso molecular, 10: Veneno, 11: *Mucuna cf. pruriens* + Veneno, 12: *Mucuna cf. pruriens* + veneno, 13: *A. inulaefolium* + Veneno, 14: *A. inulaefolium*.

Inhibición de la actividad proteolítica sobre la caseína

Ninguno de los cinco extractos inhibió la actividad proteolítica inducida por el veneno de *B. asper*.

Fraccionamiento de *Equisetum bogotense* y efecto inhibitorio de la actividad fosfolipasas A₂ por las fracciones

La especie *E. bogotense*, fue seleccionada para proseguir con otros ensayos, por tener el mejor porcentaje de inhibición de la actividad de fosfolipasa inducida por el veneno completo de *B. asper*. Al fraccionar el extracto etanolico se obtuvieron cuatro fracciones que fueron nombradas como F1 a F4, las cuales al ser evaluadas en su capacidad inhibitoria de la actividad de fosfolipasa mostraron una actividad similar a la del extracto crudo (Tabla 2), siendo la fracción F2, la que presentó un porcentaje mayor que las otras fracciones. No obstante no hubo diferencias significativas ($p > 0,05$) en su actividad (Tabla 2),

Tabla 2. Inhibición de la actividad enzimática del veneno de *B. asper*

Fraccionamiento de <i>E. bogotense</i>					
Ensayos	E.C	F1	F2	F3	F4
Porcentaje de inhibición de PLA₂ (Dole)	44,4 ± 7,6	40,4 ± 0,27	46,1 ± 13,6	40,4 ± 19,1	36,6 ± 1,07

Los resultados se presentan como la media ± SEM, del porcentaje de inhibición de ensayos llevados a cabo por triplicado. E.C: Extracto crudo, F: fracciones.

Inhibición de la actividad hemolítica indirecta por fracciones de *Equisetum bogotense*

La fracciones 1, 2, y 3 de *E. bogotense* redujeron el efecto hemolítico inducido por el veneno de *B. asper*, en porcentajes variables, no obstante F1 fue las mas activa (22,45%) La fracción F4 no mostró actividad (Figura 2).

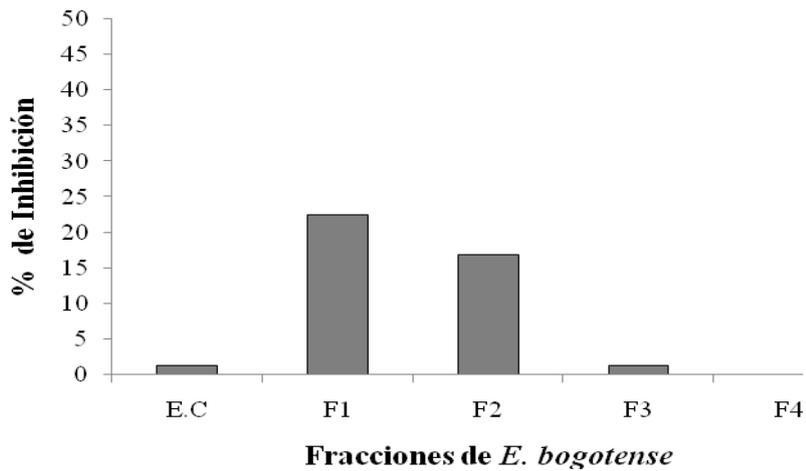


Figura 2. Porcentaje inhibición de la actividad hemolítica indirecta del veneno de *B. asper*. E.C: Extracto crudo, F1-F4: fracciones obtenidas del extracto vegetal.

Inhibición de la Citotoxicidad por *E. bogotense* y sus fracciones

El efecto citotóxico inducido por el veneno de *B.asper* fue reducido por el extracto crudo de *E. bogotense* y por las fracciones 1 y 3, el mayor porcentaje de inhibición (78%) se observó con la fracción F3 (Figura 3). El extracto crudo de *E. bogotense*, no fue citotóxico, pero las fracciones F2 y F4 fueron citotóxicas, por ello no se les determinó su actividad inhibitoria.

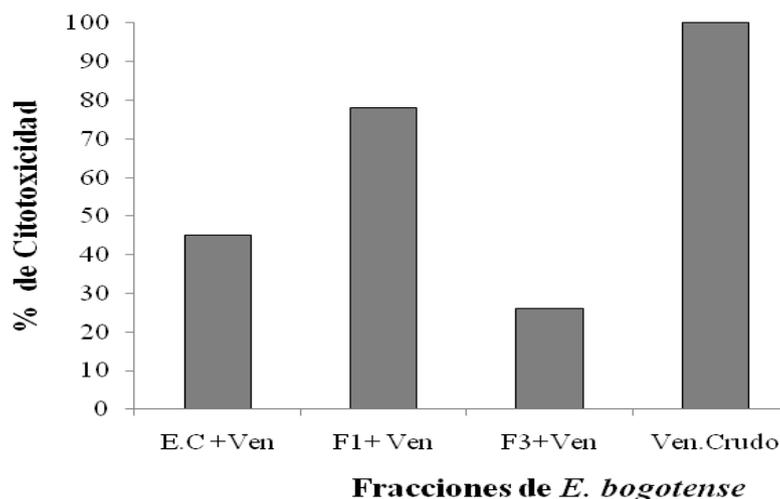


Figura 3. Porcentaje de la citotoxicidad inducida por el veneno de *B. asper* y por las mezclas de las fracciones con el veneno. E.C: Extracto crudo, F1-F3: fracciones obtenidas del extracto vegetal, Ven: Veneno.

Análisis fitoquímico preliminar de *E. bogotense*

Para el extracto de *E. bogotense* en la marcha fitoquímica preliminar, se detectó la presencia de alcaloides, esteroides y/o triterpenos, taninos, cumarinas y leucoantocianidinas (Tabla 3).

Tabla 3. Análisis fitoquímico de *Equisetum bogotense*

Metabolito secundario	Resultado
Alcaloides	Positivo
Esteroides y/o triterpenos	Positivo
Flavonoides	Negativo
Taninos	Positivo
Cumarinas	Positivo
Antocianidinas	Negativo
Cardiotónicos	Negativo
Saponinas	Negativo
Leucoantocianidinas	Positivo
Nafto y natroquinonas	Negativo

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

En el mundo se han reportado más de 750 especies de plantas empleadas por curanderos tradicionales para el tratamiento de mordeduras de serpientes, pero relativamente pocas de ellas han sido evaluadas para comprobar su efectividad en ensayos controlados (24). En este trabajo se encontró que de las 5 especies más utilizadas por los curanderos de las estribaciones de la Sierra Nevada de Santa Marta, la especie *E. bogotense* fue la más promisoría en cuanto a su porcentaje de inhibición de la actividad de la fosfolipasa A₂ del veneno de *B. asper* con respecto a las demás especies evaluadas (Tabla 1). Las PLA₂ de venenos de serpientes, son abundantes en los venenos de serpientes e inducen efectos variables tales como neurotoxicidad pre y/o posináptica, miotoxicidad local y/o sistémica, anticoagulación, cardiotoxicidad, modulación de la agregación plaquetaria, actividades hemolítica, edematizante e hipotensora y daño directo en órganos como el riñón, pulmón e hígado(25). *E. bogotense* inhibió en 40% la actividad de fosfolipasa del veneno completo de *B. asper*. Otras plantas citadas en la literatura han informado resultados similares a los obtenidos con *E. bogotense*, utilizando el método de Dole

(20). Este es el caso de la especie *Tabernaemontana catharinenses*, que demostró 40 % de inhibición frente al veneno de la *B. jararacussu* (26).

E. bogotense ha sido descrita como diurética (27), dado que una de las complicaciones en una mordedura de serpiente *B. asper* es la insuficiencia renal aguda (25), esta planta podría contribuir a solucionar el daño renal inducido por el veneno. Por otra parte, las especies *A. máxima* y *M. cf. pruriens* mostraron porcentajes de inhibición bajos en este trabajo (Tabla, 1), comparados con otros estudios realizado con las mismas especies, en uno de esos informes los extractos presentaron un porcentaje de inhibición superior al 60 % en la actividad de la PLA₂ del veneno de la *B. asper*, evaluadas por el método de actividad hemolítica indirecta (16). Es posible que los bajos porcentajes de inhibición obtenidos en este estudio se deban a otros factores que influyen en la composición química de las plantas presentando cambios en su metaboloma, como el lugar biogeográfico de procedencia, condiciones del suelo y el ambiente, época de recolección, entre otras (28). Adicionalmente, la identidad de la especie *M. cf. pruriens* evaluada en el presente trabajo, aun esta bajo confirmación lo que puede influir en los resultados obtenidos.

La inhibición mostrada por *E. bogotense*, puede estar relacionada con un efecto de degradación sobre algunas de las proteínas del veneno, el cual fue observado en la electroforesis. En esta prueba se evidenció degradación, de las proteínas del veneno en un rango de masa molecular de 28,2 y 94,43 KDa (Figura 1A, carril 7). Además se presento actividad en las especies de *M. cf pruiens* y *A. inulaefolium* en el rango de masa molecular de 31 a 97 KDa. Resultados similares fueron hallados para algunas especies de la familia Heliconiaceae, cuando fueron evaluados frente al veneno de *B. asper*, en las cuales se presentaron reducciones en la intensidad de las proteínas del veneno en un rango de 95 y 110 KDa, así como una inhibición de la actividad hemolítica indirecta del veneno (29). Por otro lado no obstante estos mismos extractos no inhibieron la actividad proteolítica sobre la caseína inducida por el veneno, y para todos los extractos crudos evaluados fueron inocuos. Resultados similares se han observado con este mismo método en extractos etanolicos de *Curcuma parvifolia*, pero utilizando otros venenos (30).Estos resultados contrastan con los informados al evaluar

el efecto proteolítico sobre caseína inducido por el veneno de *Porthidium nasutum*, con extractos de *Vitis nifera* en una relación 1:10 presentando un poder neutralizante de $(71,46 \pm 5,38)$, estos resultados dependieron de la cantidad de extracto utilizado ; La diferencias en los resultados para estos estudios se puede deber a las diferencias en las relaciones extracto - veneno que se emplearon (31).

Al evaluar las fracciones del extracto de *E. bogotense* contra la actividad de la fosfolipasa A₂ del veneno de *B. asper*, no se presentaron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre las fracciones (Tabla 2). El fraccionamiento del extracto crudo de la especie no presentó un aumento significativo en el porcentaje de inhibición., manteniéndose una tendencia homogénea (rango 36,6 - 46,1 %), en cuanto a la neutralización el veneno en esta prueba, lo cual se deba posiblemente al no actuar el sinergismo que hay entre los compuestos que en algunos casos pueden aumentar la actividad de los metabolomas (32). Porcentajes similares fueron hallados en muestras de la especie *Eclipta prostrata* después de su fraccionamiento, con las cuales se registraron porcentajes de inhibición del 50-58 %, manteniendo una tendencia en conservar los porcentajes de inhibición al evaluar el extracto crudo o sus fracciones (33).

La prueba de citotoxicidad mostró el efecto citotóxico inducido por el veneno de *B.asper* fue reducido por el extracto crudo de *E. bogotense* y por las fracciones 1 y 3 (Figura 3). El extracto crudo de *E. bogotense*, no fue citotóxico, pero las fracciones F2 y F4 fueron citotóxicos, probablemente esto se deba a la cantidad de otros compuestos en el extracto crudo que reducen la cantidad de los compuestos activos. La presencia de toxicidad en las fracciones F2 y F3 que han presentado actividad inhibitorias en las evaluaciones realizadas resulta muy frecuente cuando se buscan moléculas bioactivas en productos naturales, ya que estas deben ser modificadas para utilizarlas como plantillas en la obtención sintética de nuevos núcleos que registren una mayor actividad biológica y menor toxicidad (34)

El análisis fitoquímico preliminar de *E. bogotense* evidenció la presencia de esteroides y/o triterpenos, taninos, alcaloides, cumarinas y leucoantocianidinas, resultados similares en esta especie han sido confirmados en la literatura, en donde se detectó la

presencia de β -sitosterol, flavonoides, cumarinas y alcaloides (27). La caracterización preliminar de los compuestos presentes en las especies activas, es relevante ya que puede dar una idea de los metabolitos responsables de la actividad biológica contra el veneno de serpientes (28). En este sentido, se han encontrado reportes de los metabolitos presentes en *E. bogotense* los cuales pueden tener cierta actividad contra las PLA₂. En uno de estos estudios se encontró que los esteroides como el, β -sitosterol y el estigmasterol de la especie *Eclipta prostrata* contrarrestaron la toxicidad del veneno de *Crotalus durissus* en ratones (33). En otro estudio, se observó la presencia de taninos y polifenoles en la especie *Musa paradisiaca*, los cuales los extractos fueron evaluados tanto por separado como en una mezcla, para probar su efecto contra las actividades miotóxica y hemorrágica del veneno de *Crotulus sp*, en ratones (35). Además, en cuanto a la presencia de cumarinas, pro-antocianidinas y leucoantocianidinas detectadas en *E. bogotense*, se puede relacionar con los resultados obtenidos en *Croton urucurana*, frente al veneno de *B. jararaca*. Estos núcleos fueron antagonistas de la acción hemorrágica y fuertes inhibidores de las metaloproteínas del veneno botrópico (36). Por otro lado, en la especie *Mucuna pruriens* se registraron alcaloides que presentaron alta eficacia contra el veneno de serpientes de la familia Viperidae y Elapidae (37).

Aunque que *E. bogotense*, redujo solamente en forma parcial algunos de los efectos inducidos por el veneno de *B. asper* in Vitro, sería importante aislar e identificar el o los compuestos que dan esta actividad.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- (1) Chippaux, J.P. 1998. Snake-bites: appraisal of the global situation. Bull. World Health Organization 75:515-514.
- (2) Silva, J. 1989. Las serpientes del genero Bothrops en la Amazonia Colombiana. Aspectos biomédicos (Epidemiología, clínica y biología del ofidismo). Acta Médica Colombiana 14:148-165.

- (3) Otero, R. 1994. Manual de Diagnóstico y Tratamiento del Accidente Ofídico. Editorial Universidad de Antioquia, Medellín. 32 p.
- (4) Otero, R., Tobón, G.S., Gómez, L.F., Osorio, R.G., Valderrama, D., Urreta, J.E., Molina, S. & Arboleda, J.J. 1992. Accidente ofídico en Antioquia y Chocó. Aspectos clínicos y epidemiológicos (Marzo de 1989- febrero de 1990). Acta Médica Colombiana 17: 229-249.
- (5) Gutierrez, J.M. 1995. Clinical toxicology of snakebite in Central America. In: Meier, J. and White J (Editors.), Handbook of Clinical Toxicology of Animal Venoms and Poisons. Boca Raton, FL: CRC Press. Pp 645-665.
- (6) Otero, R., Osorio, R.G., Valderrama, R. & Giraldo, C.A. 1992. Efectos farmacológicos y enzimáticos de los venenos de serpientes de Antioquia y Chocó (Colombia). Toxicon 30 (5-6): 611-620.
- (7) Warrel, D.A. 1995. Clinical toxicology of snakebite in Africa and the Middle East/Arabianpeninsula. In: Meier J, White J (Editors.), Handbook of Clinical Toxicology of Animal Venoms and Poisons, Boca Raton, CRC Press. Pp 433-492.
- (8) Bon, C. 1996. The serum - therapie was discovered 100 years ago. Toxicon 34: 142-143.
- (9) Lomonte, B., Lungren, J., Johansson, B. & Bagge, U. 1994. The dynamics of local tissue damage induced by *Bothrops asper* snake venom and myotoxin II on the mouse cremaster muscle: an intravital and electron microscopic study. Toxicon 32: 41-55.
- (10) Gutiérrez, J.M., León, G., Rojar, G., Lomonte, B., Rucavado, A. & Chaves, F. 1998. Neutralización of local tissue damage induced by *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom. Toxicon 36: 1529-1538.

- (11) Otero, R., Núñez, V., Jiménez, S.L., Fonnegra, R., Osorio, R.G. & García, M.E. 2000a. Snakebites and ethnobotany in the northwest region of Colombia: Part I: Traditional use of plants. *Journal of Ethnopharmacology* 71 (3): 493-504.
- (12) Núñez, V., Otero, R., Barona, J., Saldarriaga, M., Osorio, R.G. & Fonnegra, R. 2004. Neutralization of the edema-forming, defibrinating and coagulant effects of *Bothrops asper* venom by extracts of plants used by healers in Colombia. *Brazil Journal Medical Biology* 37: 969-977.
- (13) Otero, R., Núñez, V., Jiménez, S.L., Fonnegra, R., Osorio, R.G., García, M.E. & Díaz, A. 2000b. Snakebites and ethnobotany in the northwest region of Colombia: Part II: Neutralization of lethal and enzymatic effects of *Bothrops atrox* venom. *Journal of Ethnopharmacology* 71:505-511.
- (14) Núñez, V., Castro, V., Murillo, R., Ponce-Soto, L.A., Merfort, I., & Lomonte, B. 2005. Inhibitory effects of *Piper umbellatum* and *Piper peltatum* extracts toward myotoxic phospholipases A₂ from *Bothrops* snake venoms: Isolation of 4-nerolidylcatechol as active principle. *Phytochemistry* 66:1017-1025.
- (15) Carbone, E. 1987. Estudios Etnobotánicos entre Los Koguis de la Sierra Nevada De Santa Marta. Tesis de grado. Universidad nacional de Colombia. Fundación Prosierra Nevada de Santa Marta. Pp 12-38.
- (16) Barranco, W. 2005. Evaluación de las plantas utilizadas contra el veneno de serpientes en el Departamento del Magdalena, Colombia. Tesis de grado Universidad Del Magdalena. Pp 22-37.
- (17) Oliveira, C.Z., Maiorano, V., Marcussi, S., Santana, C.D., Januário, A.H., Lourenco, M.V., Sampaio, S. V., Franca, S.C., Pereira, P.S. & Soares, A.M. 2005. Anticoagulant and antifibrinolytic properties of the aqueous extract from *Bauhinia forficata* against snake venoms. *Journal of Ethnopharmacology* 98:213-216.

- (18) Sanabria, A. 1983. Análisis fitoquímico preeliminar. Bogotá: Departamento de Farmacia. Universidad Nacional de Colombia.
- (19) Domínguez, X.A. 1979. Métodos de investigación fitoquímica. México. Limusa.
- (20) Dole, V.P. 1956. Relation between non-sterified fatty acids in plasma and metabolism of glucose. *The Journal of Clinical Investigation* 35:150-154.
- (21) Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685
- (22) Wang, W.J., Shis, S.H., & Huang, T.F. 2004. A novel P-I class metalloproteinase with broad substrate-cleaving activity, agkislisin, from *Agkistrodon acutus* venom. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 324 (1): 224-230.
- (23) Lomonte, B. & Gutiérrez, J.M. 1983. La actividad proteolítica de los venenos de serpientes de Costa Rica sobre la caseína. *Rev Biol Trop.* 31 (1): 37-40.
- (24) Houghton, P.J., Osibogun, I.M.1993. Flowering plants used against snakebite. *Journal of Ethnopharmacology*.39:1-29.
- (25) Kini, R M.2003.Excitement ahead: Structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A₂ enzymes. *Toxicon* 42:827-840.
- (26) Veronesea, E., Esmeraldino, L., Trombonea, A., Santanab, A., Becharac, G., Kettelhuth, I., Cintraa, A., Gigliod, J. & Sampaio, S. 2005. Inhibition of the myotoxic activity of *Bothrops jararacussu* venom and its two major myotoxins, BthTX-I and BthTX-II, by the aqueous extract of *Tabernaemontana catharinensis* A. DC. (Apocynaceae). *Phytomedicine* 12: 123–130.

- (27) Lemus, I., García, R., Erazo, R., Peña, R. & Parada, M. 1996. Fuenzalida M. Diuretic activity of an *Equisetum bogotense* tea (Platero herb): evaluation in healthy volunteers. *Journal of Ethnopharmacology* 54:55-58.
- (28) Barraza, E., Hódar, J. & Zamora, R. 2009. Species, site and seasonal variation in leaf-chemistry diversity of woody Mediterranean plants. *Revista de Ecología (Terre Vie)* 64:136-144.
- (29) Pereañez, J., Jimenez, S., Quinta, J.C., Nuñez, V., Fernandez, M., Restrepo, Y. 2008. Inhibición de las actividades proteolíticas coagulante hemolítica indirecta inducidas por el veneno de *Bothrops asper* por extractos etanólicos de tres especies de Heliconias. *Vitae revista de la Facultad de Química Farmacéutica, Universidad de Antioquia* (15) 157-164.
- (30) Daduang, S., Sattayasai, N., Sattayasai, J., Tophrom, P., Thammathaworn, A., Chaveerach, A. & Konkchaiyaphum, M. 2005. Screening of plants containing *Naja naja siamensis* cobra venom inhibitory activity using modified ELISA technique. *Biochemistry* 341:316–325.
- (31) Pereañez, J., Patiño, A., Ciro, G., Vargas, L., Vásquez, L., Salazar, A. & Rey, J. 2009. Búsqueda de alternativas terapéuticas para el accidente ofídico en residuos agroindustriales de frutas Tropicales. *Vitae revista de la Facultad de Química Farmacéutica, Universidad de Antioquia* 3 (16) 378-387.
- (32) Mukherjee, P.K. & Mukherjee, K. 2005. Evaluation of Botanical-Perspectives of Quality Safety and Efficacy. In: *Advances in Medicinal Plants*, 1st ed.; ND Prajapati, T Prajapati, S Jayapura, Eds.; Asian Medicinal Plants and Health Care Trust: Jodhpur, Rajasthan, and India. Vol. 1: 87-110.
- (33) Pithayanukul, P., Laovachirasuwan, S., Bavovada, R., Pakmanee, N. & Suttisri, R. 2004. Anti-venom potential of butanolic extract of *Eclipta prostrata* against Malayan viper venom. *Journal of Ethnopharmacology* 90:347-352.

- (34) Newman, D.J., Cragg, G. & Snader, K.M. 2003. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *Journal of natural products* 66:1022-1037.
- (35) Borges, M.H., Alves, D.L.F., Raslan, D.S., Piló-Velosos, D., Rodrigues, V.M., Homsí-Brandeburgo, M.I., & Lima, M.E. 2005. Neutralizing properties of *Musa paradisiaca* L. (Musaceae) juice on phospholipase A₂, myotoxic, hemorrhagic and lethal activities of crotalidae venoms. *Journal of Ethnopharmacology* 98: 21–29.
- (36) Esmeraldino, L.E., Souza, A. M. & Sampaio, S.V. 2005. Evaluation of the effect of aqueous extract of *Croton urucurana* Baillon (Euphorbiaceae) on the hemorrhagic activity induced by the venom of *Bothrops jararaca*, using new techniques to quantify hemorrhagic activity in rat skin. *Phytomedicine* 12: 570–576.
- (37) Guerranti, R., Aguiyi, J., Errico, E., Pagani, R. & Marinello, E. 2001. Effects of *Mucuna pruriens* extract on activation of prothrombin by *Echis carinatus* venom. *Journal of Ethnopharmacology* 75: 175–180.