



Universidad de San Carlos de Guatemala  
Dirección General de Investigación  
Programa Universitario de Investigación  
Interdisciplinaria en Salud

## INFORME FINAL

# EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD NEUTRALIZANTE DE EXTRACTOS DE PLANTAS DE USO POPULAR EN GUATEMALA COMO ANTÍDOTOS PARA EL ENVENENAMIENTO POR MORDEDURA DE LA SERPIENTE *Bothrops asper*

Equipo de investigación

**Dra. Patricia Saravia Otten**

Lic. Max Mérida

Br. Nelly Marroquín

Br. Marcella Orellana

Lic. Armando Cáceres

M. Sc. Rosario Hernández

Dr. José María Gutiérrez

**Coordinadora**

Investigador

Auxiliar de Investigación II

Auxiliar de Investigación I

Investigador asociado

Investigadora asociada

Colaborador internacional

**Guatemala, 28 de enero de 2015**

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICAS Y BIOLÓGICAS  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA

M.Sc. Gerardo Arroyo Catalán  
Director General de Investigación

Ing. Agr. MARN Julio Rufino Salazar  
Coordinador General de Programas

Dra. Hilda Valencia de Abril  
Coordinador Programa Universitario de Investigación Interdisciplinaria en Salud

Dra. Patricia Saravia Otten  
Coordinadora del proyecto

Lic. Max Mérida  
Investigador

Br. Nely Marroquín  
Auxiliar de Investigación II

Br. Marcella Orellana  
Auxiliar de Investigación I

Lic. Armando Cáceres  
Investigador Asociado

M. Sc. Rosario Hernández  
Investigadora Asociada

Dr. José María Gutiérrez  
Colaborador Internacional

Partida presupuestaria  
4.8.63.1.72  
Año de ejecución: 2014

## CONTENIDO

CONTENIDO GENERAL	1
CONTENIDO DE TABLAS Y FIGURAS	1
TÍTULO DEL PROYECTO, RESUMEN	2
ABSTRACT	5
INTRODUCCIÓN	6
OBJETIVOS	9
HIPÓTESIS	9
1. MARCO TEÓRICO/ESTADO DEL ARTE	10
2. METODOLOGÍA	13
i. Ubicación Geográfica	13
ii. Descripción del método, técnicas, procedimientos e Instrumentos	13
iii. Metodología de análisis de información	18
3. RESULTADOS	20
4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	34
5. ACTIVIDADES DE GESTIÓN, VINCULACIÓN Y DIVULGACIÓN	39
6. CONCLUSIONES	41
7. RECOMENDACIONES	43
8. BIBLIOGRAFÍA	44
9. ANEXOS	50

## INDICE DE ILUSTRACIONES

### INDICE DE FIGURAS

Gráfica 1. Determinación de la dosis reto del veneno para las pruebas de neutralización de la actividad PLA2	23
Gráfica 2. Determinación de la dosis reto de veneno para las pruebas de neutralización de la actividad proteolítica	25
Matriz de resultados	29

### INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Material vegetal recolectado para el proyecto	21
Tabla 2. Rendimiento de los extractos etanólicos de las seis plantas del estudio	22
Tabla 3. Evaluación de la actividad PLA2 intrínseca de los extractos vegetales etanólicos y su capacidad neutralizante	24
Tabla 4. Evaluación de la actividad proteolítica intrínseca de los extractos vegetales etanólicos y su capacidad neutralizante	26

# EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD NEUTRALIZANTE DE EXTRACTOS DE PLANTAS DE USO POPULAR EN GUATEMALA COMO ANTÍDOTOS PARA EL ENVENENAMIENTO POR MORDEDURA DE LA SERPIENTE *Bothrops asper*

## RESUMEN

El envenenamiento ofídico es un problema de salud importante a nivel mundial, que aunque ha sido catalogada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como una de las enfermedades tropicales desatendidas, sigue sin ser reconocida como un riesgo para la salud pública. Se calcula que a nivel mundial más de 5 millones de personas al año son víctimas de mordeduras de serpiente; de ellas mueren entre 25,000 y 125,000 y unas 400,000 quedan con secuelas físicas y psicológicas que les imposibilita desenvolverse normalmente en la sociedad. En Guatemala, según datos del Centro Nacional de Epidemiología y el Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social, el número de casos de mordedura de serpiente registrados entre 2001-2010 fue de 7,377.

El mayor número de accidentes ofídicos en Guatemala son producidos por la serpiente *Bothrops asper*, que se distribuye en el norte y alguna población aislada en la cuenca del Pacífico. El envenenamiento produce el desarrollo inmediato de daño tisular local caracterizado por edema, dolor, sangrado y necrosis. En el envenenamiento grave se produce hemorragia sistémica, coagulopatías, shock cardiovascular e insuficiencia renal aguda. Los principales componentes del veneno, metaloproteinasas y fosfolipasas A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), son los responsables de las principales manifestaciones locales y sistémicas que caracterizan al envenenamiento.

La administración temprana de sueros antiofídicos es el tratamiento recomendado para contrarrestar el envenenamiento, pero su uso en áreas rurales presenta serias limitaciones en cuanto a acceso y riesgo de reacciones alérgicas severas. Tomando en cuenta que la mayor parte de los accidentes ofídicos suceden en áreas selváticas o rurales alejadas de los centros de salud, sumado al componente tradicional de nuestros pueblos indígenas, un número indeterminado de víctimas de envenenamiento ofídico son tratados por curanderos o chamanes con plantas, de acuerdo a sus recetas tradicionales.

Por ello, se plantea la necesidad de validar científicamente si las plantas utilizadas en estos antídotos son realmente efectivas en la neutralización de los venenos de las serpientes del país, lo que contribuiría a disminuir o retardar los efectos locales y sistémicos del envenenamiento ofídico en el lugar del accidente, mientras se obtiene tratamiento médico hospitalario. En caso contrario, es importante demostrar las limitaciones de dichas sustancias, para prevenir que el paciente reciba un tratamiento inadecuado con hierbas sin valor curativo o que causen efectos tóxicos.

En la medicina popular de Guatemala se usan varias plantas contra la mordedura de serpientes. Aunque existen personas especializadas en este tipo de tratamientos, se ha reportado que no existe un criterio común en cuanto a las recetas, preparación, dosificación o administración de los antídotos.

La actividad antiofídica de las plantas usadas en Guatemala como antídotos para el tratamiento del accidente ofídico ha sido poco estudiada. Este trabajo es la continuación de un primer esfuerzo iniciado por nuestro grupo en esta línea de investigación, para lo cual se conformó un grupo multidisciplinario de investigadores interesados en el tema de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, en colaboración con el Dr. José María Gutiérrez del Instituto Clodomiro Picado de la Universidad de Costa Rica (ICP-UCR). En la presente investigación se determinó la capacidad de los extractos etanólicos de seis plantas de uso etnomédico para neutralizar los efectos proteolítico y PLA2 del veneno de *B. asper*, por ser la principal especie causante de envenenamiento en el país. Estos efectos, indicadores de la capacidad miotóxica, hemorrágica e inflamatoria del veneno, se evaluaron en ensayos controlados in vitro según las metodologías reportadas por Dole (1956) y Wang, Shih y Huang (2004). Las partes de las plantas seleccionadas para el estudio, *Acacia hindsii* (corteza), *Aristolochia máxima* (hoja y corteza), *Cissampelos pareira* (raíz), *Hamelia patens* (hoja), *Piper peltatum* (hoja) y *Sansevieria hyacinthoides* (hoja), fueron colectadas, secadas y sus principios activos se extrajeron con etanol (70-90%). El veneno utilizado para los experimentos fue una mezcla obtenida un número no menor de 40 ejemplares adultos de *B. asper* provenientes de la región del Pacífico de Costa Rica, la cual se recibió como una donación del ICP. Los resultados obtenidos en ensayos de dosis-reto muestran que ninguno de los extractos posee actividad PLA2 o proteolítica intrínseca a las dosis estudiadas. Se determinó que el extracto de *S. hyacinthoides* posee una capacidad neutralizante pobre (menor del 50%) del efecto PLA2 del veneno, aunque sí se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) cuando se compararon los valores de neutralización de las relaciones veneno: extracto (p/p) más altas (1:400 y 1:200) con el efecto del control. Con respecto a la neutralización del efecto proteolítico del veneno, aunque nuevamente el análisis estadístico demostró diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) al comparar los valores de neutralización de las relaciones veneno: planta de *P. peltatum* (1:50, 1:25 y 1:12.5) y *C. pareira* (1:50 y 1:25) con los del control, los extractos de estas plantas neutralizaron menos del 50% del efecto proteolítico del veneno. Por esta razón, según los criterios establecidos en el proyecto, ninguno de los extractos calificó para ser probado en la neutralización de la letalidad en ratones.

Se concluye que no es recomendable el uso aislado de las plantas estudiadas en el tratamiento del envenenamiento por mordedura de *B. asper*. Sin embargo, se considera que es posible que los efectos antiofídicos de las plantas que demostraron alguna capacidad neutralizante se potencien al ser utilizadas en mezclas, tal como se hace en las recetas tradicionales.

Dada la complejidad de la composición del veneno y los efectos fisiopatológicos que produce, se recomienda continuar con el tamizaje de las plantas investigando su capacidad para neutralizar otros efectos del veneno, tales como las coagulopatías, edema y miotoxicidad. Así mismo, se recomienda la continuación de trabajos de esta naturaleza, que permitan detectar y validar las plantas utilizadas como antídotos en la medicina tradicional de Guatemala.

Adicionalmente, como parte del proyecto se realizó una difusión masiva de información concerniente al problema del accidente ofídico en Guatemala y su tratamiento convencional y alternativo. Se involucró en el tema de las plantas con actividad antiofídica a investigadores y estudiantes de las carreras de Química Farmacéutica y Química de la Facultad de CCQQ y Farmacia, con quienes se dará continuación al estudio de forma colaborativa.

En conclusión, la información generada en el presente estudio representa una valiosa contribución al enriquecimiento del conocimiento que tenemos sobre nuestros recursos naturales y su uso como alternativas terapéuticas seguras y efectivas a un problema importante de salud que afecta a la población rural del país.

**Palabras clave:** plantas antiofídicas, fosfolipasa A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), medicina tradicional, antídotos, efecto proteolítico, neutralización, *B. asper*.

## ABSTRACT

Many plants are reported to be used in Guatemalan traditional medicine as antidotes against various effects of the snakebite; however, very few attempts have been made to evaluate their neutralizing capacity in controlled experiments. Six plants (*Acacia hindsii*, *Cissampelos pareira*; *Hamelia patens*, *Piper peltatum*, *Sansevieria hyacinthoides* and *Aristolochia maxima*) were evaluated in vitro for their ability to neutralize phospholipase A2 (PLA2) and proteolytic effects of the venom of *Bothrops asper*, the snake responsible for approximately half of the snakebite envenomations in Central America. These effects are indicative of the ability of *B. asper* venom to produce myotoxicity, hemorrhage and inflammation. Plants were collected, dried and active biomolecules extracted with ethanol. After pre-incubation of several amounts of each extract with a challenge dose of venom, *S. hyacinthoides* demonstrated a low neutralizing capacity ( $<DE_{50}$ ) of the PLA2 effect ( $13.90 \pm 6.41\%$ ); *P. peltatum* ( $24.52 \pm 7.45\%$ ) and *C. pareira* ( $32.98 \pm 5.51\%$ ) neutralized less than 50% of the proteolytic effect. The results suggest that neither of the tested plants should be used individually to treat the main effects of *B. asper* envenomation. However, the three low-active extracts might be potentiated when used in mixtures composed of several plants, as prepared by traditional healers. Given the complexity of the venom components and the multiple pathologic effects produced by *B. asper* envenomations, more tests are required to fully investigate the ability of these plants to neutralize the coagulant, fibrin(ogen)olytic, edematizing and myotoxic effects of the venom. Our results evidenced the need of more scientific studies to validate the plants used to treat snakebites in Guatemala.

## INTRODUCCIÓN

### Planteamiento del problema

El envenenamiento ofídico es un problema de salud importante a nivel mundial (WHO, 2007). La mordedura de serpiente produce una alta tasa de mortalidad, morbilidad, secuelas físicas como desfiguración o amputación, y psicológicas crónicas (Williams et al., 2010), lo que incide en una pérdida importante de productividad por la incapacidad física. Como son los trabajadores rurales el grupo de mayor riesgo, el envenenamiento ofídico tiene un impacto socioeconómico directo sobre las familias y comunidades de los afectados, y por lo tanto contribuye al ciclo de pobreza e inequidad prevaleciente (Gutiérrez et al., 2013a).

La magnitud del problema es difícil de determinar en Centroamérica, ya que la falta de medios de comunicación y atención médica en las áreas remotas, en donde ocurren la mayoría de los accidentes ofídicos, son un problema que incide en el subregistro de datos disponibles. Existe además el componente tradicional de nuestros pueblos indígenas, que prefieren utilizar el servicio de herbolarios, curanderos o médicos brujos antes de buscar ayuda en hospitales y centros de salud, lo que los vuelve invisibles en los datos epidemiológicos. En Guatemala, según datos del Centro Nacional de Epidemiología (CNE) y el Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social (MSPAS), el número de casos de mordedura de serpiente registrados entre 2001-2010 fue de 7,377 (Morales, 2012).

En Guatemala se reportan 19 especies de serpientes venenosas, de las cuales la que causa el mayor número de accidentes ofídicos es *Bothrops asper* (Gutiérrez, 2010; Campbell, 1999), que se distribuye en el norte y alguna población aislada en la cuenca del Pacífico (Campbell & Lamar, 1989). El envenenamiento por *B. asper* produce el desarrollo inmediato de daño tisular local caracterizado por edema, dolor, sangrado y necrosis; y en el envenenamiento grave, por hemorragia sistémica, coagulopatías, shock cardiovascular e insuficiencia renal aguda (Gutiérrez, 2002; 2010). Los principales componentes del veneno, metaloproteinasas y PLA2, son los responsables de las manifestaciones locales y sistémicas que proceden al envenenamiento (Angulo & Lomonte, 2009).

En la medicina popular de Guatemala se usan varias plantas contra la mordedura de serpientes (Morton, 1977; Hay, 2002). Estos antídotos se usan para tratar el accidente ofídico por curanderos en las regiones selváticas, en donde el acceso inmediato a sueros antiofídicos y atención médica es sumamente difícil. Existen muy pocos estudios científicos que validen si dichas plantas o sus extractos son realmente efectivas en la neutralización de alguna actividad de los venenos.

Este proyecto es continuación de la línea de investigación iniciada hace más de 10 años por nuestro grupo en búsqueda de bioactividad en plantas de uso etnomédico para el tratamiento del accidente ofídico (Saravia, Cáceres, Velásquez

& Lara, 2001a). Se propone la evaluación in vitro de los extractos etanólicos de seis plantas usadas en el país como antiofídicos, para neutralizar los efectos PLA2 y proteolítico del veneno, importantes indicadores de su capacidad para producir hemorragia, miotoxicidad e inflamación (Lomonte & Gutiérrez, 1983; Lomonte et al., 2012). Los dos extractos que demuestren mayor capacidad neutralizante de uno o ambos efectos, se evaluarán en cuanto a su capacidad neutralizante del efecto letal del veneno en ratones.

La información generada en este estudio contribuirá a enriquecer el conocimiento sobre nuestros recursos naturales y su uso como alternativas terapéuticas. Basados en estudios de campo (Saravia et al., 2001a; Hay 2002) y revisión de literatura se preparó un cuadro con las principales 24 especies vegetales usadas para el tratamiento de accidente ofídico en Guatemala, de donde se seleccionaron las seis más empleadas y de mayor distribución en el país (Anexo 2).

Los extractos se realizaron en las instalaciones del Laboratorio de Investigación de Productos Naturales (LIPRONAT) y los ensayos biológicos se realizaron en el Departamento de Bioquímica de la de la Facultad de CCQQ y Farmacia.

## **Justificación**

Los envenenamientos por mordedura de serpiente constituyen un problema de salud pública relevante en la región latinoamericana; se estima que en Centro América *B. asper* es la responsable de más del 50% del número total de casos, y de la mayor parte de muertes debido a envenenamientos (Gutiérrez 2009).

La administración temprana de sueros antiofídicos es el tratamiento recomendado para contrarrestar el envenenamiento (Gutiérrez, 2010; Gupta & Peshin, 2012), pero su uso en áreas rurales presenta varias limitaciones tales como su alto costo, poca disponibilidad en los hospitales, su almacenamiento en refrigeración y el riesgo de reacciones alérgicas que pueden ir desde reacciones tempranas (prurito, urticaria), hasta reacciones anafilácticas y enfermedad del suero. A esto debe sumarse la dificultad de transportar a tiempo al individuo afectado a un centro hospitalario. Como consecuencia de estas limitaciones, un número indeterminado de víctimas de envenenamiento ofídico son tratados por curanderos tradicionales (Otero et al., 2000a; Gupta & Peshin, 2012; Coe & Anderson 2005).

Esta situación ha renovado el interés de la comunidad científica en el estudio de las plantas utilizadas como antídotos en el tratamiento del envenenamiento ofídico (Gupta & Peshin, 2012; Molander, Saslis-Lagoudakis, Jager & Ronsted, 2012). En Guatemala existen muy pocos estudios científicos que validen si las plantas utilizadas popularmente como antiofídicos son activas en la neutralización de los venenos de las serpientes. De determinarse que una o más plantas utilizadas en Guatemala son efectivas, podría mejorarse el tratamiento de emergencia del accidente ofídico, usarse como una alternativa o complemento terapéutico al tratamiento con o sueros antiofídicos. En caso contrario, es importante demostrar

las limitaciones de dichas sustancias, para prevenir que el paciente reciba un tratamiento inadecuado con hierbas sin valor curativo o que causen efectos tóxicos.

En esta línea, nuestro grupo realizó un estudio previo (Saravia et al., 2001a) en donde se estudió la capacidad de tres plantas para neutralizar el veneno de *B. asper*. Las plantas demostraron una moderada actividad neutralizante de los efectos coagulante y anticoagulante (desfibrinante) del veneno, pero fallaron en neutralizar los efectos más importantes, lo que cuestiona el uso de estas plantas para el tratamiento de envenenamientos moderados y severos. Dada la relevancia de estos hallazgos, se hace necesario continuar, en nuestro país, con el estudio de la potencial actividad antiofídica de los extractos de plantas de uso tradicional.

Con este trabajo se estará retomando la validación de las plantas utilizadas como antiofídicas en Guatemala, las cuales podrían seguir siendo estudiadas hasta lograr el aislamiento de las moléculas bioactivas. Además, se instalará en la Facultad de CCQQ y Farmacia una estrategia de tamizaje para productos naturales de la biodiversidad nacional con modelos in vitro e in vivo de actividad antiofídica. La descripción de nuevas formas de aprovechamiento de la biodiversidad contribuirá a estimular la conservación de estos recursos, y fortalecerá la identidad de sectores rurales que han guardado esta información como un mecanismo de resiliencia.

## OBJETIVOS

### General

Evaluar la capacidad neutralizante de los extractos de plantas de uso popular en Guatemala como antídotos para el envenenamiento por la mordedura de la serpiente *Bothrops asper*.

### Específicos

1. Colectar y preparar extractos etanólicos de seis planta utilizadas como antídotos en el país (*Acacia hindsii*, *Aristolochia maxima*, *Cissampelos pareira*, *Hamelia patens*, *Piper peltatum* y *Sansevieria hyacinthoides*).
2. Estandarizar las técnicas para la determinación de la actividad fosfolipasa A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) y proteolítica en los ensayos de dosis-reto y neutralización.
3. Determinar la capacidad neutralizante de la actividad letal in vivo de los extractos de las dos plantas con mayor actividad antifosfolipasa A<sub>2</sub> y antiproteolítica.
4. Propiciar estudios de cooperación internacional para complementar la información generada en este proyecto.
5. Difundir la información sobre el problema del accidente ofídico en Guatemala y de su tratamiento convencional y alternativo.

## HIPÓTESIS

Al menos uno de los extractos estudiados neutralizará parcial o totalmente uno de los efectos toxicológicos estudiados del veneno de *B. asper*

## 1. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE

El ofidismo constituye un problema de gran importancia en los países tropicales y subtropicales (Gutiérrez et al., 2013a; WHO, 2007). Se calcula que a nivel mundial más de 5 millones de personas al año son víctimas de mordeduras de serpiente; de ellas mueren entre 25,000 y 125,000 y unas 400,000 quedan con secuelas físicas y psicológicas que les imposibilita desenvolverse normalmente en la sociedad (Williams et al., 2010). En Latinoamérica el problema podría ser mayor, por la falta de los recursos terapéuticos en las áreas rurales. En Centro América, la falta de medios de comunicación y atención médica en las áreas remotas es un problema que incide en el subregistro de datos sobre ofidismo, por lo que la magnitud real del problema es difícil de determinar. En Costa Rica ocurrieron entre 500 a 600 casos de mordedura de serpiente por año durante 1990 al 2000, lo cual corresponde a una incidencia de 15 casos/100,000 habitantes/año (Gutiérrez, 2010). En Panamá se reportan cerca de 2,000 casos/año, lo cual sugiere que es el país con mayor incidencia en la región. En Nicaragua, Honduras y Guatemala, se presenta un número de casos similares a Costa Rica. No obstante, las cifras reales deben ser mayores, ya que un número indeterminado no acude a los centros hospitalarios, lo que los vuelve invisibles al sistema de salud (Gutiérrez, 2010; Coe & Anderson, 2005). En Guatemala, Morales (2012) reportó que según el CNE y el MSPAS, el número de casos registrados entre 2001-2010 es de 7,377. En El Salvador la incidencia es menor, lo cual se debe al hecho que *B. asper* no se encuentra normalmente en el país (Gutiérrez, 2010).

La administración temprana de sueros antiofídicos es el tratamiento validado para el manejo del envenenamiento ofídico (Gutiérrez, 2002, 2010). Sin embargo, aun en los casos en los afectados logren llegar a un hospital a tiempo, el uso de antisueros presenta varias limitantes en áreas rurales, como el alto costo y poca disponibilidad, la necesidad de almacenamiento en refrigeración y el riesgo de producir reacciones alérgicas (Gutiérrez, 2010). Además los sectores indígenas prefieren utilizar el servicio de herbolarios o curanderos que los hospitales y centros de salud por facilidad y accesibilidad (Orellana, 1987).

Estas limitaciones han renovado el interés de la comunidad científica en el estudio de las plantas usadas en la medicina tradicional para tratar el envenenamiento ofídico (Molander et al., 2012; Coe & Anderson, 2005). El efecto curativo de varias plantas o sus extractos ha sido estudiado en condiciones in vivo e in vitro en diferentes regiones del mundo, utilizando los antídotos preparados con la fórmula tradicional (Melo & Ownby, 1999; Gupta & Peshin, 2012).

En Colombia, se demostró que los extractos etanólicos de siete plantas usadas en el tratamiento del accidente ofídico neutralizaron completamente el efecto letal del veneno de *B. atrox* y los extractos etanólicos de 12 plantas neutralizaron el efecto hemorrágico (Otero et al., 2000b, c). En Centroamérica se ha demostrado que los extractos de 10 plantas son capaces de neutralizar el efecto hemorrágico del

veneno de *B. asper* (Castro et al., 1999). En Guatemala se demostró la capacidad de tres plantas de uso etnomédico para neutralizar los efectos coagulantes y anticoagulantes del veneno del veneno de *B. asper* (Saravia et al., 2001a).

En algunos casos se ha logrado aislar el componente activo responsable de la neutralización de uno o más efectos toxicológicos de los venenos ofídicos, tales como la wedelolactona y el alcaloide 12-metoxi-4-metilvoacalotina (Alam, Audt & Gomes, 1994; Melo & Ownby, 1999; Batina et al., 2000).

La serpiente que causa el mayor número de accidentes ofídicos en Centro América y específicamente en el norte de Guatemala es *B. asper* (Gutiérrez, 2010; Campbell, 1999). Esta serpiente se distribuye a lo largo de la vertiente Atlántica de México, el norte de Guatemala y hasta las tierras bajas del Atlántico de Panamá. Puede encontrarse una población aislada en la vertiente del Pacífico de Chiapas y Guatemala. La mayoría de envenenamientos por mordeduras de esta serpiente afecta a jóvenes trabajadores agrícolas, predominantemente hombres, que son mordidos mientras desempeñan sus labores (Gutiérrez, 2010).

El veneno de serpientes se compone de una mezcla compleja de moléculas de diferente naturaleza bioquímica, predominando la presencia de proteínas (Angulo & Lomonte, 2009). Éstas incluyen enzimas y proteínas sin actividad enzimática. Entre las enzimas se encuentran serinoproteinasas, metaloproteinasas dependientes de zinc, oxidasas y fosfolipasas; entre las proteínas sin actividad enzimática las lectinas tipo C, desintegrinas, péptidos natriuréticos, miotoxinas, toxinas CRISP, factores de crecimiento endoteliales y vasculares e inhibidores de proteinasa tipo cistatina y Kunitz (Alape-Girón et al., 2008) En *B. asper*, los principales componentes del veneno son las metaloproteinasas y las PLA2, responsables de las manifestaciones locales y sistémicas como la inflamación, hemorragia, edema, miotoxicidad, mionecrosis y nefrotoxicidad (Angulo & Lomonte, 2009, Gutiérrez, 2002). La caracterización de los efectos farmacológicos del veneno en Guatemala demostró que induce letalidad, hemorragia, edema, mionecrosis, coagulación, desfibrinación, efecto PLA2 y hemólisis indirecta. El perfil toxicológico es similar al reportado para la misma especie costarricense (Saravia et al., 2001b).

La composición de los venenos de serpiente puede variar dependiendo del área geográfica. Este tipo de variaciones, surgidas durante la evolución de las especies (Alape-Girón et al., 2009) es un aspecto importante desde el punto de vista terapéutico, ya que los antiseros preparados con mezclas de venenos de serpientes de otras regiones resultan menos efectivos para neutralizar los efectos de los venenos guatemaltecos (Saravia et al., 2001b, 2002; Rojas et al., 2001). Igualmente, no se puede asumir que los extractos vegetales que han probado ser efectivos en otras regiones del mundo, en donde el efecto principal de sus venenos es neurotóxico, lo sean también para los efectos del veneno de especies centroamericanas, que son principalmente locales (Bailey, 1998; Gutiérrez, 2002).

En la revisión de la flora útil de Guatemala, Aguilar Girón (1966) reporta el uso medicinal de 186 especies, de las cuales seis se usan para el tratamiento de mordedura de serpiente y otros animales ponzoñosos. En una revisión de las plantas usadas en Alta Verapaz, Dieseldorff (1977) de 71 especies, menciona tres plantas para el tratamiento de mordeduras de serpientes y animales ponzoñosos. En la vasta revisión sobre las plantas medicinales usadas en Mesoamérica, Morton (1981) indica el uso cuando menos de 100 especies vegetales. En la revisión de las plantas de uso medicinal en el altiplano de Guatemala, Orellana (1987) menciona seis especies plantas usadas tradicionalmente para el tratamiento de mordeduras de serpientes y animales ponzoñosos.

De 102 especies vegetales identificadas por su uso tradicional entre los garífunas de Livingston (Girón, Freire, Alonzo & Cáceres, 1991), cuatro son usadas para tratar la mordedura de serpientes. En una encuesta de campo y revisión de la literatura de plantas usadas para el tratamiento de mordeduras de serpientes en el área norte de Guatemala, Hay (2002) describió cuando menos 59 especies, algunas de ellas comunes a otras regiones del país.

La realización del presente proyecto indudablemente contribuirá al enriquecimiento del conocimiento que tenemos sobre nuestros recursos naturales y su uso como alternativas terapéuticas seguras a un problema importante de salud que afecta a la población rural del país.

## 2. METODOLOGÍA

### i. Ubicación geográfica

La recolección de las especies vegetales utilizadas en el presente proyecto se realizó en diversos puntos del país, según la disponibilidad de cantidades adecuadas de las mismas y acceso a áreas de recolección, siendo estos: San Bernardino y Samayac, departamento de Suchitepéquez; Morales, departamento de Izabal; San Jacinto, departamento de Chiquimula y Guatemala, ciudad universitaria zona 12, departamento de Guatemala.

La preparación de extractos etanólicos se llevó a cabo en el Laboratorio de Investigación en Productos Naturales (LIPRONAT), Departamento de Farmacognosia y Fitoquímica; los ensayos de neutralización de los efectos tóxicos del veneno de *B. asper* se realizaron en la Unidad de Biología Celular, Departamento de Bioquímica; ambos de la Facultad de CCQQ y Farmacia.

**Período de la investigación:** esta investigación se realizó del 1 de febrero al 30 de noviembre de 2014.

### ii. Descripción del método, técnicas, procedimientos e instrumentos.

**Selección de la muestra.** A partir de encuestas de campo, revisión de literatura y bases de datos generadas en investigaciones anteriores (Saravia, 2001a) se identificaron 24 especies vegetales de uso popular en el país para el tratamiento de mordedura de serpientes. De este grupo se seleccionaron seis especies: *A. hindsii*, *A. maxima*, *C. pareira*, *H. patens*, *P. peltatum* y *S. hyacinthoides*, según su disponibilidad, abundancia y capacidad de recolección; las cuales fueron evaluadas en el presente proyecto.

**Muestreo.** La recolección de especies vegetales se realizó en base a un muestreo de tipo estratificado, preferencial y por conveniencia, definiéndose los estratos (asociaciones vegetales homogéneas), por contactos previamente establecidos. La recolección, embalaje y transporte de especies vegetales se realizó conforme a los principios de las buenas prácticas de colecta. Para cada especie se recolectó la máxima cantidad posible de la parte de planta a utilizar, según su uso reportado. El material fue procesado conforme a las técnicas convencionales de secado y molienda (Cáceres, 2009). Las colectas se realizaron en lugares donde se tienen las especies bajo cultivo o por manejo, dado que el uso como antiofídico de la mayoría de ellas es común en todo el país, asumiéndose que las especies vegetales tienen composiciones de metabolitos secundarios mayoritarios similares.

Para la determinación de las especies se utilizaron las claves dicotómicas de la Flora de Guatemala (Standley & Williams, 1975; Standley & Steyermark, 1946a y

b; 1952a, b y c), con el apoyo del Ing. Agr. Mario Esteban Veliz del Herbario de la Escuela de Biología (BIGU) y también se contó con el apoyo de los Ing. Agr. David Mendieta y Carlos Castillo, del Herbario de la Facultad de Agronomía (AGUAT). Para la identificación de la especie *P. peltatum*, se contó con el apoyo del Lic. Luis Álvarez, Biólogo, quien tiene experiencia en el género *Piper* en Guatemala.

**Prueba de mejor disolvente.** Se determinó la proporción etanol: agua, que permitió la mayor extracción de principios activos según lo reportado por Willoughby en BHMA (1996), Kuklinski (2000) y la Real Farmacopea Española (2002). Se prepararon diferentes diluciones de etanol (20, 30, 50, 70 y 90 %), las cuales fueron mezcladas con 1 g del material vegetal y se dejaron en reposo por 24 h. Luego, para cada dilución de etanol evaluada, se evaporó el disolvente y se pesó la cantidad de sólidos totales extraídos, seleccionándose la dilución de disolvente que logra la mayor extracción de sólidos totales.

**Extracción de principios vegetales.** La preparación de los extractos etanólicos se realizó por el método de extracción continua por percolación según Kuklinski (2000) y la Real Farmacopea Española (2002). Se pesaron 200 g de material vegetal a utilizar y se midieron 2,000 mL del disolvente previamente establecido. Esto se colocó en un percolador y se dejó reposar de 24 a 48 h para permitir la extracción y se recogió el 85 % del volumen del líquido. Se colocó más disolvente, se dejó reposar y se repitió el proceso hasta obtener un volumen que correspondiera al doble del peso inicial del material vegetal (fracción diluida). La fracción diluida se concentró hasta alcanzar un volumen correspondiente al 15% y se mezcló con el 85% de líquido obtenido en la primera recolección. La concentración de extractos se realizó por medio de rotavapor (Harwood & Moody, 1989); a una temperatura no mayor de 45°C. El extracto concentrado se traspasó a un cristizador que se colocó en una desecadora, para eliminar cualquier residuo de disolvente, el extracto seco 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.

Todos estos procedimientos se realizaron siguiendo los protocolos de trabajo establecidos en el LIPRONAT.

**Obtención del veneno.** Se utilizó una mezcla (*pool*) de veneno colectado en el serpentario del Instituto Clodomiro Picado (ICP), Universidad de Costa Rica (UCR); el cual fue obtenido a partir de un número no menor de 40 especímenes adultos provenientes de la región del Pacífico de Costa Rica. La mezcla de veneno fue centrifugada, liofilizada y guardada a -20°C hasta su uso. El veneno fue recibido como una donación realizada por el Dr. José María Gutiérrez, investigador del ICP, quien participó como colaborador internacional en el presente proyecto. Estudios previos realizados por Saravia y col. (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 chiclosa, se disolvieron en una solución tampón de fosfatos (PBS) pH 7.2 utilizando Tween-80 como emulsionante (PBS-T80), según el protocolo propuesto por Saravia y col. (2001a) con algunas modificaciones. Se pesó la cantidad de extracto en un tubo cónico Falcon y se agregó Tween 80 (5% v/v) y la mitad del volumen final de PBS. Esta mezcla se agitó en vortex hasta lograr la mayor disolución del extracto; se completó el volumen final con PBS y se calentó a 37°C en baño de María por 30 min, agitando constantemente con una varilla de vidrio. La mezcla fue sometida a sonicación por 15 min y nuevamente calentada a 37°C en reposo. La disolución se centrifugó a 2,500 rpm por 15 min, y el sobrenadante se filtró. El filtrado fue identificado (solución madre o *stock*), alícuotado y almacenado en congelación (-20°C) para su uso posterior.

**Determinación de las actividades PLA2 y proteolítica intrínsecas de los extractos vegetales por medio de ensayos dosis – respuesta.** Antes de enfrentar el veneno con los extractos vegetales, se midió la actividad PLA2 y proteolítica intrínseca de cada extracto, utilizando ensayos dosis – respuesta. La finalidad de este análisis previo fue determinar los niveles de extracto que podrían utilizarse sin provocar dichos efectos, que invalidarían los resultados de las pruebas de neutralización.

**Actividad PLA2 intrínseca.** La actividad PLA2 se determinó incubando diversas dosis de cada extracto con fosfatidilcolina de la yema de huevo como sustrato. Los ácidos grasos liberados se titularon con NaOH según el método descrito por Dole (1956) con las modificaciones realizadas por Gutiérrez y col. (1986).

Las dosis de los extractos analizados (1.25, 0.625, 0.312, 0.156 y 0.078 mg) se seleccionaron en base a estudios anteriores realizados por nuestro grupo (Saravia, 2001a). Se colocaron 100 µl de cada una de las dosis en tubos de vidrio de 15 ml y se incubaron por 2 min a 37°C en baño de María. Como blanco se utilizaron 100 µl de PBS–Tween 80 al 5% (v/v) y como control positivo 100 µl de veneno disuelto en PBS (dosis reto). Luego se agregó a cada tubo 1 ml de solución de sustrato fresca (yema de huevo en solución tampón de sustrato, 1:5) y se incubaron las mezclas por 20 min a 37°C en baño de María. Al terminar la incubación se agregó 5 ml de mezcla de extracción compuesta por alcohol isopropílico, n-heptano, ácido sulfúrico (40:10:1) a cada tubo, se tapó, se agitó vigorosamente en vortex y se dejó reposar por 10 minutos. Se agregó 2 ml de n-heptano y 3 ml de agua destilada a cada tubo y se mezcló por inversión, se dejó reposar hasta que se separaron dos fases. Se transfirieron 2 ml de la fase superior de cada reacción a un nuevo tubo de ensayo de 10 ml, se agregó 1 ml de la mezcla de titulación (azul de timol al 0.01 %) y se mezcló en vortex. Se tituló cada una de las mezclas agregando volúmenes de 20 µl de NaOH 0.018 N fresco, libre de CO<sub>2</sub> y mezclando en vortex, hasta observar visualmente un viraje de color amarillo a verde. Cada ensayo se realizó por triplicado y se repitió en tres días diferentes.

Se determinó el volumen de NaOH 0.018 N utilizado en la titulación de cada tubo restando el volumen empleado en la titulación del blanco. Se calculó la cantidad de  $\mu\text{Eq}$  de NaOH utilizados en la titulación y se expresó la actividad PLA2 en  $\mu\text{Eq}/\text{mg}\cdot\text{min}$ .

**Espectro de absorción de los extractos vegetales.** Debido a que el color verde intenso de los extractos vegetales podría interferir con la prueba colorimétrica para la medición de actividad proteolítica descrita por Wang, Shih y Huang (2004), se determinó inicialmente el espectro de absorción de cada extracto a diversas concentraciones (1.25, 0.625, 0.312, 0.156, 0.078 y 0.039 mg) a cinco longitudes de onda cercanas a los 450 nm (400 a 500 nm).

El análisis demostró que todos los extractos a las concentraciones evaluadas absorben con mayor intensidad a 400 nm (Anexo 7), por lo que se determinó la validez de utilizar el método con los extractos vegetales a esas concentraciones, leyendo a 450 nm, siempre y cuando se incluya un control interno que permita restar la absorbancia que produce el color de cada extracto (ruido de fondo). Este control se describe detalladamente en la siguiente sección.

**Actividad proteolítica intrínseca.** La capacidad proteolítica de los extractos sobre azocaseína se evaluó utilizando una modificación del método de Wang, Shih y Huang (2004) como se describe a continuación.

Se prepararon las dosis de cada extracto realizando diluciones seriadas de la solución madre (1.25, 0.625, 0.312, 0.156, 0.078 y 0.039 mg) en PBS, pH 7.2. Por cada dosis de extracto se preparó en un microtubo de reacción una mezcla que contenía 100  $\mu\text{l}$  de solución de sustrato (azocaseína 10 mg/ml en solución tampón de trabajo) y 20  $\mu\text{l}$  de extracto (serie X). El control negativo (control Z) contenía 100  $\mu\text{l}$  de solución de sustrato y 20  $\mu\text{l}$  de PBS, y el control positivo contenía 100  $\mu\text{l}$  de solución de sustrato y 20  $\mu\text{l}$  de veneno disuelto en PBS (dosis reto).

Para eliminar la interferencia del color de los extractos se preparó un control interno para cada dosis de extracto analizado, el cual contenía 100  $\mu\text{l}$  de solución tampón de trabajo libre de azocaseína y 20  $\mu\text{l}$  de cada dosis de extracto (serie Y). Para eliminar la absorbancia debida al Tween-80 se preparó otro control que contenía 100  $\mu\text{l}$  solución tampón de trabajo libre de azocaseína y 20  $\mu\text{l}$  de diluciones seriadas de PBS-Tween 80 (2.5, 1.25, 0.625, 0.3125, 0.156 y 0.078%), las cuales representan el porcentaje de Tween 80 presente en cada una de las dosis de extracto evaluadas (serie A).

Los tubos (ensayos y controles) se incubaron por 90 min en baño de María. Al terminar la incubación se agregaron 200  $\mu\text{l}$  de ácido tricloroacético a cada tubo; estos se mezclaron en vortex y se centrifugaron a 4,000 rpm. Del sobrenadante de cada tubo se transfirieron 150  $\mu\text{l}$  a una placa de ELISA de 96 pozos de fondo plano, y se agregó luego a cada pozo 150  $\mu\text{l}$  de NaOH 0.5 N. El contenido de los pozos se mezcló por agitación suave y se leyó la absorbancia a 450 nm en un

espectrofotómetro. Cada ensayo se realizó por triplicado y se repitió en tres días diferentes.

La actividad proteolítica de cada extracto se calculó de la siguiente manera: A cada ensayo (serie X) se le restó el valor de absorbancia del blanco (control Z) para obtener el valor de absorbancia neta del ensayo. Por aparte, a la absorbancia del control interno (serie Y) se le restó el valor de absorbancia del control de Tween 80 (serie A), para obtener la absorbancia correspondiente al color característico del extracto. Finalmente, al valor de absorbancia neta del ensayo ( $X - Z$ ) se le restó la absorbancia característica de la planta ( $Y - A$ ), obteniéndose así la variación de absorbancia del sobrenadante atribuida a la actividad proteolítica del extracto sobre el sustrato.

### **Evaluación in vitro de la capacidad neutralizante de los extractos**

**Determinación de la dosis reto de veneno.** Para determinar las dosis reto de veneno a utilizar en las pruebas de neutralización, se evaluaron las actividades proteolítica y PLA2 del lote de veneno que se utilizó para este estudio, utilizando los ensayos de dosis – respuesta descritos anteriormente.

Se evaluaron varias dosis del veneno para la actividad PLA2 (1.562, 3.125, 6.25, 12.5 y 25  $\mu\text{g}$ ) y proteolítica (0.78, 3.125, 6.25, 12.5, 18, 25, 50 y 100  $\mu\text{g}$ ) de acuerdo a los ámbitos reportados en estudios anteriores (Saravia et al., 2001b; Gutiérrez et al., 2013b).

Con los resultados obtenidos se elaboraron gráficas que representan la concentración de veneno vs.  $\mu\text{Eq}/\text{mg}\cdot\text{min}$  (para ensayo PLA2) o el cambio de absorbancia del sobrenadante a 450 nm (para ensayo de actividad proteolítica). Se determinó la menor concentración de veneno que produjo la máxima actividad estudiada y se eligió como dosis reto la dosis anterior a ésta (dosis sub óptima). Cada dosis de veneno se evaluó por triplicado, el ensayo se repitió en tres días diferentes.

**Pruebas de neutralización de las actividades proteolítica y PLA2 del veneno.** Se utilizó el ensayo de pre incubación descrito por Gutiérrez y col. (1990), el cual consiste en incubar la dosis reto del veneno con dosis variables del extracto. Las relaciones (razones) veneno:extracto (p/p) evaluadas para cada actividad fueron las siguientes:

**Neutralización de la actividad PLA2.** La dosis reto (3.125  $\mu\text{g}$ ) se enfrentó a dosis variables de extracto a razón veneno:extracto (p/p) de 1:400 hasta 1:12.5. Estas relaciones se seleccionaron para el tamizaje en base a estudios previos (Saravia, 2001a).

**Neutralización de la actividad proteolítica.** La dosis reto (25  $\mu\text{g}$ ) se enfrentó a dosis variables de extracto a razón veneno:extracto (p/p) de 1:50 hasta 1:3.125.

Se seleccionó este ámbito en base a los resultados obtenidos en el estudio del espectro de absorción de los extractos vegetales del proyecto, en donde se determinó que podía leerse sin interferencia la absorbancia del ensayo cuando se utilizan hasta 1.25 mg de extracto.

Para cada experimento se prepararon los controles correspondientes según la metodología previamente descrita; las mezclas y controles se incubaron por 30 min a 37°C, al cabo de los cuales se estudió la actividad neutralizante empleando el ensayo dosis-respuesta. Los experimentos se realizaron por triplicado y se repitieron en tres días diferentes.

Los resultados de los experimentos de neutralización se expresaron en términos porcentuales donde el 100% corresponde a la neutralización total del efecto evaluado y el 0% corresponde a un efecto de igual magnitud al inducido por el veneno solo.

Para establecer el grado de efectividad de un extracto se aplicaron los mismos criterios utilizados en el estudio anterior (Saravia, 2001a) con mínimas modificaciones: neutralización total (100%); neutralización parcial ( $\geq 50\%$  ( $DE_{50}$ ) pero menos del 100%); neutralización pobre (más del 1% pero menos del 50%); ausencia de neutralización (0-1%).

### **iii. Metodología de análisis de la información**

#### **Definición de variables utilizadas: tipos y formas de análisis de las variables**

**Variables independientes.** Extractos de plantas, dosis de extractos y controles.

**Variables dependientes.** Actividad anti proteolítica y actividad antifosfolipasa  $A_2$  de los extractos.

**Variable activa.** Veneno, ya que está ejerciendo una acción que no se considera natural en animales.

**Análisis de variables.** El análisis se realizó por un diseño de bloques al azar en el que para cada planta se analizó PBS 7.2, la dosis reto del veneno (3.125  $\mu\text{g}$  actividad PLA2, y 25  $\mu\text{g}$  actividad proteolítica), enfrentados a dosis variables de extracto a razón veneno:extracto de 1:400 hasta 1:12.5 para actividad PLA2 y de 1:50 hasta 1:3.125 para actividad proteolítica. Los ensayos se realizaron en tres días diferentes (bloques), con tres réplicas por ensayo por conveniencia, para un total de nueve lecturas.

**Metodología de análisis de la información.** Se calculó la actividad intrínseca de cada planta, así como su capacidad neutralizante. Para el ensayo de actividad PLA2 la respuesta se midió como la cantidad de  $\mu$  equivalentes de NaOH

liberados por  $\mu\text{g}$  de proteína por minuto; para el ensayo de actividad proteolítica la respuesta se midió por absorbancia.

Los resultados que presentaron algún grado de neutralización fueron evaluados por análisis de varianza de dos vías (ANDEVA), con un nivel de significancia  $\alpha$  de 0.05. Para los tratamientos que demostraron diferencias significativas con respecto al control (veneno), se realizó la prueba de Dunnett (comparaciones pareadas).

### 3. RESULTADOS

Los resultados obtenidos en esta investigación se presentarán de acuerdo a los objetivos específicos planteados en el proyecto.

#### **i. Recolección, secado y obtención de extractos etanólicos de las seis plantas del estudio**

Durante la fase inicial del proyecto se inició la recolección de las seis plantas del estudio: *A. hindsii*, *A. maxima*, *C. pareira*, *H. patens*, *P. peltatum* y *S. hyacinthoides*. Para ello se realizaron cuatro viajes de campo para colectarlas en San Bernardino y Samayac, Suchitepéquez; Morales, Izabal; y, San Jacinto, Chiquimula, así como también colectas en la Facultad de Agronomía y parque Las Ardillas de la Universidad de San Carlos de Guatemala (Tabla 1 y Anexo 1). Decada una de las plantas se colectó específicamente la parte que se utiliza tradicionalmente en el tratamiento de la mordedura de serpiente (Anexo 2). En el caso particular de *A. maxima* se utilizan corteza y hoja, por lo que se colectaron las dos partes. De cada una de las plantas colectadas se depositó una muestra en el herbario CFEH del Laboratorio de Productos Naturales Farmaya y se le asignó un número de registro (*voucher*).

Se procedió a secar el material vegetal y a realizar la extracción etanólica en los laboratorios del LIPRONAT (Anexo 18). El rendimiento obtenido de cada uno de los extractos se muestra en la Tabla 2. Se prepararon además las fichas técnicas de las plantas del estudio (Anexo 4 y Anexo 18).

**Tabla 1. Material vegetal recolectado para el proyecto.**

Nombre común	Nombre científico Familia	Lugar de colecta Coordenadas Altitud	Fecha de colecta	Parte colectada	Peso fresco colectado (kg)	Peso seco colectado (kg)	No. de registro de herbario Farmaya
Chichipín	<i>Hamelia patens</i> Jacq. (Rubiaceae)	San Bernardino, Suchitepéquez N 14° 33' 43.5"; W 091° 27' 19.3 " 548 msnm*	1/3/14	Hojas	7.54	1.52	CFEH** 1384
Oreja de burro	<i>Sansevieria hyacinthoides</i> (L.) Druce (Asparagaceae)	Facultad de Agronomía, CEDA, Campus central, USAC, zona 12 N 14° 34' 48.22"; W 90° 33' 14.23 " 1,474 msnm*	28/3/14	Hojas	6.04	0.79	CFEH** 1380
Alcotán	<i>Cissampelos pareira</i> L. (Menispermaceae)	Parque de las Ardillas, Campus Central, USAC, zona 12 N 14° 35' 20.37"; W 90° 29' 56.90 " 1,485 msnm*	03/4/14	Raíz	0.14	0.08	CFEH** 1381
Cordoncillo	<i>Piper peltatum</i> L. (Piperaceae)	Morales, Izabal N 15° 26' 32.20"; W 88° 49' 54.10 " 46 msnm*	05/4/14	Hojas	3.94	0.93	CFEH** 1382
Ixcanal	<i>Acacia hindsii</i> Benth. (Fabaceae)	Aldea Pueblo Nuevo Arriba, San Jacinto, Chiquimula. N 14° 39' 18.20"; W 89° 29' 56.90 " 401 msnm*	06/4/14	Hojas	2.30	0.73	CFEH** 1383
Guaco	<i>Aristolochia</i> sp. (Aristolochiaceae)	Ecoparcela El Kakawatal, municipio de Samayac, Suchitepéquez. N 14° 33' 08.2"; W 090° 28' 01.1 " 476 msnm*	4/5/14	Hojas y tallo	Hojas: 0.75 Tallo: 4.64	Hojas: 0.15 Tallo: 1.43	CFEH** 1378
Ixcanal	<i>Acacia hindsii</i> Benth. (Fabaceae)	Aldea Pueblo Nuevo Arriba, San Jacinto, Chiquimula N 14° 39' 18.20"; W 89° 29' 56.90 " 401 msnm*	20/5/14	Corteza	3.88	1.80	CFEH** 1383
Cordoncillo	<i>Piper peltatum</i> L. (Piperaceae)	Morales, Izabal N 15° 34' 52.5"; W 088° 36' 34.3 " 67 msnm*	21/5/14	Hojas	1.68	0.31	CFEH** 1382

El material vegetal fue colectado, pesado y secado en los lugares indicados en la tabla siguiendo los procedimientos de buenas prácticas descritos en materiales y métodos. \*msnm: metros sobre el nivel del mar. \*\*CFEH: *Cemat Farmaya ethnobotany herbarium*.

**Tabla 2. Rendimiento de los extractos etanólicos de las seis plantas del estudio.**

<b>Nombre</b>	<b>Parte colectada</b>	<b>Solvente</b>	<b>Porcentaje de rendimiento</b>
<i>Aristolochia maxima</i>	Hoja	Etanol 70%	24.38%
	Corteza	Etanol 70%	11.87%
<i>Acasia hindsii</i>	Corteza	Etanol 70%	9.44%
<i>Sansevieria hyacinthoides</i>	Hoja	Etanol 90%	19.99%
<i>Cissampelos pareira</i>	Raíz	Etanol 70%	17.30%
<i>Piper peltatum</i>	Hoja	Etanol 70%	22.15%
<i>Hamelia patens</i>	Hoja	Etanol 70%	37.00%

Los extractos vegetales etanólicos se prepararon por percolación y se concentraron en rotavapor, una vez secos, se determinó el porcentaje de rendimiento como se describe en materiales y métodos.

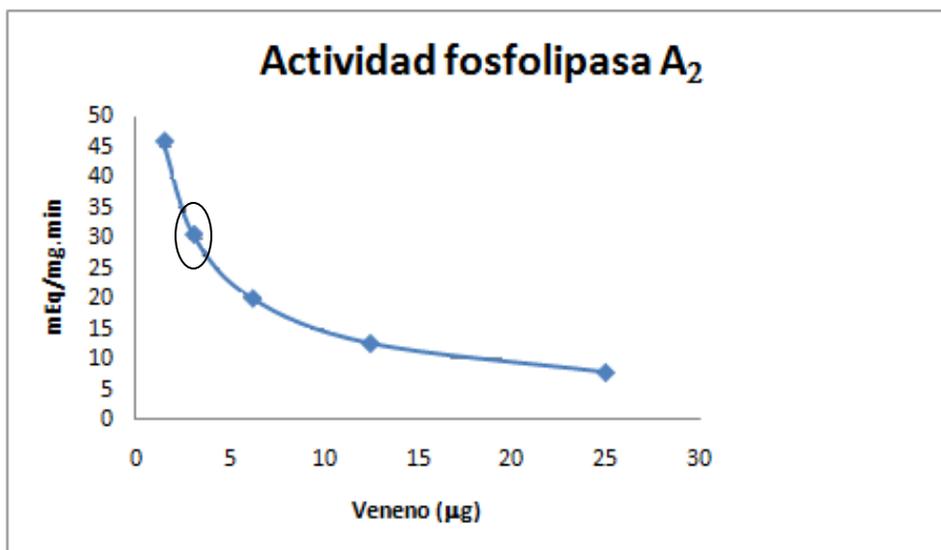
**ii. Estandarización de las técnicas para la determinación de la actividad PLA2 y proteolítica en ensayos de dosis-respuesta y neutralización.**

En la siguiente fase del proyecto se estandarizó la metodología de disolución de extractos vegetales para pruebas biológicas y se estandarizaron las metodologías de evaluación in vitro de la actividad PLA2 (Dole, 1956) y proteolítica (Wang, Shih & Huang, 2004) intrínseca de cada extracto por medio de ensayos dosis-respuesta según se describe más adelante, con la finalidad de determinar los niveles de extracto que podrían utilizarse en el estudio sin provocar los efectos PLA2 o proteolíticos, que invalidaran los resultados de las pruebas de neutralización. Utilizando los mismos ensayos de dosis-respuesta se determinaron las dosis reto (DR) de veneno a utilizarse en las pruebas de neutralización. Finalmente, se procedió a la evaluación de la capacidad de los extractos vegetales para neutralizar los efectos PLA2 y proteolítico del veneno. Todos los experimentos se realizaron por triplicado en tres experimentos independientes. Los procedimientos se explican detalladamente en la sección de materiales y métodos; se adjuntan los procedimientos operativos estándar (POEs) (Anexo 3).

Actividad PLA2 intrínseca y pruebas de neutralización:

Se midió la actividad PLA2 del lote de veneno que se utilizó en el estudio por medio del ensayo de dosis-respuesta. Como se muestra en la Gráfica 1, la dosis de veneno que produjo la mayor liberación de ácidos grasos fue de 1.562  $\mu\text{g}$ , por lo que para los ensayos de neutralización se seleccionó como dosis reto una dosis de veneno menor, el cual produce el efecto farmacológico pero no satura el sistema de reacción (3.125  $\mu\text{g}$ ). Los datos numéricos de actividad enzimática con desviaciones estándar (DE) se muestran en la Tabla 5 (Anexo 5).

**Gráfica 1. Determinación de la dosis reto de veneno para las pruebas de neutralización de la actividad PLA2**



La actividad PLA<sub>2</sub> del veneno se cuantificó incubando diferentes dosis de veneno con el sustrato y los ácidos grasos liberados titularon. La actividad PLA<sub>2</sub> del veneno se expresa como µEq de ácido graso liberado por mg de proteína por minuto. Los puntos de la curva representan la media de tres experimentos independientes realizados en triplicado. Se marcó con un círculo la dosis reto (3.125 µg) para los ensayos de neutralización

Ninguno de los extractos presentó actividad PLA<sub>2</sub> intrínseca a las dosis estudiadas (0.078-1.25 mg). De todas las plantas, únicamente *S. hyacinthoides* mostró alguna capacidad neutralizante (Tabla 3). Sin embargo, a pesar de haberse observado diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) al comparar los valores de neutralización de las dos relaciones veneno-extracto más altas evaluadas (1:400 y 1:200) con la actividad del control de veneno (Anexo 17), su capacidad neutralizante es pobre, ya que no logró alcanzar la dosis efectiva media (DE<sub>50</sub>, relación veneno: extracto que neutraliza el 50% del efecto del veneno) (Bogarín et al., 1995; Gutiérrez et al., 1990).

**Tabla 3. Evaluación de la actividad PLA2 intrínseca de los extractos vegetales etanólicos y su capacidad neutralizante**

Planta (extracto etanólico)	Actividad fosfolipasa A <sub>2</sub> intrínseca <sup>a</sup> ( $\mu$ Eq/mg.min)	Neutralización de la actividad fosfolipasa A <sub>2</sub> del veneno <sup>b</sup> (%)
<i>Hamelia patens</i> (hoja)	0	0
<i>Aristolochia maxima</i> (corteza)	0	0
<i>Aristolochia máxima</i> (hoja)	0	0
<i>Piper peltatum</i> (hoja)	0	0
<i>Sansevieria hyacinthoides</i> (hoja)	0	13.90 $\pm$ 6.41 <sup>c</sup>
<i>Acacia hindsii</i> (corteza)	0	0
<i>Cissampelos pareira</i> (raíz)	0	0

<sup>a</sup>La actividad PLA2 intrínseca de los extractos etanólicos se evaluó incubando diferentes dosis de cada extracto (0.078 – 1.25 mg) con el sustrato y titulando los ácidos grasos liberados.

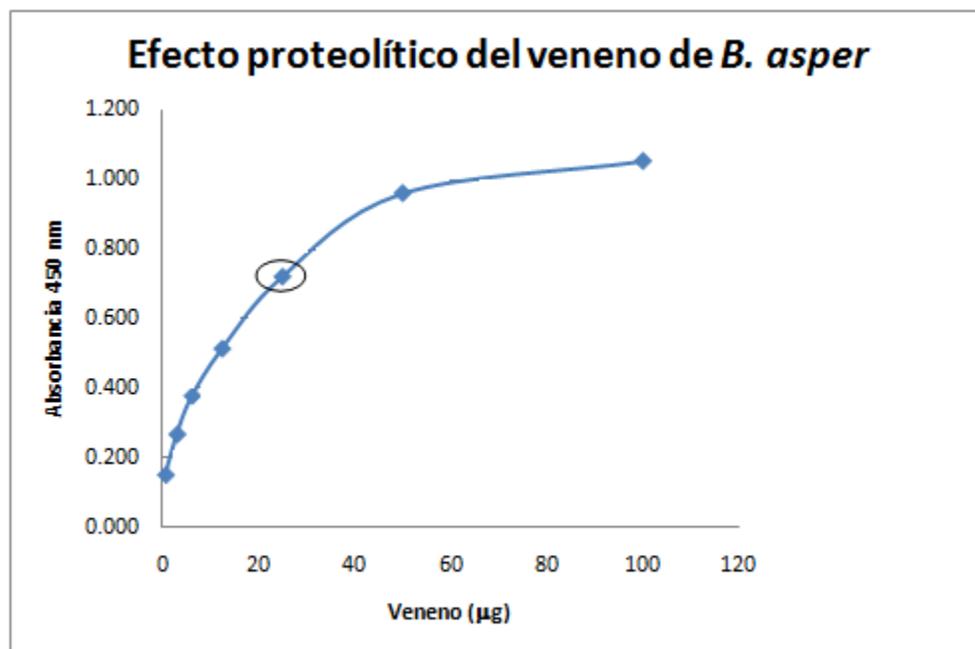
<sup>b</sup>Neutralización: se preincubaron dosis variables de extractos (1: 400 hasta 1: 12.5 p/p) con una dosis fija de veneno (dosis reto (DR): 3.125  $\mu$ g) antes de exponerlas al sustrato, posteriormente se determinó la cantidad de ácidos grasos liberados en comparación con el control (DR de veneno).

<sup>c</sup>Los números indican el porcentaje de neutralización obtenido con el mayor nivel de extracto utilizado. Los resultados se presentan como el promedio  $\pm$  DS (n=9) de tres ensayos independientes realizados en triplicado.

#### Actividad proteolítica intrínseca y pruebas de neutralización:

Se midió la actividad proteolítica sobre azocaseína del lote de veneno utilizado en el estudio por medio del ensayo de dosis-respuesta y se graficó con la finalidad de visualizar el comportamiento de la cinética enzimática. Como se muestra en la Gráfica 2, también se seleccionó una dosis sub-óptima de veneno (25  $\mu$ g) como dosis reto para los ensayos de neutralización. Los datos numéricos se muestran en la Tabla 6 (Anexo 6).

**Gráfica 2. Determinación de la dosis reto de veneno para las pruebas de neutralización de la actividad proteolítica.**



La actividad proteolítica del veneno se determinó incubando diferentes dosis de veneno con azocaseína. La cantidad de los productos de degradación del sustrato se determinó midiendo la absorbancia del sobrenadante a 450 nm. Los puntos de la curva representan la media de tres experimentos independientes realizados en triplicado. Se marcó con un círculo la dosis reto de veneno (25  $\mu\text{g}$ ) para los ensayos de neutralización.

Durante la estandarización de este ensayo para determinar la actividad intrínseca de los extractos vegetales de color verde intenso, se encontró que éste interfería con la lectura de los productos coloreados resultantes de la degradación de azocaseína. Se hizo un análisis del espectro de absorción de los extractos y los disolventes empleados en su disolución (Anexo 7); con los datos obtenidos se determinó el rango de concentraciones de extractos vegetales (0.039-1.25 mg) que permite la lectura de la prueba colorimétrica con una mínima interferencia según se describe en la metodología.

Como se muestra en la Tabla 4, ninguno de los extractos etanólicos mostró actividad proteolítica intrínseca a las dosis estudiadas. En las pruebas de neutralización se encontró que únicamente los extractos de *P. peltatum* y *C. pareira* mostraron alguna capacidad para neutralizar la actividad del veneno. *P. peltatum* mostró diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) al comparar los valores de neutralización de las primeras tres relaciones veneno:planta (1:50, 1:25 y 1:12.5) con la del control de veneno, y *C. pareira* mostró diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en dicha comparación para las primeras dos relaciones evaluadas (1:50 y 1:25) (Anexo 17). Nuevamente, ninguna de estas alcanzó la  $DE_{50}$ .

**Tabla 4 .Evaluación de la actividad proteolítica intrínseca de los extractos vegetales etanólicos y su capacidad neutralizante.**

Planta (extracto etanólico)	Actividad proteolítica intrínseca <sup>a</sup>	Neutralización de la actividad proteolítica del veneno <sup>b</sup> (%)
<i>Hamelia patens</i>	0	0
<i>Aristolochia maxima</i> (corteza)	0	0
<i>Aristolochia máxima</i> (hoja)	0	0
<i>Piper peltatum</i>	0	24.52 ± 7.45 <sup>c</sup>
<i>Sansevieria hyacinthoides</i>	0	0
<i>Acacia hindsii</i>	0	0
<i>Cissampelos pareira</i>	0	32.98 ± 5.51 <sup>c</sup>

<sup>a</sup>La actividad proteolítica intrínseca de los extractos vegetales se determinó incubando diferentes dosis de extractos (0.039-1.25 mg) con azocaseína. La cantidad de los productos de degradación del sustrato se determinó midiendo la absorbancia del sobrenadante a 450 nm.

<sup>b</sup>Neutralización: se preincubaron dosis variables de extractos con una dosis fija de veneno (dosis reto (DR): 25 µg) y se realizó el procedimiento descrito para la determinación de la actividad proteolítica. Las relaciones DR : extracto (p/p) ensayadas fueron de 1:50 hasta 1:3.125.

<sup>c</sup>Los números indican el porcentaje de neutralización obtenido con el mayor nivel de extracto utilizado. Los resultados se presentan como el promedio ± DS (n=9) de tres ensayos independientes realizados en triplicado.

### **iii. Determinar la capacidad neutralizante de la actividad letal in vivo de los extractos de las dos plantas con mayor actividad antifosfolipasa A<sub>2</sub> y antiproteolítica**

En el protocolo del presente proyecto se planteó que se seleccionarían los dos extractos que presentaran la mayor capacidad para neutralizar los efectos PLA<sub>2</sub> y proteolítico del veneno de *B. asper* (in vitro) y se evaluaría su capacidad para neutralizar el efecto letal del veneno en ratones. Como se demostró anteriormente, tres extractos del estudio demostraron en las pruebas de tamizaje una cierta capacidad para neutralizar dichos efectos del veneno, con una potencia neutralizante bastante menor a la DE<sub>50</sub> (Tablas 3 y 4).

Los efectos PLA<sub>2</sub> y proteolítico del veneno son indicadores de la capacidad mitotóxica, inflamatoria y hemorrágica del veneno de *B. asper* (Lomonte & Gutiérrez, 1983; Lomonte et al., 2012). Dado que los extractos demostraron en las pruebas in vitro que carecen de la potencia necesaria para neutralizar los efectos PLA<sub>2</sub> y proteolítico producidos por las DR de veneno (3.125 µg y 25 µg respectivamente), y tomando en cuenta las políticas actuales que restringen el uso de animales de laboratorio (Dothel, Vasina, Barbara & De Ponti, 2013; Nuffield, Council on Bioethics, 2005a y b), consideramos que los resultados obtenidos hasta ahora no justifican utilizar estos extractos vegetales etanólicos en pruebas de letalidad con animales. Como parte de las consideraciones éticas que tomamos en cuenta fue que los ensayos de neutralización de dosis letal utilizan como DR de

veneno 4DL<sub>50</sub> (DL<sub>50</sub> es la dosis de veneno que mata al 50% de los ratones inyectados), lo que en el caso de la serpiente *B. asper* implicaría que los extractos deberían ser capaces de neutralizar alrededor de 257.72 µg de veneno/ratón (Bogarín et al., 1999; Saravia et al., 2001b).

#### **iv. Propiciar estudios de cooperación internacional para complementar la información generada en el proyecto**

Se propiciaron estudios de cooperación internacional con el fin de complementar la información generada en el proyecto. Para ello, se invitó al Dr. José María Gutiérrez del ICP de la Universidad de Costa Rica, experto en el tema del ofidismo y su tratamiento, a participar como colaborador internacional del proyecto. El Dr. Gutiérrez proporcionó asesoría y acompañamiento durante el desarrollo del mismo, con lo cual se ha logrado implementar, estandarizar adecuadamente los procedimientos de laboratorio, análisis de resultados, elaboración y revisión del informe final. Así mismo, como parte del trabajo colaborativo, el ICP envió una donación de veneno de *B. asper* para uso del proyecto (Anexo 8). Durante una visita académica realizada durante el mes de abril por la Dra. Saravia al ICP, se realizaron diversas reuniones de coordinación científica con el Dr. Gutiérrez y otros expertos de dicho instituto, en donde se discutieron estrategias y se planificaron futuras colaboraciones científicas entre las dos instituciones (Anexos 9 y 10).

#### **v. Difusión de la información sobre el problema del accidente ofídico en Guatemala y de su tratamiento convencional y alternativo**

Con el fin de difundir información sobre el problema del accidente ofídico en Guatemala y de su tratamiento convencional y alternativo se realizaron actividades de docencia, asesoría, presentaciones orales en actividades académicas y la elaboración y distribución de trífolios informativos acerca del problema del ofidismo en Guatemala y su tratamiento.

##### Actividades de docencia y asesoría:

Establecimiento del seminario de graduación “*Determinación de la capacidad neutralizante de mezclas de plantas usadas en Guatemala como antídotos para la mordedura de serpiente*”, conformado por tres estudiantes de la carrera de Química Farmacéutica de la Facultad de CCQQ y Farmacia. Los estudiantes realizan su investigación de manera paralela a este proyecto, aprovechando la infraestructura creada, en donde realizarán mezclas no solo de las seis plantas del proyecto sino que se agregarán tres plantas más, detectadas como potencialmente antiofídicas por nuestro grupo (Saravia et al., 2001a) en trabajos anteriores: *D. contrajerva*, *E. odoratum* y *N. lobata* (Tabla 7, Anexo 11), han sido capacitados en las técnicas de colecta, extracción y los bioensayos in vitro. Así mismo, están en el proceso de escritura del protocolo de investigación. La dirección de dicha Escuela emitió el nombramiento oficial de estudiantes y

asesoras (Dra. Patricia Saravia, M.Sc. Rosario Hernández de la Unidad de Biología Celular y Dra. Sully Cruz del LIPRONAT) con Ref. EQF. 357.08.2014 (Anexo 12). Se espera que los estudiantes finalicen su trabajo experimental durante el año 2015.

Realización del trabajo semestral de investigación del curso de Bioquímica de la carrera de Química, en el cual se evaluaron las actividades coagulante y anticoagulante (potencialmente útiles para el tratamiento del envenenamiento ofídico y otras patologías), de extractos acuosos, etanólicos y otras fracciones de diferente polaridad, de las plantas *D. contrajerva* y *N. lobata*. En su informe final los 13 estudiantes del curso describieron en cual(es) de las fracciones se detectaron las actividades descritas, y propusieron las posibles familias de moléculas responsables de estas actividades sobre el sistema de coagulación humano. Para la realización de este trabajo, se inició una relación colaborativa con la Licda. Noemí Orozco, del Depto. de Química Orgánica, Escuela de Química, de la Facultad de CCQQ y Farmacia, con quien se acordó dar continuidad a este tipo de trabajos (Anexo 13).

#### Actividades de difusión masiva:

##### **Presentaciones orales en actividades académicas/docentes:**

Presentación de la conferencia “Evaluación de la capacidad neutralizante de extractos de plantas de uso popular en Guatemala para el envenenamiento por mordedura de la serpiente *Bothrops asper*” en la Jornada Científica 2014 de la Facultad de CCQQ y Farmacia, organizada por el Instituto de Investigaciones Químicas y Biológicas (IIQB) en septiembre de 2014 (Anexo 14).

Presentación de dos conferencias acerca del accidente ofídico, su tratamiento y monitoreo clínico a supervisores y estudiantes las carreras de Química Farmacéutica, Química Biológica y Biología durante las reuniones de inducción que se realizaron antes del inicio del Ejercicio Profesional Supervisado (EPS) el 01 de diciembre de 2014 (Anexo15).

##### **Elaboración y distribución de trifoliales informativos:**

Elaboración e impresión de 300 trifoliales con información actualizada acerca del accidente ofídico en Guatemala, su fisiopatología y tratamiento convencional y alternativo. Estos trifoliales se han entregado al Centro de Información y Asesoría Toxicológica (CIAT) de la Facultad de CCQQ y Farmacia, así como a estudiantes de tres carreras de la misma Facultad que están por iniciar su EPS, con la encomienda de distribuirlos, así como de replicar el conocimiento impartido en las conferencias de ofidismo y su tratamiento, en los hospitales y centros de salud en donde lo realicen (Anexo 16).

## Matriz de resultados

<b>Objetivo Específico</b>	<b>Resultado Esperado</b>	<b>Resultado Obtenido</b>
1. Colectar y preparar extractos etanólicos de seis plantas utilizadas como antidotos en el país ( <i>Acacia hindisii</i> , <i>Aristolochia maxima</i> , <i>Cissampelos pareira</i> , <i>Hamelia patens</i> , <i>Piper peltatum</i> y <i>Sansevieria hyacinthoides</i> )	1. Extractos etanólicos de seis especies vegetales ( <i>A. hindisii</i> , <i>A. maxima</i> , <i>C. pareira</i> , <i>H. patens</i> , <i>P. peltatum</i> y <i>S. hyacinthoides</i> ). 2. Información etnobotánica, química y farmacológica de las seis especies.	Se cuenta con siete extractos vegetales ( <i>A. hindisii</i> , <i>A. maxima</i> hoja y corteza, <i>C. pareira</i> , <i>H. patens</i> , <i>P. peltatum</i> y <i>S. hyacinthoides</i> ), así como con las fichas técnicas que presentan la información etnobotánica, química y farmacológica de las especies vegetales.
2. Estandarizar las técnicas para la determinación de la actividad PLA2 y proteolítica en los ensayos de dosis-respuesta.	1. Técnicas estandarizadas para la determinación de las actividades PLA2 y proteolítica intrínseca de los extractos vegetales en ensayos dosis-respuesta y de la capacidad neutralizante de dichos efectos del veneno de <i>B. asper</i> . 2. Identificación de extractos etanólicos con actividad neutralizante de los efectos PLA2 y proteolíticos del veneno de <i>B. asper</i> .	1. Estandarización de las técnicas para la determinación de las actividades PLA2 (Dole, 1956) y proteolítica (Wang, Shih & Huang, 2004) intrínseca del veneno y los extractos etanólicos. 2. Determinación de la actividad PLA2 intrínseca del veneno y de los extractos del estudio. 3. Determinación de la actividad proteolítica intrínseca del veneno y de los extractos del estudio. 4. Determinación de la capacidad de los extractos vegetales para neutralizar las actividades PLA2 y proteolítica del veneno. 5. Elaboración y validación de los procedimientos operativos estándar (POEs) utilizados para la disolución de extractos etanólicos para estos bioensayos in vitro así como para los ensayos de dosis – reto y neutralización.

<p>3. Determinar la capacidad neutralizante de la actividad letal in vivo de los extractos de las dos plantas con mayor actividad antifosfolipasa A2 y antiproteolítica</p>	<p>1. Identificación de extractos etanólicos con actividad neutralizante del efecto letal del veneno de <i>B. asper</i>.</p>	<p>*Debido a que ninguno de los extractos del estudio demostró capacidad para neutralizar efectivamente los efectos del veneno de serpiente in vitro, ya que ninguno de ellos alcanzó la dosis efectiva media (DE<sub>50</sub>: dosis de extracto que neutraliza el 50% del efecto evaluado), y tomando en cuenta las políticas éticas actuales que restringen el uso de animales de laboratorio, no se justificó realizar ensayos con estos extractos para neutralizar la letalidad del veneno en ratones (tomar nota de que la dosis reto para la neutralización de la letalidad son 4DL<sub>50</sub>; DL<sub>50</sub> es la dosis de veneno que mata al 50% de los ratones inyectados).</p>
<p>4. Propiciar estudios de cooperación internacional para complementar la información generada en este proyecto</p>	<p>1. Establecimiento de vinculación internacional.</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Asesoría y acompañamiento durante todo el proyecto del Dr. José María Gutiérrez, del Instituto Clodomiro Picado de la Universidad de Costa Rica.</li> <li>2. Trabajo colaborativo establecido entre los grupos de trabajo de Guatemala y Costa Rica.</li> <li>3. Donación de veneno y toxinas de <i>B. asper</i> proveniente del serpentario del Instituto Clodomiro Picado.</li> <li>4. Reuniones de discusión de resultados y propuestas de futuros proyectos colaborativos (teleconferencias y en Costa Rica).</li> </ol>

<p>5. Difundir la información sobre el problema del accidente ofídico en Guatemala y de su tratamiento convencional y alternativo.</p>	<p>1. Documentos informativos relacionados con información general sobre el accidente ofídico y su tratamiento.</p>	<p>1. Elaboración e impresión de 300 trifoliales con información actualizada acerca del accidente ofídico en Guatemala, su fisiopatología y tratamiento convencional y alternativo. Estos trifoliales se han entregado al Centro de Información y Asesoría Toxicológica (CIAT) de la Facultad de CCQQ y Farmacia, así como a estudiantes de tres carreras de la misma Facultad que están por iniciar su Ejercicio Profesional Supervisado (EPS), con la encomienda de distribuirlos en los hospitales y centros de salud en donde lo realicen.</p> <p>2. Presentación de dos conferencias acerca del accidente ofídico y su tratamiento a supervisores y estudiantes las carreras de Química Farmacéutica, Química Biológica y Biología durante las reuniones de inducción que se realizan antes del inicio del EPS.</p> <p>3. Presentación de la conferencia “Evaluación de la capacidad neutralizante de extractos de plantas de uso popular en Guatemala para el envenenamiento por mordedura de la serpiente <i>Bothrops asper</i>” en la Jornada Científica 2014 de la Facultad de CCQQ y Farmacia, organizada por el IIQB.</p>
--	---	--

		<p>4. Establecimiento del seminario de graduación "<i>Determinación de la capacidad neutralizante de mezclas de plantas usadas en Guatemala como antídotos para la mordedura de serpiente</i>", conformado por tres estudiantes de la carrera de Química Farmacéutica de la Facultad de CCQQ y Farmacia. Los estudiantes realizan su investigación de manera paralela a este proyecto, aprovechando la infraestructura creada, y realizarán mezclas no solo de las seis plantas del proyecto sino que se agregarán tres más: <i>Dorstenia contrajerva</i>, <i>Eupatorium odoratum</i> y <i>Neurolaena lobata</i>. Han sido capacitados en las técnicas de colecta, extracción y los bioensayos in vitro. Así mismo, están en el proceso de escritura del protocolo de investigación. La dirección de dicha Escuela emitió el nombramiento oficial de estudiantes y asesoras (Dra. Patricia Saravia, M.Sc. Rosario Hernández y Dra. Sully Cruz) con Ref. EQF. 357.08.2014.</p> <p>5. Realización del trabajo semestral de investigación del curso de Bioquímica de la carrera de Química, en el cual se evaluó la actividad coagulante y anticoagulante</p>
--	--	--

		<p>(potencialmente útiles para el tratamiento del envenenamiento ofídico y otras patologías), de extractos acuosos, etanólicos y otras fracciones de diferente polaridad, de las plantas <i>Dorstenia contrajerva</i> y <i>Neurolaena lobata</i>. En sus informes finales los 13 estudiantes del curso determinaron en que fracciones se detectaron las actividades descritas, y propusieron las posibles familias de moléculas responsables de estas actividades sobre el sistema de coagulación humano. Para la realización de este trabajo, se inició una relación colaborativa con la Licda. Noemí Orozco, del Depto. de Química Orgánica de la Facultad de CCQQ y Farmacia, con quien se tienen planes de dar continuidad a este tipo de trabajos.</p>
--	--	---

#### 4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El envenenamiento ofídico es un problema de salud importante a nivel mundial, que aunque ha sido catalogada como una de las enfermedades tropicales desatendidas (WHO, 2007), sigue sin ser reconocida como un riesgo para la salud pública.

En Guatemala la serpiente que causa el mayor número de accidentes ofídicos por envenenamiento es *B. asper* (Gutiérrez, 2010). El envenenamiento por *B. asper* produce el desarrollo inmediato de daño tisular local caracterizado por edema, dolor, sangrado y necrosis. En el envenenamiento grave se produce hemorragia sistémica, coagulopatías, shock cardiovascular e insuficiencia renal aguda (Gutiérrez, 2010). Los principales componentes del veneno, metaloproteinasas y PLA2, son los responsables de las principales manifestaciones locales y sistémicas que produce el envenenamiento (Angulo & Lomonte, 2009).

La administración temprana de sueros antiofídicos es el tratamiento recomendado para contrarrestar el envenenamiento (Gutiérrez, 2010; Gupta & Peshin, 2012), pero su uso en áreas rurales presenta serias limitaciones en cuanto a accesibilidad y riesgo de reacciones alérgicas severas. Los antisueros son altamente eficaces en la neutralización de los efectos sistémicos producidos por el veneno, sin embargo, los daños locales se desencadenan muy rápidamente y son irreversibles, por lo que su neutralización se logra solo parcialmente, muchas veces dependiendo de la rapidez con la que se administre el antisuero (revisado en Lomonte, León, Angulo, Rucavado & Núñez, 2009). Tomando en cuenta que la mayor parte de los accidentes ofídicos suceden en áreas rurales alejadas de los centros de salud y el componente tradicional de nuestros pueblos indígenas, un número indeterminado de víctimas de envenenamiento ofídico son tratados por curanderos o chamanes con plantas, de acuerdo a sus recetas tradicionales (Orellana, 1987; Otero et al., 2000a; Coe & Anderson, 2005).

Por ello, se plantea la necesidad de validar científicamente si las plantas utilizadas en estos antídotos son realmente efectivas en la neutralización de los venenos de las serpientes del país, lo que contribuiría a disminuir o retardar los efectos locales y sistémicos del envenenamiento ofídico en el lugar del accidente, mientras se obtiene tratamiento médico hospitalario.

En la medicina popular de Guatemala se usan varias plantas contra la mordedura de serpientes (Morton, 1977). Aunque existen personas especializadas en este tipo de tratamientos, se ha reportado que no existe un criterio común en cuanto a las recetas, preparación, dosificación o administración de los antídotos (Hay, 2002; Saravia et al., 2001a). Así mismo, existen muy pocos estudios científicos que validen si dichas plantas o sus extractos son realmente efectivas en la neutralización de los venenos de la región. En esta línea, nuestro grupo realizó un estudio previo (Saravia et al., 2001a) en donde se estudió la capacidad de los extractos etanólicos y acuosos de tres plantas (*D. contrajerva*, *N. lobata* y *E:*

*odoratum*) para neutralizar los principales efectos del veneno de *B. asper*. Aunque algunos de los extractos demostraron una capacidad neutralizante pobre del efecto hemorrágico e intermedia del efecto coagulante, fallaron en neutralizar los efectos PLA2 y letal del veneno.

Con la presente investigación se retomó la validación de las plantas utilizadas como antiofídicos en Guatemala, por lo que básicamente se implementaron y estandarizaron dos técnicas de tamizaje in vitro para la detección de actividad antifosfolipasa A<sub>2</sub> y antiproteolítica en los extractos etanólicos de seis plantas medicinales utilizadas en el tratamiento del envenenamiento ofídico en el país (Saravia et al., 2001a; Hay, 2002).

Se seleccionaron estas pruebas básicas debido a que los efectos PLA2 y proteolítico del veneno son importantes indicadores de la capacidad del veneno para producir hemorragia, miotoxicidad e inflamación (Lomonte & Gutiérrez, 1983; Lomonte et al., 2012).

Las PLA2 forman parte de los principales componentes tóxicos del veneno de *B. asper* (Angulo & Lomonte, 2009). Despliegan una amplia variedad de actividades farmacológicas, tales como miotoxicidad, cardiotoxicidad, anticoagulación y edema (revisado en Carvalho et al., 2013). Por esta razón, se han realizado esfuerzos en la búsqueda de compuestos naturales que logren la inhibición de la actividad PLA2 de los venenos de serpiente de forma rápida, sin producir los efectos secundarios de los antisueros (revisado en Carvalho et al., 2013).

El efecto proteolítico del veneno de *B. asper* está mediado principalmente por metaloproteinasas dependientes de zinc (*snake venom metalloproteinases*, SVMPs) y en menor proporción por serinaproteinasas (Gutiérrez, 2002). Estas enzimas son responsables de algunas de las consecuencias más comunes de los envenenamientos por serpientes de la familia Viperidae, como el sangrado local y sistémico, el cual contribuye a la lesión tisular permanente en el tejido muscular, así como a hipovolemia y choque cardiovascular (Fan & Cardoso, 1995; Gutiérrez, 1995). Se ha demostrado que las SVMPs también inducen mionecrosis, edema, formación de bulas, dermonecrosis, fibri(noge)nólisis y degradación de la matriz extracelular (Gutiérrez & Rucavado, 2000; Gutiérrez, 2002; Gutiérrez, Rucavado, Chaves, Díaz & Escalante, 2009a). Por ello, los inhibidores de las metaloproteinasas del veneno no se limitan a reducir los efectos locales sino que además previenen las complicaciones secundarias al envenenamiento al disminuir la hemorragia. Varios estudios han reportado metabolitos vegetales que son inhibidores de la SVMPs de diversas especies ofídicas, entre ellas *Pentacletra macroloba* y *Baccharis trímera*, que inhiben las actividades hemorrágica y proteolítica del veneno de las serpientes *Bothrops* (revisado en Santhosh et al, 2013).

Debido a que el contenido y la potencia del veneno podría variar por factores como el tamaño de la serpiente, edad, clima, la última ingesta y la procedencia

geográfica (Castrillón-Estrada, Acosta, Hernández-Ruíz & Alonso 2007; Gutiérrez, 1995), fue necesario determinar las actividades PLA2 y proteolíticas del lote de mezclas de veneno de *B. asper* utilizado para este estudio antes de establecer las dosis reto. Los resultados obtenidos (Gráficas 1 y 2) mostraron curvas de actividad enzimática similares a las reportadas previamente (Saravia et al., 2001b; Gutiérrez et al., 2013), por lo que para las dosis reto se seleccionaron dosis de veneno que indujeran una respuesta sub-máxima, ubicada en una porción lineal de la curva de dosis-respuesta, que produjera el efecto farmacológico estudiado pero sin saturar el sistema de cuantificación.

Los resultados obtenidos en las pruebas de neutralización demostraron que, de los extractos etanólicos de las seis especies analizadas, únicamente el extracto de *S. hyacinthoides* logró una neutralización pobre ( $< DE_{50}$ ) del efecto PLA2 del veneno de *B. asper* (Tabla 3). Estos resultados son similares a los obtenidos anteriormente en el estudio de plantas guatemaltecas (Saravia et al., 2001a), en donde no se logró detectar actividad PLA2 en los extractos estudiados.

Sin embargo, en el caso del extracto de *P. peltatum* este resultado fue inesperado, ya que aunque en nuestro sistema no mostró poseer actividad neutralizante en ninguna de las relaciones veneno:extracto (p/p) investigadas, en un estudio previo realizado en Costa Rica por Nuñez y col. (2005), se demostró que inhibía completamente in vitro la actividad PLA2 de la miotoxina I, aislada del veneno de *B. asper*. Debe mencionarse sin embargo, que el compuesto activo aislado de dicha planta (4-nerolidilcatecol), no logró inhibir la actividad PLA2 en experimentos posteriores realizados in vivo. Igualmente, existen reportes que sugieren propiedades anti-inflamatorias de varias especies de *Aristolochia* (Aristolochiaceae), debidas en parte a su capacidad para inhibir la actividad de las enzimas PLA2 en general (Sosa et al., 2002; Heinrich, Chan, Wanke, Neinhuis & Simmonds, 2009). Las diferencias observadas en los resultados pueden atribuirse a aspectos metodológicos, ya que en el caso del estudio de Nuñez y col. (2005) los ensayos se realizaron con una toxina aislada, no el veneno crudo y los extractos de las especies de *Aristolochia* citados anteriormente no fueron expuestos al veneno crudo de *B. asper*.

En un estudio de tamizaje realizado en Colombia por Otero y col. (2000b), se mostró que nueve de 74 extractos investigados neutralizaron efectivamente in vitro el efecto hemolítico indirecto (indicador de la actividad PLA2 del veneno de *B. atrox* (ahora clasificado como *B. asper*) (revisado en Lomonte et al., 2009). Aunque las dosis de los extractos etanólicos que alcanzaron la  $DE_{50}$  (0.044-1.153 mg) son comparables a las estudiadas en nuestro trabajo (Tabla 3), Otero y col. (2000b) reportaron que el efecto fue dosis-dependiente, por lo que existiría la posibilidad de que al aumentarse las dosis en nuestras pruebas de tamizaje, se incrementara la capacidad neutralizante de las mismas. Sin embargo, por tratarse de cantidades muy altas del extracto consideramos que elevar estas dosis no tendría mucho sentido, pero que sí existe la posibilidad de que al utilizarse en

combinación con otras plantas el efecto pueda potenciarse, como se discute más adelante en esta sección.

El análisis de la capacidad de los extractos para neutralizar el efecto proteolítico del veneno sobre azocaseína como sustrato, demostró una actividad pobre de *P. peltatum* y *C. pareira*, ya que ninguna llegó a neutralizar el 50% de actividad enzimática del veneno. Debe mencionarse que los niveles de los extractos etanólicos y las relaciones veneno:extracto (p/p) que se usaron en este estudio abarcaron ámbitos más amplios a los reportados por otros investigadores en Colombia para neutralizar el mismo efecto del veneno de *B. asper* (Patiño, López, Aristizábal, Quintana, & Benjumea, 2012; Otero et al., 2000c). Aunque podría esperarse que este efecto también fuera dosis-dependiente, no fue posible aumentar la cantidad de extracto etanólico para el ensayo utilizado en el tamizaje pues se alcanzó su solubilidad máxima a los niveles ensayados. Debe mencionarse también que el color natural de los extractos fue una limitante en el ensayo colorimétrico descrito por Wang y col. (2004), por lo que se evaluará la posibilidad de utilizar un ensayo diferente para medir la neutralización de la actividad proteolítica en futuros proyectos. Es posible que utilizando una metodología diferente se puedan obtener resultados más precisos con extractos vegetales, por lo que pensamos que no debe descartarse aún la posibilidad que *P. peltatum* y *C. pareira* puedan inhibir el efecto hemorrágico del veneno, el cual es mediado principalmente por metaloproteinasas (Castro et al., 1999). En este contexto, los resultados obtenidos en un estudio anterior de tres plantas de Guatemala (Saravia et al., 2001a) demostraron que los extractos de *D. contrajerva* (etanólico) y *N. lobata* (acuoso) fueron capaces de neutralizar, también pobremente, el efecto hemorrágico del veneno de *B. asper*.

Estudios realizados en Sudamérica han encontrado extractos vegetales con capacidad neutralizante de la actividad proteolítica del veneno de *B. asper* o sus toxinas aisladas, utilizando plantas nativas de Brasil y Colombia principalmente (Núñez et al., 2004; Pereañez et al., 2008; Borges et al., 2000, 2001). Aunque se han encontrado varias plantas con actividad neutralizante del veneno de *B. asper*, existen pocos trabajos que reportan el aislamiento y caracterización de moléculas activas, tales como las macrolobinas (saponinas triterpenoides) (da Silva et al., 2007).

De acuerdo a las nuevas políticas que restringen el uso de animales de laboratorio (Dothel et al., 2013; Nuffield Council on Bioethics, 2005a y b), inicialmente se propuso que los dos extractos que demostraran mayor capacidad neutralizante de uno o ambos efectos in vitro, se evaluarían en cuanto a su capacidad neutralizante del efecto letal del veneno en ratones. Sin embargo, a la luz de los resultados descritos anteriormente, ninguno de los extractos etanólicos calificó para los ensayos in vivo.

En conclusión, al menos tres de las seis plantas evaluadas carecen de factores inhibitorios de proteasas y de enzimas con actividad PLA2. Aunque los extractos

de *S. hyacinthoides*, *P. peltatum* y *C. pareira* demostraron una pobre capacidad neutralizante de estos efectos del veneno, el análisis global de los resultados cuestiona seriamente el uso, al menos de forma individual, de estas plantas para el tratamiento de envenenamientos por mordedura de *B. asper*.

Sin embargo, es importante señalar que en nuestro estudio anterior, a pesar de que las plantas fallaron en neutralizar los principales efectos del veneno, los extractos etanólicos y acuosos de *D. contrajerva* demostraron actividad coagulante intrínseca a dosis relativamente altas (5-2.5 mg). Así mismo, los extractos etanólicos de *N. lobata* y *E. odoratum* demostraron actividad anticoagulante intrínseca a todas las dosis ensayadas (5-0.1 mg), así como una capacidad neutralizante parcial del efecto coagulante (y probablemente la actividad desfibrinogénante) del veneno (Saravia et al., 2001a). Estos hallazgos plantean la posibilidad de que las plantas tamizadas en el presente estudio posean los metabolitos necesarios para neutralizar los efectos del veneno sobre la hemostasia, tales como coagulación, el cual produce desfibrin(ogen)ación (incoagulabilidad) y hemorragia sistémica (Barrantes, Solís, & Bolaños, 1985; Rucavado et al., 2005; Gutiérrez et al., 2009b). Por esta razón, se requiere la implementación de más pruebas de tamizaje antiofídico que permitan establecer un panel completo de ensayos para estudiar, dentro de un marco más amplio, la potencial actividad de los extractos vegetales para neutralizar los efectos fisiopatológicos del veneno de *B. asper*.

Las posibilidades de detectar plantas de uso etnomédico en Guatemala con una mayor capacidad neutralizante de los principales efectos toxicológicos del veneno de *B. asper* también se verán aumentadas conforme se incremente el número de extractos a investigar. Por ejemplo, en el caso del trabajo realizado en Colombia por Otero y col. (2000b) se muestra que únicamente 12 de los 74 extractos investigados neutralizaron la letalidad, y curiosamente, de ellos solo nueve presentaban actividad antifosfolipasa A<sub>2</sub>. En Costa Rica, Castroy col. (1999) estudiaron 48 especies vegetales, de las cuales solo 10 extractos demostraron actividad antihemorrágica. Por ello, debe continuarse con la realización de encuestas etnobotánicas encaminadas no solo a la detección de plantas utilizadas tradicionalmente para el tratamiento de mordeduras de serpiente, sino para conocer de forma más detallada las dosis y recetas tradicionales utilizadas por los curanderos, herbolarios y chamanes del país. Es posible que los extractos de las plantas no tengan un efecto significativo cuando se utilizan de forma individual, pero podrían potenciarse en combinación con otras, lo cual vendría a explicar que tradicionalmente los antídotos están compuestos de la mezcla de varias plantas (Hay, 2002; Pereira, Pereira, Nascimento, Parente & Mors, 1994; Martz, 1992; de Moura et al., 2014).

La información generada en el presente estudio representa una valiosa contribución al enriquecimiento del conocimiento que tenemos sobre nuestros recursos naturales y su uso como alternativas terapéuticas seguras y efectivas a un problema importante de salud que afecta a la población rural del país.

## 5. ACTIVIDADES DE GESTIÓN, VINCULACIÓN Y DIVULGACIÓN

Algunas de estas actividades fueron descritas como parte de los resultados de los Objetivos 4 y 5 del proyecto.

### i. Docencia

Formación y asesoría a un grupo de estudiantes de la carrera de Química Farmacéutica de la Facultad de CCQQ y Farmacia para la realización de su seminario de graduación titulado “*Determinación de la capacidad neutralizante de mezclas de plantas usadas en Guatemala como antídotos para la mordedura de serpiente*”, el cual se desarrollará de forma paralela a este proyecto. Las asesoras seremos Dra. Patricia Saravia y M.Sc. Rosario Hernández de la unidad de Biología Celular (Depto. de Bioquímica, Escuela de Química Biológica) y la Dra. Sully Cruz, Coordinadora del LIPRONAT (Depto. de Farmacognosia y Fitoquímica, Escuela de Química Farmacéutica) de la Facultad de CCQQ y Farmacia (Anexo 12).

Realización del proyecto de investigación semestral de los estudiantes del curso de Bioquímica, carrera de Química, en el cual se evaluaron los extractos acuosos, etanólicos y otras fracciones de diferente polaridad, de las plantas *D. contrajerva* y *N. lobata* en cuanto a las actividades coagulante y anticoagulante detectadas en un tamizaje realizado en un trabajo anterior de nuestro grupo de investigación (Saravia, 2001a). Los estudiantes fueron asesorados en cuanto a las técnicas de colecta (Lic. Max Mérida), extracción de principios activos en diferentes disolventes de polaridad creciente (Licda. Noemí Orozco, Depto. de Química Orgánica, Escuela de Química) y los bioensayos (M.Sc. Rosario Hernández y Br. Gabriela Hernández, unidad de Biología Celular) (Anexo 13).

Presentación de dos conferencias acerca del accidente ofídico, su tratamiento y monitoreo clínico a supervisores y estudiantes las carreras de Química Farmacéutica, Química Biológica y Biología durante las reuniones de inducción que se realizaron antes del inicio del EPS el 01 de diciembre de 2014 (Anexo15).

### ii. Divulgación

Presentación oral de la conferencia titulada “Evaluación de la capacidad neutralizante de extractos de plantas de uso popular en Guatemala para el envenenamiento por mordedura de la serpiente *Bothrops asper*” en la Jornada Científica 2014 de la Facultad de CCQQ y Farmacia, organizada por el IIQB. Septiembre 2014 (Anexo 14).

Elaboración de 300 trifolios informativos sobre el tema, los cuales fueron impresos en DIGI y repartidos a estudiantes de la Facultad de CCQQ y Farmacia que realizarán el EPS durante el 2015, a los hospitales en donde lo realicen, y al Centro de Información y Asesoría Toxicológica (CIAT) de de la misma Facultad (Anexo 16).

### iii. Gestión y vinculación

Se realizaron todas las gestiones administrativas, compra de reactivos, equipo, plásticos, vidrios y descartables.

Durante toda la ejecución del proyecto hubo retraso en las compras de reactivos y descartables, por lo que se realizaron las gestiones necesarias ante diversas unidades de investigación de la Facultad de CCQQ y Farmacia, para obtener en calidad de préstamo los reactivos, descartables y equipo necesarios para realizar los experimentos planificados en el proyecto de acuerdo al cronograma propuesto.

Trámites administrativos para convocar y formalizar la formación de un seminario de graduación compuesto por estudiantes de la carrera de Química Farmacéutica con la participación de asesoras de dos unidades de investigación pertenecientes a diferentes Escuelas de la Facultad (Anexo 12).

Trabajo colaborativo en curso con investigadoras del LIPRONAT de la Facultad de CCQQ y Farmacia (Anexo 12).

Trabajo colaborativo establecido con el Dr. José María Gutiérrez del ICP de la Universidad de Costa Rica. El Dr. Gutiérrez es experto en el tema del ofidismo y tratamiento con antisueros. Como parte de la colaboración se realizó una visita académica al ICP para discusiones científicas con el Dr. Gutiérrez y vinculación realizada para continuar la relación colaborativa establecida (Anexos 9 y 10).

Trámites administrativos para desaduanaje de donación de veneno de serpiente proveniente del ICP (Universidad de Costa Rica) a Guatemala.

Establecimiento de colaboración científica con Licda. Noemí Orozco del Departamento de Química Orgánica, Escuela de Química, Facultad de CCQQ y Farmacia (Anexo 13) a través de la realización del trabajo de investigación de los estudiantes de Bioquímica de la carrera de Química.

Gestión ante la DIGI, para obtener apoyo en el diseño e impresión de los 300 trifolios informativos del proyecto.

Contacto electrónico iniciado con la Dra. Vitelbina Núñez de la Universidad de Antioquia, Colombia. La Dra. Núñez es experta en el tema del ofidismo y validación de plantas con actividad antiofídica.

## 6. CONCLUSIONES

- Ninguna de las plantas estudiadas (*A. hindsii*, *A. maxima*, *C. pareira*, *H. patens*, *P. peltatum* y *S. hyacinthoides*) presentó efectos PLA2 o proteolíticos intrínsecos.
- El extracto etanólico de *Sansevieria hyacinthoides* logró una neutralización pobre (menor del 50%) del efecto PLA2 del veneno de *B. asper*.
- Los extractos etanólicos de *P. peltatum* y *C. pareira* neutralizaron pobremente (menos del 50%) el efecto proteolítico del veneno de *B. asper*.
- Ninguna de las plantas estudiadas calificó para los ensayos de letalidad en ratones.
- El uso aislado de cualquiera de las plantas estudiadas posiblemente resultará ineficaz para contrarrestar los efectos hemorrágico, miotóxico, inflamatorio y letal del veneno de *B. asper*.
- Se establecieron relaciones colaborativas con instituciones nacionales e internacionales dedicadas al estudio de los venenos de serpientes y su tratamiento, a la diversidad vegetal guatemalteca y a la elucidación química de moléculas bioactivas.
- Se realizó una difusión masiva de información concerniente al problema del accidente ofídico en Guatemala y su tratamiento convencional y alternativo.
- Se involucró en el tema de las plantas con actividad antiofídica a dos grupos de estudiantes de las carreras de Química Farmacéutica y Química de la Facultad de CCQQ y Farmacia, quienes le darán continuación a su estudio.
- Se conformó un grupo de trabajo multidisciplinario de investigadores de la Facultad de CCQQ y Farmacia interesados en la validación y aislamiento de biomoléculas activas de plantas guatemaltecas utilizadas tradicionalmente como antiofídicos.



## 7. RECOMENDACIONES

- Continuar realizando encuestas etnobotánicas que permitan recopilar el conocimiento de curanderos y herbolarios sobre el tratamiento del accidente ofídico con antidotos preparados a base de plantas. Esto permitirá la detección de nuevas plantas usadas tradicionalmente en el país y orientará en cuanto a las recetas y formas de tratamiento utilizadas.
- Retomar la determinación botánica de las plantas detectadas en las encuestas etnobotánicas realizadas por nuestro grupo en un estudio anterior, con el fin de proceder a su validación como antiofídicos de manera individual y en las mezclas utilizadas en las recetas tradicionales del país.
- Realizar las gestiones correspondientes para la adquisición de un liofilizador apropiado para este tipo de estudios. Esto permitirá conseguir la disolución completa de mayores dosis de extractos vegetales sin la adición de grandes cantidades de detergentes tóxicos que luego no podrían utilizarse en experimentos in vivo.
- Dada la complejidad de la composición del veneno de *B. asper* y los efectos fisiopatológicos que produce, debe ampliarse el panel de tamizaje de actividad antiofídica en extractos vegetales mediante la implementación de pruebas de neutralización de los efectos del veneno sobre la hemostasia, producción de edema y mitotoxicidad.
- De acuerdo a las nuevas políticas que restringen el uso de animales de laboratorio, deberán buscarse metodologías in vitro o poco invasivas in vivo, para el tamizaje preliminar de la capacidad neutralizante de extractos vegetales. Para ello, se recomienda la asesoría de un experto.
- Divulgar los resultados obtenidos en estudios como este, dentro de la comunidad científica y en las comunidades en donde las plantas evaluadas son utilizadas en el tratamiento de la mordedura de serpiente.
- Continuar trabajando en esta línea de investigación, ya que el análisis de un mayor número de extractos en un panel de tamizaje más completo, permitirá la detección de plantas con actividad antiofídica, así como el aislamiento de principios activos. Para ello, deberá aprovecharse la infraestructura ya creada en el presente estudio como un punto de partida.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar Girón, J. I. (1966). *Aspectos de la flora útil de Guatemala*. Guatemala, Tipografía Nacional, pp. 348-369.
- Alam, M. I., Auddy, B., & Gomes, A. (1994). Isolation, purification and partial characterization of viper venom inhibiting factor from the root extract of the indian medicinal plant sarsaparilla (*Hemidesmus indicus* R. Br.). *Toxicon*, *34*, 1551-1557.
- Alape-Girón, A., Sanz, L., Escolano, J., Flores-Díaz, M., Madrigal, M., Sasa, M., & Calvete, J. (2008). Snake venomomics of the lancehead pitviper *Bothrops asper*: geographic, individual, and ontogenic variations. *Journal of Proteome Research*, *7*, 3556-3571.
- Alape-Girón, A., Flores-Díaz, M., Sanz, L., Madrigal, M., Escolano, J., Sasa, M., & Calvete, J. (2009). Studies on the venom proteome of *Bothrops asper*: perspectives and applications. *Toxicon*, *54*, 938-48.
- Angulo, Y., & Lomonte, B. (2009). Biochemistry and toxicology of toxins purified from the venom of the snake *Bothrops asper*. *Toxicon*, *54*, 949-957.
- Batina, M., Cintra, A. C., Veronese, E. L., Lavrador, M. A., Giglio, J. R., Pereira, P. S., ... Sampaio, S., V. (2000). Inhibition of the lethal and myotoxic activities of *Crotalus durissus terrificus* venom by *Tabernaemontana catharinensis*: identification of one of the active components. *Planta Medica*, *66*, 424-428.
- Bailey, G. (Ed.). (1998). *Enzymes from snake venom*. Fort Collins, Colorado: Alaken Inc.
- Barrantes, A., Solis, V., & Bolaños, R. (1985). Alterations in the coagulation mechanisms of patients bitten by *Bothrops asper* (Terciopelo). *Toxicon*, *23*, 399-407.
- Borges, M. H., Soares, A. M., Rodrigues, V. M., Andrião-Escarso, S. H., Diniz, H., Hamaguchi, A., ... Homsí-Brandeburgo, M. L. (2000). Effects of aqueous extract of *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) on actions of snake and bee venom and on activity of phospholipases A<sub>2</sub>. *Comparative Biochemistry and Physiology – Part B: Biochemistry & Molecular Biology*, *27*, 21-30.
- Borges, M. H., Soares, A. M., Rodrigues, V. M., Oliveira, F., Fransheschi, A. M., Rucavado, A., ... Homsí-Brandeburgo, J. R. (2001). Neutralization of proteases from *Bothrops* snake venoms by the aqueous extracto from *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae). *Toxicon*, *39*, 1863-1869.
- Borgarín, G., Segura, E., Durán, G., Lomonte, B., Rojas, G., & Gutiérrez, J. M. (1995). Evaluación de la capacidad de cuatro antivenenos comerciales para neutralizar el veneno de *Bothrops asper* (terciopelo) de Costa Rica. *Toxicon*, *33*, 1242-1245.
- Cáceres, A. (2009). *Vademecum Nacional de Plantas Medicinales*. Guatemala. MSPAS/USAC.
- Campbell, J. A. & Lamar, W. W. (1989). *The Venomous Reptiles of Latin America*. Ithaca: Cornell University Press, 452p.
- Campbell, J. A. (1999). *Amphibians and Reptiles of Northern Guatemala, the Yucatán, and Belize*. Norman: University of Oklahoma Press.

- 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 PLA<sub>2</sub>s inhibitors isolated from Brazilian plants: synthetic and natural molecules. *BioMed Research International*, 2013, 153045 doi: 10.1155/2013/153045
- Castrillón-Estrada, D. F., Acosta, J. G., Hernández-Ruíz, E. A., & Alonso, L. M. (2007). Envenenamiento ofídico. *Salud Uninorte*, 23, 96-111.
- 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), 597-607.
- Coe, F. G. & Anderson, G., J. (2005). Snakebite ethnopharmacopoeia of Eastern Nicaragua. *Journal of Ethnopharmacology*, 96, 303-323.
- da Silva, J. O., Fernandes, R. S., Ticli, F. K., Oliveira, E. K., Mazzi, M. V., Franco, J. J., ... Sampaio, S. V. (2007). Triterpenoid saponins, new metalloproteinase snake venom inhibitors isolated from *Pentaclethra maculosa*. *Toxicon*, 50, 283-291.
- de Moura, V. M., Serra, A. N., Veras, R. H., Varjão, J. L., Almeida, J. D., de Sousa R. L., ... 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.
- Dieseldorff, E. P. (1977). Las plantas medicinales del Departamento de Alta Verapaz. Guatemala, Tipografía Nacional, 52 p.
- 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.
- Dothel, G., Vasina, V., Barbara, G., & De Ponti, F. (2013). Animal models of chemically induced intestinal inflammation: Predictivity and ethical issues. *Pharmacology & Therapeutics*, 139, 71-86.
- España. Ministerio de Sanidad y Consumo., Agencia Española del Medicamento., & Boletín Oficial del Estado (España). (2002). *Real Farmacopea Española: Publicada por el Ministerio de Sanidad y Consumo, por mandato de la ley 25/1990, de 20 de diciembre, del Medicamento*. (2ª ed.). Madrid: Ministerio de Sanidad y Consumo.
- Fan, H. W. & Cardoso, J. L. (1995). Clinical toxicology of snake bites in South America. In J. Meier, & J. White (Eds). *Handbook of clinical toxicology of animal venoms and poisons* (pp 667-688). Boca Raton: CRC Press.
- Girón, L. M., Freire, V., Alonzo, A., & Cáceres, A. (1991). Ethnobotanical survey of the medicinal flora used by the Caribs of Guatemala. *Journal of Ethnopharmacology*, 34, 173-187.
- Gupta, Y. K. & Peshin, S. S. (2012). Do Herbal Medicines Have Potential for Managing Snake Bite Envenomation? *Toxicology International*, 19, 89-99.
- Gutiérrez, J. M. (1995). Clinical toxicology of snakebite in Central America. In J. Meier, & J. White (Eds). *Handbook of clinical toxicology of animal venoms and poisons* (pp 645-665). Boca Raton: CRC Press.
- 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. (Ed.) (2009). *Bothrops asper*: beauty and peril in the Neotropics. *Toxicon*, 54, 901-903.
- Gutiérrez, J. M. (2010). Snakebite Envenomation in Central America. In S. Mackessy. *Handbook of Venoms and Toxins of Reptiles* (pp. 492-505). Boca Raton: CRC Press.
- 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*, 84C, 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, 1127-1129.
- Gutiérrez, J. M. & Rucavado, A. (2000). Snake venom metalloproteinases: their role in the pathogenesis of local tissue damage. *Biochimie*, 82, 841-850.
- Gutiérrez, J. M., Rucavado, A., Chaves, F., Díaz, C., & Escalante, T. (2009a) Experimental pathology of local tissue damage induced by *Bothrops asper* snake venom. *Toxicon*, 54, 958-975.
- Gutiérrez, J. M., Escalante, T., & Rucavado, A. (2009b). Experimental pathophysiology of systemic alterations induced by *Bothrops asper* snake venom. *Toxicon*, 54, 976-987.
- Gutiérrez, J. M., Warrell, D. A., Williams, D. J., Jensen, S., Brown, N., Calvete, J., & Harrison, R. (2013a). The need for gull integration of snakebite envenoming within a global strategy to combat the neglected tropical diseases: The way forward. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 7(6): e2162. doi: 10.1371/journal.pntd.0002162.
- Gutiérrez, J. M., Tsai, W. C., Pla, D., Solano, G., Lomonte, B., Sanz, L., ... Calvete, J. J. (2013b). Preclinical assessment of a polyspecific antivenom against the venoms of *cerrophidion sasai*, *Porthidium nasutum* and *Porthidium ophymegas*: insights from combined antivenomics and neutralization assays. *Toxicon*, 64, 60-69.
- Harwood, L. M. & Moody, C. J. (1989). *Experimental organic chemistry: Principles and Practice*. Wiley-Blackwell, 778 p.
- 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, USAC-SCD-IRD, 60 p.
- Heinrich, M., Chan, J., Wanke, S., Neinhuis, C., & Simmonds, M. S. J. (2009). Local uses of *Aristolochia* species and content of nephrotoxic aristolochic acid 1 and 2 – A global assessment based on bibliographic sources. *Journal of Ethnopharmacology*, 125, 108-144.
- Kuklinski, C. (2000). *Farmacognosia. Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural*. Barcelona: Omega.
- Lomonte, B. & Gutiérrez, J. M. (1983). La actividad proteolítica de los venenos de serpientes de Costa Rica sobre la caseína. *Revista de Biología Tropical*, 31, 37-40.

- 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*, 1012-1028.
- Lomonte, B., Rey-Suárez, P., Tsai, W. Ch., Angulo, Y., Sasa, M., Gutiérrez, J. M., & Calvete, J. J. (2012). Snake venomomics of the pit vipers *Porthidium nasutum*, *Porthidium ophryomegas*, and *Cerrophidion godmani* from Costa Rica: Toxicological and taxonomic insights. *Journal of Proteomics*, *75*, 1675-1689. doi: 10.1016/j.jprot.2011.12.016.
- Martz, W. (1992). Plants with a reputation against snakebite. *Toxicon*, *30*, 1131-1142.
- Melo, P. A. & Ownby, C. L. (1999). Ability of wedelolactone, heparin, and para-bromophenacyl bromide to antagonize the myotoxic effects of two crotaline venoms and their PLA2 myotoxins. *Toxicon*, *37*, 199-215.
- Molander, M., Saslis-Lagoudakis, C. H., Jager, A. K., & Ronsted, N. (2012). Cross-cultural comparison of medicinal floras used against snakebites. *Journal of Ethnopharmacology*, *139*, 863-872.
- Morales, C. A. (2012). Guía de animales ponzoñosos de Guatemala: Manejo del paciente intoxicado (Tesis de Licenciatura). Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.
- Morton, J. F. (1977). Some folk-medicine plants of Central America markets. *International Journal of Crude Drug Research*, *15*, 165-192.
- Morton, J. F. (1981) *Atlas of Medicinal Plants of Middle America*. Springfield: Charles C. Thomas.
- Nuffield Council on Bioethics (2005a). Chapter 3. Ethical issues raised by animal research. En *The ethics of research involving animals* (pp 31-58). London, Nuffield Council on Bioethics.
- Nuffield Council on Bioethics (2005b). Chapter 8. The use of animals for research in the pharmaceutical industry. En *The ethics of research involving animals* (pp 131-152). London, Nuffield Council on Bioethics.
- Núñez, V., Otero, R., Barona, J., Saldarriaga, M., Osorio, R. G., Fonnegra, R., ... 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*, 969-977.
- Núñez, V., Castro, V., Murillo, R., Ponce-Soto, L., Merfort, I., & Lomonte, B. (2005). Inhibitory effects of *Piper umbellatum* and *Piper peltatum* extracts towards myotoxic phospholipases A<sub>2</sub> from *Bothrops* snake venoms: isolation of 4-nerolidylcatechol as active principle. *Phytochemistry*, *66*, 1017-1025.
- Orellana, S. L. (1987). *Indian Medicine in Highland Guatemala*. Albuquerque, University of New Mexico, 308 p.
- Otero, R., Fonnegra, R., Jiménez, S. L., Núñez, V., Evans, N., Alzate, S. P., ... Vélez, H. N. (2000a). Snakebites and ethnobotany in the northwest region of Colombia Part I: Traditional use of plants. *Journal of Ethnopharmacology*, *71*, 493-504.

- 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.
- Otero, R., Núñez, V., Barona, J., Fonnegra, R., Jiménez, S. L., Osorio, R. G., ... Díaz, A. (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*, 233-241.
- Patiño, A. C., López, J., Aristizábal, M., Quintana, J. C., & Benjumea, D. (2012). Efecto inhibitorio de extractos de *Renealmia alpinia* Rottb. Maas (*Zingiberaceae*) sobre el veneno de *Bothrops asper* (mapaná). *Biomédica*, *32*, 365-374.
- Pereañez, J. A., Jiménez, S., Quintana, J. C., Núñez, V., Fernández, M., & Restrepo, Y. (2008). Inhibición de las actividades proteolítica, coagulante y hemolítica indirecta inducidas por el veneno de *Bothrops asper* por extractos etanólicos de tres especies de Heliconias. *Vitae*, *15*, 157-164.
- Pereira, N. A., Pereira, B. M., Nascimento, M. C., Parente, J. P., & Mors W. B. (1994). Pharmacological screening of plants recommended by folk medicine as snake venom antidotes; IV. Protection against *Jararaca* venom by isolated constituents. *Planta Medica*, *60*, 99-100.
- Rojas, E., Saravia, P., Angulo, Y., Arce, V., Lomonte, B., Chávez, J.J., ... & Gutiérrez, J.M. (2001). Venom of the crotaline snake *Atropoides nummifer* (jumping viper) from Guatemala and Honduras: comparative toxicological characterization, isolation and myotoxic phospholipase A<sub>2</sub> homologue and neutralization by two antivenoms. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part C: Toxicology & Pharmacology*, *129*, 151-162.
- Rucavado, A., Soto, M., Escalante, T., Loría, G. D., Arni, 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*, 123-131.
- 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.
- Saravia, P., Cáceres, A., Velásquez, R., & Lara, O. (2001a) Plantas con actividad antiofídica en Guatemala. I. Identificación y evaluación de su capacidad neutralizante (Proyecto FODECYT 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*, 401-405.
- Saravia, P., Rojas, E., Arce, V., Guevara, C., López, J. C., Chaves, E., ... Gutiérrez, J. M. (2002). Geographic and ontogenic variability in the venom of the neotropical rattlesnake *Crotalus durissus*: pathophysiological and therapeutic implications. *Revista de Biología Tropical*, *50*, 337-346.

- Standley, P. C. & Williams, L. O. (1975). Flora de Guatemala. *Fieldiana: Botany*, 24(11),91.
- Standley, P. C. & Steyermark, J. A. (1946a). Flora de Guatemala. *Fieldiana: Botany*, 24(4), 93.
- Standley, P. C. & Steyermark, J. A. (1946b). Flora de Guatemala. *Fieldiana: Botany*, 24(4), 260.
- Standley, P. C. & Steyermark, J. A. (1952a). Flora de Guatemala. *Fieldiana: Botany*, 24(5), 3-4.
- Standley, P. C. & Steyermark, J. A. (1952b). Flora de Guatemala. *Fieldiana: Botany*, 24(5), 80-81.
- Standley, P. C. & Steyermark, J. A. (1952c). Flora de Guatemala. *Fieldiana: Botany*, 24(5), 275-281.
- Sosa, S., Balick, M. J., Arvigo, R., Esposito, R. G., Pizza, C., Altinier, G., & Tubaro, A. (2002). Screening of the topical anti-inflammatory activities of some Central American plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 81, 211-215.
- Wang, W., Shih C., & Huang, T. (2004). A novel P-I class metalloproteinase with broad substrate-cleaving activity, agkislysin, from *Agkistrodon acutus* venom. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 324, 224-230.
- Williams, D., Gutierrez, J. M., Harrison, R., Warrell, D. A., White, J., Winkel, K. D., ... International Society on Toxicology. (2010). The Global Snake Bite Initiative: and antidote for snake bite. *Lancet* 375, 89-91.
- Willoughby, M. J., Mills, S., & British Herbal Medicine Association. (1996). *British herbal pharmacopoeia, 1996*. Exeter, England: British Herbal Medicine Association.
- WHO (2007). Rabies and envenomings, a neglected public health issue: report of a consultative meeting. ISBN: 978 92 4 156348 2

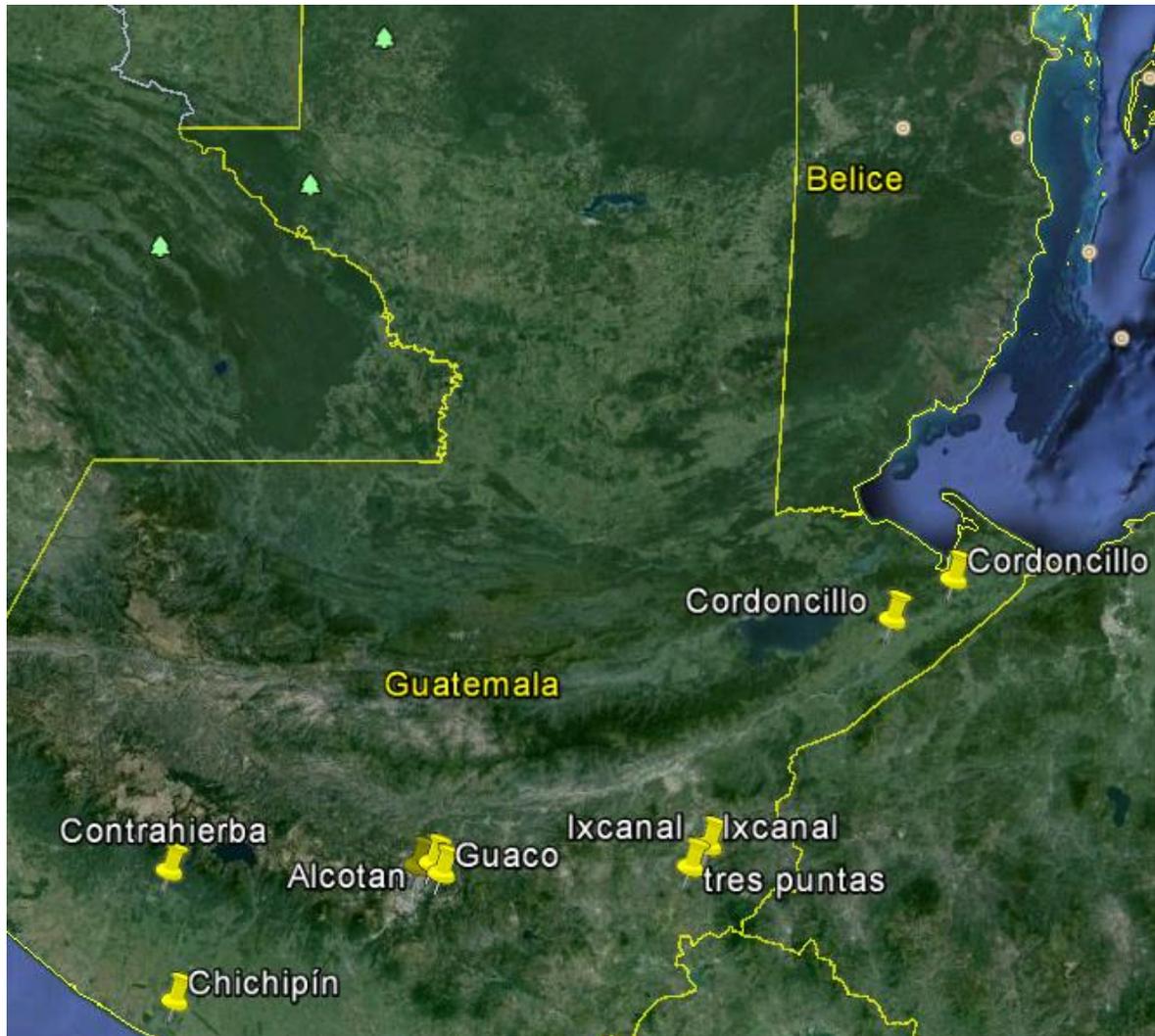
## 9. ANEXOS

### LISTADO DE ANEXOS

- Anexo 1. Figura 1. Mapa de recolección de especies vegetales.
- Anexo 2. Cuadro 1. Resumen de la información utilizada para seleccionar las plantas del estudio.
- Anexo 3. Procedimientos operativos estándar (POEs)
- Anexo 4. Fichas técnicas de plantas evaluadas en el estudio.
- Anexo 5. Tabla 5. Actividad fosfolipasa A<sub>2</sub> del veneno de *B. asper*
- Anexo 6. Tabla 6. Determinación de la actividad proteolítica sobre azocaseína del veneno de *B. asper*
- Anexo 7. Determinación de los espectros de absorción de extractos vegetales para realización del ensayo de actividad proteolítica sobre azocaseína
- Anexo 8. Carta de donación de veneno
- Anexo 9. Certificado visita académica al ICP, abril 2014
- Anexo 10. Certificado colaboración-vinculación Dr. Gutiérrez
- Anexo 11. Tabla 7. Material colectado por estudiantes de la carrera de Química Farmacéutica para realizar su seminario de graduación
- Anexo 12. Carta inicio seminario de graduación estudiantes de la carrera de Química Farmacéutica. Vinculación Unidad de Biología Celular con LIPRONAT
- Anexo 13. Trabajo de investigación estudiantes de Bioquímica, Química
- Anexo 14. Diploma de presentación oral en Semana Científica de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Instituto de Investigaciones Químicas y Biológicas, IIQB, septiembre 2014
- Anexo 15. Diplomas conferencias dictadas a estudiantes que iniciaron Ejercicio Profesional Supervisado (EPS) durante el primer semestre del 2015. Carreras: Química Biológica y Química Farmacéutica
- Anexo 16. Trifoliar informativo entregado a supervisores de EPS y Directora del CIAT
- Anexo 17. Análisis estadístico
- Anexo 18. Fotografías

## Anexo 1

Figura 1. Mapa de recolección de especies vegetales.



Los pines amarillos indican las diferentes regiones en las cuales se llevó a cabo la recolección de las especies vegetales utilizadas en el presente estudio.  
Elaborado por....

## Anexo 2

Cuadro 1. Resumen de la información utilizada para seleccionar las plantas del estudio.

Familia	Nombre científico	Nombre común	Parte colectada	Parte recomendada para su uso como antiofídico	Referencia
<b>Aristolochiaceae</b>	<i>Aristolochia máxima</i> * <i>A. serpentaria</i>	Guaco, canastilla, tecolotillo.	Hoja y corteza	Raíz y tallo (1). Corteza y hojas (2). Raíz (3*)	(1) Heinrich, M., Chan, J., Wanke, S., Neinhuis, C., & Simmonds, M. (2009). Local uses of <i>Aristolochia</i> species and content of nephrotoxic aristolochic acid 1 and 2- A global assessment based on bibliographic sources. <i>Journal of Ethnopharmacology</i> , 125, 108-144. (2) Hay, Y., Cleaves, C., & Cáceres, A. (sf). Medicinal plants used to heal snakebites in Guatemala, Universidad de San Carlos de Guatemala, 2-4 pp. (3) Mors, W. B., do Nascimento, M. C., Ruppelt, B. M., & Alvarez, N. (2000). Plant natural products active against snake bite- the molecular approach. <i>Phytochemistry</i> , 55, 627-642.
<b>Leguminosaeae</b>	<i>Acacia hinsdi</i> * <i>A. catechu</i> , <i>A. farnesiana</i> , <i>A. leucophloea</i> y <i>A. polycantha</i> . ** <i>A. bresvispica</i> , <i>A. catechu</i> y <i>A. polyacantha</i> .	Ixcanal, subín, cutupito, iscanal negro, cachito, guascanal.	Corteza	Corteza y raíz (1* y 2**).	(1) Mors, W. B., do Nascimento, M. C., Ruppelt, B. M., & Alvarez, N. (2000). Plant natural products active against snake bite- the molecular approach. <i>Phytochemistry</i> , 55, 627-642. (2) Hay, Y., Cleaves, C., & Cáceres, A. (sf). Medicinal plants used to heal snakebites in Guatemala, Universidad de San Carlos de Guatemala, 2-4 pp.
<b>Liliaceae</b>	<i>Sansevieria hyacinthoides</i> * <i>Sansevieria spp.</i> y <i>S. guineensis</i> .	Oreja de burro, curarina, espada de Judas, espada del diablo.	Hoja	Hoja (1*).	(1) Hay, Y., Cleaves, C., & Cáceres, A. (sf). Medicinal plants used to heal snakebites in Guatemala, Universidad de San Carlos de Guatemala, 2-4 pp.

Familia	Nombre científico	Nombre común	Parte colectada	Parte recomendada para su uso como antiofídico	Referencia
<b>Menispermaceae</b>	<i>Cissampelos pareira</i>	Alcotán, curarina, curarina del monte, bejuco de la peñada, estrella de la peñada.	Raíz	Hojas, raíz y toda la planta (1). Raíz (2).	(1) Coe, F.G., & Anderson, G. T. (2005). Snakebite ethnopharmacopoeia of Eastern Nicaragua. <i>Journal of Ethnopharmacology</i> , 96, 303-323. (2) Hay, Y., Cleaves, C., & Cáceres, A. (sf). Medicinal plants used to heal snakebites in Guatemala, Universidad de San Carlos de Guatemala, 2-4 pp.
<b>Piperaceae</b>	<i>Piper peltatum</i>	Santa maría, cordoncillo, ombligo.	Hoja	Toda la planta (1). Hoja (2).	(1) Coe, F.G., & Anderson, G. T. (2005). Snakebite ethnopharmacopoeia of Eastern Nicaragua. <i>Journal of Ethnopharmacology</i> , 96, 303-323. (2) Hay, Y., Cleaves, C., & Cáceres, A. (sf). Medicinal plants used to heal snakebites in Guatemala, Universidad de San Carlos de Guatemala, 2-4 pp.
<b>Rubiaceae</b>	<i>Hamelia patens</i>	Chichipín, hierba del cáncer, cuetillo, sisipince, clavito, flor de cangrejo, canuto y hierba de erisipela	Hoja	Hoja y toda la planta (1). Hoja (2).	(1) Coe, F.G., & Anderson, G. T. (2005). Snakebite ethnopharmacopoeia of Eastern Nicaragua. <i>Journal of Ethnopharmacology</i> , 96, 303-323. (2) Hay, Y., Cleaves, C., & Cáceres, A. (sf). Medicinal plants used to heal snakebites in Guatemala, Universidad de San Carlos de Guatemala, 2-4 pp.

### **Anexo 3**

#### **Procedimientos operativos estándar (POEs)**

- 1. Disolución de extractos vegetales para pruebas in vitro.**
- 2. Determinación de actividad fosfolipasa A<sub>2</sub>.**
- 3. Determinación de actividad proteolítica por degradación de azocaseína.**

**PROCEDIMIENTO ESTÁNDAR DE OPERACIÓN –PEO–**  
**DISOLUCIÓN DE EXTRACTOS VEGETALES PARA PRUEBAS IN VITRO**

FECHA DE EMISIÓN:	FECHA DE APROBACIÓN:	PEO NO.:
ELABORADO POR:	Firma:	Reemplaza:
REVISADO POR:	Firma:	Páginas:3
APROBADO POR:	Firma:	

**I. OBJETIVO**

Establecer el procedimiento estándar para la disolución de extractos vegetales en solventes orgánicos para la realización de pruebas in vitro.

**II. POLÍTICA**

Es la política del LAP contar con procedimientos escritos de distintas técnicas, que describan con detalle la forma correcta de cada una de las operaciones que se efectúan, de manera que sirvan de referencia al personal que debe realizarlas.

**III. RESPONSABLE**

Auxiliar de investigación del LAP.

**IV. MATERIALES Y REACTIVOS**

- Guantes de látex
- Papel mayordomo
- Espátulas de acero (limpia)
- Marcador permanente de punta fina
- Gradilla para tubos
- Tips azules de 1000 µL
  
- Varilla de agitación
- Tubos cónicos FALCON de 15 y 50 ml
- Jeringas de 10ml
- Microtubos
- Filtrosacrodisco de 0.2 µM.
  
- Micropipeta de 100 a 1000 µL
- Balanza analítica
- Vortex
- Baño de maría
- Sonicador
  
- Tween-80
- PBS 1X

**V. PROCEDIMIENTO**

**A. Para ensayo actividad fosfolipasa A<sub>2</sub>:**

1. Encender baño de maría y ajustar temperatura a 37°C.
2. Colocar sobre balanza analítica un beaker y sobre este colocar un tubo FALCON de 15 ml identificado con el nombre del extracto a pesar y tarar.

3. Con la ayuda de una espátula limpia (limpiar con etanol al 70% antes de pesar y entre extractos) tomar la mayor cantidad del extracto y colocarlo dentro del tubo tratando de dejarlo hasta el fondo. Agregar extracto hasta llegar al peso necesario y anotar.
4. Agregar el volumen necesario de Tween-80 para obtener una concentración final de 5% v/v.
5. Adicionar la mitad del volumen de PBS 1X a utilizar.
6. Agitar el vortex hasta lograr disolver la mayor cantidad del extracto.
7. Agregar el volumen restante de PBS 1X y agitar nuevamente en vortex.
8. Calentar en baño de maría por 30 minutos agitando con varilla de agitación.
9. Sonicar por 15 minutos.
10. Colocar nuevamente en baño de maría por 30 minutos, sin agitar.
11. Centrifugar por 15 minutos a 2,500 rpm.
12. Separar el sobrenadante colocándolo en otro tubo debidamente identificado.
13. Filtrar la disolución obtenida utilizando una jeringa de 10 ml y un filtro.
14. Guardar en el congelador alícuotas de 1.2 ml en microtubos estériles.

***B. Para ensayo actividad proteolítica:***

1. Encender baño de maría y ajustar temperatura a 37°C.
2. Colocar sobre balanza analítica un beaker y sobre este colocar un tubo FALCON de 50 ml identificado con el nombre del extracto a pesar y tarar.
3. Con la ayuda de una espátula limpia (limpiar con etanol al 70% antes de pesar y entre extractos) tomar una cantidad suficiente del extracto y colocarlo dentro del tubo tratando de dejarlo hasta el fondo. Agregar extracto hasta llegar al peso necesario y anotar.
4. Agregar el volumen necesario de Tween-80 para obtener una concentración final de 10% v/v.
5. Adicionar la mitad del volumen de PBS 1X a utilizar.
6. Agitar el vortex hasta lograr disolver la mayor cantidad del extracto.
7. Calentar en baño de maría por 30 minutos agitando con varilla de agitación.
8. Sonicar por 15 minutos.
9. Colocar nuevamente en baño de maría por 30 minutos, sin agitar.
10. Agregar el volumen restante de PBS 1X.
11. Sonicar por 15 minutos.
12. Colocar nuevamente en baño de maría por 30 minutos, sin agitar.
13. Centrifugar por 15 minutos a 2,500 rpm.
14. Separar el sobrenadante colocándolo en otro tubo debidamente identificado.
15. Filtrar la disolución obtenida utilizando una jeringa de 10 ml y un filtro.
16. Guardar en el congelador alícuotas de 1.2 ml en microtubos estériles.

**PROCEDIMIENTO ESTÁNDAR DE OPERACIÓN –PEO-  
DETERMINACIÓN ACTIVIDAD FOSFOLIPASA A<sub>2</sub>**

FECHA DE EMISIÓN:	FECHA DE APROBACIÓN:	PEO NO.:
ELABORADO POR:	Firma:	Reemplaza:
REVISADO POR:	Firma:	Páginas:5
APROBADO POR:	Firma:	

**I. OBJETIVO**

Establecer el procedimiento estándar para determinar la presencia de actividad fosfolipasa A<sub>2</sub> en veneno de serpiente y extractos vegetales

**II. POLÍTICA**

Es la política del LAP contar con procedimientos escritos de distintas técnicas, que describan con detalle la forma correcta de cada una de las operaciones que se efectúan, de manera que sirvan de referencia al personal que debe realizarlas.

**III. RESPONSABLE**

Auxiliar de investigación del LAP.

**IV. MATERIALES Y REACTIVOS**

**Material descartable**

- Guantes de látex
- Papel mayordomo
- Espátulas de acero (limpias)
- Marcador permanente de punta fina
- Agitadores magnéticos
- Tapones de hule para tubos de ensayo
- Gradilla para tubos de ensayo
- Tips amarillos de 10 a 100 µl
- Tips azules de 100 a 1000 µl
- Papel parafilm

**Cristalería y material de laboratorio**

- Probetas de vidrio (25, 50 y 100 ml).
- Balones aforados (100, 250 y 1000 ml).
- Beakers (250, 500 ml).
- Frascos de vidrio con tapón de rosca (50, 250, 500 y 1000 ml).
- Pipetas de vidrio de 2, 5 y 10 ml.
- Tubos de vidrio con capacidad para 15 ml.
- Tubos de vidrio con capacidad para 10 ml.
- Varilla de agitación.

**Equipo**

- Potenciómetro.
- Balanza analítica.
- Micropipetas de volumen variable (10 a 100 µl y 100 a 1000 µl).
- Pipetor.
- Vortex.
- Baño María

- Estufa con agitación magnética

#### **Reactivos**

- Trisma base
- Cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2$ )
- Tritón X-100
- Alcohol isopropílico (2 propanol).
- Heptano (n – heptano).
- Ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ )
- Azul de timol
- Etanol absoluto
- Hidróxido de sodio (NaOH)

#### **Material biológico**

- Veneno de serpiente (*Bothrops asper*).
- Huevos frescos.
- Extractos vegetales disueltos.

## **V. PROCEDIMIENTO**

### **METODOLOGÍA**

Antes de iniciar cada ensayo calcular la cantidad de reactivos a utilizar y revisar las existencias de los mismos.

#### **A. *Determinación dosis reto de veneno***

1. En un tubo de vidrio de 15 ml previamente identificado agregar 100  $\mu\text{L}$  de cada una de las diluciones de veneno a ensayar (se recomienda utilizar las siguientes dosis: 1.562, 3.125, 6.25, 12.5, y 25  $\mu\text{g}$  de veneno), e incubar a 37 °C en baño María por 2-3 min. Evaluar cada dilución por triplicado. Ensayar un control negativo (blanco): tubo con 100  $\mu\text{L}$  de PBS, evaluar de igual forma por triplicado.
2. Agregar 1 mL de solución de sustrato (a temperatura ambiente y previamente homogenizada) a los triplicados, dejando pasar un minuto al agregar la solución entre cada dosis como se explica a continuación:  
Poner a correr el tiempo al agregar la solución al primer tubo de los triplicados de la primera dilución, servir los dos restantes y esperar hasta que se cumpla el minuto 1 para agregar la solución a los triplicados de la siguiente dilución y así sucesivamente hasta servir todos los triplicados de las diluciones a ensayar.
3. Incubar la mezcla por 20 minutos exactos a 37°C en un baño María.
4. Cumplido el tiempo de incubación, agregar 5 ml de la mezcla de extracción, tapan con tapón de goma y agitar vigorosamente en el vortex por 20 - 30 segundos.
5. Dejar reposar por 10 minutos a TA.
6. Agregar 2 ml de n – heptano y 3 ml de agua destilada.
7. Mezclar por inversión, dejar que se separen las dos fases.
8. Transferir 2 ml de la fase superior a un tubo de vidrio de 10 ml previamente identificado.
9. Agregar 1 ml de la mezcla de titulación.
10. Mezclar por vortex 5 – 10 segundos y titular con volúmenes de 20  $\mu\text{l}$  de NaOH 0.018 N hasta observar un viraje de color de amarillo a verde.
11. Cuantificar el volumen de NaOH utilizado para la titulación en cada muestra. Restar el volumen utilizado en la titulación del control negativo/blanco (PBS).
12. Expresar la actividad en términos de  $\mu\text{Eq}$  por concentración de veneno. Se saca un valor promedio de los datos obtenidos de los triplicados.
13. Realizar los cálculos de acuerdo a la fórmula descrita en anexos para expresar la actividad fosfolipasa  $A_2$  en  $\mu\text{Eq}/\text{mg}\cdot\text{min}$

14. Graficar en eje X la concentración de veneno o extracto ( $\mu\text{g}/0.1 \text{ m l} = \mu\text{g}$  totales del veneno o extracto) añadidos y en eje Y la actividad fosfolipasa  $A_2$  expresada en  $\mu\text{Eq}/\text{mg}\cdot\text{min}$ .
15. Se reporta como dosis mínima con actividad fosfolipasa  $A_2$  a la menor dosis de veneno que se requiere para alcanzar la máxima actividad fosfolipasa  $A_2$ . Para calcular la dosis reto en los ensayos de neutralización se selecciona una dosis sub-mínima.

### **B. Ensayos dosis – respuesta.**

1. En un tubo de vidrio de 15 ml previamente identificado agregar 100  $\mu\text{L}$  de cada una de las soluciones a ensayar (diluciones de extractos o mezclas de extractos) e incubar a 37 °C en baño María por 2-3 min. Evaluar cada dilución por triplicado. Ensayar un control negativo (blanco): tubo con 100  $\mu\text{L}$  de PBS, evaluar de igual forma por triplicado y control positivo dosis reto veneno.
2. Agregar 1 mL de solución de sustrato (a temperatura ambiente y previamente homogenizada) a los triplicados, dejando pasar un minuto al agregar la solución entre cada dosis como se explica a continuación:  
Poner a correr el tiempo al agregar la solución al primer tubo de los triplicados de la primera dilución, servir los dos restantes y esperar hasta que se cumpla el minuto 1 para agregar la solución a los triplicados de la siguiente dilución y así sucesivamente hasta servir todos los triplicados de las diluciones a ensayar.
3. Incubar la mezcla por 20 minutos exactos a 37°C en un baño María.
4. Cumplido el tiempo de incubación, agregar 5 ml de la mezcla de extracción, tapar con tapón de goma y agitar vigorosamente en el vortex por 20 - 30 segundos.
5. Dejar reposar por 10 minutos a TA.
6. Agregar 2 ml de n – heptano y 3 ml de agua destilada.
7. Mezclar por inversión, dejar que se separen las dos fases.
8. Transferir 2 ml de la fase superior a un tubo de vidrio de 10 ml previamente identificado.
9. Agregar 1 ml de la mezcla de titulación.
10. Mezclar por vortex 5 – 10 segundos y titular con volúmenes de 20  $\mu\text{l}$  de NaOH 0.018 N hasta observar un viraje de color de amarillo a verde.
11. Cuantificar el volumen de NaOH utilizado para la titulación en cada muestra. Restar el volumen utilizado en la titulación del control negativo/blanco (PBS).
12. Expresar la actividad en términos de  $\mu\text{Eq}$  por concentración de muestra (veneno, extracto, mezcla veneno extracto). Se saca un valor promedio de los datos obtenidos de los triplicados.
13. Realizar los cálculos de acuerdo a la fórmula descrita en anexos para expresar la actividad fosfolipasa  $A_2$  en  $\mu\text{Eq}/\text{mg}\cdot\text{min}$
14. Graficar en eje X la concentración de veneno o extracto ( $\mu\text{g}/0.1 \text{ m l} = \mu\text{g}$  totales del veneno o extracto) añadidos y en eje Y la actividad fosfolipasa  $A_2$  expresada en  $\mu\text{Eq}/\text{mg}\cdot\text{min}$ .
15. Se reporta como dosis mínima con actividad fosfolipasa  $A_2$  a la menor dosis de veneno que se requiere para alcanzar la máxima actividad fosfolipasa  $A_2$ . Para calcular la dosis reto en los ensayos de neutralización se selecciona una dosis sub-mínima.

### **C. Ensayos de neutralización**

1. Se preparan mezclas veneno-extracto según la razón seleccionada (X dosis reto de veneno: Y partes de extracto a probar). Por ejemplo: iniciar con una razón de 1:400 hasta 1:12.5 (p/p).
2. Agitar las mezclas veneno-extracto en vortex.
3. Incluir los siguientes controles, siempre trabajando en baño de maría a 37°C:
  - 100  $\mu\text{l}$  PBS + 1 ml solución de sustrato.
  - 100  $\mu\text{l}$  PBS – Tween 80 (a la concentración de Tween 80 a la que se disolvió el extracto) + 1 ml
  - 100  $\mu\text{l}$  veneno (dosis reto) + 1 ml solución de sustrato.
  - 100  $\mu\text{l}$  de planta (dosis más alta utilizada en el ensayo) + 1 ml solución de sustrato.
4. Se preincuban las mezclas veneno : extracto y los controles a 37°C por 30 minutos.
5. Agitar nuevamente las mezclas en vortex.

6. En baño de maría a 37°C, colocar tubos de ensayo de 15 ml a los que se agrega 100 µl de cada una de las mezclas (por triplicado) y 1 ml de solución de sustrato (proceder de la misma forma como se describió anteriormente para los ensayos dosis-reto).
7. Incubar la mezcla por 20 minutos exactos a 37°C en un baño María.
8. Cumplido el tiempo de incubación, agregar 5 ml de la mezcla de extracción, tapar con tapón de goma y agitar vigorosamente en el vortex por 20 - 30 segundos.
9. Dejar reposar por 10 minutos a TA.
10. Agregar 2 ml de n – heptano y 3 ml de agua destilada.
11. Mezclar por inversión, dejar que se separen las dos fases.
12. Transferir 2 ml de la fase superior a un tubo de vidrio de 10 ml previamente identificado.
13. Agregar 1 ml de la mezcla de titulación.
14. Mezclar por vortex 5 – 10 segundos y titular con volúmenes de 20 µl de NaOH 0.018 N hasta observar un viraje de color de amarillo a verde.
15. Cuantificar el volumen de NaOH utilizado para la titulación en cada muestra. Restar el volumen utilizado en la titulación del control negativo/blanco (PBS).
16. Después de restar el volumen de NaOH utilizado en el blanco (PBS) a cada mezcla veneno-extracto y al control de veneno, calcular la cantidad de µEq para todos.
17. La cantidad de µEq que se obtiene de la actividad fosfolipasa A<sub>2</sub> del control de veneno es el 100% de actividad, y a partir de allí por regla de 3 se determina que porcentaje de actividad fue neutralizada en cada muestra. Por ejemplo, si una mezcla presenta una actividad fosfolipasa A<sub>2</sub> del 10% significa que neutralizó en un 90% la actividad del veneno.
18. Graficar en eje X el porcentaje de actividad del veneno y en eje Y la razón mg veneno / mg extracto (por ejemplo 1:400, 1:200, etc.).
19. La DE<sub>50</sub> es la cantidad de extracto vegetal (por mg de veneno) que neutraliza el 50% de la actividad fosfolipasa A<sub>2</sub> del veneno.

## VI. ANEXOS

### CÁLCULOS

Para expresar la actividad fosfolipasa A<sub>2</sub> en µEq/mg de proteína.min se realizan los siguientes cálculos:

Calcular el número de miliequivalentes (meq) de NaOH 0.018N gastados en la titulación.

Ejemplo: si se gastaron 180 µl de NaOH (habiéndole restado ya el volumen gastado en el control de PBS), equivale a 0.180 ml.

$$0.180 \text{ ml} \times 0.018 \text{ N} = 0.00324 \text{ mEq} = 3.24 \text{ µEq.}$$

$$3.24 \text{ µEq} \times (1/20 \text{ min}) \times (1000 \text{ µg} / (\text{µg de veneno utilizados})) = \text{µEq/mg.min}$$

### PREPARACIÓN DE SOLUCIONES DE TRABAJO:

#### **A.- Solución de sustrato:**

- Preparar 1 litro de buffer de sustrato: Tris 0.1 M, CaCl<sub>2</sub> 10 mM, pH 8.5. Agregar Tritón X-100 a una concentración final de 1 %. Almacenar a 4°C.
- Al momento del experimento colocar 10 mL de yema de huevo sin burbujas en una probeta, y llevar el volumen a 50 mL con el buffer de sustrato (dilución 1:5). Homogenizar bien el sustrato, colocarlo en un beaker a agitar con agitador magnético por varios minutos antes de usar.
- Utilizar esta solución fresca, preparar la cantidad adecuada cada vez que se realice la prueba.

**B.- Mezcla de extracción**

- Preparar una solución que contenga 40 partes de alcohol isopropílico, 10 partes de n – heptano y 1 parte de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> N (40:10: 1). Almacenar a TA.

**C.- Mezcla de titulación**

- Preparar una solución al 0.01 % de azul de timol: 10 mg de azul de timol en 10 ml de agua destilada y 90 ml de etanol. Guardar en frasco ámbar cubierto con papel aluminio, TA.

**D.- Solución de NaOH libre de CO<sub>2</sub>**

- Calentar hasta ebullición un volumen de agua destilada para eliminar el CO<sub>2</sub> presente en el agua.
- Con esta agua preparar una solución de NaOH 0.018 N.
- Esta solución se prepara fresca cada vez que se va a utilizar.

**VII. REFERENCIAS**

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.

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*. *Comp. Biochem. Physiol.* 84C, 159-164.

**PROCEDIMIENTO ESTÁNDAR DE OPERACIÓN –PEO–**  
**DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA POR DEGRADACIÓN DE**  
**AZOCASEÍNA**

FECHA DE EMISIÓN:	FECHA DE APROBACIÓN:	PEO NO.:
ELABORADO POR:	Firma:	Reemplaza:
REVISADO POR:	Firma:	Páginas:5
APROBADO POR:	Firma:	

### **I. OBJETIVO**

Establecer el procedimiento estándar para la determinación de la actividad proteolítica evaluada a través del ensayo de degradación de azocaseína.

### **II. POLÍTICA**

Es la política del LAP contar con procedimientos escritos de distintas técnicas, que describan con detalle la forma correcta de cada una de las operaciones que se efectúan, de manera que sirvan de referencia al personal que debe realizarlas.

### **III. RESPONSABLE**

Auxiliar de investigación del LAP.

### **IV. MATERIALES Y REACTIVOS**

#### **Material descartable**

- Guantes de látex
- Papel mayordomo
- Espátulas de acero (limpias)
- Marcador permanente de punta fina
- Tubos de reacción (ependorf 1.5 ml)
- Gradilla para tubos de reacción.
- Tips amarillos de 10 a 100 µl
- Tips azules de 100 a 1000 µl
- Papel parafilm
- Placas de ELISA de 96 pozos, fondo plano.

#### **Cristalería y material de laboratorio**

- Probetas de vidrio (25, 50 y 100 ml).
- Balones aforados (100, 250 y 1000 ml).
- Beakers (250, 500 ml).
- Frascos de vidrio con tapón de rosca (50, 250, 500 y 1000 ml).
- Pipetas de vidrio de 2, 5 y 10 ml.
- Tubos de vidrio con capacidad para 15 ml.
- Tubos de vidrio con capacidad para 10 ml.

#### **Equipo**

- Potenciómetro.
- Balanza analítica.
- Micropipetas de volumen variable (10 a 100 µl y 100 a 1000 µl).
- Micropipeta multicanal (hasta 200 µl).
- Vortex.
- Baño María

- Lector de placas de ELISA de 96 pozos.

#### Reactivos

- Azocaseína
- Trisma base
- HCl
- NaCl
- CaCl<sub>2</sub>
- Ácido tricloroacético
- NaOH

## V. PROCEDIMIENTO

### METODOLOGÍA

Antes de iniciar cada ensayo calcular la cantidad de reactivos a utilizar y revisar las existencias de los mismos.

#### A. **Determinación dosis reto**

1. En microtubos de reacción preparar diluciones de veneno en buffer de trabajo. Se recomienda analizar las siguientes dosis: 0.78, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50 y 100 µg.
2. Se espera obtener una absorbancia de 0.6 U con 15 a 30 µg del veneno de *B. asper*.
3. En un microtubo de reacción mezclar 100 µl de la solución de sustrato (azocaseína) con 20 µl de cada dilución. Evaluar cada una por triplicado. Utilizar PBS como control negativo (blanco).
4. Incubar por 90 minutos en baño de maría (37°C).
5. Al terminar la incubación agregar a cada tubo 200 µl de solución de ácido tricloroacético (ATA) al 5 %.
6. Mezclar en vortex (10 segundos).
7. Centrifugar 5 minutos de 3000 a 4000 rpm.
8. Elaborar un mapa de una placa de ELISA de 96 pozos marcando las posiciones en que se colocarán muestras y controles.
9. Transferir 150 µ del sobrenadante de cada prueba a un pozo de la placa de ELISA (según mapa).
10. Agregar a cada pozo 150 µl de NaOH 0.5 M, mezclar.
11. Leer absorbancia a 450 nm.

#### B. **Ensayos dosis – respuesta (extractos vegetales)**

1. Preparar diluciones de las muestras a analizar (veneno, diluciones de extractos, diluciones PBS Tween 80 al 5 %) en PBS.
2. En microtubos de reacción preparar las siguientes series de tubos (realizar por triplicado):
- 3.

Serie	Componentes
X	20 µl de cada una de las diluciones de extracto a evaluar + 100 µl de solución de sustrato (azocaseína).
Y	20 µl de cada una de las diluciones de extracto a evaluar + 100 µl de buffer de sustrato libre de azocaseína.
Z	20 µl de PBS + 100 µl de buffer de sustrato libre de azocaseína.
A	20 µl de diluciones seriadas de PBS – Tween 80 (2.5, 1.25, 0.625, 0.3125, 0.156 y 0.078 %)* + 100 µl de buffer de sustrato libre de azocaseína.
Control positivo	20 µl de la dosis reto del veneno + 100 µl de solución de sustrato (azocaseína).

\* Las diluciones corresponden a las concentraciones de Tween 80 que es espera encontrar en las diluciones de extracto evaluadas. Este control permitirá eliminar la absorbancia correspondiente al Tween 80.

4. Incubar por 90 minutos en baño de maría (37°C).
5. Al terminar la incubación agregar a cada tubo 200 µl de solución de ácido tricloroacético (ATA) al 5 %.
6. Mezclar en vortex (10 segundos).
7. Centrifugar 5 minutos de 3000 a 4000 rpm.
8. Elaborar un mapa de una placa de ELISA de 96 pozos marcando las posiciones en que se colocarán muestras y controles.
9. Transferir 150 µ del sobrenadante de cada prueba a un pozo de la placa de ELISA (según mapa).
10. Agregar a cada pozo 150 µl de NaOH 0.5 M, mezclar.
11. Leer absorbancia a 450 nm.

### C. *Ensayos de neutralización*

1. Preparar diluciones de las muestras a analizar (veneno, diluciones de extractos, mezclas de extractos, diluciones PBS Tween 80 al 5 %) en PBS.
2. En microtubos de reacción mezclar 500 µl de dilución de veneno y 500 µl de cada una de las diluciones de planta a utilizar. Garantizar que la concentración final de veneno en cada tubo corresponde a la dosis reto previamente establecida y que la concentración de planta en cada tubo corresponde a cada una de las diluciones a evaluar.
3. Incubar estas mezclas por 30 minutos a 37°C.
4. En microtubos de reacción preparar las siguientes series de tubos (realizar por triplicado):

Serie	Componentes
X	20 µl de cada una de las mezclas veneno:extracto a evaluar + 100 µl de solución de sustrato (azocaseína).
Y	20 µl de cada una de las diluciones de extracto a evaluar + 100 µl de buffer de sustrato libre de azocaseína.
Z	20 µl de PBS + 100 µl de buffer de sustrato libre de azocaseína.
A	20 µl de diluciones seriadas de PBS – Tween 80 (2.5, 1.25, 0.625, 0.3125, 0.156 y 0.078 %)* + 100 µl de buffer de sustrato libre de azocaseína.
Control positivo	20 µl de la dosis reto del veneno + 100 µl de solución de sustrato (azocaseína).

\* Las diluciones corresponden a las concentraciones de Tween 80 que es espera encontrar en las diluciones de extracto evaluadas. Este control permitirá eliminar la absorbancia correspondiente al Tween 80.

5. Incubar por 90 minutos en baño de maría (37°C).
6. Al terminar la incubación agregar a cada tubo 200 µl de solución de ácido tricloroacético (ATA) al 5 %.
7. Mezclar en vortex (10 segundos).
8. Centrifugar 5 minutos de 3000 a 4000 rpm.
9. Elaborar un mapa de una placa de ELISA de 96 pozos marcando las posiciones en que se colocarán muestras y controles.
10. Transferir 150 µ del sobrenadante de cada prueba a un pozo de la placa de ELISA (según mapa).
11. Agregar a cada pozo 150 µl de NaOH 0.5 M, mezclar.
12. Leer absorbancia a 450 nm.

## VI. ANEXOS

### CÁLCULOS

#### Dosis reto

- Se calcula la absorbancias de todas las muestras restando la absorbancia del control (PBS).
- Se grafica en eje X la concentración de veneno total, y en eje Y la absorbancia. Se selecciona como dosis reto de actividad proteolítica aquella que produce que la curva cambie de exponencial a estacionaria.

#### Ensayos dosis respuesta y neutralización

- Calcular la **absorbancia neta del ensayo** restando a los tubos de la serie X el valor del tubo Z (control negativo de reacción).
- Calcular la **absorbancia del control interno** restando a los tubos de la serie Y el valor de los tubos de la serie A.
- Al valor de la **absorbancia neta del ensayo** restar el valor de la **absorbancia del control interno**, este valor determina la absorbancia debida a la degradación de azocaseína por el extracto o la mezcla veneno extracto.
- Calcular el porcentaje de degradación de azocaseína en función de la degradación observada en control positivo (abs =100 %). Se grafica en eje X la concentración de extracto o la razón veneno : extracto y en eje Y el porcentaje de degradación.
- En caso de ensayos de neutralización, calcular la DE50.

### PREPARACIÓN DE SOLUCIONES DE TRABAJO

#### Buffer de trabajo

- Preparar un stock de buffer Tris-HCl 100 mM pH 8.0 y una solución de NaCl 0.5 M, esterilizar por autoclave., CaCl<sub>2</sub> 5 mM, pH 8.0.
- Preparar una solución de CaCl<sub>2</sub> 10 mM, esterilizar por filtración.
- A partir de las soluciones anteriores, preparar una solución buffer que contenga: Tris-HCl 50 mM, NaCl 0.15 M, CaCl<sub>2</sub> 5 mM, confirmar y ajustar pH a 8.0. Utilizar agua estéril para preparar el buffer.
- Almacenar a 4°C.

#### Solución de sustrato (azocaseína).

- Preparar una solución de azocaseína de 10 mg/ml en buffer de trabajo. Esta solución hace mucha espuma, por lo que se hace en un beaker pequeño. A veces requiere que se caliente un poco la solución para que se disuelva.
- Almacenar a 4°C protegida de la luz, la solución dura 2 semanas almacenada a estas condiciones.

#### Solución ácido tricloroacético.

- Preparar una solución de ácido tricloroacético al 5 % en agua destilada.
- Almacenar a 4°C.

#### Solución de hidróxido de sodio 0.5 N

- Preparar la solución de hidróxido de sodio al 0.5 N en agua estéril.
- Almacenar a temperatura ambiente.

## VII. REFERENCIAS

Wang, W., Shih C., & Huang, T. (2004). A novel P-I class metalloproteinase with broad substrate-cleaving activity, agkislysin, from *Agkistrodon acutus* venom. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 324, 224-230.

## Anexo 4

Fichas técnicas de plantas evaluadas en el estudio.

1. Chipilín (*Hamelia patens*)
2. Guaco (*Aristolochia maxima*)
3. Santa María (*Piper peltatum*)
4. Oreja de burro (*Sansevieria hyacinthoides*)
5. Ixcanal (*Acacia hindsii*)
6. Alcotán (*Cissampelos pareira*)

## CHICHIPÍN

*Hamelia patens* Jacq. (RUBIACEAE)

### Sinonimias

*Hamelia erecta* Jacq.,  
*Hamelia intermedia* Urb. & Ekman,  
*Hamelia nodosa* M. Martens & Galeotti

### Otros nombres populares

En Escuintla se le conoce como hierba del cáncer. En Petén se le conoce por los nombres de cuetillo, chac-ixcanan, xcanan e ixcanan amarillo. En lengua q'eqchi' se le conoce como chamah y sicunken. En otros lugares de Guatemala se le conoce como sisipince, clavito, flor de cangrejo, canuto y hierba de erisipela. En El Salvador es conocido por los nombres de chichipince, sisipince, chichipinte y coralillo. En Honduras se le conoce como coral, coroladillo y achiotillo colorado. En Oaxaca se le conoce como canutillo. Los nombres mayas en Yucatan y Belice se reportan como xcanal, neanan y chactoc (Standley & Steyermark, 1952).

### Partes recomendadas para su uso como antiofídico

Hoja y toda la planta (Coe & Anderson, 2005).

Hoja (Hay, Cleaves & Cáceres, sf).

### Como es la planta

Es un arbusto o árbol pequeño, comúnmente de 1-3 m de altura, las ramas con pequeños pelillos cuando son jóvenes. Las hojas de 6-20 cm de longitud y 2-9 cm de ancho, son en su mayoría alternas sobre peciolo de 1-5 cm de largo. Las inflorescencias son terminales, con muchas flores. Las flores poseen una corola tubular, rojo-naranja de 1.5-2 cm de longitud. El fruto es globoso de 6-10 mm de longitud y 4-6 mm de ancho, de color rojo que casi se vuelve negro (Standley & Steyermark, 1952).



(1) Flores; (2) Hojas, flores y frutos

Localidad: San Bernardino, Suchitepéquez  
 Fotografías por Max Mérida

### **Donde crece**

Crece usualmente en matorrales secos a húmedos, a menudo en vegetación de crecimiento secundario, algunas veces en bosques más abiertos de los 1,000 msnm o menos. En Guatemala se encuentra en los departamentos de Petén, Alta Verapaz, Izabal, Zacapa, Chiquimula, Santa Rosa, Escuintla, Suchitepéquez, Retalhuleu, Quetzaltenango, San Marcos, Huehuetenango, Quiché. También en el sur de la Florida, sur de México, Belice hasta El Salvador y Panamá. Sur de Bolivia y sur de Paraguay, Antillas y Bahamas (Standley & Steyermark, 1952).

### **Composición química de la parte medicinal**

*Hamelia patens* es una planta rica en flavonoides y alcaloides; de estos últimos contiene varios de tipo oxindoles entre los cuales se pueden mencionar la pteropodina e isopteropodina. Además se ha descubierto tres nuevos alcaloides oxindólicos los cuales han sido nombrados como alcaloide A, B y C. También se ha demostrado la presencia de epinefrina, ácido rosmarínico, epigenina, efedrina, flavonoides, isomaruquina, isopteropodina, maruquina, narirutina, palmirina, pteropodina, rumberina, rutina, seneciofilina, speciofilina y taninos (Ahmad, Pandurangan, Singh, & Ananad, 2012).

### **Usos medicinales populares**

La infusión o decocción de sus hojas es utilizada generalmente por sus propiedades antiinflamatorias y para el tratamiento de infecciones bacterianas o fúngicas. Es también recomendada para el tratar hemorragias, lesiones en la piel, pie de atleta, erupciones cutáneas, picaduras de insectos, picazón, dolor de cabeza, asma, quemaduras, escorbuto, reumatismo, shock nervioso, dolor post-parto, trastornos menstruales, afecciones del útero y ovarios, expulsión de lombrices y disentería (Ahmad et al., 2012).

Las hojas y tallo triturados se utilizan externamente en cortaduras, ampollas, erupciones y como analgésico para golpes, hongos en la piel, picaduras de insectos, torceduras, esguinces y otras condiciones dolorosas o inflamadas y es utilizado también para tratar la amenorrea (Ahmad et al., 2012).

En Guatemala la decocción de las hojas es utilizada para tratar la mordedura de serpiente por medio de baños (Hay, Cleaves & Cáceres, sf).

### **Propiedades antiofídicas medicinales demostradas**

Se ha demostrado que posee actividad contra *Escherichia coli* a una concentración mínima inhibitoria (CIM) de 2.5 mg/ml (Camporese et al., 2003).

En un estudio sobre la capacidad citotóxica *in vitro* del extracto de nueve plantas utilizadas en la medicina tradicional Maya, se encontró que el extracto de la corteza de la raíz de *H. patens* presentó una alta actividad citotóxica sobre las líneas celulares adenocarcinoma de cérvix (HeLa) y carcinoma escamoso del cérvix (SiHa), lo cual soporta su uso en enfermedades uterinas (Mena-Rejon, Caamal-Fuentes, Cantillo-Ciau, & Cedillo-Rivera, 2009).

Además, se ha encontrado que el extracto metanólico de esta especie posee actividad antidiarreica, la cual fue evaluada en ratones, mostrando dicha actividad al administrar dosis en el rango de 12.5 a 100 mg/kg de peso en un lapso de 30 a 60 minutos luego de haber administrado el laxante (Pérez G., Zabala S., Vargas S., & Hernandez Z., 1996).

### **Otros usos de la planta**

Es utilizada como forraje para ovinos ya que satisface los requerimientos diarios de energía digestible y puede ser una alternativa de suplemento al pasto en los meses de escasez (Hernandez & Benavidez, 1995).

### Efectos tóxicos de la planta

El extracto metanólico de *Hamelia patens* mostró toxicidad, al ser inyectado en ratones a dosis altas (1.5 gramos por kg de peso corporal) (Ahmad et al., 2012).

### REFERENCIAS

- Ahmad, A., Pandurangan, A., Singh, N., & Ananad, P. (2012). A mini review on chemistry and biology of *Hamelia Patens* ( Rubiaceae ). *Pharmacognosy Journal*, 4(29), 1–4. doi:10.5530/pj.2012.29.1
- Camporese, A., Balick, M. J., Arvigo, R., Esposito, R. G., Morsellino, N., Simone, F. De, & Tubaro, A. (2003). Screening of anti-bacterial activity of medicinal plants from Belize ( Central America ). *ETHNO-PHARMACOLOGY*, 87, 103–107. doi:10.1016/S0378-8741(03)00115-6
- Coe, F. G., & Anderson, G. J. (2005). Snakebite ethnopharmacopoeia of eastern Nicaragua. *Journal of Ethnopharmacology*, 96, 303–323. doi:10.1016/j.jep.2004.09.026
- Hay, Y., Cleaves, C., & Cáceres, A. (sf). Medicinal plants used to heal snakebites in Guatemala, Universidad de San Carlos de Guatemala, 2-4 pp.
- Hernandez, S., & Benavidez, J. (1995). Potencial forrajero de especies leñosas de los bosques secundarios de El Petén, Guatemala. *Agroforestería En Las Américas*, 2(6), 15–22.
- Mena-rejon, G., Caamal-fuentes, E., Cantillo-ciau, Z., & Cedillo-rivera, R. (2009). In vitro cytotoxic activity of nine plants used in Mayan traditional medicine. *Ethnopharmacology*, 121, 462–465. doi:10.1016/j.jep.2008.11.012
- Pérez G., S., Zabala S., M. A., Vargas S., R., & Hernandez Z., E. (1996). Antidiarrhoeal Activity of *Hamelia patens* Methanol Extract in Rats and Mice. *PHYTOTHERAPY RESEARCH*, 10, 686–688.
- Standley, P.C. & Steyermark, J.A. (1952). Flora of Guatemala. *Fieldiana: Botany*, 24(3), 313-314.

## GUACO

*Aristolochia máxima* Jacq. (ARISTOLOCHIACEAE)

### Sinonimias

*Aristolochia biflora* Duch. ex Klotzsch

*Aristolochia geminiflora* Kunth

*Aristolochia asperifolia* Ule

### Otros nombres populares

En Guatemala se le conoce también como canastilla y tecolotillo (Standley & Steyermark, 1946).

### Partes recomendadas para su uso como antiofidico

Corteza y tallo (Hay, Cleaves & Cáceres, sf).

Raíz y tallo (Heinrich, Chan, Wanke, Neinhuis, & Simmonds, 2009).

### Como es la planta

Es a menudo una enredadera leñosa grande. Los tallos viejos presentan grandes crestas corchosas. Las hojas de 7-18 cm de longitud, presentan peciolo cortos y son usualmente redondeadas en el ápice y cordadas en la base, glabras en el haz y densamente pubescentes en el envés, la venación es prominente y reticulada. Las inflorescencias son racimos de pocas o muchas flores, axilares o más a menudo apiñadas en densas masas en la base de los tallos o en su parte inferior. El fruto es una cápsula de 10 cm de longitud y 4 cm de grosor ferruginoso oscuro a negruzco (Standley & Steyermark, 1946).

### Donde crece

Crece en matorrales húmedos a secos, algunas veces en bosques de los 1,200 msnm o menos. En Guatemala se encuentra en los departamentos de El Progreso, Baja Verapaz, Zacapa, Chiquimula, Jutiapa, Santa Rosa, Escuintla y Guatemala. En el sur de México; de Belice a Panamá y la parte norte de Suramérica (Standley & Steyermark, 1946).



(1) Hojas; (2) Flores

Fotografías de Archivo del Missouri Botanical Garden

### **Composición química de la parte medicinal**

Las raíces de especies del género *Aristolochia* poseen alcaloides, aceites esenciales, principios amargos, ácido tánico, resina, goma y azúcares entre sus constituyentes más abundantes; además se ha encontrado que todas las plantas de este género poseen ácido aristolóquico (Bhattacharjee & Bhattacharyya, 2013).

### **Usos medicinales populares**

La planta en general es utilizada para tratar afecciones de la piel, reumatismo, heridas, diarrea, inflamaciones, lepra, leucoderma, dispepsia, lombrices intestinales, tos, dismerorrea, etc. La decocción de las raíces es utilizada mayormente para curar úlceras, asma, bronquitis y además contra mordeduras de reptiles e insectos (Bhattacharjee & Bhattacharyya, 2013)

En Guatemala esta planta es empleada para tratar la mordedura de serpiente utilizando la decocción de las hojas y corteza por vía oral o en baños (Hay, Cleaves & Cáceres, sf).

El extracto acuoso de las raíces de la especie *Aristolochia indica* es usada como antídoto contra la mordedura de serpientes, especialmente de las mordeduras de la víbora de Russell, en diferentes partes de los países del sudeste asiático como Bangladesh, India, Myanmar, Nepal, Filipinas, Sri Lanka, Tailandia, Tibet, etc. (Bhattacharjee & Bhattacharyya, 2013).

### **Propiedades antiofídicas y medicinales demostradas**

Se ha demostrado que el extracto acuoso de la raíz de la especie *A. indica* posee una alta actividad gelatinolítica, colagenasa, nucleasa y peroxidasa, además de interactuar con los componentes del veneno de la víbora de Russell inhibiendo parcialmente las actividades de la L-amino oxidasa (Bhattacharjee & Bhattacharyya, 2013).

La especie *A. elegans* es utilizada en México para el tratamiento de picaduras de escorpiones y serpientes, ya que se ha demostrado, en pruebas *in vivo* realizadas en ratones, que los ácidos aristolóquicos pueden inactivar el veneno reduciendo su efecto. La eficacia de los ácidos aristolóquicos del género ha sido estudiada encontrando que estos son eficaces contra el veneno de serpientes de la familia Elapidae, pero no son eficaces contra el veneno de crotálos (Heinrich et al., 2009).

Diferentes especies del género han demostrado poseer propiedades antibacteriana, antifúngica, anti-malárica, antiinflamatoria, antihipertensiva, expectorante, efectos abortivos, capacidad antioxidante, entre otros (Heinrich et al., 2009).

La capacidad antiinflamatoria del género ha sido confirmada en estudios realizados con el extracto acuoso, diclometano y metanólico de la raíz de *Aristolochia triangularis*; se cree que los ácidos aristolóquicos son en parte responsables de dicha capacidad, ya que son capaces de inhibir la fosfolipasa A<sub>2</sub>, una enzima formadora de mediadores pro-inflamatorios (Heinrich et al., 2009).

### **Otros usos de la planta**

Entre otros usos se ha reportado que las vainas jóvenes de la planta son cocinadas y consumidas como alimento en Costa Rica (Standley & Steyermark, 1946).

Además estudios realizados con el extracto metanólico de la especie *A. baetica* sobre gorgojos *Tribolium castaneum* mostró inhibición del crecimiento de larvas, inhibición de actividad  $\alpha$ -amilasa, erradicación de la descendencia, por lo que puede ser utilizado como plaguicida (Heinrich et al., 2009).

### **Efectos tóxicos de la planta**

Los ácidos aristolóquicos presentes en las especies de este género han demostrado ser genotóxicos en células bacterianas y de mamíferos (Zhang et al., 2004).

En animales se demostró que un bajo contenido de ácidos aristolóquicos, presente en el extracto de la especie *A. indica*, no ejerce ningún tipo de toxicidad sub-crónica y aguda, pero la exposición a corto plazo de dosis altas causa daños hepáticos y renales (Bhattacharjee & Bhattacharyya, 2013).

#### REFERENCIAS

- Bhattacharjee, P., & Bhattacharyya, D. (2013). Characterization of the aqueous extract of the root of *Aristolochia indica*: evaluation of its traditional use as an antidote for snake bites. *Journal of Ethnopharmacology*, *145*(1), 220–6. doi:10.1016/j.jep.2012.10.056
- Hay, Y., Cleaves, C., & Cáceres, A. (sf). Medicinal plants used to heal snakebites in Guatemala, Universidad de San Carlos de Guatemala, 2-4 pp.
- Heinrich, M., Chan, J., Wanke, S., Neinhuis, C., & Simmonds, M. S. J. (2009). Local uses of *Aristolochia* species and content of nephrotoxic aristolochic acid 1 and 2--a global assessment based on bibliographic sources. *Journal of Ethnopharmacology*, *125*(1), 108–44. doi:10.1016/j.jep.2009.05.028
- Standley, P.C. & Steyermark, J.A. (1946). Flora of Guatemala. *Fieldiana: Botany*, *24*(4), 97-98.
- Zhang, H., Cifone, M. a, Murli, H., Erexson, G. L., Mecchi, M. S., & Lawlor, T. E. (2004). Application of simplified in vitro screening tests to detect genotoxicity of aristolochic acid. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, *42*(12), 2021–8. doi:10.1016/j.fct.2004.07.016

## SANTA MARÍA

*Piper peltatum* L. (PIPERACEAE)

### Sinonimias

*Heckeria peltata* (L.) Kunth  
*Heckeria scutata* (A. Dietr.) Kunth  
*Lepianthes peltata* (L.) Raf.

### Otros nombres populares.

Algunas veces se le llama ombligo en Honduras (Standley & Steyermark, 1952).

En Colombia se le conoce como Cordoncillo (Puertas-Mejía, Gómez-Chabala, Rojano, & Saenz-Vega, 2009).

### Partes recomendadas para su uso como antiofídico.

Toda la planta (Coe & Anderson, 2005).

Las hojas (Hay, Cleaves & Cáceres, sf).

### Como es la planta.

Es una planta herbácea, erecta y robusta, generalmente de 1.5 metros de alto, escasamente ramificada. Las hojas son grandes con peciolo largo, la lámina foliar es delgada, de 20-30 cm de longitud, algunas veces más anchas que largas, peltadas, con nerviación palmada. Las inflorescencias son espigas de color verde pálido, la mayoría de 8-9 cm de longitud y de 3.5 mm de ancho (Standley & Steyermark, 1952).

### Donde crece.

En matorrales húmedos de las tierras bajas, algunas veces en vegetación de crecimiento secundario, 600 msnm o menos. Se encuentra en Alta Verapaz, Izabal, Santa Rosa, Suchitepéquez, Retalhuleu y San Marcos. Sur de México, sur de Panamá y en las Antillas (Standley & Steyermark, 1952).



(1) Hojas e inflorescencias (2) Hábito  
 Localidad: Morales, Izabal

Fotografías por Max Mérida

### **Composición química de la parte medicinal.**

El extracto crudo de las hojas posee una cantidad elevada de compuestos fenólicos y poca cantidad de compuestos terpenoides (Puertas-Mejía et al., 2009).

Entre los metabolitos secundarios volátiles aislados de las hojas se encuentra el  $\alpha$ -pineno, linalol,  $\beta$ -pineno, trans- $\beta$ -cariofileno,  $\beta$ -elemeno y limoneno; en el aceite esencial además se ha aislado germacreno D (Borrero M., Vitolam M., Trillos, Niño P., & Muñoz, 2011).

### **Usos medicinales populares.**

Preparaciones de las diferentes especies de la familia Piperaceae han sido utilizadas tradicionalmente como diuréticos, febrífugos, laxantes, antiinflamatorios y como tratamiento de enfermedades del hígado (Núñez et al., 2005).

La especie *Piper peltatum* es usada frecuentemente para tratar dolores estomacales, fiebres palúdicas y afecciones de la piel (Pino, 2008); su uso en el tratamiento de estas últimas se asocia a la presencia del compuesto 4-nerolidilcatecol, en los extractos no etanólicos de su hojas, el cual posee propiedades antioxidantes (Puertas-Mejía et al., 2009).

En Guatemala la decocción de las hojas de esta especie es utilizada para tratar la mordedura de serpiente (Hay, Cleaves & Cáceres, sf).

También es utilizada la infusión de sus raíces como tratamiento contra la malaria en regiones del Amazonas y parte de Sur América (Milliken, 1997).

### **Propiedades antiofídicas y medicinales demostradas.**

*Piper peltatum* es utilizada también por sus propiedades antiofídicas ya que el extracto crudo inhibe completamente la actividad Fosfolipasa A<sub>2</sub> de la miotoxina I del veneno de la serpiente *Bothrops asper* (Núñez et al., 2005).

En especies del género *Piper* se han encontrado moléculas con actividad contra *Mycobacterium tuberculosis* siendo estas la piperina, la 5,6-dihidro-7,8-dihidrometisticina y el 2-oxo-14-(3',4'-metilendioxfenil) tetradecano; en el caso de la especie *Piper peltatum* se ha demostrado que posee un 35% de actividad inhibitoria sobre el crecimiento de *M. tuberculosis* (Torres, 2007).

Además, en un estudio sobre la evaluación antibacteriana del extracto etanólico de *Piper peltatum*, se demostró que este posee actividad contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* y *Escherichia coli* (Pino Benitez, 2008).

También se ha demostrado por medio de ensayos *in vivo* e *in vitro*, que el compuesto 4-nerolidilcatecol aislado de las hojas posee una moderada actividad antimalárica, observándose inhibición del crecimiento del parásito en un 63% y 50% respectivamente en los ensayos realizados (Rocha e Silva et al., 2011).

### **Otros usos de la planta.**

El aceite esencial de las especie del género *Piper* han demostrado tener actividad biocontroladora, por la presencia de metabolitos volátiles del tipo arilpropano. En ensayos sobre la actividad fumigante del aceite esencial de las hojas e inflorescencias de estas especies, se ha encontrado que poseen un CL<sub>50</sub> de 45 ppm y 8.8 ppm respectivamente, sobre larvas de *Spodoptera frugiperda* (Cuca S., Delgado A., Avila M., & Robayo M., 2011).

### **Efectos tóxicos de la planta.**

No se encontraron datos sobre la toxicidad de la especie.

## REFERENCIAS

- Borrero M., E., Vitolam M., E., Trillos, C. L., Niño P., M. E., & Muñoz, A. (2011). Metabolitos secundarios volátiles aislados por SDE Hidrodestilación de hojas de *Piper peltatum* encontradas en Tubará (Atlántico). *Red de Revistas Científicas de América Latina, El Caribe, España Y Portugal*, 18, S10.
- Coe, F. G., & Anderson, G. J. (2005). Snakebite ethnopharmacopoeia of eastern Nicaragua. *Journal of Ethnopharmacology*, 96, 303–323. doi:10.1016/j.jep.2004.09.026
- Cuca S., L. E., Delgado A., W. A., Avila M., M. C., & Robayo M., A. T. (2011). Análisis comparativo de la composición y la actividad fumigante de los aceites esenciales de inflorescencias y hojas de una especie de la familia Piperaceae. *Vitae*, 57(52).
- Hay, Y., Cleaves, C., & Cáceres, A. (sf). Medicinal plants used to heal snakebites in Guatemala, Universidad de San Carlos de Guatemala, 2-4.
- Milliken, W. (1997). TRADITIONAL ANTI-MALARIAL MEDICINE IN RORAIMA , BRAZIL 1. *Economic Botany*, 3(51), 212–237.
- Núñez, V., Castro, V., Murillo, R., Ponce-Soto, L. a, Merfort, I., & Lomonte, B. (2005). Inhibitory effects of *Piper umbellatum* and *Piper peltatum* extracts towards myotoxic phospholipases A2 from Bothrops snake venoms: isolation of 4-nerolidylcatechol as active principle. *Phytochemistry*, 66(9), 1017–25. doi:10.1016/j.phytochem.2005.03.026
- Pino Benitez, N. (2008). Actividad antibacteriana a partir de extractos de hojas de seis especies del género *Piper* L. (PIPERACEA). *Revista Institucional Universidad Tecnológica Del Choco: Investigación, Biodiversidad Y Desarrollo*, 27(1), 67–75.
- Puertas-Mejía, M. A., Gómez-Chabala, L., Rojano, B., & Saenz-Vega, J. A. (2009). Capacidad antioxidante in vitro de fracciones de hojas de *Piper peltatum* L. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 14(2), 1–11.
- Rocha e Silva, L. F., da Silva Pinto, A. C., Pohlit, A. M., Jacques Quignard, E. L., Ribeiro Vieira, P. P., Tadei, W. P., ... de Andrade-Neto, V. F. (2011). In Vivo and In Vitro Antimalarial Activity of 4 - Nerolidylcatechol. *PHYTOTHERAPY RESEARCH*, (January).
- Standley, P.C. & Steyermark, J.A. (1952). Flora of Guatemala. *Fieldiana: Botany*, 24(3), 313-314.
- Torres, F. (2007). Actividad antimicobacteriana de algunas plantas de la flora colombiana. *Scientia et Technica*, (33), 133–136.

Enlace: <http://www.tropicos.org/Name/25001138?tab=synonyms>

Sinonimias disponibles en base de datos del Missouri Botanical Garden.

## OREJA DE BURRO

*Sansevieria hyacinthoides* (L.) Druce (ASPARAGACEAE)

### Sinonimias

*Sansevieria guineensis* (L.) Willd.

*Sansevieria angustiflora* Lindb.

*Aloe guineensis* L.

### Otros nombres populares

Se le conoce como curarina y quina en Escuintla. En El Salvador se le conoce como espada de Judas y espada del diablo. El nombre curarina está bien establecido en todas las regiones de Guatemala y aún los niños la conocen por este nombre. (Standley & Steyermark, 1952).

### Partes recomendadas para su uso como antiofídico

Hoja (Hay, Cleaves & Cáceres, sf).

### Como es la planta

Es una planta sin tallo. Las hojas son lineares-lanceoladas, cóncavas, de 50-140 cm de longitud y 5-9 cm de ancho, erectas, se estrechan al final, de color verde, moteadas de blanco y gris. Las inflorescencias son escapos usualmente más cortos que las hojas. Las flores son blancas formando panículas estrechas (Standley & Steyermark, 1952).

### Donde crece

Es una planta utilizada como ornamento a elevaciones medias y bajas en Guatemala. Se encuentra en bordes de matorrales cerca de las viviendas o en los márgenes de campos. Es nativa de África tropical (Standley & Steyermark, 1952).



(1) Hábito; (2) Flores y hojas

Fotografías de Archivo del Missouri Botanical Garden

### Composición química de la parte medicinal

El extracto metanólico de las hojas de la especie *Sansevieria roxburghiana* posee dietilftalato, 6-metil-1-octanol, 2-propildecán-1-ol, 2(4H)-benzofuranona, diisobutil ftalato, 6,10,14-trimetil-2-pentadecanona, 2,5-dimetoxibenzihidrazina, 3,4-dimetoxibenzoico anhídrido, 1,2- ácido benceno dicarboxílico, bis(2- etil hexil) ester, ácido dodecanoico, palmitaldehído dialil acetal, 1-butil-2-(8-metilonil) ftalato, delta-undecalactona, metil hexadecanoato y ácido n-hexadecanoico como metabolitos secundarios (Philip, Kaleena, & Valivittan, 2011).

Los rizomas de *S. roxburghiana* contienen alcaloides, saponinas, fenoles, glucósidos, proteínas, antocianinas, betacianinas, fitoesterol, esteroides y carbohidratos (Philip, Kaleena, Valivittan, & Girish Kumar, 2011).

### Usos medicinales populares

Toda la planta es utilizada tradicionalmente como cardiotónico, expectorante, febrífugo, purgante y para tratar el reumatismo (Haldar, Kar, Battacharya, Bala, & Suresh, 2010). En el sureste de Nigeria es utilizada para el tratamiento de bronquitis, inflamación, hipertensión y tos. También se utiliza para detener los efectos de las mordeduras de serpientes (Ayalogu, Ikewuchi, Onyeike, & Ikewuchi, 2011).

Los rizomas son mucilaginosos y se utilizan para tuberculosis, tos persistente o crónica, para el alivio de la tos común y resfrío, para el dolor de oído, etc. El jugo de los brotes tiernos se utiliza para despejar la flema en niños. Las raíces son usadas como febrífugo en mordedura de serpientes y hemorroides (Haldar, Kar, Bhattacharya, Bala, & Kumar, 2010).

En Guatemala se utiliza el jugo de las hojas machacadas para tratar la mordedura de serpiente, administrándolo de forma oral (Hay, Cleaves & Cáceres, sf).

### Propiedades antiofídicas y medicinales demostradas

Se ha comprobado en animales que el extracto acuoso de las hojas de *Sansevieria senegambica*, produce una disminución significativa de los niveles séricos de sodio y cloro, además de un incremento de los niveles de calcio y potasio lo cual soporta su uso tradicional contra la hipertensión, sugiriendo que el extracto es un ahorrador de potasio cuyo mecanismo de acción hipertensiva puede lograrse por medio de la alteración de los saldos de sodio y potasio en el plasma, o a través de cambios en la concentración de calcio mediados en el tono muscular (Ayalogu et al., 2011).

El extracto hidroalcohólico de los rizomas de la especie *Sansevieria roxurghiana* demostró poseer actividad antidiabética al normalizar significativamente los niveles de glucosa en sangre de ratones con diabetes inducida, al ser el extracto administrado en dosis de 50 y 100 mg/kg (Haldar et al., 2010).

Fracciones del extracto metanólico y acetónico de las hojas de la especie *Sansevieria roxurghiana* han mostrado una pronunciada actividad inhibitoria contra bacterias Gram negativas, positivas y contra cepas de hongos (Philip, Kaleena, Valivittan, et al., 2011).

Se ha encontrado que la fracción soluble del extracto etil acetato de la especie *S. roxurghiana* posee una significativa actividad analgésica al ser administrada por vía oral a dosis de 100mg/kg de peso en ratones (Roy, Kuddus, Begum, & Choudhury, 2012).

### Otros usos de la planta

Se ha reportado su uso ornamental, como alimento, elaboración de artesanías, entre otros para varias de las especies de la familia (Takawira-Nyanya, Newton, Wabuye, & Stedje, 2014).

### Efectos tóxicos de la planta

La fracción soluble acuosa del extracto de la especie *S. roxburghiana* ha mostrado toxicidad en bioensayos con camarones, encontrándose un  $CL_{50}$  de 0.735  $\mu\text{g/ml}$  en comparación con 0.544  $\mu\text{g/ml}$  mostrado por el estándar (Roy et al., 2012).

### REFERENCIAS

- Ayalogu, E. O., Ikewuchi, C. C., Onyeike, E. N., & Ikewuchi, J. C. (2011). Effects of an aqueous leaf extract of *Sansevieria senegambica* Baker on plasma biochemistry and haematological indices of salt-loaded rats. *S. Afr. Sci.*, 107, 1–5.
- Haldar, P. K., Kar, B., Bhattacharya, S., Bala, A., & Kumar, R. B. S. (2010). ANTIDIABETIC ACTIVITY AND MODULATION OF ANTIOXIDANT STATUS BY SANSEVIERIA ROXBURGHIANA RHIZOME IN STREPTOZOTOCIN-INDUCED DIABETIC RATS. *Diabetología Croatica*, (3), 115–123.
- Hay, Y., Cleaves, C., & Cáceres, A. (sf). Medicinal plants used to heal snakebites in Guatemala, Universidad de San Carlos de Guatemala, 2-4 pp.
- Philip, D., Kaleena, P. K., & Valivittan, K. (2011). GC-MS ANALYSIS AND ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF CHROMATOGRAPHICALLY SEPARATED PURE FRACTIONS OF LEAVES OF SANSEVIERIA ROXBURGHIANA. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 4(4), 1–4.
- Philip, D., Kaleena, P. K., Valivittan, K., & Girish Kumar, C. P. (2011). Phytochemical Screening and Antimicrobial Activity of. *Middle-East Journal of Scientific Research*, 10(4), 512–518.
- Roy, J., Kuddus, M., Begum, B., & Choudhury, H. (2012). Evaluation of analgesic, cytotoxic and antioxidant activities of *Sansevieria roxburghiana* Schult. and Schult. f. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2(2), S723–S726. doi:10.1016/S2221-1691(12)60303-7
- Standley, P.C. & Steyermark, J.A. (1952). Flora of Guatemala. *Fieldiana: Botany*, 24(3), 80-81.
- Takawira-Nyenya, R., Newton, L. E., Wabuyele, E., & Stedje, B. (2014). Ethnobotanical Uses of *Sansevieria Thunb.* (Asparagaceae) in Coast Province of Kenya. *Ethnobotany Research & Applications*, 12, 51–69.

## IXCANAL

*Acacia hindsii* Benth (MIMOSACEAE)

### Sinonimias

*Acacia bursaria* Schenck

*Acacia sinaloensis* Saff.

*Acacia tepicana* Saff.

### Otros nombres populares

Se le conoce también como iscanal. En Alta Verapaz le llaman subín. En El Salvador se conoce con los nombres de cutupito, iscanal negro, cachito y guascanal (Standley & Steyermark, 1946).

### Partes recomendadas para su uso como antiofídico

Corteza y raíz (Hay, Cleaves & Cáceres, sf).

### Como es la planta

Es un arbusto o árbol pequeño, usualmente de 6 metros o menos con las ramas robustas, alargadas y colgantes. Posee espinas huecas muy grandes de 3-5 cm de longitud que semejan los cuernos de un toro, las cuales son habitadas por colonias de hormigas. Presenta hojas compuestas con pinnas de 6-15 pares, folíolos de 3-8 mm de longitud, sin vellosidades. Las flores son de color amarillo brillante de 3-5 cm de longitud. Los frutos son vainas de 4-6 cm de longitud y 12 mm de ancho (Standley & Steyermark, 1946).

### Donde crece

En matorrales secos a húmedos, abundante sobre bancos de grava a lo largo de arroyos, algunas veces en bosques poco densos de tierras bajas, 1,800 msnm o menos, principalmente en los 1,000 msnm o menos. En Guatemala se encuentra en los departamentos de Alta Verapaz, Zacapa, Chiquimula, Jutiapa, Santa Rosa, Escuintla, Guatemala, Sacatepéquez, Suchitepéquez, Retalhuleu, Quetzaltenango y San Marcos. En el oeste de México, de Belice hasta El Salvador y Honduras (Standley & Steyermark, 1946).



(1) Hojas (2) Hábito

Localidad: Aldea Pueblo Nuevo, San Jacinto, Chiquimula  
Fotografías por Max Mérida

### Composición química de la parte medicinal

No se encontró información sobre esta especie u otras de la familia

#### **Usos medicinales populares**

En Guatemala la corteza y las raíces son utilizadas para tratar la mordedura de serpiente; la corteza es masticada o aplicada en forma de cataplasma y la decocción de las raíces es administrada en forma de baños (Hay, Cleaves & Cáceres, sf).

#### **Propiedades antiofídicas y medicinales demostradas**

No se encontró información sobre esta especie u otras de la familia

#### **Otros usos de la planta**

No se encontró información sobre esta especie u otras de la familia

#### **Efectos tóxicos de la planta**

No se encontró información sobre esta especie u otras de la familia

#### **REFERENCIAS**

Hay, Y., Cleaves, C., & Cáceres, A. (sf). Medicinal plants used to heal snakebites in Guatemala, Universidad de San Carlos de Guatemala, 2-4 pp.

Standley, P.C. & Steyermark, J.A. (1946). Flora of Guatemala. *Fieldiana: Botany*, 24(5), 10-12.

## ALCOTÁN

*Cissampelos pareira* L. (MENISPERMACEAE)

### Sinonimias

*Cissampelos acuminata* Benth.

*Cissampelos acuminata* DC.

*Cissampelos argentea* Kunth

### Otros nombres populares

En Guatemala se le conoce como curarina y curarina de monte. En San Juan Sacatepéquez se le conoce como icxatú-can. En lengua q'eqchi' le llaman cuxoguí y cuxbá. En Petén se le conoce como bejuco de la preñada y estrella de la preñada. En Yucatán se conoce como peteltun y tsutsuc (Standley & Steyermark, 1952).

### Partes recomendadas para su uso como antiofídico

Toda la planta (Coe & Anderson, 2005).

Raíz (Hay, Cleaves & Cáceres, sf).

### Como es la planta

Es una enredadera pequeña o grande que trepa sobre arbustos o árboles pequeños. Presenta tallos finos usualmente con pequeñas vellosidades muy densas. Las hojas presentan peciolo grandes, son epeltadas, redondeadas, de 3-10 cm de longitud, mucronadas en el ápice, cordadas en la base. Las inflorescencias nacen en las axilas y usualmente son más cortas que las hojas. Las flores son verdes con sépalos de 1-1.5 mm de longitud. Los frutos son rojos de 4-5 mm de longitud cubiertos de vellosidades finas (Standley & Steyermark, 1952).

### Donde crece

Es común en matorrales secos a húmedos o en bosques, a menudo en vegetación de crecimiento secundario, algunas veces en bosques de pino-encino. Se encuentra hasta los 1,800 msnm pero es más abundante a bajas elevaciones, principalmente debajo de los 1,000 msnm.



(1) Hábito; (2) Hoja y flores

Localidad: CEDA, USAC, zona 12

Fotografías por: Max Mérida

En Guatemala se encuentra en los departamentos de Petén, Alta Verapaz, Baja Verapaz, Izabal, Zacapa, Chiquimula, Jalapa, Santa Rosa, Escuintla, Guatemala, Suchitepéquez, Retalhuleu, Huehuetenango, San Marcos, Quetzaltenango, Quiché, México, Belice hasta El Salvador y Panama, las Antillas, Suramérica, trópicos del Viejo Mundo (Standley & Steyermark, 1952).

### **Composición química de la parte medicinal**

El extracto etanólico de las hojas posee alcaloides, saponinas, glucosidos, carbohidratos, taninos y compuestos fenólicos, flavonoides, proteínas y aminoácidos, esteroides y ligninas (Gupta, Pandey, Shah, Seth, & Yadav, 2011).

En hojas y raíces se han encontrado alcaloides como seperina, pelosina, deyamitina, cissampelina, dicentrina, cicleanina, hiatina, hiatinina e insularina (Actor, 2011). En raíces y partes aéreas se han encontrado también alcaloides cissampareina, warifteina, tetradina, quercitol, esterol, aceites esenciales y bases de amonio cuaternario (Singh et al., 2013).

Se ha aislado de las partes aéreas de la planta una chalcona flavonoide, a la cual se le asignó el nombre trivial de cissampeloflavona a la cual se le atribuye actividad antiprotozoaria (Ramirez et al., 2003).

### **Usos medicinales populares**

En muchas partes de América tropical tiene una gran reputación como remedio contra la mordedura de serpientes u otros animales ponzoñosos. Dieseldorff establece que en Cobán un extracto de las raíces es empleado para tratar las fiebres y en Petén es un remedio doméstico para tratar las erisipelas (Standley & Steyermark, 1952).

La pasta de sus raíces es utilizada externamente en fístulas, prurito y trastornos cutáneos; internamente es útil en la anorexia, indigestión, dolor abdominal, diarrea y disentería. Con frecuencia se prescribe para la tos, dispepsia, hidropesía, problemas urino-genitales tales como el colapso uterino, cistitis, hemorragia, menorragia y nefritis. Es utilizada además como un purificador de la sangre, en trastornos de la secreción de leche materna y por sus propiedades antiinflamatorias (Amresh, Reddy, Rao, & Singh, 2007).

### **Propiedades antiofídicas y medicinales demostradas**

El extracto alcohólico de las hojas ha demostrado inhibir la actividad hemolítica del veneno de la serpiente *Bothrops neuwiedi diporus* (Torres et al., 2007)

También ha mostrado que el extracto de esta especie posee actividad anti-hemorrágica y anti-proteolítica contra el veneno de *Bothrops asper* (revisado en Dey & Nath De, 2012).

Se ha demostrado que el extracto acuoso de esta especie posee la capacidad de reducir gradualmente los niveles de glucosa sanguínea, además de disminuir significativamente los niveles de aspartato aminotransferasa, alanina aminotransferasa, fosfatasa alcalina, bilirrubina total, triglicéridos y creatinina, así como el incremento del glucógeno hepático y proteínas séricas; en ratones con diabetes inducida a los cuales se les administró el extracto a una dosis de 250 y 500 mg/kg de peso durante 14 días (Singh et al., 2013).

El extracto etanólico demostró una potente actividad antiinflamatoria en diferentes modelos de inflamación (aguda exudativa, subcutánea y crónica proliferativa) inducida en ratas al ser administrado en dosis de 200 y 400 mg/kg (Amresh, Reddy, et al., 2007). También se ha demostrado que el extracto acuoso posee un efecto protector contra la artritis y el dolor inducido en ratones (Amresh, Singh, & Rao, 2007).

Sus raíces han demostrado una significativa actividad antibacteriana contra bacterias gram positivo en comparación con las gram negativo (Amresh, Rao, & Singh, 2007).

En un estudio realizado para medir la actividad antimalárica de algunas plantas medicinales de Kenya, se encontró que el extracto acuoso y metanólico de *C. pareira* posee actividad antiplasmodial con un IC<sub>50</sub> por debajo de 10µ/ml (Rukunga et al., 2009).

En ensayos antiprotozoarios realizados con la flavona cissampelo-flavona, aislada de esta especie, se encontró que esta posee una buena actividad contra *Trypanosoma cruzi* (forma intracelular) y *T. brucei rhodesiense* (forma extracelular), más no contra *Plasmodium falciparum* y *Leishmania donovani*. Se encontró además que esta flavona posee una baja actividad citotóxica sobre la línea celular KB (Ramirez et al., 2003).

El extracto de las hojas mostró efecto antiinfertilidad en ratones hembra, observándose que produce una alteración en la liberación de gonadotropinas y la secreción de estradiol (Ganguly, Kr, Devi, & Mahanta, 2007).

Se ha demostrado además que el extracto etanólico posee potentes radicales libres capaces de proteger contra el daño oxidativo a lípidos y proteínas, también mantiene los niveles de moléculas antioxidantes y enzimas *in vivo* (Amresh, Rao, et al., 2007).

### Otros usos de la planta

No se encontró información sobre otros usos.

### Efectos tóxicos de la planta

La evaluación de la toxicidad aguda y subaguda del extracto etanólico de esta especie demostró que luego de la administración oral de 2 g/kg no se produjo mortalidad ni cambios en el comportamiento o actividades fisiológicas en ratones, esto en el caso del ensayo de toxicidad aguda. En el ensayo de toxicidad subaguda no se observó toxicidad al administrar dosis diarias de 1 o 2 g/kg del extracto acuoso a ratas durante un periodo de 28 días (Amresh, Singh, & Rao, 2008).

### REFERENCIAS

- Actor, J. K. (2011). HERBAL MEDICINES WITH IMMUNOMODULATORY EFFECTS. In A. Dasgupta & C. A. Hammett-Stabler (Eds.), *Herbal Supplements: Efficacy, toxicity, interactions with western drugs, and effects on clinical laboratory tests*. (pp. 74–124). Houston, TX.: John Wiley & Sons, Inc.
- Amresh, G., Rao, C. V., & Singh, P. N. (2007). Antioxidant activity of *Cissampelos pareira* on benzo(a)pyrene-induced mucosal injury in mice. *Nutrition Research*, 27(10), 625–632. doi:10.1016/j.nutres.2007.05.009
- Amresh, G., Reddy, G. D., Rao, C. V., & Singh, P. N. (2007). Evaluation of anti-inflammatory activity of *Cissampelos pareira* root in rats. *ETHNO-PHARMACOLOGY*, 110, 526–531. doi:10.1016/j.jep.2006.10.009
- Amresh, G., Singh, P. N., & Rao, C. V. (2008). Toxicological screening of traditional medicine *Laghupatha* (*Cissampelos pareira*) in experimental animals. *Journal of Ethnopharmacology*, 116(3), 454–60. doi:10.1016/j.jep.2007.12.008
- Amresh, G., Singh, P. N., & Rao, C. V. (2007). Antinociceptive and antiarthritic activity of *Cissampelos pareira* roots. *Journal of Ethnopharmacology*, 111(3), 531–6. doi:10.1016/j.jep.2006.12.026
- Coe, F. G., & Anderson, G. J. (2005). Snakebite ethnopharmacopoeia of eastern Nicaragua. *Journal of Ethnopharmacology*, 96, 303–323. doi:10.1016/j.jep.2004.09.026
- Dey, A., & Nath De, J. (2012). Phytopharmacology of Antiophidian Botanicals: A Review. *International Journal of Pharmacology*, 2(8), 62–79. doi:10.3923/ijp.2012.62.79.

- Ganguly, M., Kr, M., Devi, N., & Mahanta, R. (2007). Antifertility activity of the methanolic leaf extract of *Cissampelos pareira* in female albino mice. *ETHNO-PHARMACOLOGY*, 111, 688–691. doi:10.1016/j.jep.2007.01.023
- Gupta, A., Pandey, S., Shah, D. R., Seth, N. R., & Yadav, J. S. (2011). Pharmacognostical and Phytochemical Evaluation of Leaves of *Cissampelos pareira*. *Pharmacognosy Journal*, 3(21), 25–28. doi:10.5530/pj.2011.21.4
- Hay, Y., Cleaves, C., & Cáceres, A. (sf). Medicinal plants used to heal snakebites in Guatemala, Universidad de San Carlos de Guatemala, 2-4 pp.
- Ramirez, I., Carabot, A., Meléndez, P., Carmona, J., Jimenez, M., Patel, A. V., ... Costa, M. (2003). Cissampeloflavone , a chalcone-flavone dimer from *Cissampelos pareira*. *Phytochemistry*, 64, 645–647. doi:10.1016/S0031-9422(03)00241-3
- Rukunga, G. M., Gathirwa, J. W., Omar, S. a, Muregi, F. W., Muthaura, C. N., Kirira, P. G., ... Kofi-Tsekpo, W. M. (2009). Anti-plasmodial activity of the extracts of some Kenyan medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 121(2), 282–5. doi:10.1016/j.jep.2008.10.033
- Singh, K., Prasad, N., Shanker, K., Thomas, S. C., Srivastav, S., Srivastava, S., ... Sinha, P. (2013). Assessment of antidiabetic potential of *Cissampelos pareira* leaf extract in streptozotocin e nicotinamide induced diabetic mice. *JOPR: Journal of Pharmacy Research*, 6(8), 874–878. doi:10.1016/j.jopr.2013.06.027
- Standley, P.C. & Steyermark, J.A. (1946). Flora of Guatemala. *Fieldiana: Botany*, 24(3), 260-261
- Torres, A. M., Camargo, F., Ricciardi, G. A. L., Dellacassa, E., Ricciardi, A. I. A., Pareira, C., ... Cope, D. (2007). ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIHEMOLÍTICA IN VITRO DE EXTRACTOS DE *Cissampelos pareira* CONTRA VENENO DE *Bothrops neuwiedi* diporus (Cope) (yarára chica). *Redalyc*, 6(5), 280–281.

### Anexo 5

**Tabla 5. Actividad fosfolipasa A<sub>2</sub> del veneno de *B. asper***

<b>Veneno (μg)</b>	<b>Actividad fosfolipasa A<sub>2</sub> (μEq/mg.min)</b>
1.562	46.08 ± 9
3.125 <sup>a</sup>	30.72 ± 5
6.25	20.16 ± 2
12.5	12.72 ± 1
25	7.92 ± 0.3

La actividad fosfolipasa A<sub>2</sub> del veneno se cuantificó incubando diferentes dosis de veneno con fosfatidilcolina de yema de huevo como sustrato. Los ácidos grasos liberados se extrajeron y titularon según se describe en materiales y métodos (Dole, 1956). La actividad fosfolipasa A<sub>2</sub> del veneno se expresa como μEq de ácido graso liberado por mg de proteína por minuto. Los resultados se presentan como la media ± DS (n=3) de 3 experimentos independientes. <sup>a</sup>Dosis reto seleccionada.

## Anexo 6

**Tabla 6. Determinación de la actividad proteolítica sobre azocaseína del veneno de *B. asper*.**

Veneno ( $\mu\text{g}$ )	Absorbancia a 450 nm <sup>a</sup>	U/ $\mu\text{g}$ veneno <sup>b</sup>
100	1.055 $\pm$ 0.051	1.055 $\pm$ 0.051
50	0.962 $\pm$ 0.095	1.925 $\pm$ 0.191
25 <sup>c</sup>	0.721 $\pm$ 0.059	2.884 $\pm$ 0.235
12.5	0.513 $\pm$ 0.036	4.104 $\pm$ 0.286
6.25	0.377 $\pm$ 0.021	6.027 $\pm$ 0.336
3.125	0.266 $\pm$ 0.017	8.501 $\pm$ 0.528
0.78	0.148 $\pm$ 0.035	19.017 $\pm$ 4.533

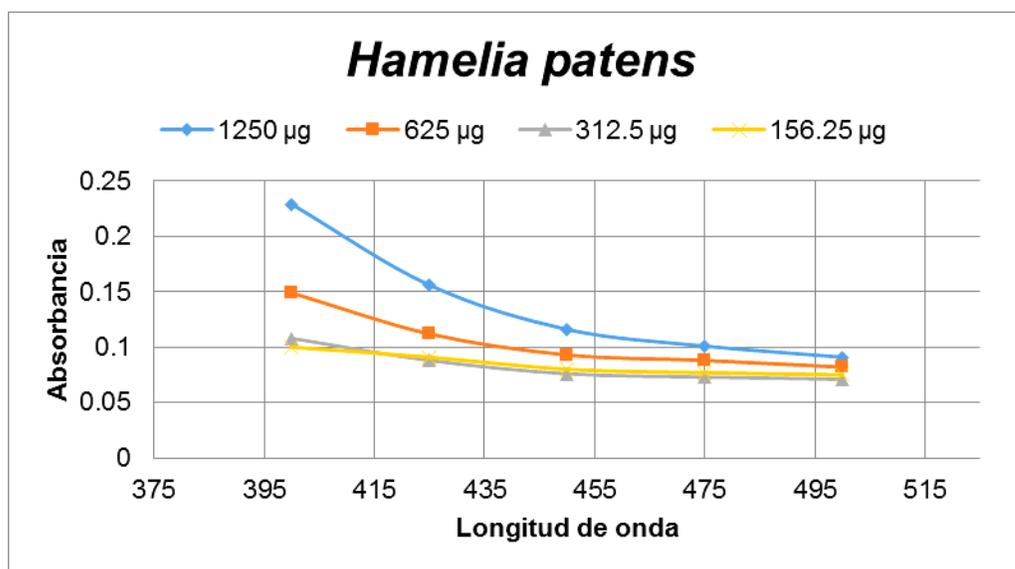
La actividad proteolítica del veneno se estudió incubando diferentes dosis de veneno con azocaseína por 90 min. Se determinó la cantidad de los productos de degradación del sustrato midiendo la absorbancia del sobrenadante a 450 nm. Los resultados de 3 experimentos independientes en triplicado se presentan como <sup>a</sup>la media de la absorbancia  $\pm$  DS (n=3); o <sup>b</sup>como Unidades/ $\mu\text{g}$  de veneno  $\pm$  DS (n=3), dividiendo el cambio de absorbancia producido en 90 min por los  $\mu\text{g}$  de veneno presentes en el tubo y multiplicando por 100. <sup>c</sup>Dosis reto seleccionada.

## Anexo 7

### Determinación de espectros de absorción de extractos vegetales para realización del ensayo de actividad proteolítica sobre azocaseína

Se presentan las gráficas que muestran el espectro de absorción de cada uno de los extractos etanólicos evaluados en el estudio a cuatro diferentes concentraciones, como se describió en materiales y métodos.

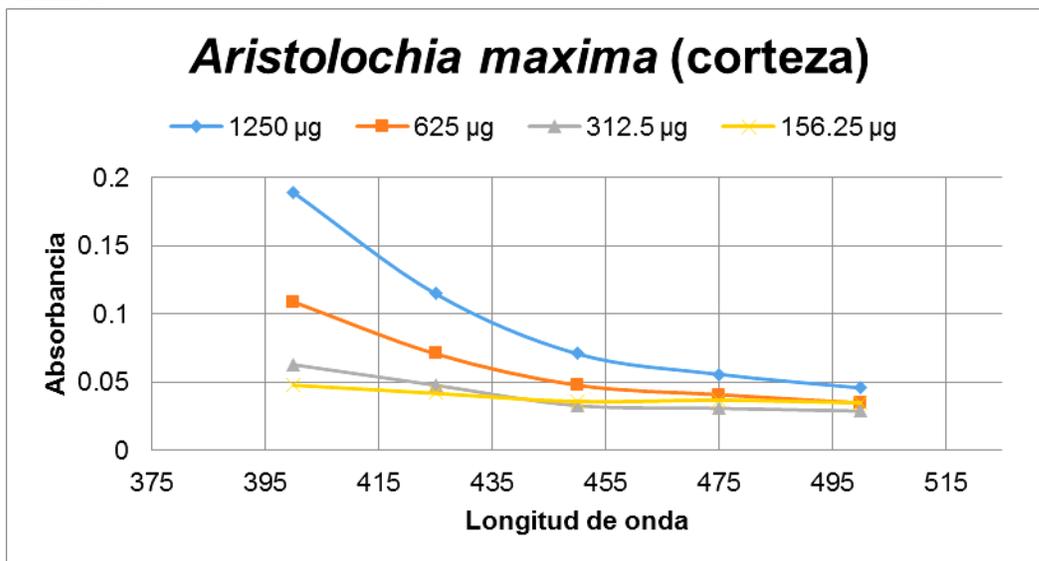
Gráfica 4. Espectro de absorción del extracto de *Hamelia patens*



Fuente: datos experimentales, proyecto.

Los colores representan las diferentes concentraciones de extracto evaluadas.

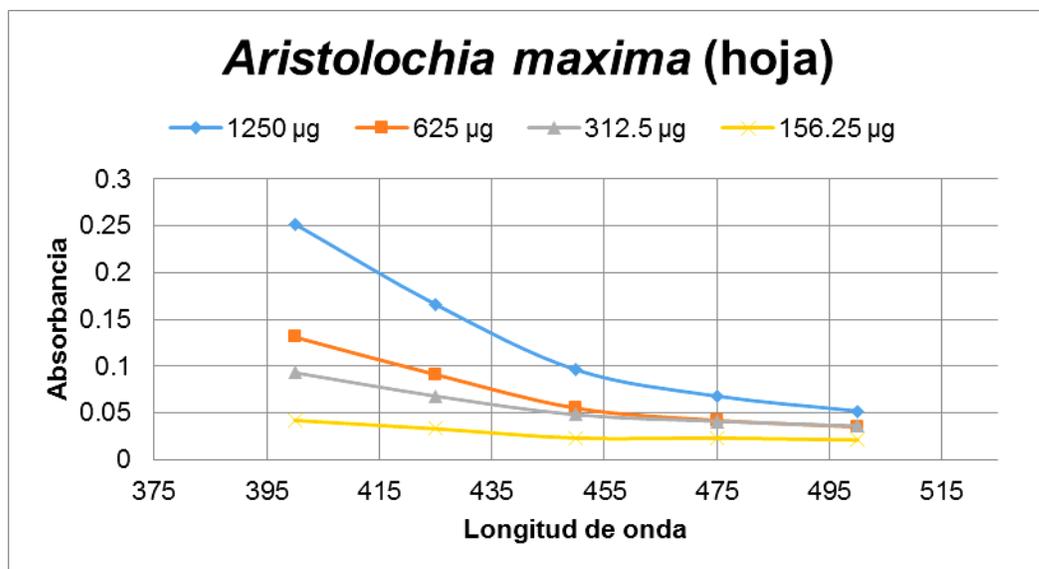
**Gráfica 5. Espectro de absorción del extracto de corteza de *Aristolochia maxima***



Fuente: datos experimentales, proyecto.

Los colores representan las diferentes concentraciones de extracto evaluadas.

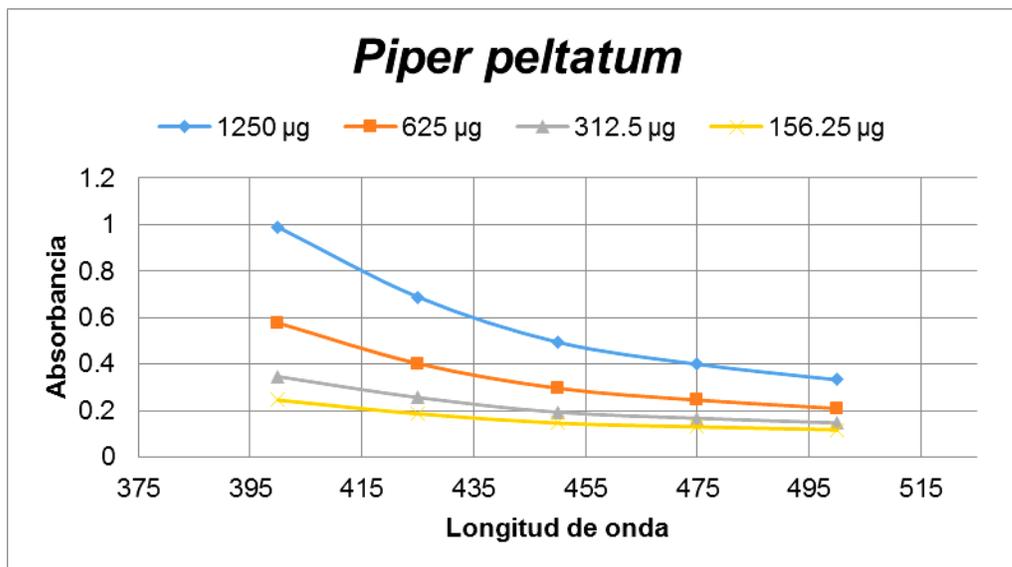
**Gráfica 6. Espectro de absorción del extracto de hoja de *Aristolochia maxima***



Fuente: datos experimentales, proyecto.

Los colores representan las diferentes concentraciones de extracto evaluadas.

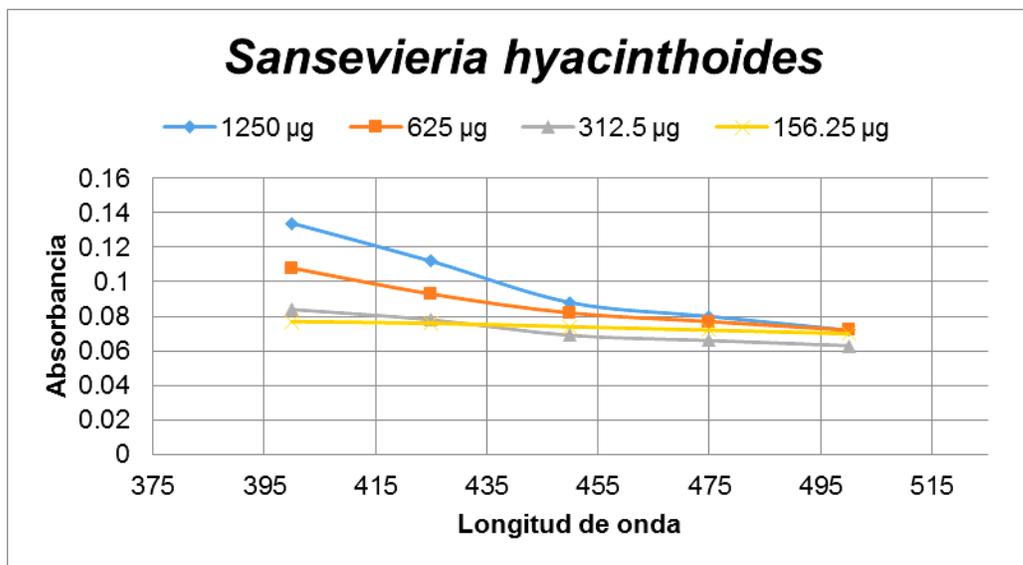
**Gráfica 7. Espectro de absorción del extracto de *Piper peltatum***



Fuente: datos experimentales, proyecto.

Los colores representan las diferentes concentraciones de extracto evaluadas.

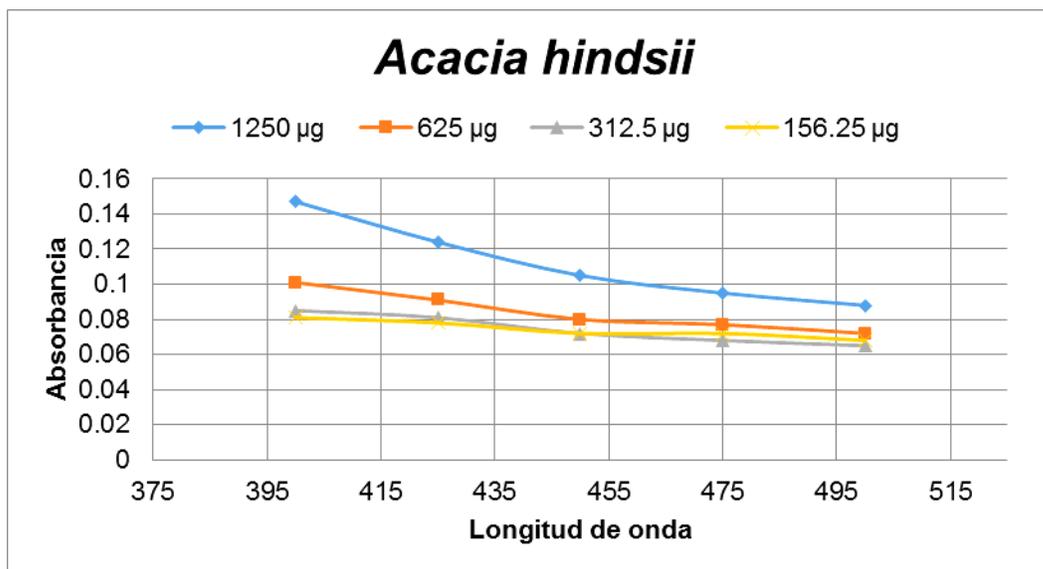
**Gráfica 8. Espectro de absorción del extracto de *Sansevieria hyacinthoides***



Fuente: datos experimentales, proyecto.

Los colores representan las diferentes concentraciones de extracto evaluadas.

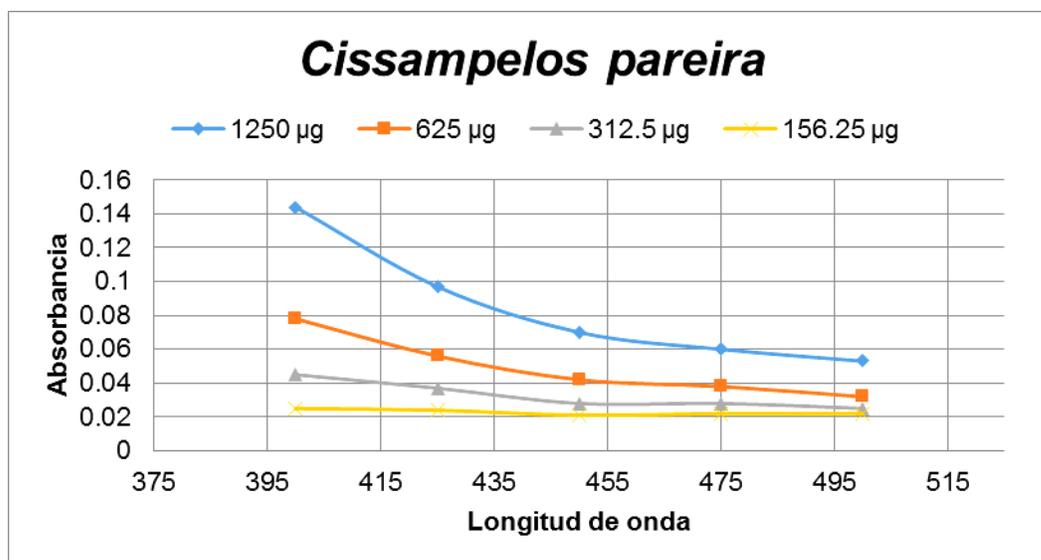
**Gráfica 9. Espectro de absorción del extracto de *Acacia hindsii***



Fuente: datos experimentales, proyecto.

Los colores representan las diferentes concentraciones de extracto evaluadas.

**Gráfica 10. Espectro de absorción del extracto de *Cissampelos pareira***



Fuente: datos experimentales, proyecto.

Los colores representan las diferentes concentraciones de extracto evaluadas.

Todas las disoluciones de los extractos etanólicos evaluados presentaron la mayor absorbancia 400 nm, observándose su disminución a medida que se incrementaba la longitud de onda le lectura (de 400 a 500 nm).

## Anexo 8

### Carta donación de veneno

San José, 26 de mayo de 2014

Dra. Patricia Saravia  
Departamento de Bioquímica  
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia  
Universidad de San Carlos de Guatemala

Por medio de la presente hago entrega de una donación de veneno liofilizado de *Bothrops asper* obtenido del serpentario de Instituto Clodomiro Picado, Universidad de Costa Rica, consistente en dos viales de veneno liofilizado. El veneno donado no posee valor comercial.

Esta donación se entrega como parte del trabajo colaborativo realizado por ambas instituciones, de manera específica para llevar a cabo experimentos del proyecto "Evaluación de la capacidad neutralizante de extractos de plantas de uso popular en Guatemala como antídotos para el envenenamiento por mordedura de la serpiente *Bothrops asper*", el cual se encuentra en ejecución.

Atentamente,

Dr. José María Gutiérrez  
Subdirector  
Instituto Clodomiro Picado  
Universidad de Costa Rica

**Anexo 9****Certificado visita académica al ICP, abril 2014**

San José, 8 de abril del 2014

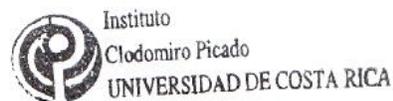
A quien corresponda:

Por este medio certifico que, durante la última semana, hemos tenido reuniones de coordinación científica con la Dra Patricia Saravia Otten, de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala. Estas reuniones se han efectuado en el Instituto Clodomiro Picado, de la Universidad de Costa Rica, y en las mismas hemos coordinado actividades de investigación conjunta que se desarrollan entre nuestros grupos. Así mismo, hemos discutido posibles proyectos de investigación futuros, con el objetivo de consolidar los vínculos académicos entre nuestras instituciones.

Agradeciendo de antemano la atención que se le brinde a la presente, se despide.

Atentamente,

  
Dr. José María Gutiérrez G.  
Subdirector  
Instituto Clodomiro Picado  
Universidad de Costa Rica



## Anexo 10

### Certificado colaboración–vinculación Dr. Gutiérrez.



26 de noviembre del 2014

A quien corresponda:

Por este medio certifico que participé activamente, como colaborador internacional, en el proyecto de investigación titulado “**Evaluación de la capacidad neutralizante de extractos de plantas de uso popular en Guatemala como antídotos para el envenenamiento por mordedura de la serpiente *Bothrops asper***”, proyecto que fue coordinado por la Dra Patricia Saravia Otten, de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

Esta colaboración académica entre el grupo que coordina la Dra Saravia y nuestro grupo en el Instituto Clodomiro Picado, de la Universidad de Costa Rica, forma parte de una ya extensa saga de colaboraciones científicas que datan de más de una década. Para mí en lo particular, y para el instituto en el que trabajo en general, fue muy provechosa la oportunidad de colaborar nuevamente con esta investigación.

Sin otro particular, agradezco la atención a la presente.

Atentamente,

A handwritten signature in black ink, appearing to read "José María Gutiérrez".

José María Gutiérrez  
División Académica  
Instituto Clodomiro Picado

## Anexo 11

**Tabla 7. Material colectado por estudiantes de la carrera de Química Farmacéutica para realizar su seminario de graduación.**

Nombre común	Nombre científico Familia	Lugar de colecta Coordenadas Altitud	Fecha de colecta	Parte de la planta colectada	Peso fresco (kg)	Peso seco (kg)
Tres puntas	<i>Neurolaena lobata</i> (L.) Cass. (Asteraceae)	Facultad de Agronomía, CEDA, Campus central, USAC, zona 12 N 14° 34' 48.41" W 90° 33' 14.29" 1, 475 msnm	20/3/14	Hojas	4.74	1.13
Contrahierba	<i>Dorstenia contrajerba</i> L. (Moraceae)	Ecoparcela El Kakawatal, municipio de Samayac, Suchitepéquez. N 14° 33' 06.4" W 091° 27' 58.3" 487 msnm	3 /5 /14	Hojas	0.53	0.05
Baq che´	<i>Eupatorium odoratum</i> L. (Asteraceae)	Zona 6 de Cobán, Alta Verapaz. N 15°27'58.5" W 90°23'14.9" 1400 msnm	19/10/14	Hojas	2.9	0.9

El material vegetal de las tres plantas adicionales que se estudiarán en el seminario de graduación fue colectado por los estudiantes participantes bajo la supervisión del Lic. Max Mérida.

## Anexo 12

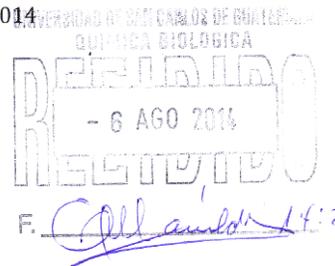
### Carta inicio seminario de graduación estudiantes de la carrera de Química Farmacéutica. Vinculación Unidad de Biología Celular con LIPRONAT.



Ciudad Universitaria, Zona 12  
Edificio T-12, Segundo Nivel  
Guatemala, Centroamérica

Ref.E.Q.F.357.08.2014  
05 de agosto de 2014

Doctora  
Patricia Saravia  
Departamento de Bioquímica  
Escuela de Química Biológica  
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia



Estimada Dra. Saravia:

Atentamente me dirijo a usted, en relación su oficio EQB.399.07.2014, referente a la participación de tres estudiantes de esta escuela en el proyecto titulado: **"Determinación de la capacidad neutralizante de mezclas de plantas usadas en Guatemala como antídotos para la mordedura de serpiente"**.

Al respecto le informo que esta Dirección de Escuela, autoriza el desarrollo del trabajo de investigación, asesorado por usted, con la participación de tres estudiantes de esta escuela, quienes realizarán su opción de graduación en modo de seminario. Siendo los siguientes.

Jaqueline Lourdes Alvarado Cárdenas	Carné 200910680
Rossana Judith Navarizo García	Carné 201013440
Michael Javier Mo Leal	Carné 201021700

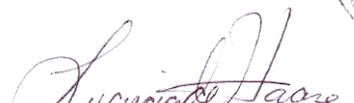
Dicho seminario estará siendo asesorado por los siguientes profesionales:

Asesora: Dra. Patricia Saravia  
Asesora: M.Sc. Rosario Hernández  
Co-asesora: Dra. Sully Cruz

Aprovecho la oportunidad para felicitarla y exhortarla a continuar con ese entusiasmo y dedicación en la línea de trabajos de investigación.

Cordialmente,

"ID Y ENSEÑAD A TODOS"

  
Licda. Lucrecia Martínez de Haase  
DIRECTORA  
ESCUELA DE QUIMICA FARMACEUTICA



LMdeH/Vilma

## Anexo 13

### Trabajo de investigación estudiantes de Bioquímica, Química

#### Determinación de la actividad coagulante y anticoagulante de fracciones orgánicas, tintura etanólica e infusión de *Neurolaena lobata* y *Dorstenia contrajerva* Resultados preliminares

#### Estudiantes del curso de Bioquímica, carrera de Química

##### Grupo *Neurolaena lobata*

Francisco Gabriel Cuellar A.  
Ana Delmi Castañeda F.  
Ricardo Antonio Posadas V.  
Belter Isaí Trinidad R.  
Lester Iván Lemus  
Jonathan José Racancoj L.  
Moisés Berducido

##### Grupo *Dorstenia contrajerva*

Fermín Estudardo Labín M.  
María Celeste Pelayes G.  
Alba Elena S. Toledo H.  
Diego Rodolfo Roesch M.  
Edgar Guillermo Contreras C.  
Rony José Letona L.

#### Profesora

Licda. Rosario Hernández, Departamento de Bioquímica.

#### Colaboradores

Dra. Patricia Saravia, Departamento de Bioquímica.  
Licda. Nohemí Orozco, Departamento de Química Orgánica.  
Lic. Rodolfo Orozco, Departamento de Fisicoquímica.  
Dra. Sully Cruz, Departamento de Farmacognosia y Fitoquímica, LIPRONAT.  
Licda. Nereida Marroquín, Departamento de Farmacognosia y Fitoquímica, LIPRONAT.  
Lic. Max Mérida, LIPRONAT.  
Br. Gabriela Hernández, Departamento de Bioquímica.  
Br. Sofía Marroquín Tinti, LIPRONAT.

## Descripción

Como parte de las actividades del curso de Bioquímica, los estudiantes de la carrera de Química desarrollan cada año en el laboratorio un trabajo de investigación.

Durante el segundo semestre del año 2014, evaluaron la actividad coagulante y anticoagulante de *N. lobata* y *D. contrajerva*, plantas utilizadas en la región norte del país en el tratamiento de la mordedura de serpiente (Saravia 2001 a). Estudios previos llevados a cabo por Saravia y colaboradores (2001 a), demostraron que los extractos etanólicos y acuosos de dichas plantas presentaban efecto sobre la cascada de la coagulación. La intención de este tamizaje fue realizar un fraccionamiento orgánico sencillo, generando tres fracciones de polaridad creciente: ciclohexano, acetato de etilo y etanol, las cuáles permitieran establecer las condiciones de polaridad en las cuales se encuentra presente la actividad previamente observada, para proponer así las familias de metabolitos en las cuales pudiera encontrarse la molécula responsable de dicha actividad.

## Metodología

Recolección de especies vegetales: las especies vegetales fueron colectadas en la Universidad de San Carlos de Guatemala (*N. lobata*) y en la Finca Sabana Grande (*D. contrajerva*), contando con el permiso de las autoridades responsables de la Facultad de Agronomía. La identificación y recolección de la planta fue supervisada por el Lic. Max Mérida, quién acompañó a los estudiantes durante el proceso de recolección y asesoró en cuanto a la identificación y recolección de la planta.

Preparación fracciones orgánicas: las hojas fueron secadas de 35 a 40° en horno, hasta observar un porcentaje de humedad menor de 5 % (peso). El material seco fue molido y tamizado (Sarker, Latif & Gray 2006).

Extracción fraccionada de principios vegetales por método de maceración: se pesaron 15 g de material seco y se adicionó ciclohexano hasta cubrirlo por completo, se mantuvo en agitación por 2 horas y se dejó reposar por 24 h; luego se separó la fracción y se recolectó en un frasco ámbar; este procedimiento se repitió 2 veces. Al terminar la extracción con ciclohexano, el material vegetal se dejó secar durante la noche (campana de extracción), se agregó acetato de etilo y se repitió la extracción durante tres días, finalmente la última fracción se obtuvo con etanol absoluto siguiendo el mismo procedimiento. Las tres fracciones orgánicas fueron concentradas por rotavapor, la última parte de solvente fue evaporada por baño de María hasta obtener una sustancia pastosa (Sarker, Latif & Gray, 2006).

Cada una de las fracciones orgánicas fue disuelta en PBS – Tween 80 al 5 % (v/v), siguiendo el protocolo utilizado en la Unidad de Biología Celular. La disolución fue almacenada a 4° hasta su uso.

Preparación tintura etanólica: se pesaron 15 g de material vegetal y se cubrieron con etanol (frasco ámbar), esta mezcla se dejó reposar por 15 días a temperatura ambiente. La tintura se separó por filtración y se almacenó en frasco ámbar hasta su uso (Sharapin, 2000).

Preparación infusión acuosa: se pesaron 5 g de material vegetal, y se les adicionó 70 ml de agua hirviendo. Se cubrió y se dejó reposar hasta enfriar (temperatura ambiente). La infusión se filtró para separar el material vegetal y se utilizó inmediatamente (Saravia, 2001).

Evaluación de la actividad coagulante: para cada fracción se evaluó únicamente la concentración de 5 mg/ml, la tintura etanólica y la infusión acuosa fueron evaluadas a la condición a la que fueron preparadas.

Se obtuvieron 5 ml de plasma humano citratado, el cual fue diluido 1:10 con PBS pH 7.2. En tubos de ensayo se colocaron 200 µl de plasma diluido y se incubó por 2 minutos en baño de María a 37°C. Manteniendo los tubos en baño de María, se agregaron 100 µl de cada una de las sustancias a evaluar (fracciones orgánicas, tintura etanólica, infusión acuosa, PBS pH 7.2 como control negativo y trombina como control positivo), y se observó de forma constante durante el primer minuto anotándose el tiempo requerido para la formación de un coagulo evidente, de no observarse formación del coagulo en ese tiempo, los tubos se mantuvieron en baño de María y se observaron a los 5, 10, 15 y 30 minutos (Dade Behring). Cada ensayo se realizó por triplicado.

Evaluación de la actividad anticoagulante: para cada fracción se evaluó la concentración de 5 mg/ml, la tintura etanólica y la infusión acuosa fueron evaluadas a la condición a la que fueron preparadas.

En tubos de ensayo se mezclaron 350 µl de cada una de las sustancias a evaluar (fracciones orgánicas, tintura etanólica, infusión acuosa), con 350 µl de trombina (Saravia 2001). Como control negativo se utilizó 700 µl de PBS – Tween al 5 % y como control positivo 350 µl de PBS – Tween 80 al 5 % con 350 µl de trombina. Todas las mezclas fueron incubadas por 30 minutos a 37°C en baño de María.

Al terminar la incubación, en tubos de ensayo se colocaron 200 µl de plasma diluido 1:10 (37°C), los cuales fueron incubados por 2 minutos en baño de María. Luego se adicionaron 100 µl de cada una de las mezclas previamente incubadas y la actividad coagulante fue evaluada como fue descrito anteriormente (Dade Behring).

El tiempo de coagulación corresponde al tiempo necesario para la formación de un coágulo evidente a 37°C, se consideró incoagulable el plasma que no presentó formación de un coágulo evidente en 30 minutos (37°C).

## Resultados y discusión

### Evaluación de la actividad coagulante

Tabla 1. Determinación del efecto coagulante intrínseco de *N. lobata* y *D. contrajerva*.

Planta (concentración)	Tiempo de coagulación (minutos) para las fracciones evaluadas				
	Fracción orgánica		E	Tintura etanólica*	Infusión acuosa*
CH	AE				
<i>N. lobata</i> (5 mg/ml)	Incoagulable después de 30 minutos	15	Incoagulable después de 30 minutos	Incoagulable después de 30 minutos	15
(2.5 mg/ml)	Incoagulable después de 30 minutos	28	Incoagulable después de 30 minutos	--	--
<i>D. contrajerva</i> (5 mg/ml)	21	Incoagulable después de 30 minutos	Incoagulable después de 30 minutos	Incoagulable después de 30 minutos	22
(2.5 mg/ml)	Incoagulable después de 30 minutos	Incoagulable después de 30 minutos	Incoagulable después de 30 minutos	--	--

CH: ciclohexano, AE: acetato de etilo, E: etanol, \* evaluado a la concentración original a la que se preparó.

Se utilizó trombina como control positivo, observándose coagulación en 10 segundos; y PBS – Tween 80 al 5 % como control negativo, observándose incoagulable a los 30 minutos. Los valores reflejan el tiempo de coagulación promedio observado en tres repeticiones.

La actividad coagulante observada en ambas plantas fue leve, sin embargo, permitió establecer la presencia de compuestos de diferente polaridad responsables de la actividad observada en cada una de las plantas estudiadas. Para el extracto de *N. lobata*, la actividad observada se observó en la fracción de acetato de etilo, considerándose que la misma corresponde a compuestos de polaridad intermedia como alcaloides, flavonoides, entre otros (Sarker, Latif & Gray, 2006). Para *N. lobata* se ha reportado la presencia de varias sesquiterpeno lactonas con actividades farmacológicas (Walshe-Roussel, 2013), pudiéndose considerar este grupo de compuestos como los posibles responsables de la actividad observada en la fracción extraída con acetato de etilo.

Con respecto a *D. contrajerva*, la actividad se detectó en la fracción obtenida con ciclohexano; entre los compuestos observados con frecuencia en las fracciones apolares se encuentran: alcanos, ácidos grasos, pigmentos, ceras, esteroides, terpenoides, alcaloides y cumarinas (Sarker, Latif & Gray, 2006).

Estudios previos han reportado la presencia de compuestos de la familia de las cumarinas en *D. contrajerva* (Cáceres, 2001), por lo que podría considerarse que la actividad reportada se puede atribuir a este grupo de compuestos.

### Evaluación de la actividad anticoagulante

Tabla 2. Determinación del efecto anticoagulante intrínseco de *N. lobata* y *D. contrajerva*.

Planta (concentración)	Tiempo de coagulación (segundos) para las fracciones evaluadas				
	Fracción orgánica			Tintura etanólica	Infusión acuosa
	CH	AE	E		
<i>N. lobata</i> (5 mg/ml)	20	20	20	20	20
<i>D. contrajerva</i> (5 mg/ml)	20	Ind.	20	20	20

CH: ciclohexano, AE: acetato de etilo, E: etanol, Ind: indeterminada.

Se utilizó trombina como control positivo, observándose coagulación en 10 segundos; y PBS – Tween 80 al 5 % como control negativo, observándose incoagulable a los 30 minutos. Los valores reflejan el tiempo de coagulación promedio observado en tres repeticiones.

La fracción de acetato de etilo de *D. contrajerva* presentó la formación de una película, interpretada como red de fibrina, en el ambiente acuoso evaluado. Sin embargo, para esta fracción, no se observó la formación de un coagulo evidente durante el tiempo que duró el experimento, por lo que se consideró la posibilidad de que los componentes de la misma puedan inactivar la trombina, alterando así su capacidad coagulante del plasma citratado.

Debido a que el presente estudio permitió realizar únicamente un tamizaje general de la actividad de las fracciones evaluadas, no fue posible establecer con mayor certeza la identidad de los compuestos responsables. Sin embargo, partiendo de los resultados preliminares obtenidos en este tamizaje se propone realizar en el futuro estudios que permitan un fraccionamiento más específico de los componentes de las plantas estudiadas, así como la separación e identificación de los componentes de cada fracción, su purificación y posterior evaluación.

### Conclusiones

1. Las fracciones de acetato de etilo (ambas concentraciones), de *N. lobata* y la ciclohexánica (5 mg/ ml), de *D. contrajerva* presentaron efecto coagulante leve sobre plasma humano citratado.
2. La actividad coagulante se mantuvo presente en la infusión acuosa para ambas plantas.
3. No se observó efecto anticoagulante en las fracciones, tintura etanólica o infusión acuosa de *N. lobata*.

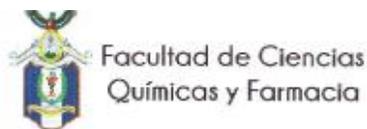
4. La incubación de trombina con la fracción de acetato de etilo (5 mg/ml) de *D. contrajerva* no permitió la formación de un coágulo evidente, observándose únicamente una red de fibrina.

## Referencias

- Cáceres, A., Rastrelli, L., De Simone, F., De Martino, G., Saturnino, C., Saturnino, P., & Aquino, R. (2001). Furanocoumarins from the aerial parts of *Dorstenia contrajerva*. *Fitoterapia*, 72: 376-381.
- Dade Behring. Dade® Fibrinogen Determination Reagents. Doc. Tec.
- Saravia, P., Cáceres, A., Velásquez, R., & Lara, O. (2001a) Plantas con actividad antiofídica en Guatemala. I. Identificación y evaluación de su capacidad neutralizante. FODECYT 47-99.
- Satyajit, D., Latif, S. Z., & Gray A. I. Eds. (2006). *Methods in Biotechnology™ Natural Products*. (2<sup>nd</sup> ed.). New Jersey, Humana Press.
- Sharapin N. (2000). *Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos*. Convenio Andrés Bello.
- Swain, L., Quirke, J., Winkle, S., & Downum, K. (1991). A Furanocoumarin from *Dorstenia contrajerva*. *Phytochemistry*, 30(12), 4196-4197.
- Walshe-Roussel, B., Choueiri, C., Saleem, A., Asim, M., Caal, F., Cal, V. ... Arnason, J. T. (2013). Potent anti-inflammatory activity of sesquiterpene lactones from *Neurolaena lobata* (L.) R. Br. ex Cass., a Q'eqchi' Maya traditional medicine. *Phytochemistry*, 92: 122-127.

## Anexo 14

Diploma de presentación oral en Semana Científica de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Instituto de Investigaciones Químicas y Biológicas, IIQB, septiembre 2014.



EL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICAS Y BIOLÓGICAS  
DE LA FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA  
DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

Otorgan el presente reconocimiento a:

**Dra. Patricia Saravia**

Por haber participado en la Jornada Científica 2014 con la conferencia "Evaluación de la capacidad neutralizante de extractos de plantas de uso popular en Guatemala como antídotos para el envenenamiento por mordedura de la serpiente *Bothrops asper*", el día martes 9 de septiembre de 2014.

Id y Enseñad a Todos

Guatemala de la Asunción, septiembre de 2014

Dr. Óscar Cobar  
DECANO



Dr. Roberto Flores Arzu  
DIRECTOR IIQB



## Anexo 15

**Diplomas conferencias dictadas a estudiantes de que iniciaron Ejercicio Profesional Supervisado (EPS) durante el primer semestre del 2015. Carreras: Química Biológica y Química Farmacéutica.**

Universidad de San Carlos de Guatemala  
 Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia  
 Programa de Experiencias Docentes con la Comunidad  
 Subprograma de Ejercicio Profesional Supervisado de Química Farmacéutica



**Otorgan el presente diploma a:**

***Ph.D. Patricia Saravia***

Por su participación como:

***Conferencista***

Durante el desarrollo de la XLVI Jornada Científica

**“LOS RETOS DEL QUÍMICO FARMACÉUTICO  
 ANTE EL EJERCICIO DE LA PROFESIÓN”**

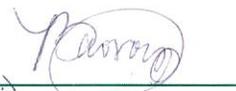
Dado en la Ciudad de Guatemala, el 01 de diciembre de 2014.

*“Id y enseñad a todos”*

  
 Licda. Liliانا Vides  
 Directora

Programa de Experiencias  
 Docentes con la Comunidad –EDC-



  
 MSc. Bessie A. Orozco  
 Supervisora de EPS de  
 Química Farmacéutica

  
 Br. Claudia Calderón  
 Coordinadora  
 Jornada Científica



UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
 FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA  
 PROGRAMA DE EXPERIENCIAS DOCENTES CON LA COMUNIDAD - EDC  
 SUB-PROGRAMA DE EJERCICIO PROFESIONAL SUPERVISADO - EPS



Otorga el presente reconocimiento a:

**MSC. ROSARIO DÁMARIS HERNÁNDEZ**

Por su valiosa colaboración en como Conferencista en el tema:  
**“Identificación, prevención y tratamiento de  
 mordeduras de serpientes venenosas en Centro América”**  
 Impartida a los alumnos que se encuentran realizando su EPS en diferentes  
 Hospitales Nacionales del país.

Dado en la ciudad de Guatemala, el día 01 de  
 Diciembre del año 2,014.

*Liliana Vides*  
 Licda. Liliana Vides  
 Directora Programa de EDC



*David A. Mendez*  
 Lic. David A. Mendez  
 Supervisor EPS - Química Biológica



## Anexo 16

### Trifoliar informativo entregado a supervisores de EPS y Directora del CIAT.

#### ACCIDENTE OFÍDICO

La mordedura de serpiente se considera una condición médica seria que afecta principalmente a personas que viven en áreas rurales en diversas regiones en el mundo.<sup>1</sup> A nivel mundial se reportan más de 5 millones de accidentes anuales.<sup>1,2</sup> En Centro América la magnitud del problema es difícil de determinar. Se estima que ocurren 15 casos por 100,000 habitantes al año en Costa Rica, Guatemala, Nicaragua y Honduras; sin embargo, debido a que los eventos que se presentan con frecuencia en regiones lejanas a centros urbanos, puede existir un porcentaje importante de subregistros.<sup>3</sup>

#### ESPECIES DE IMPORTANCIA EN LA REGIÓN, FISIOPATOLOGÍA DEL ENVENENAMIENTO

En Guatemala se reportan 21 especies de serpientes venenosas que pertenecen a las familias Elapidae y Viperidae.<sup>2</sup> Las de la familia Elapidae incluyen diversas especies de corales y la serpiente de mar.<sup>2</sup> Sus venenos son considerados "neurotóxicos", ya que afectan la región que une al músculo con el nervio, provocando parálisis muscular. Los efectos locales son poco evidentes, siendo más importantes los efectos sistémicos que se observan generalmente de 5 a 6 horas después de la mordedura y que pueden llegar a causar la muerte.<sup>4</sup>

En Centro América las serpientes de la familia Viperidae, entre las cuales se encuentra la "barba amarilla" (*Bothrops asper*), son responsables de la mayor parte de accidentes ofídicos reportados.<sup>2,3</sup> Las serpientes *B. asper* presentan colmillos grandes, retráctiles, que permiten inyectar cantidades

considerables de veneno.<sup>5</sup> Estos envenenamientos se caracterizan por presentar cuadros muy severos en sitio de la mordedura, observándose daños locales inmediatos (hinchazón, hemorragia, dolor, destrucción del tejido). También se producen efectos generalizados o "sistémicos" (hemorragia sistémica, daño renal, shock hipovolémico). Ambos tipos pueden llegar a poner en riesgo la vida de la persona envenenada.<sup>2,5,6</sup>

#### Distribución de serpiente "barba amarilla" (*Bothrops asper*) en territorio guatemalteco.

Figura tomada del *Manual para la identificación, prevención y tratamiento de mordeduras de serpientes venenosas en Centro América*. Volumen I: Guatemala (2009), OPM, OMS, MSPAS USAC.



#### TRATAMIENTO

Para iniciar el tratamiento es necesario reconocer y diferenciar las manifestaciones clínicas de un envenenamiento por serpientes de la familia Elapidae o Viperidae. Por ello es de gran valor la información que se pueda aportar sobre la serpiente responsable de la mordedura. Si no se cuenta con los datos, la observación clínica de los síntomas del envenenamiento serán el parámetro para establecer el tratamiento más adecuado.<sup>2</sup>

En el lugar del accidente es importante calmar al paciente, mantenerlo cómodo y estable y trasladarlo inmediatamente a un centro asistencial.<sup>2,6</sup> Muchas de las acciones normalmente recomendadas a realizar en caso de mordedura de ser-

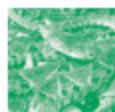
piente (aplicar torniquete, efectuar incisiones, entre otras), solo pueden agravar más el cuadro clínico del paciente.<sup>2</sup>

El tratamiento hospitalario implica el uso de sueros antiofídicos producidos en animales inmunizados con veneno (o mezclas de venenos), de las especies de importancia médica en la región.<sup>2,5</sup> La cantidad de antisuero a aplicar se evalúa individualmente de acuerdo a la gravedad del accidente. Así mismo, deberá observarse al paciente durante y después del tratamiento; así como monitorearlo a través de pruebas de laboratorio para evaluar la progresión del tratamiento.<sup>2</sup> Este tipo de terapia debe ser aplicada bajo supervisión médica, pues presenta el riesgo de producir reacciones alérgicas.<sup>7</sup>

#### MEDICINA NATURAL

En la medicina popular guatemalteca existe una gran variedad de plantas utilizadas como antídoto contra la mordedura de serpiente, las cuales son utilizadas en regiones en las que el acceso inmediato a atención médica hospitalaria es difícil. Además, en nuestros pueblos indígenas es tradicional consultar herbolarios, curanderos o chamanes como primera opción para tratar la mordedura. Existen reportes del uso de al menos 20 especies de plantas guatemaltecas con ese propósito.<sup>8</sup>

Por estas razones se hace necesario estudiar las plantas de uso tradicional en Guatemala, ya que debe determinarse su efectividad para neutralizar los efectos del envenenamiento. De resultar efectivas, estas podrán utilizarse de forma segura para mejorar el tratamiento de emergencia del accidente ofídico. En caso contrario, es importante demostrar sus limitaciones para prevenir que el paciente reciba un tratamiento inadecuado sin valor curativo o con efectos tóxicos.<sup>8</sup>



## ¿QUÉ ESTAMOS HACIENDO?

El interés por el accidente ofídico en Guatemala ha existido desde hace varios años, el cual se ha reflejado en diversos trabajos de investigación.

El estudio de plantas guatemaltecas con actividad antiofídica se inició en la Facultad de CCQQ y Farmacia en 1999, a través de un proyecto cofinanciado por el CONCYT. En este se realizó una encuesta etnobotánica que colectó información acerca de las plantas utilizadas en regiones en las que el accidente ofídico representa un importante problema de salud. Al evaluarse tres de las plantas detectadas (*Dorstenia contrajerva*, *Neurolaena lobata* y *Eupatorium odoratum*) se demostró que no neutralizaban los principales efectos tóxicos del veneno de *B. asper*.<sup>8</sup>

Actualmente, con el apoyo de la Dirección General de Investigación (DIGI) de la Universidad de San Carlos de Guatemala (USAC) se ha retomado el estudio de las plantas reportadas en dicha encuesta etnobotánica. Para ello se está realizando el montaje de una batería de pruebas de tamizaje para evaluar la capacidad neutralizante de las nuevas plantas seleccionadas para el estudio, las cuales son: *Cissampelos pareira*, *Piper peltatum*, *Aristolochia maxima*, *Acacia hindsii*, *Hamelia patens* y *Sansevieria hyacinthoides*.

### SITIOS DE INTERÉS

**Instituto Clodomiro Picado:**  
<http://icp.ucr.ac.cr/>

**Instituto Bioclon:**  
<http://www.bioclon.com.mx/bioclon/html/index.html>

**Instituto Butantan (en portugués):**  
<http://www.butantan.gov.br/index.php>

Diseño e impresión: Dirección General de Investigación

### REFERENCIAS

1. Gutiérrez JM, Warrell D a, Williams DJ, et al., The need for full integration of snakebite envenoming within a global strategy to combat the neglected tropical diseases: the way forward. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(6):e2162. doi:10.1371/journal.pntd.0002162.
2. Organización Panamericana de la Salud, Organización Mundial de la Salud, Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social, Museo de Historia Natural. *Manual para la identificación, prevención y tratamiento de mordeduras de serpientes venenosas en Centro América*; 2009:96.
3. Gutiérrez JM. Current challenges for confronting the public health problem of snakebite envenoming in Central America. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis*. 2014;20(1):7. doi:10.1186/1678-9199-20-7.
4. Arroyo CO, Muñoz Porras A. Aspectos básicos, epidemiológicos y clínicos del ofidismo en Costa Rica (Revisión bibliográfica). *Rev Médica Costa Rica y Centroamérica*. 2009;LXVII(590):363-366.
5. Mora F, J. A, Bien R, Lopez A. *Aspectos Básicos sobre las Serpientes de Costa Rica*. (Picado IC, ed.); 2006:61.
6. Gutiérrez JM. Comprendiendo los venenos de serpientes: 50 años de investigaciones en América Latina. *Rev Biol Trop*. 2002;50(2):377-394.
7. Gutiérrez JM. Snakebite envenomation in Central America. In: Machessy S, ed. *Handbook of Venoms and Toxins of Reptiles*. USA: CRC-Press; 2010:492 - 505.
8. Saravia Otten P, Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Universidad de San Carlos de Guatemala. *Informe Final del Proyecto Fodecyt 47-99. Plantas con Actividad Antiofídica en Guatemala. I. Identificación y Evaluación de su Capacidad Neutralizante.*; 2000:50.

### CENTRO DE INFORMACIÓN Y ASESORÍA EN TOXICOLOGÍA (CIAT)

**Departamento de Toxicología,  
Facultad de CCQQ y Farmacia, USAC.**  
3ra. calle 6-47, Zona 1, Ciudad de Guatemala,  
Teléfono (502) 2251-3560,  
atención de lunes a viernes de 7:00 a 16:00 h.  
Emergencias 24 horas, teléfono 1 801-0029832



UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA

DIRECCIÓN GENERAL DE INVESTIGACIÓN  
PROGRAMA DE INVESTIGACIÓN EN SALUD

Unidad de Biología  
Celular

Departamento  
de Bioquímica

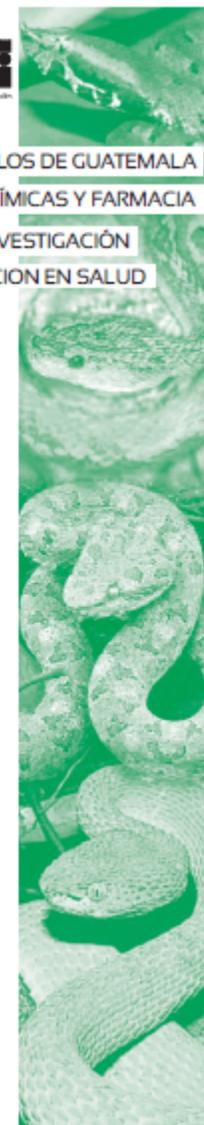
## ACCIDENTE OFÍDICO

Elaborado por:  
**Rosario Hernández, M. Sc.**  
[rosariodamarish@gmail.com](mailto:rosariodamarish@gmail.com)

**Patricia Saravia, Ph. D.**  
[psaravia02@gmail.com](mailto:psaravia02@gmail.com)

Colaboradores:  
**Nely Marroquín, Q. B.**  
**Max Mérida, B.**

Guatemala, septiembre 2014





**USAC**  
**TRICENTENARIA**  
 Universidad de San Carlos de Guatemala

Guatemala, 28 de noviembre de 2014  
 REF.EQB.624.11.2014

Licda. Bessie Orozco  
 Coordinadora  
 Programa de EPS  
 Escuela de Química Farmacéutica  
 Presente

Estimada Licda. Orozco

Por este medio tenemos el gusto de hacerle entrega de 100 trifoliales con información referente al accidente ofídico en Centroamérica, su fisiopatología, tratamiento convencional y tradicional, así como teléfonos, direcciones y sitios electrónicos en donde se puede obtener más información sobre el tema.

Estos trifoliales fueron elaborados con el apoyo de la Dirección General de Investigaciones (DIGI) de esta Universidad, con la finalidad de ponerlos a la disposición de personas e instituciones que puedan contribuir a la diseminación de la información, para que esta llegue a trabajadores de salud, curanderos tradicionales y público en general en los lugares en donde sucede y se trata el accidente ofídico en el país.

Conociendo la labor que desempeñan los estudiantes de Química Farmacéutica que realizan EPS en los diversos Hospitales Naciones, le hacemos llegar estos trifoliales para ser repartidos entre quienes realicen su EPS en regiones en las que pueden observarse casos de accidentes ofídicos, para que los utilicen como herramienta para informar a la población acerca de este tema y así, de manera conjunta, podamos contribuir al bienestar de la población afectada.

Sin otro particular, nos despedimos de usted,

Atentamente,  
 "Id y enseñad a todos"

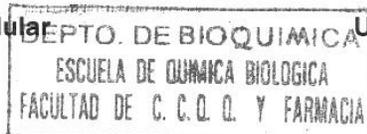
*Recibí ok  
 ysd.  
 01 Dic. 2014  
 9:30 hrs.*



*[Signature]*  
 Dra. Patricia Saravia  
 Coordinadora  
 Unidad de Biología Celular

*[Signature]*  
 M.Sc. Rosario Hernández  
 Investigadora  
 Unidad de Biología Celular

cc. archivo, correlativo





**USAC**  
**TRICENTENARIA**  
 Universidad de San Carlos de Guatemala

Guatemala, 28 de noviembre de 2014  
 REF.EQB.625.11.2014

Lic. David Méndez  
 Coordinador  
 Programa de EPS  
 Escuela de Química Biológica  
 Presente

Estimado Lic. Méndez

Por este medio tenemos el gusto de hacerle entrega de 100 trifoliales con información referente al accidente ofídico en Centroamérica, su fisiopatología, tratamiento convencional y tradicional, así como teléfonos, direcciones y sitios electrónicos en donde se puede obtener más información sobre el tema.

Estos trifoliales fueron elaborados con el apoyo de la Dirección General de Investigaciones (DIGI) de esta Universidad, con la finalidad de ponerlos a la disposición de personas e instituciones que puedan contribuir a la diseminación de la información, para que esta llegue a trabajadores de salud, curanderos tradicionales y público en general en los lugares en donde sucede y se trata el accidente ofídico en el país.

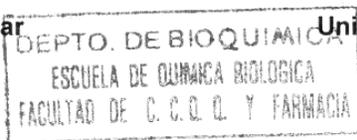
Conociendo la labor que desempeñan los estudiantes de Química Biológica que realizan EPS en los diversos Hospitales Nacionales, le hacemos llegar estos trifoliales para ser repartidos entre quienes realicen su EPS en regiones en las que pueden observarse casos de accidentes ofídicos, para que los utilicen como herramienta para informar a la población acerca de este tema y así, de manera conjunta, podamos contribuir al bienestar de la población afectada.

Sin otro particular, nos despedimos de usted,

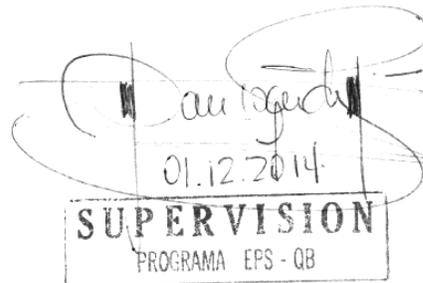
Atentamente,  
 "Id y enseñad a todos"

Dra. Patricia Saravia  
 Coordinadora  
 Unidad de Biología Celular

M.Sc. Rosario Hernández  
 Investigadora  
 Unidad de Biología Celular



cc. Archivo, correlativo





**USAC**  
**TRICENTENARIA**  
 Universidad de San Carlos de Guatemala

Guatemala, 29 de octubre de 2014

REF EQB: 589.10.2014

M.Sc. Carolina Guzmán  
 Directora  
 Centro de Información y Asesoría Toxicológica –CIAT–  
 Presente.

Estimada M.Sc. Guzmán:

Por este medio tenemos el gusto de hacerle entrega de 75 trifolios con información referente al accidente ofídico en Centroamérica, su fisiopatología, tratamiento convencional y tradicional, así como teléfonos, direcciones y sitios electrónicos en donde se puede obtener más información sobre el tema.

Estos trifolios fueron elaborados con el apoyo de la Dirección General de Investigaciones (DIGI) de esta Universidad, con la finalidad de ponerlos a la disposición de personas e instituciones que puedan contribuir a la diseminación de la información, para que esta llegue a trabajadores de salud, curanderos tradicionales y público en general en los lugares en donde sucede y se trata el accidente ofídico en el país.

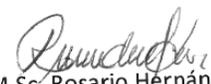
Siendo el CIAT un centro de información y asesoría en el tratamiento del envenenamiento ofídico, esperamos que puedan servirle de apoyo en su labor, y que de manera conjunta podamos contribuir al bienestar de la población afectada con este problema.

Sin otro particular, nos despedimos de usted,

Atentamente,

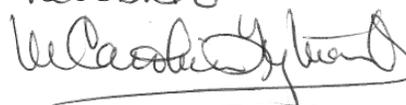
“Id y enseñad a todos”

  
 Dra. Patricia Saravia  
 Coordinadora  
 Unidad de Biología Celular

  
 M.Sc. Rosario Hernández  
 Jefa a.i. Depto. de Bioquímica  
 Investigadora Unidad de Biología Celular

cc. Archivo, correlativo

DEPTO. DE BIOQUIMICA  
 ESCUELA DE QUIMICA BIOLOGICA  
 FACULTAD DE C. C. Q. Y FARMACIA

Recibido  
  
 29/10/14

## Anexo 17

### Análisis estadístico

#### 1. Neutralización de actividad de PLA2 de *Sansevieria hyacintoides*

##### 1.1 Estadística descriptiva

$\mu$  equivalentes NaOH/ $\mu$ g proteína por minuto

Tratamientos	Media	n	Desviación estándar
Control Positivo	58.56	9	12.80
Rel 1 a 400	49.92	9	9.110
Rel 1 a 200	52.80	9	11.00
Rel 1 a 100	54.72	9	11.15
Rel 1 a 50	57.60	9	9.98
Rel 1 a 25	58.56	9	12.72
Rel 1 a 12.5	60.48	9	12.47
Total	56.09	63	11.38

##### 1.2 Pruebas de normalidad y homogeneidad de varianzas (homocedasticidad)

Todos los tratamientos presentan una distribución normal (Shapiro-Wilk  $p > 0.05$ ) y homocedasticidad (Levene  $p = 0.3631$ ). Lo cual indica que el análisis de varianza sí puede realizarse.

##### 1.3 Análisis de varianza

El análisis de varianza de dos vías para el diseño de bloques da la siguiente tabla:

Variable dependiente:  $\mu$  equivalentes NaOH/ $\mu$ g proteína por minuto

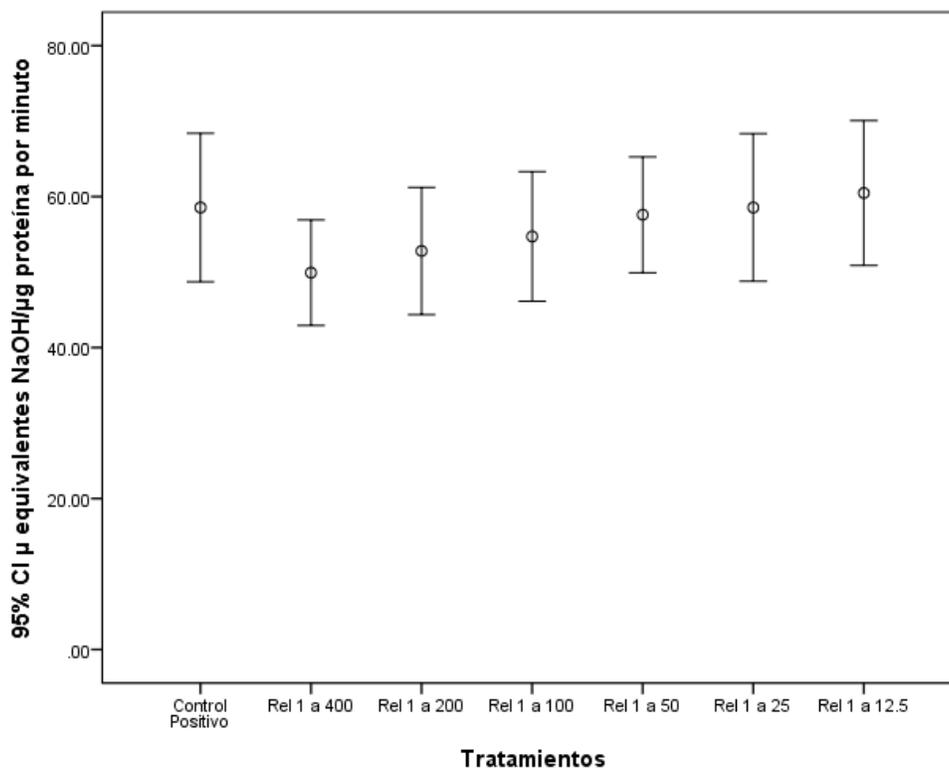
Origen	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Cuadrático promedio	F	Sig.	
Tratamientos	Hipótesis	760.715	6	126.786	15.787	<0.0001
	Error	433.679	54	8.031		
Bloques (días)	Hipótesis	6832.216	2	3416.108	425.361	<0.0001
	Error	433.679	54	8.031		

Existe diferencia significativa entre los tratamientos ( $p < 0.0001$ ).

## 1.4 Prueba de Dunnett frente al control positivo (prueba unilateral izquierda)

(I) Tratamientos	(J) Tratamientos	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.
Rel 1 a 400	Control Positivo	-8.6400*	1.33592	<0.0001
Rel 1 a 200	Control Positivo	-5.7600*	1.33592	0.0002
Rel 1 a 100	Control Positivo	-3.8400*	1.33592	0.0143
Rel 1 a 50	Control Positivo	-0.9600	1.33592	0.5817
Rel 1 a 25	Control Positivo	0.0000	1.33592	0.8571
Rel 1 a 12.5	Control Positivo	1.9200	1.33592	0.9973

Presentan una disminución significativa de la actividad, las relaciones 1 a 400 ( $p < 0.0001$ ) y 1 a 200 ( $p = 0.0002$ ).

1.5 Gráfica de barras de error (Media  $\pm$  Error Estándar)

## 2. Neutralización de actividad proteolítica de *Cissampelos pareira*

### 2.1 Estadística descriptiva

Absorbancia

Tratamientos	Media	n	Desviación estándar
Control Positivo	1.016	9	0.093
Rel 1 a 50	0.665	9	0.060
Rel 1 a 25	0.874	9	0.046
Rel 1 a 12.5	1.031	9	0.044
Rel 1 a 6.25	1.096	9	0.050
Rel 1 a 3.125	1.118	9	0.057
Total	0.966	54	0.168

### 2.2 Pruebas de normalidad y homogeneidad de varianzas (homocedasticidad)

Todos los tratamientos presentan una distribución normal (Shapiro-Wilk  $p > 0.05$ ) y homocedasticidad (Levene  $p = 0.9472$ ). Lo cual indica que el análisis de varianza sí puede realizarse.

### 2.3 Análisis de varianza

El análisis de varianza de dos vías para el diseño de bloques da la siguiente tabla:

Variable dependiente: Absorbancia

Origen		Tipo III de suma de cuadrados	gl	Cuadrático promedio	F	Sig.
Tratamientos	Hipótesis	1.311	5	0.262	81.881	<0.0001
	Error	0.147	46	0.003		
Bloques (días)	Hipótesis	0.029	2	0.014	4.529	0.016
	Error	0.147	46	0.003		

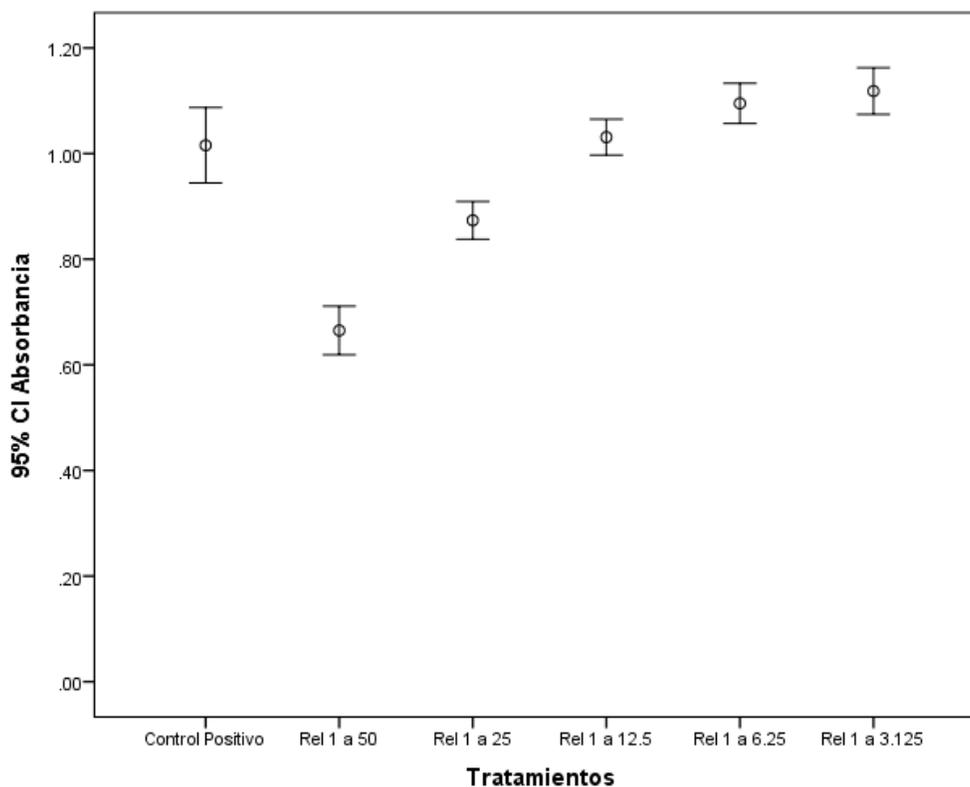
Existe diferencia significativa entre los tratamientos ( $p < 0.0001$ ).

#### 2.4 Prueba de Dunnett frente al control positivo (prueba unilateral izquierda)

(I) Tratamientos	(J) Tratamientos	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.
Rel 1 a 50	Control Positivo	-0.3507*	.02667	<0.0001
Rel 1 a 25	Control Positivo	-0.1421*	.02667	<0.0001
Rel 1 a 12.5	Control Positivo	0.0153	.02667	0.9505
Rel 1 a 6.25	Control Positivo	0.0792	.02667	>0.9999
Rel 1 a 3.125	Control Positivo	0.1026	.02667	>0.9999

Las relaciones 1 a 50 y 1 a 25 presentan una disminución significativa de la actividad ( $p < 0.0001$  en ambos casos).

#### 2.5 Gráfica de barras de error (Media $\pm$ Error Estándar)



### 3. Neutralización de actividad proteolítica de *Piper peltatum*

#### 3.1 Estadística descriptiva

Absorbancia

Tratamientos	Media	n	Desviación estándar
Control Positivo	1.006	9	0.069
Rel 1 a 50	0.762	9	0.110
Rel 1 a 25	0.877	9	0.078
Rel 1 a 12.5	0.933	9	0.045
Rel 1 a 6.25	1.021	9	0.028
Rel 1 a 3.125	1.032	9	0.045
Total	0.938	54	0.116

#### 3.2 Pruebas de normalidad y homogeneidad de varianzas (homocedasticidad)

Todos los tratamientos presentan una distribución normal (Shapiro-Wilk  $p > 0.05$ ) y homocedasticidad (Levene  $p = 0.1458$ ). Lo cual indica que el análisis de varianza sí puede realizarse.

#### 3.3 Análisis de varianza

El análisis de varianza de dos vías para el diseño de bloques da la siguiente tabla:

Variable dependiente: Absorbancia

Origen		Tipo III de suma de cuadrados	gl	Cuadrático promedio	F	Sig.
Tratamientos	Hipótesis	0.496	5	0.099	46.448	<0.0001
	Error	0.098	46	0.002		
Bloques (días)	Hipótesis	0.125	2	0.063	29.312	<0.0001
	Error	0.098	46	0.002		

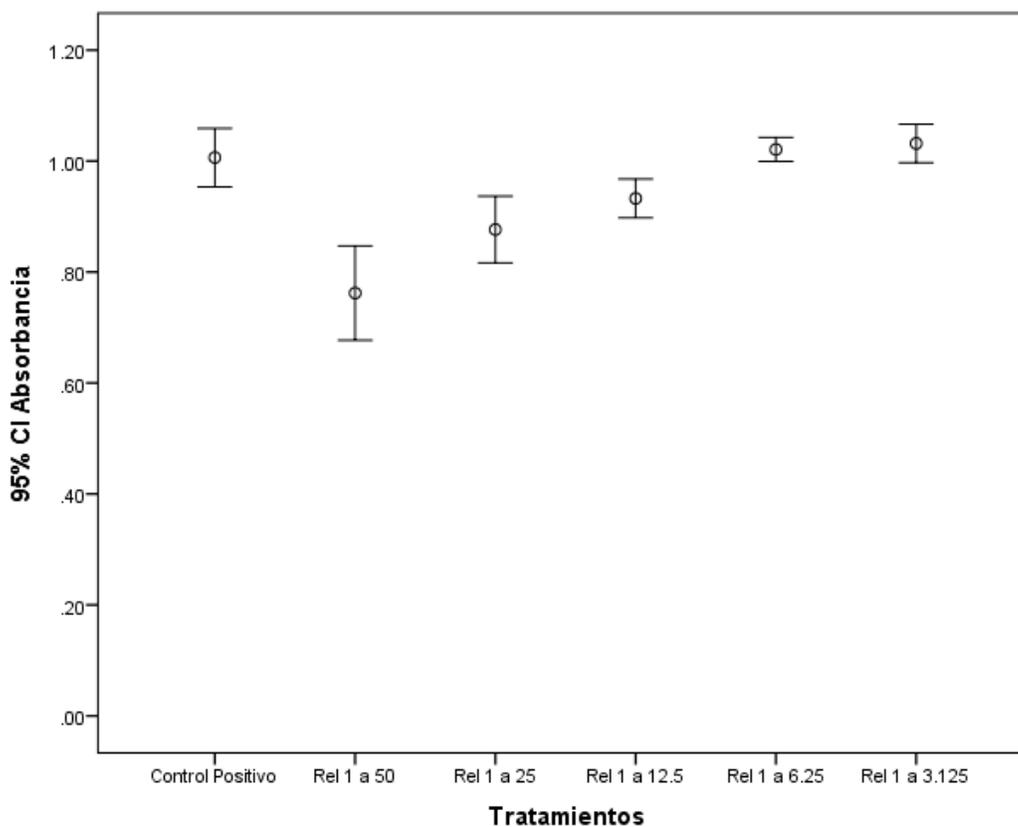
Existe diferencia significativa entre los tratamientos ( $p < 0.0001$ ).

#### 3.4 Prueba de Dunnett frente al control positivo (prueba unilateral izquierda)

(I) Tratamientos	(J) Tratamientos	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.
Rel 1 a 50	Control Positivo	-0.2442*	.02178	<0.0001
Rel 1 a 25	Control Positivo	0.1298*	.02178	<0.0001
Rel 1 a 12.5	Control Positivo	-0.0737*	.02178	0.0033
Rel 1 a 6.25	Control Positivo	0.0146	.02178	0.9608
Rel 1 a 3.125	Control Positivo	0.0254	.02178	0.9904

Presentan una disminución significativa de la actividad las relaciones 1 a 50 ( $p < 0.0001$ ), 1 a 25 ( $p < 0.0001$ ) y 1 a 12.5 ( $p = 0.0033$ ).

### 3.5 Gráfica de barras de error (Media $\pm$ Error Estándar)



## Anexo 18

### Fotografías

#### 1. Recolección de especies vegetales



Lic. Máx Mérida durante recolección de *Hamelia patens*.  
Fotografía por: Lic. Armando Cáceres.



Lic. Max Mérida durante recolección *Neurolaena lobata*.  
Fotografía por: Marcella Orellana.

## 2. Preparación de extractos vegetales



Proceso de secado de material vegetal.  
Fotografías por: Marcella Orellana.



Proceso de determinación del mejor solvente.  
Fotografías por: Marcella Orellana

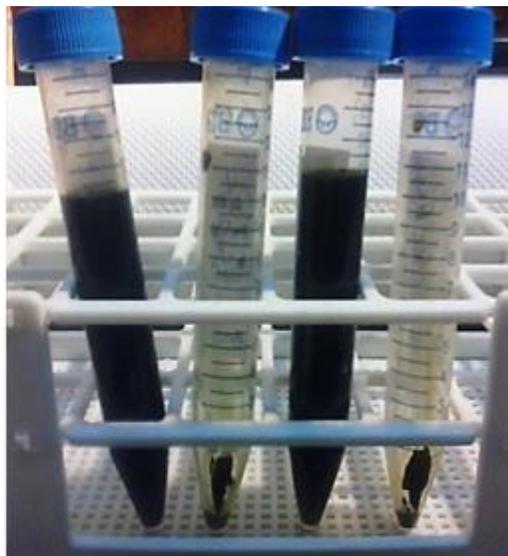
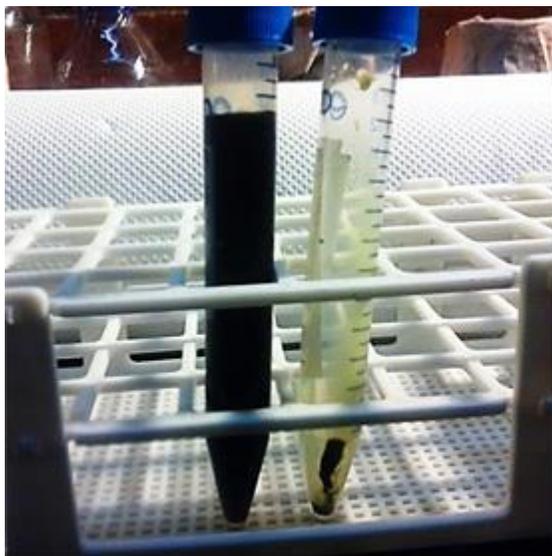


Procedimiento de concentración del extracto por rotavapor.  
Fotografías por: Marcella Orellana.



Extractos vegetales de las especies estudiadas.  
Fotografía por: Nely Marroquín.

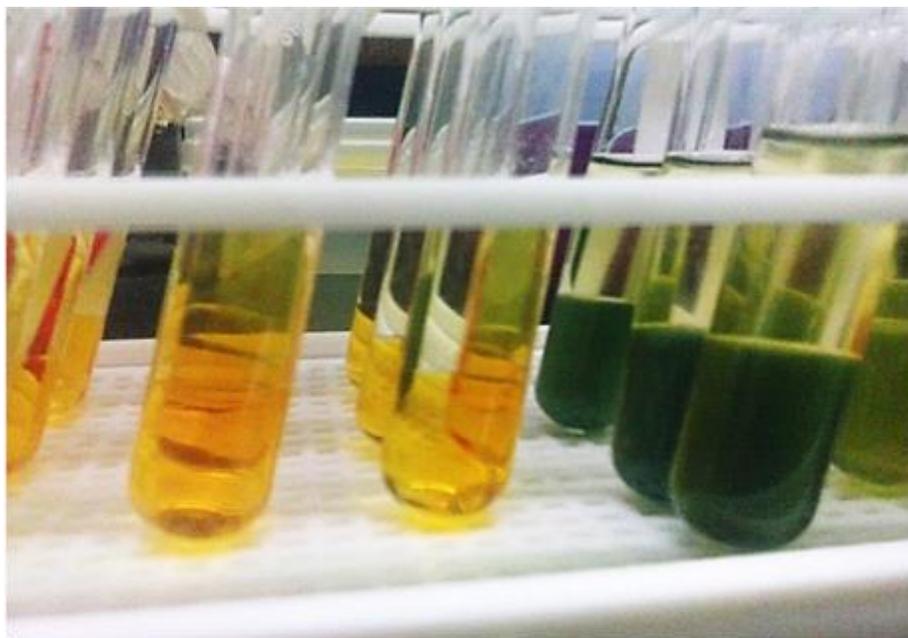
### 3. Realización de ensayos de actividad biológica.



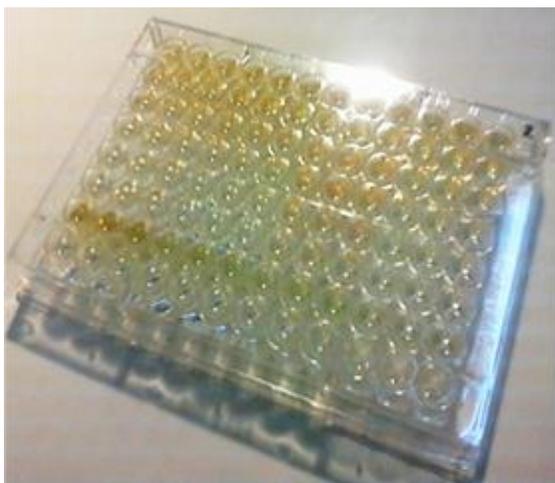
Disolución de extractos vegetales para elaboración de ensayos.  
Fotografías por: Nely Marroquín.



Donación de veneno liofilizado de la serpiente *Bothrops asper* por el Instituto Clodomiro Picado, Costa Rica.  
Fotografías por: Nely Marroquín.



Ensayo de la actividad fosfolipasa  $A_2$  del veneno de la serpiente *B. asper* y neutralización de la actividad por extractos estudiados. Titulación de ácidos grasos liberados con hidróxido de sodio cambio de coloración de amarillo a verde. Fotografía por: Nely Marroquín.



Ensayo de la actividad proteolítica del veneno de la serpiente *B. asper* y neutralización de la actividad por extractos estudiados. Medición de la degradación de azocaseína por espectrofotometría utilizando un lector de microplacas. Fotografías por: Nely Marroquín.