



Universidad de San Carlos de Guatemala

Dirección General de Investigación

Programa Universitario de Investigación Interdisciplinaria en Salud

INFORME FINAL

**NEUTRALIZACIÓN DE LOS EFECTOS COAGULANTE, FOSFOLIPASA A2 Y  
PROTEOLÍTICO DEL VENENO DE *Bothrops asper* POR EXTRACTOS DE  
ESPECIES VEGETALES UTILIZADAS EN LA MEDICINA TRADICIONAL  
CENTROAMERICANA**

Equipo de investigación

**Dra. Patricia Saravia Otten (coordinadora)**

Lic. Max Mérida (investigador)

Licda. Gabriela García Hernández (investigadora)

Br. Libny Pernillo (auxiliar de investigación II)

M. Sc. Rosario Hernández (investigadora asociada)

Dra. Sully Cruz (investigadora asociada)

M. Sc. Nereida Marroquín (investigadora asociada)

Licda. Nohemí Orozco (investigadora asociada)

Lic. Armando Cáceres (investigador asociado)

Dr. José María Gutiérrez (colaborador internacional)

Guatemala, 28 de febrero de 2017

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

Licda. Gabriela García Hernández  
Investigadora

Br. Libny Pernillo  
Auxiliar de Investigación II

M. Sc. Rosario Hernández  
Investigadora asociada

Dra. Sully Cruz  
Investigadora asociada

M. Sc. Nereida Marroquín  
Investigadora asociada

Licda. Nohemí Orozco  
Investigadora asociada

Lic. Armando Cáceres  
Investigador asociado

Dr. José María Gutiérrez  
Colaborador internacional

Partida presupuestaria  
4.8.63.1.82  
Año de ejecución: 2016

## Índice

Resumen	1
Abstract	2
Introducción	3
Preguntas de investigación	6
Objetivos	7
Hipótesis	7
1. Marco teórico	8
2. Materiales y métodos	11
3. Resultados	23
4. Análisis y discusión de resultados	42
5. Conclusiones	51
6. Referencias	52
7. Anexos	61
8. Actividades de gestión, vinculación y divulgación	95

## Índice de ilustraciones

### Figuras

Gráfica 1. Determinación de la dosis coagulante mínima en plasma (DCM-P) del veneno para las pruebas de neutralización de la actividad coagulante.	28
Figura 1. Electroforesis SDS-PAGE del veneno de <i>B. asper</i> crudo y preincubado con extractos vegetales	37

## Tablas

Tabla 1. Datos de recolección de especies vegetales	25
Tabla 2. Rendimiento de los extractos etanólicos de las plantas	26
Tabla 3. Condiciones de disolución y prepración de soluciones madre ( <i>stocks</i> ) de trabajo de los extratos etanólicos evaluados en el proyecto para determinar actividades PLA <sub>2</sub> , proteolítica y coagulante.	27
Tabla 4. Determinación de la actividad coagulante intrínseca de los extractos etanólicos evaluados en el estudio	29
Tabla 5. Determinación de la actividad anticoagulante intrínseca de los extractos etanólicos evaluados en el estudio	30
Tabla 6. Neutralización de la actividad coagulante del veneno de <i>B. asper</i> por los extractos etanólicos evaluados en el estudio	31
Tabla 7. Porcentaje de rendimiento obtenido durante el proceso de desclorofilación de los extractos vegetales	34
Tabla 8. Neutralización del efecto proteolítico del veneno de <i>B. asper</i> por los extractos etanólicos evaluados en el estudio	35
Tabla 9. Tamizaje fitoquímico de plantas del proyecto	38

## NEUTRALIZACIÓN DE LOS EFECTOS COAGULANTE, FOSFOLIPASA A2 Y PROTEOLÍTICO DEL VENENO DE *Bothrops asper* POR EXTRACTOS DE ESPECIES VEGETALES UTILIZADAS EN LA MEDICINA TRADICIONAL CENTROAMERICANA

### Resumen

Existen pocos estudios científicos que demuestren el valor terapéutico de las plantas usadas en la medicina tradicional centroamericana para tratar el envenenamiento ofídico. En este estudio se evaluó la capacidad de los extractos etanólicos de nueve plantas de uso etnomédico en Centroamérica (*Acacia hindsii*, *Aristolochia maxima*, *Cissampelos pareira*, *Hamelia patens*, *Piper peltatum*, *Sansevieria hyacinthoides*, *Eryngium foetidum*, *Pimenta dioica* y *Bursera simaruba*) para inhibir el efecto coagulante del veneno de *Bothrops asper*. Tres de ellas (*E. foetidum*, *P. dioica* y *B. simaruba*) también fueron evaluadas en cuanto a su capacidad neutralizante de los efectos fosfolipasa A2 (PLA<sub>2</sub>) y proteolítico del veneno. Las plantas fueron colectadas en Guatemala, secadas, extraídas con etanol y los efectos neutralizantes fueron evaluados in vitro después de pre-incubar dosis variables de extracto con dosis fijas de veneno. Los resultados demostraron que ninguno de los extractos logró inhibir los efectos coagulante y PLA<sub>2</sub>, pero los extractos clorofilados de *P. dioica* y *E. foetidum* neutralizaron efectivamente (>DE<sub>50</sub>) la actividad proteolítica del veneno. El tamizaje fitoquímico, realizado mediante cromatografía en capa fina y ensayos macro y semimicrométricos, demostró la presencia de metabolitos secundarios reportados con actividad antiproteolítica (flavonoides, antocianinas, catequinas y taninos) en la composición química de los extractos de *P. dioica* y *E. foetidum*. Su efecto sobre el veneno se evaluó mediante electroforesis SDS-PAGE, demostrándose que no está mediado por degradación proteolítica. Se necesitan futuros estudios que permitan el aislamiento y caracterización específica de sus metabolitos secundarios para determinar el mecanismo de acción inhibitoria ejercido por estos extractos.

**Palabras clave:** plantas antiofídicas, antídotos, Guatemala, mordedura de serpiente, envenenamiento ofídico

## Abstract

Medicinal plants have been traditionally used in Central America to treat snakebite envenomations, however, very few scientific studies aimed to demonstrate their efficacy and safety have been conducted. In this study, ethanolic extracts of nine plants used in the region by traditional healers (*Acacia hindsii*, *Aristolochia maxima*, *Bursera simaruba*, *Cissampelos pareira*, *Eryngium foetidum*, *Hamelia patens*, *Pimenta dioica*, *Piper peltatum* and *Sansevieria hyacinthoides*) were evaluated for their ability to neutralize the coagulant effect induced by the venom of the snake *Bothrops asper*. Three of these extracts (*B. simaruba*, *E. foetidum* and *P. dioica*) were also evaluated for their inhibitory effect on the phospholipase A2 (PLA2) and proteolytic activities of the venom. Plants were collected in Guatemala, dried, extracted with ethanol, and their inhibitory effects were evaluated in vitro after pre-incubation of several amounts of each extract with a challenge dose of venom. Results showed that all extracts failed to neutralize the coagulant and PLA2 effects; however, chlorophyllated extracts of *E. foetidum* and *P. dioica* effectively neutralized (>ED<sub>50</sub>) the proteolytic effect of the venom. Phytochemical analysis of these extracts, conducted by thin layer chromatography and macro- and micrometric methods, identified secondary metabolites (flavones, anthocyanins, catequines and tannins) whose anti-proteolytic activities have been widely reported. SDS-PAGE analysis demonstrated that the mechanism of inhibition is not related to proteolytic degradation of the venom proteins by the plant extracts. Further studies are needed to isolate and identify the active antiophidic compounds of these plants, aimed to understand their mechanism of action.

**Key words:** Plant extracts, traditional medicine, Guatemala, snakebite, antidote

## Introducción

### Planteamiento del problema.

El envenenamiento ofídico es un problema de salud importante a nivel mundial (WHO, 2007) que produce una alta tasa de mortalidad, morbilidad, secuelas físicas (como desfiguración o amputación) y psicológicas crónicas, lo que incide en una pérdida importante de productividad. Como son los trabajadores rurales el grupo de mayor riesgo, este problema tiene un impacto socioeconómico directo sobre las familias y comunidades de los afectados, contribuyendo al ciclo de pobreza e inequidad existente (Gutiérrez et al., 2013). En Costa Rica se reportan 15 casos/100,000 habitantes/año y se calcula que en Nicaragua, Honduras y Guatemala puede presentarse un número de casos similar (Gutiérrez, 2010). No obstante, se considera que 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. 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 los años 2001-2010 fue de 7,377 (Morales, 2012).

La serpiente *Bothrops asper* (barba amarilla) es la responsable de más del 50% del número total de casos y de la mayor parte de muertes debido a envenenamientos en Centroamérica. El envenenamiento produce el desarrollo inmediato de daño tisular local caracterizado por edema, sangrado y necrosis; y en el envenenamiento grave, por hemorragia sistémica, coagulopatías y alteraciones hemodinámicas, que pueden ocasionar la muerte (Gutiérrez, 2014). La administración temprana de sueros antiofídicos es el tratamiento validado para el manejo del envenenamiento ofídico. Sin embargo, aun en los casos en que 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). Se suma 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 con antídotos preparados con plantas nativas (Coe & Anderson 2005; Otero et al., 2000a).

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. Su efecto curativo ha sido estudiado en diferentes regiones del mundo, utilizando los antídotos preparados con la fórmula tradicional (Gupta & Peshin, 2012; Otero 2000a). Sin embargo, la composición de los venenos de serpiente puede variar dependiendo del área geográfica (Alape-Girón et al., 2009), lo que es un aspecto importante desde el punto de vista terapéutico, ya que los antisueros 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). Igualmente, no se puede asumir que los extractos vegetales que han probado ser efectivos en otras regiones del mundo, lo sean también para los efectos del veneno de especies centroamericanas.

En la medicina popular de Guatemala se usan varias plantas contra la mordedura de serpientes (Hay, 2002). Estos antídotos se usan para tratar el accidente ofídico en regiones selváticas, donde el acceso inmediato a sueros antiofídicos y atención médica es sumamente difícil. Existen, sin embargo, muy pocos estudios científicos que validen si dichas plantas o sus extractos son efectivos en la neutralización del envenenamiento. De determinarse que una o más plantas son efectivas, podría mejorarse el tratamiento de emergencia del accidente ofídico y usarse como un complemento terapéutico al tratamiento con antisueros. En caso contrario, deben demostrarse las limitaciones de dichas sustancias, para prevenir que el paciente reciba un tratamiento inadecuado con hierbas sin valor curativo, que causen efectos tóxicos o agraven los efectos del envenenamiento.

El presente proyecto se realizó dentro del marco de la línea iniciada por este grupo de investigación en búsqueda de bioactividad en plantas de uso etnomédico para el tratamiento del accidente ofídico en Guatemala. Los resultados obtenidos en el primer proyecto (Saravia et al., 2001a) demostraron que los extractos de *Neurolaena lobata* (L.) Cass, *Dorstenia contrajerva* L. y *Eupatorium odoratum* L., usadas como antídotos en la zona norte del país, poseen moderada actividad neutralizante de los efectos coagulante y hemorrágico del veneno de *B. asper*, pero fallaron en neutralizar sus efectos más importantes. Además, se encontró que sus extractos acuosos principalmente, poseen actividades intrínsecas que afectan la hemostasia, por lo que su uso debe ser controlado en el tratamiento del envenenamientos

moderados y severos, en donde tras la desfibrin(ogen)ación producida por el efecto coagulante del veneno, ocurre sangrado masivo. Estos hallazgos evidencian además su potencial uso terapéutico para el tratamiento de otras enfermedades.

Posteriormente, se evaluó mediante ensayos in vitro la capacidad de los extractos etanólicos de seis plantas de uso etnomédico en el país (*Acacia hindsii* Benth, *Aristolochia maxima* Jacq., *Cissampelos pareira* L., *Hamelia patens* Jacq., *Piper peltatum* L. y *Sansevieria hyacinthoides* Druce) para neutralizar los efectos proteolítico y PLA<sub>2</sub> del veneno de *B. asper*, indicadores de la capacidad miotóxica, hemorrágica e inflamatoria del veneno (Lomonte & Gutiérrez, 1983; Lomonte et al., 2012). Se determinó que, de los seis extractos, solamente el de *S. hyacinthoides* posee alguna capacidad neutralizante (< 50%) del efecto PLA<sub>2</sub>; de forma similar, solo los extractos de *P. peltatum* y *C. pareira* neutralizaron pobremente (< 50%) el efecto proteolítico del veneno (Saravia-Otten, Hernández, Gutiérrez, Mérida, & Cáceres, 2015). El análisis global de estos resultados cuestionó seriamente el uso de estas plantas, al menos de forma individual, para el tratamiento de envenenamientos por mordedura de *B. asper*.

Debido a que estas dos pruebas de tamizaje evalúan únicamente la capacidad de los extractos vegetales para neutralizar las principales toxinas del veneno responsables de los efectos locales, se consideró necesario completar el panel de tamizaje con pruebas que midan su capacidad para neutralizar los efectos sistémicos del envenenamiento sobre la hemostasia. Por ello, en este proyecto se amplió el panel de bioensayos para tamizaje mediante el montaje de la prueba de neutralización del efecto coagulante del veneno. Se evaluaron los extractos etanólicos de las plantas estudiadas en un proyecto anterior (*A. hindsii*, *A. maxima*, *C. pareira*, *H. patens*, *P. peltatum* y *S. hyacinthoides*) (Saravia-Otten et al., 2015) y de tres plantas de reciente ingreso al estudio (*Eryngium foetidum* L., *Pimenta dioica* (L.) Merr y *Bursera simaruba* (L.) Sarg), seleccionadas por uso etnomédico para el tratamiento de mordedura de serpiente en Centroamérica (anexo 1, tabla 1.1). Las tres nuevas plantas también fueron tamizadas en cuanto a su capacidad neutralizante de los efectos PLA<sub>2</sub> y proteolítico del veneno. Para iniciar la elucidación del mecanismo de acción de los extractos que demostraron capacidad neutralizante de los efectos tóxicos estudiados, se realizó un

análisis del patrón electroforético de las principales proteínas del veneno crudo y se compararon con el patrón mostrado tras ser enfrentado a los extractos vegetales.

Es importante para Guatemala, un país con amplia biodiversidad y medicina tradicional, disponer de un panel de pruebas para validar científicamente la capacidad de las plantas utilizadas como antidotos para neutralizar de los efectos locales y sistémicos de los venenos ofídicos de la región. Al incrementarse el número de extractos investigados, se aumentarán las posibilidades de detectar plantas efectivas, de bajo costo y fácil acceso para los afectados, quienes podrán ser tratados rápidamente en el lugar en donde ocurre el accidente ofídico. Además, 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.

El proyecto se ejecutó de febrero de 2016 a febrero de 2017. Las tres nuevas especies (*E. foetidum*, *P. dioica* y *B. simaruba*) se colectaron durante el primer semestre de 2016 en Izabal y Suchitepéquez. Sus extractos etanólicos con y sin clorofila se prepararon en las instalaciones del Laboratorio de Investigación en Productos Naturales (LIPRONAT) de la Escuela de Química Farmacéutica de esta Facultad de abril a septiembre de 2016. Los extractos etanólicos de las seis plantas que ya estaban en proceso de tamizaje (*A. hindsii*, *A. maxima*, *C. pareira*, *H. patens*, *P. peltatum* y *S. hyacinthoides*) se encontraban almacenados a 4°C en el Depto. de Bioquímica de esta Facultad, en donde se realizaron los bioensayos de mayo a noviembre de 2016. El análisis de resultados y escritura del informe final se realizó de diciembre de 2016 a febrero de 2017.

### **Preguntas de investigación**

1. ¿Qué capacidad tendrán los extractos etanólicos de *A. hindsii*, *A. maxima*, *C. pareira*, *H. patens*, *P. peltatum*, *S. hyacinthoides*, *E. foetidum*, *P. dioica* y *B. simaruba* para neutralizar el efecto coagulante del veneno de *B. asper*? ¿Cuál será su dosis efectiva media (DE<sub>50</sub>)?

2. ¿Qué capacidad tendrán los extractos etanólicos de *E. foetidum*, *P. dioica* y *B. simaruba* para neutralizar los efectos fosfolipasa A2 (PLA<sub>2</sub>) y proteolítico del veneno de *B. asper*? ¿Cuál será su dosis efectiva media (DE<sub>50</sub>)?
3. ¿Se debe la inhibición de los efectos del veneno a un proceso hidrolítico de sus proteínas producido por componentes del extracto vegetal?

## **Objetivos**

### **Objetivo general**

Evaluar la capacidad neutralizante de los efectos coagulante, fosfolipasa A2 y proteolítico del veneno de *Bothrops asper* por extractos de especies vegetales utilizadas en la medicina tradicional centroamericana.

### **Objetivos específicos**

1. Evaluar la capacidad de los extractos etanólicos de nueve plantas de uso etnomédico (*A. hindsii*, *A. maxima*, *C. pareira*, *H. patens*, *P. peltatum*, *S. hyacinthoides*, *E. foetidum*, *P. dioica* y *B. simaruba*) para neutralizar el efecto coagulante del veneno de *B. asper*.
2. Evaluar la capacidad de los extractos etanólicos de *E. foetidum*, *P. dioica* y *B. simaruba* para neutralizar los efectos fosfolipasa A2 y proteolítico del veneno de *B. asper*.
3. Determinar si el efecto neutralizante ejercido por los extractos vegetales se debe a la proteólisis de las principales proteínas del veneno.

## **Hipótesis**

Uno o más de los extractos vegetales tendrá actividad neutralizante sobre alguno de los efectos coagulante, proteolítico o fosfolipasa A2 del veneno de *B. asper*.

## 1. Marco teórico y estado del arte

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 mordedura 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 (WHO, 2007). Se ha estimado que en Centroamérica ocurren aproximadamente 5,500 casos anuales (Gutiérrez, 2014). En Guatemala el número de casos de mordedura de serpiente registrados entre los años 2001-2010 fue de 7,377 (Morales 2012). Sin embargo, el problema podría ser mayor, ya que el accidente ofídico sucede más frecuentemente en áreas selváticas, alejadas de los centros de salud, por lo que un número indeterminado de víctimas no es registrado (Gutiérrez 2010; como se citó en Giovannini & Howes, 2017).

En Centroamérica, los casos más serios de envenenamiento se producen por mordedura de serpientes de la familia Viperidae, especialmente por *B. asper* (Gutiérrez, 2010). Esta serpiente se distribuye a lo largo de la vertiente Atlántica de México, el norte de Guatemala, Honduras y Nicaragua; Costa Rica y Panamá, y vertiente del Pacífico de Colombia. Puede encontrarse una población aislada en la vertiente del Pacífico de Chiapas y Guatemala (Campbell & Lamar, 1989). 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).

Los envenenamientos por *B. asper* se caracterizan por una serie de alteraciones locales que aparecen rápidamente en el sitio de la mordedura, como edema, hemorragia, mionecrosis y dermonecrosis (Gutiérrez, Rucavado, Chaves, Díaz & Escalante, 2009b), así como alteraciones sistémicas caracterizadas por coagulopatía, hemorragia, shock cardiovascular y en casos severos la muerte (Gutiérrez, Escalante, & Rucavado, 2009a). Frecuentemente se observan alteraciones en la hemostasia, que dan lugar a trombocitopenia, hipoagregación plaquetaria, desfibrin(ogen)ación y coagulación intravascular diseminada (Rucavado et al., 2005).

El veneno de serpientes se compone de una mezcla compleja de moléculas de diferente naturaleza bioquímica, predominando la presencia de proteínas. En *B. asper*, los principales componentes del veneno son las metaloproteinasas dependientes de zinc (*snake venom metalloproteinases*, SVMPS) las PLA<sub>2</sub>, responsables de manifestaciones locales y sistémicas (Angulo & Lomonte, 2009) y en menor proporción las serina proteinasas (Calvete, et al, 2011; Gutiérrez, 2002). La actividad coagulante del veneno es producida por enzimas que actúan directamente sobre el fibrinógeno (serina proteinasas), sobre el factor X (metaloproteinasas) o sobre la protrombina (serina proteinasas o metaloproteinasas) (Gutiérrez et al., 2009a). La actividad desfibrin(ogen)ante del veneno es consecuencia de la acción de estos componentes procoagulantes sobre el sistema de coagulación in vivo, ya que causan la formación de microtrombos en la circulación, con el concomitante consumo de fibrinógeno y la activación del sistema fibrinolítico (Rucavado et al., 2005). La hemorragia sistémica es una de las manifestaciones más serias en envenenamiento severo por *B. asper* en humanos, produce hipovolemia, hipotensión, choque cardiovascular y accidentes cerebrovasculares severos (como se citó en Gutiérrez et al., 2009a). La administración temprana de sueros antiofídicos es el tratamiento validado para el manejo del envenenamiento ofídico. Sin embargo, aun en los casos en que 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). 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 (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 (Gupta & Peshin, 2012). 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, Auddt & Gomes, 1994; Melo & Ownby, 1999).

Existen estudios realizados con extractos de plantas de uso etnomédico de Centroamérica y Colombia para neutralizar los efectos tóxicos del veneno de *B. asper* (como se citó en Giovannini & Howes, 2017). En Colombia se demostró que los extractos etanólicos de siete

plantas usadas en el tratamiento del accidente ofídico neutralizaron completamente el efecto letal y los extractos de 12 plantas neutralizaron el efecto hemorrágico (Otero et al., 2000b, c). Así mismo, se reportó la actividad inhibitoria de los efectos proteolítico, edematizante, desfibrinante y coagulante del veneno de varias especies vegetales colombianas (Gómez-Betancur, Benjumea, Patiño, Jiménez, & Osorio, 2014; Núñez et al., 2004). Castro y col. (1999) demostraron que los extractos de 10 plantas de Costa Rica son capaces de neutralizar el efecto hemorrágico del veneno. En Guatemala se demostró la capacidad de tres plantas de uso tradicional en el país para neutralizar parcialmente los efectos coagulante y hemorrágico del veneno del veneno de *B. asper* (Saravia et al., 2001a). Recientemente, Saravia-Otten y col. (2015) demostraron la capacidad de tres plantas nativas para inhibir moderadamente los efectos PLA<sub>2</sub> y proteolítico del veneno de dicha serpiente.

Existen reportes científicos acerca del uso de especies vegetales guatemaltecas para el tratamiento de mordedura de serpiente y otros animales ponzoñosos. En la revisión de la flora útil de Guatemala, Morton (1981) indica el uso cuando menos de 100 especies vegetales en Mesoamérica; Orellana (1987) menciona seis especies de plantas usadas tradicionalmente en el altiplano de Guatemala y Hay (2002) describió cuando menos 59 especies usadas en el área norte de Guatemala, algunas de ellas comunes a otras regiones del país. Aunque existen personas especializadas en este tipo de tratamientos, no existe un criterio común en cuanto a las recetas, preparación, dosificación o administración de los antídotos (Hay, 2002; Saravia et al., 2001a). Por ello, este proyecto contribuyó al enriquecimiento del conocimiento que se tiene sobre los recursos naturales del país y su uso como alternativas terapéuticas seguras a un problema importante de salud que afecta a la población rural.

## 2. Materiales y métodos

### 2.1 Técnicas e instrumentos

#### 2.1.1 Selección y recolección de especies vegetales de reciente inclusión al proyecto

A partir de revisión de literatura se seleccionaron tres especies vegetales de uso popular en Centroamérica (*E. foetidum*, *P. doica* y *B. simaruba*) para el tratamiento de mordeduras de serpiente, especialmente de la especie *B. asper* (anexo 1, tabla 1.2).

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.

Las hojas de *Eryngium foetidum* L. se recolectaron en la propiedad de la señora Marta Cal en aldea Plan Grande Quehueche; las hojas de *Pimenta dioica* (L.) Merr. se recolectaron en la propiedad del señor Nolberto Ticas en la aldea Barra Lampara, ambas del municipio de Livingsgton, Izabal, con el apoyo de Felix Cal, guardarecursos del Biotopo Chocón Machacas. La corteza de *Bursera simaruba* (L.) Sarg. se recolectó en la ecoparcela El Kakawatal, municipio de Samayac, Suchitepéquez, propiedad del Lic. Armando Cáceres (colaborador del proyecto), con el apoyo del administrador, señor Arnoldo Hilario. Las especies se determinaron utilizando las claves dicotómicas de la Flora de Guatemala (McVaugh, 1963; Standley & Steyermark, 1946; Standley & Williams, 1966) en las instalaciones del Laboratorio y Droguería de Productos Fitofarmacéuticos, S.A (FARMAYA).

### **2.1.2 Extracción de principios vegetales**

Inicialmente se realizó la prueba del mejor disolvente, en donde 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 Ministerio de Sanidad y Consumo (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. Seguidamente se prepararon los extractos etanólicos por percolación según la metodología descrita en Saravia-Otten y col. (2015). Se pesaron 300 g del material vegetal seco, se agregó etanol y se percoló durante 24 h con recambios del disolvente. Los menstruos extraídos se concentraron en rotavapor y los extractos concentrados se llevaron a sequedad en un desecador con sílica. Cada 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.

### **2.1.3 Obtención del veneno**

Se utilizó veneno completo de *B. asper* obtenido de una mezcla de no menos de 40 ejemplares adultos provenientes de la región del Pacífico de Costa Rica, la cual fue una donación del Dr. José María Gutiérrez, Instituto Clodomiro Picado, Universidad de Costa Rica (ICP-UCR), colaborador internacional del proyecto. El veneno fue colectado, centrifugado y liofilizado. Se transportó y almacenó a -20°C. El uso del veneno de especies costarricenses se justifica por falta de serpentarios en Guatemala con un número suficiente de ejemplares adultos de *B. asper* que permitan obtener una mezcla representativa de las regiones Pacífico y norte. Además, el estudio realizado por Saravia y col. (2001a) demostró que el perfil toxicológico del veneno de ambas especies es similar.

#### **2.1.4 Disolución de extractos**

Los extractos vegetales etanólicos con consistencia viscosa grado miel se disolvieron en una solución tampón de fosfatos pH 7.2 (PBS) y Tween 80 (1-10% v/v). Se agitó en vortex hasta lograr la mayor disolución del extracto; posteriormente se incubó por 30 min en baño de agua a 37°C con agitación constante. La disolución se sonicó por 15 min, posteriormente se incubó por 30 min a 37°C en reposo. Después de centrifugarse, se filtró el sobrenadante y almacenó a -20°C.

#### **2.1.5 Desclorofilación de extractos vegetales**

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

#### **2.1.6 Tamizaje fitoquímico de los extractos**

La determinación macro y semimicrométrica de metabolitos secundarios se realizó como se describe a continuación:

**2.1.6.1 Taninos:** se determinó su presencia mediante la técnica macrométrica de tubos descrita por Kuklinski (2000). Para ello se disolvió 0.1 g de cada extracto en 5ml de etanol o metanol; se filtró y se evaporó a sequedad. Después de añadir 10ml de agua caliente al residuo, se agitó y se filtró. Al sobrenadante se agregó 0.5ml de NaCl al 10 % y se filtró nuevamente. Se dividió el filtrado resultante en 4 tubos de ensayo, de los cuales uno se utilizó como testigo, al segundo tubo se le agregó gelatina al 1%, al tercero gelatina-sal al 1% (v/v) y al cuarto tubo FeCl<sub>3</sub> al 10%.

La formación de precipitado y/o cambio de coloración evidenció un resultado positivo.

**2.1.6.2 Flavonoides, antocianinas y catequinas:** se determinaron mediante cromatografía en capa fina de acuerdo a la metodología descrita en Wagner y Bladt (1996) y Ministerio de Sanidad y Consumo (2002). Se disolvió 0.1 g de cada extracto en 5ml de metanol y se aplicó 10 µl sobre una cromatoplaque de silicagel 60 F<sub>254</sub>. En la misma placa se aplicaron 5 µl de estándares de quercetina, rutina, ácido clorogénico e hiperósido. La fase móvil fue una mezcla de acetato de etilo-ácido fórmico-ácido acético glacial-agua (100:11:11:27). Se reveló con el reactivo de Productos Naturales / polietilenglicol (NP/PEG) y la placa se observó bajo luz ultravioleta a 365nm. La presencia de los metabolitos se evidenció por la aparición de fluorescencia de color amarillo, azul o verde.

**2.1.6.3 Cumarinas:** se determinó su presencia por cromatografía en capa fina según el método descrito por Lock (1994). Se disolvió 0.1g de cada extracto en 5ml de metanol, se filtró y evaporó hasta 1ml. Se aplicaron 20µl de esta disolución en una cromatoplaque de sílica gel 60 F<sub>254</sub>. En la misma placa se aplicaron 20µl de estándares de ácido p-cumárico y cumarina. La fase móvil consistió en una mezcla de tolueno-acetato de etilo (93:7). El revelador fue una solución etanólica de KOH 5% y se observó bajo luz ultravioleta a 365nm. La aparición de fluorescencia azul o verde indicó un resultado positivo.

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

### **2.2.1 Primera fase: ensayos dosis – respuesta.**

**2.2.1.1 Actividad coagulante.** Debido a que las actividades intrínsecas (coagulante o anticoagulante) propias de un extracto enmascararían los resultados en las pruebas de neutralización del efecto del veneno, inicialmente se evaluó la actividad coagulante intrínseca de los extractos a diferentes dosis utilizando plasma humano citratado según el método de Theakston y Reid (1983). El plasma incubado a 37°C fue enfrentado a cantidades variables de los extractos vegetales (0.005-0.86 mg)

seleccionadas en base a estudios previos (Saravia et al., 2001a); luego se determinó el tiempo de coagulación con un cronómetro. Como control negativo se utilizó PBS, como controles positivos, veneno y soluciones de trombina. Debido a que algunos extractos vegetales pueden presentar efectos anticoagulantes intrínsecos, se incubó por 30 min a 37°C una dosis fija de trombina con las mismas dosis de extractos evaluadas en las pruebas de coagulación intrínseca; posteriormente cada una de las mezclas trombina–extracto se agregó a plasma humano citratado preincubado a 37°C y se determinó el tiempo de coagulación con un cronómetro. Como control negativo se utilizó PBS y como control positivo una mezcla de la dosis fija de trombina y PBS (Saravia et al., 2001a). Se reportaron como incoagulables aquellas dosis que no presentaron formación de un coágulo evidente luego de 60 min de incubación.

**2.2.1.2 Actividad proteolítica** Debido a que el color verde intenso de los extractos vegetales podría interferir con la prueba colorimétrica de proteólisis, se ensayaron los extractos vegetales con y sin clorofila, con el fin de evaluar si a eliminación de este pigmento mejoraba la discriminación de la prueba. Se determinó inicialmente el espectro de absorción de cada extracto con y sin clorofila a la mayor concentración evaluada (1.25 mg) realizándose un barrido desde 340 hasta 800 nm. Todos los extractos absorbieron con mayor intensidad a longitudes de onda menores a 400 nm, por lo que se incluyó un control interno que permitió restar la absorbancia del color de cada extracto. La capacidad proteolítica de los extractos sobre azocaseína se evaluó utilizando el método de Wang, Shih y Huang (2004) con las modificaciones descritas en Saravia-Otten y col. (2015). La cantidad de productos de degradación del sustrato se determinó midiendo la absorbancia del sobrenadante a 450 nm y la actividad proteolítica se expresó como unidades por microgramo de veneno (U/ $\mu$ g) (Lomonte & Gutiérrez, 1983). Como blanco de reactivos se utilizó PBS-Tween 80, como control positivo se utilizó la dosis reto (DR) de veneno establecida previamente (Saravia-Otten et al., 2015) y el control de PBS contenía PBS pH 7.2. Para eliminar la interferencia del color de los extractos se utilizó un control interno para cada dosis con la solución tampón de trabajo sin azocaseína y cada una de las dosis de extracto evaluado. La

actividad proteolítica de cada extracto se calculó restando al valor de absorbancia de cada dosis ensayada de extracto (1.25, 0.625, 0.312, 0.156 y 0.078 mg), la absorbancia de su control interno y del blanco de reactivos. La actividad proteolítica del control positivo (100% de actividad) se determinó restando la absorbancia del control de PBS al valor de absorbancia del tubo que contenía la dosis reto de veneno.

**2.2.1.3 Actividad fosfolipasa A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>).** Se evaluó mediante un ensayo de titulación que utiliza fosfatidilcolina de yema de huevo como sustrato, según el método de Dole (1956) con las modificaciones realizadas por Gutiérrez y col. (1986). El sustrato se incubó con diversas concentraciones de los extractos vegetales (1.25, 0.625, 0.312, 0.156 y 0.078 mg) o veneno a 37°C. Los ácidos grasos liberados se extrajeron con una mezcla de heptano: H<sub>2</sub>O:H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se titularon con NaOH. La actividad se expresó como µeq/mg/min. Como control negativo se utilizó PBS y como control positivo la DR de veneno establecida anteriormente (Saravia-Otten et al., 2015).

## **2.2.2 Segunda fase: pruebas de neutralización.**

**2.2.2.1 Determinación de la dosis reto (DR) del veneno.** Para las pruebas de neutralización de la actividad proteolítica y PLA<sub>2</sub> se utilizarán como DR 25 y 3.125 µg de veneno respectivamente, según lo reportado por Saravia-Otten y col. (2015). La DR para las pruebas de neutralización de la actividad coagulante fue de 0.215 µg, valor que corresponde a dos dosis coagulantes mínimas (DCM, cantidad de veneno que induce coagulación del plasma humano citratado en 60 s) (Gené, Roy, Rojas, Gutiérrez, Cerdas, 1989). La DCM se estableció utilizando el ensayo dosis–respuesta como se describe en la sección anterior.

**2.2.2.2 Pruebas de neutralización.** 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. La dosis reto de veneno para la actividad PLA<sub>2</sub> (3.125 µg) 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, Saravia-Otten et al., 2015). Para los ensayos de neutralización de la actividad proteolítica del veneno, 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, en donde se determinó que podía leerse sin interferencia la absorbancia del ensayo cuando se utilizan hasta 1.25 mg de extracto. Para los ensayos de neutralización de la actividad coagulante del veneno, la dosis reto (0.215  $\mu\text{g}$ ) se enfrentó a dosis variables de extracto a razón veneno:extracto (p:p) de 1:400 hasta 1:25 para el tamizaje. 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 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% a un efecto de igual magnitud al inducido por el veneno solo. En los casos en los que hubo neutralización se calculó la dosis efectiva media del extracto ( $\text{DE}_{50}$ , dosis de extracto capaz de neutralizar el 50% del efecto estudiado).

Para establecer el grado de efectividad del extracto se aplicaron los siguientes criterios: neutralización total (100%); neutralización parcial ( $\geq 50\%$  ( $\text{DE}_{50}$ ) pero menos del 100%); neutralización pobre (más del 1% pero menos del 50%); ausencia de neutralización (0-1%).

### **2.2.3 Tercera fase: comparación de patrones electroforéticos en geles de poliacrilamida.**

**2.2.3.1 Electroforesis SDS-PAGE.** Los extractos que demostraron capacidad neutralizante de alguno de los efectos estudiados fueron incubados a 37°C por 30 min con el veneno en proporciones 1:20 (veneno: extracto p:p). Luego se cargaron 20  $\mu\text{l}$  de cada una de las mezclas en un gel de poliacrilamida al 12% y la electroforesis se corrió en condiciones reductoras a 150 V por 1 h (Laemmli,

1970). Las proteínas se tiñeron con azul brillante de Coomassie. Se comparó el patrón electroforético del veneno frente al patrón de las mezclas veneno:extracto. Todos los experimentos se repitieron cinco veces.

### **2.3 Muestreo**

El presente estudio, por ser experimental, no requirió fase de muestreo; requirió repeticiones de las dosis y pruebas evaluadas. Con respecto a la actividad coagulante, para cada planta se evaluaron cinco dosis del extracto, PBS (control negativo), veneno y trombina (controles positivos) en tres bloques (días diferentes), cinco réplicas por bloque. Con respecto a las actividades proteolítica y PLA<sub>2</sub>, se evaluaron cinco dosis de extracto para cada planta, PBS y veneno, en tres bloques, cinco réplicas por bloque.

## 2.4 Operacionalización de las variables o unidades de análisis.

Objetivo	Variable	Definición teórica de la variable	Definición operativa	Técnica	Instrumento	Escala de medición
Evaluar la capacidad de los extractos etanólicos de nueve plantas de uso etnomédico ( <i>A. hindsii</i> , <i>A. maxima</i> , <i>C. pareira</i> , <i>H. patens</i> , <i>P. peltatum</i> , <i>S. hyacinthoides</i> , <i>E. foetidum</i> , <i>P. dioica</i> y <i>B. simaruba</i> ) para neutralizar el efecto coagulante del veneno de <i>B. asper</i> .	Independiente: extractos vegetales de uso popular en Guatemala y Centroamérica.	Extractos etanólicos de especies vegetales.	Cinco dosis de cada extracto (concentración a determinar en base a DR de veneno).	Extracción por percolación	Percolador, rotavapor.	Dilución de extractos: concentración en $\mu\text{g} / \mu\text{l}$ .
	Dependientes: Actividad coagulante	Formación de coagulos a partir de plasma humano.	Determinación del tiempo de formación del coagulo.	Método Theakston y Reid; curvas dosis respuesta.	Tiempo de coagulación determinado con cronómetro	Tiempo en segundos
	Actividad proteolítica	Hidrólisis de azocaseína	Determinación de absorbancia	Método de Wang, Shih & Huang, curvas dosis respuesta.	Absorbancia determinada por lector de placas de 96 pozos.	Valor de absorbancia
	Actividad PLA <sub>2</sub>	Liberación de fosfolípidos de yema de huevo	Determinación de cambio de coloración en solución	Método de Dole, curvas dosis respuesta	Titulación visual (cambio de color)	Cuantificación de $\mu\text{Eq}/\text{mg}/\text{min}$
	Controles positivos.		Dosis de veneno con	Método Theakston y Reid	Tiempo de coagulación	Tiempo en segundos

<p>Evaluar la capacidad de los extractos etanólicos de <i>E. foetidum</i>, <i>P. dioica</i> y <i>B. simaruba</i> para neutralizar los efectos fosfo-lipasa A2 (PLA<sub>2</sub>) y proteolítico del veneno de <i>B. asper</i>.</p>	<p>Control negativo.</p>	<p>Veneno completo de <i>B. asper</i>.</p>	<p>actividad coagulante (60 s).</p> <p>Dosis de veneno con actividad proteolítica en el rango de medición de la prueba.</p> <p>Dosis de veneno con actividad PLA<sub>2</sub> en el rango de medición de la prueba.</p>	<p>Método de Wang, Shih &amp; Huang</p> <p>Método de Dole</p>	<p>determinado con cronómetro</p> <p>Absorbancia determinada por lector de placas de 96 pozos.</p> <p>Titulación visual (cambio de color)</p>	<p>Valor de absorbancia</p> <p>Cuantificación de <math>\mu\text{Eq}/\text{mg}/\text{min}</math></p>
		<p>Trombina y fibrina</p>	<p>Concentración con actividad coagulante (60 s).</p>	<p>Método Theakston y Reid</p>	<p>Tiempo de coagulación determinado con cronómetro</p>	<p>Tiempo en segundos</p>
		<p>Buffer de fosfatos, pH 7.2 (PBS)</p>	<p>Solución que no posee actividades coagulante, proteolítica ni PLA<sub>2</sub>.</p>	<p>Métodos de: Theakston y Reid (actividad coagulante), Wang, Shih &amp; Huang (actividad proteolítica) y Dole (actividad PLA<sub>2</sub>).</p>	<p>Tiempo de coagulación determinado con cronómetro; absorbancia determinada por lector de placas de 96 pozos; titulación visual (cambio de color)</p>	<p>Tiempo en segundos; valor de absorbancia; cuantificación de <math>\mu\text{Eq}/\text{mg}/\text{min}</math></p>

Determinar si el efecto neutralizante ejercido por los extractos vegetales se debe a la proteólisis de las principales proteínas del veneno.	Independiente: extractos vegetales de uso popular en Guatemala y Centroamérica.	Extractos etanólicos de especies vegetales.	Dosis de extractos que neutralizan alguna de las actividades del veneno evaluadas.	Extracción por percolación	Percolador, rotavapor.	Dilución de extractos: concentración en $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ .
	Veneno de <i>B. asper</i> .	Veneno completo.	Patrón de bandas del veneno.	Electroforesis de proteínas (SDS – PAGE).	Cámara de electroforesis vertical.	Observación patrón electroforético.
	Dependiente: actividad proteolítica de extractos.	Mezclas veneno - extracto	Patrón de bandas del veneno (modificado).	Electroforesis de proteínas (SDS – PAGE).	Cámara de electroforesis vertical.	Comparación patrón electroforético.

## 2.5 Metodología de análisis de la información

El análisis de la determinación de actividades de extractos vegetales se realizó por un diseño de bloques no aleatorizados. Los ensayos se realizaron en tres días diferentes (bloques), con cinco réplicas por ensayo por conveniencia, para un total de quince lecturas. Los resultados de la actividad coagulante intrínseca y neutralización del efecto coagulante del veneno se evaluaron por la prueba de hipótesis binomial, con un nivel de significancia de  $\alpha = 0.05$ . Los resultados de las actividades proteolítica y PLA<sub>2</sub> intrínsecas se evaluaron por un análisis de varianza de dos vías (Andeva), con un nivel de significancia  $\alpha = 0.05$ ; cuando este análisis demostró que existían diferencias significativas, se realizó la prueba de comparaciones de Dunnet de cada tratamiento frente al control positivo (veneno). El análisis de las pruebas de neutralización de los efectos proteolíticos y PLA<sub>2</sub> del veneno se realizó mediante un análisis de regresión de la curva dosis-respuesta, para determinar el mejor modelo de ajuste con un nivel de significancia  $\alpha = 0.05$ . Con base en este modelo se calculó para cada extracto la DE<sub>50</sub> con un intervalo de confianza del 95%. Para la determinación de la actividad proteolítica de extractos vegetales sobre proteínas del veneno se realizó un análisis descriptivo del patrón electroforético de las mezclas veneno-extracto en comparación con el patrón observado en el veneno solo.

### 3. Resultados

#### 3.1 Descripción de resultados.

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

##### 3.1.1 Evaluación de la capacidad neutralizante de los extractos etanólicos de nueve plantas de uso etnomédico para neutralizar el efecto coagulante del veneno de *B. asper*

Inicialmente se realizó la recolección de las tres plantas de reciente inclusión en el estudio (*P. dioica*, *E. foetidum* y *B. simaruba*) en tres viajes de campo, los cuales se realizaron a los departamentos de Izabal y Suchitepéquez. De cada una de las plantas se colectó la parte que se utiliza tradicionalmente en el tratamiento de la mordedura de serpiente en Centroamérica (anexo 1, tabla 1.2 y figura 1.2) y se depositó una muestra en el herbario del Laboratorio de Productos Naturales Farmaya (*Cemat Farmaya ethnobotanical herbarium*, CFEH), en donde se le asignó un número de registro (tabla 1 y anexo 1, fig 1.1).

Se procedió a secar el material vegetal y a realizar la extracción etanólica en los laboratorios del LIPRONAT (anexo 2, fig 2.1). 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 3, fichas 3.1 – 3.3).

Los extractos etanólicos de las seis plantas procedentes de un estudio previo (*A. hindsii*, *A. maxima*, *C. pareira*, *H. patens*, *P. peltatum*, *S. hyacinthoides*) (anexo 1, tabla 1.1, figura 1.1), en el que se evaluó su capacidad para neutralizar los efectos PLA<sub>2</sub> y proteolítico del veneno de *B. asper* (Saravia-Otten et al., 2015), fueron pesados (anexo 4, tabla 4.1) y almacenados a 4°C, protegidos de la luz hasta su uso.

Seguidamente se disolvieron todos los extractos vegetales con la cantidad requerida de Tween 80 para lograr su máxima disolución, y se prepararon las soluciones madre (*stock*) de trabajo requeridas para cada uno de los tres bioensayos del panel de tamizaje (tabla 3). Todos los *stocks* se almacenaron a -20°C durante la fase experimental.

Para evaluar la capacidad de los extractos etanólicos para neutralizar el efecto coagulante del veneno de *B. asper* inicialmente se estandarizó de la prueba de coagulación utilizando plasma humano citratado según el método de Theakston y Reid (1983). El procedimiento operativo estándar (POE) se adjunta en el anexo 5, (POE 5.1). Seguidamente, por medio de ensayos de dosis-respuesta, se determinó que la dosis coagulante mínima sobre plasma (DCM-P) del lote de veneno de *B. asper* con el que se trabajó en este estudio es de 1.074  $\mu\text{g/ml}$  (0.1074  $\mu\text{g}$  de veneno total), por lo que la dosis reto utilizada (2 DCM) fue de 0.215  $\mu\text{g}$  de veneno (gráfica 1 y anexo 5, tabla 5.1).

Posteriormente se evaluaron las actividades coagulante y anticoagulante intrínsecas de los extractos etanólicos (0.005-0.086 mg) de las nueve plantas del proyecto, demostrándose que ninguno de los extractos presentaba actividades intrínsecas significativas ( $p < .001$ ) (tablas 4 y 5). Así mismo, en los ensayos de neutralización realizados utilizando las relaciones de DR:extracto establecidas para este estudio (1:400 a 1:25 p:p), se demostró que ninguno de los extractos etanólicos evaluados neutralizó el efecto coagulante del veneno ( $p < .001$ ) a las dosis ensayadas (tabla 6).

Tabla 1  
 Datos de recolección de especies vegetales

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
Palo jote	<i>Bursera simaruba</i> (L.) Sarg. (Burseraceae)	Ecoparcela el Kakawatal, Samayac, Suchitepéquez N 14° 33' 08.4" O 091° 28' 02.8" 453 msnm <sup>b</sup>	03/04/2016	Corteza	6.30	2.60	(CFEH <sup>a</sup> 1386)
Palo jote	<i>Bursera simaruba</i> (L.) Sarg. (Burseraceae)	Ecoparcela el Kakawatal, Samayac, Suchitepéquez N 14° 33' 08.4" O 091° 28' 02.8" 453 msnm <sup>b</sup>	26/05/2016	Corteza	2.93	1.21	(CFEH 1386)
Samat	<i>Eryngium foetidum</i> L. (Apiaceae)	Aldea Plan Grande Quehueche, Livingston, Izabal N 15° 50' 02.6" O 088° 49' 02.1" 85 msnm <sup>b</sup>	28/04/2016	Hojas	2.69	0.54	(CFEH 1387)
Pimienta gorda	<i>Pimenta dioica</i> (L.) Merr. (Myrtaceae)	Comunidad de Barra Lampara, Livingston, Izabal N 15° 46' 56.76" O 088° 47' 29.94" 13 msnm <sup>b</sup>	28/04/2016	Hojas	1.10	0.33	(CFEH 1388)

Nota. <sup>a</sup>CFEH: *Cemat Farmaya ethnobotanical herbarium*. <sup>b</sup>msnm: metros sobre el nivel del mar.

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

<b>Características</b>	<b><i>Bursera simaruba</i></b>	<b><i>Pimenta dioica</i></b>	<b><i>Eryngium foetidum</i></b>
Órgano	Corteza	Hoja	Hoja
Peso seco	1500 g	1100 g	521.1 g
% de humedad	4.62%	9.57%	8.14%
Mejor solvente extractor	Etanol al 50%	Etanol al 70%	Etanol al 70%
% de rendimiento	15%	62%	69%
Peso extracto seco	30 g	124 g	141.2 g

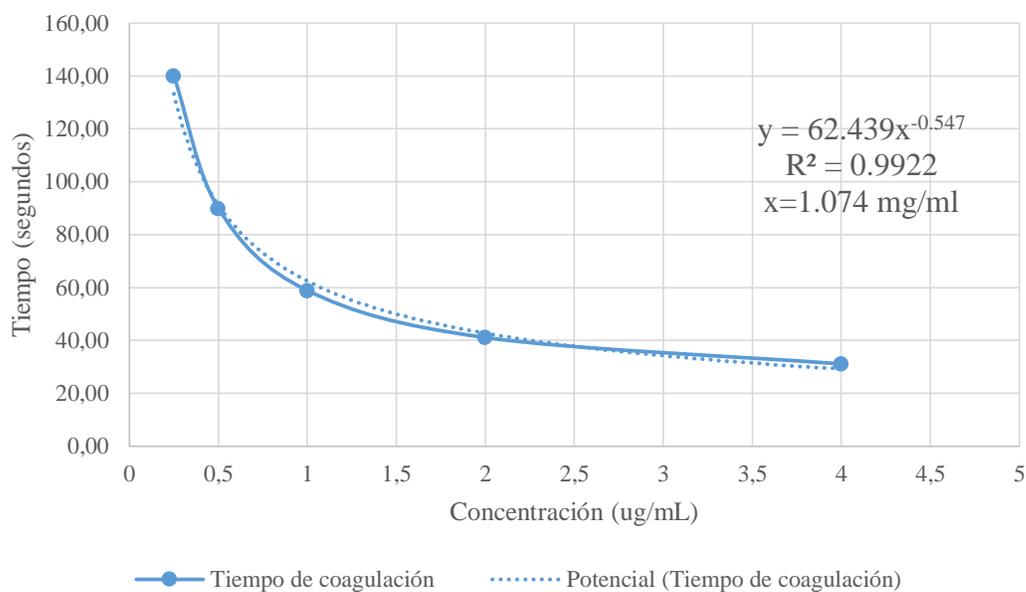
Tabla 3  
 Condiciones de disolución y preparación de soluciones madre (stocks) de trabajo de los extractos etanólicos evaluados en el proyecto para determinar actividades PLA<sub>2</sub>, proteolítica y coagulante

Planta	Prueba	Porcentaje Tween 80 (v/v) <sup>a</sup>	Concentración final (g extracto/ ml PBS-Tween 80) <sup>b</sup>
Corteza de <i>B. simaruba</i> Extracto con clorofila	Proteolítica	10%	0.125
Corteza de <i>B. simaruba</i> Extracto desclorofilado	Proteolítica	10%	0.125
Corteza de <i>B. simaruba</i> Extracto con clorofila	PLA <sub>2</sub>	10%	0.025
Corteza de <i>B. simaruba</i> Extracto con clorofila	Coagulación	5%	0.032
Hoja de <i>P. dioica</i> Extracto con clorofila	Proteolítica	1%	0.125
Hoja de <i>P. dioica</i> Extracto desclorofilado	Proteolítica	10%	0.125
Hoja de <i>P. dioica</i> Extracto con clorofila	PLA <sub>2</sub>	5%	0.025
Hoja de <i>P. dioica</i> Extracto con clorofila	Coagulación	5%	0.032
Hoja de <i>E. foetidum</i> Extracto con clorofila	Proteolítica	1%	0.125
Hoja de <i>E. foetidum</i> Extracto desclorofilado	Proteolítica	1%	0.125
Hoja de <i>E. foetidum</i> Extracto con clorofila	PLA <sub>2</sub>	1%	0.025
Hoja de <i>E. foetidum</i> Extracto con clorofila	Coagulación	1%	0.032
Corteza de <i>A. hindsii</i> Extracto con clorofila	Coagulación	5%	0.032
Corteza de <i>A. maxima</i> Extracto con clorofila	Coagulación	5%	0.032
Hoja de <i>A. maxima</i> Extracto con clorofila	Coagulación	5%	0.032
Raíz de <i>C. pareira</i> Extracto con clorofila	Coagulación	5%	0.032
Hoja de <i>H. patens</i> Extracto con clorofila	Coagulación	5%	0.032
Hoja de <i>P. peltatum</i> Extracto con clorofila	Coagulación	5%	0.032
Hoja de <i>S. hyacinthoides</i> Extracto con clorofila	Coagulación	5%	0.032

Nota. <sup>a</sup>v/v: volumen-volumen. <sup>b</sup>Concentración de la solución madre expresada en gramos de extracto por mililitro de PBS-Tween 80 al porcentaje indicado (v/v).

## Gráfica 1

*Determinación de la dosis coagulante mínima en plasma (DCM-P) del veneno para las pruebas de neutralización de la actividad coagulante*



*Nota.* La DCM-P del veneno se determinó agregando diferentes dosis de veneno a plasma citratado humano y midiendo el tiempo de coagulación. DCM-P: concentración de veneno que induce la coagulación del plasma en 60 segundos. Los puntos de la curva representan la media de tres experimentos independientes realizados por triplicado.

Tabla 4

*Determinación de la actividad coagulante intrínseca de los extractos etanólicos evaluados en el estudio*

Dosis planta (mg)	Tiempo de coagulación (segundos) <sup>a</sup>									
	<i>A. maxima</i> (hoja)	<i>A. maxima</i> (corteza)	<i>A. hindsii</i>	<i>H. patens</i>	<i>P. peltatum</i>	<i>C. pareira</i>	<i>S.</i> <i>hyacinthoides</i>	<i>E.</i> <i>foetidum</i>	<i>B.</i> <i>simaruba</i>	<i>P. dioica</i>
0.086	Incoagulable <sup>c</sup>	Incoagulable	Incoagulable	Incoagulable	Incoagulable	Incoagulable	Incoagulable	Incoagulable	Incoagulable	Incoagulable
0.043	Incoagulable	Incoagulable	Incoagulable	Incoagulable	Incoagulable	Incoagulable	Incoagulable	Incoagulable	Incoagulable	Incoagulable
0.021	Incoagulable	Incoagulable	Incoagulable	Incoagulable	Incoagulable	Incoagulable	Incoagulable	Incoagulable	Incoagulable	Incoagulable
0.010	Incoagulable	Incoagulable	Incoagulable	Incoagulable	Incoagulable	Incoagulable	Incoagulable	Incoagulable	Incoagulable	Incoagulable
0.005	Incoagulable	Incoagulable	Incoagulable	Incoagulable	Incoagulable	Incoagulable	Incoagulable	Incoagulable	Incoagulable	Incoagulable
PBS <sup>b</sup>	Incoagulable	Incoagulable	Incoagulable	Incoagulable	Incoagulable	Incoagulable	Incoagulable	Incoagulable	Incoagulable	Incoagulable
Veneno <sup>c</sup>	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
Trombina <sup>d</sup>	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20

*Nota.*<sup>a</sup> La actividad coagulante intrínseca se evaluó incubando a 37°C diferentes dosis del extracto con plasma humano citratado y evaluando visualmente el tiempo empleado en la formación de un coagulo evidente. Los resultados presentan el promedio (n = 15) de tres ensayos independientes realizados en quintuplicado para cada una de las dosis evaluadas.

<sup>b</sup>PBS: control negativo de reacción. <sup>c</sup>Veneno: control positivo (DR= 0.215 µg). <sup>d</sup>Trombina: control positivo (2.7 UNIH/ml; UNIH: unidad establecida por el Instituto Nacional de Salud de los EE.UU. [*National Institute of Health*, por sus siglas en inglés]). <sup>e</sup>Se reportan como incoagulables aquellas muestras que no presentaron formación de un coagulo evidente luego de 60 minutos de incubación.

Tabla 5

*Determinación de la actividad anticoagulante intrínseca de los extractos etanólicos evaluados en el estudio*

Dosis planta (mg)	Tiempo de coagulación (segundos) <sup>a</sup>									
	<i>A. maxima</i> (hoja)	<i>A. maxima</i> (corteza)	<i>A. hindsii</i>	<i>H. patens</i>	<i>P. peltatum</i>	<i>C. pareira</i>	<i>S.</i> <i>hyacinthoides</i>	<i>E.</i> <i>foetidum</i>	<i>B.</i> <i>simaruba</i>	<i>P. dioica</i>
0.086	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
0.043	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
0.021	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
0.010	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
0.005	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
PBS <sup>b</sup>	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
Veneno <sup>c</sup>	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
Trombina <sup>d</sup>	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20

*Nota.* <sup>a</sup>La actividad anticoagulante intrínseca se evaluó incubando diferentes dosis del extracto con una dosis fija de trombina por 30 minutos a 37°C; posteriormente esa mezcla se agregó a plasma humano citratado y se midió el tiempo empleado en la formación de un coagulo evidente a 37°C. Los resultados presentan el promedio (n = 15) de tres ensayos independientes realizados en quintuplicado para cada una de las dosis evaluadas. <sup>b</sup>PBS: control negativo de reacción. <sup>c</sup>Veneno: control positivo (DR= 0.215 µg). <sup>d</sup>Trombina: control positivo (2.7 UNIH/ml; UNIH: unidad establecida por el Instituto Nacional de Salud de los EE.UU. [*National Institute of Health*, por sus siglas en inglés]).

Tabla 6

Neutralización de la actividad coagulante del veneno de *B. asper* por los extractos etanólicos evaluados en el estudio

Relaciones veneno:planta <sup>a</sup>	Tiempo de coagulación (segundos)									
	<i>A. maxima</i> (hoja)	<i>A. maxima</i> (corteza)	<i>A. hindsii</i>	<i>H. patens</i>	<i>P.</i> <i>peltatum</i>	<i>C. pareira</i>	<i>S.</i> <i>hyacinthoides</i>	<i>E.</i> <i>foetidum</i>	<i>B.</i> <i>simaruba</i>	<i>P. dioica</i>
1:400	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
1:200	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
1:100	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
1:50	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
1:25	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
PBS <sup>b</sup>	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
Veneno <sup>c</sup>	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
Trombina <sup>d</sup>	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20

*Nota.*<sup>a</sup> La neutralización de la actividad coagulante se evaluó incubando la DR del veneno (0.215 µg) con dosis variables del extracto (relaciones p:p) por 30 minutos a 37°C; posteriormente la mezcla se agregó a plasma humano citratado y se midió el tiempo invertido en la formación de un coagulo evidente a 37°C. Los resultados presentan el promedio (n = 15) de tres ensayos independientes realizados en quintuplicado para cada una de las dosis de extracto evaluadas. <sup>b</sup>PBS: control negativo de reacción. <sup>c</sup>Veneno: control positivo (DR= 0.215 µg). <sup>d</sup>Trombina: control positivo (2.7 UNIH/ml; UNIH: unidad establecida por el Instituto Nacional de Salud de los EE.UU. [*National Institute of Health*, por sus siglas en inglés]).

### 3.1.2 Evaluación de la capacidad de los extractos etanólicos de *E. foetidum*, *P. dioica* y *B. simaruba* para neutralizar los efectos fosfolipasa A2 y proteolítico del veneno de *B. asper*

En la siguiente fase del proyecto se determinaron las actividades PLA<sub>2</sub> y proteolítica intrínsecas de los extractos etanólicos de *B. simaruba*, *E. foetidum* y *P. dioica* por medio de ensayos dosis-respuesta, según se describe en la sección de Materiales y Métodos, con la finalidad de determinar los niveles de extracto que podrían utilizarse en el estudio sin provocar los efectos PLA<sub>2</sub> o proteolíticos, que invalidaran los resultados de las pruebas de neutralización. Posteriormente, utilizando las DR de veneno determinadas en un estudio previo (Saravia-Otten et al., 2015), se procedió a evaluar la capacidad de los extractos vegetales para neutralizar los efectos del veneno.

La actividad PLA<sub>2</sub> intrínseca se determinó incubando diferentes dosis de cada extracto (0.078–1.25 mg) con el sustrato. Se demostró que el extracto de *B. simaruba* presentaba actividad PLA<sub>2</sub> intrínseca a todas las dosis estudiadas (2.3-4.2%), siendo la dosis más alta (1.25 mg) la que demostró la mayor actividad (4.2 %, IC95% [1.97, 6.47]). Aunque la actividad intrínseca demostrada por esta planta fue significativamente diferente a la actividad del veneno ( $p \leq .001$ ), de acuerdo a los criterios de inclusión establecidos en el estudio, este extracto no fue analizado en las pruebas de neutralización.

Al analizarse la capacidad del extracto de *P. dioica* en los ensayos de neutralización en las relaciones DR:extracto establecidas para este estudio (1:400 a 1:25 p:p), se encontró que ninguna de las dosis enfrentadas al veneno (0.078–1.25 mg) pudo neutralizar efectivamente ( $p = .624$ ) el efecto PLA<sub>2</sub>. De igual manera, las dosis del extracto de *E. foetidum* enfrentadas al veneno demostraron carecer de toda capacidad neutralizante, por lo que, al obtenerse valores de cero en el bioensayo, el análisis de varianza no se pudo realizar.

Debido a que existía la posibilidad de que el color verde intenso de los extractos vegetales podría interferir con la lectura de absorbancia de los productos coloreados resultantes de la degradación de azocaseína en el bioensayo de determinación de actividad proteolítica descrito por Wuang, y col. (2004), en el presente trabajo se analizaron los extractos con clorofila y desclorofilados de *B. simaruba*, *E. foetidum* y *P. dioica*. El rendimiento obtenido

de las fracciones orgánicas resultantes durante el proceso de desclorofilación se muestran en la tabla 7 y el proceso se ilustra en el anexo 6, figura 6.1. El análisis del espectro de absorción de la dosis más alta de cada extracto con y sin clorofila (1.25 mg), demostró que absorbieron con mayor intensidad a longitudes de onda menores a 400 nm (anexo 7, figura 7.1 y tabla 7.1). 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 a 450 nm con una mínima interferencia, cuyo valor de absorbancia se sustrajo en los cálculos finales, según se describe en la metodología.

Ninguno de los extractos estudiados presentó actividad proteolítica intrínseca ( $p < .001$ ) a las dosis estudiadas (0.078-1.25 mg). Como se muestra en la tabla 8, los extractos con clorofila de *P. dioica* y *E. foetidum* neutralizaron efectivamente el efecto proteolítico del veneno a las relaciones veneno:planta ensayadas (1:3.125 hasta 1:50 p:p), ya que se necesitaron 0.884 mg, IC95% [0.811, 0.965] de *P. dioica* y 1.244 mg, IC95% [1.110, 1.298] de *E. foetidum* ( $p < .001$ ), para alcanzar la DE<sub>50</sub>. El análisis de regresión lineal mostró un coeficiente de determinación ( $r^2$ )  $\geq .904$  en ambos casos. En la misma tabla se muestra que los extractos sin clorofila de estas dos plantas no alcanzaron la DE<sub>50</sub> a las dosis evaluadas en el estudio. El análisis de regresión (tabla 8) demostró que, aunque la ecuación calculada para la prueba con el extracto desclorofilado de *P. dioica* era significativa ( $p < .001$ ), el coeficiente de determinación era muy bajo ( $r^2 = .262$ ), por lo que la DE<sub>50</sub> calculada (10.07 mg, IC95% [7.06, 16.95]) no es necesariamente representativa del valor real, lo cual se refleja en la amplitud de los intervalos de confianza. Por otro lado, la ecuación derivada del análisis del extracto desclorofilado de *E. foetidum* también fue significativa ( $p < .001$ ), y aunque su coeficiente de determinación ( $r^2 = .831$ ) fue inferior a 0.9, puede considerarse que el comportamiento de los datos guarda una mejor linealidad que en el caso de *P. dioica*. Según el modelo, su DE<sub>50</sub> fue de 1.957 mg, IC95% [1.71, 2.26], un valor cercano al del extracto con clorofila.

Los extractos con y sin clorofila de *B. simaruba* no demostraron ninguna actividad neutralizante, por lo que no aparecen incluidos en la tabla 8.

Tabla 7  
 Porcentajes de rendimiento obtenidos durante el proceso de desclorofilación de los extractos vegetales.

<b>Muestra</b>	<b>Descripción Especie vegetal</b>	<b>Porcentaje de rendimiento</b>
<b><i>Bursera simaruba</i> (corteza)</b>		
<b>Extracto seco</b>	Extracto etanólico al 50% a partir de 200 g de material vegetal	15%
<b>F1</b>	Fracción metanólica completa sin fraccionar a partir de 10 g de extracto seco	51%
<b>F2</b>	Fracción hexánica a partir de 10 g de extracto seco	4.00%
<b>F3</b>	Fracción diclometánica a partir de 10 g de extracto seco	0.7%
<b>F4</b>	Fracción metanólica a partir de 10 g de extracto seco	6%
<b>F5</b>	Fracción acetónica a partir de 10 g de extracto seco	12%
<b><i>Pimenta dioica</i> (hojas)</b>		
<b>Extracto seco</b>	Extracto etanólico al 70% a partir de 200 g de material vegetal	62%
<b>F1</b>	Fracción etanólica completa sin fraccionar a partir de 10 g de extracto seco	14%
<b>F2</b>	Fracción hexánica a partir de 10 g de extracto seco	4%
<b>F3</b>	Fracción diclometánica a partir de 10 g de extracto seco	4%
<b>F4</b>	Fracción metanólica a partir de 10 g de extracto seco	25%
<b>F5</b>	Fracción acetónica a partir de 10 g de extracto seco	29%
<b><i>Eryngium foetidum</i> (hojas)</b>		
<b>Extracto seco</b>	Extracto etanólico al 70% a partir de 205.1 g de material vegetal	69%
<b>F1</b>	Fracción etanólica completa sin fraccionar a partir de 10.4 g de extracto seco	10%
<b>F2</b>	Fracción hexánica a partir de 10.4 g de extracto seco	0.2%
<b>F3</b>	Fracción diclometánica a partir de 10.4 g de extracto seco	0.2%
<b>F4</b>	Fracción etanólica a partir de 10.4 g de extracto seco	19.10%
<b>F5</b>	Fracción acetónica a partir de 10.4 g de extracto seco	34%

Tabla 8

*Neutralización del efecto proteolítico del veneno de B. asper por los extractos etanólicos evaluados en el estudio*

Extracto etanólico	Neutralización actividad proteolítica del veneno				
	$r^{2a}$	$p$	Ecuación <sup>b</sup>	IC95% <sup>c</sup>	DE <sub>50</sub> [IC95%] <sup>d</sup>
<i>P. dioica</i> con clorofila	.956	< .001	$y = 60.925x - 3.8536$	Límite inferior: $y = 57.873x - 5.823$ Límite superior: $y = 63.978x - 1.884$	0.884 [0.811, 0.965]
<i>P. dioica</i> sin clorofila	.262	< .001	$y = 4.388x + 5.7897$	Límite inferior: $y = 2.673x + 4.683$ Límite superior: $y = 6.103x + 6.8963$	10.075 [7.062, 16.953]
<i>E. foetidum</i> con clorofila	.904	< .001	$y = 34.033x + 7.6791$	Límite inferior: $y = 31.453x + 6.015$ Límite superior: $y = 36.613 + 9.343$	1.244 [1.110, 1.298]
<i>E. foetidum</i> sin clorofila	.831	< .001	$y = 23.742x + 3.5253$	Límite inferior: $y = 21.242x + 1.9121$ Límite superior: $y = 26.242x + 5.1384$	1.957 [1.710, 2.264]

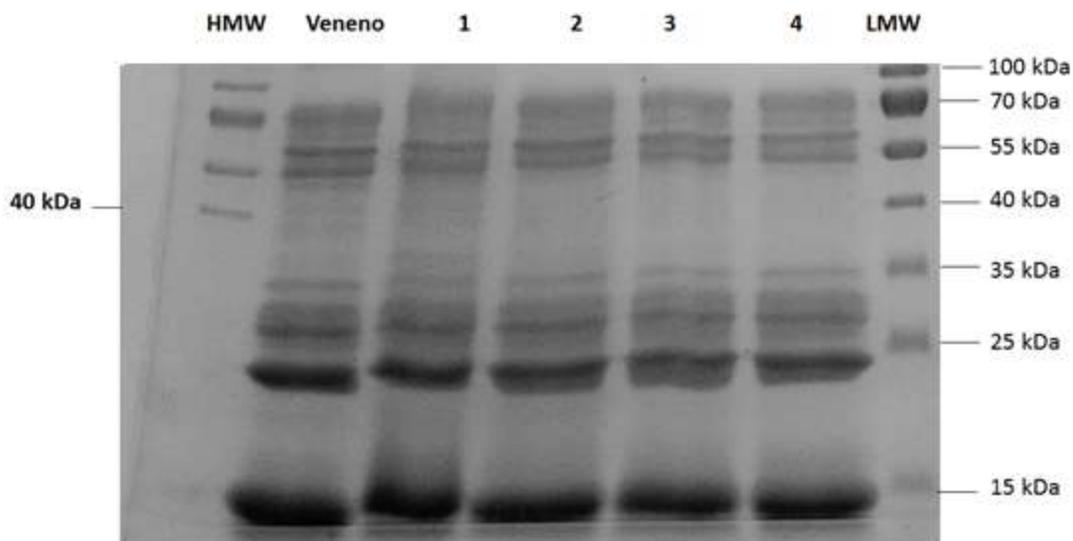
*Nota.* <sup>a</sup>Coefficiente de determinación. <sup>b</sup>Ecuación que representa el modelo de regresión lineal que mejor describe el comportamiento de los resultados obtenidos en los ensayos de neutralización de la actividad proteolítica del veneno. <sup>c</sup>Ecuaciones que delimitan el intervalo de confianza al 95% de la ecuación del modelo de regresión lineal. <sup>d</sup>Dosis efectiva media expresada en mg de extracto, entre corchetes se muestran los valores de los intervalos de confianza.

### 3.1.3 Comparación de los patrones electroforéticos (SDS-PAGE)

Se evaluó por medio de electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 12%, en condiciones reductoras, el patrón electroforético del veneno crudo de *B. asper*. En la figura 1 se muestra la presencia de las bandas características del veneno la serpiente *B asper* adulta del Pacífico de Costa Rica, las cuales corresponden a proteína(s) de masa molecular relativa entre 14 y 70 kDa (Alape-Girón et al., 2009). No se detectaron bandas de proteínas en los extractos vegetales (datos no mostrados). Cuando el veneno fue preincubado con los extractos etanólicos de las plantas que demostraron actividad neutralizante del efecto proteolítico (*P. dioica* y *E. foetidum*) del veneno, el patrón de bandas no mostró cambios en ninguna de las mezclas veneno:planta (1:20, p:p) en comparación con el patrón del control de veneno solo (figura 1).

Figura 1

*Electroforesis SDS-PAGE del veneno de B. asper crudo y preincubado con extractos vegetales.*



*Nota.* El veneno se preincubó con extractos etanólicos en proporciones veneno:extracto (1:20 p:p) a 37°C por 30 min. En un gel de poliacrilamida al 12% se cargaron en cada pozo 10 µl de cada mezcla conteniendo: *P. dioica* con (1) y sin clorofila (2); *E. foetidum* con (3) y sin clorofila (4). Como control se cargó veneno solo. Se muestran los marcadores de alto peso molecular (HMW, *High molecular weight*) y bajo peso molecular (LMW, *Low molecular weight*).

### 3.1.4 Tamizaje fitoquímico preliminar

Adicionalmente a lo propuesto en el anteproyecto de la presente investigación, se realizó la determinación macro y semimicrométrica de los principales grupos de metabolitos secundarios (flavonoides, antocianinas, catequinas, taninos y cumarinas) presentes en los extractos etanólicos de *B. simaruba*, *E. foetidum* y *P. dioica* (anexo 8, tablas 8.1-8.3 y figuras 8.1-8.3).

En la tabla 9 presenta el resumen del tamizaje fitoquímico. Como puede observarse, las tres especies vegetales presentan flavonoides, antocianinas y taninos; mientras que las cumarinas solo están presentes *B. simaruba*.

Tabla 9

#### *Tamizaje fitoquímico de las plantas del proyecto*

Extracto etanólico	Flavonoides, catequinas y antocianinas <sup>a</sup>	Taninos <sup>b</sup>	Cumarinas <sup>c</sup>
<i>B. simaruba</i>	Presencia	Presencia	Presencia
<i>E. foetidum</i>	Presencia	Presencia	Ausencia
<i>P. dioica</i>	Presencia	Presencia	Ausencia

*Nota.* <sup>a</sup>La presencia de flavonoides y antocianinas se evaluó en los extractos etanólicos mediante cromatografía en capa fina, revelador de productos naturales y polietilenglicol. <sup>b</sup>Los taninos se determinaron mediante técnicas macrométricas de tubos por reacción de formación de precipitado. <sup>c</sup>La detección de cumarinas se realizó mediante cromatografía en capa fina con revelador KOH 5%.

### 3.2 Matriz de resultados

Objetivo Específico	Resultado Esperado	Resultado Obtenido
<p>Evaluar la capacidad de los extractos etanólicos de nueve plantas de uso etnomédico (<i>A. hindsii</i>, <i>A. maxima</i>, <i>C. pareira</i>, <i>H. patens</i>, <i>P. peltatum</i>, <i>S. hyacinthoides</i>, <i>E. foetidum</i>, <i>P. dioica</i> y <i>B. simaruba</i>) para neutralizar el efecto coagulante del veneno de <i>B. asper</i>.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Especies vegetales (<i>E. foetidum</i>, <i>P. dioica</i> y <i>B. simaruba</i>) secas.</li> </ul>	Las tres especies vegetales fueron colectadas y secadas según los protocolos establecidos.
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fichas técnicas de las plantas (<i>E. foetidum</i>, <i>P. dioica</i> y <i>B. simaruba</i>) elaboradas.</li> </ul>	Se cuenta con las fichas técnicas de las tres especies vegetales, en las que se presenta su información etnobotánica, química y farmacológica.
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tres extractos etanólicos (<i>E. foetidum</i>, <i>P. dioica</i> y <i>B. simaruba</i>).</li> </ul>	Elaboración de los extractos etanólicos de las tres especies según se describe en materiales y métodos.
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Disolución de nueve extractos etanólicos (<i>A. hindsii</i>, <i>A. maxima</i>, <i>C. pareira</i>, <i>H. patens</i>, <i>P. peltatum</i>, <i>S. hyacinthoides</i>, <i>E. foetidum</i>, <i>P. dioica</i> y <i>B. simaruba</i>).</li> </ul>	Disolución de los extractos de las nueve especies vegetales en PBS-Tween 80 (1-10% v/v) y se prepararon las soluciones madre necesarias para los bioensayos.
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pruebas de coagulación estandarizadas.</li> </ul>	Estandarización de las pruebas de coagulación con veneno crudo, los extractos etanólicos y mezclas veneno:extracto, según la metodología descrita por Theakston y Reid (1983).
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Actividades coagulante y anticoagulante intrínsecas determinadas.</li> </ul>	Determinación de las actividades coagulante y anticoagulante intrínsecas de los extractos etanólicos de las nueve especies vegetales del proyecto.

	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Capacidad neutralizante actividad coagulante determinada.</li> </ul>	Determinación de la capacidad de los extractos etanólicos de las nueve especies vegetales, para neutralizar el efecto coagulante del veneno de <i>B. asper</i> .
<p>Evaluar la capacidad de los extractos etanólicos de <i>E. foetidum</i>, <i>P. dioica</i> y <i>B. simaruba</i> para neutralizar los efectos fosfolipasa A2 (PLA<sub>2</sub>) y proteolítico del veneno de <i>B. asper</i>.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Actividad PLA<sub>2</sub> intrínseca determinada.</li> </ul>	Determinación de la actividad PLA <sub>2</sub> intrínseca de los extractos de <i>E. foetidum</i> , <i>P. dioica</i> y <i>B. simaruba</i> .
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Capacidad neutralizante actividad PLA<sub>2</sub> determinada.</li> </ul>	Determinación de la capacidad de los extractos vegetales para neutralizar la actividad PLA <sub>2</sub> del veneno.
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Técnica de despigmentación estandarizada.</li> </ul>	Extractos vegetales despigmentados por medio de la técnica estandarizada según Fernandes y col. (1997) y Coll y Bowden (1986).
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Actividad proteolítica intrínseca determinada.</li> </ul>	Determinación de la actividad proteolítica intrínseca de los extractos de <i>E. foetidum</i> , <i>P. dioica</i> y <i>B. simaruba</i> .
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Capacidad neutralizante de actividad proteolítica determinada.</li> </ul>	Determinación de la capacidad de los extractos vegetales (con y sin clorofila) para neutralizar la actividad proteolítica del veneno.
<p>Determinar si el efecto neutralizante ejercido por los extractos vegetales se debe a la proteólisis de las principales proteínas del veneno.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Patrones electroforéticos descritos y comparados</li> </ul>	Determinación y comparación de los patrones electroforéticos del veneno de <i>B. asper</i> solo y enfrentado a los extractos etanólicos del proyecto que demostraron alguna capacidad neutralizante en los bioensayos.

### 3.3 Impacto esperado

- 3.3.1 Se generó información científica acerca de la capacidad de los extractos de nueve especies de Centroamérica usadas tradicionalmente como antiofídicos para neutralizar tres efectos tóxicos (coagulación, proteólisis y PLA<sub>2</sub>) del veneno de *B. asper*.
- 3.3.2 Los datos generados en este proyecto serán divulgados a nivel nacional e internacional por medio de una publicación científica, conferencias y trifoldares informativos.
- 3.3.3 La Facultad de CCQQ y Farmacia cuenta con la tecnología y personal capacitado (profesores titulares, auxiliares y estudiantes) en identificación de plantas antiofídicas, obtención de extractos vegetales, manejo de venenos ofídicos y pruebas de neutralización para resolver un problema de salud nacional.
- 3.3.4 Se promovió la investigación conjunta de un equipo multidisciplinario de la Facultad de CCQQ y Farmacia con el fin de ofrecer al país una alternativa viable para el tratamiento del accidente ofídico y aprovechamiento de los recursos naturales.
- 3.3.5 Se incidió en la formación de recurso humano profesional y en la información popular sobre el problema del accidente ofídico en Guatemala, su tratamiento convencional y alternativo.
- 3.3.6 Se dio continuidad a relaciones colaborativas con grupos de investigación internacionales dedicados al tema del ofidismo y el uso de productos naturales para su tratamiento.

#### 4. Análisis y discusión de resultados

La mayoría de accidentes ofídicos en Latinoamérica suceden en áreas rurales alejadas de los centros de salud, por lo que un número indeterminado de víctimas de envenenamiento ofídico son tratados por curanderos o chamanes, quienes preparan antídotos con plantas de acuerdo a sus recetas tradicionales, y los aplican en forma de toma de infusiones o jugos, o bien, como baños y emplastos sobre el área afectada (Coe & Anderson, 2005; Orellana, 1987; Otero, et al., 2000a, Hay 2002).

La serpiente *B. asper* es responsable del mayor número de accidentes ofídicos en Centroamérica y en la región norte de Sudamérica (Gutiérrez, 2010; Otero-Patiño, 2009). Aunque la administración temprana de sueros antiofídicos es el tratamiento validado para tratar el envenenamiento, su uso en áreas rurales presenta severas limitaciones, existiendo el agravante de que, aunque son altamente eficaces para neutralizar los efectos sistémicos del veneno, los daños locales se desarrollan tan rápidamente que su neutralización dependerá de la rapidez con la que se administre el antisuero (como se citó en Lomonte, León, Angulo, Rucavado & Núñez, 2009).

El complejo cuadro clínico desencadenado por la mordedura de *B. asper* es el resultado de la acción de varios componentes del veneno. Las PLA<sub>2</sub>s son las principales responsables de la mionecrosis producida por el veneno, la cual, en caso de no ser neutralizada, produce pérdida del tejido muscular y secuelas físicas; sus acciones farmacológicas incluyen la inducción de edema, anticoagulación in vitro, citotoxicidad e hiperalgesia (como se citó en Angulo & Lomonte, 2009).

El efecto proteolítico del veneno de está mediado principalmente por las SVMPs, y en menor proporción por serina proteinasas (Gutiérrez, 2002). Las SVMPs son responsables de la hemorragia local y sistémica que caracteriza el envenenamiento; además inducen mionecrosis, edema, formación de bulas, dermonecrosis, fibrino(geno)lisis y degradación de matriz extracelular, entre otras muchas actividades farmacológicas (como se citó en Gutiérrez, Rucavado & Escalante 2010).

Las serina proteinasas tienen acción principalmente sobre proteínas de la cascada de la coagulación, tales como la actividad tipo trombina sobre el fibrinógeno, activación del

plasminógeno, fibrinogenólisis, inducción de la agregación plaquetaria e hipotensión (Markland, 1998; Pérez et al., 2007; Serrano & Maroun, 2005). Dado que el veneno de *B. asper* contiene serinaproteinasas tipo trombina y metaloproteinasas con actividad activadora de protrombina, su acción combinada sobre la hemostasis resulta en la formación de microtrombos, con agotamiento de fibrinógeno plasmático (desfibrin(ogen)ación) y degradación de fibrina (Rucavado et al., 2005).

Por esta razón, la búsqueda de compuestos naturales efectivos para el tratamiento del envenenamiento producido por las serpientes *Bothrops* se ha enfocado en aquellos que logren la inhibición de los principales componentes del veneno de forma rápida y segura (Carvalho et al., 2013; como se citó en Lomonte et al., 2009; Patiño, Benjumea & Pereañez, 2013; Santhosh et al., 2013). Los extractos vegetales pueden contener una variedad de compuestos químicos capaces de inhibir los efectos tóxicos de los venenos de serpiente por acción directa como inhibidores enzimáticos, quelantes, inactivadores químicos o inmunomoduladores, que a su vez interactúan con macromoléculas blanco (Mors et al., 2000; Otero et al., 2000b; como se citó en Sánchez & Rodríguez-Acosta, 2008). También se ha sugerido que pueden producir inactivación del veneno por proteólisis directa (Nuñez et al., 2004; Mourao de Moura et al., 2014).

Se realizaron pruebas para determinar la presencia de flavonoides, taninos, catequinas y cumarinas mediante cromatografía en capa fina y ensayos macro y semimicrométricos en los extractos etanólicos de las tres plantas de reciente ingreso al estudio (*B. simaruba*, *E. foetidum* y *P. dioica*), con el objetivo de correlacionar la presencia de dichos metabolitos con las bioactividades presentadas. El análisis fitoquímico evidenció la presencia de flavonoides, antocianinas, catequinas y taninos en las tres especies, mientras que las cumarinas solo se detectaron en *B. simaruba*.

La determinación de la DCM del lote de veneno utilizado en el proyecto demostró una dosis de 1.074µg/ml, comparable a la reportado por Bogarín y col. (1999) en Costa Rica para ejemplares de *B. asper* adultos de la región del Pacífico. Posteriormente se demostró que ninguno de los extractos de las seis plantas que proceden del estudio anterior (*A. hindsii*, *A. maxima*, *C. pareira*, *H. patens*, *P. peltatum* y *S. hyacinthoides*) ni las de este estudio (*P. dioica*, *E. foetidum* y *B. simaruba*) presentaron actividad coagulante y/o anticoagulante

intrínseca a las dosis evaluadas (0.005-0.86 mg). Estos resultados difieren de los obtenidos en un estudio anterior realizado con plantas guatemaltecas (Saravia, et al 2001a), en donde los extractos acuosos y etanólicos de *D. contrajerva* demostraron actividad coagulante intrínseca, y los acuosos de *N. lobata* y *E. odoratum* actividad anticoagulante intrínseca. Sin embargo, debe tomarse en cuenta que las dosis de extractos utilizadas fueron más altas (0.1-5 mg) a las utilizadas en este estudio, por lo que existe la posibilidad de que el efecto intrínseco de las plantas sobre la hemostasia sea dosis-dependiente (Houghton & Skari, 1994). Esta noción podría ser sustentada además por el hecho de que el análisis fitoquímico realizado demostró que posee el extracto de *B. simaruba* cumarinas (warfarinas) en su composición química, pero no se logró detectar actividad anticoagulante en el extracto. Los flavonoides están comúnmente asociados con cumarinas y además han demostrado efectos antiplaquetario y anticoagulante (Bijak et al., 2011; Ryu et al., 2013). Los flavonoides no encajan dentro de las características estructurales típicas asociadas con la actividad anticoagulante, sin embargo, han inhibido la adhesión, agregación y secreción plaquetaria mediante ensayos ex vivo (McGregor et al., 1999; Freedman, et al., 2001). Estas consideraciones sugieren la necesidad de estudiar con mayor detalle la actividad de *B. simaruba* sobre la hemostasia, así como de realizar la caracterización fitoquímica de todas las plantas del estudio.

Cuando los extractos se enfrentaron al veneno, ninguno de ellos mostró capacidad neutralizante del efecto coagulante a las proporciones dosis reto de veneno: extracto evaluadas (1:400-1:25). Aunque en la literatura científica no existen reportes de que estas plantas tengan actividad inhibitoria del efecto coagulante del veneno de *B. asper* de la región centroamericana (como se citó en Giovannini & Howes, 2017) o Colombia, estos resultados difieren parcialmente con los hallazgos obtenidos en un estudio anterior, ya que, aunque se ensayaron las mismas relaciones DR veneno: extracto (p:p), las dosis proporcionales de planta en dicho estudio fueron más altas (0.2-3.2 mg) a las utilizadas en esta investigación. Así mismo, los extractos acuosos de las dos plantas (*N. lobata* y *E. odoratum*) que demostraron neutralizar efectivamente el efecto coagulante (potencialmente desfibrin(ogen)ante) del veneno, tenían actividad anticoagulante intrínseca en la fracción etanólica (Saravia, et al 2001a). Aunque en este caso también existe la posibilidad de que al aumentarse la cantidad de extracto en relación al veneno se pudiera obtener algún grado de

neutralización del efecto coagulante por ser dosis-dependiente (Houghton & Skari, 1994; Patiño, López, Aristizabal; Quintana, & Benjumea, 2012), deberá evaluarse en futuras investigaciones que estas dosis sean biológicamente relevantes, sobre todo teniendo en cuenta que en Colombia se ha reportado que se necesitan 10-20  $\mu\text{g}$  de los extractos etanólicos de algunas plantas que neutralizan efectivamente el efecto coagulante del veneno de *B. asper* (Fernández et al., 2010; Nuñez et al., 2004).

La inhibición del efecto coagulante del veneno se ha atribuido a la presencia de flavonoides, ya que tienen una amplia gama de bioactividades, entre ellas la de inhibir la actividad enzimática de serinaproteinasas como trombina, plasmina y tripsina, posiblemente mediante un acoplamiento molecular que induce el bloqueo del sitio activo de la enzima (Cuccioloni et al., Jedinak et al., 2006). Así mismo, se ha descrito que las cumarinas pueden inhibir serinaproteinasas (Pochet, Frédérick, R., & Maseereel 2004). Aunque en el análisis fitoquímico demostró la presencia de flavonoides, antocianinas y taninos en las tres especies del estudio (*B. simaruba*, *P. dioica* y *E. foetidum*), y de cumarinas en *B. simaruba*, los resultados obtenidos sugieren que posiblemente su concentración sea insuficiente para neutralizar las toxinas del veneno, ya que se utilizaron concentraciones relativamente bajas del extracto en estos experimentos. Existe también la posibilidad de que la extracción en etanol no permitiera la extracción total de dichos metabolitos, ya que algunos estudios han demostrado que la mayor cantidad de flavonoides y polifenoles generalmente son extraídos con acetona (Singh, Singh, Banu, & Salim, 2013).

Esta situación podría explicar también que las moléculas de las plantas que interactúan con los factores de la coagulación sanguínea o los componentes procoagulantes del veneno (serina proteinasas y metaloproteinasas) se perdieran durante la extracción etanólica, disminuyendo o anulando la bioactividad del extracto. Estas consideraciones deberán tomarse en cuenta para estudios posteriores, en donde deberá evaluarse la actividad de los extractos acuosos (Mourao de Moura et al., 2014; Saravia, et al, 2001a) y otras fracciones orgánicas de las plantas. Es importante mencionar también que la incapacidad de extractos vegetales para neutralizar el efecto desfibrinante del veneno de *B. asper* (inducido por su efecto coagulante) ha sido atribuido, en parte, a la rápida acción de los componentes tipo trombina del veneno sobre la cascada de la coagulación (Ho, et al., 1986; Nuñez et al, 2004).

Existen reportes en Sudamérica de plantas y moléculas activas que neutralizan efectivamente las PLA<sub>2</sub>s miotóxicas de los venenos de algunas serpientes de la familia Viperidae. Los metabolitos a los cuales se les ha atribuido su actividad son principalmente: a) compuestos fenólicos: flavonoides, cumestanos, alcaloides, taninos y otros; b) compuestos esteroideos: esteroides y colesterol; y c) terpenoides, incluyendo triterpenoides y saponinas (como se cita en Carvalho et al., 2013; Da Silva et al., 2007; Melo & Owny, 1999; Santosh et al., 2013). Si bien ha sido propuesta una inhibición competitiva por parte de estos compuestos hacia las enzimas mencionadas (Lättig et al., 2007), también podría pensarse en un mecanismo de inhibición menos específico, ya sea por la formación de complejos inactivos entre la enzima y los compuestos en mención, o por la quelación del Ca<sup>2+</sup> requerido por las fosfolipasas A<sub>2</sub> para su ciclo catalítico. Es posible sugerir que los compuestos polifenólicos pueden precipitar proteínas y formar complejos con metales como el Ca<sup>2+</sup> lo cual explicaría la disminución en la actividad de PLA<sub>2</sub> activo (Da Silva, Calgarotto, Chaar, & Marangoni 2008; Leanpolchareanchai, Pithayanukul, Bavovada, & Saparpakorn 2009).

En Colombia y Costa Rica se han detectado plantas con acción neutralizante de la actividad PLA<sub>2</sub> veneno de *B. asper* (Borges et al., 2000; Nuñez et al, 2004; Otero et al., 2000b y c) y de miotoxinas PLA<sub>2</sub> aisladas, como es el caso de *P. umbellatum* y *P. peltatum* (Nuñez et al., 2005). En el caso de estas últimas, logró identificarse al compuesto activo 4-nerolidilcatecol (un compuesto fenólico), el cual inhibió la actividad miotóxica y edematizante en ratones cuando se preincubó con la toxina, pero perdió su efectividad al ser inyectados, toxina y compuesto, separadamente (Nuñez et al., 2005). Sin embargo, cabe mencionar que cuando se evaluó el extracto de hojas *P. peltatum* colectadas en Izabal, Guatemala, este no demostró capacidad neutralizante del efecto PLA<sub>2</sub> del veneno crudo de *B. asper* (Saravia-Otten et al., 2015).

Los resultados obtenidos en este estudio en las pruebas de actividad PLA<sub>2</sub> intrínseca fueron inesperados, ya que inicialmente se demostró que el extracto de *B. simaruba* presenta actividad ( $\leq 5\%$ ) a todas las dosis evaluadas (0.078-1.25 mg/ml). Así mismo, los extractos de *P. dioica* y *E. foetidum* no demostraron capacidad neutralizante del efecto PLA<sub>2</sub> del veneno, aun cuando se ensayaron en proporciones veneno: extracto de 1:25 hasta 1:400 (p:p). Aunque la presencia de los compuestos fenólicos (metabolitos secundarios) en los extractos

sugeriría alguna actividad anti PLA<sub>2</sub>, estos resultados son similares a los obtenidos anteriormente en el estudio de plantas guatemaltecas, en donde no se logró detectar neutralización efectiva de esta actividad (Saravia, et al., 2001a; Saravia-Otten et al., 2015). Estos hallazgos sugieren la posibilidad de que variaciones en el lugar y época de colecta, factores ambientales como humedad, temperatura y suelo, así como el estado fenológico de la planta, hayan influido en la cantidad de metabolitos presentes en los especímenes estudiados (Ramakrishna & Ravinshankar, 2011).

El efecto proteolítico provocado por la acción de las SVMs del veneno sobre diversos sustratos es responsable de la producción de hemorragia local y sistémica, un efecto central producido por la mordedura de *B. asper*. Por esta razón se evaluó la capacidad de los extractos del estudio para neutralizar el efecto proteolítico del veneno en condiciones in vitro. Debido a que inicialmente se pensó que el color verde intenso de los extractos vegetales podría interferir con la prueba colorimétrica estandarizada para medir la actividad proteolítica de veneno y extractos sobre azocaseína (Wang, et al, 2004), los extractos etanólicos de *B. simaruba*, *P. dioica* y *E. foetidum* se evaluaron con y sin clorofila en ensayos simultáneos. Además, se realizó una modificación en la metodología, ya que se incluyó un control interno que permitió restar el color del extracto disuelto, tal como se describe en la sección de materiales y métodos. Los resultados de las pruebas de neutralización demostraron que los extractos con clorofila de *P. dioica* (DE<sub>50</sub>=0.884 mg) y *E. foetidum* (DE<sub>50</sub>= 1.244 mg) neutralizaron efectivamente la actividad del veneno a las dosis ensayadas en el estudio, mientras que sus extractos desclorofilados demostraron tener menor potencia, particularmente el de *P. dioica*.

Diversos estudios han demostrado que los metabolitos inhibidores de estas metaloproteinasas en los venenos de serpiente son principalmente terpenoides, saponinas, esteroides, alcaloides, antioxidantes, polifenoles, flavonoides y ftalatos (como se cita en Santhosh et al., 2013). En Costa Rica, el estudio realizado por Castro y col. (1999) identificó la presencia de catequinas, flavonas, antocianinas y taninos condensadas en los extractos vegetales que inhibieron efectivamente la hemorragia local inducida en ratones por la inyección de veneno de *B. asper*. La habilidad neutralizante del efecto hemorrágico en este y otros estudios (Mourao de Moura et al., 2014) se ha asociado principalmente a la presencia de flavonoides, los cuales podrían

quelar el átomo de zinc requerido para que las metaloproteinasas ejerzan su acción hemorrágica. Cabe mencionar que, en este contexto, los resultados obtenidos con el extracto clorofilado de *P. dioica* de Guatemala correlacionan con dicho estudio, en donde se demostró que los extractos hidroalcohólico (85% etanol), en acetato de etilo y acuoso de la hoja de *P. dioica* inhiben completamente la hemorragia local en ratones. Adicionalmente, los patrones electroforéticos del veneno de *B. asper* preincubados con los extractos de *P. dioica* y *E. foetidum* con y sin clorofila, demostraron que los componentes de los extractos vegetales no tenían efecto proteolítico sobre el veneno.

Lo expuesto anteriormente sugiere que la capacidad inhibitoria de la proteólisis demostrada por los extractos de *P. dioica* y *E. foetidum*, podría deberse a la presencia de los metabolitos secundarios reportados con bioactividad anti proteolítica (flavonoides, antocianinas, catequinas y taninos) en su composición, y que el mecanismo de inhibición posiblemente sea mediado por la quelación de cinc. Así mismo, que la pérdida de bioactividad observada en los extractos desclorofilados, puede atribuirse a la pérdida de moléculas lipofílicas activas durante el proceso de desclorofilación, tales como los terpenoides, saponinas y esteroides.

Es interesante mencionar que el hecho de que *E. foetidum* neutralice efectivamente el efecto proteolítico del veneno de *B. asper* respalda la forma en que los curanderos del norte de Guatemala utilizan esta planta para el tratamiento de la mordedura de serpiente, ya que aplican la hoja machacada en forma de cataplasma (Cáceres, 2009) sobre el área afectada (Hay, 2002). De igual forma, existen otros trabajos (García, Sáenz, Gómez, & Fernández 1999; Sáenz, Fernández, & García, 1997) que reportan el uso externo de los extractos de las hojas para reducir la inflamación crónica y aguda en modelos animales. La forma de uso tradicional antiofídico de la hoja de *P. dioica* no aparece reportada en la literatura, pero de acuerdo a los resultados obtenidos, tendría sentido recomendarse su uso externo, aunque deberá evaluarse en modelos animales de daño local, tales como el de hemorragia.

La falta de capacidad del extracto de *B. simaruba* para inhibir el efecto proteolítico del veneno fue inesperada, ya que además del estudio de Castro y col. (1999) en donde se demuestra su actividad anti hemorrágica in vivo, en el estudio de Coe y Anderson (2005) se reporta que la decocción de corteza o toda la planta de *B. simaruba* es utilizada de forma oral para tratar los efectos secundarios del envenenamiento por mordedura de serpientes en la

región este de Nicaragua, en donde *B. asper* es abundante (Campbell & Lamar, 1989). En el estudio de Castro y col. (1999) se reportó que los extractos hidroalcohólico y en acetato de etilo de la corteza de *B. simaruba* neutralizaron completamente la hemorragia local, siendo los extractos activos de la corteza muy ricos en taninos condensados además de presentar compuestos flavonoides.

Por esta razón, es interesante que el extracto etanólico de la especie guatemalteca, a pesar de poseer las familias de metabolitos secundarios potencialmente activos contra el veneno de serpiente (Arvigo & Balik, 1993), no haya demostrado acción inhibitoria alguna de la actividad proteolítica del veneno en este estudio. Sin embargo, además de considerarse los factores de variación en cuanto a suelo y los ambientales mencionados anteriormente, es importante tomar en cuenta que los antídotos tradicionales se preparan con mezclas complejas de plantas (Coe & Anderson, 2005; Hay, 2002; Otero et al; 2001a; Saravia, et al, 2001a), lo cual puede producir sinergia entre sus compuestos bioactivos (Ahmad & Aqil, 2007; Bussmann, Glenn, Meyer, Kuhlman, & Townesmith, 2010). Esto podría explicar la falta de actividad neutralizante del extracto de *B. simaruba* cuando se evaluó solo. Así mismo, el efecto PLA<sub>2</sub> intrínseco de este extracto no ha sido reportado anteriormente, aunque es interesante mencionar que los extractos acetónicos y metanólicos de la corteza y hoja de *B. simaruba* de Guatemala han demostrado actividad citotóxica contra líneas celulares tumorales (Cates et al., 2013, 2014), lo cual podría estar mediado, al menos en parte, por su actividad PLA<sub>2</sub>.

El análisis global de los resultados obtenidos en el proyecto demuestra que dos de las plantas evaluadas (*P. dioica* y *E. foetidum*) inhiben efectivamente el efecto proteolítico del veneno de *B. asper*, lo cual podría justificar su uso en el tratamiento antiofídico, especialmente en la neutralización del efecto hemorrágico local mediado por SVMPS. Aunque se detectaron los metabolitos secundarios que podrían mediar los efectos inhibitorios demostrados en esta investigación, la identificación específica de estos compuestos requiere estudios de aislamiento y caracterización en futuras investigaciones, pues solo así se podrá determinar el mecanismo directo por el cual se ven inhibidas las actividades que ocasiona el veneno.

Así mismo, los resultados de las pruebas de inhibición del efecto coagulante inducido por el veneno, sugieren que deberán evaluarse dosis mayores de los extractos etanólicos, acetónicos

y acusosos de las plantas de este estudio para medir su capacidad neutralizante, ya que presentan en su composición química los metabolitos secundarios necesarios para neutralizar a las serina proteinasas y metaloproteiniasas del veneno. El extracto de corteza de *B. simaruba*, al cual se le ha atribuido actividad antiofídica en otros países de Centroamérica, no solo resultó ineficaz para neutralizar los efectos del veneno evaluados en el presente estudio, sino que además demostró actividad PLA<sub>2</sub> intrínseca. Esto cuestiona seriamente su uso como antídoto en Guatemala, al menos de forma aislada. Por ello, es necesario realizar estudios científicos más detallados para determinar el verdadero valor curativo de *B. simaruba* y las otras plantas del proyecto, ya que posiblemente al utilizarse en combinación con otras plantas de acuerdo a la forma tradicional de preparación de los antídotos, podría potenciarse su acción.

La información generada en el presente estudio contribuye a la validación de plantas de uso etnomédico en la región como alternativas terapéuticas seguras y efectivas para tratar un problema importante de salud que afecta a la población rural de Centroamérica.

## 5. Conclusiones

- 5.1 Ninguna de las plantas estudiadas (*A. hindsii*, *A. maxima*, *C. pareira*, *H. patens*, *P. peltatum*, *S. hyacinthoides*, *B. simaruba*, *P. dioica* y *E. foetidum*) presentó efectos coagulantes o anticoagulantes intrínsecos o fue capaz de neutralizar el efecto coagulante del veneno de *B. asper* a las dosis del estudio.
- 5.2 El extracto etanólico de la corteza de *B. simaruba* presentó actividad PLA<sub>2</sub> intrínseca, pero esta actividad no se detectó en los extractos de hojas de *P. dioica* y *E. foetidum*.
- 5.3 Ninguna de las plantas evaluadas (*P. dioica* y *E. foetidum*) neutralizó el efecto PLA<sub>2</sub> del veneno de *B. asper*.
- 5.4 Ninguna de las plantas evaluadas (*B. simaruba*, *P. dioica* y *E. foetidum*) presentó actividad proteolítica intrínseca.
- 5.5 Los extractos etanólicos de *P. dioica* y *E. foetidum* neutralizaron efectivamente (más del 50%) el efecto proteolítico del veneno a las dosis ensayadas en el estudio.
- 5.6 La capacidad neutralizante del efecto proteolítico demostrada por los extractos de *P. dioica* y *E. foetidum* posiblemente esté asociada a la presencia de flavonoides, antocianinas, catequinas y taninos en su composición química.
- 5.7 La ausencia de cambios en el patrón electroforético del veneno de *B. asper* preincubado con los extractos de las plantas bioactivas, indica que el mecanismo de inhibición no está mediado por proteólisis directa.
- 5.8 Los resultados obtenidos respaldan el uso tradicional de *P. dioica* y *E. foetidum* en la región centroamericana para tratar el accidente ofídico, ya que la inhibición de las metaloproteinasas del veneno contribuye a disminuir el daño local producido por la mordedura de *B. asper*.
- 5.9 El uso aislado de la corteza de *B. simaruba* de la región sur de Guatemala posiblemente resultará ineficaz para contrarrestar los efectos hemorrágico, miotóxico, inflamatorio, letal y coagulante (posiblemente desfibrin(ogen)ante) del veneno de *B. asper*.

## 6. Referencias

- Ahmad, I., & Aqil, F. (2007). In vitro efficacy of bioactive extracts of 15 medicinal plants against ES  $\beta$ L-producing multidrug-resistance enteric bacteria. *Microbiological Research*, 162, 264-275.
- 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 sarsaparrilla (*Hemidesmus indicus* R. Br.). *Toxicon*, 34, 1551-1557.
- Alape-Girón, A., Flores-Díaz, M., Sanz, L., Madrigal, M., Escolano, J., Sasa, M., & Calvette, J. (2009). Studies on the venom proteome of *Bothrops asper*: perspectives and applications. *Toxicon*, 54, 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.
- Arvigo, R., Balik, M. (1993). Bursera simaruba. In: Arvigo, R., Balik, M. (Eds.), *Rainforest Remedies. One Hundred Healing Herbs of Belize*, second ed. Lotus Press, Twin Lakes, WI, 221p.
- Bijak, M., Bobrowski, M., Borowiecka, M., Podsedek, A., Golański, J., & Nowak, P. (2011). Anticoagulant effect of polyphenols-rich extracts from black chokeberry and grape seeds. *Fitoterapia*, 82(6), 811-817.
- Bogarín, G., Romero, M., Rojas, G., Lutsch, C., Casadamont, M., Lang, J., ... Gutiérrez, J. M. (1999). Neutralization, by a monospecific *Bothrops lanceolatus* antivenom of toxic activities induced by homologous and heterologous *Bothrops* snake venoms. *Toxicon*, 37, 551-557.
- Borges, M. H., Soares, A. M., Rodrigues, V. M., Andrião-Escarso, S. H., Diniz, H., Haaguchi, A., ... Homsí-Brendeburgo, M. (2000). Effects of aqueous extract of *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) on actions of snake and bee venoms and on activity of phospholipases A2. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 127, 21-30.
- Bussmann, R. W., Glenn, A., Meyer, K., Kuhlman, A., & Townesmith, A. (2010). Herbal mixtures in traditional medicine in Northern Peru. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 6, 10. doi: 10.1186/1746-4269-6-10.
- Cáceres, A. (2009). *Vademecum Nacional de Plantas Medicinales*. Guatemala. MSPAS/USAC.

- Calvete, J. J., Sanz, L., Pérez, A., Borges, A., Vargas, A. M., Lomonte, B., ... Moura-Da-Silva, A. (2011). Snake population venomomics and antivenomics of *Bothrops atrox*: Pedomorphism along its transamazonian dispersal and implications of geophyc venom variability on snakebite management. *Journal of Proteomics*, 74, 510-527.
- Campbell, J. A. & Lamar, W. W. (1989). *The Venomous Reptiles of Latin America*. Ithaca: Cornell University Press, 452p.
- 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
- 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*. 43, 605-616.
- Cates, R., Prestwich, B., Innes, A., Rowe, M., Stanley, M., Williams, S., ... Martínez, J. (2013). Evaluation of the activity of Guatemalan medicinal plants against cancer cell lines and microbes. *Journal of Medicinal Plants Research*, 7(35), 2616-2627. DOI: 10.5897/ JMPR2013.4478
- Cates, R., Thompson, A., Brabazon, H., McDonald, S., Lawrence, M., Williams, S., ... Ancheta, F. (2014). Activities of Guatemalan medicinal plants against cancer cell lines and selected microbes: Evidence for their conservation. *Journal of Medicinal Plants Research*, 8(33). DOI: 10.5897/ JMPR2014.5488
- Coe, F. G. & Anderson, G., J. (2005). Snakebite ethnopharmacopoeia of Eastern Nicaragua. *Journal of Ethnopharmacology*, 96, 303-323.
- Coll, J., & Bowden, B. (1986). The application of vacuum liquid chromatography to the separation of terpene mixtures. *Journal of Natural Products*, 49, 934-936.
- Cucciolini, M., Mozzicafreddo, M., Bonfili, L., Cecarini, V., Eleuteri, A. M., & Angeletti, M. (2009). Natural occurring polyphenols as template for drug desingn. Focus on sernie proteases. *Chemical Biology & Drug Design*, 74, 1-15.

- Da Silva J. O., Fernandes, R. S., Tieli, F. K., Oliveira, C. Z., Mazzi, M. V., Franco, J. J. ... Sampaio, S. V. (2007). Triterpenoid saponins, new metalloprotease snake venom inhibitors isolated from *Pentaclethra macroleoba*. *Toxicon*. 50(2), 283-291.
- Da Silva, S. L., Calgarotto, A. K., Chaar, J. S., & Marangoni, S. (2008). Isolation and characterization of ellagic acid derivatives isolated from *Casearia sylvestris* SW aqueous extract with anti-PLA<sub>2</sub> activity. *Toxicon*. 52(6), 655-666.
- 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.
- Ministerio de Sanidad y Consumo, Agencia Española del Medicamento., & Boletín Oficial del Estado (España). (2002). *Real Farmacopea Española*. (2<sup>a</sup> ed.). Madrid: Ministerio de Sanidad y Consumo.
- Fernandes, A. M., Prado, A. L., Barata, L. E. S., Paulo M. Q., Azevedo, N. R., & Ferri P. H. (1997). A method to separate lignoid from *Virola* leaves. *Phytochemical Analysis*, 8, 18-21.
- Fernández, M., Ortíz, W. F., Pereañez, J. A., & Martínez, D. (2010). Evaluación de las propiedades antiofídicas del extracto etanólico y fracciones obtenidas de *Renealmia alpinia* (Rottb) Mass (Zingiberaceae) cultivada *in vitro*. *Vitae*, 17, 75-82.
- Freedman, J. E.; Parker, C.; Li, L.; Perlman, J. A.; Frei, B.; Ivanov, V.; ... Folts, J.D. (2001). Select flavonoids and whole juice from purple grapes inhibit platelet function and enhance nitric oxide release. *Circulation* 103, 2792-2798.
- García, M. D., Sáenz, M. T., Gómez, M. A., & Fernández, M. A. (1999). Topical anti-inflammatory activity of phytosterols isolated from *Eryngium foetidum* on chronic and acute inflammation models. *Phytotherapy Research*, 13, 78-80.
- Gené, J. A., Roy, A., Rojas, G., Gutiérrez, J. M., & Cerdas, L. (1989). Comparative study on coagulant, defibrinating, fibrinolytic and fibrinogenolytic activities of Costa Rican crotaline snake venoms and their neutralization by a polyvalent antivenom. *Toxicon*, 27 (8), 841-848.
- Giovannini, P., & Howes M. R. (2017). Medicinal plants used to treat snakebite in Central America: Review and assessment of scientific evidence. *Journal of Ethnopharmacology* doi: 10.1016/j.jep.2017.02.011

- Gómez-Betancur, I., Benjumea, D., Patiño, A., Jiménez, N. & Osorio, E. (2014). Inhibition of the toxic effects of *Bothrops asper* venom by pinostrobin, a flavonone isolated from *Renealmia alpinia* (Rottb.) MAAS. *Journal of ethnopharmacology*, 155, 1609-1615.
- 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. (2002). Comprendiendo los venenos de serpientes: 50 años de investigaciones en América Latina. *Revista de Biología Tropical*, 50, 377-394.
- Gutiérrez, J. M. (2010). Snakebite Envenomation in Central America. In S. Mackessy. *Handbook of Venoms and Toxins of Reptiles* (pp. 492-505). Boca Raton: CRC Press.
- Gutiérrez, J. M. (2014). Current challenges for confronting the public health problem of snakebite envenoming in Central America. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 20:7
- Gutiérrez, J.M., Lomonte, B., Chaves, F., Moreno, E., & Cerdas, L. (1986). Pharmacological activities of a toxic phospholipase A isolated from the venom of the snake *Bothrops asper*. *Comparative Biochemistry and Physiology C*, 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., Escalante, T., & Rucavado, A. (2009a). Experimental pathophysiology of systemic alterations induced by *Bothrops asper* snake venom. *Toxicon*, 54, 976-987.
- Gutiérrez, J. M., Rucavado, A., Chaves, F., Díaz, C., & Escalante, T. (2009b) Experimental pathology of local tissue damage induced by *Bothrops asper* snake venom. *Toxicon*, 54, 958-975.
- Gutiérrez, J. M., Rucavado, A., & Escalante, T. (2010). Snake venom metalloproteinases: Biological roles and participation in the pathophysiology of envenomation. In Mackessy S. P. (Ed), *Handbook of venoms and toxins of reptiles* (pp. 115-138). Boca Raton: CRC Press.
- Gutiérrez, J. M., Warrell, D. A., Williams, D. J., Jensen, S., Brown, N., Calvete, J., & Harrison, R. (2013). 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.

- 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.
- Ho, M., Warrell, D. A., Looareesuwan, S., Phillips, R. E., Chanthavanich, P., Karbwang, J., ... Vejcho, S. (1986). Clinical significance of venom antigen levels in patients envenomed by the Malayan pit viper (*Calloselasma rhodostoma*). *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 35, 579-587.
- Houghton, P. J., & Skari, M. P. (1994). The effect on blood clotting of some west African plants used against snakebite. *Journal of Ethnopharmacology*, 44, 99-108.
- Jedinásk, A., Maliar, T., Grancai, D., & Nagy, M. (2006). Inhibition activities of natural products on serine proteases. *Phytotherapy Research*, 20, 214-217.
- Kuklinski, C. (2000). *Farmacognosia. Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural*. Barcelona: Omega.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- Lättig, J., Böhl, M., Fischer, P., Tischer, S., Tietböhl, C., Menschikowski, M., ... Pisabarro, M. T. (2007). Mechanism of inhibition of human secretory phospholipase A2 by flavonoids: rationale for lead design. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 21(8), 473-483.
- Leanpolchareanchai, J., Pithayanukul, P., Bavovada, R., & Saparpakorn, P. (2009). Molecular docking studies and anti-enzymatic activities of *Thai mango* seed kernel extract against snake venoms. *Molecules*, 14(4), 1404-1422.
- Lock, O. (1994). *Investigación Fitoquímica*. 2ª. Ed. Fondo Editorial. Perú. 300 p
- 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-Suares, P., Tasai, W. C., 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 taxonomical insights. *Journal of Proteomics*, 75, 1675-1689.
- Markland, F. S. (1998). Snake venom fibrinogenolytic and fibronilytic enzymes: an updated inventory. *Thrombosis and haemostasis*, 79, 668-674.
- McGregor, L.; Bellangeon, M.; Chignier, E.; Lerond, L.; Rouselle, C.; & McGregor, J.L. (1999). Effect of a micronized purified flavonoid fraction on in vivo platelet functions in the rat. *Thrombosis Research*, 15, 235-240.
- McVaugh, R. (1963). Flora of Guatemala. *Fieldiana: Botany*, 24(7), 382-385.
- Melo, P. A. & Ownby, C. L. (1999). Ability of wedelolactone, heparin, and parabromophenacyl bromide to antagonize the myotoxic effects of two crotaline venoms and their PLA<sub>2</sub> myotoxins. *Toxicon*, 37, 199-215.
- 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.
- Mors, W. B., do Nascimento, M. C., Ruppelt Pereira, B. M., & Alvares Pereira, N. (2000). Plant natural products active against snake bite – the molecular approach. *Phytochemistry*, 55, 627-642
- Morton, J. F. (1981) *Atlas of Medicinal Plants of Middle America*. Springfield: Charles C. Thomas.
- Mourao de Moura, V., Serra Bezerra, A. N., Veras Mourao, R. H., Varjao Lameiras, J. L., Almeida Raposo, J. D., Luckwu de Sousa, R., ... Dos-Santos, M. C. (2014). A comparison of the ability of *Bellucia dichotoma* Cogn. (Melastomataceae) extract to inhibit the local effects of *Bothrops atrox* venom when pre-incubated and when used according to traditional methods. *Toxicon*, 85, 59-68.
- Núñez, V., Otero, R., Barona, J., Saldarriaga, M., Osorio, R. G., Fonnegra, R., ...A., Quintana, J. C. (2004). Neutralization of the edema-forming, defibrinating and coagulant effects of *Bothrops asper* venom by extracts of plants used by healers in Colombia. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 37, 969-977.

- 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*, 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., Barona, J., Fonnegra, R., Jiménez, S. L., Osorio, R. G., ... Díaz, A. (2000b). 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.
- Otero, R., Núñez, V., Jiménez, S. L., Fonnegra, R., Osorio, R. G., García, M. E., & Díaz, A. (2000c). 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-Patiño, R. (2009). Epidemiological, clinical and therapeutic aspects of *Bothrops asper* bites. *Toxicon* *54*, 998-1011.
- Patiño, A. C., López, J., Aristizábal, M., Quintana, J. C., & Benjumea, D. (2012). Efecto inhibitorio de extractos de *Renealmia alpina* Rottb. Maas (*Zingiberaceae*) sobre el veneno de *Bothrops asper* (mapaná). *Biomédica*, *32*, 365-374.
- Patiño, A., C., Benjumea, D. M., & Pereañez, J. A. (2013). Inhibition of venom serine proteinase and metalloproteinase activities by *Renamia alpina* (*Zingiberaceae*) extracts: Comparison of wild and *in vitro* propagated plants. *Journal of Ethnopharmacology*, *149*, 590-596
- Pérez, A., V., Saravia, P., Rucavado, A., Sant'Ana, C. D., Soares, A. M., & Gutiérrez, J. M. (2007). Local and systemic pathophysiological alterations induced by a serine proteinase from the venom of the snake *Bothrops jararacussu*. *Toxicon*, *49*, 1063-1069.
- Pochet, L., Frédérick, R., & Masereel, B. (2004). Coumarin and isocoumarin as serine protease inhibitors. *Ccurrent Pharmaceutical Design*, *10*, 3781-3796.

- Ramakrishna, A., & Ravishankar, G. A. (2011). Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant Signal & Behavior*, 6, 1720-1731.
- 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.
- Ryu, R., Jung, U. J., Kim, H. J., Lee, W., Bae, J. S., Park, Y. B., & Choi, M. S. (2013). Anticoagulant and antiplatelet activities of artemisia princeps Pampanini and its bioactive components. *Preventive nutrition and food science*, 18(3), 181-187.
- Sáenz, M. T., Fernández, M. A., García, M. D. (1997). Antiinflammatory and analgesic properties from leaves of *Eryngium foetidum* L (Apiaceae). *Phytotherapy Research*, 11, 380-383.
- Sánchez, E. E., & Rodríguez-Acosta, A. (2008). Inhibitors of snake venoms and development of new therapeutics. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 30, 647-678.
- 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-Otten, P., Hernández, R., Gutiérrez, J. M., Mérida, M., Cáceres, A. (2015). Evaluación de la capacidad neutralizante de extractos de plantas de uso popular en Guatemala como antídotos para el envenenamiento por la mordedura de *Bothrops asper*. *Ciencia, Tecnología y Salud*, 2, 25-37.
- Saravia, P., Cáceres, A., Velásquez, R., & Lara, O. (2001a) Plantas con actividad antiofídica en Guatemala. I. Identificación y evaluación de su capacidad neutralizante (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.
- Standley, P. C., Steyermark, J. A. (1946). *Flora of Guatemala. Fieldiana: Botany*, 24(5), 435-441.
- Standley, P. C., Williams, L.O. (1966). *Flora of Guatemala. Fieldiana: Botany*, 24(8), 43-48.

- Serrano, S. M. T., & Maroun R. C. (2005). Snake venom serine proteinases: sequence homology vs. substrate specificity, a paradox to be solved. *Toxicon*, 45, 1115-1132.
- Singh, S., Singh, D. R., Banu, S., & Salim, K. M. (2013). Determination of bioactives and antioxidant activity in *Eryngium foetidum* L.: a traditional culinary and medicinal herb. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, 83(3), 453-460.
- Theakston, R. D. G. & Reid H. A. (1983). Development of a simple standard assay procedures for the characterization of snake venoms. *Bulletin of World Health Organization*, 61, 949-956.
- 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.
- Wagner, H. & Bladt, S. (1996). *Plant Drug Analysis*. Springer Verlag, Berlin
- 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

## **7. Anexos**

Anexo 1. Información de especies vegetales utilizadas en el proyecto

Anexo 2. Extracción de principios vegetales

Anexo 3. Fichas técnicas de especies vegetales colectadas en el proyecto.

Anexo 4. Información de extractos vegetales obtenidos en el proyecto anterior.

Anexo 5. Determinación de actividad coagulante y actividad anticoagulante.

Anexo 6. Desclorofilación de extractos vegetales.

Anexo 7. Espectros de absorción de extractos vegetales.

Anexo 8. Tamizaje fitoquímico de extractos vegetales.

## Anexo 1.

Tabla 1.1

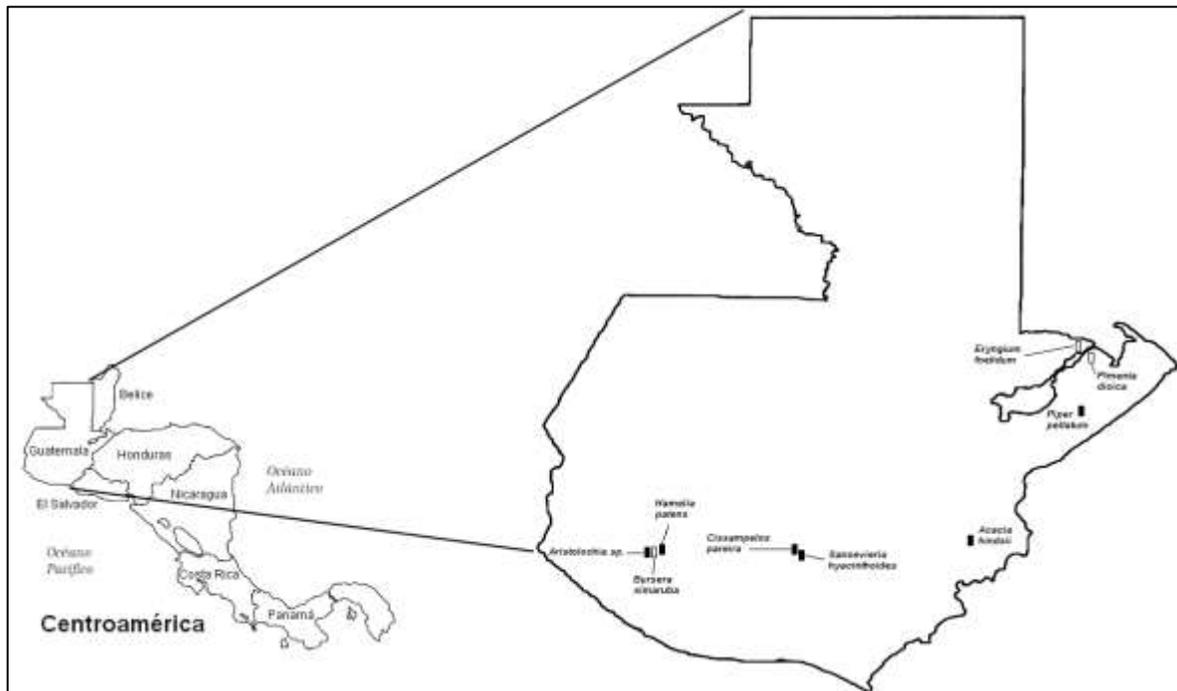
*Datos de recolección de las plantas de un estudio previo que fueron evaluadas en las pruebas de coagulación en el proyecto*

<b>Familia / especie (número de registro)<sup>a</sup></b>	<b>Nombre común</b>	<b>Parte utilizada</b>	<b>Lugar de colecta Coordenadas y altitud</b>
Rubiaceae / <i>Hamelia patens</i> Jacq. (CFEH 1384)	Chichipín	Hojas	San Bernardino, Suchitepéquez. N 14° 33 ' 43.5"; O 91° 27 ' 19.3" " 548 msnm <sup>b</sup>
Asparagaceae / <i>Sansevieria hyacinthoides</i> (L.) Druce (CFEH 1380)	Oreja de burro	Hojas	Guatemala, Guatemala N 14° 34 ' 48.22"; O 90° 33 ' 14.23 " 1,474 msnm
Menispermaceae / <i>Cissampelos pareira</i> L. (CFEH 1381)	Alcotán	Raíz	Guatemala, Guatemala N 14° 35 ' 20.37"; O 90° 29 ' 56.90 " 1,485 msnm
Piperaceae / <i>Piper peltatum</i> L. (CFEH 1382)	Cordoncillo	Hojas	Morales, Izabal N 15° 26 ' 32.20"; O 88° 49 ' 54.10 " 46 msnm
Fabaceae / <i>Acacia hindsii</i> Benth. (CFEH 1383)	Ixcanal	Corteza	San Jacinto, Chiquimula. N 14° 39 ' 18.20"; O 89° 29 ' 56.90 " 401 msnm
Aristolochiaceae / <i>Aristolochia</i> sp. (CFEH 1378)	Guaco	Hojas y corteza	Samayac, Suchitepéquez. N 14° 33 ' 08.2"; O 90° 28 ' 01.1 " 476 msnm

Nota. <sup>a</sup>CFEH: Cemat Farmaya ethnobotanical herbarium. <sup>b</sup>msnm: metros sobre el nivel del mar. Tomado de: Saravia-Otten et al., 2015.

Figura 1.1

*Lugares de colecta en Guatemala de las nueve especies vegetales evaluadas en el proyecto*



*Nota.* Los rectángulos negros indican las regiones en las cuales se colectaron las especies vegetales reportadas en Saravia y col. (2015) y los rectángulos blancos las de las especies colectadas en el presente estudio.

Tabla 1.2

*Plantas seleccionadas para el estudio por su uso etnomédico para el tratamiento de la mordedura de serpiente en Centroamérica.*

<b>Familia</b>	<b>Nombre científico</b>	<b>Nombre popular en Guatemala</b>	<b>Parte usada</b>	<b>Referencia</b>
Apiaceae	<i>Eryngium foetidum</i> L.	Culantro, Samat	Hoja	Morton, 1981; Hay, 2002; Coe & Anderson, 2005
Burseraceae	<i>Bursera simaruba</i> (L.) Sarg	Palo de jiote, indio desnudo, cohuite, palo mulato	Corteza	Castro, 1999; Coe & Anderson, 2005
Myrtaceae	<i>Pimenta dioica</i> (L.) Merr.	Pimienta gorda	Hoja	Castro, 1999

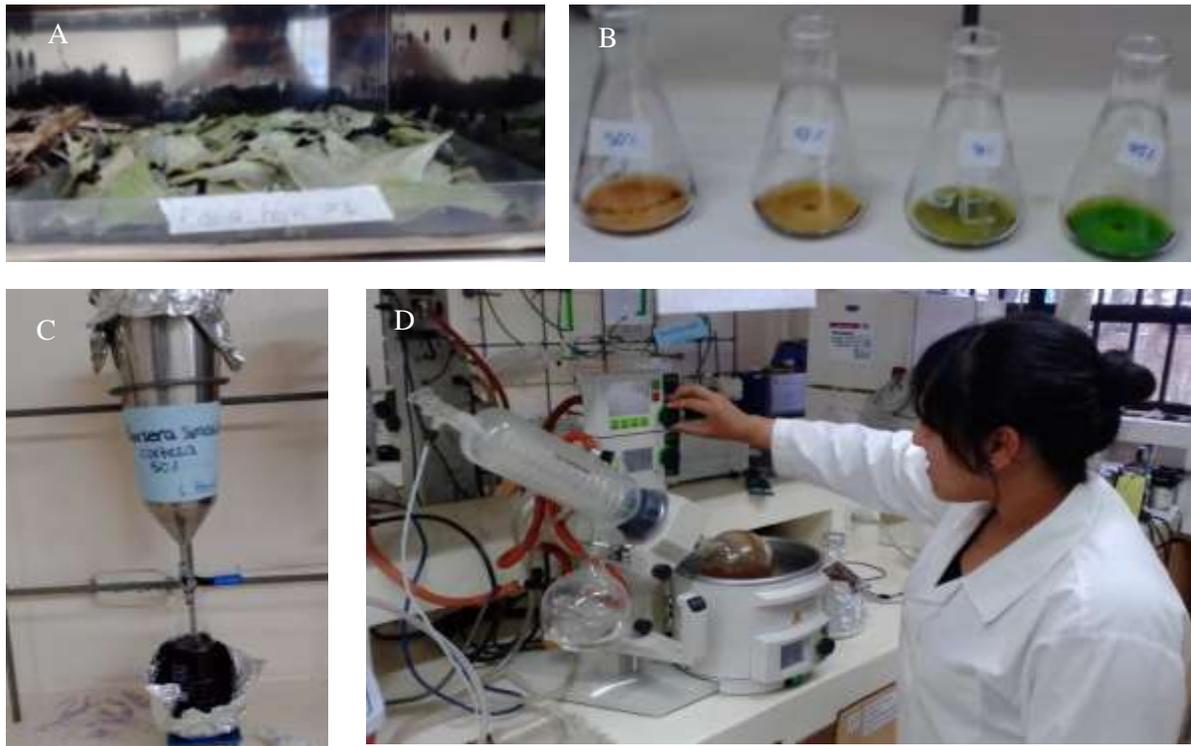
Figura 1.2

*Recolección del material vegetal*

*Nota.* A. Individuo de *Bursera simaruba* en la ecoparcela El Kakawatal, Samayac, Suchitepéquez. B. Adquisición de corteza fragmentada de *B. simaruba* por el señor Arnoldo Hilario guardián de la ecoparcela. C. Corteza de *B. simaruba* colectada. D y E. *Eryngium foetidum* en aldea Plan Grande, Quehueche, Livingston, Izabal. F. Recolección de hojas de *E. foetidum* en colaboración con pobladores locales. G. Individuo de *Pimenta dioica* en comunidad de Barra Lampara, Livingston, Izabal. H. Hojas de *P. dioica*. I. Recolección de hojas de *P. dioica* en colaboración con pobladores locales y el estudiante Vicente Genovés.

**Anexo 2**

Figura 2.1

*Proceso de preparación de extractos vegetales*

*Nota.* A Secado del material vegetal. B. Prueba del mejor solvente. C. Obtención de extracto etanólico por percolación. D. Concentración de extractos vegetales por medio de rotavapor.

## Anexo 3

## PALO JIOTE

## Ficha 3.1

*Bursera simaruba* (L.) Sarg. (BURSERACEAE)**Sinonimias***Pistacia simaruba* L.*Bursera gummifera* L.*Elaphrimo valifolium* Schtdl.**Otros nombres populares**

Se le conoce también como jiole, chino, chinacahuite, solpiem, cajha, xacago-que (Huehuetenango), palo chino, chacah, chacah colorado (maya de Petén), palo mulato (Petén), chacá (Huehuetenango), indio desnudo (costa norte) chic-chica, chichah (Petén), cacah (Q'eqchi'). En Belice se le conoce como birch o gumbolimbo; en Honduras a veces es llamado copón; en Tabasco se le conoce como palo retinto; en Oaxaca y Veracruz se le llama mulato (Standley & Steyermark, 1946).

**Partes recomendadas para su uso como antiofídico**

La corteza es responsable del efecto antihemorrágico de la planta (Castro, et al., 1999).

Según Coe y Anderson (2005), en la región oriente de Nicaragua, la corteza y la planta entera se han usado en decocción como antídoto para tratar los efectos causados por mordedura de serpientes.

**Descripción botánica**

Es un árbol de pequeño a mediano tamaño. En bosques húmedos alcanza los 25 m. de alto o más, algunas veces de 1 m. de diámetro. La corteza joven es verde o pardo verdosa, la corteza madura es color rojo brillante a pardo rojiza oscura la cual se descascara en láminas delgadas parecidas al papel. Las hojas son compuestas y están formadas usualmente por 5-7 foliolos de 5-12 cm. de largo, acuminados, pubescentes cuando son jóvenes y glabros cuando maduran. Las flores divididas en 3 partes, grisáceas o amarillentas, fragantes. Los frutos son variables en tamaño y forma, 6-10 mm. de longitud, 3-valvados, usualmente teñidos de rojo (Standley & Steyermark, 1946).



(1) Hoja (2) Corteza

Localidad: Ecoparcela El Kakawatal, Samayac,  
Suchitepéquez  
Fotografías por Max Mérida

## Hábitat

Es un árbol común o abundante en muchas regiones de las tierras bajas, a menudo en bosques vírgenes, pero más abundante en bosques secundarios o matorrales secos o húmedos, muy común en cercos. Se encuentra desde el nivel del mar hasta alrededor de los 1,800 msnm, pero es más frecuente a los 1,000 msnm o menos. En Guatemala se encuentra en los departamentos de Petén, Alta Verapaz, Baja Verapaz, Izabal, Zacapa, El Progreso, Chiquimula, Jalapa, Jutiapa, Santa Rosa, Escuintla, Guatemala, Sacatepéquez, Suchitepéquez, Retalhuleu, San Marcos, Huehuetenango, Quiché. Se distribuye desde el sur de Florida, México, Belice, El Salvador, Panamá, las Antillas y el norte de Sudamérica (Standley & Steyermark, 1946).

## Composición química de la parte medicinal

En la corteza de *B. simaruba* se han identificado flavonoides, taninos condensados (bajo contenido), triterpenos, ácidos fenólicos, ácidos grasos de cadena larga, ésteres metílicos y sacarosa. Se ha encontrado ácido gálico, ácido protocatecuico, epicatequina, proantocianidina, apigenina, luteolina y kaempferol. También se encontró el ursa-9(11)-12-dien-3- $\beta$ -ol, el 24(28)- metilencicloartanol, ácido n-hexadecanoico, ácido 9Z,12Z-octadecadienoico, 2E,4E-decadienal, esteres metílicos de hexacosanoico, ácidos octacosanoico y triacontanoico. (Castro et al., 1999; Bah, Gutiérrez, Mendoza, Rodríguez & Castañeda, 2014). Y en la resina se han encontrado los triterpenos lup-20(29)-en-3  $\beta$ ,23diol,  $\beta$ -amyrina, lupeol, epilupeol, picropoligamainay epiglutinol (Peraza, Salazar & Peña, 1995; Camporese, Balick, et al., 2003; Coe & Anderson, 2005).

El extracto metanólico de la corteza de *B. simaruba*, presenta los siguientes compuestos fenólicos: lignanoyateína,  $\beta$ -peltatina-O- $\beta$ -glucopiranosido, hinokinina, bursehernina, 3,4-dimetoxifenil-1-O- $\beta$ -D-(6-sulfo)-glucopiranosido, 3,4,5-trimetoxifenil-1-O- $\beta$ -D-(6-sulpho)-glucopiranoside y 3,4-dihidroxifeniletanol-1-O-  $\beta$ -D-(6-sulfo)-glucopiranosido (Maldini, Montoro, Piacente & Pizza, 2009).

Los aceites esenciales presentes en la corteza son  $\alpha$ -pineno (32.1%),  $\beta$ -pineno (13.5%) e isolimoneno (5.6%), viridiflorol (7.1%),  $\beta$ -cariofileno (4.9%),  $\beta$ -selineno (4.3%),  $\alpha$ -humuleno (3.1%) y óxido de cariofileno(3.1%) (Junor, Porter & Yee, 2008).

## Usos medicinales populares

Este árbol es muy utilizado en medicina doméstica, siendo uno de los numerosos “remedios” para mordeduras de serpientes. Se utilizan cataplasmas de las hojas en casos de gangrena para evitar su propagación (Standley & Steyermark, 1946).

En la medicina popular se utiliza a resina como purgante, sudorífico y diurético (Niembro, 1990).

En México se ha utilizado como antipirético, antihemorrágico nasal, en el alivio del dolor muscular, llagas en la piel, en inflamación de ovarios, analgésico, antiinflamatorio, afrodisiaco, en asma, citostático, depurativo, diaforético, en hidropesía, disentería, enterorragia, expectorante, insecticida, purgante y fiebre amarilla (Bah, Gutiérrez, Mendoza, Rodríguez & Castañeda, 2014; Jasso, Angulo & Hernández, 2006).

En Belice, se utiliza como antipruriginoso, en calambres estomacales, infecciones en el riñón, como diurético y “sanador de heridas” (Balick & Mendelsohn, 1992; Camporese, et.al., 2003). La decocción es tomada en forma de té para infecciones internas, del tracto urinario, fiebre, quemaduras de sol, resfriado y gripe (Camporese, et.al., 2003).

### Propiedades antifúngicas medicinales demostradas

El extracto hidroalcohólico de la corteza mostró neutralización total hacia el efecto hemorrágico inducido por el veneno de *Bothrops asper* en un bioensayo basado en la cuantificación macroscópica de la hemorragia producida por el veneno en ratones (Castro, et al., 1999).

### Propiedades medicinales demostradas

El extracto hexánico de la corteza mostró actividad antibacterial contra *Pseudomonas aeruginosa*, con una concentración inhibitoria mínima (CIM) de 2.5 mg/ml y también contra *Escherichia coli*. El extracto etanólico también mostro actividad antibacterial contra *Micrococcus luteus* pero no contra *Escherichia coli*. El compuesto Lupeol, mostró actividad *in vitro* contra bacterias gram positivas y gram negativas. Sin embargo los extractos acetónicos y metanólicos de corteza no mostraron inhibición contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Streptococcus mutans*, y *Candida albicans*. El extracto metanólico de hojas de *B. simaruba* produjo una CIM mayor a 1000 µg/ml contra *S. aureus* y una CIM de 500 µg/ml contra *Escherichia coli*. Según Cáceres, Samayoa, Cano & Aguilar (1990), *B. simaruba* no posee actividad inhibitoria contra *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhi*, *Shigella dysenteriae* y *Shigella flexneri* (Camporese, et al., 2003; Cates, et al. 2013; Cates, et al., 2014).

Fraciones aisladas del extracto hexánico de hojas, mostraron actividad antiinflamatoria significativa (Noguera, et al., 2004), utilizando una concentración de 80 mg/kg se observó alta inhibición en fases agudas y crónicas de inflamación (Duke, 2009). El extracto clorofórmico mostro actividad antifúngica (Rahalison, et al., 1993)

Los extractos de acetona y metanólico de corteza mostraron inhibición de líneas celulares en cáncer de pecho, obteniendo una concentración máxima inhibitoria (IC50) de 113±38 µg/ml (extracto acetónico) y 116±14 µg/ml (extracto metanólico) y para cáncer cervical de 148±14 µg/ml (extracto acetónico) y 170±18 µg/ml (extracto metanólico). Así mismo es importante mencionar que los extractos acetónicos y metanólicos de hojas fueron activos en un 60 y 70% contra células cancerígenas de pecho (Cates, et al., 2013; Cates, et al., 2014).

El aceite esencial de fruto y corteza de *B. simaruba* son activos contra *Escherichia cogli*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylocococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (MRSA) y el *Streptococcus betahemolitico* del grupo A (EBHA) (Junor, Porter, Facey & Yee, 2007).

### Otros usos de la planta

La resina es utilizada a menudo como sustituta de pegamento y como un cemento para reparar porcelana y cristal. Los caribes la empleaban para pintar sus canoas, para preservarlas de los ataques de los gusanos (Standley & Steyermark, 1946).

### Efectos tóxicos de la planta

El extracto etanólico de hojas mostro una CL50 igual 163.56µg/mL frente a larvas de *Artemia salina*; contra peces del género Mollinesia, mostró toxicidad (500 mg/kg), al igual que el extracto acuoso de corteza. Los extractos clorofórmicos de resina fueron citotóxicos contra *A. salina* (CL50: 33 ppm). En el uso popular no se le conocen efectos tóxicos ni contraindicaciones (Fernández, et al., 2009; Gupta, Santana & Espinoza, s.f.)

Los extractos de corteza (acetónicos y metanólicos) y de hoja (metanólico) de *B. simaruba* obtuvieron concentraciones de citotoxicidad media (CC50) mayores a 800 µg/ml en células Vero (células epiteliales de riñón de mono) (Cates, et al., 2013; Cates, et al., 2014).

## REFERENCIAS

- Bah, M., Gutiérrez, D., Mendoza, S., Rodríguez, V., Castañeda, R. (2014). Chemical constituents and antioxidant activity of extracts obtained from branch bark of *Bursera simaruba*. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 13 (6): 527 – 536
- Balick, M., Mendelsohn, R. (1992). Assessing the economic value of traditional medicines from tropical rain forests. *Conservation Biology*, 6(1).
- Cáceres, A., Samayoa, B., Cano, O., Aguilar, L. (1990). Plants used in Guatemala for the treatment of gastrointestinal disorders. 1. Screening of 84 plants against enterobacteria. *Journal of Ethnopharmacology*, 30, 55-73.
- Camporese, A., Balick, M.J., Arvigo, R., Esposito, R.G., Morsellino, N., De Simone, F., & Tubaro, A. (2003). Screening of anti-bacterial activity of medicinal plants from Belize (Central America). *Journal of Ethnopharmacology*, 87, 103–107
- 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 extracto de plantas tropicales. *Revista de biología tropical*, 47(3), 605-616.
- Cates, R., Prestwich, B., Innes, A., Rowe, M., Stanley, M., Williams, S., ... Martínez, J. (2013). Evaluation of the activity of Guatemalan medicinal plants against cancer cell lines and microbes. *Journal of Medicinal Plants Research*, 7(35), 2616-2627
- Cates, R., Thompson, A., Brabazon, H., McDonald, S., Lawrence, M., Williams, S., ... (2014). Activities of Guatemalan medicinal plants against cancer cell lines and selected microbes: Evidence for their conservation. *Journal of Medicinal Plants Research* 8(33), 1040 - 1050
- Coe, F., Anderson, G. (2005). Snakebite ethnopharmacopoeia of eastern Nicaragua. *Journal of Ethnopharmacology* 96, 303–323
- Duke, J. (2009). *Duke's Handbook of Medicinal plants of Latin America*. United States: CRC Press Taylor and Francis Group.
- Fernández, A., et al. (2009). Evaluación de la toxicidad de extractos de plantas cubanas con posible acción antiparasitaria utilizando larvas de *Artemia salina* L. *Rev Cubana Med Trop*, 61(3).
- Gupta, M., Santana, A., Espinoza, A. (s.f.). Plantas medicinales de Panamá.
- Jasso, D., Angulo, J., Hernández, F. (2006). Chapter 14, An overview of the antimicrobial properties of Mexican medicinal plants. *Rai and Carpinella (eds.) Naturally Occurring Bioactive Compounds*.
- Junor, G., Porter, R., Facey, P., Yee, T. (2007). Investigation of Essential Oil Extracts from Four Native Jamaican Species of *Bursera* for Antibacterial Activity. *West Indian Med J*, 56 (1): 22
- Junor, G., Porter, R., Yee, T. (2008). The Chemical Composition of the Essential Oils from the Leaves, Bark and Fruits of *Bursera simaruba* (L.) Sarg. from Jamaica. *Journal of Essential Oil Research*, 20, 426-429.
- Maldini, M., Montoro, P., Piacente, S., Pizza, C. (2009). Phenolic compounds from *Bursera simaruba* Sarg. bark: Phytochemical investigation and quantitative analysis by tandem mass spectrometry. *Phytochemistry*, 70, 641–649.
- Niembro, A. (1990). Árboles y arbustos útiles de México. México: Limusa, 45-46.
- Noguera, B., et al. (2004). Anti-inflammatory activity of leaf extract and fractions of *Bursera simaruba* (L.) Sarg (Burseraceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 92, 129–133
- Peraza, S., Salazar, N., Peña, L. (1995). A new triterpene from the resin of *Bursera simaruba*. *Journal of Natural Products*, 58 (2), 271-274.
- Rahalison, L., et al. (1993). Screening for antifungal activity of Panamanian Plants. *International Journal of Pharmacognosy*, 31 (1), 68-76.
- Standley, P.C. & Steyermark, J.A. (1946). Flora of Guatemala. *Fieldiana: Botany*, 24 (5), 439-441.

## Ficha 3.2

**PIMIENTA GORDA**

*Pimenta dioica* (L.) Merr. (MYRTACEAE)

**Sinonimias**

*Eugenia micrantha* Bertol.

*Myrtus pimenta* L.

*Myrtus dioica* L.

**Otros nombres populares**

Se le conoce con los nombres de pimienta, peensia (Cobán), pimienta de Chiapas, pens (Q'eqchi'), ixnabacuc (maya de Petén), pimienta de Jamaica (McVaugh, 1963).

**Partes recomendadas para su uso como antiofídico**

Hoja (Castro et al., 1999). El extracto neutraliza la actividad hemorrágica inducida por veneno de *Bothrops asper* (Duke, 2009).

**Como es la planta**

Es un árbol de 20 m. de alto, 30 cm. de diámetro, con la corteza color pardo claro. Las hojas son coriáceas, ovadas o elípticas, 3-9 cm. de ancho, 9-20 cm. de longitud, la mayoría 2-3 veces más largo que ancho; la lámina foliar variable en forma. La vena central profundamente surcada en el haz, las venas laterales de 9-12 pares, distantes, bastante prominentes en el envés. Las flores en su mayoría agrupadas cerca de las puntas, sésiles pero las laterales sobre las ramas cortas son pediceladas. Los pétalos son blancos de alrededor de 5 mm. de longitud. El fruto es subgloboso de 4-8 mm. de diámetro (McVaugh, 1963).

**Donde crece**

Este árbol se encuentra en bosques húmedos de suelo cárstico a 350 msnm o menos. En Guatemala se encuentra en los departamentos de Petén y Alta Verapaz, cultivado comúnmente en fincas de Guatemala, o algunas veces como ornato o por sus frutos en parques, a lo largo de calles, o en viviendas, a elevaciones medias y bajas. Se distribuye desde el sur de México, incluyendo la península de Yucatán, Belice, Centroamérica, las Antillas, quizás el norte de Sudamérica (Attokaran, 2011; McVaugh, 1963).



(1) Corteza (2) Hojas con botones florales

Plantación en la comunidad de Barra Lampara, Livingston, Izabal. Fotografías por Max Mérida

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

El extracto hidroalcohólico de hojas presenta alcaloides, saponinas, taninos, flavonoides, proteínas y triterpenoides (George & Joseph, 2013).

Se evidenció la presencia de eugenol (47.80-55.35%) como componente principal del aceite esencial de hojas el cual mostró variación en el rendimiento dependiente de la estación de colecta (Rao, Navinchandra, Jayaveera, 2012).

El fruto contiene flavonoides, taninos, esteroides, triterpenos y aceites volátiles (eugenol, eugenolmetil éter,  $\alpha$ - pineno,  $\beta$ -cariofilenoyescualeno) (Adnan, Mansour, Mohammed, Jaber & Syed, 2002; Ankli, Sticher & Heinrich, 1999).

### **Usos medicinales populares**

Se utiliza para tratar problemas gastrointestinales, tales como "aire en el estómago" (Ankli et al., 1999).

En la India las hojas son utilizadas como tratamiento para el dolor, artritis, fiebre y estrés (Nayak, Abhilash, Vijaynarayana & Fernandes, 2008).

Los frutos secos han sido usados para el tratamiento de la hipertensión, adiposidad y analgesia (Jiang, Feng, Li & Wang, 2013).

Las hojas y la corteza son consideradas útiles para aliviar problemas estomacales por las familias de Uaxactún (Mutchnick & McCarthy, 1997) y los frutos son utilizados hasta cierto punto en la medicina doméstica (McVaugh, 1963).

### **Propiedades antiofídicas demostradas**

Se demostró la actividad anti-hemorrágica causada por el veneno de *Bothrops asper* en un bioensayo basado en inyecciones intradérmicas en ratones, concentrándose la actividad en las fracciones acetato de etilo y acuosa del extracto hidroalcohólico de hojas. Este estudio sugiere que la actividad anti-hemorrágica podría deberse a compuestos de tipo flavonoide y taninos condensados, presentes en el extracto (Castro et al., 1999).

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

El fruto es muy utilizado como condimento para saborizar los alimentos en la mayoría de países americanos y europeos, y se venden comúnmente en los mercados guatemaltecos (McVaugh, 1963).

En Guatemala, los indígenas a menudo aplican los frutos pulverizados a los cadáveres de los niños, porque se dice que esto los preserva indefinidamente, práctica que probablemente es de origen muy antiguo (McVaugh, 1963).

En Costa Rica, se ha usado para tratar los síntomas de la menopausia, y según Doyle et al (2009), el extracto mostró capacidad para unirse a receptores de estrógeno e inducir transcripción de genes de respuesta a estrógeno (Doyle, et al., 2009).

### Propiedades medicinales demostradas

El extracto acuoso de hojas produjo un efecto depresor nervioso central por vía intravenosa (Ankli et al., 1999).

El extracto etanólico de hojas demostró buena protección contra la ciclofamida inductora de mielosupresión la cual podría ser a causa de sus compuestos totales fenólicos. El eugenol que es el compuesto mayoritario en las hojas podría ser responsable de la actividad. El extracto también demostró actividad antioxidante significativa, proporcional al contenido de fenoles (Nayak et al., 2008).

El extracto metanólico de hoja y corteza fue efectivo en inhibir cepas aisladas de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus mutans* aislados de quemaduras y caries dentales de pacientes respectivamente, utilizando el método de agar por difusión en pocillo. El potencial de los extractos en inhibir los aislados clínicos de bacterias podría ser atribuido a la presencia de componentes inhibitorios que están presentes en los extractos. Esta especie puede ser un candidato potencial para el desarrollo de agentes activos contra bacterias patógenas (Asha, Chaithra, Yashoda, Vivek, & Prashith, 2013).

El extracto acetónico demostró una concentración inhibitoria mínima (CIM) de 250 µg/ml contra *S.aureus* (Cates, et al., 2014).

El aceite esencial de las hojas demostró actividad antioxidante en el modelo de emulsión del ácido linoleico, donde a concentración de 0.005 % la muestra inhibió la formación de dienos conjugados en 65.47% y en 72.98% la generación de productos de oxidación de ácido linoleico secundario (Jirovetz et al., 2007).

El extracto acuoso de hojas mostró actividad contra radical DPPH en manera dependiente de la concentración. La IC<sub>50</sub> del extracto acuoso de hojas fue de 390 µg/ml y para el aceite esencial fue de 2,340 µg/ml. Los estándares BHA, BHT y α-tocoferol mostraron IC<sub>50</sub> de 840, 900 y 840 µg/ml respectivamente. Esto muestra que la actividad contra radicales libres del extracto acuoso es mucho más alta que los estándares mientras que la actividad del aceite esencial es mucho menos (Kumar, Badarudin, & Jose, 2010).

El aceite esencial de hojas demostró actividad inhibitoria contra bacterias (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus coreus*) y contra hongos (*Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus flavus* y *Candida utilis*) a diferentes diluciones por el método de difusión en disco (Kumar et al., 2010).

El extracto hidroalcohólico de las partes aéreas mostraron un IC<sub>50</sub> < 30 µg/ml en la prueba de reducción del radical DPPH y un IC<sub>50</sub><32 µl en la inhibición de la peroxidación lipídica. También mostró un 20% de inhibición del daño ocasionado por el radical hidroxilo a la desoxiglucosa. En el ensayo de antimutagénesis utilizando *Escherichia coli* IC 188, el extracto mostró inhibición de la mutagenesis oxidativa del daño al ADN bacteriano inducido por el ter-butil hidroperóxido (TBH) (Ramos et al., 2003).

### Efectos tóxicos de la planta

Estudios de toxicidad aguda del fruto no mostraron mortalidad ni efectos adversos hasta una dosis de 7,5 g/kg en ratones (Adnan, Mansour, Mohammed, Jaber, & Syed, 2002).

## REFERENCIAS

- Al-Rehaily, A.J., Al-Said, M.S., Al-Yahya, M.A., Mossa, J.S., & Rafatullah, S. (2002). Ethnopharmacological studies on allspice (*Pimenta dioica*) in laboratory animals. *Pharmaceutical Biology*, 40(3), 200-205.
- Ankli, A., Sticher, O., & Heinrich, M. (1999). Medical ethnobotany of the Yucatecmaya: Healers' consensus as a quantitative criterion. *Economic Botany*, 53 (2), 144-160.
- Asha, M., Chaithra, M., Yashoda, K., Vivek, M., & Prashith, T. (2013). Antibacterial activity of leaf and bark extracts of *Pimenta dioica* (Linn.) Merrill against clinical isolates of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus mutans*. *World journal of pharmacy and pharmaceutical sciences*, 2 (5), 3207-3215.
- Attokaran, M. (2011). *Natural food flavors and colorants*. Blackwell publishing Ltd. and Institute of food technologists, 53.
- 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 extracto de plantas tropicales. *Revista de biología tropical*, 47(3), 605-616.
- Cates, R., Thompson, A., Brabazon, H., McDonald, S., Lawrence, M., Williams, S., ... (2014). Activities of Guatemalan medicinal plants against cáncer cell lines and selected microbes: Evidence for their conservation. *Journal of Medicinal Plants Research* 8(33), 1040 - 1050
- Doyle, B., Frasier, J., Bellows, L., Locklear, T.D., Perez, A., Gomez-Laurito, J., & Mahady, G. (2009). Estrogenic effects of herbal medicines from Costa Rica used for the management of menopausal symptoms. *Menopause*, 16(4), 748-75.
- Duke, J. (2009). *Duke's handbook of medicinal plants of Latin America*. USA: CRC Press, Taylor and Francis. pp. 594–596.
- George, M., Joseph, L. (2013). Pharmacognostical and phytochemical characterization of pimento leaves. *Global Journal of Pharmacology*, 7 (1), 75-80.
- Jiang, T., Feng, X., Li, R., & Wang, Y. (2013). Composition comparison of essential oils extracted by classical hydrodistillation and microwave-assisted hydrodistillation from *Pimenta dioica*. *Journal of essential oil bearing plants*, 16 (1), 45 – 50.
- Jirovetz, L., Buchbauer, G., Stoilova, I., Krastanov, A., Stoyanova, A., & Schmidt, E. (2007). Spice plants: chemical composition and antioxidant properties of *Pimenta* Lindl. essential oils, part 1: *Pimenta dioica* (L.) Merr. leaf oil from Jamaica. *Ernährung/Nutrition*, 31, 55-62.
- Kumar, B.H., Badarudin, A., & Jose, A. (2010). DPPH radical scavenging activity and antibacterial activity of *Pimenta dioica* (L.) Merr. *Oriental journal of chemistry*, 26(4), 1501-1505.
- McVaugh, R. (1963). Flora of Guatemala. *Fieldiana: Botany*, 24(7), 382-385.
- Nayak, Y., Abhilash, D., Vijaynarayana, K., & Fernandes, J. (2008). Antioxidant and hepatoprotective activity of *Pimenta dioica* leaves extract. *Journal of cell and tissue research*, 8 (3), 1571-1576.
- Mutchnick, P. & McCarthy, B. (1997). An ethnobotanical analysis of the tree species common to the subtropical moist forests of the Petén, Guatemala. *Economic botany*, 51(2), 158-183.
- Nayak, Y., Abhilash, D., Vijaynarayana, K., Fernandes, J. (2008). Protection of cyclophosphamide induced myelosuppression by alcoholic extract of *Pimenta dioica* leaves in mice. *Pharmacology on line*, 3, 719-723.
- Ramos, A., Visozo, A., Piloto, J., García, A., Rodríguez, C.A., & Rivero, R. (2003). Screening of antimutagenicity via antioxidant activity in Cuban medicinal plants. *Journal of ethnopharmacology*, 87, 241-246.
- Rao, P., Navinchandra, S., & Jayaveera, K.N. (2012). HPTLC analysis of the essential oil from *Pimenta dioica* leaf. *Journal of applied pharmaceutical science*, 2 (12), 141-148.

### Ficha 3.3

## SAMAT

*Eryngium foetidum* L. (APIACEAE)

### Sinonimias

*Eryngium antihystericum* Rottb.  
*Eryngium foetidum* fo. *comosum* Urb.  
*Eryngium molleri* Gand.

### Otros nombres populares

Se le conoce como culantro, culantro extranjero, culantro real, alcapate, escorzonera, xamat (Cobán; Q'eqchi'), silantro cimarrón (Petén). Algunas veces llamado acapate en El Salvador y Honduras (Standley & Williams, 1966).

### Partes recomendadas para su uso como antiofídico

Hojas y raíz (Wang, Su, Yuan, Deng & Li, 2012; Ramcharan, 1999). La hoja se utiliza machacada en cataplasma (Hay, 2002) y en infusión o decocción para tratar los efectos provocados por mordedura de serpiente. También se ha reportado el uso de las hojas frotadas sobre el cuerpo para repeler serpientes (Morton, 1981; Coe & Anderson, 2005; Duke, 2009).

### Descripción botánica

Es una hierba perenne, glabra, fuertemente aromática. Presenta hojas basales usualmente numerosas y formando una roseta, sésiles, la mayoría de 8-20 cm. de longitud, finamente serradas. Las cabezas florales son numerosas de alrededor de 1 cm de longitud, cilíndricas, verde amarillentas. Fruto globoso-ovoide de 2 mm de longitud (Standley & Williams, 1966).

### Hábitat

Esta hierba crece en riberas abiertas o pastos húmedos, algunas veces en terrenos baldíos en 1,300 metros sobre el nivel del mar o menos; a menudo cultivado en jardines. En Guatemala se encuentra en los departamentos de Petén, Alta Verapaz, Izabal, Jutiapa y Escuintla. Se distribuye en México, Belice hasta El Salvador y Panamá, en las Antillas, Sudamérica. Es naturalizada en África y Asia (Standley & Williams, 1966).



(1) Inflorescencia (2) Hojas en roseta

Cultivo en aldea Plan Grande Quehueche, Livingston, Izabal. Fotografías por Max Mérida

### Composición química de la parte medicinal

Las partes aéreas son ricas en calcio, hierro, riboflavina, caroteno, vitaminas A, B, C y aceites esenciales. Las hojas frescas poseen cerca del 85% de humedad, 3.3% de proteína, 0.6% de grasas, 6.5% de carbohidratos, 1.7% de cenizas, 0.06% de fósforo y 0.02% de hierro. En las hojas se han encontrado triterpenoides libres,  $\alpha$ -colesterol, brassicasterol, campesterol, estigmasterol (componente principal con 95% del total) y clerosterol,  $\beta$ -sitosterol,  $\delta$ -5-avenasterol,  $\delta$ -(5)-24-stigmastadienol and  $\delta$ -7-avenasterol. Sin embargo no se han reportado alcaloides en hojas (Paul, Seaforth & Tikasingh, 2011)

La hoja no contiene alcaloides, en esta se pueden encontrar flavonoides, taninos, saponinas y varios triterpenoides. El extracto de hojas presenta carotenoides (luteína, zeaxantina, b-criptoxantina, b-caroteno, clorofila-a, clorofila-b y feofitina-b), compuestos fenólicos (ácido gálico, ácido protocateico, ácido siríngico, ácido p-cumárico, ácido ferúlico y ácido sinápico) y antraquinona (norlichexantona, telochistina, ácido secalónico, citreoroseína, emodina y parietina) (Singh, Singh & Banu, 2013; Robineau, 2005).

De las fracciones hexánicas y acetato de etilo, obtenidas a partir de un extracto metanólico de hojas se aisló lasidiol p-metoxibenzoato, un sesquiterpenodaucano; y el 4-hydroxy-1,1,5-trimetil-2-formilciclohexadieno-(2,5)-[a-acetoximetil-cis-crotonato], un derivado terpenoide aldehídico (Rojas-Silva, et al., 2013).

Se han aislado del aceite esencial de hojas varios compuestos, como el 2-dodecenal (37.4%), ácido dodecanoico (10.7%), ácido trans-2-dodecanoico (9.7%), E-2-tridecenal (6.7%), duraldehído (5.1%) y tetradecanal (4.4%) (Singh, Ramakrishna & Ngachan, 2014).

Las hojas presentan el glicósido triterpenoidepentacíclico *o*-(3)- $\beta$ -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2 rham)- $\beta$ -D-fucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3 rham)- $\alpha$ -L-rhamnopyranosil-(1 $\rightarrow$ 4 glu)- $\beta$ -D-glucopiranosil]-olean-12-en-23,28-diol (Anam, 2002).

En el aceite esencial los mayores constituyentes son 2,4,5-trimetil-benzaldehído (27.7%), (E)-2-dodecenal (27.5%), carotol (8.8%), 3-dodecenal (5.2%) y terpineno (3.8%) (Cardozo, Rubio, Rojas & Usubillaga, 2000). Además, presenta alto porcentaje de tetradecanal y de 3,4,5-trimetilfenol (Jaramillo, Duarte, Martelo, 2011).

### Usos medicinales populares

En Guatemala esta planta es utilizada hasta cierto punto en la medicina doméstica (Standley & Williams, 1966). Las hojas se han usado como expectorante y mucolítico (Anam, 2002). Su aplicación medicinal incluye su uso como té para la gripe, diabetes, el estreñimiento y la fiebre (Jaramillo, Duarte, Martelo, 2011). También se ha utilizado para el tratamiento de quemaduras, dolor de oídos, hipertensión, asma, dolor de estómago, infertilidad, mordeduras de serpiente, diarrea y malaria (Paul, et al., 2011). En el tratamiento de mordedura de serpiente, en Guatemala se ha utilizado la hoja machacada en cataplasma (Hay, 2002).

### Propiedades antiofídicas medicinales demostradas

El extracto acuoso de hojas y raíces ha demostrado inhibición de la actividad hemolítica del veneno de serpientes y escorpiones (Wang, Su, Yuan, Deng & Li, 2012).

### Propiedades medicinales demostradas

Las hojas han demostrado actividad analgésica central, según Almeida, Navarro y Barbosa-Filho (2001).

El derivado sesquiterpenodaucano, obtenido del extracto metanólico de hojas, presentó actividad leishmanicida al inhibir el crecimiento de *Leishmania tarentolae* (promastigotes) y *L. donovani* (amastigotes) (Cardozo, Rubio, Rojas & Usubillaga, 2004).

Las hojas de *E. foetidum* mostraron actividad antiinflamatoria tópica en ratones e inhibición del edema de pata inducido por carragenina (Saénz, Fernández & García, 1997).

### Otros usos de la planta

Esta planta es muy conocida en la región por su uso en la cocina. La planta fresca posee un fuerte olor nauseabundo, pero cuando es hervida en las sopas o estofados le confiere un delicioso sabor, el cual no se esperaría de la planta fresca (Standley & Williams, 1966). Se usa comúnmente en salsas como estimulante del apetito (Jaramillo, Duarte & Martelo, 2011).

### Efectos tóxicos de la planta

De fracciones hexánicas y acetato de etilo extraídas de hojas de *E. foetidum*, se aisló sidiol-p-metoxibenzoato, un sesquiterpenodaucano, que no mostró citotoxicidad ( $IC_{50} > 50 \mu M$ ), por medio del ensayo *in vitro* contra líneas celulares L6 de mioblastos procedentes de huesos de rata (Rojas-Silva et al., 2013). El extracto acuoso de la planta entera congelada no presentó mortalidad a dosis de 2000 mg/kg, sin embargo, en los ratones se observaron signos de toxicidad (García, 1996).

En otra investigación realizada en Tailandia, se evaluó la toxicidad crónica de *E. foetidum* en ratones, concluyendo que al administrarlo junto con la dieta a dosis mayores a 0.8% de la dieta diaria por 24 semanas se presentan efectos adversos en la función del riñón (Anwitthayanuchit, Kupradinun, Rungsipipat, Kettawan & Butryee, 2016).

### REFERENCIAS

- Almeida, R., Navarro, D., Barbosa-Filho, J. (2001). Plants with central analgesic activity. *Phytomedicine*, 8(4), 310-322.
- Anam, E. (2002). A novel triterpenoid saponin from *Eryngium foetidum*. *Indian Journal of Chemistry*, 41 B, 1500-1503.
- Anwitthayanuchit, K., Kupradinun, P., Rungsipipat, A., Kettawan, A., Butryee, C. (2016). A 24-Weeks Toxicity Study of *Eryngium foetidum* Linn. Leaves in Mice. *Toxicological Research*, 32 (3), 231-237.
- Cardozo, E., Rubio, M., Rojas, L., Usubillaga, A. (2004). Composition of the essential oil from the leaves of *Eryngium foetidum* L. from the Venezuelan Andes. *Journal of Essential Oil Research*, 16, 33-34.
- Coe, F., Anderson, G. (2005). Snakebite ethnopharmacopoeia of eastern Nicaragua. *Journal of Ethnopharmacology* 96, 303-323
- Duke, J. (2009). Duke's handbook of medicinal plants of Latin America. USA: CRC Press, Taylor and Francis. pp. 298-300.
- García, M. (1996). Toxicidad crónica en ratones de *Eryngium foetidum*, planta entera. (Informe Tramil). España: Universidad de Sevilla.
- Hay, Y. (2002). Estudio etnofarmacológico de plantas utilizadas en la medicina tradicional para el tratamiento de la Leishmaniasis Cutánea, del Paludismo y de las mordeduras de serpiente, en tres departamentos de Guatemala. (Informe de actividades). Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala, Service de Coopeération au Développement, Institut de Recherche pour le Développement.
- Jaramillo, B., Duarte, E., Martelo, I. (2011). Composición química volátil del aceite esencial de *Eryngium foetidum* L. colombiano y determinación de su actividad antioxidante. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 16(2), 140-150.
- Morton, J. (1981). Atlas of Medicinal Plants of Middle America. Springfield: Charles C. Thomas.
- Paul, J., Seaforth, C., Tikasingh, T. (2011). *Eryngium foetidum* L.: A review. *Fitoterapia*, 82(2011), 302-308

- Ramcharan, C. (1999). Culantro: A much utilized, little understood herb. Perspectives on new crops and new uses. United States: ASHS Press.
- Robineau, L. (2005). Farmacopea vegetal caribeña. (Segunda edición). Nicaragua: Editorial Universitaria UNAN.
- Rojas-Silva, P., Graziose, R., Vesely, B., Poulev, A., Mbeunkui, F., Grace, M. H., et al. (2014). Leishmanicidal activity of a daucanesesquiterpene isolated from *Eryngium foetidum*. *Pharmaceutical biology*, 52(3), 398-401.
- Saénez, M., Fernández, M., García, M. (1997). Antiinflammatory and analgesic properties from leaves of *Eryngium foetidum* L. (Apiaceae). *Phytotherapy Research*, 11, 380–383.
- Singh, B., Ramakrishna, Y., Ngachan, S. (2014). Spiny coriander (*Eryngium foetidum* L.): a commonly used, neglected spicing-culinary herb of Mizoram, India. *Genet Resour Crop Evol*, 61, 1085-1090.
- Singh, S., Singh, D. & Banu, S. (2013). Determination of bioactives and antioxidant activity in *Eryngium foetidum* L.: A Traditional Culinary and Medicinal Herb. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, 83(3), 453-460.
- Standley, P. & Williams, L. (1966). Flora of Guatemala. *Fieldiana: Botany*, 24(8), 46-47.
- Wang, P., Su, Z., Yuan, W, Deng, G., Li, S. (2012). Phytochemical constituents and pharmacological activities of *Eryngium* L. (Apiaceae). *Pharmaceutical Crops*, 2012(3), 99-120.

**Anexo 4**

Tabla 4.1

*Cantidad disponible de extractos etanólicos secos de especies vegetales provenientes del proyecto de Saravia-Otten y col. (2015)*

<b>Especie vegetal</b>	<b>Peso neto (g)</b>
<i>P. peltatum</i> (hoja, etanol 70%)	43.95
<i>S. hyacinthoides</i> (hoja, etanol 90%)	37.52
<i>A. hindsii</i> (corteza, etanol 70%)	19.49
<i>H. patens</i> (hoja, etanol 70%)	57.42
<i>A. máxima</i> (corteza, etanol 70%)	21.29
<i>A. máxima</i> (hoja, etanol 70%)	22.27
<i>C. pareira</i> (raíz, etanol 70%)	15.54

### DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD COAGULANTE/ANTICOAGULANTE

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 coagulante y anticoagulante 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
- Marcador permanente de punta fina
- Gradilla para tubos de ensayo
- Tips amarillos de capacidad de 10 a 100  $\mu$ l
- Tips azules de capacidad de 100 a 1000  $\mu$ l
- Microtubos de capacidad de 1.5 mL
- Papel parafilm
- Tubos de plástico con anticoagulante (citrato de sodio al 3.8% o al 3.2%)
- Jeringas de plástico de capacidad de 5 mL

##### Cristalería y material de laboratorio

- Tubos de vidrio con capacidad para 10 mL.
- Gradilla para tubos de ensayo

##### Equipo

- Balanza analítica.
- Micropipetas de volumen variable (10 a 100  $\mu$ L y 100 a 1000  $\mu$ L).
- Vórtex.
- Baño de agua
- Cronómetro

##### Reactivos

- PBS 1x
- PBS 1x + Tween 80 al 5% v/v
- Kit para la determinación de tiempo de trombina (Wiener lab)
- Citrato trisódico

### Material biológico

- Veneno de serpiente (*Bothrops asper*).
- Pool de plasma humano citratado

## V. PROCEDIMIENTO

### METODOLOGÍA

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

#### A. Obtención de plasma humano citratado

1. Obtener sangre cuidadosamente mediante punción venosa, evitando estasis o espuma, y colocarla en un tubo con anticoagulante (citrate de sodio al 3.2%), en una relación sangre:anticoagulante de 9:1. Mezclar suavemente.
2. Centrifugar por 10 minutos a 2000 x g. Separar el sobrenadante antes de los 30 minutos.
3. Mantener el plasma en refrigeración (2-10°C) hasta el momento de efectuarse la prueba. En caso de no procesarse inmediatamente, se debe almacenar el plasma a una temperatura de -20°C. La descongelación de este plasma debe realizarse en baño de María, a 37°C.

#### B. Determinación de dosis reto de veneno

1. Rotular 5 tubos de vidrio por cada concentración de veneno que se evaluará (el ensayo se realizará en quintuplicado).
2. Rotular 5 tubos de vidrio por cada control a analizar (control positivo de reacción: solución de trombina; control negativo de reacción: PBS).
3. Agregar 100 µl de plasma citratado a los tubos de vidrio e incubar de 3 a 5 minutos en baño de agua a 37°C.
4. Preparar diluciones de veneno en PBS a las concentraciones a evaluar. Se recomienda analizar las siguientes dosis (concentraciones de veneno): 0.25, 0.50, 1.00, 2.00 y 4.00 µg de veneno por 100 µl de solución.
5. Agregar a cada uno de los tubos con plasma citratado (incubados a 37°C) 100 µl de la dosis de veneno a evaluar.
6. Inmediatamente determinar el tiempo de coagulación con cronómetro, indicado por la formación de un coágulo evidente en el tubo de ensayo.
7. Preparar una curva dosis-respuesta (µg de veneno en el eje de las abscisas [x] vs tiempo de coagulación en el eje de las ordenadas [y]), empleando una escala logarítmica para la dosis de veneno y una escala milimétrica para el tiempo de coagulación. Determinar la dosis de veneno que induce coagulación del plasma en 60 segundos, el cual corresponde a la dosis coagulante mínima-plasma (DCM-P).
8. La dosis reto (DR) de veneno a ser utilizada en las pruebas de neutralización corresponderá a 2 DCM-P.

#### C. Ensayos dosis-respuesta -Actividad coagulante intrínseca

1. Rotular 5 tubos de vidrio para cada repetición de cada concentración de planta que se evaluará, así como para controles positivos (trombina y DR de veneno) y control negativo (PBS).
2. Agregar 100 µl de plasma citratado a los tubos de vidrio e incubar de 3 a 5 minutos en baño de agua a 37 °C.
3. Preparar diluciones de extractos vegetales a las concentraciones a evaluar. Se recomienda analizar concentraciones de extractos que presenten las siguientes relaciones con respecto a la DR de veneno: 1:25, 1:50, 1:100, 1:200 y 1:400.

4. Agregar a cada tubo 100  $\mu$ l de cada una de las soluciones a ensayar (diluciones de extractos o mezclas de extractos). Usar como control negativo 100  $\mu$ l de PBS. Se usará dos controles positivos diferentes: 100  $\mu$ l de veneno (DR), y 100  $\mu$ l de solución de trombina.
5. Inmediatamente determinar el tiempo de coagulación con cronómetro, indicado por la formación de un coágulo evidente en el tubo de ensayo. Verificar la formación del coagulo a los siguientes tiempos (en minutos): 1, 2, 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 45, 60. Todos los extractos (o mezclas de extractos) que no demuestren formación de coagulo evidente a los 60 minutos serán clasificados sin actividad coagulante intrínseca a las concentraciones evaluadas.
6. Si se demuestra actividad coagulante de algún extracto luego de los 30 minutos, se repetirá la determinación de esta actividad realizando evaluaciones en períodos más cortos (35, 40, 45, 50, 55 min), para observar con mayor detalle el tiempo específico de formación del coagulo.

#### **D. Ensayos dosis-respuesta -Actividad anticoagulante intrínseca**

1. Preparar diluciones de extractos vegetales a las concentraciones a evaluar. Se recomienda analizar concentraciones de extractos que representen las siguientes relaciones con respecto a la DR de veneno: 1:25, 1:50, 1:100, 1:200 y 1:400.
2. Realizar una mezcla con una dosis fija de trombina y cada una de las diluciones de extractos a evaluar por quintuplicado. Las mezclas se preparan en microtubos de 1.5 ml en proporción 1:1. Preparar mezclas de controles positivos: trombina:PBS relación 1:1 y DR de veneno: PBS relación 1:1. Como control negativo se utilizará PBS.
3. Incubar mezclas y controles por 30 minutos en baño de agua a 37°C.
4. Rotular 5 tubos de vidrio para cada dosis de extracto a evaluar, así como para controles positivos y negativo.
5. Agregar a cada tubo 100  $\mu$ l de plasma citratado incubar de 3 a 5 minutos en baño de agua a 37 °C.
6. Agregar a cada tubo 100  $\mu$ l de cada una de las mezclas pre-incubadas. Incluir controles positivos y negativo.
7. Inmediatamente determinar el tiempo de coagulación con cronómetro, indicado por la formación de un coágulo evidente en el tubo de ensayo. Verificar la formación del coagulo a los siguientes tiempos (minutos): 1, 2, 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 45, 60.
8. Para los extractos que retarden el tiempo de coagulación del plasma se reportará el tiempo (en minutos), requerido para la coagulación. Todos los extractos (o mezclas de extractos) que no demuestren formación de coagulo evidente a los 60 minutos serán considerados con actividad anticoagulante intrínseca a las concentraciones evaluadas.

#### **E. Ensayos de neutralización**

1. Realizar mezclas veneno-extracto según las relaciones seleccionadas (x dosis reto de veneno: y partes de extracto a probar [se recomienda utilizar una razón de 1:25 hasta 1:400]) en microtubos de 1.5 ml en una proporción de 1:1 de volumen. Incluir como control negativo PBS y como controles positivos la DR de veneno:PBS relación 1:1 y trombina:PBS relación 1:1.
2. Incubar mezclas y controles a 37°C por 30 minutos en baño de agua.
3. Rotular 5 tubos de vidrio para cada mezcla a evaluar, así como para controles positivos y negativo.
4. Agregar 100  $\mu$ l de plasma citratado a los tubos de vidrio e incubar de 3 a 5 minutos en baño de agua a 37 °C.
5. Agregar a cada tubo 100  $\mu$ l de cada una de las mezclas pre-incubadas. Incluir controles positivos y negativo.
6. Inmediatamente determinar el tiempo de coagulación con cronómetro, indicado por la formación de un coágulo evidente en el tubo de ensayo. Verificar la formación del coagulo a los siguientes tiempos (minutos): 1, 2, 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 45, 60.
7. Para las mezclas que retarden el tiempo de coagulación del plasma se reportará el tiempo (en minutos), requerido para la coagulación. Todas las mezclas que no demuestren

formación de coagulo evidente a los 60 minutos serán considerados con capacidad de neutralizar la actividad coagulante del veneno a la dosis empleada en la preparación de la mezcla.

8. Si se demuestra actividad coagulante para alguna mezcla luego de los 30 minutos, se repetirá la determinación de esta actividad realizando evaluaciones en períodos más cortos (35, 40, 45, 50, 55 min), para observar con mayor detalle el tiempo específico de formación del coagulo.

## VI. ANEXOS

### PREPARACIÓN DE SOLUCIONES DE TRABAJO

#### **A. PBS 1x**

Para 100 mL de solución de PBS 1x, pesar 0.87 g de NaCl, 0.144 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y 0.021 g de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y disolver en 60 mL de agua estéril. Mezclar bien y aforar a 100 mL. Autoclavear.

#### **B. Citrato de sodio al 3.2%**

Para 50 mL de solución de citrato de sodio al 3.2%, pesar 1.62 g de citrato disodio tribásico y disolver en agua destilada estéril. Filtrar la solución con filtro de 0.22 µm. Almacenar la solución filtrada a 4°C.

#### **C. Solución de trombina**

Reconstituir la trombina liofilizada de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Para trombina de la casa comercial de Weiner Lab, se puede utilizar dos volúmenes diferentes, que resultarán en dos concentraciones diferentes:

Reconstituido con 2 mL → Trombina a 4 UNIH/mL

Reconstituido con 3 mL → Trombina a 2.7 UNIH/mL

Asegurarse de usar una misma concentración de trombina para todos los experimentos. Para la determinación de la actividad anticoagulante, se debe reconstituir la trombina con la mitad del volumen normalmente trabajado, para que cuando se realice la mezcla con la solución stock de la planta, la trombina alcance la concentración deseada.

Por ejemplo, si se ha estado trabajando con trombina a 4 UNIH/mL, se debe reconstituir la trombina con 1 mL, y si se ha estado trabajando con una concentración de trombina de 2.7 UNIH/mL, se debe utilizar 1.5 mL para reconstituir. La concentración de la solución stock de la planta también debe estar a una concentración doble de la que se va a evaluar, para que al mezclar con la trombina, alcance la concentración deseada.

## VII. REFERENCIAS

- Houghton, P. & Skari, K. (1994). The effect on blood clotting of some west African plants used against snakebite. *Journal of Ethnopharmacology*, 44 (1994), 99-108.
- Instituto Clodomiro Picado (2007). *Determinación de actividades tóxicas de venenos de serpiente y su neutralización por antivenenos*. Manual de métodos de laboratorio. Costa Rica: Instituto Clodomiro Picado.
- Saravia, P., Cáceres, A., Velásquez, R., & Lara, O. (2001) *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.
- Theakston, R.G.D., & Reid, H.A. (1983). Development of simple standard assay procedures for the characterization of snake venoms. *Bulletin of the World Health Organization*, 61(6), 949-956
- U.S. Pharmacopeia. Wilk, A. (2016) *Titration and electrodes*. Recuperado de [http://www.pharmacopeia.cn/v29240/usp29nf24s0\\_m5220.html](http://www.pharmacopeia.cn/v29240/usp29nf24s0_m5220.html)
- Weiner Laboratorios S.A.I.C. (2000). *Tiempo de trombina*. Recuperado de [http://www.wiener-lab.com.ar/VademecumDocumentos/Vademecum%20espanol/tiempo\\_trombina\\_sp.pdf](http://www.wiener-lab.com.ar/VademecumDocumentos/Vademecum%20espanol/tiempo_trombina_sp.pdf)

Tabla 5.1

*Determinación de la dosis coagulante mínima en plasma (DCM-P) de veneno de Bothrops asper*

Concentración veneno ( $\mu\text{g/mL}$ )	Tiempo de coagulación (segundos) <sup>a</sup>
4.00	31.11
2.00	41.11
1.00	58.89
0.50	90.00
0.25	140.00

*Nota:* <sup>a</sup>Los resultados representan el promedio de tres ensayos independientes realizados en triplicado (n = 9).

**Anexo 6**

Figura 6.1

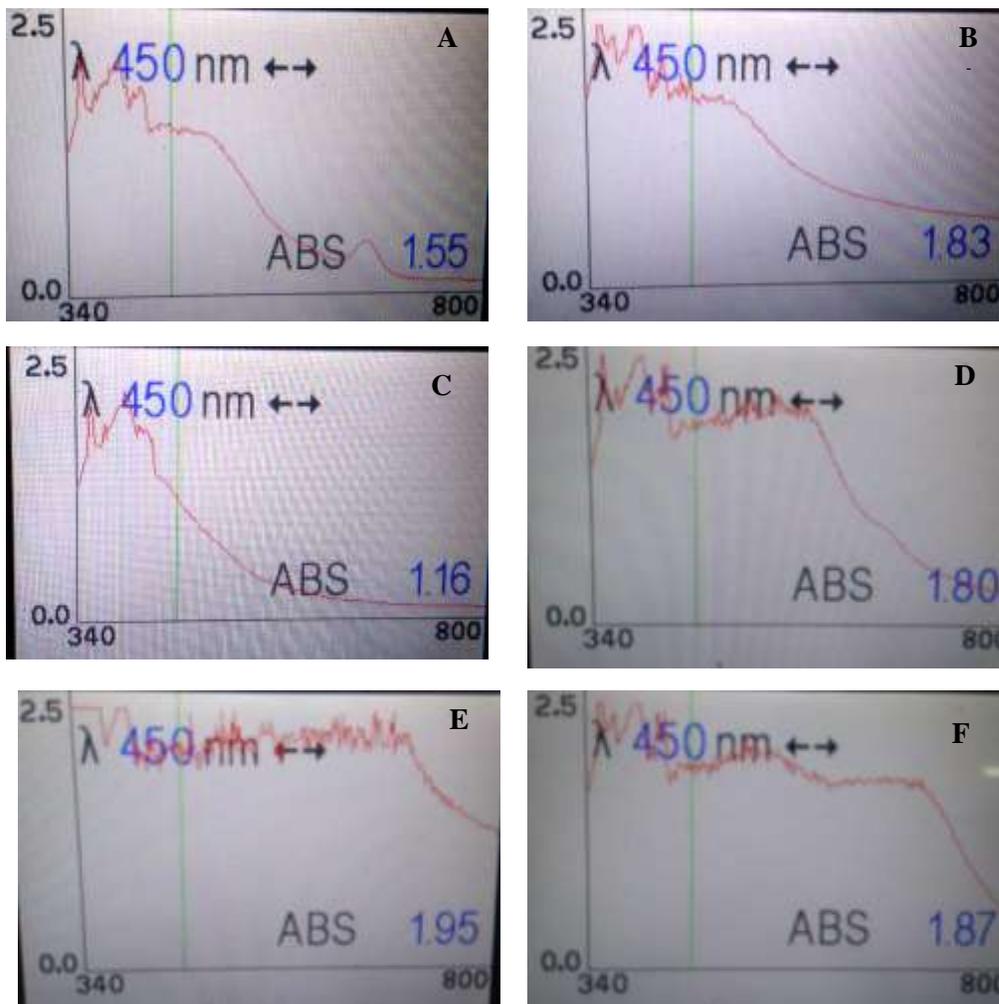
*Fotografías del proceso de desclorofilación*

*Nota.* A. Proceso de desclorofilación de extractos vegetales por columna de sílica. B. Fraccionamiento de la solución desclorofilada utilizando solventes de polaridad creciente en ampolla de decantación. C y D. Separación de fracciones de diferente polaridad utilizando ampolla de decantación.

## Anexo 7

Figura 7.1

*Determinación de los espectros de absorción en el rango de 340-800 nm de los extractos vegetales con y sin clorofila.*



*Nota.* Los extractos evaluados fueron: *B. simaruba* con clorofila (A) y sin clorofila (B); *P. dioica* con clorofila (C) y sin clorofila (D); *E. foetidum* con clorofila (E) y sin clorofila (F).

Tabla 7.1

*Resumen de los espectros de absorción de los extractos utilizados en la evaluación de la capacidad neutralizante del efecto proteolítico del veneno de B. asper*

Extracto	Mayor absorbancia <sup>a</sup>		Menor absorbancia <sup>a</sup>		Absorbancia a 450 nm <sup>c</sup>
	Longitud de onda <sup>b</sup>	Absorbancia	Longitud de onda <sup>b</sup>	Absorbancia	
<i>B. simaruba</i> con clorofila	397	2.08	787	0.112	1.55
<i>B. simaruba</i> sin clorofila	352-257 392-394	2.50	800	0.63	1.83
<i>P. dioica</i> con clorofila	390	2.24	800	0.113	1.16
<i>P. dioica</i> sin clorofila	352-357 387-388	2.50	800	0.496	1.80
<i>E. foetidum</i> con clorofila	340-365 385-395	2.50	800	1.33	1.95
<i>E. foetidum</i> sin clorofila	390	2.24	800	0.13	1.87

*Nota.* <sup>a</sup>La determinación del espectro de absorción de los extractos se realizó evaluando la absorbancia de cada extracto en un espectrofotómetro desde 340 hasta 800 nm. <sup>b</sup>En nanómetros (nm). <sup>c</sup>Longitud de onda utilizada en la prueba de actividad proteolítica.

## Anexo 8

Tabla 8.1

*Determinación de flavonoides y antocianinas y catequinas*

Extracto etanólico	Número de bandas	Color de banda	Rf
<i>Bursera simaruba</i>	1	Celeste	0.25
	2	Celeste	0.46
	3	Celeste	0.52
	4	Celeste	0.86
<i>Eryngium foetidum</i>	1	Verde	0.21
	2	Anaranjado	0.31
	3	Verde	0.34
	4	Turquesa	0.46
	5	Anaranjado	0.55
	6	Anaranjado	0.62
	7	Verde	0.81
	8	Anaranjado	0.89
<i>Pimenta dioica</i>	1	Verde	0.2
	2	Violeta	0.29
	3	Violeta	0.35
	4	Anaranjado	0.51
	5	Anaranjado	0.61
	6	Violeta	0.73
	7	Anaranjado	0.76
	8	Verde	0.82
Estándar quercertina	1	Anaranjado	0.76
Estándar rutina	1	Anaranjado	0.05
Estándar hiperósido	1	Verde	0.22
Estándar ácido clorogénico	1	Verde	0.70

*Nota.* Determinación metabolitos por cromatografía en capa fina. Fase estacionaria: TLC Silicagel 60 RP-18 F254S; fase móvil: acetato de etilo-ácido fórmico-ácido acético glacial-agua (20:2:2:5); revelador: productos naturales y polietilenglicol, observado a 365 nm.

Tabla 8.2

*Determinación de taninos*

Extracto etanólico	Reactivo utilizado en el análisis / Resultado			Testigo
	Gelatina 1%	Gelatina-sal	FeCl <sub>3</sub>	
<i>Eryngium foetidum</i>	Turbidez (+)	Turbidez (+)	Coloración negro-grisáceo (+)	Amarillo
<i>Pimenta dioica</i>	Turbidez (+)	Turbidez (+)	Coloración negro-azulado (+)	Bronce
<i>Bursea simaruba</i>	Turbidez (+)	Turbidez (+)	Cambio de color, a caramelo (+)	Incoloro

Nota.<sup>a</sup>Determinación de metabolitos mediante técnica macrométrica de tubos.

Tabla 8.3

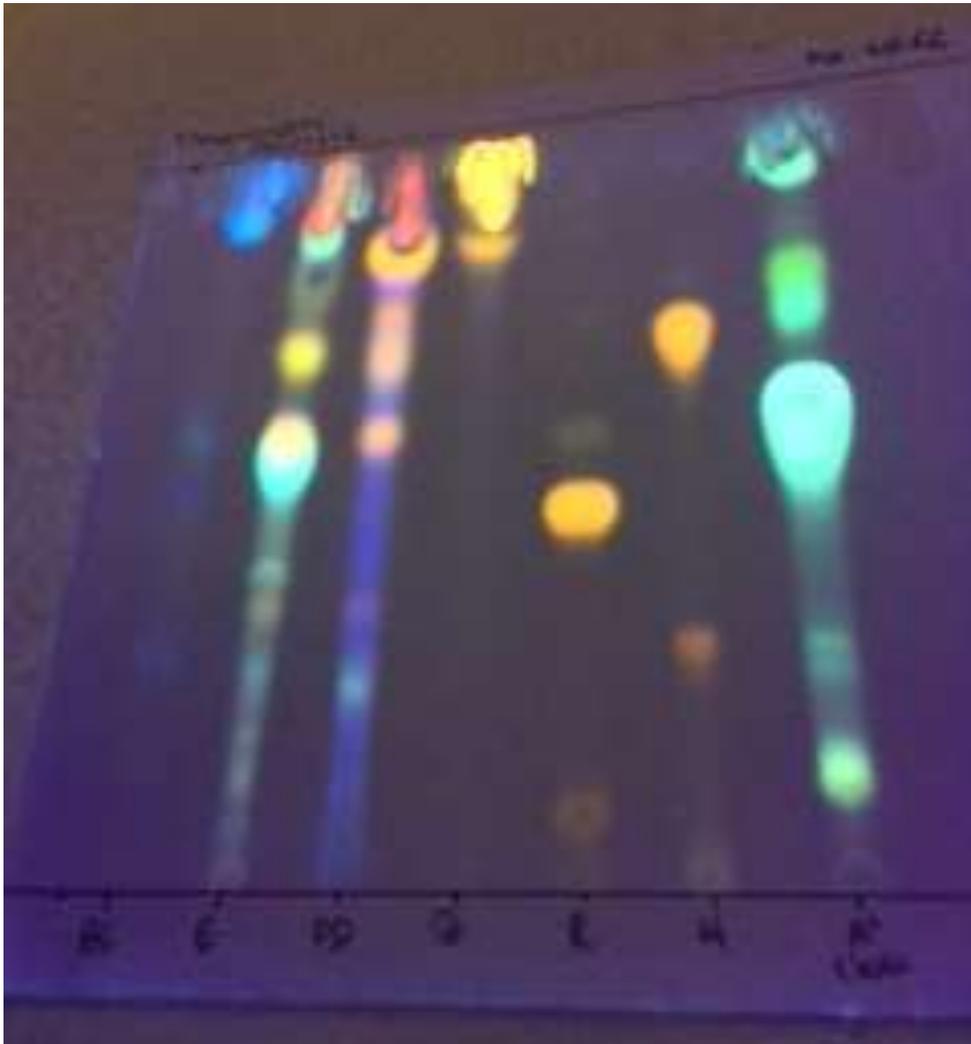
*Determinación de cumarinas*

<b>Extracto etanólico</b>	<b>Número de bandas</b>	<b>Color de la banda</b>	<b>Intensidad de la banda</b>	<b>Rf</b>
<i>Bursera simaruba</i>	1	Fluorescencia celeste	+++	0.07
<i>Pimienta dioica</i>	-	-	-	-
<i>Eringyum foetidum</i>	-	-	-	-
Estandar ácido p-cumárico	2	Fluorescencia azul	+ +	0.12
Estándar cumarina	2	Fluorescencia azul	+	0.14
		Fluorescencia verde	++++	0.45

*Nota.* Determinación metabolitos por cromatografía en capa fina. Fase estacionaria: TLC Silicagel 60 RP-18 F254S; fase móvil: tolueno-acetato de etilo (93:7); revelador: KOH al 5%, observado a 365 nm.

Figura 8.1

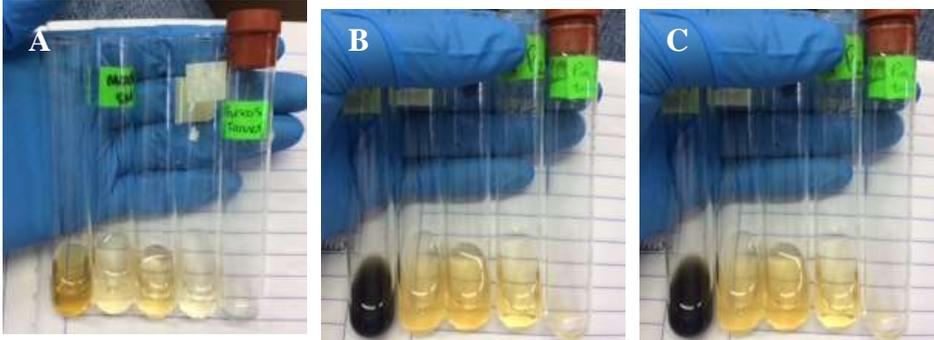
*Determinación de flavonoides, antocianinas y catequinas por análisis cromatográfico*



*Nota.* BS. *Bursera simaruba*. E. *Eryngium foetidum*. PD. *Pimenta dioica*. Q. Estandar de quercitina. R. Estandar de rutina. H. Estandar hipersódico. A+ cloro. Estandar de ácido clorogénico.

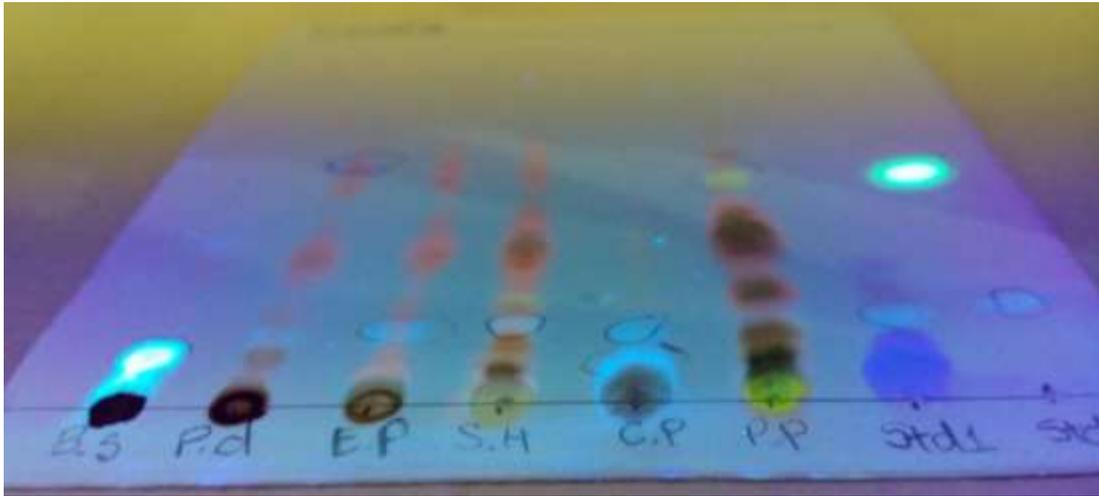
Figura 8.2

*Determinación de taninos por...macrometrica*



*Nota. A. Extracto de B. simaruba. B. Extracto de P. dioica. C. Extracto de E. foetidum.*

Figura 8.3

*Determinación de cumarinas por análisis cromatográfico*

Nota. BS. *B. simaruba*. PD. *P. dioica*. EP. *E. foetidum*. SH. *S. hyacinthoides*. CP. *C. pareira*. PP. *P. peltatum*. Std1. Estándar ácido p-cumárico. Std2. Estándar cumarina.

## **8. Actividades de gestión, vinculación y divulgación**

### **8.1 Actividades de docencia**

De manera paralela al desarrollo del proyecto de investigación se asesoró el seminario de graduación “*Determinación de la capacidad neutralizante de mezclas de plantas usadas en Guatemala como antídotos para la mordedura de serpiente*”, el cual fue desarrollado por estudiantes de la Escuela de Química Farmacéutica; y asesorado por las siguientes catedráticas: Dr. Patricia Saravia, M. Sc. Rosario Hernández (Unidad de Biología Celular, Depto. de Bioquímica) y Dra. Sully Cruz (Lipronat, Depto. de Farmacognosia y Fitoquímica). Los estudiantes fueron capacitados en la realización de los bioensayos y concluyeron todos los ensayos correspondientes a parte experimental del seminario

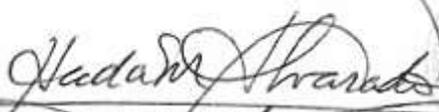
23 de enero de 2017  
REF.EQF.49.01.017

A quien interese:

La Dirección de la Escuela de Química Farmacéutica, por este medio **HACE CONSTAR QUE:** La Doctora Patricia Saravia, es Asesora de Seminario de Tesis titulado "**Determinación de la capacidad neutralizante de mezclas de plantas usadas en Guatemala, como antídoto; para la mordedura de serpiente**", el cual está siendo desarrollado por los estudiantes, Jaqueline Alvarado, Rossana Navarajo, Michael Mo.-----

Para los usos que a la interesada convengan, extendiendo la presente en la ciudad de Guatemala, a los veintitrés días del mes de enero del año dos mil diecisiete.-----

"ID Y ENSEÑAD A TODOS"




Licda. Hada Marieta Alvarado Beteta  
Directora  
Escuela de Química Farmacéutica

HMAB\*Ingrid

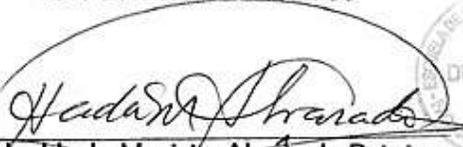
23 de enero de 2017  
REF.EQF.50.01.017

A quien interese:

La Dirección de la Escuela de Química Farmacéutica, por este medio **HACE CONSTAR QUE:** La Licenciada Rosario Hernández, es Asesora de Seminario de Tesis titulada "**Determinación de la capacidad neutralizante de mezclas de plantas usadas en Guatemala, como antídotos para la mordedura de serpiente**", el cual está siendo desarrollado por los estudiantes, Jaqueline Alvarado, Rossana Navarizo, Michael Mo.-----

Para los usos que a la interesada convengan, extendiendo la presente en la ciudad de Guatemala, a los veintitrés días del mes de enero del año dos mil diecisiete.-----

"ID Y ENSEÑAD A TODOS"



Licda. Hada Marieta Alvarado Beteta  
Directora  
Escuela de Química Farmacéutica



HMAB\*Ingrid

Se iniciaron las gestiones para la realización de dos tesis de graduación en las cuales se continuará investigando la capacidad neutralizante de extractos vegetales de plantas colectadas en Guatemala, sobre diferentes efectos del veneno de *B. asper*. Actualmente los anteproyectos se encuentran en proceso de escritura para someter a aprobación a las Escuelas de Química Biológica (Br. Vicente Genovés) y Química Farmacéutica (Br. Alba Torres).

## **8.2 Actividades de divulgación**

Se presentó al claustro del Depto. de Bioquímica, en el marco de actividades de educación continua, la conferencia “*Neutralización de los efectos coagulante, fosfolipasa A2 y proteolítico del veneno de B. asper por extractos de especies vegetales utilizadas en la medicina tradicional centroamericana*”.



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:

**DRA. PATRICIA SARAVIA OTTEN**

Por su valiosa colaboración en como Conferencista en el tema:  
“Accidentes ofídicos, su tratamiento convencional con antisuero y el tradicional con extractos de plantas”  
Impartida a los alumnos de Química Biológica que realizarán su Ejercicio Profesional Supervisado en el transcurso del año 2017.

Dado en la ciudad de Guatemala, el día 28 de  
Noviembre del año 2,016.

*Licda. Liliana Vides*  
Directora Programa de EDC



*Lic. Marvin Efraim Riveza Rugama*  
Lic. Marvin Efraim Riveza Rugama  
Supervisor EPS - Química Biológica

Se elaboró y presentó de un poster científico dentro de la Feria Científica 2016 organizada por el Instituto de Investigaciones Químicas y Biológicas - IIQB en el marco del V Congreso de la Escuela de Química Farmacéutica. La elaboración del póster se realizó con el apoyo del IIQB, en cuanto al diseño y de DIGI en impresión.





Universidad de San Carlos de Guatemala  
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia  
Instituto de Investigaciones Químicas y Biológicas

Otorga del presente reconocimiento a:

## Dra. Patricia Saravia

Por su participación en la exposición de los poster científicos: **Validación de plantas utilizadas en Guatemala para el tratamiento del envenenamiento por mordedura de la serpiente *Bothrops asper*** y **Homogenates of skeletal muscle injected with snake venom inhibit myogenic differentiation in cell culture**; dentro de la Feria Científica 2016.

Realizado en el marco del V Congreso de la Escuela de Química Farmacéutica.

Id y Enseñad a Todos

Guatemala, 21 de septiembre de 2016

Dra. Karin Larissa Herrera Aguilar  
Directora - IIQB





Universidad de San Carlos de Guatemala  
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia  
Instituto de Investigaciones Químicas y Biológicas

Otorga del presente reconocimiento a:

## Licda. Rosario Hernández

Por su participación en la exposición del poster científico **Validación de plantas utilizadas en Guatemala para el tratamiento del envenenamiento por mordedura de la serpiente *Bothrops asper***. Realizado en la Feria Científica 2016, en el marco del V Congreso de la Escuela de Química Farmacéutica.

Id y Enseñad a Todos

Guatemala, 25 de octubre de 2016

  
Dra. Karin Larissa Herrera Aguilar  
Directora - IIQB



Se presentó la conferencia titulada *“Tratamiento convencional y alternativo del venenamiento producido por mordedura de serpiente en Guatemala”*, dirigida a supervisores y estudiantes la carrera de Química Farmacéutica como parte de las actividades de seguimiento de los estudiantes que realizaron su Ejercicio Profesional Supervisado (EPS) durante el segundo semestre del año 2016.



Universidad de San Carlos de Guatemala  
 Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia  
 Programa de Experiencias Docentes con la Comunidad  
 Sub-Programa de Ejercicio Profesional Supervisado



*Otorgan el presente reconocimiento a:*

***Dra. Patricia Saravia Otten***

*Por la presentación de la Conferencia:  
 "Tratamiento convencional y alternativo del envenenamiento producido  
 por mordedura de serpiente en Guatemala"  
 A estudiantes de EPS de Química Farmacéutica, Segundo Semestre 2016*

Dado en Sta. Lucía Milpas Altas, a los veintiocho días del mes de Octubre, dos mil dieciséis

*Luzmila de la Cruz*  
**Luzmila Vides de Urizar**  
 Directora del Programa de EDC



*Bessie Abigail Orozco R.*

**MSc. Bessie Abigail Orozco R.**  
 Supervisora EPS-QF



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



Universidad de San Carlos de Guatemala  
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia  
Programa de Experiencias Docentes con la Comunidad  
Sub-Programa de Ejercicio Profesional Supervisado

*Otorgan el presente reconocimiento a:*

***MSc. Rosario Hernández***

*Por la presentación de la Conferencia:  
"Tratamiento convencional y alternativo del envenenamiento producido  
por mordedura de serpiente en Guatemala"*

*A estudiantes de EPS de Química Farmacéutica, Segundo Semestre 2016*

Dado en Sta. Lucía Milpas Altas, a los veintiocho días del mes de Octubre, dos mil dieciséis

*Licda. Lina Vides de Urizar*  
Directora del Programa de EDC



**MSc. Bessie Abigail Orozco R.**  
Supervisora EPS-QF

Se presentó la conferencia titulada “*Accidentes ofídicos, su tratamiento convencional con antisuero y el tradicional con extractos de plantas*”, dirigida a supervisores y estudiantes las carreras de Química Biológica y Biología durante las actividades de inducción de los estudiantes que realizarán su EPS durante el primer semestre 2017.



Universidad de San Carlos de Guatemala  
 Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia  
 Programa de Experiencias Docentes con la Comunidad  
 Sub-Programa de Ejercicio Profesional Supervisado



*Otorgan el presente reconocimiento a:*

***Dra. Patricia Saravia Otten***

*Por la presentación de la Conferencia:  
 "Tratamiento convencional y alternativo del envenenamiento producido  
 por mordedura de serpiente en Guatemala"  
 A estudiantes de EPS de Química Farmacéutica, Segundo Semestre 2016*

Dado en Sta. Lucía Milpas Altas, a los veintiocho días del mes de Octubre, dos mil dieciséis

*Lidia Chiana Vides de Urizar*  
 Directora del Programa de EDC



*Bessie Abigail Orozco R.*

MSc. Bessie Abigail Orozco R.  
 Supervisora EPS-QF



Universidad de San Carlos de Guatemala  
 Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia  
 Programa de Experiencias Docentes con la Comunidad  
 Sub-Programa de Ejercicio Profesional Supervisado

Otorgan el presente reconocimiento a:

**MSc. Rosario Hernández**

Por la presentación de la Conferencia:  
 "Tratamiento convencional y alternativo del envenenamiento producido  
 por mordedura de serpiente en Guatemala"  
 A estudiantes de EPS de Química Farmacéutica, Segundo Semestre 2016

Dado en Sta. Lucía Milpas Altas, a los veintiocho días del mes de Octubre, dos mil dieciséis

*Lidia Lidia Vidales Urizar*  
 Lidia Lidia Vidales Urizar  
 Directora del Programa de EDC



*Bessie Abigail Orozco R.*

MSc. Bessie Abigail Orozco R.  
 Supervisora EPS-QF

Se elaboraron e imprimieron 500 trifoliales, los cuales contienen información actualizada acerca del accidente ofídico en Guatemala, su fisiopatología y tratamiento convencional y alternativo. Estos trifoliales fueron entregados 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 realizaron su EPS el segundo semestre del año 2016 (QF) o que lo están realizando durante el primer semestre del 2017 (QB y B), con la encomienda de distribuirlos en los hospitales, centros de salud o comunidades en donde lo realicen.

Tabla 1

Especies de plantas evaluadas en cuanto a su capacidad neutralizante de los efectos PLA2 y proteolítico del veneno de *B. asper*.

Especie	Nombre común	Parte utilizada	Porcentaje de neutralización actividad	
			PLA2	Proteolítica
<i>Hamelia patens</i>	Chipilín	Hojas	0	0
<i>Sansevieria hyacinthoides</i>	Oreja de burro	Hojas	13.90 ± 6.41	0
<i>Cissampelos pareira</i>	Alcotán	Raíz	0	32.98 ± 5.51
<i>Piper peltatum</i>	Cordoncillo	Hojas	0	24.52 ± 7.45
<i>Acacia hindsii</i>	Ixcanal	Corteza	0	0
<i>Aristolochia maxima</i>	Guaco	Hojas y corteza	0	0

Tomado de: Saravia-Otten et al., 2015.

Las plantas fueron colectadas en las regiones en las cuales se reporta su uso (figura 1).

Figura 1. Mapa de recolección de especies vegetales.



Nota. Los pines azules indican las regiones en las cuales se llevó a cabo la recolección de las especies vegetales utilizadas en Saravia y col. (2015) y los pines rojos las especies de reciente inclusión en el estudio (proyecto cofinanciado por DIGI, partida presupuestal 4.8.63.1.82, año 2016).

Publicación realizada con fondos aportados por la Dirección General de Investigación en el Programa Universitario de Investigación Interdisciplinaria en Salud (partida presupuestal 4.8.63.1.82, año 2016) y avalada por el Instituto de Investigaciones Químicas y Biológicas de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.

Diseño: Dirección General de Investigación.

## Referencias

- 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.
- Organización Panamericana de la Salud, Organización Mundial de la Salud M de SP y AS, Museo de Historia Natural. *Manual Para La Identificación, Prevención Y Tratamiento de Mordeduras de Serpientes Venenosas En Centro América Manual Para La Identificación, de Mordeduras de Serpientes*; 2009:96.
- 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.
- Arroyo CO, Muñoz Porras A. Aspectos básicos, epidemiológicos y clínicos del ofidismo en Costa Rica (Revisión bibliográfica). *Rev Médica Costa Rica y Centroamérica*. 2009;LXVIII(590):363-366.
- Mora F, J. A, Bien R, Lopez A. Aspectos Básicos sobre las Serpientes de Costa Rica. (Picado IC, ed.); 2006:61.
- Gutiérrez JM. Comprendiendo los venenos de serpientes: 50 años de investigaciones en América Latina. *Rev Biol Trop*. 2002;50(2):377-394.
- Gutiérrez JM. Snakebite envenomation in Central America. In: Mackessy S, ed. *Handbook of Venoms and Toxins of Reptiles*. USA: CRC-Press; 2010:492 - 505.
- 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.
- Saravia-Otten, P., Hernández, R., Gutiérrez, J. M., Mérida, M. & Cáceres, A. Evaluación de la capacidad neutralizante de plantas de uso popular en Guatemala como antidotos para el envenamamiento por la mordedura de la serpiente *Bothriopsis asper*. *Ciencia, Tecnología y Salud*, 2015, 2(1):25-37.

## SITIOS DE INTERÉS

Instituto Clodomiro Picado  
http://icpuccr.ac.cr

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

Departamento de Toxicología,  
Facultad de CCOQ y Farmacia, USAC,  
3ra. Calle 6-47, Zona 1, Ciudad de Guatemala,  
Teléfono (502) 2251-3566,  
atención de lunes a viernes de 7:00 a 16:00 h.

**Emergencias 24 horas, teléfono 1801-0029832**

Universidad de San Carlos de Guatemala  
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia  
Dirección General de Investigación (Digi)  
Programa Universitario de Investigación Interdisciplinaria en Salud

## Unidad de Biología Celular

Departamento de Bioquímica  
Facultad de Ciencias  
Químicas y Farmacia

# ACCIDENTE OFÍDICO

Elaborado por:  
Rosario Hernández, M. Sc.  
rosariodamarish@gmail.com

Patricia Saravia, Ph. D.  
psaravia02@gmail.com

Guatemala, agosto 2016



# 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, estimándose que ocurren 15 casos por 100,000 habitantes al año en Costa Rica, Guatemala, Nicaragua y Honduras, dato que posiblemente excluye los casos que no son registrados en los sistemas de salud.<sup>3</sup>

## Especies de importancia en la región y fisiopatología del envenenamiento

En Guatemala se reportan 21 especies de serpientes venenosas que pertenecen a las familias Elapidae y Viperidae.<sup>2</sup> En la familia Elapidae se incluyen especies de corales y la serpiente de mar.<sup>2</sup> Sus venenos, con efecto neurotóxico, afectan la región que une al músculo con el nervio, provocando parálisis muscular. Los efectos locales son poco evidentes, siendo más importantes los efectos generalizados o 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>

La familia Viperidae comprende a diversas especies de víboras,<sup>2</sup> incluyendo a la serpiente **barba amarilla** (*Bothrops asper*), la cual provoca la mayoría de accidentes ofídicos reportados.<sup>3</sup> El envenenamiento se caracteriza por presentar cuadros muy severos en sitio de la mordedura, observándose daños locales inmediatos: hinchazón, hemorragia, destrucción del tejido. También se producen efectos sistémicos: hemorragia sistémica, daño renal, shock hipovolémico. Ambos tipos de efectos pueden poner en riesgo la vida de la persona.<sup>2,5,6</sup>

Iniciamos el estudio de plantas guatemaltecas con actividad antifídica con un proyecto cofinanciado por el CONCYT en el que se realizó una encuesta etnobotánica que colectó información acerca de las plantas utilizadas en regiones en las que el accidente ofídico representa un problema importante.

## Tratamiento

El tratamiento es específico para la familia a la cual pertenece la serpiente (Elapidae o Viperidae). Esto hace muy valiosa 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> Medidas de las acciones normalmente recomendadas a realizar en caso de mordedura de serpiente (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 de accidente. Así mismo, deberá observarse al paciente durante y después del tratamiento; así como monitorarlo 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 antidotos contra la mordedura de serpiente, las cuales son utilizadas en regiones en las que el acceso inmediato a atención médica hospitalaria es difícil. Existen reportes de al menos 20 especies de plantas guatemaltecas usadas con ese propósito.<sup>8</sup>

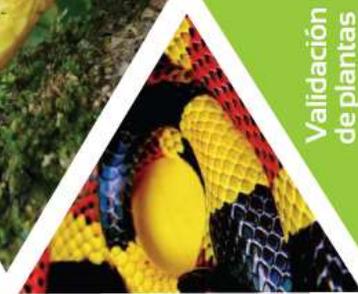
Esto hace necesario su estudio para determinar su efectividad para neutralizar los efectos del envenenamiento. De resultar efectivas, estas podrán utilizarse de forma segura para mejorar el tratamiento de emergencia del accidente ofídico. En caso contrario, es importante demostrar su limitación para prevenir que el paciente reciba un tratamiento inadecuado sin valor curativo o con efectos tóxicos.<sup>8</sup>

A lo evaluarse tres de las plantas detectadas (*D. contrajerva*, *N. lobata* y *E. odoratum*) se demostró que no neutralizaban los principales efectos tóxicos del veneno de *B. asper*.<sup>8</sup>

Recientemente se evaluó la capacidad de seis plantas para neutralizar in vitro los efectos fosfolipasa A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) y proteolítico del veneno de *B. asper*, los cuales son indicadores de su capacidad miotóxica, hemorrágica e inflamatoria. Se determinó que solo tres de ellas neutralizaban, en un bajo porcentaje, alguna de las actividades evaluadas (tabla 1).<sup>9</sup> Se concluyó que no es recomendable el uso aislado de estas plantas en el tratamiento del envenenamiento, aunque posiblemente puedan resultar potenciadas al usarse en conjunto con otras plantas, como se hace en las recetas tradicionales.

Este año se ha dado continuación al estudio, evaluándose la capacidad de las seis plantas para neutralizar las coagulopatías producidas durante el envenenamiento. Se agregaron tres nuevas plantas al estudio (*Eryngium foetidum*, *Bursera simaruba* y *Pimenta daica*), a las cuales se les evaluará su capacidad para neutralizar los tres efectos del veneno (proteolítico, PLA<sub>2</sub> y coagulante) con los ensayos de tamizaje implementados.

Geografía tomada del sitio electrónico del Instituto Guatemalteco de Medicina y Cirugía. [www.iguc.mec.gov.gt](http://www.iguc.mec.gov.gt)





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

28 de noviembre de 2016  
 REF.EQB.690.11.2016

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

DEPARTAMENTO DE TOXICOLOGIA  
 Centro de Información y Asesoría Toxicológica  
 Fac. de CC. QD. y Farmacia

**RECIBIDO**  
 28 NOV 2016

Hora 11:25 Firma

Estimada M.Sc. Guzmán:

Por este medio tenemos el gusto de hacerle entrega de 75 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.

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,  
 "¡D Y ENSEÑAD A TODOS!"

Dra. Patricia Saravia  
 Coordinadora  
 Unidad de Biología Celular

M.Sc. Rosario Hernández  
 Investigadora  
 Unidad de Biología Celular

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

cc. Archivo



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

Guatemala, 28 de octubre de 2016

REF.EQB:664.10.2016

M.Sc. Bessie Orozco  
 Supervisora de EPS de Química Farmacéutica  
 Programa de Experiencias Docentes con la Comunidad  
 Presente.

Estimada M.Sc. Orozco:

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

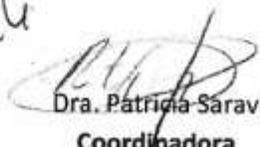
Estos trifoliales fueron elaborados con el apoyo de la Dirección General de Investigaciones (DIGI) de esta Universidad, con la finalidad de ponerlos a la disposición de personas e instituciones que puedan contribuir a la diseminación de la información, para que esta llegue a trabajadores de salud, curanderos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

Sabiendo que los estudiantes de la carrera de Química Farmacéutica durante la realización de su EPS, sobre todo en los hospitales nacionales, están a cargo de proveer información y asesoría en el uso de fármacos y antisueros, esperamos que los trifoliales puedan servirles de apoyo en su labor, que puedan distribuirlos en donde se necesiten y que de esta manera conjunta podamos contribuir al bienestar de la población afectada con este problema.

Sin otro particular, nos despedimos de usted,

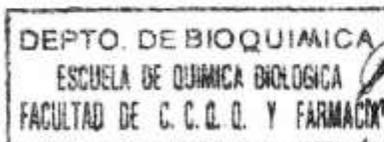
Atentamente,

"ID Y ENSEÑAD A TODOS"

*Recibido  
 28.10.16*  
  
 Dra. Patricia Saravia

Coordinadora

Unidad de Biología Celular



*Recibido*  
 Sc. Rosario Hernández

Investigadora

Unidad de Biología Celular

cc. Archivo



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

28 de noviembre de 2016

REF.EQB.691.11.2016

Licenciado  
 Marvin Rivera  
 Supervisor de EPS de Química Biológica  
 Programa de Experiencias Docentes con la Comunidad  
 Presente

Estimado Licenciado Rivera:

Por este medio tenemos el gusto de hacerle entrega de 75 trifoliales con información referente al accidente ofídico en Centroamérica, su fisiopatología, tratamiento convencional y alternativo, 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.

Sabiendo que durante la realización de su EPS, en hospitales nacionales y centros de salud del país, los estudiantes de la carrera de Química Biológica están a cargo de supervisar las pruebas de laboratorio que permiten dar seguimiento al envenenamiento ofídico, así como de proveer información y asesoría, esperamos que los trifoliales puedan servirles de apoyo en su labor, que puedan distribuirlos en donde se necesiten y que de esta manera conjunta podamos contribuir al bienestar de la población afectada con este problema de alto impacto socioeconómico en nuestro país.

Sin otro particular, nos despedimos de usted,

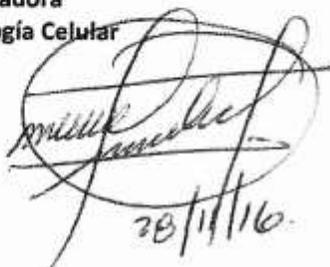
Atentamente,  
 "ID Y ENSEÑAR A TODOS"

  
 Dra. Patricia Saravia  
 Coordinadora  
 Unidad de Biología Celular

  
 M.Sc. Rosario Hernández  
 Investigadora  
 Unidad de Biología Celular

cc. Archivo

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

  
 28/11/16

### **8.3 Actividades de gestión y vinculación**

Se integró un equipo multidisciplinario (Unidad de Biología Celular, Depto. de Bioquímica, Lipronat, Depto. de Farmacognosia y Fitoquímica, Escuela de Química Farmacéutica y Depto. de Química Orgánica, Escuela de Química) de la Facultad de CCQQ y Farmacia, apoyados por expertos internacionales (Lic. Armando Cáceres, Farmaya y Dr. José Ma. Gutiérrez, Instituto Clodomiro Picado) en el tema, con el objetivo de validar científicamente plantas de uso etnomédico en la región, así como el aislamiento y caracterización de moléculas con actividad antiofídica.



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

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

REF.IIQB.031.01.2017

### CONSTANCIA

La Directora del Instituto de Investigaciones Químicas y Biológicas de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia hace constar que las personas que figuran a continuación, miembros del Personal Académico y de Investigación de la Facultad, fungen en calidad de Investigadores en el proyecto de Investigación **Neutralización de los efectos coagulante, fosfolipasa A2 y proteolítico del veneno de *Bothrops asper* por extractos de especies vegetales utilizadas en la medicina tradicional centroamericana, partida No. 4.8.63.1.82**, cofinanciado por la Dirección General de Investigación -DIGI- ejecutado durante el 2016.

Dra. Patricia Saravia, Coordinadora e Investigadora  
M. Sc. Rosario Hernández, Investigadora asociada  
Dra. Sully Cruz, Investigadora asociada  
M. Sc. Nereida Marroquín, Investigadora asociada  
Licda. Nohemí Orozco, Investigadora asociada  
Licda. Gabriela García Hernández, investigadora Titular  
Lic. Max Mérida, investigador Titular  
Br. Libny Pernillo, Auxiliar de Investigación.

A solicitud de los interesados se extiende la presente constancia a los veintitrés días del mes de enero del 2017.

*"Id y Enseñad a Todos"*

  
Dra. Karin Larissa Herrera Aguilar  
Directora



Instituto de Investigaciones Químicas y Biológicas

KLHA/tvch.  
c.c.archivo

Como parte del proceso de integración del equipo multidisciplinario se desarrollaron capacitaciones en las cuales participaron investigadores y estudiantes. Las capacitaciones fueron en la técnica de desclorofilación de extractos vegetales (Lipronat), determinación de actividad proteolítica y evaluación de actividad intrínseca de un extracto vegetal (Unidad de Biología Celular), colecta y secado de material vegetal (actividad realizada en campo, a cargo del Lic. Max Mérida), extracción etanólica (Lipronat).

Guatemala, 29 de febrero de 2016

Por este medio se hace constar que el Laboratorio de Investigación de Productos Naturales – LIPRONAT- realizó la capacitación de

“PROCESO DE DESCLOROFILACIÓN DE EXTRACTOS VEGETALES”

con una duración de cuatro horas de trabajo efectivo, impartido el 18 de febrero del presente año, por la Licda. Nereida Marroquín para los integrantes del proyecto “NEUTRALIZACIÓN DE LOS EFECTOS COAGULANTE, FOSFOLIPASA A2 Y PROTEOLÍTICA DEL VENENO *Bathrops asper* POR EXTRACTOS VEGETALES UTILIZADOS EN LA MEDICINA TRADICIONAL CENTROAMERICANA”.

Dra. Patricia Saravia

Coordinadora del Proyecto de Investigación

M.Sc. Rosario Hernández

Jefa del Departamento de Bioquímica

Facultad de CCQQ y Farmacia

USAC

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



Universidad de San Carlos de Guatemala  
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia  
Laboratorio de Investigación de Productos Naturales  
-LIPRONAT-



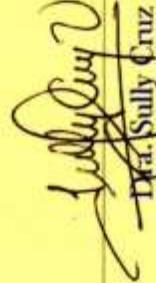
Otorga el presente diploma a:

**Dra. Patricia Saravía**

Por haber participado en la capacitación de procesos de desclorofilación de extractos vegetales con una duración de 4 horas en el Laboratorio de Investigación de Productos Naturales -LIPRONAT-

Dado en la ciudad de Guatemala, el 18 de febrero de 2016



  
Dra. Sully Cruz

Coordinadora LIPRONAT



Universidad de San Carlos de Guatemala  
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia  
Laboratorio de Investigación de Productos Naturales  
-LIPRONAT-



Otorga el presente diploma a:

Licda. Rosario Hernández

Por haber participado en la capacitación de procesos de desclorofilación de extractos vegetales con una duración de 4 horas en el Laboratorio de Investigación de Productos Naturales -LIPRONAT-

Dado en la ciudad de Guatemala, el 18 de febrero de 2016



-LIPRONAT-  
Laboratorio de Investigación  
de Productos Naturales

Dra. Sully Cruz

Coordinadora LIPRONAT



# USAC

*"id y enseñad a todos"*

El proyecto "Neutralización de los efectos coagulante, fosfolipasa A2 y proteolítica del veneno de *Bothrops asper* por extractos vegetales utilizados en la medicina tradicional centroamericana"

(4.8.63.1.82)

Otorga el presente diploma a

*Libny Pernillo*

Por su participación en la capacitación del ensayo bioquímico para la determinación de actividad proteolítica y evaluación de la actividad intrínseca de un extracto vegetal.

Realizada el 11 de mayo del 2016 en el Laboratorio de Análisis de Proteínas –LAP- con una duración de cuatro horas de trabajo efectivo.

MSc. Rosario Hernández  
Investigadora Asociada

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

Dra. Patricia Saravia  
Coordinadora del Proyecto de Investigación

Se dio continuidad a la relación colaborativa previamente establecida con el Instituto Clodomiro Picado de la Universidad de Costa Rica. Como parte de la colaboración, el ICP donó veneno de *B. asper* liofilizado para los experimentos. Así mismo, se recibió asesoría del Dr. José Ma. Guitérrez para la realización de las pruebas de coagulación y anticoagulación.

Gestión ante la DIGI, para obtener apoyo en el diseño e impresión de los 500 trifoliales informativos del proyecto.

Gestión ante el IIQB, para obtener el apoyo en el diseño del póster presentado en la Feria Científica 2016, así como ante la DIGI para obtener el apoyo en la impresión del mismo.

**EQUIPO DE INVESTIGADORES**

Contratados por unidad avaladora	Otros colaboradores
Dra. Patricia Saravia Otten	Lic. Armando Cáceres
M.Sc. Rosario Hernández	Dr. José María Gutiérrez
Dra. Sully Cruz	
Licda. Nereida Marroquín	
Licda. Nohemí Orozco	

Contratados por la Dirección General de Investigación					
Nombre	Categoría	Registro de personal	Pago DIGI		Firma
			SI	NO	
Dra. Patricia Saravia	Coordinadora	971022		X	
Lic. Max Mérida	Investigador titular I	20060419		X	
Licda. Gabriela García	Investigadora titular I	20121088	X		
Br. Libny Pernillo	Auxiliar de investigación II	20140512		X	

Fecha de entrega: 28 de febrero de 2017

Dra. Patricia Saravia Otten

Nombre coordinador del proyecto de investigación

Firma

Dra. Hilda Valencia de Abril

Vo. Bo. Nombre coordinador del Programa Universitario

Firma

Ing. Rufino Salazar

Vo. Bo. Nombre coordinador general de Programas

Firma