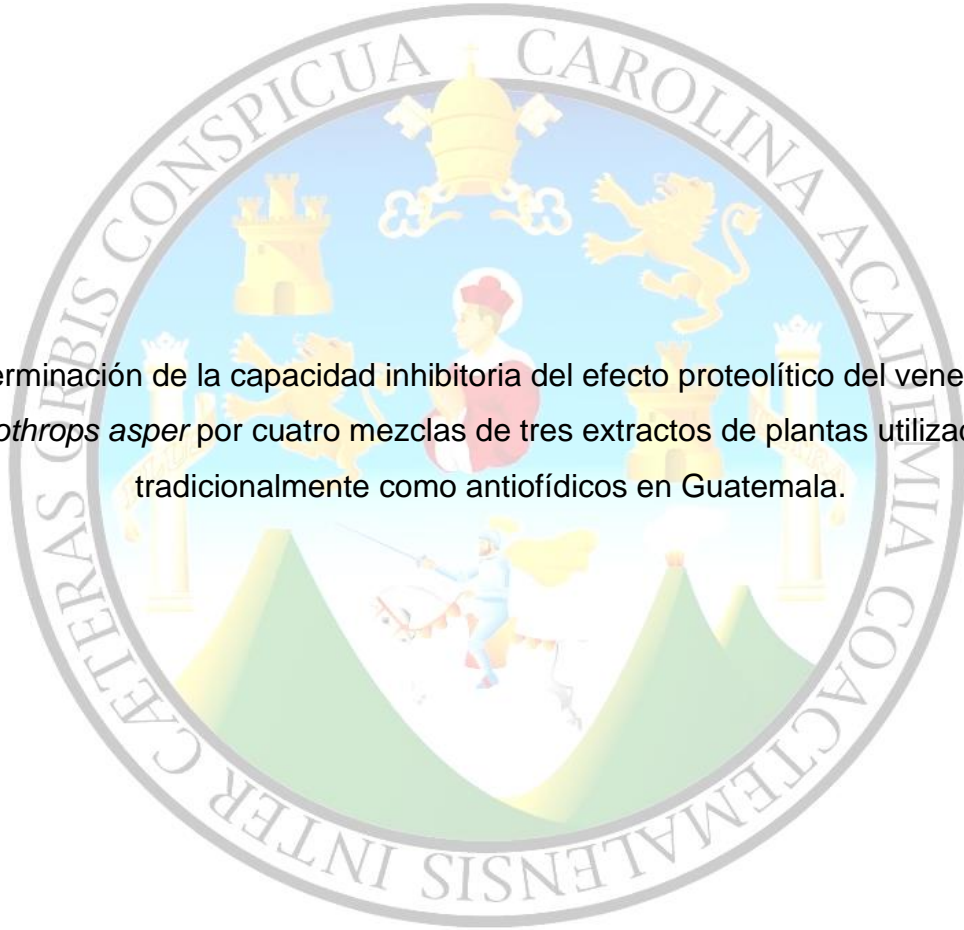


Universidad de San Carlos de Guatemala
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia

The seal of the Universidad de San Carlos de Guatemala is a circular emblem. It features a central figure of a man in a red and white robe, possibly a saint or scholar, holding a book. Above him is a golden crown and a lion rampant. The background is light blue with a castle on the left and a mountain on the right. The entire scene is set against a green landscape with a white path. The Latin motto "CETERAS TRIBIS CONSPICUA CAROLINA ACADEMIA COACTEMALENSIS INTER" is inscribed around the perimeter of the seal.

Determinación de la capacidad inhibitoria del efecto proteolítico del veneno de *Bothrops asper* por cuatro mezclas de tres extractos de plantas utilizadas tradicionalmente como antiofídicos en Guatemala.

Jaqueline Lourdes Alvarado Cárdenas
Michael Javier Mó Leal
Rossana Judith Navarizo García

QUÍMICOS FARMACÉUTICOS

Guatemala, febrero de 2020

Universidad de San Carlos de Guatemala
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia

Determinación de la capacidad inhibitoria del efecto proteolítico del veneno de *Bothrops asper* por cuatro mezclas de tres extractos de plantas utilizadas tradicionalmente como antiofídicos en Guatemala.

SEMINARIO DE INVESTIGACIÓN

Presentado por

Jaqueline Lourdes Alvarado Cárdenas
Michael Javier Mó Leal
Rossana Judith Navarizo García

Para optar al título de
QUÍMICOS FARMACÉUTICOS

Guatemala, febrero de 2020

JUNTA DIRECTIVA FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA

M.A. Pablo Ernesto Oliva Soto	Decano
Licda. Miriam Roxana Marroquín Leiva	Secretaria
Dr. Juan Francisco Pérez Sabino	Vocal I
Dr. Roberto Enrique Flores Arzú	Vocal II
Lic. Carlos Manuel Maldonado Aguilera	Vocal III
Br. Giovani Rafael Funes Tovar	Vocal IV
Br. Carol Merarí Caceros Castañeda	Vocal V

DEDICATORIA

Jaqueline Lourdes Alvarado Cárdenas

- A Dios y a la Virgen María
Por darme sabiduría y perseverancia para permitirme cumplir esta meta tan anhelada.
- A mis papás
Jorge Alvarado y Estela Cárdenas, gracias por el apoyo incondicional en cada etapa de mi vida, por su esfuerzo, sacrificio, guía y no permitir que me detenga hasta cumplir lo que me propongo, no sé cómo agradecerles, este logro es de ustedes.
- A mis hermanos
Fernando y Jordy, por su apoyo y cariño, espero ser un buen ejemplo para ustedes.
- A mis ángeles
Porque sé que están felices por este logro y que siempre me han guiado cada día.
- A mis familiares
Agradezco a cada uno sus palabras de motivación y el apoyo que me brindaron para seguir adelante.
- A mis amigos
Por brindarme su amistad y apoyo, por compartir conmigo momentos de emoción, nervios y estrés, los que compartieron conmigo en LIPRONAT, a los que se han sumado durante estos años y principalmente a los que nos conocimos hace mucho y nuestra amistad sigue siendo incondicional.

DEDICATORIA

Rossana Judith Navarizo García

- A Dios y a la Virgen María Que han guiado mi camino y me han enseñado que cada día tiene un propósito y muchas razones para estar agradecida.
- A mis padres Edgar Navarizo y Judith García; gracias por todo su amor, palabras de aliento, llamadas de atención y especialmente por su confianza y apoyo incondicional, sin ustedes este logro no sería posible. Son el mejor ejemplo de trabajo honesto, integridad y perseverancia que puedo tener.
- A mis hermanos Edgar y Josué; por su compañía, apoyo y ocurrencias que siempre nos provocan una carcajada.
- A mi esposo José Manuel; tu amor, comprensión y paciencia han sido fundamentales para alcanzar esta meta. Gracias por los consejos para seguir adelante, por la paz que me da tu sonrisa y por todos los sueños que conquistaremos juntos. Te amo.
- A mis familiares Los que están cerca, los que están lejos y los que ya no están con nosotros. Gracias por su cariño que me motiva a seguir adelante. Especialmente a mis tíos y primas Cifuentes Navarizo por recibirme en su hogar durante el EPS.
- A mis amigos Compañeros de estudio que con su amistad se volvieron cómplices de estrés, desvelos, consejos, alegrías y tristezas; catedráticos que además de compartir su conocimiento me han compartido su amistad y oportunidades de crecimiento personal y profesional; exalumnos que revivieron mi corazón de docente y que siempre llevaré en el corazón. Gracias por todo.

DEDICATORIA

Michael Javier Mó Leal

- | | |
|----------------------------|--|
| A Dios y a la Virgen María | Por iluminar mi camino, darme fuerza, tranquilidad y sabiduría para lograr esta meta. |
| A mis padres | Alfonso Mó y Sara Leal; que han sido mi ejemplo de vida. Gracias por todos estos años de apoyo incondicional, la paciencia, el amor. Este logro es gracias a su constante lucha y esfuerzo. |
| A mis hermanos | Diego Juancarlos, Nancí Claraluz y Kevin Alfonso; por la complicidad, cariño y apoyo incondicional. |
| A mis familiares | Abuelitos que siempre me acompañan, gracias a sus consejos y anécdotas. Tías, tíos y primos gracias por el apoyo en los momentos alegres y en los difíciles, por las risas y los buenos consejos. |
| A mis amigos | Por permitirme aprender y crecer a su lado. Por escucharme, cuidarme y compartir tristezas y alegrías, por cada anécdota vivida y por la que nos faltan por vivir. Muchas gracias, por ustedes disfrute tanto de esta etapa. |

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de San Carlos de Guatemala

Especialmente a la **Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia** por acogernos y brindarnos la oportunidad de ser parte del pequeño porcentaje de guatemaltecos que recibe formación universitaria y que, a través del ejercicio profesional, podamos contribuir a la construcción de una mejor sociedad.

A los laboratorios de Investigación

Laboratorio de Proteínas de la Unidad de Investigación en Biología Celular, Laboratorio de Investigación de Productos Naturales (LIPRONAT), Laboratorio de extractos vegetales (LIEXVE) y Laboratorio de Farmacognosia y Fitoquímica; por permitirnos usar sus instalaciones para llevar a cabo la fase experimental de este estudio.

A las personas que nos guiaron en la realización de este proyecto

Asesoras, Co-asesora, Revisora, Investigadores, Auxiliares de laboratorio y profesores, por compartir su conocimiento y experiencia para mejorar nuestras habilidades en investigación.

A nuestros catedráticos

Que con paciencia y dedicación nos brindaron los conocimientos, herramientas y consejos que nos permiten desarrollarnos en el ámbito profesional.

ÍNDICE

1. ÁMBITO DE LA INVESTIGACIÓN	1
2. RESUMEN	4
3. ANTECEDENTES	6
3.1. Ofidios.....	6
3.1.1. Clasificación de las serpientes venenosas, según su aparato venenoso.....	7
3.2. <i>Bothrops asper</i>	8
3.2.1. Composición del veneno	9
3.2.2. Fisiopatología del envenenamiento por mordedura de <i>Bothrops asper</i>	11
3.3. Epidemiología de la mordedura de <i>Bothrops asper</i>	14
3.4. Suero antiofídico (antisuero).....	15
3.5. Medicina tradicional basada en plantas para el tratamiento del envenenamiento por <i>Bothrops asper</i>	17
3.6. Plantas evaluadas como inhibidores de los efectos PLA2 y proteolítico del veneno de <i>Bothrops asper</i>	19
4. JUSTIFICACIÓN	21
5. OBJETIVOS	22
5.1. General	22
5.2. Específicos	22
6. HIPÓTESIS	23
7. MATERIALES Y MÉTODOS	24
7.1. Universo.....	24
7.1.1. Muestra	24
7.2. Materiales.....	24
7.2.1. Recursos humanos.....	24
7.2.2. Recursos económicos e institucionales	24
7.2.3. Equipo de laboratorio.....	25

7.2.4. Cristalería.....	25
7.2.5. Reactivos.....	26
7.3. Metodología	27
7.3.1. Área geográfica de recolección	27
7.3.2. Técnicas, procedimientos y equipo	27
7.3.2.1. Selección de la muestra.	27
7.3.2.2. Muestreo.....	27
7.3.2.3. Preparación de la muestra.	28
7.3.2.4. Prueba de mejor solvente.....	28
7.3.2.5. Extracción de los principios vegetales.	28
7.3.2.6. Tamizaje fitoquímico de los extractos.	29
7.3.2.7. Obtención del veneno.....	32
7.3.2.8. Disolución de extractos vegetales.....	32
7.3.2.9. Preparación de mezclas a evaluar.....	33
7.3.2.10. Primera fase: evaluación de actividad intrínseca por medio de ensayos concentración-actividad.....	33
7.3.2.11. Segunda fase: ensayo de inhibición	35
7.3.2.12. Interpretación de resultados.	3
7.3.3. Metodología de análisis de la información.	36
7.3.3.1. Definición de variables.....	36
7.3.3.2. Metodología de análisis de resultados.	36
8. RESULTADOS	38
9. DISCUSION.....	44
10. CONCLUSIONES	49
11. RECOMENDACIONES	50
12. REFERENCIAS.....	51
13. ANEXOS	62
Anexo 1. Mapa de georreferencia de especies vegetales.....	62
Anexo 2. Capacidad de los extractos etanólicos del estudio para inhibir los efectos proteolíticos del veneno de <i>Bothrops asper</i>	62
Anexo 3. Caracterización de metabolitos secundarios	63

Anexo 4. Monografías de plantas	71
Anexo 5. Formas de preparación fitoterapéutica	85

1. ÁMBITO DE LA INVESTIGACIÓN

En Guatemala las investigaciones en plantas medicinales que reportan capacidad inhibitoria de los efectos del envenenamiento producido por mordedura de la serpiente *Bothrops asper* son escasas. En los primeros estudios realizados en esta línea de investigación, se llevó a cabo un estudio etnobotánico en el que se recopiló información acerca de las plantas utilizadas por los chamanes y curanderos entrevistados para el tratamiento de mordedura de la serpiente, principalmente de *B. asper* (barba amarilla), su forma de uso y la cantidad empleada en la preparación de los antídotos (Hay, 2002, Saravia, Cáceres, Velásquez & Lara, 2001a). Los datos fueron recolectados mediante entrevistas y colecta de especímenes en los departamentos de Alta Verapaz, Izabal y Petén. Estos estudios mostraron que no existía un criterio único en cuanto a la forma tradicional del uso de las plantas y la preparación de antídotos; sin embargo, el elemento común era el uso de plantas en diferentes combinaciones.

Dado que el envenenamiento ofídico provoca efectos locales y sistémicos, mediados por las diferentes proteínas y toxinas que componen el veneno, en el estudio de Saravia y colaboradores (2001a) se realizaron pruebas de inhibición sobre algunos de los efectos del veneno de *B. asper* (letal, hemorrágico, coagulante y actividad fosfolipasa A₂ [PLA₂]), evaluando de manera individual los extractos acuosos y etanólicos de tres de las especies detectadas (*Neurolaena lobata* (L.) Cass, *Eupatorium odoratum* L. y *Dorstenia contrajerva* L.), las cuales fueron colectadas en el norte del país. Los resultados de este estudio en cuanto a la neutralización de la hemorragia, uno de los principales efectos locales del veneno, demostraron que los extractos de las tres plantas tenían una baja actividad antihemorrágica en ratones, ya que solamente dos de ellos demostraron bioactividad: el extracto acuoso de *N. lobata* neutralizó aproximadamente el 27% del efecto y el etanólico de *D. contrajerva* el 11.7%. Además, ninguna de las especies del estudio logró neutralizar efectivamente la dosis letal en ratones, por lo

-

que en ese estudio se concluyó que no podía recomendarse el uso aislado de dichas especies vegetales para tratar el envenenamiento por *B. asper* hasta que se realizaran más estudios de validación, y se sugirió que el uso de las plantas de forma combinada podría potenciar su acción, lo cual vendría a explicar que tradicionalmente los antidotos están compuestos de la mezcla de varias plantas (Martz, 1992; Pereira, Pereira, Nascimento, Parente & Mors, 1994). La necesidad de utilizar las plantas en las formas y combinaciones usadas ancestralmente en la medicina tradicional ha sido planteada también por otros autores en Latinoamérica que han realizado estudios similares (de Moura et al., 2014; Hay, 2002).

Como se mencionó anteriormente, uno de los principales efectos locales es la producción de hemorragia, la cual es causada, principalmente, por la acción de metaloproteinasas de matriz del veneno de serpiente (SVMP), las cuales ejercen un efecto proteolítico sobre diversos componentes de matriz extracelular. Debido a que las nuevas políticas que restringen el uso de animales de laboratorio (3 Rs) exigen la demostración de bioactividad en los extractos antes de ser evaluados in vivo, la inhibición de la actividad proteolítica general del veneno sobre azocaseína se utiliza como un indicador. Aunque esta prueba no reemplaza los ensayos de neutralización de la actividad hemorrágica en ratones, existen varios estudios en donde se ha demostrado que los extractos naturales que inhibieron la actividad proteolítica del veneno también neutralizaron efectivamente el efecto hemorrágico en modelos animales (Borges et al., 2001; Patiño, López, Aristizábal, Quintana & Benjumea, 2012). Estos hallazgos indicarían entonces que las mezclas de este estudio que demuestren ser efectivas in vitro, deberían ser evaluadas en pruebas de hemorragia local in vivo en futuras investigaciones, con el fin de validar su uso para neutralizar los efectos locales del veneno.

Por estas razones, en el presente estudio se evaluaron cuatro mezclas de tres extractos etanólicos preparados a partir de las plantas estudiadas originalmente por Saravia y colaboradores (2001a), *D. contrajerva*, *N. lobata* y *E. odoratum*, con

el fin de determinar científicamente si se logra potenciar su efecto inhibitorio sobre la actividad proteolítica del veneno de *B. asper* en condiciones in vitro, de forma tal que una o más de las mezclas produzcan una inhibición efectiva ($\geq 50\%$) con una potencia (CE_{50}) aceptable, lo cual demostraría la sinergia que se logra en una mezcla por la presencia de los metabolitos secundarios, abriendo la posibilidad para su recomendación como coadyuvantes en el tratamiento convencional del accidente ofídico.

2. RESUMEN

En el presente estudio se seleccionaron tres especies vegetales que han sido reportadas en Guatemala por su uso tradicional, en el tratamiento para la mordedura de serpiente, que han sido evaluadas individualmente, demostrando que ninguno de los extractos inhibió efectivamente el efecto hemorrágico del veneno en ratones siendo los extractos acuoso de *N. lobata* (~27.3%) y etanólico de *D. contrajerva* (~11.72%) los únicos que mostraron algún efecto antihemorrágico.

El objetivo del presente estudio fue determinar si las mezclas de los extractos etanólicos de las especies vegetales *D. contrajerva*, *E. odoratum* y *N. lobata*, en proporciones de 1:1 y 1:1:1 (p:p), eran capaces de inhibir el efecto proteolítico del veneno de *B. asper*. El efecto proteolítico es causado, en gran medida, por las metaloproteinasas dependientes de zinc, mediadoras de los efectos hemorrágicos locales y sistémicos.

Inicialmente, se evaluó la capacidad de las mezclas de los tres extractos para inhibir el efecto proteolítico del veneno por medio del ensayo de degradación de azocaseína descrito en el método modificado de Wang, Shih & Huang (2004) con las modificaciones realizadas en Saravia-Otten y col. (2015). Se observó que las mezclas *D. contrajerva* + *N. lobata*; *E. odoratum* + *N. lobata* y *D. contrajerva* + *E. odoratum* + *N. lobata* en la concentración 62.5 µg/µL lograron inhibir efectivamente (≥ 50%) el efecto proteolítico y la mezcla *D. contrajerva* + *E. odoratum* tiene un efecto inhibitorio muy pobre (<26%) en la misma concentración.

En la segunda fase del estudio se realizó el tamizaje fitoquímico de los tres extractos mediante ensayos macro y semimicrométricos de cromatografía en capa fina, en donde se observó en los tres extractos la presencia de: flavonoides, antocianinas y saponinas, principios activos a los que se les ha atribuido previamente la capacidad inhibitoria de metaloproteinasas, en estudios similares

para el veneno de especies del género *Bothrops*. En consecuencia, es necesaria la confirmación de su actividad inhibitoria por medio de estudios para aislar las moléculas responsables y así poder estudiar de una forma más específica su mecanismo de acción.

3. ANTECEDENTES

3.1. Ofidios

La abundancia de las serpientes venenosas en Centroamérica depende, claramente, de las especies, clima, localidad, temporada del año y otros factores (Russell, Walter, Bey, & Fernandez, 1997). La mayoría no son agresivas ya que las mordidas usualmente son accidentales o se dan debido al contacto descuidado en respuesta al susto que pueden provocar al verlas (Campbell & Lammar, 2004). Generalmente en América Latina y el Caribe, las especies venenosas son de las familias Viperidae y Elapidae. Por otro lado, existen especies clasificadas en la familia Colubridae que son capaces de producir una secreción tóxica e inyectarla, pero la severidad de los casos por mordeduras de serpientes de esta familia generalmente, es leve (Campbell & Lammar, 2004).

En Centroamérica, las serpientes más importantes desde el punto de vista médico pertenecen a la familia Viperidae. Son serpientes con colmillos delanteros móviles. Las escamas en la parte superior de su cabeza son pequeñas, similares a las del resto del cuerpo, y sus pupilas en forma elipsoidal. Cuatro géneros de la familia Viperidae se encuentran en Centroamérica: *Agkistrodon*, *Crotalus*, *Lachesis* y *Bothrops* (Bolaños, 1982).

En Guatemala se encuentran descritas 133 especies de las cuales solo 21 son venenosas, divididas en ocho familias y dos de ellas presentan especies que son potencialmente peligrosas para el ser humano. La familia Elapidae contiene siete especies de serpientes coral de Guatemala que pertenecen al género *Micrurus* y la víbora marina que habita en la costa sur del género *Pelamis*. La familia Viperidae es la de mayor importancia médica debido a que provoca gran cantidad de accidentes ofídicos y la acción de su veneno se da rápidamente. Esta familia incluye trece especies de víboras de los géneros *Bothrops*, *Agkistrodon*, *Atropoides*, *Crotalus*, *Cerrophidion*, *Bothriechis* y

-

Porthidium (Organización Panamericana de la Salud/Organización Mundial de la Salud, 2009).

3.1.1. Clasificación de las serpientes venenosas, según su aparato venenoso

- Opistoglifas, en las que los dientes posteriores de los maxilares superiores son más grandes que los demás y presentan una acanaladura en su cara anterior, la cual conecta con glándulas salivales modificadas, productoras de saliva débilmente ponzoñosa (De Lozoya, 1994).

- Proteroglifas, en este grupo el veneno es más potente e inoculado de forma más rápida por un par de colmillos situados en la parte anterior de los maxilares superiores y, a menudo, por el par siguiente de dientes. Estas serpientes necesitan morder durante cierto tiempo para inocular suficiente cantidad de veneno (De Lozoya, 1994).

- Solenoglifas, este grupo de serpientes posee el aparato venenoso más evolucionado, se observa en las víboras y crotalinos que poseen dos colmillos anteriores muy grandes, que la boca no puede cerrarse, por lo que poseen una articulación móvil que les permite que queden sobre el paladar en posición de reposo. Los colmillos están huecos y en su base se comunican con las glándulas venenosas. conformando un sistema de inyección de veneno que logra inocular mucha cantidad de forma casi instantánea. A este grupo pertenecen las serpientes de la familia Viperidae a la que pertenece *Bothrops asper* (De Lozoya, 1994).

3.2. *Bothrops asper*

Conocida con los nombres comunes de barba amarilla, cantil boca dorada, terciopelo, cantil devanador, equis, nauyaca e i'kbolay; pertenece a la familia Viperidae y habita en bosque tropical húmedo o seco, y bosque subtropical húmedo. Se encuentra entre 0 – 1300 m.s.n.m., y puede ser encontrada en potreros, cultivos de caña, de palma africana, milpa, cardamomo y café (Campbell & Lammar, 2004).

Entre sus características se encuentran que posee foseta loreal, cabeza triangular y una mandíbula inferior de color amarillo, la cual la hace característica. Su hábito es nocturno, aunque puede encontrarse tomando el sol en horas de la mañana. Siendo sus hábitos terrestres, los pies y las piernas de sus víctimas suelen ser los sitios más expuestos a posibles mordeduras (OPS/OMS, 2009).

Su distribución comprende principalmente los departamentos de Petén, Quiché, Alta Verapaz, Izabal, San Marcos, Retalhuleu, Suchitepéquez, Escuintla, Huehuetenango, Jutiapa y Santa Rosa (OPS/OMS, 2009). El ejemplar de la serpiente *B. asper* adulto posee un dorso que contiene de 18 a 25 figuras triangulares oscuras que pueden ser negras o café, con bordes claros a cada lado del cuerpo, este patrón de colores sirve de camuflaje entre hojas caídas. El macho mide 130 cm y la hembra 159.5 cm en promedio (Campbell & Lammar, 2004).

El género *Bothrops* está representado principalmente en América del Sur con 32 especies, mientras que en México y América Central solamente por una especie. En este género destaca la especie *B. asper* por ser la serpiente más frecuente implicada en accidentes ofídicos en Centroamérica, distribuyéndose desde la vertiente Atlántica de Tamaulipas (México), hasta Colombia; y de la vertiente del Pacífico de Costa Rica hacia Ecuador con una población separada

-

en el sur de Chiapas y la vertiente del Pacífico de Guatemala (Campbell & Lammar, 2004).

3.2.1. Composición del veneno

El veneno es una secreción que es producida por glándulas exocrinas especializadas que se encuentran conectadas a los colmillos de las serpientes, esta secreción es una mezcla compleja en la que predominan las proteínas, muchas de las cuales presentan actividad enzimática, atribuyendo así, los efectos del veneno (Jiménez-Porras, 1970). Se han logrado aislar proteínas, de al menos ocho familias, del veneno de *B. asper*, entre ellas: las metaloproteinasas, fosfolipasa A₂ y serinproteasa, y otras menos representativas como la disintegrinas, L-amino ácidos oxidasas y lectinas del tipo C (Angulo & Lomonte, 2009).

3.2.1.1. Fosfolipasa miotóxica A₂ (PLA₂) y homólogos

Este grupo de proteínas se encuentra ausente en *B. asper* recién nacidas, empiezan a producirse en serpientes jóvenes alcanzando la proporción más alta en su fase adulta (Gutiérrez, Chaves, & Bolaños, 1980; Lomonte & Carmona, 1992), llegando a representar entre el 29 a 45% de las proteínas presentes en el veneno (Alape-Girón, et al., 2008). Se han logrado aislar 10 enzimas de este tipo y se clasifican en dos grupos: ácidas (PLA I, PLA II, PLA₂ 1, PLA₂ 2 y PLA₂ 3) y básicas (miotoxinas I, miotoxina II, miotoxina III, miotoxina IV y miotoxina PLA₂) los pesos varían desde 11kDa (Alagón et al., 1980) hasta 32kDa (Ferlan & Gubenšek, 1978). Las enzimas acídicas pueden tener efectos sobre la agregación plaquetaria además de bloqueo neuromuscular, miotoxicidad y efecto hipotensivo. (Gutiérrez & Lomonte, 1995). Por otro lado, las

-

enzimas básicas son más abundantes que su contraparte ácida y se ha demostrado que son capaces de causar daño al músculo esquelético (Gutiérrez, Lomonte, Chaves, Moreno & Cerdas, 1986). Estos efectos se atribuyen a la actividad enzimática, sin embargo, las miotoxinas II y IV no presentan actividad enzimática debido a la mutación Lys49, manteniendo efectos miotóxicos (Lomonte, Angulo & Calderón, 2003).

3.2.1.2. Metaloproteinasas

El veneno de *B. asper* presenta del 41 al 44% de metaloproteinasas (Alape-Girón et al., 2008), las cuales son dependientes de Zn^{+2} , de las que se han aislado del grupo estructural P-I (proteinasas G y BaP1) y del grupo P-III (BaH1, BH2, BH3, BaH4 y Basparin A). Estas presentan pesos que varían desde 18kDa (Aragón-Ortiz & Gubenšek, 1987) hasta 70kDa (Loría et al., 2003). La metaloproteinasa G fue la primera en ser aislada y pertenece al grupo P-I. In vitro hidroliza sustratos proteicos como caseína, hemoglobina, gelatina y fibrinógeno (Aragón-Ortiz & Gubenšek, 1987).

3.2.1.3. Serina proteinasas

Las serinas proteinasas son constituyentes en el veneno de *B. asper* y se presentan entre un 5 a 18% (Alape-Girón et al., 2008) de las cuales se han aislado: asperasa, ficozima y tipo trombina. Estas proteinasas presentan efecto de desfibrogenación (Pérez, Rucavado, Sanz, Calvete & Gutiérrez, 2008). La primer serina proteinasas con actividad similar a la trombina que ha sido aislada del veneno de *B. asper* es la asperasa (Aragón-Ortiz & Gubenšek, 1978).

Además de las familias anteriormente descritas, el veneno de *B. asper* contiene otras familias de proteínas que comprenden aproximadamente el 10% de la composición del veneno (Alape-Girón, et al., 2008), las cuales son: L-amino oxidasas, de las que no se conoce su perfil toxicológico (Umaña, 1982a,1982b); desintegrinas como la botrasperina que podría inhibir la agregación plaquetaria (Alape-Girón, et al., 2008); y lectinas del tipo C como la aspercetina que es un potente agregante plaquetario (Rucavado, et al., 2001).

3.2.2. Fisiopatología del envenenamiento por mordedura de *Bothrops asper*

Las principales manifestaciones clínicas de la mordedura de *B. asper* se caracterizan por la aparición de edema, hemorragia local, ampollas, dermonecrosis y mionecrosis durante los primeros minutos de la mordida. Los envenenamientos moderados o severos provocan alteraciones sistémicas como hemorragia sistémica, coagulopatía, hipovolemia, inestabilidad hemodinámica, shock, falla renal aguda, eventos cerebrovasculares y cardiovasculares. Según las manifestaciones clínicas se puede clasificar el grado de envenenamiento (Tabla 1). Dentro de las complicaciones frecuentemente descritas están: infección de tejido, caracterizada por celulitis y abscesos; también artritis, osteomielitis, sepsis, neumonía y meningitis, estos últimos menos frecuentes (Delgado & Del Brutto, 2012; Gutiérrez, Escalante, & Rucavado, 2009; Otero-Patiño, 2009)

Tabla 1

Grados de Envenenamiento por Mordedura de B. asper

<u>Grado</u>	<u>Signos locales</u>	<u>Signos sistémicos</u>
Sin envenenamiento	Dolor leve, edema y hemorragia sin importancia.	Signos vitales y coagulación sanguínea normal.
Envenenamiento leve	Hinchazón alrededor de uno o dos segmentos de la mordedura (ej. pie y pierna), circunferencia de la extremidad aumentada <4 cm, hematoma; sin sagrado o sangrado escaso en el sitio de la mordedura, sin necrosis.	Sangre normal o incoagulable, no hay sangrado sistémico ni alteraciones hemodinámicas.
Envenenamiento moderado	Hinchazón en dos o tres segmentos del sitio de la mordedura (ej. pie, pierna y muslo), circunferencia de la extremidad aumentada >4 cm; sangrado local, sin necrosis local y ampollas en algunos casos.	Sangre no coagulable, sangrado sistémico (hematuria gingival, heridas recientes, etc.), no hay alteraciones hemodinámicas ni falla renal.
Envenenamiento severo	Hinchazón extendida hasta el tronco; ampollas; sangrado local; necrosis o síndrome compartimental. Observar textos de casos de mordeduras por especímenes mayores a 1 metro de largo.	Sangre no coagulable, múltiples sangrados sistémicos, hipotensión o shock, coagulación intravascular diseminada o falla renal, hemorragia cerebral o fallas multisistémicas.

Fuente: adaptado de Otero-Patiño, R. (2009). Epidemiological, clinical and therapeutic aspects of *Bothrops asper* bites. *Toxicon*, 54(7), 998–1011. doi:10.1016/j.toxicon.2009.07.001

La inflamación (el edema acompañado de dolor) es la mayor característica del envenenamiento por la mordedura de *B. asper*. El edema causado puede llegar a provocar isquemia y compresión neural, lo cual lleva a pérdida permanente de tejido, discapacidad o amputación. El veneno de *B. asper* es capaz de reducir el lumen de los vasos linfáticos, perjudicando el flujo linfático (Mora, Mora, Lomonte & Gutiérrez, 2008). También se sabe que las miotoxinas inducen la liberación de grandes cantidades de potasio y ATP al músculo esquelético amplificando sus

efectos, causando daños al interactuar con receptores purinérgicos y potenciando la reacción al dolor (Cintra-Francischinelli, et al., 2010). Existe evidencia que indica que el principal mecanismo de acción de estas miotoxinas consiste en atacar la membrana plasmática al causar la hidrólisis de fosfolípidos seguido de un ingreso de iones calcio (Ca^{+2}) y egreso de componentes citosólicos (Fernández et al., 2013). Paralelo al edema sucede una infiltración de leucocitos induciendo fagocitosis. Un estudio in vivo demuestra que las miotoxinas estimulan la fagocitosis de zimosano no sensible a fagocitosis, causando daño en los tejidos mediante la liberación de anión superóxido (Rueda et al., 2013; Teixeira, Cury, Moreira, Picolo, & Chaves, 2009). A estos efectos se le añade la mionecrosis causada por la enzima PLA₂ de las cuales se han descrito mecanismos diferentes entre los subtipos Asp49 y Lys49, que pueden trabajar sinérgicamente actuando sobre los miotubos (Mora, Fernández, Montecucco, Gutiérrez, & Lomonte, 2014).

La hemorragia sistémica es una de las manifestaciones serias en los envenenamientos severos. Esta ocurre en diversos órganos, especialmente en los pulmones, causando hipovolemia, hipotensión, hipoperfusión de tejidos, shock cardiovascular y severos accidentes (Gutiérrez, Escalante, & Rucavado, 2009). Las metaloproteinasas son causantes del efecto hemorrágico, la actividad proteolítica de la P-I Bap1 de *B. asper* es capaz de digerir rápidamente el colágeno tipo IV, hidrolizar laminina, nidógeno y perlecan (Escalante et al., 2011). Las metaloproteinasas P-III son responsables de la hemorragia sistémica mediante la destrucción de la membrana celular, dejando a las P-I con un efecto mayormente local (Gutiérrez, Escalante, & Rucavado, 2009). El daño a los vasos capilares causado por el veneno de *B. asper* se traduce a una reducción de la densidad de capilares sanguíneos e inervaciones musculares, lo que en conjunto con la inhibición de formación de miotubos,

efecto de la PLA₂, dificultan la regeneración muscular (Hernández et al., 2011; Saravia-Otten et al., 2013).

Las alteraciones hemostáticas están dadas por la desfibrinogénación, lo cual altera el tiempo de protrombina y la actividad parcial de tromboplastina mientras las concentraciones de fibrinógeno son reducidas drásticamente por los efectos de las metaloproteinasas y las serinas proteasas. La trombocitopenia es causada por una proteína llamada aspercetina que es del grupo lectina tipo C. Las alteraciones renales agudas están dadas por necrosis cortical, nefrosis distal, microangiopatía trombótica y necrosis tubular, siendo una de las complicaciones más críticas. En casos severos la acción combinada de las toxinas y el deterioro de los mecanismos homeostáticos pueden terminar en la muerte del paciente (Gutiérrez, Escalante, & Rucavado, 2009). Los efectos del envenenamiento por mordedura de *B. asper* pueden variar por diferentes factores. La distribución geográfica, edad, sexo, alimentación, talla y temporada del año pueden afectar la composición del veneno y con ello los efectos tóxicos (Chippaux, 1991).

3.3. Epidemiología de la mordedura de *Bothrops asper*

La serpiente *B. asper* es la causante de la mayoría de mordeduras por serpientes en América Central (Tabla 2) y el norte de Sur América, siendo el mayor grupo de riesgo los trabajadores jóvenes agricultores en áreas rurales (Otero-Patiño, 2009). En Guatemala cada año se reportan al menos 600 casos, los departamentos de Alta Verapaz, Petén, Quiché y Escuintla fueron los más afectados durante el periodo 2001-2010 (Morales, 2012).

Estos datos epidemiológicos se basan en reportes de hospitales, los cuales son parciales especialmente cuando la incidencia es baja (Yañez-Arenas, Peterson, Mokondoko, Rojas-Soto, & Martínez-Meyer, 2014). Debido

-

a que muchas víctimas de mordedura de serpiente se encuentran en áreas rurales, no son hospitalizados y acuden a tratamientos tradicionales como preparaciones herbales (Hay, 2002; Snow et al., 1994). Esto, sumado a la carencia de infraestructura y recursos para la recolección de datos fiables, se traduce a datos que no reflejan la situación real que se vive (Gutiérrez, 2014a, 2014b).

Tabla 2

Número Total Estimado de Casos por Año e Incidencia de Accidente Ofídico en Países de Centroamérica.

<u>País</u>	<u>Número total de casos por año</u>	<u>Incidencia (por 100,000 habitantes por año)</u>
Guatemala	600	4.2
Belice	50	15.2
Honduras	600	7.2
El Salvador	50	0.8
Nicaragua	600	10.5
Costa Rica	600	12.9
Panamá	2,800	79.8

Fuente: adaptado de Gutiérrez, J. (2014a). Current challenges for confronting the public health problem of snakebite envenoming in Central America. *Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 20(7). doi:10.1186/1678-9199-20-7

3.4. Suero antiofídico (antisuero)

La administración parenteral de sueros antiofídicos es la única terapia científicamente validada para el tratamiento de mordedura de serpiente. Las sustancias activas de los sueros antiofídicos pueden ser: inmunoglobulinas G (IgG) completas o sus fragmentos F(ab')₂ y Fab, las cuales tienen la habilidad de unirse a las toxinas del veneno e inhibir sus efectos tóxicos. Estas sustancias activas son purificadas del plasma de animales inmunizados con el veneno de serpientes (World Health Organization, 2018; Gutiérrez, Gené, Rodas & Cerdas, 1985).

Los pacientes deben ser atendidos en una unidad de cuidados intensivos. Para lograr un tratamiento eficiente se debe realizar un diagnóstico

•

certero y, de ser posible, identificar la serpiente causante de la mordida para administrar el antiveneno adecuado. Idealmente utilizar pruebas de ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay) para identificar y cuantificar veneno-antígeno en suero y concentración de suero antiofídico. La administración de suero antiofídico puede causar efectos adversos correspondientes a reacciones de hipersensibilidad tipo I pudiendo llegar a una reacción anafiláctica (Otero-Patiño, 2009). Siendo los sueros antiofídicos sustancias específicas provenientes de animales inmunizados, existen datos de inhibición cruzada entre sueros producidos en México, Costa Rica de diferentes poblaciones de *B. asper*, siendo variable la cantidad de suero necesario para inhibir las manifestaciones clínicas de los venenos de diferente origen geográfico (Segura, et al., 2012). Para el caso de *B. asper* de Guatemala se ha demostrado efecto neutralizante con los sueros antiofídicos del Instituto Clodomiro Picado en Costa Rica y del Laboratorio Bioclon en México, siendo el primero de mayor potencia neutralizante (Saravia et al., 2001b).

Para lograr una prevención y tratamiento adecuado se debe:

- Promover el trabajo interdisciplinario y buscar establecer políticas nacionales que cumplan su objetivo (Otero-Patiño, 2009).
- Capacitar constantemente al personal de salud sobre las manifestaciones clínicas del accidente ofídico, el tratamiento y sus efectos adversos (Gutiérrez, Williams, Fan, & Warrell, 2010).
- Lograr que la información epidemiológica sea exacta y actualizada y garantizar la disponibilidad de sueros antiofídicos (Gutiérrez, Theakston & Warrell, 2006).

3.5. Medicina tradicional basada en plantas para el tratamiento del envenenamiento por *Bothrops asper*.

La medicina tradicional son los conocimientos basados en creencias y experiencias indígenas de las diferentes culturas, para el tratamiento de una afección (World Health Organization, 2000). Se conoce que un gran número

•

de plantas son utilizadas por curanderos y chamanes como tratamiento tradicional para el envenenamiento por mordedura de serpientes en diferentes regiones (Mors,1991; Samy, Thwin, Gopalakrishnakone & Ignacimuthu, 2008) Los géneros *Aristolochia* y *Ficus* pueden considerarse representativos por la cantidad de especies que se han reportado (Tabla 3) (López & Pérez, 2009). Estos antídotos vegetales pueden ser usados por dos razones: para inhibir el veneno o para aliviar los síntomas, por lo que los curanderos pueden estar usando plantas medicinales como calmantes sin que en realidad sean antídotos (López & Pérez, 2009).

Tabla 3

Especies de los Géneros Aristolochia y Ficus, Usadas Tradicionalmente para el Tratamiento en las Mordeduras de Serpientes en Diferentes Regiones.

<u>Región</u>	<u>Plantas usadas tradicionalmente como antiofídicos</u>
Centroamérica	<i>Aristolochia arborescens</i> <i>Aristolochia grandiflora</i> <i>Aristolochia maxima</i> <i>Aristolochia odoratissima</i> <i>Aristolochia pentandra</i> <i>Asclepias curassavica</i> <i>Lophophora williamsii</i>
Brasil	<i>Aristolochia barbata</i> <i>Aristolochia teriaca</i> <i>Cynara scolymum</i>
Colombia	<i>Aristolochia barbata</i> <i>Aristolochia teriaca</i> <i>Cynara scolymum</i>
India	<i>Aristolochia brateata</i> <i>Aristolochia indica</i> <i>Aristolochia longa</i> <i>Aristolochia serpentaria</i>
Sudeste asiático	<i>Aristolochia cucurbitifolia</i> <i>Aristolochia debili</i>
India y Sudeste asiático	<i>Ficus bengalensis</i> <i>Ficus glomerata</i> <i>Ficus religiosa</i> <i>Ficus rumphii</i> <i>Ficus septica</i> <i>Ficus carica</i>
Occidente de África	<i>Ficus sycomorus</i>

Fuente: adaptado de López, J., & Pérez, J. (2009). Plantas alexitéricas: antídotos vegetales contra las picaduras de serpientes venenosas. España: *Medicina Naturista*, 3(1), 17-24.

En la medicina tradicional de Guatemala se han reportado hasta 32 plantas para el tratamiento del envenenamiento por mordedura de serpientes. Estas prácticas se observan con frecuencia en áreas rurales, donde el acceso inmediato a sueros antiofídicos y atención médica es difícil. Aunque chamanes y curanderos son personas especializadas en este tipo de tratamientos, se ha reportado que no existe un criterio común en cuanto a las recetas, preparación, parte de la planta utilizada, dosificación o

administración de los antídotos, observándose como factor común el uso de mezclas de varias plantas en las recetas preparadas (Hay, 2002). De manera muy similar se han reportado más de 100 plantas en Colombia, en donde se sabe que cerca del 60% de los afectados por mordeduras de serpientes son tratados por curanderos y chamanes las cuales son preparadas en infusión, decocción, maceración o emplasto de forma individual o en mezclas (Otero, et al., 2000).

3.6. Plantas evaluadas como inhibidores de los efectos PLA₂ y proteolítico del veneno de *Bothrops asper*.

En Guatemala los estudios de plantas de uso tradicional por Saravia y col. (2001a), demostraron, mediante la evaluación individual de extractos etanólicos, que las especies *Dorstenia contrajerva*, *Neurolaena lobata* y *Eupatorium odoratum* no fueron capaces de inhibir los efectos PLA₂. *D. contrajerva* presentó pobre inhibición del efecto hemorrágico y *E. odoratum* y *N. lobata* cerca del 50% de la inhibición del efecto coagulante. En otro estudio al evaluar extractos etanólicos de seis plantas de uso tradicional en Guatemala (*Acacia hindsii*, *Aristolochia máxima*, *Cissampelos pareira*, *Hamelia patens*, *Piper peltatum* y *Sansevieria hyacinthoides*), se determinó que los extractos de *P. peltatum* y *C. pareira* inhibieron el efecto proteolítico del veneno con una efectividad menor al 50% y *S. hyacinthoides* neutralizó pobremente la actividad fosfolipasa A₂ (Saravia-Otten, et al., 2015).

Otra planta que ha sido evaluada es *Renealmia alpinia* es utilizada en la región norte de Colombia. El extracto de las hojas con diclorometano contiene principalmente pinostrobin, que es un flavonoide al cual se le atribuye la inhibición significativa de la actividad proteolítica del veneno, así como de mitigar el daño local de tejidos debido a los efectos hemorrágicos del mismo (Gómez-Betancur, Benjumea, Patiño, Jiménez, & Osorio, 2014). El extracto de *R. alpinia* inhibe la actividad de las metaloproteinasas y serina

-

proteinasas presentes en el veneno de *B. asper* debido a la interacción molecular de los metabolitos secundarios de la planta con las proteinasas del veneno (Patiño, Benjumea, & Pereañez, 2013). Por otro lado, el extracto acuoso de *Caesaria sylvestris* ha demostrado ser un potencial inhibidor de la actividad PLA₂ del veneno de *B. asper* (Cavalcante et al., 2007). Las hojas y corteza de *Brownea ariza*, cuya corteza tiene un efecto neutralizante en efectos hemorrágicos e inhibición de actividad proteolítica (Mack-Wen, Rico, Alarcón, & Pereañez, 2011). Estos son ejemplos de que plantas de uso tradicional son un nicho por explorar para la búsqueda de alternativas para el tratamiento efectivo del envenenamiento por el veneno de *B. asper*.

4. JUSTIFICACIÓN

En Guatemala, la serpiente *Bothrops asper* (barba amarilla) es considerada la causante de la mayoría de los accidentes ofídicos. Se encuentra principalmente en los departamentos de Izabal, Alta Verapaz, Petén y algunas poblaciones aisladas en la cuenca del Pacífico. Actualmente el único tratamiento validado para contrarrestar los efectos causados por su veneno consiste en la administración de sueros antiofídicos, cuyos efectos secundarios pueden conducir a un ataque anafiláctico. La mayoría de los accidentes ofídicos ocurren en áreas rurales, donde predomina la pobreza y es difícil el acceso al sistema de salud. Muchas de estas víctimas no llegan a ser hospitalizadas, por lo que acuden a médicos tradicionales (curanderos o chamanes), quienes administran preparados a base de mezclas de plantas.

Este estudio, con base en los resultados y en las recomendaciones de investigaciones realizadas en Guatemala acerca del tema, evaluó la capacidad de cuatro mezclas de tres plantas, evaluadas individualmente en investigaciones previas (*Dorstenia contrajerva*, *Neurolaena lobata* y *Eupatorium odoratum*), para inhibir uno de los principales componentes del veneno siendo estas las metaloproteinasas dependientes de zinc, el veneno de *B. asper* presenta alrededor del 41-44% de metaloproteinasas, causando hemorragia local y sistémica. Se realizó el ensayo de actividad de inhibición proteolítica in vitro, para observar la relación entre la concentración del extracto y la capacidad inhibitoria de las mezclas, dejando abierta la posibilidad de realizar investigaciones posteriores con las mezclas que muestren efectividad.

Al evaluar mezclas de las plantas se busca la reproducción de las condiciones utilizadas por los médicos tradicionales para demostrar si se potencia el efecto de inhibición, posibilitando la validación del uso de estas mezclas de plantas, determinando su efectividad y limitaciones.

5. OBJETIVOS

5.1. General

Evaluar la capacidad inhibitoria del efecto proteolítico del veneno de *Bothrops asper* de cuatro mezclas de tres extractos de plantas utilizadas tradicionalmente como antiofídicos en Guatemala.

5.2. Específicos

5.2.1. Determinar la capacidad de cuatro mezclas de extractos etanólicos de *Eupatorium odoratum*, *Dorstenia contrajerva* y *Neurolaena lobata* para inhibir la actividad proteolítica del veneno de *B. asper*.

5.2.2. Comparar la capacidad inhibitoria de cada una de las mezclas evaluadas para establecer si existe diferencia significativa en cuanto a su potencia.

5.2.3. Correlacionar los metabolitos secundarios presentes en la composición química de los extractos etanólicos de las especies en estudio con su capacidad para inhibir el efecto proteolítico del veneno.

6. HIPÓTESIS

Al menos una de las cuatro mezclas inhibirá el 50% o más del efecto proteolítico del veneno de *B. asper*.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. Universo

Plantas nativas de uso popular para el tratamiento de accidentes ofídicos en Guatemala, como antídotos para el envenenamiento por mordedura de la serpiente *Bothrops asper*.

7.1.1. Muestra

Extractos etanólicos de: *Eupatorium odoratum* (hojas), *Neurolaena lobata* (hojas) y *Dorstenia contrajerva* (hojas).

7.2. Materiales

7.2.1. Recursos humanos

Rossana Judith Navarizo García	Autor
Jaqueline Lourdes Alvarado Cárdenas	Autor
Michael Javier Mó Leal	Autor
Dra. Patricia Saravia Otten	Asesor
M. Sc. Rosario Hernández	Asesor
Dra. Sully Cruz	Coasesor

7.2.2. Recursos económicos e institucionales

- Biblioteca Central, Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Biblioteca, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. USAC.
- Laboratorio de proteínas, Unidad de Investigación en Biología Celular, Departamento de Bioquímica. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. USAC.
- Laboratorio de Farmacognosia y Fitoquímica. Departamento de Farmacognosia. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. USAC.
- Laboratorio de Investigación de Productos Naturales, (LIPRONAT). Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. USAC.
- Laboratorio de extractos vegetales (LIEXVE). Facultad de Ingeniería. USAC.

•

7.2.3. Equipo de laboratorio

- Lector de ELISA
- Espectrofotómetro
- Potenciómetro
- Balanza de humedad
- Baño de ultrasonido
- Balanza analítica
- Balanza semianalítica
- Vórtex
- Campana de extracción
- Centrifugadora
- Estufa eléctrica
- Horno de secado
- Rotavapor
- Termómetro
- Percolador
- Liofilizadora
- Bomba de vacío
- Cámara cromatográfica
- Lámpara de luz UV

7.2.4. Cristalería y materiales.

- Balones aforados
- Balones para colecta para rotavapor
- Cápsulas de porcelana
- Condensador para rotavapor
- Cristalizadores
- Erlenmeyers
- Embudos de vidrio
- Fracos de liofilizador
- Micropipetas
- Probetas
- Tubos de ensayo
- Varillas de vidrio
- Vaso de precipitar
- Viales de vidrio
- Vidrio de reloj
- Capilares de 5 μ L
- Regla
- Micropipetas
- Pipetas
- Baño María
- Gradillas
- Asperjador
- Pipetas automáticas de volumen variable
- Cromatoplacas de sílica gel 60 F254
-
-
-
-

7.2.5. Reactivos

- Etanol 95%
- Agua destilada
- Veneno liofilizado de *B. asper*
- Solución tampón de fosfatos (PBS)
pH 7.2
- Tween-80 (PBS-T80)
- Ácido sulfúrico
- Hidróxido de sodio
- Azocaseína
- Ácido tricloroacético
- Metanol
- Hidróxido de amonio
- Ácido clorhídrico
- Reactivo de Mayers
- Reactivo de Wagner
- Reactivo de Dragendorff
- Cloruro férrico
- Ácido acético
- Acetato de etilo
- Ácido fórmico
- Anisaldehído-ácido sulfúrico
- Tolueno
- Reactivo NP/PEG
- Diclorometano
- Anhídrido acético
- Vainillina-ácido sulfúrico
- Cloroformo
- Permanganato de potasio
- Cloruro de metileno
- Estándares de referencia para TLC

7.3. Metodología

7.3.1. Área geográfica de recolección

El material vegetal se recolectó en Samayac, Suchitepéquez; Cobán, Alta Verapaz y Ciudad Universitaria Zona 12, Guatemala.

7.3.2. Técnicas, procedimientos y equipo.

Las técnicas y procedimientos empleados en esta investigación fueron los estandarizados por las unidades de investigación y laboratorios en los cuales se desarrollaron las diferentes fases del proyecto (Laboratorio de proteínas, LIPRONAT y LIEXVE).

7.3.2.1. Selección de la muestra.

De acuerdo a revisiones de literatura y base de datos generadas en investigaciones anteriores de especies vegetales de uso etnomédico en el país para el tratamiento del envenenamiento por mordedura de serpientes, se seleccionaron tres especies: *D. contrajerva*, *N. lobata* y *E. odoratum* (Anexo 1, monografías de las tres especies) (Saravia et al., 2001a).

7.3.2.2. Muestreo

Se realizó un muestreo por conveniencia en Samayac, Suchitepéquez; Cobán, Alta Verapaz y Ciudad Universitaria Zona 12, Guatemala, 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 (World Health Organization, 1998). La cantidad colectada fue mayor a 2 kg de material vegetal fresco. Las especies se identificaron en el Herbario

BIGU (Biología de Guatemala), de la Escuela de Biología. Los datos de recolección se resumen en la Tabla 5 en la sección de resultados.

7.3.2.3. Preparación de la muestra.

El material vegetal se secó en sombra a temperatura ambiente sobre papel periódico, por un tiempo mínimo de 24 horas, seleccionando la parte de la planta de interés (hojas) y eliminando la materia extraña. Luego se colocó en hornos de secado por convección a una temperatura de 40°C hasta lograr una humedad menor a 10% (p/p) (WHO, 1998).

7.3.2.4. Prueba de mejor solvente

Se determinó la proporción de etanol-agua que permitía la mayor extracción de principios activos. Para lo cual se prepararon diferentes diluciones de etanol (30%, 50%, 70% y 95%), las cuales fueron mezcladas con 1 g de materia vegetal y se dejaron macerar por 24 horas. Luego se evaporó el disolvente en capsula de porcelana, previamente secada y tarada, la dilución que presentó el mayor porcentaje de sólidos totales extraídos se seleccionó para preparar el extracto (Tabla 6, sección de resultados) (Kuklinski, 2000; Willoughby, Mills & British Herbal Medicine Association, 1996).

7.3.2.5. Extracción de los principios vegetales.

Se pesaron 200 g, aproximadamente, de material vegetal seco y se colocó en un percolador con 2,000 ml del disolvente seleccionado. Se dejó reposar inicialmente de 24 a 48 horas para permitir la extracción, luego se recogió alrededor del 85% del volumen del líquido y se colocó más disolvente dejando

reposar por 24 a 48 horas, repitiendo el proceso de 5 a 8 veces, hasta que el líquido extraído no presentara mayor coloración (Kuklinski, 2000). El extracto fue concentrado por medio de rotavapor a una temperatura no mayor de 45°C. El extracto concentrado se traspasó a un cristizador para ser colocado en una desecadora, con el fin de eliminar cualquier residuo de disolvente, luego se pesó el extracto seco para determinar el porcentaje de rendimiento tomando en cuenta el peso final del extracto seco dividido el material vegetal pesado, multiplicado por 100 (Harwood & Moody, 1989).

7.3.2.6. Tamizaje fitoquímico de los extractos.

El tamizaje se llevó a cabo según los procedimientos del Laboratorio de Investigación de Productos Naturales (LIPRONAT) (Kuklinski, 2000; Lock, 1994; Ministerio de Sanidad y Consumo, 2002; Sharapin, 2000; Vila & Reing, 2003; Wagner & Bladt, 1984 y WHO, 1998). Se realizó la identificación de metabolitos secundarios presentes en los extractos mediante técnicas micrométricas realizadas por cromatografía en capa fina, utilizando cromatoplasmas de aluminio de sílice gel 60 F₂₅₄ de 10 cm de altura, utilizando la fase móvil, estándares y reveladores de acuerdo al metabolito a identificar, de la siguiente manera.

a. Alcaloides. Se pesó 0.1 g de extracto y se disolvió en 5 ml de metanol, se agregó 1 ml de hidróxido de amonio al 10% (p/v) y acidificó con 2 gotas de ácido clorhídrico 2 N. Se filtró, concentró y aplicó, utilizando como estándar una solución de atropina y papaverina al 1% en metanol. Fase móvil: tolueno-acetato de etilo-dietilamina (70:20:10), se observó sin tratamiento en luz UV 254 nm y 365 nm coloraciones azul o

amarillo y con revelador Dragendorff zonas cafés o naranjas en visible.

b. Flavonoides y antocianinas. Se pesó 1 g de material vegetal seco pulverizado, se agregó 10 ml de metanol, se colocó por 5 minutos en baño María a 60°C. se filtró la solución y se aplicó. Fase móvil: acetato de etilo- ácido fórmico- ácido acético glacial-agua (50:5.5:5.5:13.5). Para antocianinas, se utilizó estándar rojo de sudan, se reveló con anisaldehído- ácido sulfúrico y se calentó 3 minutos a 105°C, se detectó con luz UV visible zonas rojas, azules y moradas. Para flavonoides, se utilizó estándar de quercetina, rutina, ácido clorogénico, kaempferol e hiperósido, se observó bajo luz UV 254 nm fluorescencia azul o amarilla, UV 365 nm fluorescencia amarillo, azul o verde y para la detección con tratamiento se reveló con reactivo de productos naturales NP/PEG.

c. Antraquinonas. Se pesó 0.1 g de extracto, se agregó 5 ml de metanol y disolvió empleando el baño ultrasónico o vórtex; se colocó en baño María (60°C) por 5 minutos. Se filtró y aplicó. Utilizando como estándar solución de antraquinonas 0.1%. Fase móvil: acetato de etilo-metanol-agua (100:17:13), se observó en luz UV 254 nm fluorescencia y 365 nm fluorescencia amarilla o rojo-café, con tratamiento químico: se reveló con hidróxido de potasio al 10%, antraquinonas: zonas rojas en visible y fluorescencia roja en UV 365 nm, antronas y antranolas: zonas amarillas en visible y fluorescencia amarilla en UV 365 nm.

d. Cumarinas. Se pesó 0.1 g de extracto y disolvió con 5 ml de metanol. Se filtró y se concentró hasta 1 ml. Se aplicó y utilizó como estándar canela en metanol al 1%, umbeliferona, cumarina. Fase móvil: tolueno-acetato de etilo (93:7), se observó con luz UV 254 nm fluorescencia y 365 nm

fluorescencia azul o verde-azul y con tratamiento se reveló con hidróxido de potasio 10%, se observó con luz UV 365 nm fluorescencia azul o verde.

e. Saponinas. Se pesó 0.1 g de extracto y disolvió con 10 ml metanol. Se aplicó y utilizó estándar de saponinas 0.1%. Fase móvil: cloroformo-metanol-agua (65:50:10), se reveló con vainillina-ácido sulfúrico, evaluar zonas azules, violetas y amarillentas en visible.

f. Principios amargos. Se pesó 0.1 g de extracto y disolvió con 10 ml de metanol, se filtró y aplicó. Se utilizó estándar de artemisina al 1% en metanol. Fase móvil: cloroformo-metanol (95:5), se reveló con anisaldehído-ácido sulfúrico, se calentó a 100°C durante 5 minutos y se observa en visible o bajo luz UV 365 nm coloraciones rojo-violeta, café-rojizo, azul-verdoso y azul.

g. Taninos. Se pesó 0.1 g de extracto y disolvió con 5 ml de etanol 95%, se dejó reposar por 5 minutos, se filtró y concentró en baño María 60°C, se aplicó y utilizó estándar de solución de taninos 1%. Fase móvil: acetato de etilo-ácido fórmico-ácido acético-agua (17:2:2:5), se observó en luz UV 254 nm fluorescencia y 365 nm fluorescencia azul y con revelador FeCl_3 10%, bandas en espectro visible.

h. Aceites volátiles. Se pesó 0.1 g de extracto y disolvió en 5 ml de metanol y se filtró. Se aplicó y utilizó estándar de mentol, timol, anisaldehído, anetol y 1,8-cineol. Fase móvil: Tolueno-acetato de etilo (93:7), se reveló con anisaldehído-ácido sulfúrico y colocó en horno a 100°C por 5 min y se observó la presencia de zonas azules, verdes, rojas y cafés en el espectro visible.

i. Sesquiterpenlactonas. Se pesó 0.1 g de extracto y disolvió 5 ml de metanol, se filtró y aplicó. Se utilizó como fase

móvil: cloroformo- metanol (99:1), se reveló con vainillina 1% en etanol luego se calentó 5 min a 100°C, observando coloraciones verdes, amarillas, marrones, rojas o azules.

7.3.2.7. Obtención del veneno.

Se utilizó una mezcla de veneno colectado en el serpentario del Instituto Clodomiro Picado (ICP), Universidad de Costa Rica (UCR); el cual se obtiene a partir de un número no menor de 40 especímenes adultos provenientes de la región del Pacífico de Costa Rica. La mezcla de veneno es centrifugada, liofilizada y guardada a -20°C hasta su uso (Saravia-Otten et al., 2015).

7.3.2.8. Disolución de extractos vegetales.

Los extractos vegetales etanólicos, se disolvieron en solución tampón de fosfatos (PBS) pH 7.2 utilizando Tween 80 como emulsionante. Se pesó la cantidad de 1.25 g de extracto y se disolvió en un tubo cónico de 15 ml con PBS y se agregó Tween 80 (5 o 10% v/v) y se agregó 5 ml de PBS. Esta mezcla se agitó en vórtex hasta lograr la mayor disolución del extracto; se completó el volumen final con PBS (10 ml) y se calentó a 37°C en baño María por 30 min, agitando constantemente con una varilla de vidrio. La mezcla se sometió a baño ultrasonido por 15 min y nuevamente se calentó a 37°C en reposo. La disolución se centrifugó a 2,500 rpm por 15 min, después se filtró el sobrenadante. El filtrado se identificó y se almacenó en congelación (-20°C) para su uso posterior, según el procedimiento de Saravia y col. (2001a) con las modificaciones realizadas por Saravia-Otten y col. (2015).

7.3.2.9. Preparación de mezclas a evaluar.

Las mezclas de los extractos etanólicos se realizaron en proporciones iguales (1:1 [p/p] y 1:1:1[p/p/p]) de manera que la solución madre tuviera una concentración de 62.5 µg/µl de cada planta para los ensayos de inhibición de la actividad proteolítica. La solución madre y sus diluciones se prepararon antes de cada ensayo, de tal manera que fueran utilizadas el mismo día. Las mezclas se identificaron de la 1 a la 4 como se indica en la Tabla 4.

Tabla 4

Mezclas de Extractos Vegetales Evaluadas.

<u>Mezcla No.</u>	<u>Concentración de cada extracto^a</u>	<u>Proporción de cada extracto</u>	<u>Composición de la mezcla</u>
1	62.5 µg/µl	1:1	<i>D. contrajerva + E. odoratum</i>
2	62.5 µg/µl	1:1	<i>D. contrajerva + N. lobata</i>
3	62.5 µg/µl	1:1	<i>E. odoratum + N. lobata</i>
4	62.5 µg/µl	1:1:1	<i>D. contrajerva + E. odoratum + N. lobata</i>

Nota: ^a Concentración más alta utilizada en los ensayos a partir de la cual se prepararon diluciones seriadas para obtener el resto de las concentraciones utilizadas (31.25, 15.625, 7.8125 y 3.906 µg/µl)

7.3.2.10. Primera fase: evaluación de actividad intrínseca por medio de ensayos concentración-actividad.

7.3.2.10.1. Determinación de la actividad proteolítica intrínseca de las mezclas de extractos vegetales.

Según el método modificado de Wang, Shih & Huang (2004) con las modificaciones realizadas en Saravia-Otten y col. (2015). Se evaluaron 5 diferentes concentraciones de mezclas de extractos preparadas por dilución seriada en PBS (62.5, 31.25, 15.625, 7.8125 y 3.906 µg/µl) a partir de los extractos previamente disueltos. Por cada concentración de

mezcla de extractos, se preparó en un microtubo de reacción una mezcla de 100 μ l de solución de sustrato (azocaseína 10 mg/ml en solución tampón de trabajo) y 20 μ l de extracto. El control positivo contenía 100 μ l de solución de sustrato y 20 μ l de veneno disuelto en PBS, utilizando 1.25 μ g/ μ l de veneno como concentración reto establecida previamente (Saravia-Otten et al., 2015).

Para eliminar la interferencia del color de los extractos se preparó un control interno para cada dosis a evaluar, el cual contenía 100 μ l de solución tampón de trabajo libre de azocaseína y 20 μ l de cada dosis de mezcla de extractos. Para eliminar la absorbancia debida al Tween-80 se realizó otro control conteniendo 100 μ l solución de sustrato y 20 μ l de diluciones seriadas de PBS-Tween 80 las cuales representan el porcentaje de Tween 80 presente en cada una de las dosis a evaluar. Se preparó un blanco conteniendo 100 μ l solución de sustrato y 20 μ l de PBS.

Los tubos (ensayos y controles) fueron incubados por 90 min en baño María a 37°C. Al terminar la incubación se agregó 200 μ l de ácido tricloroacético a cada tubo; estos fueron mezclados en vórtex y centrifugados a 4,000 rpm. Del sobrenadante de cada tubo se transfirió 150 μ l a una microplaca de titulación de 96 pozos de fondo plano, y se agregó luego a cada pozo 150 μ l de NaOH 0.5 N. El contenido de los pozos se mezcló por agitación suave y se leyó la absorbancia a 450 nm en un espectrofotómetro.

La actividad proteolítica intrínseca de cada mezcla de extractos se calculó de la siguiente manera: a cada ensayo se

le restó el valor de absorbancia del blanco correspondiente, para obtener el valor de absorbancia neta del ensayo a la que se atribuye la actividad proteolítica de la mezcla de extractos sobre el sustrato. Se tomó como el 100% de la actividad proteolítica la absorbancia del control positivo menos la absorbancia del blanco.

7.3.2.11. Segunda fase: ensayo de inhibición

7.3.2.11.1. Evaluación in vitro de la capacidad inhibitoria de las mezclas de extractos ante la actividad proteolítica del veneno.

Según el método modificado de Wang, Shih & Huang (2004) con las modificaciones realizadas en Saravia-Otten y col. (2015). Se prepararon las mezclas veneno:extractos evaluando distintas concentraciones de mezclas (62.5, 31.25, 15.63, 7.81 y 3.90 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), utilizando 1.25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de veneno como concentración reto (CR) establecida previamente por Saravia-Otten y col. (2015). Se preparó un microtubo de reacción para cada concentración de las mezclas de extractos en donde se mezcló 20 μl de mezcla de extractos y 20 μl de veneno, logrando de esta forma distintas relaciones veneno-extracto (1:50, 1:25, 1:12.5, 1:6.75 y 1:3.125). Los microtubos (ensayos y controles descritos en el ensayo de concentración-actividad) fueron incubados por 30 minutos en baño María a 37 °C. Al terminar la incubación se repitieron los pasos descritos en el ensayo concentración-actividad agregando solución de sustrato y buffer de trabajo respectivamente.

7.3.2.12. Interpretación de resultados.

Los resultados de los experimentos de actividad intrínseca se expresaron en términos porcentuales donde 100% corresponde a una actividad de igual magnitud al inducido por

la concentración reto del veneno y 0% corresponde a la actividad observada en el control negativo (sustrato + PBS).

Los resultados de los experimentos de inhibición se expresaron en términos porcentuales donde el 100% corresponde a la inhibición total del efecto evaluado y el 0% a un efecto de igual magnitud al inducido por el veneno (Saravia-Otten et al., 2017).

7.3.3. Metodología de análisis de la información.

7.3.3.1. Definición de variables.

- Variables independientes. Mezclas de extractos de plantas, concentración de mezclas de extractos y dosis control de veneno.
- Variables dependientes. Porcentaje de inhibición de la actividad proteolítica del veneno.
- Variable activa. Actividad proteolítica ejercida por el veneno.

7.3.3.2. Metodología de análisis de resultados.

Los ensayos de actividad proteolítica intrínseca de las cuatro mezclas de extractos se realizaron por triplicado. Los resultados se sometieron a un análisis descriptivo, obteniéndose la media de las tres repeticiones.

Los ensayos de inhibición de la actividad proteolítica del veneno por las cuatro mezclas de extractos vegetales se realizaron por un diseño de bloques, tratamientos (mezclas), bloques (concentraciones ensayadas), los cuales se realizaron en tres días diferentes, con tres réplicas por ensayo, para un total de nueve lecturas. Se realizó un análisis de varianza para determinar si existía diferencia significativa entre los

porcentajes de inhibición alcanzados por cada una de las mezclas evaluadas. Al determinarse la existencia de diferencias significativas entre los porcentajes de inhibición entre mezclas, se procedió a realizar la prueba de pares de Tukey por medio del software Minitab18, comparando entre sí las cuatro mezclas por cada concentración evaluada. La prueba determinó cuales mezclas diferían significativamente entre sí en cuanto a su actividad proteolítica a una misma concentración.

Los resultados de las pruebas de inhibición de proteólisis se sometieron a un análisis de regresión lineal (concentración/actividad), para determinar el modelo de mejor ajuste con un nivel de error $\alpha = .05$. Con base en este modelo se obtuvo la ecuación de la recta y se calculó para cada mezcla de extractos la CE_{50} con un intervalo de confianza del 95%. El análisis del tamizaje fitoquímico se realizó de forma descriptiva.

8. RESULTADOS

Se realizó la recolección de los órganos de interés de las tres plantas seleccionadas para el estudio (*Dorstenia contrajerva* (L.), *Eupatorium odoratum* (L.) y *Neurolaena lobata* (L.) Cass), mediante muestreo por conveniencia en los departamentos de Suchitepéquez, Alta Verapaz y Guatemala. Los datos de colecta y la georreferencia se muestran en la Tabla 5 y Anexo 1. El material vegetal colectado fue transportado, secado y molido siguiendo las buenas prácticas de colecta (WHO, 1998).

Tabla 5

Datos de Recolección de las Plantas

<u>Familia / Especie</u> (número de registro) ^a	<u>Nombre</u> <u>común</u>	<u>Parte</u> <u>colectada</u>	<u>Lugar de colecta</u> <u>Coordenadas</u> <u>Altitud</u>
Moraceae / <i>Dorstenia contrajerva</i> (L.) (BIGU72573)	Contrahierba	Hojas	Ecoparcela el Kakawatal, Samayac, Suchitepéquez N 14° 33' 08.4", O 091° 28' 02.8" 453 msnm ^b
Asteraceae / <i>Eupatorium odoratum</i> (L.) (BIGU 72564)	Bacché	Hojas	Centro universitario del norte Zona 5, Cobán, Alta Verapaz N 15° 27' 59.6", O 090° 23' 16.0" 1320 msnm ^b
Asteraceae / <i>Neurolaena lobata</i> (L.) Cass (BIGU 72565)	Tres puntas	Hojas	Centro experimental docente de agronomía, ciudad universitaria zona 12, ciudad de Guatemala, Guatemala N 14° 34' 47.2", O 90° 33' 13.8" 1485 msnm ^b

Nota.^aHerbario BIGU de la Escuela de Biología, Universidad de San Carlos de Guatemala. ^bmsnm: metros sobre el nivel del mar.

Se realizó la prueba de mejor solvente, en donde se evaluaron diferentes concentraciones de etanol (30, 50, 70 y 95%), para seleccionar la concentración que permite la mejor extracción de sólidos totales, según Kuklinski (2000). En la Tabla 6 se muestra los diferentes porcentajes de sólidos obtenidos. El criterio de selección fue el mayor porcentaje de sólidos recuperados y cuando la diferencia no es mayor a 10% se prefiere el etanol a mayor concentración ya que esto permite

una concentración más rápida del extracto en el rotavapor. Se escogió etanol 30% para *D. contrajerva*, etanol 50% para *E. odoratum* y etanol 50% para *N. lobata*. En el caso de *N. lobata* se escogió etanol al 50% ya que con etanol al 30% solo se logró 1.9% más de extracción de sólidos.

Tabla 6

Prueba de Mejor Solvente

<u>Especie</u>	<u>Porcentaje de etanol</u>	<u>Porcentaje de sólidos</u>	<u>Concentración seleccionada</u>
<i>Dorstenia contrajerva</i>	30	1.04	30%
	50	0.36	
	70	0.80	
	95	0.01	
<i>Eupatorium odoratum</i>	30	1.05	50%
	50	1.64	
	70	1.14	
	95	0.73	
<i>Neurolaena lobata</i>	30	1.05	50%
	50	1.03	
	70	0.58	
	95	0.23	

Seguidamente se prepararon los extractos etanólicos por el método de percolación, agregando la concentración de etanol seleccionada previamente. Se percoló por 24 horas, los menstros extraídos se concentraron en rotavapor y los extractos concentrados se colocaron en desecadora para extraer la humedad residual. Al obtener el extracto seco se pesó y determinó el porcentaje de rendimiento (Tabla 7), el mejor porcentaje de rendimiento se obtuvo con *N. lobata*.

Tabla 7

Porcentaje de Rendimiento

<u>Extracto</u>	<u>Extracto obtenido</u> (g)	<u>Rendimiento</u> (%)
<i>Dorstenia contrajerva</i>	69.10	23
<i>Eupatorium odoratum</i>	73.97	37
<i>Neurolaena lobata</i>	82.23	41

Con el fin de evaluar si existe sinergia entre extractos vegetales, bajo la premisa reportada por diferentes investigadores en donde exponen que las especies vegetales utilizadas como antídotos para la mordedura de serpiente son utilizadas en mezclas y no de forma individual (Hay, 2002; Otero et al., 2000; Saravia et al., 2001a), se procedió a preparar cuatro diferentes mezclas de extractos etanólicos en proporción 1:1 p/p y 1:1:1 p/p/p utilizando las tres especies vegetales (Tabla 4).

En la primera fase del estudio se evaluó la actividad proteolítica intrínseca de las mezclas de extractos vegetales, para lo cual se incubaron las cuatro mezclas de los extractos utilizando azocaseína como sustrato según la metodología descrita por Wang y col. (2004) adaptado por Saravia-Otten y col. (2015), en la que se mide la hidrólisis del sustrato mediante la lectura de absorbancias. Se determinó que ninguna de las cuatro mezclas posee actividad proteolítica intrínseca bajo las condiciones de trabajo, por lo que se procedió a evaluar su capacidad inhibitoria del efecto proteolítico del veneno.

Para ello, se incubó la concentración reto (CR) del veneno (1.25 µg/µl) con concentraciones variables de extractos (3.01 - 62.50 µg/µl), en relaciones veneno:extractos desde 1:3.12 hasta 1:50 (p:p). Se preparó un control positivo conteniendo la CR de veneno y un control negativo con PBS. Los resultados se presentan en la Tabla 8, en donde se observa que las mezclas de dos plantas (*D. contrajerva* + *N. lobata* y *E. odoratum* + *N. lobata*) y la de tres plantas (*D. contrajerva* + *E. odoratum* + *N. lobata*) inhibieron efectivamente ($\geq 50\%$) el efecto proteolítico del veneno (Anexo 2). Las relaciones veneno:extractos que resultaron efectivas fueron 1:50 y 1:25 (p:p) para la mezcla *D. contrajerva* + *E. odoratum* + *N. lobata* y 1:50 (p:p) para las que contenían *D. contrajerva* + *N. lobata* y *E. odoratum* + *N. lobata* (Tabla 8). En la misma Tabla puede observarse que la mezcla compuesta por *D. contrajerva* y *E. odoratum* tiene un efecto inhibitorio muy pobre (<26%) aún a la proporción más alta evaluada en el estudio.

Tabla 8

Capacidad de Cuatro Mezclas de Extractos para Inhibir la Actividad Proteolítica del Veneno de B. asper

<u>Concentración de cada extracto en la mezcla (µg/µl)¹</u>	<u>Porcentaje de inhibición del efecto proteolítico por las mezclas</u>			
	<u>Media² (DE)³ [IC 95%]⁴</u>			
	<u><i>D. contraierva</i> + <i>E. odoratum</i></u>	<u><i>D. contraierva</i> + <i>N. lobata</i></u>	<u><i>E. odoratum</i> + <i>N. lobata</i></u>	<u><i>D. contraierva</i> + <i>E. odoratum</i> + <i>N. lobata</i></u>
62.50	22.39 (4.97) ^c [18.57, 26.21]	51.16 (4.20) ^b [47.93, 54.39]	63.49 (3.34) ^a [60.92, 66.05]	67.34 (5.05) ^a [63.46, 71.22]
31.25	20.37 (5.11) ^c [16.45, 24.30]	17.99 (4.94) ^b [14.19, 21.79]	37.96 (5.22) ^b [33.94, 41.97]	51.03 (8.67) ^a [44.37, 57.70]
15.63	17.18 (3.38) ^b [14.59, 17.78]	2.64 (2.55) ^b [0.68, 4.60]	30.81 (4.74) ^a [27.17, 34.46]	32.02 (4.33) ^a [28.69, 35.34]
7.81	6.40 (1.80) ^c [5.01, 7.78]	0.17 (0.33) ^b [0.00, 4.60]	13.11 (4.14) ^a [9.93, 16.29]	20.79 (1.60) ^a [19.56, 22.03]
3.91	0.57 (1.18) ^b [0.00, 1.42]	0.00 (0.00) ^b --	7.68 (5.91) ^a [3.14, 12.22]	16.78 (5.34) ^a [12.68, 20.88]

*Nota.*¹Concentración de cada uno de los componentes de la mezcla en proporciones 1:1 (p/p) para mezclas de dos plantas, y 1:1:1 (p/p/p) para mezcla de tres, disueltas en el volumen total de cada ensayo. Las concentraciones equivalen a distintas relaciones veneno:extractos (1:50, 1:25, 1:12.5, 1:6.25 y 1:3.125) ²Se reporta el promedio del porcentaje de inhibición de tres experimentos independientes realizados por triplicado (n=9). ³Desviación estándar. ⁴Valores que delimitan el intervalo de confianza al 95%. ^{abc}Las medias que no comparten la misma letra son significativamente diferentes entre sí, la prueba de comparaciones en pares de Tukey se realizó para cada concentración entre mezclas ensayadas.

El análisis de los datos obtenidos en las pruebas de inhibición del efecto proteolítico del veneno se realizó mediante el modelo de regresión lineal de las curvas de concentración-actividad con un nivel de error $\alpha=.05$. Con base en estos datos se obtuvo la ecuación de la recta que mejor describe la relación entre la concentración de la mezcla y la respuesta de inhibición. Con la ecuación obtenida se calculó para cada mezcla la concentración efectiva media (CE₅₀) con un intervalo de confianza de 95% (IC 95%) (Tabla 9). El análisis de varianza de dos factores ($\alpha=.05$) demostró que al menos una de las mezclas estudiadas posee capacidad antiproteolítica significativamente diferente a la que tienen las otras mezclas del estudio ($p<.01$). Por ello, se procedió a realizar la comparación de pares de Tukey,

para determinar cuáles mezclas y a cuáles concentraciones variaban significativamente en cuanto a su capacidad inhibitoria del efecto proteolítico del veneno (Tabla 8). Se encontró que las mezclas conformadas por *D. contrajerva* + *E. odoratum* + *N. lobata* y *E. odoratum* + *N. lobata* fueron similares en cuanto a su capacidad inhibitoria, presentando diferencia únicamente cuando se evaluaron a la concentración de 31.25 µg/µl.

En los resultados del análisis de regresión lineal (Tabla 9), se observó que la mezcla de tres plantas (*D. contrajerva*, *E. odoratum* y *N. lobata*) presentó la CE_{50} más baja (38.45 µg/µl, IC95% [31.46, 47.17]) lo que significa que se requiere menor concentración de las plantas para lograr inhibir el 50% del efecto evaluado del veneno, y por lo tanto es la que tiene mayor potencia inhibitoria.

Tabla 9

*Concentración Efectiva Media (CE_{50}) de las Mezclas de Extractos Etanólicos para Inhibir el Efecto Proteolítico del Veneno de *B. asper*.*

<u>Mezcla de extractos etanólicos^a</u>	<u>Inhibición de la actividad proteolítica del veneno</u>				
	<u>Ecuación^b</u>	<u>r^{2c}</u>	<u>p^d</u>	<u>IC 95%^e</u>	<u>CE₅₀ [IC95%]^f</u>
<i>D. contrajerva</i> + <i>E. odoratum</i>	y= 0.324x + 5.530	.573	<.001	Límite inferior y= 0.410x + 8.308 Límite superior y= 0.238x + 2.751	137.17 [101.61, 198.45]
<i>D. contrajerva</i> + <i>N. lobata</i>	y= 0.907x – 7.575	.955	<.001	Límite inferior y= 0.967x – 5.627 Límite superior y= 0.847x – 9.523	63.48 [57.50, 70,31]
<i>E. odoratum</i> + <i>N. lobata</i>	y= 0.908x + 8.622	.905	<.001	Límite inferior y= 0.998x + 11.535 Límite superior y= 0.818x + 5.708	45.58 [38.53, 54.17]
<i>D. contrajerva</i> + <i>E. odoratum</i> + <i>N. lobata</i>	y= 0.872x + 16.447	.887	<.001	Límite inferior y= 0.968x + 19.564 Límite superior y= 0.776x + 13.390	38.45 [31.46, 47.17]

Nota.^aLas mezclas fueron preparadas en proporción 1:1 p/p y 1:1:1 p/p/p para cada ensayo.

^bEcuación que representa el modelo de regresión lineal que mejor describe el comportamiento de los resultados obtenidos. ^cCoefficiente de determinación. ^dModelo de regresión lineal significativo a un nivel de confianza de $\alpha=.05$. ^eEcuaciones que delimitan el intervalo de confianza al 95% de la ecuación del modelo de regresión lineal. ^fConcentración efectiva media expresada en µg de cada extracto/µl de mezcla total, entre corchetes se muestran los valores de los intervalos de confianza.

Con el objetivo de correlacionar la presencia de los metabolitos secundarios que pueden ser los responsables de la bioactividad presentada por los extractos, se realizaron pruebas para determinar la presencia de metabolitos a los cuales se les ha atribuido propiedades antiofídicas, tales como alcaloides, antraquinonas, flavonoides, antocianinas, cumarinas, saponinas, principios amargos, taninos, aceites esenciales y sesquiterpenlactonas. El análisis fitoquímico se realizó mediante cromatografía en capa fina y ensayos macro y semimicrométricos como se describe en la sección de metodología. En la Tabla 10 puede observarse que todos los extractos presentaron alcaloides, antraquinonas, flavonoides, antocianinas, saponinas, principios amargos y sesquiterpenlactonas en su composición química, no se observaron las cumarinas en *E. odoratum* y los aceites esenciales en *D. contrajerva*. Por otro lado, ninguno de los extractos mostró la presencia de taninos. Los resultados se muestran detalladamente en el Anexo 3.

Tabla 10

Tamizaje Fitoquímico de Plantas Evaluadas

<u>Prueba</u>	<u><i>D. contrajerva</i></u>	<u><i>E. odoratum</i></u>	<u><i>N. lobata</i></u>
Alcaloides	+	+	+
Antraquinonas	+	+	+
Flavonoides	+	+	+
Antocianinas	+	+	+
Cumarinas	+	-	+
Saponinas	+	+	+
Principios amargos	+	+	+
Taninos	-	-	-
Aceites esenciales	-	+	+
Sesquiterpenlactonas	+	+	+

Nota. La ausencia se representa con "-". La presencia de metabolitos se representa con "+", estos fueron identificados según las metodologías descritas en la sección de materiales y métodos.

9. DISCUSION

El accidente ofídico está catalogado por la Organización Mundial de la Salud como una de las 20 enfermedades tropicales desatendidas prioritarias (Gutiérrez et al., 2015). Es difícil determinar la situación real del accidente ofídico, sin embargo, se estima que en Centroamérica cada año ocurren aproximadamente 5,500 casos. Estas cifras podrían elevarse, debido a que sucede con mayor frecuencia en áreas rurales, en donde se dificulta monitorear el número exacto de víctimas, ya que, al no acudir a un centro de salud, les vuelve invisibles a las estadísticas del país (Giovannini & Howes, 2017; Gutiérrez, 2014a).

En Guatemala, como en los otros países de América Latina, los problemas de accesibilidad geográfica o económica dificultan la atención hospitalaria del accidente ofídico y la aplicación de antiseros efectivos que contrarresten el envenenamiento, por lo que muchos afectados son tratados por chamanes o curanderos que utilizan antídotos preparados con plantas medicinales según sus recetas tradicionales (Hay, 2002; Saravia et al., 2001a).

Las manifestaciones clínicas del envenenamiento por *B. asper* son causadas principalmente por metaloproteinasas dependientes de zinc (SVMPs), fosfolipasas A₂ (PLA₂) (Angulo & Lomonte, 2009) y serina proteinasas (Pérez et al., 2008; Yong-Hong et al., 2003). Las SVMPs son enzimas proteolíticas que digieren componentes de la matriz extracelular y lámina basal del endotelio, produciendo isquemia, hemorragia local, edema y sangrado sistémico (Delgado & Del Brutto, 2012; Gutiérrez, Escalante & Rucavado, 2009; Otero-Patiño, 2009).

En el estudio de Saravia y colaboradores (2001a) se realizaron pruebas de inhibición sobre algunos de los efectos del veneno de *B. asper* (letal, hemorrágico, coagulante y actividad fosfolipasa A₂) de extractos acuosos y etanólicos de las especies *Neurolaena lobata*, *Eupatorium odoratum* y *Dorstenia contrajerva* de manera individual. Los resultados demostraron que ninguno de los extractos inhibió efectivamente el efecto hemorrágico del veneno en ratones, siendo el extracto

acuoso de *N. lobata* el único que mostró algún efecto antihemorrágico (27%). Así mismo, ninguna de las especies del estudio logró neutralizar la dosis letal en ratones, por lo que los autores concluyeron que no podía recomendarse su uso aislado hasta realizarse más estudios de validación. En el mismo estudio se reportó que los antidotos preparados por los chamanes que fueron entrevistados en el área norte de Guatemala pueden contener varias especies vegetales en su composición, cada una de ellas en distintas proporciones, dependiendo del curandero que los prepare (Hay, 2002; Saravia et al., 2001a). Por esta razón, en el presente estudio se evaluó la capacidad inhibitoria del efecto proteolítico del veneno de *B. asper* por mezclas preparadas con extractos etanólicos de las tres especies del estudio de Saravia y colaboradores (2001a).

Los resultados de este estudio mostraron que las mezclas conformada por *D. contrajerva* + *E. odoratum* + *N. lobata* (1:1:1 p:p:p), y por *E. odoratum* + *N. lobata* (1:1 p:p) poseen mayor potencia de inhibición del efecto proteolítico del veneno en comparación con las otras mezcla (*D. contrajerva* + *E. odoratum* [1:1 p:p] y *D. contrajerva* + *N. lobata* [1:1 p:p]), ya que las dos primeras tienen una CE₅₀ de 38.45 µg/µl IC95% [31.46, 47.17] y 45.58 µg/µl IC95% [38.53, 54.17] respectivamente, en comparación con la CE₅₀ de 137.17 µg/µl IC95% [101.61, 198.45] para la mezcla *D. contrajerva* + *E. odoratum* y 63.48 µg/µl IC95% [57.50, 70.31] para la mezcla *D. contrajerva* + *N. lobata*.

El aumento de la capacidad inhibitoria de las mezclas *E. odoratum* + *N. lobata* y *D. contrajerva* + *E. odoratum* + *N. lobata* podría atribuirse a una acción sinérgica entre los metabolitos de las especies vegetales que las conforman, ya que el efecto sinérgico se conoce como el efecto que se observa al combinar sustancias que actúan mejor en conjunto, que al usarlas individualmente (Williamson, 2001). Aunque la inhibición del efecto proteolítico del veneno sobre sustratos como la azocaseína no sustituye a la prueba de hemorragia local en ratones (Gutiérrez et al., 2017), existen estudios en donde los extractos de plantas que lograron la inhibición de la proteólisis in vitro también neutralizaron el efecto hemorrágico en modelos animales (Patiño et al, 2013; Preciado, Comer, Núñez, Rey-Suárez &

Pereañez, 2018). Estos hallazgos indican que es factible que las mezclas evaluadas en este estudio puedan inhibir el efecto hemorrágico del veneno en ratones.

Las combinaciones de extractos vegetales se han empleado históricamente en formulaciones basadas en la experiencia, cuando el sinergismo es conocido o se sospecha de su existencia, utilizando mezclas de especies vegetales para lograr el efecto terapéutico como sucede en combinaciones mundialmente conocidas como el caso de Ginseng y Ginko (*Panax ginseng* + *Ginkgo biloba*) o *Piper methysticum* + *Valeriana officinalis* (Williamson, 2001; Gilbert & Ferreira, 2003).

Según el análisis de varianza de los resultados, en conjunto con la prueba de pares de Tukey realizados en este estudio, se concluye que los mayores porcentajes de inhibición del efecto proteolítico del veneno se lograron al utilizar las mezclas que contenían *D. contrajerva* + *E. odoratum* + *N. lobata* y *E. odoratum* + *N. lobata*, las cuales no presentaron diferencia significativa entre sí, excepto a la concentración de 31.25 µg/µl (Tabla 8). El otro par de mezclas (*D. contrajerva* + *N. lobata* y *D. contrajerva* + *E. odoratum*) presentaron diferencias en las concentraciones ensayadas, siendo la mezcla de *D. contrajerva* + *E. odoratum* la que obtuvo menor porcentaje de inhibición.

Las mezclas que demostraron ser más eficaces en base a su CE₅₀ contienen en su composición los extractos etanólicos de *N. lobata* y *E. odoratum*, lo que puede sugerir que los metabolitos de una o ambas plantas tienen mayor capacidad para inhibir el efecto proteolítico in vitro de las SVMPS del veneno de *B. asper*, generando posibles efectos sinérgicos al momento de trabajar en conjunto, ya que se observó un efecto significativamente diferente al utilizarse cada una por separado en combinación con *D. contrajerva*. Estas observaciones apoyan la idea de que se obtendrían resultados diferentes según las plantas que los chamanes mezclen en sus recetas tradicionales (Otero et al., 2000; Saravia et al., 2015).

La actividad antiproteolítica observada puede explicarse en gran parte por los metabolitos secundarios presentes en la composición química de cada uno de los

extractos, en los que se observó la presencia de flavonoides, antocianinas y saponinas.

Estos metabolitos han sido identificados como posibles responsables de la actividad antiproteolítica en otros estudios con venenos de serpientes. El estudio de Castro y col (1999) en Costa Rica, identificó la presencia de flavonas y antocianinas en los extractos vegetales que inhibieron totalmente la actividad hemorrágica del veneno de *B. asper* en ratones, sugiriendo que este efecto se debía a la inhibición de las SVMs. En Colombia, Preciado y col. (2018) demostraron que el flavonoide miricetina inhibió específicamente la actividad proteolítica y hemorrágica de la metaloproteínasa más abundante del veneno de la serpiente *B. atrox*, confirmando la publicación previa de Parellada, Suarez & Guinea (1998) en donde se estableció que los flavonoides y compuestos fenólicos relacionados inhiben a las metalopeptidasas dependientes de zinc. Así mismo, en la revisión de Santhosh y col (2013) se reporta que los terpenoides, saponinas, fenoles y flavonoides aislados de productos naturales inhiben a las SVMs de serpientes del género *Bothrops*. El estudio realizado por Januario y col (2004) utilizando el diterpenoide Bt-CD de tipo clerodano, mostró actividad anti-hemorrágica y anti-proteolítica del veneno de serpientes *Bothrops* de Sudamérica.

Se han descrito dos mecanismos por los cuales los compuestos fenólicos pueden actuar como antivenenos mediante la inhibición de metaloproteinasas dependientes de zinc, los cuales suceden por interacción directa con el sitio activo de las metaloproteinasas. Un mecanismo propuesto sucede quelando el ion Zn^{+2} de forma similar a como lo hace el EDTA, según han sugerido Nithitanakool y col (2009). El otro mecanismo propuesto por Pithayanukul y col (2009) es la capacidad de formar fuertes puentes de hidrogeno cercanos al sitio activo, dando como resultado la inhibición de la actividad enzimática por bloqueo del sitio activo e interacción con el ion Zn^{+2} .

Son varios los estudios en donde se ha recopilado el uso etnobotánico de las especies de la presente investigación para el tratamiento de la mordedura de

serpiente (Félix-Silva, Silva-Junior, Zucolotto & Fernandes-Pedrosa, 2017; Giovannini & Howes, 2017; Hay, 2002), los cuales coinciden en que las partes empleadas son hojas, tallos y partes aéreas, resaltando su uso externo y en algunos casos uso interno. Las plantas se aplican en cataplasmas, emplastos, infusiones o decocciones para ser ingeridas o lavar el área afectada (Anexo 5), utilizando varias plantas a la vez, según reportó Hay (2002).

En el caso de Guatemala, se puede mencionar que el uso reportado para las hojas de *N. lobata* es por medio de cataplasma siendo masticadas inicialmente por el paciente y luego aplicadas sobre la mordedura (Hay, 2002; Saravia et al, 2001a). De esta especie también se han reportado otras actividades biológicas como cicatrizante y antiinflamatorio que pueden contribuir a la recuperación del paciente (McKinnon et al., 2014).

Es necesario realizar pruebas más específicas para evaluar la efectividad de las mezclas más promisorias de esta investigación, para inhibir los efectos sistémicos producidos por el veneno como la defibrinogénesis producida por su acción procoagulante, hemorragia, letalidad y actividad PLA₂; ya que dichas pruebas se sugieren como parámetros para el control de la potencia y efectividad de los antivenenos (Gutiérrez, Lomonte, Sanz, Calvete & Pla, 2014). Los resultados de este tamizaje determinarán científicamente el verdadero valor terapéutico de estas plantas en el tratamiento temprano del envenenamiento por *B. asper*.

Así mismo, para garantizar el uso seguro de las mezclas evaluadas en este estudio, deberá determinarse en futuras investigaciones su toxicidad, así como también deberá estandarizarse la forma y dosis en la que deberán administrarse.

10. CONCLUSIONES

- 10.1. Tres mezclas de las cuatro mezclas evaluadas de tres extractos vegetales inhibieron más del 50% del efecto proteolítico del veneno de *B. asper*, siendo la mejor la mezcla conformada por *D. contrajerva* + *E. odoratum* + *N. lobata*, por lo tanto, se acepta la hipótesis del estudio.
- 10.2. Se observó que las mezclas de *D. contrajerva* + *E. odoratum* + *N. lobata* y *E. odoratum* + *N. lobata* fueron las más eficaces para inhibir el efecto proteolítico ($\geq 50\%$) del veneno de *B. asper* a la mayor concentración evaluada.
- 10.3. Se evidenció la presencia de flavonoides, antocianinas, y saponinas en la composición química de las especies evaluadas, principios activos a los que se les ha atribuido previamente la capacidad para inhibir el efecto de las SVMPs del veneno de *B. asper* en estudios similares.

11. RECOMENDACIONES

- 11.1. Evaluar las mezclas de extractos del estudio con pruebas específicas que permitan observar su capacidad para inhibir los efectos locales del veneno de *B. asper* no estudiados en esta investigación, tales como hemorragia local, inflamación o edema.
- 11.2. Realizar estudios de toxicidad para garantizar el uso seguro de los extractos vegetales individuales y en mezclas.
- 11.3. Realizar un fraccionamiento de los extractos de *D. contrajerva*, *E. odoratum* y *N. lobata*, para una separación selectiva de los posibles metabolitos secundarios responsables de la actividad antiofídica, para su posterior identificación.
- 11.4. Siendo *N. lobata* la especie en común en las mezclas promisorias de este estudio, realizar estudios in silico de las moléculas que se han reportado con actividad antiofídica, para identificar su relación estructura–actividad elucidando el mecanismo de acción.

12. REFERENCIAS

- Alagón, A., Molinar, R., Possani, L., Fletcher, P., Cronan, J. & Julia, J. (1980). Venom from the snake *Bothrops asper* Garman. Purification and characterization of three phospholipases A₂. *Biochemical Journal*, 185,695–704.
- Alape-Girón, A., Sanz, L., Escolano, J., Flores-Díaz, M., Madrigal, M., Sasa, M. & Calvete, J.J., (2008). Snake venomomics of the lance head pit viper *Bothrops asper*. Geographic, individual and ontogenetic variations. *Journal of Proteome Research*, 7, 3556–3571
- Angulo, Y. & Lomonte, B. (2009). Biochemistry and toxicology of toxins purified from the venom of the snake *Bothrops asper*. *Toxicon*, 54(7), 949–957. doi: 10.1016/j.toxicon.2008.12.014
- Aragón-Ortiz, F. & Gubenšek, F. (1978). *Characterization of thrombin-like proteinase from Bothrops asper venom. In: Rosenberg. Toxins: Animal, Plant and Microbial.* Pergamon Press, Oxford, 107–111.
- Aragón-Ortiz, F. & Gubenšek, F. (1987). Characterization of a metalloproteinase from *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom. *Toxicon*, 25, 759–766.
- Bolaños, R. (1982). Las serpientes venenosas de centroamerica y el problema del ofidismo. *Revista Costarricense de Ciencias Médicas*, 26, 165–184.
- Borges, M. H., Soares, A. M., Rodrigues, V. M., Oliveira, F., Fransheschi, A. M., Rucavado, A., ... Homsí-Brandeburgo, J. R. (2001). Neutralization of proteases from *Bothrops* snake venoms by the aqueous extracto from *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae). *Toxicon*, 39, 1863-1869.
- Campbell, J. A. & Lamar, W. W. (2004). *The Venomous Reptiles of the Western Hemisphere.* Ithaca and London: Cornell University Press.
- Castro, O., Gutiérrez, J., Barrios, M., Castro, I., Romero, M. & Umaña, E. (1999). Neutralización del efecto hemorrágico inducido por veneno de *Bothrops*

- asper* (Serpientes: Viperidae) por extractos de plantas tropicales. *Revista de Biología Tropical*, 47(3), 605–616.
- Cavalcante, W. L., Campos, T. O., Dal Pai-Silva, M., Pereira, P., Oliveira, C., Soares, A., & Gallacci, M. (2007). Neutralization of snake venom phospholipase A2 toxins by aqueous extract of *Casearia sylvestris*(Flacourtiaceae) in mouse neuromuscular preparation. *Journal of Ethnopharmacology*, 112(3), 490–497. doi:10.1016/j.jep.2007.04.002
- Chippaux, J. (1991). Snake Venom Variability: Methods of Study, Results and Interpretation. *North*, 29(11), 1279–1303.
- Cintra-Francischinelli, M., Caccin, P., Chiavegato, A., Pizzo, P., Carmignoto, G., Angulo, Y., ... Montecucco, C. (2010). Bothrops snake myotoxins induce a large efflux of ATP and potassium with spreading of cell damage and pain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(32), 14140–14145. doi:10.1073/pnas.1009128107
- De Lozoya, A. (1994). *Envenenamientos por animales*. Madrid, España: Ediciones Díaz de Santos.
- de Moura, V., Serra, A., Veras, R., Varjão, J., Almeida, J., de Sousa R., ... Dos-Santos M. (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.
- Delgado, M., & Del Brutto, O. (2012). Case report: Reversible posterior leukoencephalopathy in a venomous snake (*Bothrops asper*) bite victim. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 86(3), 496–498. doi:10.4269/ajtmh.2012.11-0610
- Escalante, T., Ortiz, N., Rucavado, A., Sanchez, E., Richardson, M., Fox, J., & Gutiérrez, J. (2011). Role of collagens and perlecan in microvascular stability: Exploring the mechanism of capillary vessel damage by snake venom

metalloproteinases. *PLoS ONE Journal*, 6(12).
doi:10.1371/journal.pone.0028017

- Félix-Silva, J., Silva-Junior, A., Zucolotto, S., & Fernandes-Pedrosa, M. (2017). Medicinal plants for the treatment of local tissue damage induced by snake venoms: an overview from traditional use to pharmacological evidence. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2017, 1 – 52. doi:10.1155/2017/5748256
- Ferlan, I. & Gubenšek, F. (1978). Phospholipases of *Bothrops asper* venom. *Periodicum Biologorum Journal*, 80, 31–36.
- Fernández, J., Caccin, P., Koster, G., Lomonte, B., Gutiérrez, J., Montecucco, C. & Postle, A. D. (2013). Muscle phospholipid hydrolysis by *Bothrops asper* Asp49 and Lys49 phospholipase A2 myotoxins - Distinct mechanisms of action. *FEBS Journal*, 280(16), 3878–3886. doi:10.1111/febs.12386
- Gilbert, B. & Ferreira L. (2003). Synergy in Plant Medicines. *Current Medicinal Chemistry*, 10, 13-20.
- Giovannini, P. & Howes M.(2017). Medicinal plants used to treat snakebite in Central America: Review and assessment of scientific evidence. *Journal of Ethnopharmacology*, 199, 240-256 doi: 10.1016/j.jep.2017.02.011
- Gómez-Betancur, I., Benjumea, D., Patiño, A., Jiménez, N. & Osorio, E. (2014). Inhibition of the toxic effects of *Bothrops asper* venom by pinostrobin, a flavanone isolated from *Renealmia alpinia* (Rottb.) MAAS. *Journal of Ethnopharmacology*, 155(3), 1609–1615. doi:10.1016/j.jep.2014.08.002
- Gutiérrez, J. (2014a). Current challenges for confronting the public health problem of snakebite envenoming in Central America. *Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 20(7). doi:10.1186/1678-9199-20-7
- Gutiérrez, J. (2014b). Reducing the impact of snakebite envenoming in latin America and the Caribbean: Achievements and challenges ahead. *Transactions of the*

Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 108(9), 530–537.
doi:10.1093/trstmh/tru102

Gutiérrez, J., Chaves, F. & Bolaños, R. (1980). Estudio comparativo de venenos de ejemplares recién nacidos y adultos de *Bothrops asper*. *Revista de Biología Tropical*, 28, 341–351.

Gutiérrez, J., Gené, A., Rodas, G. & Cerdas, L., (1985). Neutralization of proteolytic and hemorrhagic activities of Costarican snake venoms by a polyvalent antivenom. *Toxicon*, 23(6), 887–893. doi:10.1016/0041-0101(85)90380-0

Gutiérrez, J., Lomonte, B., Chaves, F., Moreno, E. & Cerdas, L. (1986). Pharmacological activities of a toxic phospholipase A isolated from the venom of the snake *Bothrops asper*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 84C, 159-164

Gutiérrez, J. & Lomonte, B. (1995). Phospholipase A2 myotoxins from *Bothrops asper* snake venoms. *Toxicon*, 33, 1405–1424.

Gutiérrez, J., Theakston, R. & Warrell, D. (2006). Confronting the neglected problem of snake bite envenoming: The need for a global partnership. *PLoS Medicine*, 3(6), 0727–0731. doi: 10.1371/journal.pmed.0030150

Gutiérrez, J., Escalante, T. & Rucavado, A. (2009). Experimental pathophysiology of systemic alterations induced by *Bothrops asper* snake venom. *Toxicon*, 54(7), 976–987. doi:10.1016/j.toxicon.2009.01.039

Gutiérrez, J., Williams, D., Fan, H. & Warrell, D. (2010). Snakebite envenoming from a global perspective: Towards an integrated approach. *Toxicon*, 56(7), 1223–1235. doi:10.1016/j.toxicon.2009.11.020

Gutiérrez, J., Lomonte, B., Sanz, L., Calvete, J. & Pla, D. (2014). Immunological profile of antivenoms: Preclinical analysis of the efficacy of a polyspecific antivenom through antivenomics and neutralization assays. *J. Proteom.* 105, 340–350.

- Gutiérrez, J., Burnouf, T., Harrison, R., Calvete, J., Brown, N., Jensen, S., Warell, D. & Williams, D. (2015). A call for incorporating social research in the global struggle against snakebite. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 9 (9) doi: 10.1371/journal.pntd.0003960
- Gutiérrez, J., Solano, G., Pla, D., Herrera, M., Segura, A., ... Calvete, J. (2017). Preclinical evaluation of the efficacy of antivenoms for snakebite envenoming: state-of-the-art and challenges ahead. *Toxins*, 9(5), 163–185. doi:10.3390/toxins9050163
- Harwood, L. & Moody, C. (1989). *Experimental organic chemistry: Principles and Practice*. Wiley-Blackwell
- 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*. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala, Service Coopération au Développement, Institut de recherche pour le développement. .
- Hernández, R., Cabalceta, C., Saravia-Otten, P., Chaves, A., Gutiérrez, J. & Rucavado, A. (2011). Poor regenerative outcome after skeletal muscle necrosis induced by *Bothrops asper* venom: Alterations in microvasculature and nerves. *PLoS ONE Journal*, 6(5). doi:10.1371/journal.pone.0019834
- Januario, A., Santos, S., Marcussi, S., Mazzi, M., Pietro, R., Sato, D, Ellena, J., Sampaio, S., França, S. & Soares, A. (2004). Neo-clerodane diterpenoid, a new metalloprotease snake venom inhibitor from *Baccharis trimera* (Asteraceae): antiproteolytic and anti-hemorrhagic properties. *Chemico-Biological Interactions*, 150(3), 243-51.
- Jiménez-Porras, J. (1970). Biochemistry of snake venoms. *Clinical Toxicology*, 3, 389–431.
- Kuklinski, C. (2000). *Farmacognosia. Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural*. Barcelona: Omega

- Lock, O. (1994). *Investigación fitoquímica*. (2ª. Ed). Fondo editorial. Perú.
- Lomonte, B. & Carmona, E. (1992). Individual expression patterns of myotoxin isoforms in the venom of the snake *Bothrops asper*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 102B, 325–329.
- Lomonte, B., Angulo, Y. & Calderón, L., (2003). An overview of Lysine-49phospholipase A2 myotoxins from crotalid snake venoms and their structural determinants of myotoxic action. *Toxicon*, 42, 885–901.
- López, J. & Pérez, J. (2009). Plantas alexitéricas: antídotos vegetales contra las picaduras de serpientes venenosas. *Medicina Naturista*, 17-24.
- Loría, G., Rucavado, A., Kamiguti, A., Theakston, R., Fox, J., Alape, A. & Gutiérrez, J. (2003). Characterization of “basparin A”, a prothrombin-activating metalloproteinase, from the venom of the snake *Bothrops asper* that inhibits platelet aggregation and induces defibrination and thrombosis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 18, 13–24.
- Mack-Wen, V., Rico, L., Alarcón, J. & Pereañez, J. (2011). Inhibición in vitro del veneno de *Bothrops asper* con extractos etanólicos de *Brownea ariza* B. (Caesalpinaceae). *Vitae*, 18(1), 43–48.
- Martz, W. (1992). Plants with a reputation against snakebite. *Toxicon*, 30, 1131-1142.
- McKinnon, R., Binder, M., Zupkó, I., Afonyushkin, T., Lajter, I., Vasas, A., ... Bochkov, V. (2014). Pharmacological insight into the anti-inflammatory activity of sesquiterpene lactones from *Neurolaena lobata* (L.) R.Br. ex Cass. *Phytomedicine*, 21, 1695-1701. doi: 10.1016/j.phymed.2014.07.019
- Ministerio de Sanidad y Consumo, Agencia Española del Medicamento. (2002). *Real Farmacopea Española*. (2ª ed.). Madrid:Boletín Oficial del Estado Ministerio de Sanidad y Consumo.
- Mora, J., Mora, R., Lomonte, B. & Gutiérrez, J. (2008). Effects of *Bothrops asper* snake venom on lymphatic vessels: Insights into a hidden aspect of

- envenomation. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2(10). doi:10.1371/journal.pntd.0000318
- Mora, D., Fernández, J., Montecucco, C., Gutiérrez, J. & Lomonte, B. (2014). Synergism between basic Asp49 and Lys49 phospholipase A2 myotoxins of viperid snake venom *in vitro* and *in vivo*. *PLoS ONE Journal*, 9(10). doi:10.1371/journal.pone.0109846
- Morales, C. (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. Recuperado de: http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/06/06_3342.pdf
- Mors, W. (1991). Economic and Medicinal Plant Research. *Academic Press*, New York, 353–373.
- Nithitanakool, S., Pithayanukul, P. & Bavovada, R. (2009). Antioxidant and hepatoprotective activities of Thai mango seed kernel extract. *Planta Medica*. 2009, 75, 1118–1123. doi: 10.1055/s-0029-1185507
- Organización Panamericana de la Salud/Organización Mundial de la Salud (2009). *Manual para la identificación, prevención y tratamiento de mordeduras de serpientes venenosas en Centro América*. Guatemala: Guatemala, 96.
- Otero, R., Fonnegra, R., Jiménez, S., Núñez, V., Evans, N., Alzate, S., ... Vélez, H. (2000). Snakebites and Ethnobotany in the northwest region of Colombia. Part I: traditional use of plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 71, 493–504 doi: 10.1016/S0378-8741(00)00243-9
- Otero-Patiño, R. (2009). Epidemiological, clinical and therapeutic aspects of *Bothrops asper* bites. *Toxicon*, 54 (7), 998–1011. doi:10.1016/j.toxicon.2009.07.001
- Patiño, A., López, J., Aristizábal, M., Quintana, J. & Benjumea, D. (2012). Efecto inhibitorio de extractos de *Renealmia alpinia* Rottb. Maas (Zingiberaceae) sobre el veneno de *Bothrops asper* (mapaná). *Biomédica*, 32, 365-374.

- Patiño, A., Benjumea, D. & Pereañez, J. (2013). Inhibition of venom serine proteinase and metalloproteinase activities by *Renealmia alpinia* (Zingiberaceae) extracts: Comparison of wild and in vitro propagated plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 149(2), 590–596. doi:10.1016/j.jep.2013.07.033
- Parellada, J., Suárez, G. & Guinea, M. (1998). Inhibition of zinc metalloproteinases by flavonoids and related phenolic compounds: Structure-activity relationships. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 13, 347-359. doi: 10.3109/14756369809021480
- Pereira, N., Pereira, B., Nascimento, M., Parente, J. & Mors W. (1994). Pharmacological screening of plants recommended by folk medicine as snake venom antidotes; IV. Protection against *Jararaca* venom by isolated constituents. *Planta Medica*, 60, 99-100.
- Pérez, A., Rucavado, A., Sanz, L., Calvete, J. & Gutiérrez, J. (2008). Isolation and characterization of a serine proteinase with thrombin-like activity from the venom of the snake *Bothrops asper*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 41(1), 12–17. doi:10.1590/S0100-879X2006005000189.
- Pithayanukul, P., Leanpolchareanchai, J. & Saparpakorn, P. (2009). Molecular docking studies and anti-snake venom metalloproteinase activity of Thai mango seed kernel extract. *Molecules*. 14(9), 3198-3213. doi: 10.3390/molecules14093198
- Preciado, L., Comer, J., Núñez, V., Rey-Suárez, P. & Pereañez, J. (2018). Inhibition of a snake venom metalloproteinase by the flavonoid myricetin. *Molecules*, 23, 2662. doi:10.3390/molecules23102662
- Rucavado, A., Soto, M., Kamiguti, A.S., Theakston, R., Fox, J., Escalante, T. & Gutiérrez, J., (2001). Characterization of aspercetin, a platelet aggregating component from the venom of the snake *Bothrops asper* which induces thrombocytopenia and potentiates metalloproteinase-induced hemorrhage. *Journal of Thrombosis and Hemostasis*, 85, 710–715.

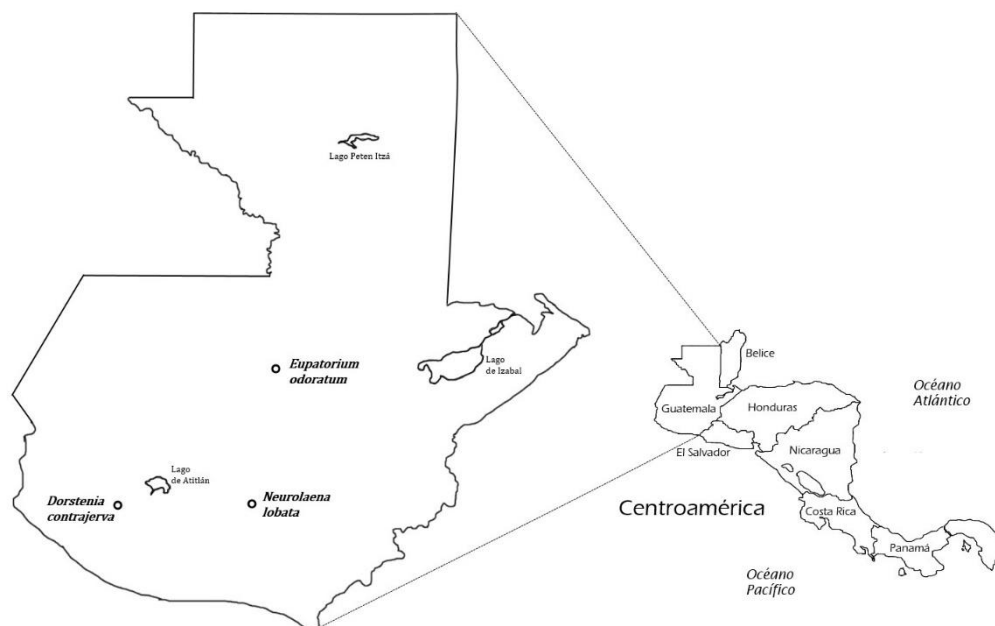
- Rueda, A., Rodríguez, I., Arantes, E., Setúbal, S., Calderon, L., Zuliani, J., ... Soares, A. (2013). Biochemical characterization, action on macrophages, and superoxide anion production of four basic phospholipases A from Panamanian *Bothrops asper* snake venom. *BioMedResearch International*, 1–9. doi:10.1155/2013/789689
- Russell, F., Walter, F., Bey, T. & Fernandez, M. (1997). Snakes and snakebite in Central America. *Toxicon*, 35(10), 1469–1522. doi:10.1016/S0041-0101(96)00209-7
- Samy R., Thwin M., Gopalakrishnakone P. & Ignacimuthu S. (2008). Ethnobotanical survey of folk plants for the treatment of snakebites in Southern part of Tamilnadu, India. *Journal of Ethnopharmacology*, 115(2), 302–312. doi: 10.1016/j.jep.2007.10.006
- Santhosh, M., Hemshekhar, M., Sunitha, K., Thushara, R., Jnaneshwari, S., Kemparaju, K. & Girish, K. (2013). Snake venom induced local toxicities: plant secondary metabolites as an auxiliary therapy. *Mini Reviews in Medical Chemistry*, 13, 106-123.
- Saravia, P., Cáceres, A., Velásquez, R. & Lara, O. (2001a). *Plantas con actividad antiofídica en Guatemala. Identificación y evaluación de su capacidad neutralizante*. Guatemala: Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de ciencias Químicas y Farmacia.
- Saravia, P., Rojas, E., Escalante, T., Arce, V., Chaves, E., Velásquez, R., ... Gutiérrez, J. M. (2001b). The venom of *Bothrops asper* from Guatemala: Toxic activities and neutralization by antivenoms. *Toxicon*, 39(2-3), 401–405. doi:10.1016/S0041-0101(00)00122-7
- Saravia-Otten, P., Robledo, B., Escalante, T., Bonilla, L., Rucavado, A., Lomonte, B., ... Gastaldello, S. (2013). Homogenates of skeletal muscle injected with snake venom inhibit myogenic differentiation in cell culture. *Muscle and Nerve*, 47(2), 202–212. doi:10.1002/mus.23489

- Saravia-Otten, P., Hernández, R., Gutiérrez, J., Mérida, M. & Cáceres, A. (2015). Evaluación de la capacidad neutralizante de extractos de plantas de uso popular en Guatemala como antidotos para el envenenamiento por la mordedura de *Bothrops asper*. *Ciencia, Tecnología y Salud*, 2(1), 25-37.
- Saravia-Otten, P., Hernández, R., Marroquín, N., García, G., Mérida, M., Cruz, S., Orozco, N., Cáceres, A. & Gutiérrez, J. (2017). Inhibición de los efectos coagulante, fosfolipasa A₂ y proteolítico del veneno de *Bothrops asper* por plantas usadas tradicionalmente en Centroamérica. *Ciencia, Tecnología y Salud*, 4(2).
- Segura, Á., Herrera, M., Villalta, M., Vargas, M., Uscanga-Reynell, A., de León-Rosales, S. P., ... León, G. (2012). Venom of *Bothrops asper* from Mexico and Costa Rica: Intraspecific variation and cross-neutralization by antivenoms. *Toxicon*, 59(1), 158–162. doi:10.1016/j.toxicon.2011.11.005
- Sharapin, N. (2000). *Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos*. Santafé de bogotá: convenio andrés bello y cyted. 247 p.
- Snow RW, Bronzan R, Roques T, Nyamawi C, Murphy S & Mash, K. (1994). The prevalence and morbidity of snake bite and treatment-seeking behavior among a rural Kenyan population. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 88(6), 665–671.
- Teixeira, C., Cury, Y., Moreira, V., Picolo, G. & Chaves, F. (2009). Inflammation induced by *Bothrops asper* venom. *Toxicon*, 54(1), 67–76. doi: 10.1016/j.toxicon.2009.03.019
- Umaña, V. (1982a). Purificación y separación de isoenzimas de L-aminoácido oxidasa del veneno de *Bothrops asper*. *Revista de Biología Tropical*, 30, 59–64.
- Umaña, V., (1982b). Estudio comparativo de las isoenzimas de L-aminoácido oxidasa del veneno de *Bothrops asper*. *Revista de Biología Tropical*, 30, 79–84.

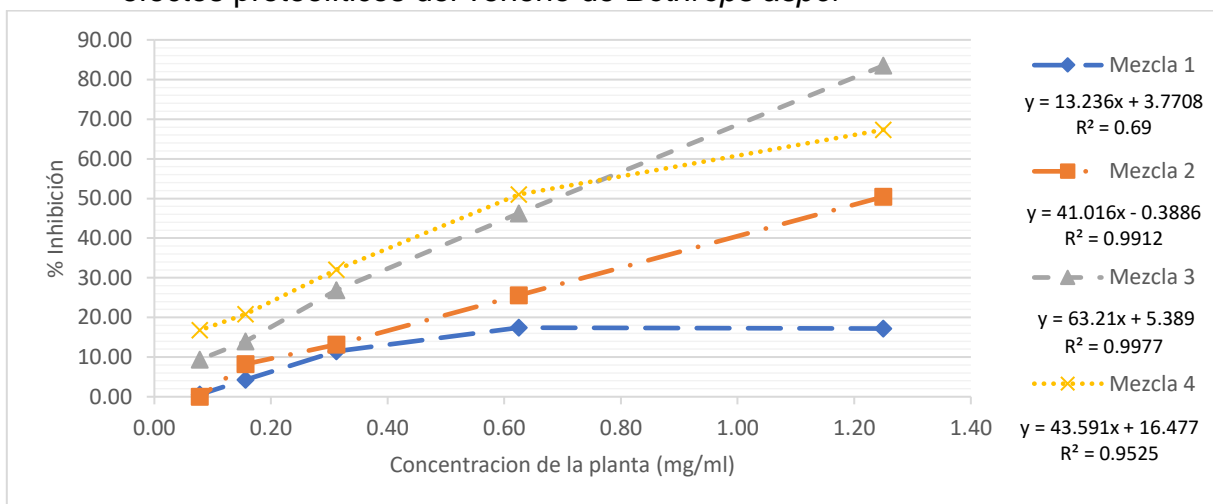
- Vila, R. & Reing, M. (2003). *Métodos de control de calidad*. Madaus, ub virtual, IMicromat. 39.
- Wagner, H. & Bladt, S. (1984). *Plant drug analysis*. Germany: Springer-Verlang.
- Wang, W., Shih C. & Huang, T. (2004). A novel P-I class metalloproteinase with broad substrate- cleaving activity, agkislysin, from *Agkistrodon acutus* venom. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 324(1), 224-230.
- Williamson, E. (2001). Synergy and other interactions in phytomedicines. *Phytomedicine*, 8(5), 401-409.
- Willoughby, M. J., Mills, S. & British Herbal Medicine Association. (1996). *British herbal pharmacopoeia*. Exeter, England: British Herbal Medicine Association.
- World Health Organization (1998). *Quality control methods for medicinal plant materials*. Geneva: WHO
- World Health Organization (2000). *General Guidelines for Methodologies on Research and Evaluation of Traditional Medicine*, Geneva: WHO
- World Health Organization (2018). *WHO Guidelines for the production, control and regulation of snake antivenom immunoglobulins*. Geneva: WHO
- Yañez-Arenas, C., Peterson, A. T., Mokondoko, P., Rojas-Soto, O. & Martínez-Meyer, E. (2014). The use of ecological niche modeling to infer potential risk areas of snakebite in the Mexican State of Veracruz. *PLoS ONE Journal*, 9(6). doi:10.1371/journal.pone.0100957
- Yong-Hong, J., Yang, J., Qiu-Min, L., Sheng, D., Wan-Yu, W. & Yu-Liang, X. (2003). Jerdonase, a novel serine protease with kinirealising and fibrinogenolytic activity from *Trimeresurus jerdonii* venom. *Acta Biochimica Biophysica Sinica*. 35, 689–694.

13.ANEXOS

Anexo 1. Mapa de georreferencia de especies vegetales
 Figura 1. Lugares de colecta en Guatemala de las tres especies vegetales evaluadas



Anexo 2. Capacidad de los extractos etanólicos del estudio para inhibir los efectos proteolíticos del veneno de *Bothrops asper*



Nota: Composición de las mezclas: Mezcla 1 = *D. contrajerva* + *E. odoratum*. Mezcla 2 = *D. contrajerva* + *N. lobata*. Mezcla 3 = *E. odoratum* + *N. lobata*. Mezcla 4 = *D. contrajerva* + *E. odoratum* + *N. lobata*.

Anexo 3. Caracterización de metabolitos secundarios

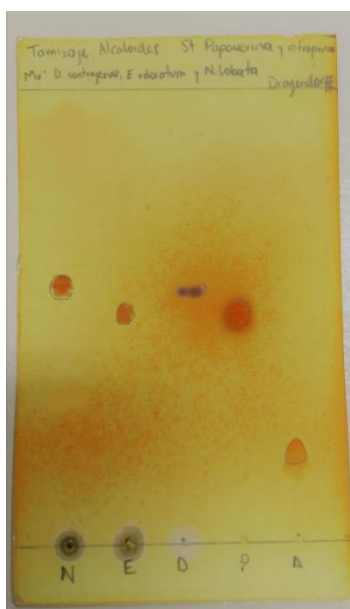
En la Tabla 3.1 se observan los resultados obtenidos para la identificación de alcaloides.

Tabla 3.1. Detección de alcaloides por medio de cromatografía en capa fina.

Muestra	Bandas	Color	Rf
<i>D. contrajerva</i>	1	Café	0.74
<i>E. odoratum</i>	1	Café	0.66
<i>N. lobata</i>	1	Naranja	0.79
Estándar Atropina	1	Café	0.39
Estándar Papaverina	1	Naranja	0.64

Fuente: Datos experimentales. Laboratorio de Investigación de Productos Naturales -LIPRONAT-, USAC.

Figura 2. Cromatografía en capa fina de alcaloides



Fuente: Datos experimentales. Laboratorio de Investigación de Productos Naturales -LIPRONAT-, USAC.

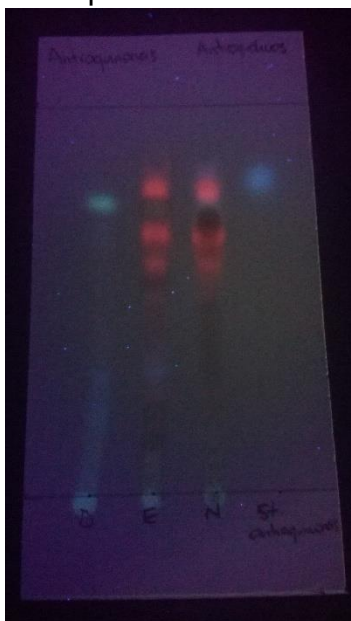
En la Tabla 3.2, se muestran la presencia de antraquinonas determinada por cromatografía en capa fina, todas las muestras evidenciaron la presencia de una gran diversidad de bandas.

Tabla 3.2. Detección de antraquinonas por medio de cromatografía en capa fina.

Muestra	Bandas	Color	Rf
<i>D. contrajerva</i>	1	Amarillo	0.70
<i>E. odoratum</i>	1	Rojo	0.23
	2	Rojo	0.49
	3	Rojo	0.54
	4	Rojo	0.59
	5	Rojo	0.63
	6	Amarillo	0.69
	7	Rojo	0.74
<i>N. lobata</i>	1	Rojo	0.54
	2	Rojo	0.60
	3	Rojo	0.63
	4	Rojo	0.73
Estándar Antraquinonas	1	Celeste	0.39

Fuente: Datos experimentales. Laboratorio de Investigación de Productos Naturales -LIPRONAT-, USAC.

Figura 3. Caracterización de antraquinonas.



Fuente: Datos experimentales. Laboratorio de Investigación de Productos Naturales -LIPRONAT-, USAC.

En la Tabla 3.3, se muestran los resultados obtenidos para flavonoides por cromatografía en capa fina, todas las muestras evidenciaron la presencia de dichos compuestos con una gran diversidad de bandas.

Tabla 3.3. Detección de flavonoides por medio de cromatografía en capa fina.

Muestra	Bandas	Color	Rf
<i>D. contrajerva</i>	1	Azul	0.31
	2	Morado	0.37
	3	Naranja	0.51
	4	Azul	0.66
	5	Amarillo	0.83
<i>E. odoratum</i>	1	Azul	0.46
	2	Amarillo	0.51
	3	Morado	0.60
	4	Morado	0.64
	5	Naranja	0.73
	6	Amarillo	0.76
	7	Amarillo	0.86
<i>N. lobata</i>	1	Naranja	0.33
	2	Amarillo	0.49
	3	Naranja	0.59
	4	Amarillo	0.67
Estándar Kampferol	1	Verde	0.71
Estándar Quercetina	1	Naranja	0.74
Estándar Acido clorogénico	1	Amarillo	0.49
Estándar Rutina	1	Naranja	0.29

Fuente: Datos experimentales. Laboratorio de Investigación de Productos Naturales -LIPRONAT-, USAC.

Figura 4. Caracterización de flavonoides.



Fuente: Datos experimentales. Laboratorio de Investigación de Productos Naturales -LIPRONAT-, USAC.

En la Tabla 3.4 se observan los resultados obtenidos para la identificación de antocianinas.

Tabla 3.4. Detección de antocianinas por medio de cromatografía en capa fina.

Muestra	Marca	Color	Rf
<i>D. contrajerva</i>	1	Azul	0.39
	2	Morado	0.43
	3	Verde	0.71
	4	Azul	0.87
<i>E. odoratum</i>	1	Morado	0.46
	2	Azul	0.51
	3	Azul	0.66
	4	Azul	0.71
	5	Rojo	0.84
<i>N. lobata</i>	1	Azul	0.54
	2	Azul	0.76
	3	Rojo	0.87
Estándar Rojo de sudan	1	Rojo	0.97

Fuente: Datos experimentales. Laboratorio de Investigación de Productos Naturales -LIPRONAT-, USAC.

Figura 5. Caracterización de antocianinas.



Fuente: Datos experimentales. Laboratorio de Investigación de Productos Naturales -LIPRONAT-, USAC.

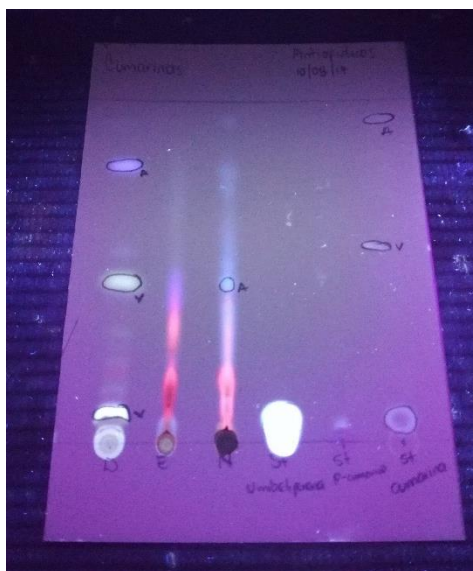
En la Tabla 3.5, se muestran los resultados para evaluar la presencia de cumarinas, las cuales se evidenciaron en los extractos de *D. contrajerva* y *N. lobata*.

Tabla 3.5. Detección de cumarinas por medio de cromatografía en capa fina.

Muestra	Marca	Color	Rf
<i>D. contrajerva</i>	1	Azul	0.07
	2	Verde	0.40
	3	Azul	0.76
<i>E. odoratum</i>	---	---	---
<i>N. lobata</i>	1	Azul	0.36
Estándar Umbeliferona	1	Azul	0.06
Estándar Cumarinas	1	Celeste	0.04
	2	Verde	0.46
	3	Azul	0.98

Fuente: Datos experimentales. Laboratorio de Investigación de Productos Naturales -LIPRONAT-, USAC.

Figura 6. Caracterización de cumarinas.



Fuente: Datos experimentales. Laboratorio de Investigación de Productos Naturales -LIPRONAT-, USAC.

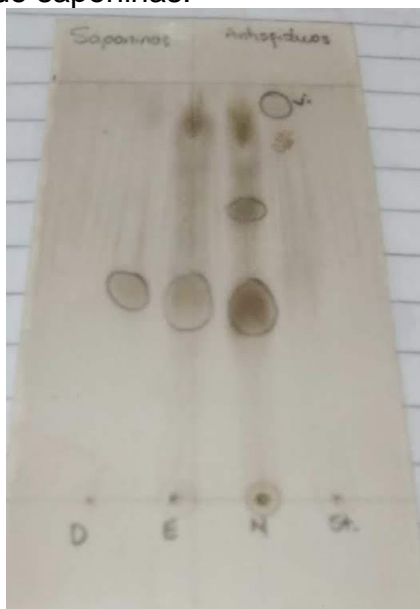
En la Tabla 3.6, se muestran los resultados obtenidos para detectar la presencia de saponinas, evidenciándose su presencia en las tres plantas evaluadas.

Tabla 3.6. Detección de saponinas por medio de cromatografía en capa fina.

Muestra	Marca	Color	Rf
<i>D. contrajerva</i>	1	Morado	0.43
<i>E. odoratum</i>	1	Morado	0.40
<i>N. lobata</i>	1	Morado	0.39
	2	Morado	0.61
Estándar Saponinas	1	Morado	0.93

Fuente: Datos experimentales. Laboratorio de Investigación de Productos Naturales -LIPRONAT-, USAC.

Figura 7. Caracterización de saponinas.



Fuente: Datos experimentales. Laboratorio de Investigación de Productos Naturales -LIPRONAT-, USAC.

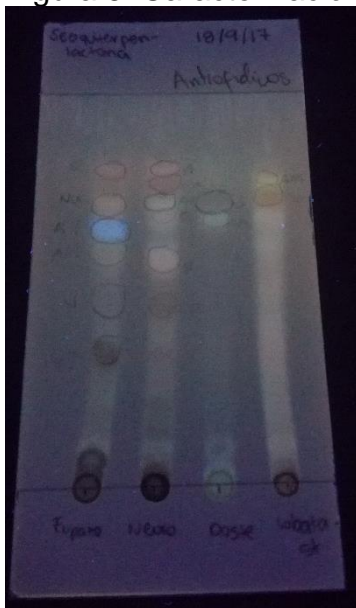
En Tabla 3.7, se muestran los resultados obtenidos para la evaluación de sesquiterpenlactonas por cromatografía en capa fina, todas las muestras evidenciaron la presencia de dichos compuestos con una gran diversidad de bandas.

Tabla 3.7. Detección de sesquiterpenlactonas por medio de cromatografía en capa fina.

Muestra	Marca	Color	Rf
<i>D. contrajerva</i>	1	Amarillo	0.69
	2	Azul	0.73
<i>E. odoratum</i>	1	Café	0.35
	2	Verde	0.49
	3	Naranja	0.59
	4	Azul	0.66
	5	Naranja	0.73
	6	Rojo	0.81
<i>N. lobata</i>	1	Café	0.49
	2	Naranja	0.57
	3	Naranja	0.70
	4	Amarillo	0.73
	5	Rojo	0.77
	6	Naranja	0.81
Estándar <i>N. lobata</i>	1	Naranja	0.74
	2	Amarillo	0.79

Fuente: Datos experimentales. Laboratorio de Investigación de Productos Naturales -LIPRONAT-, USAC.

Figura 6. Caracterización de sesquiterpenlactonas.



Fuente: Datos experimentales. Laboratorio de Investigación de Productos Naturales -LIPRONAT-, USAC.

Anexo 4. Monografías de plantas

TRES PUNTAS

Neurolaena lobata(L.) Cass(ASTERACEAE)

Sinonimias

Conyza lobata L., *Calea lobata**Caleasuriani* Cass, *Conyzasymphitofolia* Mill.*Neurolaena integrifolia* Klatt, *Plucheasymphytifolia* (Mill.) Gillis

Otros nombres populares

En Guatemala se le conoce también como Hierba de coronas, gavilana y mano de lagarto, árnica, hierba amarga, quina y tabaquillo. En países como Costa Rica, Panamá y Colombia es llamada contragavilana, valeriana, salvia-gavilana y patelancha (Blair Trujillo & Madrigal, 2005).

Partes recomendadas para su uso como antiofídico

Hojas y tallos (Binorkar & Jani, 2012)

Cómo es la planta

Planta perenne, por lo general escasamente ramificada, a menudo arbustiva, que puede crecer 1 - 4 metros de altura (Ospina & Pinzón, 1995). Tallo estirado, pubescente, muy ramificado, suave, casi esférico, con abundante médula blanca. Hojas alternas, las adultas inferiores lobuladas (tres lóbulos, los laterales más cortos que el central) opuestas,

ovado – lanceoladas, hasta oblongo lanceoladas, margen serrada o denticulado, ápice y base acuminados, limbo hasta de 25 cm de largo x 9 cm de ancho en la parte media, ásperas en el haz. Inflorescencias en corimbos o panículas de cabezuelas pediceladas; flores amarillas, involucro con 3 o 4 series de brácteas



1

2

(1) Tallo, hoja y flores; (2) Hojas y flores.

Localidad: Ciudad Universitaria, zona 12.

Fotografías por Michael Mo.

imbricadas. Aquenio glabro con vilano de aristas blancas densas (Blair Trujillo & Madrigal, 2005).

Dónde crece

Crece en matorrales húmedos o muy húmedos y algunas veces en bosques de encino, comúnmente en vegetación secundaria, a menudo en campos cultivados, a orillas de ríos con arbustos y laderas abiertas y bordes de caminos (Blair Trujillo & Madrigal, 2005). Nativa desde el sur de México hasta el norte de Colombia y Venezuela, incluyendo las islas del Caribe. Se distribuye desde el nivel del mar hasta 1450 msnm de altura. En Guatemala, se encuentra en Alta Verapaz, Chiquimula, Escuintla, Izabal, Petén, El Progreso, Quetzaltenango, Retalhuleu, San Marcos, Santa Rosa y Suchitepéquez (Nash & Williams, 1976).

Composición química de la parte medicinal

La planta contiene derivados de timo, lactona. Las hojas contienen las sesquiterpenlactonas lobatinas A y B y neurolaninas A y B. De las hojas se han aislado once flavonoides: cinco derivados de quercetagenina, cuatro derivados de kaempferol y dos derivados de luteolina (Ospina & Pinzón, 1995).

Usos medicinales populares

Se utilizan las hojas en decocción por vía oral para diabetes y diarrea. De manera especial en Guatemala se utiliza contra el paludismo en una decocción de las hojas por vía oral; 5-8 hojas en una taza de agua hirviendo. Se le atribuye propiedad antibiótica, antimalárica, aperitiva, carminativa, diurética, espasmolítica, febrífuga, hipoglucémica, hipotensora y tónica (Cáceres, 2006). Su actividad hipoglucemiante ha sido popular en áreas rurales del país, lo que ha dado paso a estudios que comprueban que su efecto inicia a los 90 minutos después del consumo (Andrade-Cetto, Cruz, Cabello-Hernández & Cárdenas Vásquez, 2019; Andrews, Wyne & Svenson, 2018). Su actividad antiinflamatoria ha sido confirmada por el alto contenido de sesquiterpenlactonas presente en extractos etanólicos (McKinnon et al., 2014).

Propiedades antiofídicas medicinales demostradas

Muestra una protección parcial frente a hemorragias causadas por accidentes ofídicos (Gomes et al., 2010). De forma etnobotánica es utilizada para el tratamiento de mordeduras de serpientes y otros animales ponzoñosos (Vásquez et al., 2013). Los flavonoides son capaces de inhibir diferentes tipos de proteasas, actuando como ligandos pequeños, bloqueando la capacidad proteolítica de las enzimas dependientes de zinc, por lo cual podrían inhibir la actividad hemorrágica del veneno (Castro, Gutiérrez, Barrios, Castro, Romero & Umaña, 1999).

Efectos tóxicos de la planta

En las raíces se han aislado varios flavonoides derivados de kaempferol, quercetina y luteolina. Hojas y tallos son usados como veneno para peces y como insecticida en las Indias Occidentales (Blair Trujillo & Madrigal, 2005).

Referencias

- Andrade-Cetto, A., Cruz, E., Cabello-Hernández, C. & Cárdenas Vásquez, R. (2019) Hypoglycemic Activity of Medicinal Plants Used among the Cackchiquels in Guatemala for the Treatment of Type 2 Diabetes. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2019, 1-7.
- Andrews, C., Wyne, K. & Svenson, J. (2018) The use of Traditional and Complementary Medicine for Diabetes in Rural Guatemala. *Journal of Health Care for the Poor and Underserved*, 29(4), 1188-1208.
- Binorkar, S. V, & Jani, D. K. (2012). Profile of medicinal plants with anti-ophidian property. *Journal of Pharmaceutical and Scientific Innovation*, 1(5), 13–20.
- Blair Trujillo, S., & Madrigal, B. (2005). *Plantas antimaláricas de Tumaco. Costa Pacífica colombiana* (1st ed.). Colombia: Editorial Universidad de Antioquía.

- Cáceres, A. (2006). *Vademecum Nacional de Plantas Medicinales*. Guatemala: Editorial Universitaria.
- Castro, O., Gutiérrez, J. M., Barrios, M., Castro, I., Romero, M., & Umaña, E. (1999). Neutralización del efecto hemorrágico inducido por veneno de *Bothrops asper* (Serpientes: Viperidae) por extractos de plantas tropicales. *Revista de Biología Tropical*, 47(3), 605–616.
- Gomes, A., Das, R., Sarkhel, S., Mishra, R., Mukherjee, S., Bhattacharya, S., & Gomes, A. (2010). Herbs and herbal constituents active against snake bite. *Indian Journal of Experimental Biology*, 48(9), 865–878.
- McKinnon, R., Binder, M., Zupkó, I., Afonyushkin, T., Lajter, I., Vasas, A., de Martin, R., Unger, C., Dolznig, H., Días, R., Prisch, R., Passreiter, C.M., Krupitza, G., Hohmann, J., Kopp, B., Bochkov, V.N. (2014) Pharmacological insight into the anti-inflammatory activity of sesquiterpene lactones from *Neurolaena lobata* (L.) R.Br. ex Cass. *Phytomedicine*, 21, 1695-1701. <http://dx.doi.org/10.1016/j.phymed.2014.07.019>
- Nash, D., & Williams, L. O. (1976). Flora of Guatemala. *Fieldiana: botany*, 24(12), 272. doi:10.1017/CBO9781107415324.004
- Ospina, L. F., & Pinzón, R. (1995). Plantas Usadas Como Antidiabéticas en la Medicina Popular Colombiana. *Revista Colombiana de Ciencias Químico Farmacéuticas*, 23(23), 81–94.
- Vásquez, J., Jiménez, S. L., Gómez, I. C., Rey, J. P., Henao, A. M., Marin, D. M., ... Alarcón, J. C. (2013). Snakebites and ethnobotany in the Eastern region of Antioquia, Colombia - The traditional use of plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 146, 449 – 455.

BACCHÉ
Eupatorium odoratum L.(ASTERACEAE)

Sinonimias

Ageratinaligustrina(DC.) R.M. King & H.
Ageratina caeciliae (B.L. Rob.) R.M. King & H. Rob.
Ageratina plethadenia (Standl. & Steyerl.) R.M. King & H. Rob.
Ageratum glaucum, *Eupatorium biceps* Klotzsch ex Vatke
Eupatorium caeciliae B.L. Rob, *Eupatorium ligustrinum* DC.
Eupatorium micranthum Less, *Eupatorium myriadenium* Schauert
Eupatorium plethadenium Standl. & Steyerl, *Eupatorium semialatum* Benth.
Eupatorium vetularum Standl. & Steyerl, *Eupatorium weinmannianum* Regel
 & Körn (Robinson, 1990).

Otros nombres populares

Bacché, bac-ché, bac ce', q'eqikáy (Lenguas nativas de Guatemala), barretillo, chicajol (español de Guatemala), amargoso, escoba amarga, flor de pascua, hoja lisa, mafitero, pascua (español de Honduras), ch'a te', k'anal ton ch'a te', muk'tikch'a te', sakilch'ajtez, sakilpayte (Chiapas, México) (Davidse, Sousa, Knap & Chiang, 2016).

Partes recomendadas para su uso como antiofídico

Hojas (Hay, 2002; Saravia, 2001).

Como es la planta

Árbol frágil de 1.5-6 m de altura, ramas cafés, densamente puberulentas; tallo café-tomentoso; raíces semi-leñosas y ramificadas. Hojas gruesas, opuestas, pecíolos cortos, de forma rectangular angostamente lanceadas, 4-12 cm de ancho, punteadas en los extremos, más o menos aserradas, verde oscuro; en la superficie posee vellosidades. Inflorescencias numerosas, en forma de racimo o cabeza de 6-7 mm de largo, los racimos son redondeados y



1



2

(1) Hojas, tallo e inflorescencia (2) Inflorescencia
 Localidad: Cobán, A. V.
 Fotografías por: Michael Mó

muy ramificados presenta vellosidades café; flores fragantes, menudas, blancas o rosado nacarado. Aqueninos de 2-3 mm de largo, angostamente oblongos, ligeramente estrigosos (Cáceres, 1996).

Donde crece

En terreno ondulado, bosque de *Pinus rudis*, no se reproduce cuando solo quedan unos pocos árboles, sobre todo la vegetación arbustiva 1-3m de altura, rozó, dominado por *Baccharis*, *Quercus*, y *Buddleia*. De clima tropical se encuentra desde el sur de México hasta Costa Rica. (The New York Botanical Garden, 1983; Encina, Zárate, Estrada, Valdés, & Villareal, 2009).

Composición química de la parte medicinal

De las hojas, se han logrado aislar de extractos: ácido oleanólico sesquiterpenlactonas, derivados de oplopanona como la cinamoiloxioplopanona, lactonas del tipo eudesmanolidos así como derivados del 8β-hidroxireinosina y 8β-hidroxibalchanina (Lang, Passreiter, Medinilla & Castillo, 2000). De los tallos y hojas colectadas en Costa Rica mediante medios cromatográficos obteniendo sesquiterpenoscariofileno, cariofileno-epóxido correspondiente, espatulenol, el triterpenolupeol, el flavonoide cisimaritina, siete lactonas sesquiterpénicas, ácido sarracínico, ácido lignano y pinorresinol (Rojas, Castro, Ciccio & Tamayo, 1990). Por otro lado, en hojas recolectadas en Guatemala se determinó por cromatografía en capa fina la presencia de principios amargos, alcaloides, cumarinas, arbutina, antraglicósidos, flavonoides y aceites esenciales (Muñoz, 1997)

Usos medicinales populares

La decocción de las hojas se utiliza popularmente en Alta Verapaz para el tratamiento de la malaria, diabetes, amebiasis, hepatitis, inflamación estomacal e intestinal (Lang, Passreiter, Medinilla & Castillo, 2000).

Propiedades antiofidicas y medicinales demostradas

El extracto etanólico de *E. odoratum* neutralizó parcialmente el efecto coagulante del veneno de *B. asper* y el extracto acuoso inactiva la trombina en ensayos de preincubación, lo que produce la incoagulabilidad sanguínea (Saravia, 2001).

El extracto acuoso posee efecto hipoglucemiante en ratas normales y en diabéticas inducidas con aloxano a una dosis de 1,000 mg/kg (Martinez , 1990). Se determinó la actividad antiinflamatoria de la infusión acuosa de hojas en ratas hembras albinas (Velásquez, 2008). Estudios antimicrobianos demostraron que la tintura de las hojas es activa contra bacterias (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *S. pyogenes*, *S. flexneri*, *S. tufhi*) con una CIM para *S. aureus* y *S. pyogenes* de 1 mg/ml, hongos levaduriformes (*C. Albicans*, *C. neoformans*) con una CIM de 10mg/ml y hongos filamentosos (*E. floccosum*, *M. gypseum*, *T. rubrum*) con una CIM para *T. rubrum* de 5 mg/ml y de 10 mg/ml para los otros dermatofitos (Cáceres, 1996).

Efectos tóxicos de la planta

Para el extracto acuoso de la planta se demostró un buen margen de seguridad en dosis de 0.2 a 6.4 g/kg con un DL₅₀ en ratón mayor a 6.4 g/kg (Cáceres, 1996).

Referencias

- Cáceres, A. (1996). *Plantas de uso medicinal en Guatemala* (Primera ed., Vol. 1). Guatemala: Editorial Universitaria USAC.
- Davidse , G., Sousa, M., Knapp, S., & Chiang, F. (2016). *Asteraceae* (Vol. 2). St. Louis, St. Louis & Mexico : Missouri Botanical Garden & UNAM Mexico .
- Encina, J., Zárate, A., Estrada, E., Valdés, R., & Villareal, J. (2009). Composición y aspectos estructurales d elos bosques de encino de la Sierra de Zapalinamé, Coahuila, México. *Acta Botanica Mexicana*, 86, 71-108. Recuperado de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57412072004>

- Hay, J. O. (2002). *Estudio etnofarmacológico de plantas utilizadas en la medicina tradicional para el tratamiento de leishmaniasis cutánea, del paludismo y de la mordedura de serpientes, en tres departamentos de Guatemala*. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala, Service Coopération au Développement, Institut de recherche pour le développement
- Lang, G., Passreiter, C., Medinilla, B., & Castillo, J. (2000). Eudesmanilides and Further Terpenes from the leaves of *Eupatorium semialatum*. *Z Naturforsch*, 511-515.
- Martinez, N. (1990). *Efecto del extracto acuoso de las hojas de Eupatorium semialatum (bacché) sobre la concentración de glucosa sanguínea en ratas normales y en diabéticas inducidas con aloxano* (Tesis de Licenciatura). Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Muñoz, L. (1997). *Tamizaje fitoquímico de las hojas de Eupatorium semialatum (bacché) por medio de cromatografía en capa fina* (Tesis de Licenciatura). Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Ordoñez, E. (2007). *Determinación de la actividad inhibidora IN VITRO de nueve plantas guatemaltecas sobre Campylobacter jejuni, utilizando el método de difusión en disco* (Tesis de Licenciatura). Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Robinson, H. (1990). Notes on Ageratin in Mesoamerica (Eupatorieae: Asteraceae). *Phytologia*, 69(2), 61-86.
- Rojas, A., Castro, V., Ciccio, J., & Tamayo, G. (1990). Estudio fitoquímico de Ageratina ligustrina (compositae). *Ciencia y Tecnología*, 14(1-2), 221-222.
- Saravia, P., Cáceres, A., Velásquez, R., & Lara, O. (2001). *Plantas con actividad antiofídica en Guatemala. Identificación y evaluación de su capacidad neutralizante*. Guatemala: Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología,

Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de ciencias Químicas y Farmacia.

The New York Botanical Garden(24 de Agosto de 1983). *Ageratina ligustrina*.(M. Nee. Recopilador)Herbarium, NYBG New York. Recuperado el 29 de Febrero de 2016, de <http://sweetgum.nybg.org/vh/specimen.php?irn=1346417>

Velásquez, E. (2008). *Validación Farmacológica de la actividad antiinflamatoria de las infusiones acuosas de las hojas de Buddleja americana L. (Salvia santa), hojas de Eupatorium semialatum (Bacché) y hojas de Psidium guajava L. (guayaba) en ratas hembras albinas* (Tesis de Licenciatura). Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala.

CONTRAHERBA
Dorstenia contrajerva L. (MORACEAE)

Sinonimias

Dorstenia contrajerva subsp. *Tenuiloba* S.F. Blake, *Dorstenia contrajerva* var. *houstonii*,
Dorstenia alexiteria L., *Dorstenia maculata* Lem., *Dorstenia palmata* Willd. Ex Schult.,
Dorstenia quadrangularis Stokes.

Otros nombres populares

Contrahierba; Mano de león (Quetzaltenango); Hierba de sapo (Petén); Cambahan (Petén, Maya); Contaúl (Chimaltenango), matadolor, Drakena–Tarofé, Tarapé, Caápia. Otros Idiomas: inglés: contrayerva; portugués: Contra-erva; alemán: Widergift; francés: Contrayerva; italiano: contraierva (Ordoñez, 2007).



1

Partes recomendadas para su uso como antiofídico

Los remedios vegetales se administran por vía oral o por aplicación externa en la herida o ambos, según las creencias esto proporciona protección contra el veneno si se toma 7-14 días antes de iniciar una actividad de riesgo como tala de árboles o corte de madera (Coe & Anderson, 2005). Se utiliza la raíz como antídoto para las mordeduras de víbora, la rabia y la intoxicación por alimentos. El tratamiento consiste en ingerir el rizoma seco o pulverizado o bien, elaborar un té con las hojas y el tallo (Samayoa, 2008).



2

(1) Hojas (2) Habito
 Localidad: Samayac, Suchitepéquez
 Fotografías por: Michael Mo

Como es la planta

Planta acaulescente o casi acaulescente. Hojas frecuentemente muy numerosas y amontonadas, largamente pecioladas, pinadamente lobadas o casi palmadamente lobadas, escasamente escabrosas o puberulentas, usualmente algo rugosas al tacto, los lóbulos agudos a acuminados, estrechos o amplios. Receptáculos en largos pedúnculos delgados, cuadrangulares o profunda o irregularmente lobados, acrescentes en edad y 2-5 cm de ancho, escaberuloso abajo (Cáceres, 2011).

Donde crece

Se encuentra en bosques tropicales, lugares húmedos y sombreados. Crecen alrededor de 1,800 metros; se encuentra en Petén, Alta Verapaz, Chiquimula, Jalapa, Santa Rosa, Escuintla, Guatemala, Sacatepéquez, Chimaltenango, Retalhuleu, Quetzaltenango y Huehuetenango. En Sur América, México, y desde Honduras hasta Panamá (Ordoñez, 2007).

Composición química de la parte medicinal

Hojas: alcaloides, péptidos como la contrayervina y el psoraleno de 5-(3-4-epoxi-2-7-dimetil-6-7-octenoil). Rizoma: mucilagos, la cumarina dorsteniol y el cardenolidosiriogenina. Partes aéreas: furanocumarinasglucosiladas como α -L-rhamnopiranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopiranosil-bergaptol, bergaptén, 4-[[3-(4,5-dihidro-5,5-dimetil-4-oxo-2-uranil)butil]oxi]-7H-furo[3,2-g][1]benzopiran-7-one, bergaptol, catequina y epicatequina, geiparvarina, 2,3-dihidro-2-isopropenil-6-metoxibenzofurano, (2S*, 1'S*)-2,3-dihidro-2-(1'-hidroxi-1'acetiloximetiletil)-7H-furo[3,2][1]benzopiran-7-o (Díaz & Flores, 2015).

Usos medicinales populares

Otros usos comunes son para malestares relacionados con el aparato digestivo tales como bilis, disentería, vómito, dolor de estómago y mala digestión; así como para tratar las caries. La raíz en cocimiento es utilizada en padecimientos ginecológicos o venéreos. El látex se aplica de manera externa para la cicatrización

de las heridas, además de emplearse contra la disípela, erisipela y paperas; mientras que por vía oral se utiliza en casos de tos crónica, diabetes, inapetencia y paludismo. Estimulante, tónica diaforética, recomendada en las fiebres pútricas y adinámicas (Samayoa, 2008).

Propiedades antiofídicas y medicinales demostradas

El extracto etanólico de *D. contrajerva* logró una inhibición pobre (menor del 50%) del efecto hemorrágico del veneno de *B. asper*. Tanto el extracto etanólico como el acuoso también presentaron actividad coagulante sanguínea (Saravia, 2001).

El péptido de contrayervina produjo una fuerte inhibición del efecto citopático de la infección del virus de inmunodeficiencia humano HIV (HIV-1_{RF}) en una línea celular de linfocitos T-linfoblastos humana. Se ha determinado que los polifenoles de la raíz son antipiréticos, astringentes e hipotensores. La contrayervina aislada (parte no especificada) tiene un efecto inhibitorio citopático contra la infección de una línea del virus HIV. La actividad contra las fiebres, diarrea y mordeduras de serpientes se le atribuye a las cumarinas, chalconas, flavonas y flavononas (Bokesch et al., 2004). Un estudio in vitro, demostró que la geiparvarina, una cumarina 7-substituida, inhibe el carcinoma humano de la nasofaringe. El extracto etanólico de la raíz posee actividad inhibitoria sobre la vía clásica del complemento, pero es inactiva en la vía alterna. El extracto etanólico de la flor es inactiva sobre la vía alterna y clásica (Castillo, Osorio, Paz, & Cáceres, 2005)

Se aislaron dos nuevos bencilbenzofuranos, dorsjervin A y dorsjervin B, junto con otros nueve compuestos, los cuales fueron evaluados en cuanto a una actividad anti-leishmania in vitro, dos de los once compuestos evaluados fueron activos contra leishmania (Peniche-Pavía, Medrano-Nahuat, Torres-Tapia, Mut-Martín, García-Miss & Peraza-Sánchez, 2016)

Efectos tóxicos de la planta

No se encontraron datos sobre la toxicidad de la especie.

Referencias

- Bokesch, H. R., Charan, R. D., Meragelman, K. M., Beutler, J. A., Gardella, R., O'Keefe, B. R., ... McMahon, J. B. (2004). Isolation and characterization of anti-HIV peptides from *Dorstenia contrajerva* and *Treculia obovoidea*. *FEBS Letters*, 567(2-3), 287–290. doi:10.1016/j.febslet.2004.04.085
- Cáceres, A. (2011). *Evaluación de la actividad inhibitoria de la acetilcolinesterasa por diez especies medicinales y aromáticas nativas como posible fuente para el tratamiento de afecciones de la memoria*. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. Recuperado de <http://glifos.concyt.gob.gt/digital/fodecyt/fodecyt2008.39.pdf>
- Castillo, C., Osorio, A., Paz, A., & Cáceres, A. (2005). Actividad moduladora del Sistema del Complemento de diez plantas medicinales nativas de Guatemala. *Revista Científica*, 3(1), 30–34.
- Coe, F. G., & Anderson, G. J. (2005). Snakebite ethnopharmacopoeia of eastern Nicaragua. *Journal of Ethnopharmacology*, 96(1-2), 303–323. doi:10.1016/j.jep.2004.09.026
- Díaz, C. & Flores, K. (2015). *Descripción morfoanatomica e histoquímica de dos variedades de Dorstenia contrajerva nativas de Guatemala* (Tesis de Licenciatura). Universidad de San Carlos de Guatemala. Recuperado de http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/06/06_3926.pdf
- Ordoñez, E. (2007). *Determinación de la actividad inhibidora in vitro de nueve plantas guatemaltecas sobre Campylobacter jejuni, utilizando el método de difusión en disco* (Tesis de Licenciatura). Universidad de San Carlos de Guatemala. Recuperado de http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/06/06_2585.pdf
- Peniche-Pavía, H., Medrano-Nahuat, D., Torres-Tapia, L., Mut-Martín, M., García-Miss, R. & Peraza-Sánchez, S. (2016). Metabolites isolated from the rhizomes of *Dorstenia contrajerva* with anti-leishmanial activity. *Phytochemistry Letters*, 18, 140 - 143.

Samayoa, M. (2008). *Actividad inhibitoria de cinco extractos de arbustos contra M. tuberculosis y M. smegmatis*(Tesis de Licenciatura). Universidad de San Carlos de Guatemala. Recuperado de http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/06/06_2584.pdf

Saravia, P., Cáceres, A., Velásquez, R., & Lara, O. (2001). *Plantas con actividad antiofídica en Guatemala. Identificación y evaluación de su capacidad neutralizante*. Guatemala: Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de ciencias Químicas y Farmacia.

Anexo 5. Formas de preparación fitoterapéutica.

Cataplasma y Emplasto

La cataplasma se prepara machacando la parte medicinal de la planta, se calienta y aplica directamente sobre el área que se desea tratar. En el emplasto se mezcla la planta con una harina, logrando una pasta que se aplica igual que la cataplasma. Se administran para calmar dolores o inflamaciones, madurar abscesos y resolver catarros e inflamaciones de las vías respiratorias.

Se prepara de la siguiente forma: Recoger un manojo de la planta tierna y fresca, lavarla bien con agua. Machacarla hasta lograr una pasta. Envolver en un paño limpio y colocar sobre el área afectada. Las cataplasmas también pueden realizarse con las hierbas secas, mezclándolas con agua hirviendo y haciendo una pasta, que a la temperatura adecuada se aplica en el área afectada. En el caso del emplasto se cocina la harina (trigo, avena, cebada o linaza) y se le incorpora la planta deseada.

Infusión

También llamada apagado o té, forma parte de una cultura de consumo de hierbas aromáticas que se usan no sólo con fines medicinales. Consiste en dejar en contacto por 3-5 minutos la parte materia vegetal (hojas, flores y tallos) con agua hirviendo. Por no usar calor directo garantiza que sus partes no sufran deterioro. Se utiliza para hacer preparaciones de las partes suaves como flores y hojas.

Se prepara de la siguiente forma: Colocar 1-2 cucharadas de la planta en una taza, agregarle agua hirviendo, tapar, dejar reposar de 5-10 min, colar, endulzar al gusto y beber caliente. Las infusiones no deben conservarse por mucho tiempo, lo ideal es prepararlas justo antes de beberlas.

Decocción o cocimiento

Se prepara hirviendo durante algunos minutos la planta y luego se filtra; es ampliamente usado para preparaciones caseras, pero en ocasiones la aplicación de calor puede destruir los principios activos, sobre todo cuando el principio activo es un aceite esencial o un aroma. Debe utilizarse para las partes duras de la planta como: troncos, raíces, cortezas y semillas y tomando en cuenta que los principios activos sean termoestables.

Se prepara de la siguiente forma: Colocar 2 cucharadas de la planta desmenuzada en una ollita o recipiente que no sea de aluminio; agregar dos tazas de agua, tapar, poner al fuego y hervir durante 5 min Colar, exprimir ligeramente y enfriar hasta una temperatura agradable.

Lavados

Es la aplicación de infusiones, cocimientos o tinturas diluidas para tratar tópicamente afecciones externas localizadas como heridas, llagas, úlceras, hemorroides, vaginitis y otras afecciones de la piel o mucosas.

Para su preparación se debe hacer un cocimiento o infusión de la parte de la planta indicada, colar y aplicar en forma de baño en el área afectada.

Referencia

Cáceres, A. (2003). *Vademecun Nacional de plantas medicinales*. Guatemala: Editorial Universitaria USAC.