

EVALUACIÓN BIOLÓGICA PRELIMINAR DE EXTRACTOS VEGETALES UTILIZADOS EN LA MEDICINA TRADICIONAL DE LA SIERRA NEVADA DE SANTA MARTA CONTRA EL VENENO DE LA *BOTHROPS ASPER*

PRELIMINARY BIOLOGICAL EVALUATION OF PLANTS EXTRACTS USED IN THE SIERRA NEVADA DE SANTA MARTA AGAINST THE SNAKE *BOTHROPS ASPER* VENOM

Willinton Barranco Pérez*, Vitelbina Nuñez** y Mauricio Sanchez***

RESUMEN

La mordedura de serpientes constituye un problema de salubridad importante en muchos países tropicales y subtropicales, con un estimado de 2,5 millones de personas envenenadas cada año. En Colombia las especies *Bothrops asper* y *Bothrops atrox* son las causantes del 70 al 90 % de los accidentes registrados. Se estima que el 60 % de estos accidentes son inicialmente tratados por curanderos tradicionales utilizando plantas medicinales en diferentes preparaciones. Este estudio evaluó la capacidad inhibitoria de cinco especies contra el efecto proteolítico y hemolítico indirecto inducido por el veneno de *B. asper* en ensayos *in vitro*.

Las especies, que fueron seleccionadas de acuerdo a su uso en la medicina tradicional por parte de las comunidades campesinas de la Sierra Nevada de Santa Marta, fueron, *Aristolochia máxima*, *Cissampelos pareira*, *Equisetum bogotense*, *Mucuna pruriens* y una especie de la familia Asteraceae. La planta *E. bogotense* mostró los mayores porcentaje de inhibición contra la actividad de las fosfolipasas A_2 (42,29 %), así como la mayor precipitación de las proteínas en un rango de masas moleculares de 28,2 y 94,43 kDa. Al fraccionar el extracto de *E. bogotense* se obtuvieron cinco fracciones, las cuales presentaron un porcentaje de inhibición de $36,6 \pm 1,07$ a $46,1 \pm 13,6$. Adicionalmente se detectaron por métodos cualitativos núcleos como, alcaloides, esteroides y/o triterpenos, taninos, cumarinas y leucoantocianidinas. En estudio se reporta la actividad antiofídica en ensayos *in vitro* de la especie *E. bogotense* contra el veneno de la especie *B. asper*. (DUAZARY 2012 No. 2, 140 - 150)

Palabras clave: *Bothrops asper*, plantas antiofídicas, Fosfolipasa A_2 .

ABSTRACT

In Colombia the species *Bothrops asper* and *Bothrops atrox* are responsible for 70 to 90% of the snakebite accidents. Around 60% of these injuries are initially treated by traditional healers; they're used medicinal plants in different preparations. This study evaluated the inhibitory capacity in five vegetables species against proteolytic and hemolytic

*Profesor Catedrático, Universidad del Magdalena Wbarranco66@yahoo.es, Facultad de Estudios Generales. Biólogo, MSc. Carrera 32 No. 22-08, Sector San Pedro Alejandrino. Grupo de Investigaciones, Biodiversidad, Uso y Conservación, Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín.

**Profesora Asociada, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Antioquia.

***Profesora Asociada, Facultad de Ciencias Agropecuarias. Grupo de Investigaciones, Biodiversidad, Uso y Conservación, Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín.



indirect effect induced by the venom of *B. asper* in vitro. The species that were selected according to their use in traditional medicine by the rural communities of the Sierra Nevada de Santa Marta are: *Aristolochia maxima*, *Cissampelospareira*, *Equisetum bogotense*, *Mucunacpruriens* and *Austroeupatoriuminulaefolium*. *E. bogotense* showed the highest percentage of inhibition in opposition to the activity of Phospholipases A2 (42.29%), also the higher precipitation of proteins in a range of molecular weights from 28.2 to 94.43 KDa. Fractionating the extract of *E. bogotense* we obtained five fractions, which showed an inhibition percentage from 36.6 ± 1.07 to 46.1 ± 13.6 . Additionally, we detected some nucleus by qualitative methods, principally alkaloids, steroids and/or triterpenes, tannins, coumarins and leucoanthocyanidins. In the study reported activity in vitro assays of the species *E. bogotense* against the venom of the species *B. asper*.

Keywords: *Bothrops asper*, against the snake plants, phospholipases A2.

INTRODUCCIÓN

La mordedura de serpiente constituye uno de los problemas de salubridad más importante en numerosos países tropicales y subtropicales, con un estimado de 2,5 millones de personas envenenadas cada año¹. En nuestro país, las especies *Bothropsasper* y *Bothropsatrox* son las causantes del 70 al 90 % de los accidentes registrados^{2,3}, y sus venenos inducen efectos locales y sistémicos que ponen en peligro la vida humana^{4,6}. La seroterapia o administración intravenosa de inmunoglobulinas equinas u ovinas, descubierta hace más de 100 años^{7,8}, es el principal tratamiento contra el envenenamiento por mordedura de serpientes, pero su acción tiene una eficiencia limitada en la neutralización de efectos locales como hemorragia, edema y mionecrosis⁹⁻¹².

En Colombia, el 60 % de los accidentes causados por mordeduras de serpientes son inicialmente tratados por curanderos tradicionales, los cuales utilizan plantas medicinales en diferentes formas¹³. La utilización frecuente de plantas para el tratamiento antiofídico se debe a la localización distante y las dificultades geográficas de los lugares vulnerables al accidente. Además, la producción y distribución de sueros o antivenenos es insuficiente y no hay disponibilidad del producto en todas las comunidades e instituciones de salud encargadas¹⁴. En el país los estudios realizados para evaluar tratamientos alternativos se vienen desarrollando en los departamentos de Antioquia y

Chocó, en los cuales se registraron 101 plantas utilizadas como antiofídicas por comunidades locales¹⁵. Por medio de la evaluación de 75 de estas se detectó en 31 especies, actividad para neutralizar el veneno de *B. asper*¹⁶. En uno de los estudios más recientes se evaluó la actividad de 12 plantas (*Bixaorellana*, *Ficus nymphaeifolia*, *Struthanthusorbicularis*, *Gonzalaguniapanamensis*, *Brownearosademonte*, *Tabebuia rosea*, *Pleopeltispercussa*, *Trichomaneselegans*, *Renalmiaalpinia*, *Heliconia curtispatha*, *Dracontiumcroatii* y *Citrus limon*) contra la formación de edema, defibrinación y efecto anticoagulante del veneno de *Bothropsasper*, obteniéndose en todos los casos neutralización parcial de la formación de edema entre el 58 al 76 %. Asimismo, en este estudio 10 especies presentaron un porcentaje de neutralización del 100 % del efecto defibrinante y nueve incrementaron el tiempo de coagulación inducido por el veneno¹⁴. Por otra parte, en la Sierra Nevada de Santa Marta se identificaron 26 especies de plantas usadas como antiofídicas por la etnia Kogui¹⁷, de estas solo se evaluaron *Aristolochiaanguicida* y *Mucunapruriens* contra el veneno de *B. atrox*, las cuales presentaron neutralización de la actividad hemolítica¹⁸.

Dado todo lo anterior, se da la necesidad de buscar alternativas e investigar acerca de inhibidores de los efectos ocasionados a nivel local por el veneno de las serpientes, como la necrosis y la pérdida de tejidos afectados. Dichas opciones pueden ser útiles para complementar la terapia convencional de antivenenos¹⁹. Es así, como el objetivo de este estudio fue el de evaluar la capacidad inhibitoria contra el veneno de *B. asper*, de

los extractos vegetales de cinco especies seleccionadas, de acuerdo al uso dado por comunidades campesinas de la Sierra Nevada de Santa Marta.

MATERIALES Y MÉTODO

MATERIAL VEGETAL

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

PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS

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

VENENOS Y REACTIVOS

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

EFEECTO INHIBITORIO DE ACTIVIDAD DE FOSFOLIPASAS A₂

1 mL de yema de huevo (sustrato) se le agregaron 100 µL de una mezcla variable de cada extracto con 20 µg del veneno, esto fue incubado a 37° C por 30 minutos. Después, se le agregó una mezcla de extracción con hexano para de extraer los ácidos grasos liberados, los cuales fueron titulados con NaOH 0,018 N y azul de timol en etanol como indicador. Cada prueba fue replicada tres veces y los resultados fueron expresados como promedios, se expresan como porcentaje de inhibición, asumiendo un 100% de actividad en el control positivo (veneno de *B. asper*). Esta misma prueba se realizó para la especie *E. bogotense* una vez fraccionada.

ELECTROFORESIS SDS-PAGE

La electroforesis fue realizada sobre geles de poliacrilamida al 15 % en condiciones no reducidas, como lo describe Laemmli²⁰. Se incubaron 40 µg de veneno con 400 µg de cada extracto (relación 1:20) durante 30 minutos a 37° C. Posteriormente, las muestras se corrieron en la cámara Mini Protean-II® (Bio Rad) durante 60 minutos a 150 voltios. El veneno y los extractos fueron incubados en los mismos tiempos y corridos en las mismas condiciones. Las proteínas fueron coloreadas empleando azul Coomssie R 250, esta prueba permite evidenciar grandes cambios en las proteínas del veneno cuando éste es pre-incubado con los extractos.

INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD HEMOLÍTICA INDIRECTA EUISETUM BOGOTENSE

Se utilizó el método de agarosa-yema de huevo-eritrocitos, descrito por Gutiérrez y colaboradores¹¹. Se determinaron como dosis hemolítica indirecta mínima (DHIm) del veneno de *B. asper*, aquellas fracciones de *E. bogotense* que generaron un halo de hemólisis de 20 mm de diámetro después de 20 horas de incubación. Los ensayos de inhibición se llevaron a cabo incubando mezclas de cantidades variables de cada extracto con una DHIm del veneno a 37° C por 30 minutos. Los experimentos fueron realizados por triplicado y solo en los extractos fraccionados de la especie que presentó mayor inhibición.

ACTIVIDAD CITOTÓXICA DEL EXTRACTO DE EQUISETUM BOGOTENSE

En este ensayo se utilizó la línea celular C2C12 de mioblastos de músculo esquelético de ratón. Estas células fueron mantenidas en un medio de crecimiento, DME (Medio de Tagle modificado por Dulbecco), suplementado con suero fetal bovino (SBF) al 15 %. La cuantificación de la citotoxicidad se realizó adicionando 150 μ L de medio de ensayo (DME con 1 % SBF) con concentraciones variables de fosfolipasas A₂ (PLA₂) del veneno de *B. asper* a células cultivadas en platos de 96 pozos. Después de 3 h de incubación a 37° C, se tomaron muestras de sobrenadante y se midió la actividad de la enzima deshidrogenada láctica (LDH; EC1.1.127) liberada, utilizando un método cinético (sigma N500)⁹. Los experimentos de inhibición se llevaron a cabo mediante preincubación de la toxina con los extractos previos a su adicción a las células y por triplicado.

ANÁLISIS FITOQUÍMICO Y FRACCIONAMIENTO DE LA ESPECIE EQUISETUM BOGOTENSE

El análisis fitoquímico preliminar de los extractos para la detección de metabolitos secundarios, se efectuó de acuerdo con los métodos propuesto por Sanabria & Domínguez^{21, 24}. Se hicieron pruebas para la detección de alcaloides, esteroides y/o terpenoides, flavonoides, naftoquinonas, antroquinonas, saponinas, taninos y cumarinas. Para la especie con actividad más promisoría, se realizó un fraccionamiento en columna utilizando Sephadex LH-20 como fase sólida. El extracto se eluyó de forma isocrática con hexano: diclorometano: metanol

(5:3:1). Para detectar el perfil cromatográfico de las fracciones, se corrieron placas de silica gel (capa fina), con sistemas de solventes de diferente polaridad tales como, hexano: acetona (3,5:1,5), hexano: acetato de etilo (4:1) y diclorometano: metanol (4:1). Posteriormente, las placas fueron visualizadas usando revelador universal (H₂SO₄ 10 %).

ANÁLISIS DE LOS DATOS

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

RESULTADOS

EFFECTO INHIBITORIO DE ACTIVIDAD DE FOSFOLIPASAS A₂

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

Tabla 1. Porcentaje de Inhibición de la actividad enzimática PLA₂ del veneno de *B. asper* evaluado por el método Dole, 1956.

Ensayos	Extractos crudos				
	maxima	pareira	<i>E. bogotense</i>	<i>M. pruriens</i>	inulaefolium
% inPLA ₂ (Dole)	11,54 \pm 9,4	28,85 \pm 34,0	42,29 \pm 9,4	17,28 \pm 16,3	15,34 \pm 0,0

Los resultados se presentan como la media \pm SEM del porcentaje de inhibición de ensayos llevados a cabo por triplicado. % inPLA₂: Porcentaje de inhibición de la fosfolipasa.

ELECTROFORESIS DE LOS EXTRACTOS VEGETALES

Para la electroforesis del veneno de *B. asper* y los extractos vegetales (Figura 1), se puede observar que en *E. bogotense* causa una posible precipitación de las proteínas en un rango de masas moleculares 28,2 y 94,43 KDa aproximadamente (Figura 1, carril 7).

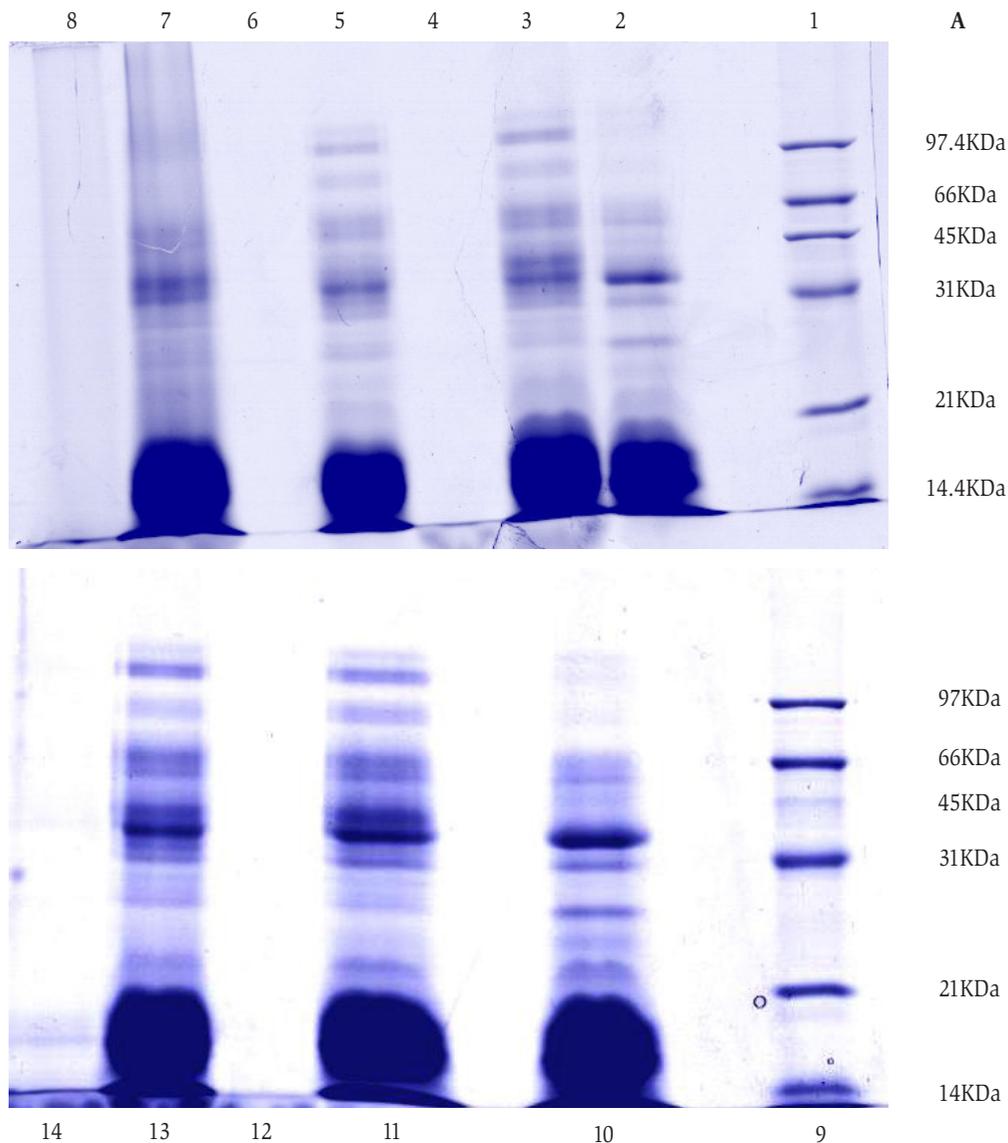


Figura 1. Extractos vegetales. A. 1: Marcador de peso molecular, 2: Veneno, 3: *C. pareira* + Veneno, 4: *C. pareira*, 5: *A. maxima* + veneno, 6: *A. maxima*, 7: *E. bogotense* + veneno, 8: *E. bogotense*, 9: Marcador de peso molecular, 10: Veneno, 11: *M. pruriens* + Veneno, 12: *M. pruriens* + veneno,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

FRACCIONAMIENTO DE *EQUISETUM BOGOTENSE*

La especie *E. bogotense*, fue seleccionada para proseguir con otros ensayos, por tener el mejor porcentaje de inhibición de la actividad inhibitoria de las PLA₂ (Tabla 2). El extracto etanólico de esta especie fue fraccionado y se obtuvieron cuatro fracciones que fueron nombradas como F1-F4.

EFFECTO INHIBITORIO DE ACTIVIDAD DE FOSFOLIPASAS A₂, EN FRACCIONES DE *EQUISETUM BOGOTENSE*

Del total de fracciones obtenidas de *E. bogotense*, la fracción F2, presentó el porcentaje de inhibición del efecto de las PLA₂ más alto (46,1 ± 13,6). Las cinco fracciones evaluadas no presentaron diferencias significativa (p < 0,05) (Tabla 2).

Tabla 2. Porcentaje de inhibición de la actividad enzimática PLA₂ del veneno de *B. asper*

Fraccionamiento de <i>E. bogotense</i>					
Ensayos	E.C	F1	F2	F3	F4
% de INH PLA ₂ (Dole)	44,4 ± 7,6	40,4 ± 0,27	46,1 ± 13,6	40,4 ± 19,1	36,6 ± 1,07

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

INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD HEMOLÍTICA INDIRECTA, EN FRACCIONES DE *EQUISETUM BOGOTENSE*

La fracción F1 fue la que presentó mayor efecto inhibitorio (22,45 %) contra la actividad hemolítica indirecta inducida por los venenos de *B. asper*, mientras que la fracción F4 no mostró capacidad neutralizante (Figura 2).

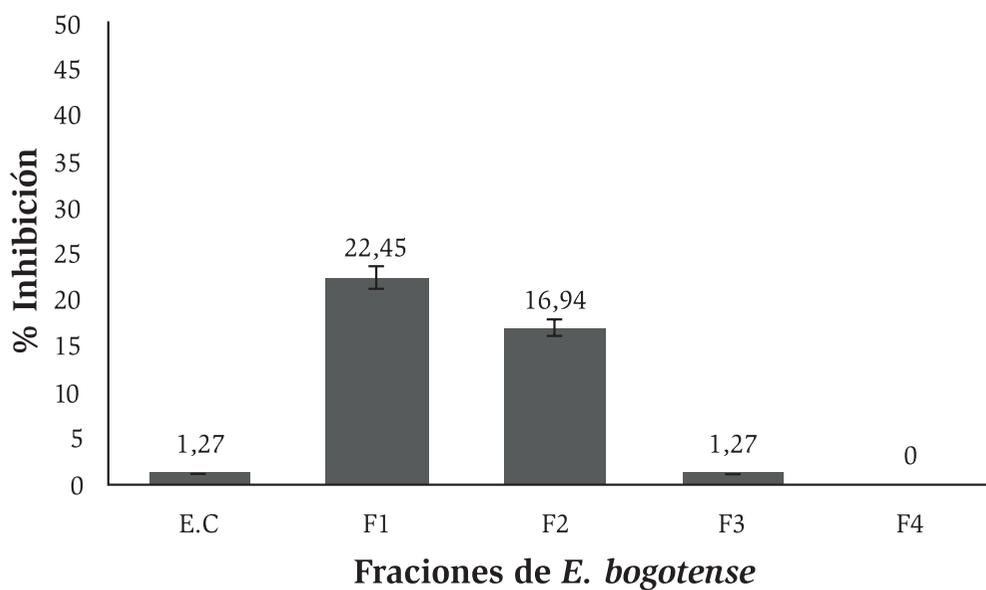


Figura 2. Porcentaje inhibición de la actividad hemolítica indirecta del veneno de *B. asper*. E.C: Extracto crudo, F1-F4: fracciones obtenidas del extracto vegetal.

CITOTOXICIDAD DE LAS FRACCIONES DE *E. BOGOTENSE*

En esta prueba, la fracción uno presentó el mayor porcentaje (31,8 %) de citotoxicidad. Por otra parte, las fracciones fracción cuatro y el extracto crudo (E.C.) no presentaron citotoxicidad, comparado con el veneno que registra el 100% de citotoxicidad (Figura 3).

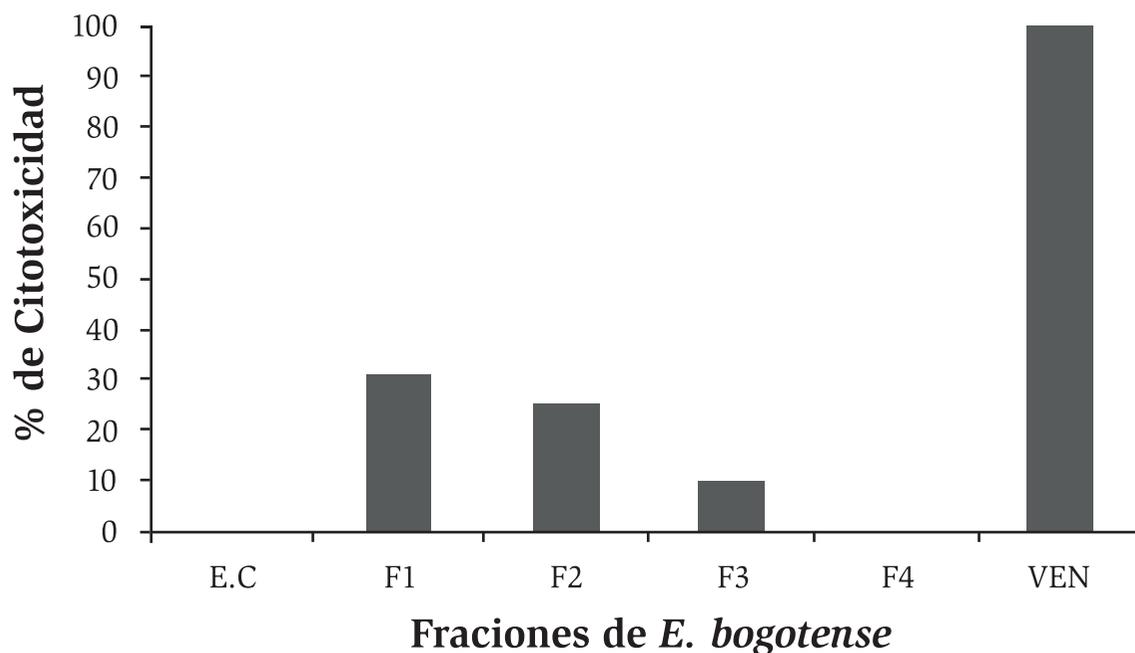


Figura 3. Porcentaje de citotoxicidad de las fracciones de *E. bogotense*. E.C: Extracto crudo, F1-F4: fracciones obtenidas del extracto vegetal. VEN: Veneno

ANÁLISIS FITOQUÍMICO PRELIMINAR DE *E. BOGOTENSE*

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

Tabla 3. Marcha fitoquímico de *Equisetum bogotense*. (Método propuesto por Sanabria 1983 & Domínguez 1979)

Metabolitos secundario	<i>E. bogotense</i>
Alcaloides	+
Esteroides y/o triterpenos	+
Flavonoides	-
Taninos	+
Cumarinas	+
Antocianidinas	-

Metabolitos secundario	<i>E. bogotense</i>
Cardiotónicos	-
Saponinas	-
Leucoantocianidinas	+
Nafto y nastroquinonas	-

DISCUSIÓN

De los resultados obtenidos, se encontró que la especie *E. bogotense* fue la más promisoría en cuanto a su porcentaje de inhibición de la actividad de la fosfolipasa A₂ del veneno de *B. asper* con respecto a las demás especies evaluadas (Tabla 1). Lo anterior es relevante, considerando que esta especie es registrada y evaluada por primera vez como antiofídica. A su vez, esta especie se ha evaluado como una opción a nivel clínico para pacientes con problemas renales²⁵. En cuanto a la actividad inhibitoria de las PLA₂, en la literatura se encuentran reportes de estudios con valores inhibitorios similares a *E. bogotense*, utilizando el método de Dole²² y la especie *Tabernaemontana catharinenses*, registrándose valores superiores al 40 % de inhibición contra el veneno de la *B. jararacussu*²⁶.

Por otra parte, para las especies *A. máxima* y *M. pruriens* los porcentajes de inhibición obtenidos en este trabajo, fueron bajos, comparados con otros estudios realizado con las mismas especies, en uno de estos reportes los extractos presentaron un porcentaje de inhibición superior al 60 % en la actividad de la PLA₂ del veneno de la *B. asper*, evaluadas por el método de actividad hemolítica indirecta¹⁸. Igualmente, otros ensayos realizados en la especie *M. pruriens* mostraron porcentajes superiores al 60 % contra el veneno de serpiente de familia Viperidae y Elapidae^{27, 28}. Es posible que los bajos porcentajes de inhibición obtenidos en este estudio se deban a otros factores que influyen en la composición química de las plantas presentando cambios en su metaboloma, como el lugar biogeográfico de procedencia, condiciones del suelo y el ambiente, época de recolección, entre otras²⁹.

Por otro lado, los resultados obtenidos con *E. bogotense*, en cuanto a la inhibición de las PLA₂, presenta un comportamiento importante en la prueba de la electroforesis. En esta prueba se evidenció una precipitación de las proteínas del veneno en un rango de

masa molecular de 28,2 y 94,43 KDa aproximadamente con el extracto de *E. bogotense*, (Figura 1, carril 7) mientras que esta precipitación no se dio con el resto de los extractos evaluados en el SDS-PAGE.. Resultados similares se han registrado en especies de la familia Heliconiaceae, en las cuales se presentaron reducciones en la intensidad de las proteínas del veneno en un rango de 26,8 y 70,7 KDa en cuanto a las masas moleculares de las proteínas, obteniéndose en consecuencia, una inhibición de actividad hemolítica indirecta del veneno del *B. asper*(30). Estos resultados contrastan con los reportados al evaluar el efecto proteolítico sobre caseína inducido por el veneno de *P. nasutum*, con extractos de *V. vinifera* en una relación 1:10 presentando un poder neutralizante de (71,46 ± 5,38), estos resultados dependieron de la cantidad de extracto utilizado, la diferencias en los resultados para estos estudios se puede deber a las cantidades de extractos en las relaciones extracto - veneno que se emplearon³⁰.

Al evaluar las fracciones del extracto de *E. bogotense* contra la actividad de la fosfolipasa A₂ del veneno de *B. asper*, no se presentaron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre las fracciones (Tabla 2). Igualmente, el fraccionamiento del extracto crudo de la especie no presenta un aumento significativo en porcentaje de inhibición. El porcentaje de inhibición, mantiene una tendencia homogénea (rango 36,6 - 46,1 %), en cuanto a la neutralización el veneno en esta prueba, lo cual se deba posiblemente al sinergismo que hay entre los compuestos³¹. Porcentajes similares fueron hallados en muestras de la especie *Eclipta prostrata* después de su fraccionamiento, con las cuales se registraron porcentajes de inhibición del 50-58 %, manteniendo una tendencia en conservar los porcentajes de inhibición al evaluar el extracto crudo o sus fracciones³².

En cuanto a la actividad hemolítica indirecta, las fracciones de la especie *E. bogotense* presentaron porcentajes bajos del efecto de inhibición comparados con las fracciones evaluadas en otros estudios³³. Sin

embargo, la fracción F1 presentó algún tipo de actividad inhibitoria para esta prueba (Figura 2). La prueba de toxicidad mostró efecto en las fracciones F1-F3, pero no en el extracto crudo E.C. (Figura 3), probablemente esto se deba a la cantidad de metabolitos presentes que pueden enmascarar el efecto tóxico. La presencia de toxicidad en las fracciones que han presentado actividad resulta muy frecuente cuando se buscan moléculas bioactivas en productos naturales, ya que estas deben ser modificadas para utilizarlas como plantillas en la obtención sintética de nuevos núcleos que registren una mayor actividad biológica y menor toxicidad³⁴.

El análisis fitoquímico preliminar de *E. bogotense* evidenció la presencia de esteroides y/o triterpenos, taninos, alcaloides, cumarinas y leucoantocianidinas, resultados similares en esta especie han sido confirmados en la literatura, en donde se detectó la presencia de β -sitosterol, flavonoides, cumarinas y alcaloides²⁵. La caracterización preliminar de los núcleos presentes en las especies activas, es relevante ya que puede dar una idea de los metabolitos responsables de la actividad biológica contra el veneno de *B. asper*²⁸. En este sentido, se han encontrado reportes de los metabolitos presentes en *E. bogotense* en los cuales se ha observado cierta actividad contra las PLA₂. En uno de estos estudios se encontró que los esteroides como el, β -sitosterol y el estigmasterol de la especie *Eclipta prostrata* contrarrestaron la toxicidad del veneno de *Crotalus durissus* en ratones³⁵. Asimismo, se observó la presencia de taninos y polifenoles en la especie *Musa paradisiaca*, los cuales fueron evaluados tanto por separados, como en una mezcla, para probar su efecto contra la actividades miotóxica y hemorrágica del veneno de *Crotalus* sp., en ratones³⁶. Además, en cuanto a la presencia de cumarinas, pro-antocianidinas y leucoantocianidinas detectadas en *E. bogotense*, se puede relacionar con los resultados obtenidos en *Crotonuru curana*, frente al veneno de *B. jararaca*. Estos núcleos fueron antagonistas de la acción hemorrágica y fuertes inhibidores de las metaloproteínas del veneno botrópico³⁷. Por otro lado, en la especie *Mucunapruriens* se registraron alcaloides que presentaron alta eficacia contra el veneno de serpientes de la familia Viperidae y Elapidae³⁸.

Los resultados de este estudio demuestran que la especie *E. bogotense* presenta un potencial para la neutralización del veneno de *B. asper* en ensayos in vitro, además sus fracciones no presentan alta toxicidad. Se hacen necesarios estudios Fitoquímico que identifiquen

los metabolitos que son responsables de la actividad inhibitoria, además, ensayos biológicos que verifiquen el potencial de la especie como agentes terapéutico o coayudantes para contrarrestar los efectos del accidente ofídico.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín; a los PhD, Mauricio Sánchez, Tatiana Lobo y a la Dirección de investigaciones sede Medellín (DIME) por la financiación del proyecto; a la Fundación Prosierra Nevada de Santa Marta por la cofinanciación; a Armando Calvano y Yadira Tinoco. A la Universidad de Antioquia, en especial a los grupos de Ofidismo y escorpionismo, a la PhD Vitelbina Núñez; (Ingeniera Química Maritza Culma y al M.Sc Juan Carlos Quintana) al grupo de investigación de Química orgánica de productos naturales (PhD, Luis Fernando Echeverri López y Edwin Correa); a la Universidad del Magdalena, al Herbario (UTMC), al M.Sc Eduino Carbono al biólogo Héctor García Quiñonez y Elda Garrido, al M.Sc Jeiner Castellanos Barliza por el aporte significativo para realizar este trabajo. Un reconocimiento especial a los informantes que son la fuente de todo el conocimiento tradicional: las comunidades campesinas de Pueblo Bello (Cesar); las Casitas Juan y medio, Moreneros (Guajira); y San Pedro de la Sierra (Magdalena).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Chippaux, J.P. Snake-bites: appraisal of the global situation. Bull. World Health Organization. 1998; 75:515-14.
2. Silva J. Las serpientes del genero Bothrops en la Amazonia Colombiana. Aspectos biomédicos (Epidemiología, clínica y biología del ofidismo). Acta Médica Colombiana. 1989; 14:148-65.
3. Otero R. Manual de Diagnóstico y Tratamiento del Accidente Ofídico. Editorial Universidad de Antioquia, Medellín. 1994; 32 p.
4. Otero R, Tobón GS, Gómez LF, Osorio RG, Valderrama D, Urreta JE, Molina S, Arboleda JJ. Accidente ofídico en Antioquia y Chocó. Aspectos clínicos y epidemiológicos (Marzo de 1989- febrero de 1990). Acta Médica Colombiana. 1992; 17: 229-29.
5. Gutierrez JM. Clinical toxicology of snakebite in Central America. In: Meier, J. and White J (Editors.), Handbook of Clinical Toxicology of Animal Venoms and Poisons. Boca Raton, F1: CRC Press. 1995; Pp 645-65.

6. Otero R, Osorio RG, Valderrama R, Giraldo CA. Efectos farmacológicos y enzimáticos de los venenos de serpientes de Antioquia y Chocó (Colombia). *Toxicon*. 1992; 30 (5-6): 611-20.
7. Warrel DA. Clinical toxicology of snakebite in Africa and the Middle East/Arabianpeninsula. In: Meier J, White J (Editors.), *Handbook of Clinical Toxicology of Animal Venoms and Poissons*, Boca Raton, CRC Press. 1995; Pp 433-92.
8. Bon C. The serum - therapie was discovered 100 years ago. *Toxicon*. 1996; 34: 142-43.
9. Lomonte B, Lungren J, Johansson B, Bagge U. The dynamics of local tissue damage induced by *Bothropsaspersnake* venom and myotoxin II on the mouse cremaster muscle: an intravital and electron microscopic study. *Toxicon*. 1994; 32: 41-55.
10. Gowda TV. Interaction of snake venom phospholipases A2 with plant isolates. En: Kini RM, editor. *Venom Phospholipase A2 Enzymes*. Chichester: Willey. 1997; Pp 205-21.
11. Gutiérrez JM, Ávila C, Rojas E, Cerdas L. An alternative *in vitro* method for testing the potency of the *polyvalent antivenom produced in Costa Rica*. *Toxicon*. 1988; 26 (4): 411-13.
12. Melo PA, Ownby CL. Ability of wedelolactone, heparin, and p-bromophenacyl bromide to antagonize the myotoxic effects of two crotaline venoms and their PLA2 myotoxins. *Toxicon*. 1999; 37: 199-215.
13. Otero R, Núñez V, Jiménez SL, Fonnegra R, Osorio RG, García ME. Snakebites and ethnobotany in the northwest region of Colombia: Part I: Traditional use of plants. *Journal of Ethnopharmacology*. 2000^a; 71 (3): 493-504.
14. Núñez V, Castro V, Murillo R, Ponce-Soto LA, Merforf I. 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*. 2005; 66 (9): 1017-025.
15. Nuñez V, Otero R, Barona J, Saldarriaga M, Osorio RG, Fonnegra R. Neutralization of the edema-forming, defibrinating and coagulant effects of *Bothropsasper* venom by extracts of plants used by healers in Colombia. *BrazilJournal Medical Biology*. 2004; 37: 969-77.
16. Otero R, Núñez V, Barona J, Fonnegra R, Jiménez SL, Osorio RG. Snakebites and ethnobotany in the northwest region of Colombia. Part III: Neutralization of the haemorrhagic effect of *Bothropsatrox* venom. *Journal of* . 2000c; 73 (1-2): 233-41.
17. Carbono E. Estudios Etnobotánicos entre Los Koguis de la Sierra Nevada De Santa Marta. Tesis de grado. Universidad nacional de Colombia. Fundación Prosierra Nevada de Santa Marta. 1987; Pp 12-38.
18. Barranco W. Evaluación de las plantas utilizadas contra el veneno de serpientes en el Departamento del Magdalena, Colombia. Tesis de grado Universidad Del Magdalena. 2005; Pp 22-37.
19. Oliveira CZ, Maiorano V, Marcussi S, Santana CD, Januário AH, Lourenco MV, Sampaio SV, Franca SC, Pereira PS, Soares AM. Anticoagulant and antifibrinogenolytic properties of the aqueous extract from *Bauhinia forficata* against snake venoms. *Journal of Ethnopharmacology*. 2005; 98:213-16.
20. Sanabria A. Análisis fitoquímico preliminar. Bogotá: Departamento de Farmacia. Universidad Nacional de Colombia. 1983.
21. Domínguez XA. Métodos de investigación fitoquímica. México. Limusa. 1979.
22. Dole VP. Relation between non-sterified fatty acids in plasma and metabolism of glucose. *The Journal of Clinical Investigation*. 1956; 35(2):150-54.
23. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227:680-85.
24. Lomonte B, Gutiérrez JM. La actividad proteolítica de los venenos de serpientes de Costa Rica sobre la caseína. *RevBiolTrop*. 1983; 31(1): 37-40.
25. Lemus I, García R, Erazo R, Peña R, Parada M, Fuenzalida M. Diuretic activicty of an *Equisetum bogotense* tea (Platero herb): evaluation in haelthy volunteers. *Journal of Ethnopharmacology*. 1996; 54:55-8.
26. Veronesea E, Esmeraldinoa L, Trombonea A, Santanab A, Becharac G, Kettelhutd I, Cintraa A, Gigliod J, Sampaio S. Inhibition of the myotoxic activity of *Bothropsjararacussu* venom and its two major myotoxins, BthTX-I and BthTX-II, by the aqueous extract of *Tabernaemontanacatharinensis* A. DC.(Apocynaceae). *Phytomedicine*. 2005; 12: 123-30.
27. Guerranti R, Aguiyi IJ, Ogueli I, Onorati G, Neri S, Rosati F, Del Buono F, Lampariello R, Pagani R, Marinello E. Protection of de *Mucunapruriens* seeds against *Echiscarinatus* venom is exerted through a multiform glycoprotein whose oligosaccharide chains are functional in this role. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2004; 323:484-90.
28. Aguiyi JC, Igweh AC, Egesie UG, Leoncini R. Studies on possible protection against snake venom using *Mucunapruriens* protein immunization. *Fitoterapia*. 1999; 70(1):2-24.
29. Barraza E, Hódar J, Zamora R. Species, site and seasonal variation in leaf-chemistry diversity of woody Mediterranean plants. *Rivieecology (Terre Vie)*. 2009; 64:136-44.
30. Pereañez J, Patiño A, Ciro G, Vargas L, Vásquez L, Salazar A, Rey J. Búsqueda de alternativas terapéuticas para el accidente ofídico en residuos agroindustriales

- de frutas Tropicales. Vitae revista de la Facultad de Química Farmaceutica, Universidad de Antioquia. 2009; 3 (16) 378-87.
31. Mukherjee PK, Mukherjee K. Evaluation of Botanical-Perspectives of Quality Safety and Efficacy. In: Advances in Medicinal Plants, 1st ed.; ND Prajapati, T Prajapati, S Jayapura, Eds.; Asian Medicinal Plants and Health Care Trust: Jodhpur, Rajasthan, and India. 2005; 1: 87-110.
 32. Pithayanukul P, Laovachirasuwan S, Bavovada R, Pakmanee N, Suttisri R. Anti-venom potencial of butanolic extract of *Ecliptaprostrata* against Malayan viper venom. Journal of Ethnopharmacology. 2004; 90:347-52.
 33. Fernandez M, Ortiz W, Pereáñez J, Martimez D. Evaluación de las propiedades antiofídicas del extracto etanólico y fracciones obtenidas de *Renealmiaalpinia* (Rottb) Mass (Zingiberaceae). Vitae. 2010; 1 (17) 75-2.
 34. Newman DJ, Cragg G, Snader KM. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. Journal of natural products. 2003; 66:1022-037.
 35. Mors WB, Nascimento MC, Parente JP, Da Silva MH, Melo PA, Suárez-Kurtz G. Neutralization of letal and myotoxic activities of South American rattlesnake venom by extracts and constituents of the plant *Ecliptaprostrata* (Asteraceae). Toxicon. 1989; 27(9): 1003-009.
 36. Borges MH, Alves DLF, Raslan DS, Piló-Velosos D, Rodrigues VM, Homsí-Brandeburgo MI, Lima ME. Neutralizing properties of *Musa paradisiaca* L. (Musaceae) juice on phospholipase A₂, myotoxic, hemorrhagic and lethal activities of crotalidae venoms. Journal of Ethnopharmacology. 2005; 98: 21-9.
 37. Esmeraldino LE, Souza AM, Sampaio SV. Evaluation of the effect of aqueous extract of *Croton urucurana* Baillon (Euphorbiaceae) on the hemorrhagic activity induced by the venom of *Bothropsjararaca*, using new techniques to quantify hemorrhagic activity in rat skin. Phytomedicine. 2005; 12: 570-76.
 38. Guerranti R, Aguiyi J, Errico E, Pagani R, Marinello E. Effects of *Mucunapruriens* extract on activation of prothrombin by *Echiscarinatus* venom. Journal of Ethnopharmacology. 2001;75: 175-80.