

**ESPECIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD NEUTRALIZANTE DEL EXTRACTO  
ETANÓLICO DE *Piper auritum* (Kunth, 1816) CONTRA EL VENENO DE  
*Bothrops asper* (SERPENTES: VIPERIDAE) DE LA POBLACIÓN DE LA  
CUENCA DEL RÍO CAUCA**



**ANGIE MARCELA RENGIFO RIOS**

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN  
PROGRAMA DE BIOLOGÍA  
POPAYÁN  
2017**

**ESPECIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD NEUTRALIZANTE DEL EXTRACTO  
ETANÓLICO DE *Piper auritum* (Kunth, 1816) CONTRA EL VENENO DE  
*Bothrops asper* (SERPENTES: VIPERIDAE) DE LA POBLACIÓN DE LA  
CUENCA DEL RÍO CAUCA**

Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de Bióloga

**ANGIE MARCELA RENGIFO RIOS**

Director

**JIMMY ALEXANDER GUERRERO VARGAS, Ph.D.**

Asesor

**FABIO ANTONIO CABEZAS FAJARDO, Ph.D.**

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA**

**FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN**

**PROGRAMA DE BIOLOGÍA**

**POPAYÁN**

**2017**

**Nota de aceptación**

---

---

---

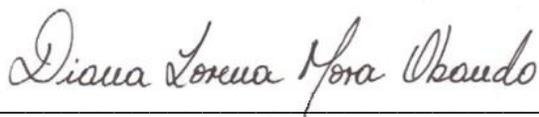
---

Director \_\_\_\_\_

**Jimmy Alexander Guerrero Vargas, PhD**

Jurado \_\_\_\_\_

**Víctor Campo Daza, MSc**

Jurado  \_\_\_\_\_

**Diana Lorena Mora Obando, cPhD**

Lugar y fecha de sustentación: Popayán, 23 de octubre de 2017

## *Dedicatoria*

*A mi madre, Sulma Constanza Rios Ortega, por ser la persona que me ha enseñado a no rendirme ante los obstáculos, por ser mi apoyo incondicional y darme sus acertados consejos*

*A mi padre, Didier Rengifo Mesías, por cuidarme y guiar mi camino.*

*A mis abuelos Gerardo Rios, Kerney Rengifo, Inés Mesías y Magola Ortega por su gran apoyo durante todas las etapas de mi vida.*

*A mis hermanos Gabriel Eduardo Rengifo y Juan Sebastián Velasco, por sus estar siempre a mi lado, apoyándome y aconsejándome.*

*A mi Tía Claudia Patricia Rios, por brindarme su apoyo siempre.*

*“No es el más fuerte ni el más inteligente el que sobrevive, sino aquel que se adapta mejor a los cambios”*

*Charles Darwin*

## Agradecimientos

Al profesor Jimmy Alexander Guerreo, por su dedicación en mi trabajo de investigación, por sus consejos y por animarme a seguir en el camino de la ciencia.

Al profesor Fabio Antonio Cabezas, por su apoyo, sus consejos y calidad humana.

A mis jurados, Diana Mora y Víctor Campo, por todos los valiosos aportes que realizaron a mi trabajo de investigación.

A Luis Miguel Muñoz, por toda su ayuda durante el proceso de experimentación y por su amistad.

A Diana Correa y Hamilton Martínez, por su gran colaboración en el laboratorio y por brindarme su amistad.

A Andrés Mera Bernal, por su compañía en las salidas a recolectar material vegetal y por incentivar-me a la investigación.

A Ronald Hernández, por permitirme realizar las colectas del material vegetal en su casa.

A mis compañeros del Grupo de Investigaciones Herpetológicas y Toxinológicas.

A mis amigos y monitores del CIBUC; Karen Ángel, Andrés Olaya, Mary Bueno, Daniela Carvajal, Yulisa Moreno y Valentina Muñoz, por su apoyo durante todo mi trabajo de grado y por todos los momentos compartidos.

Al grupo de Investigación Química de compuestos Bioactivos.

A la profesora Olga Lucia Sanabria, por su gran colaboración en los inicios de mi trabajo de investigación.

Al profesor Bernardo Ramírez, por la identificación taxonómica de la planta de estudio.

Al personal de los laboratorios de Biología, especialmente a Magally Castrillón y a Betty Piamba por su gran colaboración.

A la Universidad del Cauca, por su apoyo en el trabajo experimental.

## CONTENIDO

RESUMEN .....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	2
2. JUSTIFICACIÓN .....	4
3. MARCO TEÓRICO.....	6
3.1 <i>Bothrops asper</i> .....	6
3.1.1 Veneno de <i>B. asper</i> .....	8
3.2. <i>Piper auritum</i> .....	9
3.3. Metabolitos secundarios.....	11
3.3.1. Metabolitos secundarios de <i>P. auritum</i> .....	11
3.4. Aceite esencial de <i>P. auritum</i> .....	12
3.5. Métodos de extracción .....	13
3.6. Neutralización del veneno de serpiente por parte de plantas.....	14
3.7. Suero antiofídico colombiano .....	14
3.8. Ensayo de toxicidad sobre <i>Artemia salina</i> (Linnaeus, 1758).....	15
4. ANTECEDENTES .....	16
5. OBJETIVOS .....	20
5.1. Objetivo general .....	20
5.2. Objetivos específicos .....	20
6. MATERIALES Y MÉTODOS .....	21
6.1. Veneno de <i>B. asper</i> .....	21
6.2. Colecta de material vegetal de <i>P. auritum</i> .....	21
6.3. Extracto etanólico.....	22
6.4. Extracción del aceite esencial .....	22
6.5. Modelos animales .....	23
6.6. Antiveneno .....	23
6.7. Tamizaje fitoquímico .....	23
6.8. Cuantificación de fenoles .....	24
6.9. Actividad tóxica sobre <i>A. salina</i> .....	25
6.10. Pruebas de neutralización.....	26
6.10.1. Actividad coagulante y su respectiva neutralización .....	26
6.10.2. Actividad edematizante y su respectiva neutralización .....	27

6.10.3. Actividad hemorrágica y su respectiva neutralización.....	27
6.11. Diseño experimental y Análisis estadísticos.....	28
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	29
7.1. Rendimiento de extracción.....	29
7.2. Tamizaje fitoquímico .....	29
7.3. Cuantificación de fenoles .....	30
7.4. Actividad tóxica sobre <i>A. salina</i> .....	32
7.5. Actividad coagulante y su respectiva neutralización .....	34
7.6. Actividad edematizante y su respectiva neutralización .....	37
7.7. Actividad hemorrágica y su respectiva neutralización.....	41
7.8 Observaciones adicionales .....	45
8. CONCLUSIONES.....	46
9. RECOMENDACIONES .....	47
10. BIBLIOGRAFÍA .....	48
ANEXO 1.....	62

## LISTA DE ABREVIATURAS

**mg.** Miligramos

**AG.** Acido gálico

**g.** Gramos

**ES.** Extracto seco

**µl.** Microlitros

**FLA<sub>2</sub>.** Fosfolipasas A<sub>2</sub>

**m.** Metros

**cm.** Centímetros

**kg.** Kilogramos

**MPa.** Megapascal

**°C.** Grados centígrados

**DL.** Dosis letal

**CK.** Creatina quinasa

**m.s.n.m.** Metros sobre el nivel del mar

**INS.** Instituto Nacional de Salud

**nm.** Nanómetros

**µg.** Microgramos

**ml.** Mililitros

**Eq.** Equivalente

**l.** Litro

**ppm.** Partes por millón

**min.** Minutos

**DMSO.** Dimetilsulfóxido

**DCM-P.** Dosis coagulante mínima en plasma

**DEM.** Dosis edematizante mínima

**DHM.** Dosis hemorrágica mínima

**rpm.** Revoluciones por minuto

**DE.** Dosis eficaz

**EET.** Extracto etanólico total

**AE.** Aceite esencial

**p/p.** peso a peso

**CL.** Concentración letal

**IL.** Interleucina

**TNF-α.** Factor de necrosis tumoral

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Mapa de distribución de las tres poblaciones del complejo <i>B. asper</i> en el suroccidente colombiano.....	7
<b>Figura 2.</b> Distribución de <i>P. auritum</i> en Colombia según información de los especímenes depositados en el Herbario de la Universidad del Cauca (CAUP) ..	10
<b>Figura 3.</b> Estructura química de los componentes principales de <i>P. auritum</i> A. Safrol B. p-cimeno C. Miristicina D. $\beta$ cariofileno E. $\gamma$ -terpineno F. $\alpha$ -terpineno G. Ácido palmítico .....	13
<b>Figura 4.</b> Planta de <i>P. auritum</i> A. En su entorno silvestre B. Ejemplar llevado al Herbario de la Universidad del Cauca (CAUP).....	21
<b>Figura 5.</b> Extracción etanólica por el método Soxhlet de <i>P. auritum</i> A. Montaje de la extracción por Soxhlet B. Concentración del extracto a presión reducida en un rota-evaporador.....	22
<b>Figura 6.</b> Montaje para extracción del aceite esencial de <i>P. auritum</i> . Laboratorio del grupo de investigación Química de compuestos Bioactivos.. ..	23
<b>Figura 7.</b> Curva de calibración de ácido gálico.....	31
<b>Figura 8.</b> Neutralización de la actividad coagulante del veneno de <i>B. asper</i> por el EET de <i>P. auritum</i> .. ..	35
<b>Figura 9.</b> Neutralización de la actividad coagulante del veneno de <i>B. asper</i> por el suero antiofídico polivalente del INS. ....	36
<b>Figura 10.</b> Neutralización de la actividad edematizante del veneno de <i>B. asper</i> por el EET de <i>P. auritum</i> . ....	38
<b>Figura 11.</b> Neutralización de la actividad edematizante del veneno de <i>B. asper</i> por el suero antiofídico polivalente del INS.....	39
<b>Figura 12.</b> Necrosis producida por el veneno de <i>B. asper</i> en la actividad edematizante. A. Control positivo y la neutralización de <i>P. auritum</i> a diferentes razones B. 500 C. 1000 D. 1500 $\mu$ L de antiveneno / mg de veneno.. ..	40

<b>Figura 13.</b> Neutralización de la actividad hemorrágica del veneno de <i>B. asper</i> por el EET de <i>P. auritum</i> . .....	42
<b>Figura 14.</b> Neutralización de la actividad hemorrágica del veneno de <i>B. asper</i> por el suero antiofídico polivalente del INS.....	43

### LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Reacciones para determinar cualitativamente la presencia de metabolitos secundarios.....	24
<b>Tabla 2.</b> Metabolitos secundarios presentes en el EET de <i>P. auritum</i> .....	29
<b>Tabla 3.</b> Toxicidad del EET y del AE de <i>P. auritum</i> frente a <i>A. salina</i> expresado en CL <sub>50</sub> .....	33
<b>Tabla 4.</b> Clasificación de toxicidad para el ensayo de <i>A. salina</i> (100).....	33
<b>Tabla 5.</b> Comparación de la dosis coagulante mínima de las tres poblaciones....	34
<b>Tabla 6.</b> Comparación de la dosis hemorrágica mínima de las tres poblaciones.....	41
<b>Tabla 7.</b> Comparación entre las dosis efectivas del extracto de <i>P. auritum</i> y del suero del INS para cada una de las actividades biológicas.....	44

## RESUMEN

El accidente ofídico constituye un grave problema de salud pública ya que afecta a millones de personas en el mundo, principalmente a las que habitan en zonas rurales y que desempeñan actividades agrícolas (1). En el Cauca se reporta que la serpiente que causa alrededor del 70% de los envenenamientos, es *Bothrops asper* (2), la cual presenta un veneno principalmente miotóxico, proteolítico y hemotóxico (3).

Colombia y específicamente el Cauca cuenta con sueros antiofídicos, que no neutralizan por completo los efectos locales ocasionados por el veneno, lo cual hace necesaria la búsqueda de alternativas terapéuticas que sean de fácil acceso, como es el caso de las plantas, las cuales presentan metabolitos secundarios que pueden interactuar con las proteínas del veneno neutralizándolas (4,5).

En el presente trabajo se determinó que *Piper auritum* se compone principalmente de triterpenos, esteroides, cumarinas, saponinas y lignanos, mediante tamizaje fitoquímico. El extracto presenta  $43,733 \pm 2,106$  mg AG/g ES de fenoles, componentes principales de la mayoría de metabolitos secundarios que probablemente son responsables de la neutralización de la actividad coagulante y edematizante, a razones de 2363.870  $\mu$ l y 1787,708  $\mu$ l de extracto / mg de veneno respectivamente. La actividad hemorrágica no fue neutralizada en las dosis probadas. Como parámetro de comparación se determinó la dosis eficaz del suero antiofídico del Instituto Nacional de Salud.

Por otro lado, para determinar la toxicidad del extracto vegetal y del aceite esencial de *P. auritum* se utilizó como modelo biológico un crustáceo llamado *Artemia salina*. El extracto etanólico fue moderadamente tóxico a las 6 y 24 horas de exposición y el aceite esencial estuvo dentro del rango de extremadamente tóxico a las 6 y 24 horas.

## 1. INTRODUCCIÓN

El accidente ofídico es considerado como una enfermedad tropical desatendida que afecta aproximadamente 5 millones de personas al año. De estas, la mitad se intoxican, al menos 100.000 mueren y unas 300.000 sufren casos de amputación y discapacidad permanente, constituyendo un grave problema de salud pública (1).

En Colombia se registraron 4.636 accidentes ofídicos en el 2016, de los cuales 156 casos se presentaron en el departamento del Cauca (6). Sin embargo, estos datos podrían ser subestimados por la falta de registro en los centros de salud; debido a que muchas de las mordeduras de serpiente son tratadas en las zonas rurales por médicos tradicionales, donde la población solo cuenta con recursos terapéuticos naturales como son las plantas (7–11).

Las especies de serpientes de importancia médica en Colombia, están agrupadas en dos familias: Viperidae y Elapidae, de las cuales Viperidae es la más relevante y el accidente botrópico es el de mayor importancia epidemiológica en el país (90 a 95% de todos los accidentes ofídicos) (12). Esta familia incluye a *Bothrops asper*, especie cuyo envenenamiento causa diferentes manifestaciones clínicas locales como hemorragia, edema, flictenas, dolor, infecciones, síndrome compartimental, abscesos, gangrena y manifestaciones sistémicas como shock mixto, microtrombosis masiva capilar pulmonar y/o mesentérica, falla orgánica multisistémica, colapso cardiovascular y coagulopatía severa (13–16).

Para estos accidentes, el único tratamiento autorizado es el suero antiofídico, el cual es efectivo en la neutralización de los efectos sistémicos, pero no neutraliza completamente el daño local como hemorragias, flictenas y edemas (17–22). Por otra parte, algunos antivenenos pueden causar hipersensibilidad (23) agravando así el estado de salud del paciente, el cual requerirá un soporte obligatorio en una unidad de cuidado intensivo, elevando el costo económico del tratamiento médico. Además, cabe resaltar que existe dificultad para distribuir los sueros antiofídicos hacia los centros de salud en áreas rurales (5,7) y mantener de la cadena de frío.

Por lo tanto, es necesario buscar alternativas terapéuticas que minimicen las secuelas en los pacientes. Una de las alternativas a la cual acude gran parte de la

población son las plantas usadas tradicionalmente, que son de fácil acceso y que están disponibles para el cuidado de salud básica (24). Estos recursos naturales han mostrado ser eficientes en cuanto a la neutralización de daños locales debido a la presencia de compuestos polifenólicos los cuales pueden precipitar proteínas y formar complejos con metales como  $Zn^{2+}$  y  $Ca^{2+}$ , lo cual explicaría la eficacia inhibidora sobre las fosfolipasas  $A_2$  dependientes  $Ca^{2+}$  y las metaloproteinasas dependientes de  $Zn^{2+}$  y además su actuación directa como inhibidores enzimáticos, inactivadores químicos o inmunomoduladores (3).

En este contexto, es imprescindible la búsqueda de nuevas alternativas para neutralizar efectos locales producidos por envenenamiento botrópico y es por esta razón que surge la pregunta de investigación: ¿El extracto etanólico de *Piper auritum* tiene capacidad neutralizante sobre los efectos causados por el veneno de *Bothrops asper*?

## 2. JUSTIFICACIÓN

En el mundo existen cerca de 800 plantas alexíteras, plantas a las que se les atribuye la capacidad de aliviar uno o más cuadros clínicos complejos como dolor, sangrado, inflamación, infección e incluso el envenenamiento (25). Colombia, un país mega-diverso, podría contar con un número aproximado de estas plantas, pero sólo unas cuantas han sido objeto de estudios científicos, encontrándose alternativas terapéuticas en ellas (7–9,26,27).

El 70% del ofidismo en el Cauca, es provocado por *B. asper* (2), motivo por el cual el presente trabajo se realizó con esta especie de interés clínico. Sumado a lo anterior, los accidentes ofídicos generalmente ocurren en zonas rurales, donde las personas más vulnerables son las dedicadas a actividades agrícolas, caracterizadas por tener dificultades en el acceso a los servicios de salud y promover el uso de prácticas no médicas (2). Entre esas prácticas se encuentra el tratar ciertos síntomas de la mordedura de serpiente con el extracto de plantas (28,29), las cuales proveen una neutralización local que según algunos estudios es más efectiva que la del suero antiofídico producido en el país (3,10).

Por consiguiente, es necesario realizar investigaciones sobre el poder neutralizante de plantas usadas en la medicina tradicional, ya que se ha demostrado que algunos de los metabolitos secundarios que contienen pueden modificar o inactivar la actividad tóxica de las proteínas del veneno (4,5) inhibiendo o neutralizando algunos efectos en la víctima (17,30–35). *P. auritum* ha sido utilizada tradicionalmente contra la mordedura de serpiente en algunas comunidades de Antioquia y Chocó (36), por lo que el presente trabajo busca evaluar el potencial neutralizante del extracto de *P. auritum* contra los efectos edematizante, hemorrágico y coagulante producidos por el veneno de la población de *B. asper* de la cuenca del Río Cauca.

Esta investigación es una exploración del potencial de componentes bioactivos en plantas con fines terapéuticos para el envenenamiento ocasionado por mordedura de serpientes, y a largo plazo, se convertirá en línea base para el desarrollo de terapias alternativas que puedan contribuir a la disminución de los efectos locales

del accidente botrónico, que generalmente deja secuelas irreversibles. Además, se espera que este estudio contribuya a reducir el impacto socio-económico que genera la permanencia de un paciente víctima de envenenamiento por mordedura de serpiente en los centros de salud.

### 3. MARCO TEÓRICO

#### 3.1 *Bothrops asper*

##### Información taxonómica

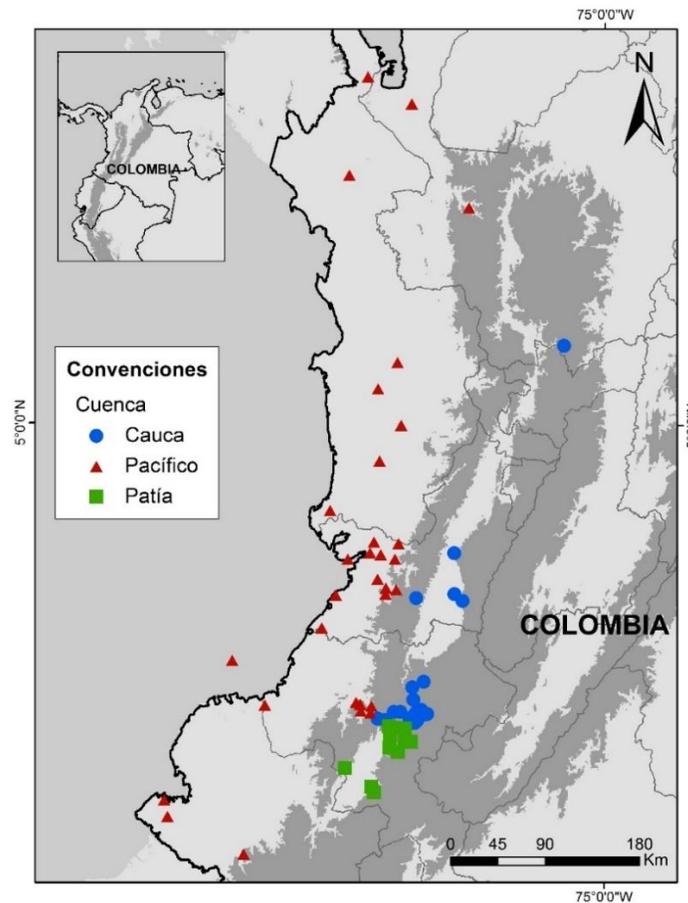
**Reino:** Animalia, **Filo:** Chordata, **Clase:** Sauropsida, **Orden:** Squamata, **Suborden:** Serpentes, **Familia:** Viperidae, **Subfamilia:** Crotalinae, **Género:** *Bothrops*, **Especie:** *B. asper* (Garman, 1883)

Es una especie de serpiente venenosa comúnmente llamada “equis”, “terciopelo”, “barba amarilla”, “nauyaca”, “cuatro narices” o “mapaná”. Los individuos presentan una coloración dorsal marrón, oliva, o gris a gris oscuro, mientras que el vientre es a menudo color crema y con manchas oscuras o no. Se distribuye desde centro América hasta el noroeste de sur América (37); su gran tamaño corporal, abundancia relativa, hábitos crípticos y la capacidad de habitar en ambientes perturbados por el hombre, contribuyen a la alta incidencia de mordeduras ocasionadas por esta especie. Esta serpiente juega un papel importante en ecosistemas, tanto como presa o como un depredador generalista. *B. asper*, como otras especies, exhiben un cambio ontogenético notable en la dieta (38). Puede alcanzar la madurez sexual en torno a 1 metro de longitud o en poco más de 3 años, presenta una longitud máxima de 250 cm, hay un fuerte dimorfismo sexual y las hembras son significativamente más grandes que los machos y tienen un mayor número de hileras de escamas dorsales, y un menor número de escamas subcaudales que los machos (39).

*B. asper* tiene una dentición solenoglifa, los colmillos son curvados hacia atrás, móviles y de localización anterior en la maxila, están dotados de un conducto central cerrado, son especializados para la inoculación profunda del veneno; presenta fosetas termo-receptoras ubicadas entre el ojo y fosas nasales, las cuales les permiten detectar el calor de las presas (40).

En el departamento del Cauca se encuentran tres poblaciones del complejo *Bothrops asper* del suroccidente colombiano, cuya posición taxonómica actualmente no está bien definida. Folleco-Fernández, reconoce tres especies

diferentes (población de la cuenca del río Patía: *Bothrops ayerbei*, población de la cuenca del Pacífico: *Bothrops asper* y la población de la cuenca del río Cauca: *Bothrops rhombeatus*) (Figura 1) (41); mientras que Liévano-Bonilla, afirma que son poblaciones de la misma especie (42) ya que no se presentan diferencias significativas al analizar los caracteres morfológicos entre los individuos, y propone la existencia de variación fenotípica a nivel geográfico relacionada a la ecología y al hábitat de cada población. No obstante, se requiere evidencia molecular y filogeográfica que resuelvan tal interrogante.



**Figura 1.** Mapa de distribución de las tres poblaciones del complejo *B. asper* en el suroccidente colombiano (42). Fuente: Liévano-Bonilla, F (2016).

### 3.1.1 Veneno de *B. asper*

Es una mezcla heterogénea de compuestos biológicos cuya función es inmovilizar, matar y digerir a las presas, además de defenderse de posibles depredadores. Entre sus componentes proteicos y enzimáticos están las metaloproteinasas (41-44%), fosfolipasas  $A_2$  (29-45%), serina proteinasas (4-18%), ácido L-amino oxidasas (5-9%), desintegrinas (1-2%), compuestos similares a lectinas tipo C (0.5%), proteína secretora rica en cisteína (0.1%) y fragmentos DC (<0.1%), entre otras, que han sido descritas parcialmente con métodos bioquímicos y funcionales (38,43).

Estas proteínas afectan la coagulación sanguínea ya que presentan enzimas coagulantes y procoagulantes, tales como serina proteinasas 'tipo trombina' y metaloproteinasas que activan los factores X y II de la cascada de coagulación (44,45). El sangrado local y sistémico, el cual contribuye a lesión tisular permanente en el tejido muscular, así como la hipovolemia y choque cardiovascular es producido principalmente por la acción de metaloproteinasas dependientes de zinc, que hidrolizan algunas proteínas que componen la lámina basal que rodea las células endoteliales de los vasos capilares y de las vénulas, como consecuencia de esta hidrólisis, las células endoteliales se ven afectadas, desarrollando una serie de vesículas y reduciendo su grosor, hasta el punto en que su integridad se afecta y se producen rupturas a través de las que se produce la extravasación (46).

La mionecrosis es provocada por la acción de las FLA<sub>2</sub>, clasificadas en dos subtipos, las que presentan aspartato en el residuo 49, aminoácido que favorece la unión con el ion calcio cofactor necesario para la actividad catalítica, y las que presentan lisina en esta misma posición, variación que impide la unión a calcio y como consecuencia pérdida de actividad enzimática, no obstante, conservan el efecto miotóxico mediante mecanismos no enzimáticos (47). En general, las FLA<sub>2</sub> afectan la integridad de la membrana plasmática de las células musculares ocasionando un influjo de  $Ca^{2+}$ , el cual inicia una serie compleja de eventos de degeneración asociados con hipercontracción y daño mecánico de la membrana

plasmática, activación de los canales y sobrecarga  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial conduciendo a apoptosis y necrosis de las células musculares (48).

Estudios proteómicos del veneno de dos de las poblaciones de *B. asper* del suroccidente colombiano (cuenca del río Patía y cuenca del Pacífico) muestran diferencias marcadas en cuanto a la composición del veneno (49). El perfil proteómico del veneno de la población de la cuenca del río Patía (*Bothrops ayerbei*) revela un porcentaje muy bajo de FLA<sub>2</sub> (0,7%), contrastado con el alto contenido de estas enzimas (25,3%) en el veneno de la población del pacífico (*Bothrops asper*); además se resalta que las proteínas predominantes en *B. ayerbei* fueron las metaloproteinasas (53,7%) lo que concuerda con su alta actividad hemorrágica, a diferencia de *B. asper* que presenta un alto efecto miotóxico (50). Dado que no se cuenta con el perfil proteómico de la población de la cuenca del río Cauca, se podría decir que las actividades biológicas sugieren una composición del veneno diferente a la de las otras dos poblaciones.

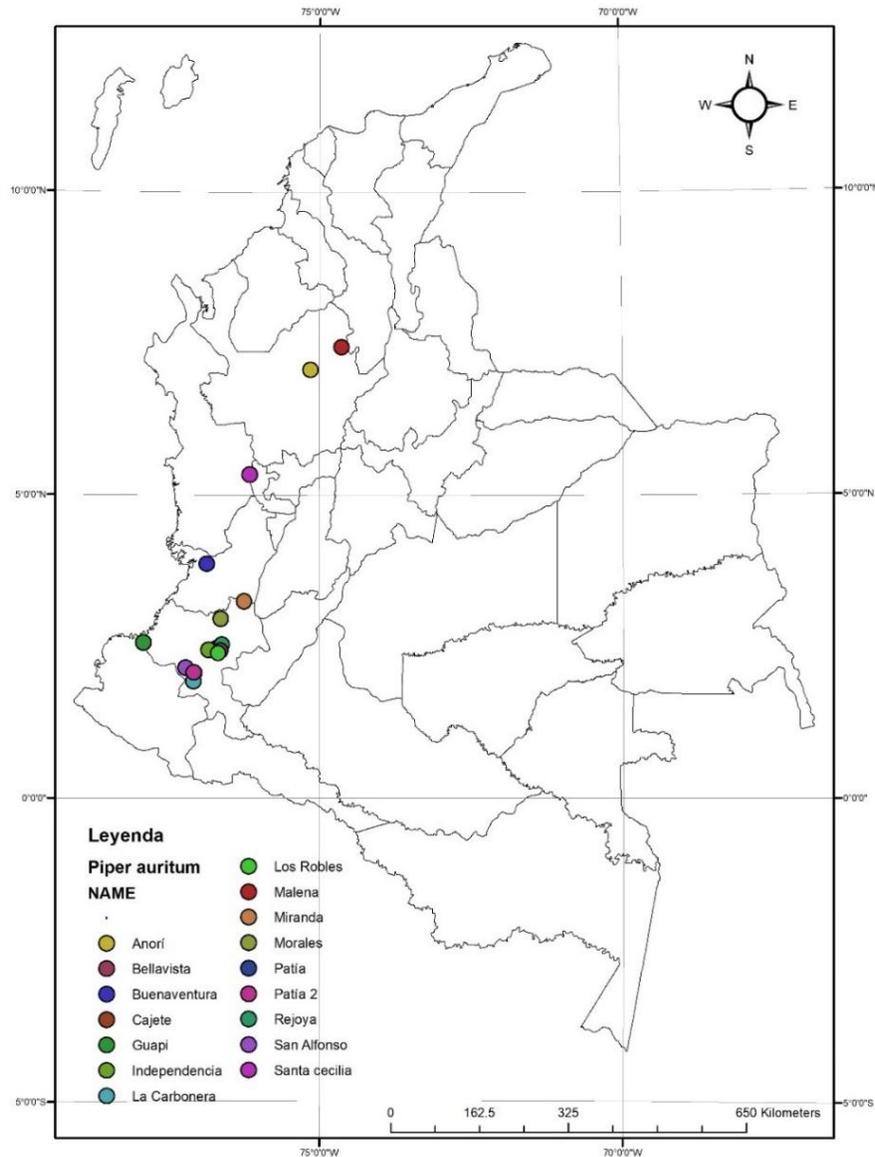
### **3.2. *Piper auritum***

#### **Información taxonómica**

**Reino:** Plantae, **División:** Magnoliophyta, **Clase:** Magnoliopsida, **Subclase:** Magnoliidae, **Orden:** Piperales, **Familia:** Piperaceae, **Género:** *Piper*, **Especie:** *Piper auritum* (Kunth, 1815).

Esta especie conocida como anisillo, caisimón de anís, desvanecedora o santa maría se encuentra distribuida desde México hasta Colombia (Figura 2) (51). Es un arbusto pequeño de 1.20-5 m de altura, con madera blanda, entrenudos floríferos moderadamente delgados y largos, estriados, glabros o algunas veces pubescentes. Hojas ovadas, 18-30 cm de largo por 10-22 cm de ancho, el ápice agudo a cortamente acuminado, la base profundamente cordada, asimétrica, el lóbulo inferior grande y el seno redondo, pubescentes, más densas por el envés, ciliadas, cilia blandas y densas, nervios secundarios 7-8 pares, láminas delgadas, translúcidas. Posee espigas blancas a verde blanquecinas, 8.5-29 cm de largo por

0.3-0.6 cm de diámetro; brácteas circulares o triangulares, subpeltadas, frimbriadas marginalmente, su fruto es pequeño, glabro y trígono; tres estigmas, sésiles. La planta es aromática y se caracteriza además por tener una lámina relativamente grande (25 a 30 cm de largo) y una base marcadamente asimétrica. Se ha encontrado en el borde de la carretera y selva intervenida (52).



**Figura 2.** Distribución de *P. auritum* en Colombia según información de los especímenes depositados en el Herbario de la Universidad del Cauca (CAUP) (Ver Anexo 1). Fuente: este estudio.

### 3.3. Metabolitos secundarios

La biosíntesis, transformación y degradación de compuestos endógenos de las plantas mediante proteínas especializadas dan como resultado los metabolitos secundarios. La biosíntesis de estas sustancias está restringida a estados específicos de desarrollo del organismo y de las células especializadas, a periodos de estrés causados por la deficiencia de nutrientes, ataque por microorganismos o depredadores, y durante la polinización, es decir, los metabolitos secundarios no son esenciales para el crecimiento o la vida de la planta, pero juegan un papel importante en la interacción del organismo con el medio que lo rodea. Además, para el hombre tienen un enorme valor económico pues son una fuente importante de principios activos de medicamentos y de otros valiosos productos químicos como fragancias, insecticidas, saborizantes, colorantes y aditivos nutritivos (53,54).

#### 3.3.1. Metabolitos secundarios de *P. auritum*

Los metabolitos secundarios presentes en el extracto hexánico de las hojas de *P. auritum* son safrol (56,88%), ácido palmítico (5,95%),  $\gamma$ -terpineno (5,11%),  $\beta$  cariofileno (2,65%),  $\alpha$ -terpineno (2,61%), miristicina (2,01%) y otros 20 compuestos más, entre los que se pueden encontrar fenilpropanos, monoterpenos y sesquiterpenos (55). El safrol, fitol y tetrametil-2-hexadecen-1-ol, son los compuestos mayoritarios según otro reporte (56).

Se ha determinado que probablemente los metabolitos presentes en el extracto alcohólico de *P. auritum* son los responsables de las diferentes actividades biológicas de la planta, entre las que se encuentran el efecto antiinflamatorio y la toxicidad, la cual fue determinada como  $DL_{50}$  igual a 1801,99 mg/kg de peso del ratón (57).

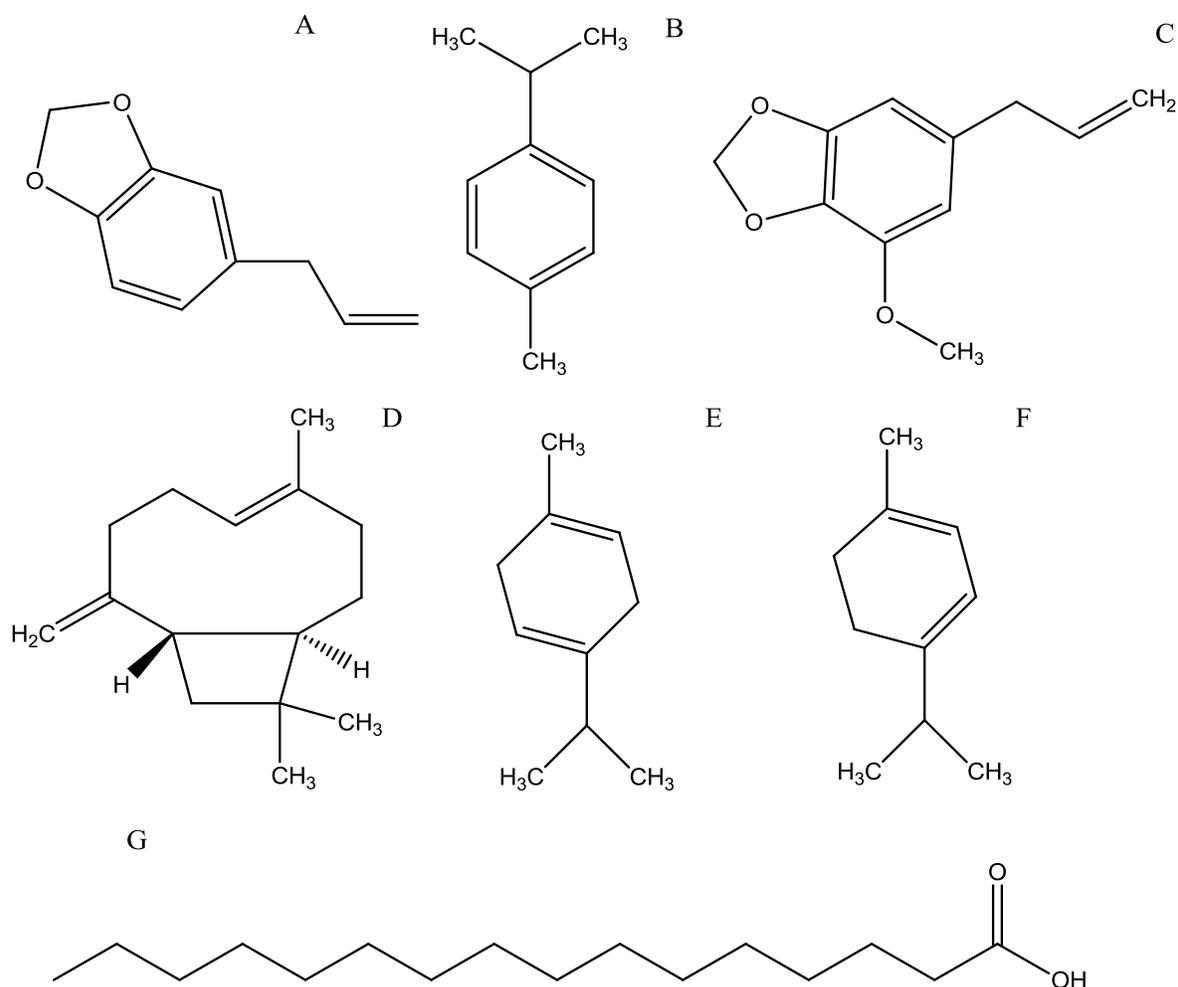
Por otro lado, el extracto fluido de *P. auritum* tiene actividad moderadamente citotóxica en el sistema *Aspergillus nidulans*, mientras que no se comportó así en el ensayo de Ames, ni en la prueba de micronúcleos, lo que podría concordar con

ausencia de potencial genotóxico *in vitro* e *in vivo* (58). También, se demostró que el extracto de la planta disuelto en diferentes concentraciones de agua y etanol tiene actividad antioxidante (56), al igual que el extracto hexánico de las hojas; en ratas diabéticas podría atenuar el estrés oxidativo, actuando como un supresor del daño de las células hepáticas (59,60). Asimismo, el extracto metanólico y hexánico de *P. auritum*, presenta propiedades entomotóxicas (61).

### **3.4. Aceite esencial de *P. auritum***

El aceite esencial está compuesto por sustancias químicas lipófilicas y terpenoides volátiles. Se han obtenido 14 componentes de las hojas de *P. auritum*, de los cuales el safrol (fenilpropanoide) es el principal, con una cantidad relativa de 93,24%, seguido de la miristicina con el 4,34% (62,63). En otros reportes, el safrol está presente en menor porcentaje, pero sigue siendo el mayoritario con un 69,54%, seguido del  $\beta$  cariofileno (3,71%), p-cimeno (3,52%) y 6 compuestos más (55) (Figura 2). Estas diferencias de porcentajes dependen de parámetros naturales como: el origen geográfico, el estado vegetativo de la planta, las condiciones de almacenamiento, los métodos de extracción, entre otros (64).

El aceite de *P. auritum* ha sido estudiado en cuanto a su efecto antibacteriano, el cual ha mostrado resultados positivos por la presencia de fenilpropanoides como el safrol (65,66) y al cual también se le atribuye la actividad antileishmaniosis (67). Por otro lado, el aceite esencial, el extracto hexánico y su componente principal (safrol) tienen aplicaciones interesantes para controlar hongos patógenos de las plantas (55,68). De igual modo, el aceite esencial presenta actividad repelente e insecticida contra *Tribolium castaneum* (63) y actividad antioxidante cuando es obtenido a 17,24 MPa y 40 ° C por el método de extracción supercrítica de aceites esenciales (69).



**Figura 3.** Estructura química de los componentes principales de *P. auritum* **A.** Safrol **B.** p-cimeno **C.** Miristicina **D.**  $\beta$  cariofileno **E.**  $\gamma$ -terpineno **F.**  $\alpha$ -terpineno **G.** Ácido palmítico

### 3.5. Métodos de extracción

Existen varios métodos de extracción de metabolitos secundarios en plantas, entre los más usados están la percolación y el soxhlet, los cuales presentan un porcentaje de rendimiento de 7,87% y 15,61% p/p respectivamente, esto se debe posiblemente a la temperatura que es utilizada en el soxhlet, ya que el disolvente (en este caso etanol) alcanza el punto de ebullición, lo que contribuye a aumentar la eficacia del proceso debido a que la constante de equilibrio de saturación se desplaza favoreciendo la extracción (70).

Además se han reportado el uso de compuestos de polaridad creciente entre los que se encuentran el hexano, diclorometano, acetato de etilo y agua, los compuestos de mayor polaridad como el acetato de etilo y el extracto acuoso permiten una mejor extracción (71). También se utilizan solventes polares como el etanol para realizar pruebas de neutralización del veneno de serpientes por parte de extractos vegetales (35,36,72).

### **3.6. Neutralización del veneno de serpiente por parte de plantas**

Experimentalmente se ha demostrado la neutralización de efectos locales producidos por el veneno de serpiente como edema, hemorragia, mionecrosis, y de efectos sistémicos como alteraciones en la coagulación, debido al potencial inhibitorio que presentan las plantas por la reacción de sus metabolitos secundarios (polifenoles, terpenos, alcaloides, entre otros) con las proteínas del veneno, modificando o inactivando sus acciones sobre el cuerpo humano. De Moura y colaboradores, afirman que los compuestos químicos de las plantas son capaces de actuar directamente como inhibidores enzimáticos, inactivadores químicos o inmunomoduladores, los cuales interactúan directamente con macromoléculas blanco. Los compuestos polifenólicos pueden precipitar proteínas y formar complejos con metales como  $Zn^{2+}$  y  $Ca^{2+}$ , lo cual explicaría la eficacia inhibitoria de las  $FLA_2$  dependientes  $Ca^{2+}$  y las metaloproteinasas dependientes de  $Zn^{2+}$  (3–5,17).

### **3.7. Suero antiofídico colombiano**

El Instituto Nacional de Salud (INS) y el Laboratorio ProBiol producen sueros antiofídicos con algunas diferencias, el INS produce un antiveneno polivalente efectivo en los accidentes ocasionados por serpientes de los géneros *Bothrops* y *Crotalus*, su presentación es una solución inyectable de inmunoglobulinas específicas, purificadas a partir de plasma equino hiperinmune, mediante la técnica de precipitación con sulfato de amonio (<http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/Produccion/Paginas/suero-antiofido-polivalente.aspx>). En ProBiol cada frasco de suero antiofídico polivalente contiene inmunoglobulinas completas o

fragmentos F(ab')<sub>2</sub> (digeridas con pepsina) de origen equino precipitadas con sulfato de amonio, capaces de neutralizar veneno de *Bothrops atrox*, *Bothrops asper*, *Lachesis muta* y *Crotalus durissus*; además, ProBiol produce suero anticorral polivalente que neutraliza el veneno de las serpientes del género *Micrurus*. La aplicación de los sueros puede conllevar a reacciones alérgicas, por lo que cada instituto aclara las precauciones y advertencias antes de realizar el tratamiento, entre las que se encuentran: antecedentes de angioderma y/o shock anafiláctico y pacientes sensibles al suero equino (<http://www.probiol.com/index.php/productos>).

### **3.8. Ensayo de toxicidad sobre *Artemia salina* (Linnaeus, 1758)**

*Artemia salina* pertenece al Filo: Arthropoda, Subfilo: Crustacea, Clase: Branchiopoda, Orden: Anostraca, Familia: Artemidae. Es un crustáceo propio de aguas salobres utilizado para determinar la toxicidad de productos químicos y naturales, como es el caso de los extractos vegetales. Los huevos pueden permanecer metabólicamente inactivos durante largos periodos en condiciones de total ausencia de agua, oxígeno y a temperaturas por debajo de punto de congelación. Transcurridas 6 a 8 semanas las artemias se convierten en adulto alcanzando un tamaño promedio de 7 milímetros y su vida media es de 1 año. El ensayo es económico debido a que el estado criptobiótico del animal está disponible comercialmente de manera continua, además es fácil de realizar, rápido (24 horas) y reproducible (73,74). Esta prueba además de las ventajas ya mencionadas es una alternativa a los ensayos de toxicidad de extractos vegetales *in vivo*, ya que otro tipo de animales implican aspectos éticos y económicos más complicados (75).

#### 4. ANTECEDENTES

Desde hace más de dos décadas se han realizado estudios con el fin de buscar alternativas terapéuticas naturales que neutralicen los efectos letales y ciertos síntomas locales y sistémicos ocasionados por el envenenamiento por mordedura de serpiente. Mors y colaboradores en 1989, demostraron que el extracto etanólico de las partes aéreas de *Eclipta prostrata* (Asteraceae) neutralizó la actividad letal del veneno de *Crotalus durissus terrificus* cuando fueron pre-incubados e inyectados vía intraperitoneal en ratones. Del extracto se aislaron sustancias como la wedelolactona, sitosterol y estigmasterol, los cuales fueron capaces de neutralizar 3 dosis letales (DL<sub>50</sub>). Además, el extracto fue capaz de inhibir la liberación de creatina quinasa (CK) del músculo aislado de ratón expuesto al veneno, lo que indicó minimización del efecto mionecrótico (76).

Mors y colaboradores en el 2000, presentaron una lista de plantas usadas contra la mordedura de serpiente, indicando que los constituyentes químicos, denominados metabolitos secundarios, son capaces de interactuar con macromoléculas blanco, receptores y enzimas; por ejemplo, ocupando sus sitios de unión, formando enlaces covalentes, quelando metales que son indispensables para su acción o bloqueando receptores. Algunos de ellos son los esteroides, triterpenos, derivados de fenilpropanoides, cumarinas y flavonoides, que pueden ser responsables del efecto neutralizante de las plantas contra la acción del veneno de serpiente (77).

Abubakar y colaboradores (2000), demostraron la reducción en la mortalidad de ratones en ensayos realizados con dos venenos de serpiente, *Echis carinatus* y *Naja nigricollis*, los cuales fueron previamente incubados con el extracto de *Guiera senegalensis* (Combretaceae) y luego administrados intraperitonealmente; esta actividad puede deberse a los compuestos polifenólicos presentes en las plantas, que modifican las acciones de las proteínas y enzimas debido a sus propiedades astringentes (4).

En Costa Rica, Núñez y colaboradores (2005) analizaron los extractos de *Piper peltatum* y *Piper umbellatum*, los cuales mostraron resultados positivos en cuanto

a la inhibición de fosfolipasas miotóxicas A<sub>2</sub> del veneno de serpientes del género *Bothrops*. A partir del extracto se aisló 4-catecol nerolidol, compuesto que inhibió completamente la actividad de la miotoxina I de *B. asper*. Además, el metabolito aislado redujo la actividad edematizante de las miotoxinas y el nivel de CK en plasma al pre-incubarse con los venenos de *B. asper* y *Bothrops atrox*. La administración del 4-catecol nerolidol después de inyectar la toxina *in vivo*, mostró una habilidad inhibitoria sustancialmente baja. Esto podría ser explicado por la rápida acción de estas toxinas *in vivo* (78).

Ode y Asuzu (2006), realizaron un estudio en Nigeria sobre la actividad neutralizante del extracto metanólico del bulbo de *Crinum jagus* (Amaryllidaceae) frente a la mordedura de las especies *Echis ocellatus*, *Bitis arietans* y *Naja nigricollis*. El extracto protegió a los ratones de los efectos letales cuando fue administrado por vía oral, lo que demostró que su acción es farmacológica y no resultado de la interacción física con los componentes del veneno (21).

Shenoy y colaboradores (2013) investigaron los frutos de una planta de género *Piper*, los cuales son utilizados tradicionalmente contra la mordedura de serpiente en India. El extracto etanólico de *Piper longum* fue capaz de inhibir la hemorragia inducida por el veneno *in vitro*; el extracto y el principio activo, piperina, inhibieron significativamente la letalidad, la hemorragia, la necrosis, la desfibrinogénación y el edema en ratones. También redujeron significativamente la degranulación de mastocitos y se revertió el incremento de niveles de CK producidos por el veneno. Este estudio demostró que el extracto posee un buen potencial neutralizante y la piperina fue uno de los componentes responsables de la efectiva neutralización (79).

En Colombia son escasos los estudios realizados alrededor del potencial neutralizante de las plantas frente a los envenenamientos, sin embargo, se conocen importantes estudios etnobotánicos sobre plantas utilizadas tradicionalmente contra la mordedura de serpiente en algunas comunidades indígenas de Antioquia y Chocó, lo cual provee información para adelantar pruebas que permitan comprobar dichas propiedades. Otero y colaboradores

(2000) identificaron 101 especies de plantas usadas para el tratamiento de la mordedura de serpiente, agrupadas en 41 familias, entre las cuales Piperaceae (13sp), Araceae (6sp), Asteraceae (5sp) y Gesneriaceae (3sp) fueron las más abundantes. La información fue brindada por chamanes, indígenas de las comunidades rurales y curanderos tradicionales, quienes están convencidos de que las plantas más eficaces son las que tienen un sabor amargo (por ejemplo *Episcia dianthiflora* o *Piper auritum*) (26).

Otero y colaboradores (2000), generaron extractos etanólicos de 74 plantas de las anteriormente reportadas como utilizadas tradicionalmente para el accidente ofídico y analizaron si estos extractos neutralizaban los efectos letales y enzimáticos del veneno de *Bothrops atrox*. Los resultados mostraron que solo 12 tenían acción neutralizante, 7 de ellas neutralizaron el 100% de la actividad, a saber: *Brownea rosademonte* (Caesalpiniaceae), *Tabebuia rosea* (Bignoniaceae), *Renealmia alpinia* (Zingiberaceae), *Heliconia curtispatha* (Heliconiaceae), *Pleopeltis percussa* (Polypodiaceae), *Trichomanes elegans* (Hymenophyllaceae) y *Citrus limon* (Rutaceae), las otras mostraron entre un 45% y 80% de neutralización de ambos efectos (7).

Posteriormente, Otero y colaboradores (2000) realizaron pruebas de neutralización del efecto hemorrágico causado por el veneno de *Bothrops atrox*, con extractos de las plantas previamente reportadas. Se analizaron 75 extractos, de los cuales, 12 demostraron el 100% de neutralización y 19 especies presentaron una neutralización moderada. *P. auritum* mostró un porcentaje de  $10 \pm 4\%$  de inhibición del efecto hemorrágico (27).

Otero y colaboradores (2000), estudiaron la composición química y el uso etnobotánico de *P. auritum*, del municipio de Chocó, contra las mordeduras de serpientes. Encontraron que el extracto de la planta no neutraliza el efecto letal del veneno de *B. asper* (Población de la cuenca del Pacífico), la neutralización del efecto hemorrágico *in vitro* fue insignificante, pero neutralizó parcialmente (63%) el efecto edematizante del veneno (36).

Gómez y colaboradores (2014) reportaron el uso tradicional de *Renealmia alpina* (Zingiberaceae) para el tratamiento de mordeduras de serpientes por parte de tribus indígenas Embera-Katios pertenecientes a las regiones de Antioquia y Chocó. Una flavonona aislada de dicha planta, inhibió la actividad enzimática y biológica de venenos de *Bothrops* y de fosfolipasas purificadas. También inhibió la actividad proteolítica y hemolítica indirecta producida por el veneno de *Bothrops asper*. Adicionalmente, puede mitigar daños en el tejido local producto de los efectos hemorrágicos ocasionados por el envenenamiento, tiene propiedades analgésicas y anti-inflamatorias (5).

## 5. OBJETIVOS

### 5.1. Objetivo general

- Especificar la actividad neutralizante del extracto etanólico de *P. auritum* contra el veneno de *B. asper* de la población de la cuenca del río Cauca.

### 5.2. Objetivos específicos

- Establecer la actividad anticoagulante del extracto etanólico de *P. auritum* contra el veneno de *B. asper*.
- Identificar el efecto antiedematizante del extracto etanólico de *P. auritum* contra el veneno de *B. asper*.
- Evaluar la actividad antihemorrágica del extracto etanólico de *P. auritum* contra el veneno de *B. asper*.
- Determinar cualitativamente los metabolitos secundarios y cuantificar los fenoles totales del extracto etanólico total de *P. auritum*.
- Determinar la actividad tóxica del extracto etanólico total y del aceite esencial de *P. auritum*.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1. Veneno de *B. asper*

Se obtuvo una mezcla de veneno de 4 ejemplares adultos de *B. asper* (población de la cuenca del río Cauca) provenientes de La Yunga, Tambo – Cauca, mantenidos en cautiverio en el centro de investigaciones biomédicas de la Universidad del Cauca (CIBUC). El veneno se colectó por estimulación manual, para ello se indujo a los ejemplares a morder una película de parafilm ubicada sobre un embudo de cristal conectado a un tubo falcón, posteriormente el veneno se centrifugó, se liofilizó y almacenó a -20°C hasta su uso.

### 6.2. Colecta de material vegetal de *P. auritum*

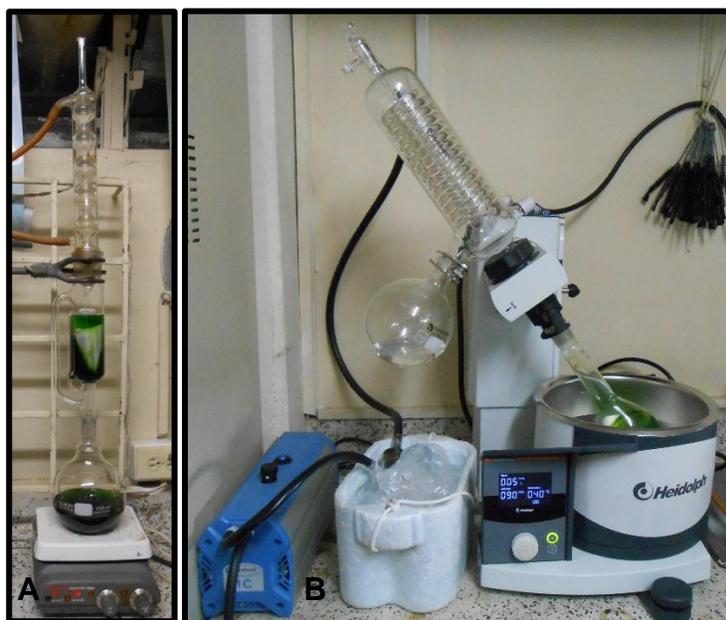
Las muestras de *P. auritum* fueron colectadas en la vereda Cajete, Popayán – Cauca (2° 28' 41.17" Latitud Norte, 76° 40' 19.91" Longitud Oeste) (Figura 2), a una altura de 1744 m.s.n.m., durante el mes de junio del 2016. Un espécimen fue depositado en el Herbario de la Universidad del Cauca (CAUP) bajo la referencia Angie M. Rengifo 01 (Figura 4).



**Figura 4.** Planta de *P. auritum* **A.** En su entorno silvestre **B.** Ejemplar llevado al Herbario de la Universidad del Cauca (CAUP). Fotografía: Rengifo, A (2017).

### 6.3. Extracto etanólico

Las hojas de la planta se cortaron en pequeñas partes y se dejaron secar a temperatura ambiente. En el laboratorio del grupo de Investigación Química de Compuestos Bioactivos se pulverizó el material, se pesaron 84,599 g y se sometió a extracción continua sólido-líquido (Soxhlet) durante 48 horas utilizando como disolvente etanol anhidro (80). Posteriormente, se secó el extracto mediante concentración a presión reducida en un rota- evaporador (Laborota 4003, Heidolph Instrument GmbH & Co) a 40°C (Figura 5) y se almacenó en un desecador para evitar su hidratación hasta que se realizaran los respectivos ensayos.



**Figura 5.** Extracción etanólica por el método Soxhlet de *P. auritum* **A.** Montaje de la extracción por Soxhlet **B.** Concentración del extracto a presión reducida en un rota- evaporador. Fotografía: Rengifo, A (2017).

### 6.4. Extracción del aceite esencial

La extracción del aceite se realizó por hidrodestilación a partir de hojas secas de *P. auritum* (Figura 6) y luego se secó con sulfato de sodio anhidro ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ).



**Figura 6.** Montaje para extracción del aceite esencial de *P. auritum*. Laboratorio del grupo de investigación Química de compuestos Bioactivos. Fotografía: Rengifo, A (2017).

### **6.5. Modelos animales**

Para llevar a cabo las pruebas de neutralización se utilizaron ratones *Mus musculus* cepa ICR con peso de  $20\pm 2$  g, mantenidos en el CIBUC en cajas estándar con acceso de alimento y agua *ad libitum*.

### **6.6. Antiveneno**

Se usó el suero antiofídico polivalente del Instituto Nacional de Salud, el cual fue recibido en donación y cuyo lote es 05 SAP 03.

### **6.7. Tamizaje fitoquímico**

Se determinó cualitativamente la presencia de algunos metabolitos secundarios, mediante la extracción de 30 g de material seco con etanol por 48 horas utilizando la metodología planteada por Domínguez (1979) (81), las pruebas fueron las siguientes (Tabla 1):

**Tabla 1.** Reacciones para determinar cualitativamente la presencia de metabolitos secundarios.

<b>Metabolito</b>	<b>Prueba en tubo de ensayo</b>
<b>Alcaloides</b>	Dragendorff, Mayer y Wagner
<b>Cardiotónicos</b>	Reactivo de Baljet, Kedde, Raymond-Marthoud, Keller-Killiani, Liebermann-Burchard y Salkowski
<b>Cumarinas</b>	Volátiles en papel impregnado con NaOH (Observación UV)
<b>Taninos</b>	Cloruro Férrico, solución de gelatina, solución de gelatina y sal, solución salina
<b>Saponinas</b>	Formación de espuma
<b>Triterpenos y esteroides</b>	Liebermann-Burchard y Salkowski
<b>Flavonoides</b>	Reacción de Shinoda
<b>Lignanos</b>	Prueba de Labat

### 6.8. Cuantificación de fenoles

Se utilizó el método propuesto por Folin y Ciocalteu (1927) (82), el cual se fundamenta en la reducción, en medio básico, de una mezcla de ácidos fosfowolfrámico y fosfomolibdico ( $H_3Mo_{12}O_{40}P$  y  $H_3[P(W_3O_{10})_4]$ ) con compuestos polifenólicos hasta óxidos de color azul ( $W_8O_{13}$  y  $Mo_8O_{23}$ ), los cuales presentan absorbancia a una longitud de onda de 760 nm.

Se realizó una curva de calibración de ácido gálico en un intervalo de concentraciones de 15-75  $\mu\text{g/g}$  siguiendo el protocolo descrito por Li *et al.* (2014) (83). Una vez se obtuvieron las absorbancias del ácido gálico, se procedió a preparar la muestra de extracto vegetal de la siguiente manera: en una cubeta plástica de 3 ml se agregó 1 ml de solución acuosa del reactivo de Folin-Ciocalteu (0,2 eq/l) y 0,2 ml de solución metanólica de las muestras (500 ppm). Luego, se

homogenizaron y en ausencia de luz se incubaron por 5 min, posteriormente se agregó 0,8 ml de solución acuosa de carbonato de sodio (75 g/l), se homogenizaron y se incubaron en ausencia de luz por 60 min. Después de este tiempo se procedió a medir la absorbancia a una longitud de onda de 760 nm en un espectrofotómetro UV-vis GENESIS (Thermo Scientific). La concentración de fenoles presentes en el extracto vegetal se obtuvo a partir de la ecuación de la curva de calibración y la absorbancia de la muestra. El resultado se expresó en mg AG/g de ES.

### **6.9. Actividad tóxica sobre *A. salina***

El ensayo se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito por Sanabria *et al.* (1997) (84) con modificaciones de Syahmi y colaboradores (2010) (85). Se preparó agua de mar sintética al 3,6% y se filtró hasta obtener una solución homogénea. En 500 ml de agua de mar se depositaron 50 mg de huevos de *A. salina*, los cuales se dejaron por 48 horas en una cámara ambiental (Biotronette Mark III, Melrose Park, IL, USA) a 25 °C.

Las muestras del extracto de *P. auritum* fueron disueltas en dimetilsulfóxido para obtener una concentración de 40.000 µg/g, a partir de la cual se prepararon las dosis de trabajo (20 – 50 – 100 – 200 – 300 – 400 – 500 – 600 – 800 - 1000 µg/g). Posteriormente, se tomaron 10 nauplios por cada vial aforándolos a un volumen final de 5 ml, se incubaron en una cámara ambiental con las mismas condiciones en las que fueron eclosionados y, por último, se realizaron conteos de nauplios muertos a las 6 horas (dosis aguda) y a las 24 horas (dosis crónica).

Como control positivo, se realizó el ensayo de letalidad en las condiciones anteriormente mencionadas utilizando diferentes concentraciones de dicromato de potasio para la toxicidad aguda (5-25 µg/g) y para la toxicidad crónica (31-900 µg/g). Para el control negativo se tomó el máximo volumen de DMSO agregado en el ensayo de letalidad (250 µl en 5 ml de agua de mar) y un segundo control solo con agua de mar. Cada ensayo se realizó por triplicado y los datos fueron reportados en CL<sub>50</sub>, concentración que induce la muerte del 50% de los organismos estudiados.

## **6.10. Pruebas de neutralización**

Previamente se determinaron la dosis coagulante mínima en plasma (DCM-P), la dosis edematizante mínima (DEM) y la dosis hemorrágica mínima (DHM), inyectando ratones *Mus musculus* (n=4) de ambos sexos con varias dosis de veneno de *B. asper*, como control se utilizó solución salina (0,9%). Para las pruebas de actividad neutralizante del extracto etanólico de *P. auritum* se utilizaron razones desde 500 – 3000 µL de extracto / mg de veneno mientras que para el suero antiofídico del INS se utilizaron razones de 31,25 - 1000 µL antiveneno / mg de veneno. Como controles se inyectaron ratones con veneno más solución salina y con antiveneno o extracto más solución salina, utilizando la dosis más alta en cada prueba.

### **6.10.1. Actividad coagulante y su respectiva neutralización**

Para cada prueba se utilizaron 10 ml de sangre O+ de un voluntario, repartidos en 6 vacutainers de 3,6 ml con citrato de sodio (una parte de anticoagulante por 9 partes de sangre venosa). Una vez obtenida la muestra se procedió a centrifugar a 4000 revoluciones por minuto (rpm) por 5 min para recolectar el plasma. Tubos con 0,2 ml de plasma citratado, se incubaron durante 5 min en baño maría a 37°C. Posteriormente, a cada tubo se agregó 0,1 ml de veneno disuelto en solución salina a concentraciones de 0,05 - 0,1 - 0,2 - 0,4 - 0,8 µg. Se realizaron 6 repeticiones de cada ensayo. Se registró el tiempo de coagulación y a partir de un análisis dosis- respuesta, se determinó la DCM-P, definida como la mínima concentración capaz de producir un coágulo en 60 segundos.

Para la actividad neutralizante, se prepararon mezclas con una cantidad fija de veneno (dosis reto: 2 DCM-P) y cantidades variables del extracto o antiveneno en un volumen final de 0,1 ml, las cuales se incubaron en baño maría a 37°C por 30 min y luego se agregaron a 0,2 ml de plasma citratado incubado previamente a 37° C por 5 min. Finalmente, se calculó la dosis efectiva, definida como la razón de µl de extracto o antiveneno / mg de veneno en la que el tiempo de coagulación aumenta 3 veces respecto al tiempo de coagulación del control de veneno sin antiveneno (86).

### 6.10.2. Actividad edematizante y su respectiva neutralización

Se inyectaron grupos de 4 ratones con dosis de 0,0625 – 0,125 – 0,25 – 0,5 - 1 µg, utilizando solución salina como diluyente. Las dosis fueron administradas por vía subcutánea en la almohadilla plantar de la pata trasera derecha del ratón y en la pata izquierda se inyectó 50 µl de solución salina en idénticas condiciones como control negativo de la actividad.

Después de 1 hora, utilizando un calibrador, se midió el grosor de las dos patas. Se estimó la magnitud del edema (porcentaje de aumento del grosor de la pata), de la siguiente manera:  $[(\text{Grosor de la pata derecha} / \text{grosor de la pata izquierda}) \times 100] - 100$ . La DEM, se determinó a partir de un análisis dosis-respuesta, definida como la dosis de veneno que induce un edema de 30%.

Para la neutralización del edema se prepararon mezclas de una cantidad fija de veneno (6 DEM) con razones de entre 500 – 2500 µl extracto o antiveneno / mg de veneno, las cuales se incubaron en baño maría a 37°C por 30 min. 50 µl de la mezcla fueron inyectados en la pata derecha del ratón; la pata izquierda se usó como control negativo con solución salina. Se calculó la magnitud del edema y se estimó la  $DE_{50}$ , correspondiente a la razón µl de extracto o antiveneno / mg veneno en la que el edema se reduce un 50% (87).

### 6.10.3. Actividad hemorrágica y su respectiva neutralización

Se inyectaron grupos de 4 ratones, vía intradérmica, con concentraciones de 3 – 4 - 5 – 6 - 7 µg. Dos horas después se eutanasiaron para remover la piel y medir el área hemorrágica utilizando el programa ImageJ. Luego se procedió a calcular el diámetro utilizando la siguiente fórmula: **Diámetro =  $2x (\sqrt{\text{área hemorrágica}/\pi})$** . Se obtuvo la DHM, definida como la mínima concentración de veneno capaz de generar una lesión de 10 milímetros de diámetro.

Para los ensayos de neutralización, se prepararon tubos con mezclas de una concentración fija de veneno (dosis reto:10 DHM) y diluciones de extracto o antiveneno en un volumen final de 0,1 ml. Se incubaron por 30 min a 37°C y a continuación, se inyectaron vía intradérmica grupos de 4 ratones. 2 horas después se realizó el mismo procedimiento para hallar la DHM. Posteriormente se

determinó la  $DE_{50}$ , que corresponde a la razón  $\mu\text{l}$  extracto o antiveneno/ mg de veneno en la que el diámetro de la lesión hemorrágica disminuye en un 50% (88).

### **6.11. Diseño experimental y Análisis estadísticos**

Se realizó un diseño experimental completamente al azar con 4 repeticiones para las actividades edematizante y hemorrágica. Se realizaron pruebas de normalidad y homogeneidad de varianzas, lo que permitió elegir los estadísticos de inferencia por la vía paramétrica (Anova de una vía) o no paramétrica (Kruskal-Wallis). Posteriormente se aplicaron pruebas post-Hoc. Todos los análisis fueron realizados empleando el software BioEstat 5.0. Los resultados de las diferentes actividades se representaron gráficamente en una curva dosis-respuesta (software GraphPad-Pris 5.0), donde el eje x representó la razón  $\mu\text{L}$  extracto o antiveneno / mg veneno y el eje y la variable tiempo para la actividad coagulante, porcentaje para la actividad edemática y diámetro para la actividad hemorrágica. Para el experimento con *A. salina* se realizó un análisis de regresión no lineal en el software GraphPad-Pris 5.0 y se calculó la  $CL_{50}$ .

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1. Rendimiento de extracción

El extracto etanólico total presentó un rendimiento de 12,65%, el cual fue mucho mayor al reportado en la literatura con otros solventes, por ejemplo, la extracción con metanol por el método de percolación presentó un rendimiento del 0,25% (55) y por el método Soxhlet en 48 horas fue de 0,83% (61).

El aceite esencial presentó un rendimiento de 1,45%; el cual fue más alto que el reportado por Pineda *et al.* (2012) (0,12%), quien realizó la extracción de las partes aéreas frescas por hidrodestilación de 3 horas (55) y similar al encontrado por Conde–Hernández (2017) (69) obtenido por destilación por arrastre de vapor que fue  $1,58 \pm 0,05\%$  p/p.

### 7.2. Tamizaje fitoquímico

Los metabolitos secundarios encontrados en el EET de *P. auritum* se describen a continuación y se presentan sus respectivas actividades biológicas recopiladas por la literatura (Tabla 2):

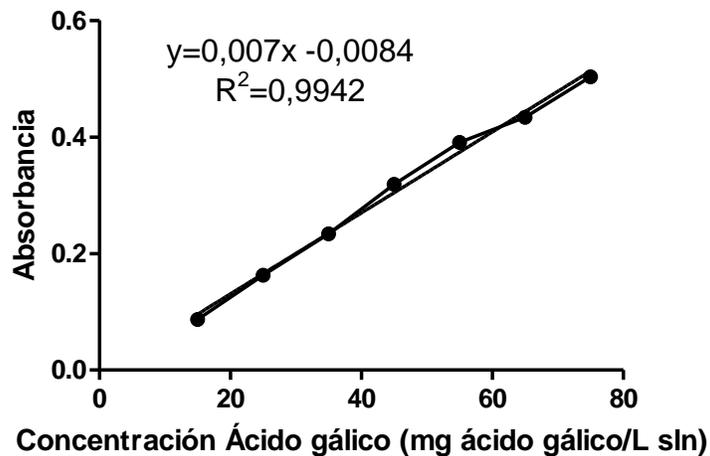
**Tabla 2.** Metabolitos secundarios presentes en el EET de *P. auritum*.

Metabolito	Actividad biológica
Cumarinas	Antifúngica (89), antiinflamatoria (90) y Anti-FLA <sub>2</sub> (91).
Saponinas	Expectorantes, antiinflamatorios, antifúngicos y antibacterianos (53), antihemorrágicos, antiproteolítico, antimiotóxicos(92).
Triterpenos	Antibacterianos (93), antifúngicos (68) y antiinflamatorios (94,95), Anti-FLA <sub>2</sub> (78)
Esteroides	Antimiotóxicos (76)
Lignanos	Protección frente al ataque de agentes patógenos (53)

Los compuestos anteriormente nombrados son los que posiblemente aportan las diferentes actividades biológicas que presenta la planta como la actividad antiinflamatoria (57), antioxidante (60), antibacteriana (65) y otras que se describen en el apartado 4.3.1. Los triterpenos y los esteroides al parecer confieren la actividad antimionecrótica debido a que estos son capaces de formar enlaces covalentes con las toxinas, en este caso con las FLA<sub>2</sub> (78). Las cumarinas y las saponinas han sido identificadas como compuestos que contrarrestan la inflamación y otra serie de complicaciones del envenenamiento por mordedura de serpiente. Las saponinas pueden neutralizar la hemorragia y la proteólisis, debido a la interacción de las saponinas con las metaloproteinasas, además son responsables de inhibir las enzimas tipo trombina y de reducir parcialmente los efectos miotóxicos (92). Las cumarinas como la umbeliferona interactúan con las FLA<sub>2</sub> del veneno de *Crotalus durissus collilineatus*, ocasionándole fuertes modificaciones estructurales en la hélice alfa principalmente en la región del sitio catalítico, lo que se traduce en la supresión del fenómeno inflamatorio producido por la toxina (91).

### **7.3. Cuantificación de fenoles**

A partir de la ecuación de la curva de calibración de ácido gálico (Figura 7), donde el eje y corresponde a la absorbancia del ácido a diferentes concentraciones (eje x), y la absorbancia de la muestra vegetal, se determinó la concentración de fenoles expresada en mg de AG / gramo de ES.



**Figura 7.** Curva de calibración de ácido gálico. Cada concentración presenta la media y la  $\pm$  desviación estándar (DE) de tres repeticiones.  $R^2=0,9942$ .

Los compuestos fenólicos poseen un anillo bencénico, con uno o más grupos hidroxilo, libres o sustituidos. El EET de *P. auritum* presentó  $43,733 \pm 2,106$  mg AG/g ES, un mayor contenido que el reportado en la literatura por el método de agitación ( $8,72 \pm 1,69$  mg AG/g) y ultrasonido ( $6,79 \pm 1,41$  mg AG/g) utilizando como disolvente el etanol. Muchas plantas usadas para propósitos terapéuticos tienen excelentes recursos fitoquímicos como los compuestos fenólicos (56), los cuales tienen propiedades astringentes (4) y se ha propuesto que son responsables de la actividad inhibitoria del veneno de serpiente debido a la interacción de las proteínas del mismo con las sustancias polifenólicas del extracto (30,96). La inhibición podría ser explicada porque estos compuestos tienen la habilidad de formar complejos con metales como el  $Ca^{2+}$ , es decir, actúan como quelantes naturales, cofactor del cual dependen las FLA<sub>2</sub> del subtipo D49 para ejercer su acción; sus grupos hidroxilo también pueden formar enlaces de hidrógeno con aminoácidos de las proteínas localizados en el sitio activo o próximos a este impidiendo la actividad enzimática; además inhiben otras actividades enzimáticas como la de hialuronidasas y de la L-amino ácido oxidasa de los venenos de serpientes (97).

#### **7.4. Actividad tóxica sobre *A. salina***

La toxicidad de las muestras se clasificó a las 6 horas como aguda y a las 24 horas como crónica (Tabla 4). El EET de *P. auritum* fue moderadamente tóxico a las 6 y 24 horas de exposición, mientras que el aceite esencial se ubicó dentro del rango de extremadamente tóxico a las 6 y 24 horas. Según los análisis estadísticos tanto el extracto como el aceite presentaron diferencias significativas en la CL<sub>50</sub> respecto al control entre las 6 y 24 horas, aunque el AE fue más tóxico que el control positivo (Tabla 3). Lo anterior puede deberse al alto contenido de monoterpenos, componentes de las esencias volátiles de las plantas y causantes de la toxicidad sobre los nauplios de *A. salina* (98).

Lagarto Parra y colaboradores (2001), en Cuba, reportaron una dosis tóxica del EET de *P. auritum* de 26.67 µg/ml (74), la cual es mucho menor que la descrita en este estudio, esto se puede deber a que las plantas presentan diferente origen ecológico, lo que se refleja en variaciones de abundancia de los compuestos tóxicos. El reporte de CL<sub>50</sub> para el AE coincide con el valor reportado por Olivero-Verbel *et al.* (2009) (99) la cual fue de 8,48 µg/ml (planta colombiana), una dosis relativamente baja; sin embargo, se debe tener en cuenta que el AE tiene un rendimiento del 1,45%, por lo que es necesario tener precaución con los AE puros, ya que se podrían presentar actividades biológicas indeseadas.

Así mismo, esta prueba se considera como un resultado preliminar de la presencia de actividad bioquímica, ya que los metabolitos secundarios posiblemente actúan sobre los componentes intra y extracelulares causando la muerte de las Artemias. Aunque se desconoce el mecanismo de acción sobre las Artemias (75), sería interesante explorar el uso potencial de estos extractos como anticancerígenos, antibacterianos, antifúngicos.

Determinar la concentración a la que una sustancia que será inoculada es tóxica, es un aspecto necesario dentro de una investigación, porque si se alcanza una elevada concentración podría causar efectos nocivos en el sistema biológico con el que se está trabajando. En cuanto al uso de las plantas para el tratamiento del accidente ofídico se debe establecer la dosis tóxica para los humanos, para lo cual

primero se realizan ensayos en modelos biológicos como *A. salina*. En el presente estudio, no se sobrepasó la CL<sub>50</sub> reportada, por lo que sería factible utilizar los metabolitos que presentan ciertas propiedades frente al envenenamiento por mordedura de serpiente como complemento del suero antiofidico; no obstante, se deben realizar más estudios sobre la toxicidad de ese metabolito, con el fin de encontrar la dosis en la que la toxicidad es mínima y es capaz de neutralizar el efecto.

**Tabla 3.** Toxicidad del EET y del AE de *P. auritum* frente a *A. salina* expresado en CL<sub>50</sub>.

	CL <sub>50</sub> (µg/mL)	
	6 horas (aguda)	24 horas (crónica)
<b>EET</b>	<b>322,954 ± 15,283*</b>	<b>215,209 ± 7,524*</b>
<b>AE</b>	<b>9,129 ± 0,305*</b>	<b>8,115 ± 0,370*</b>
<b>Dicromato de Potasio</b>	<b>83,630 ± 6,758</b>	<b>15,580 ± 2,086</b>

\* Concentraciones con diferencias significativas  $p < 0,05$  respecto al control. En cada experimento se presenta la media ± DE (n=3).

**Tabla 4.** Clasificación de toxicidad para el ensayo de *A. salina* (100).

Nº	Categoría	CL <sub>50</sub> (µg/mL)
I	Extremadamente tóxico	1-10
II	Altamente tóxico	10-100
III	Moderadamente tóxico	100-500
IV	Ligeramente tóxico	500-1000
V	Prácticamente no tóxico	1000-1500
VI	Relativamente inocuo	>1500

## 7.5. Actividad coagulante y su respectiva neutralización

La dosis mínima coagulante del veneno de la población de la cuenca del río Cauca fue más baja que la reportada para las otras dos poblaciones (río Patía y Pacífico) (Tabla 5), lo que implica una mayor actividad coagulante. Estos resultados reflejan la variación geográfica en cuanto a presencia y abundancia de componentes en el veneno, reportada también para otras poblaciones de la misma especie (38). Tal como se manifiesta en el capítulo de marco teórico, Mora y colaboradores (2014) encontraron marcadas diferencias entre el veneno de la población del río Patía (*Bothrops ayerbei*) y la población del Pacífico (*Bothrops asper*), las cuales difieren significativamente en la abundancia de FLA<sub>2</sub>, resultados que correlacionaron bien con la actividad miotóxica *in vivo*. Dicho estudio no incluyó la población del río Cauca; sin embargo, pese a que no se han realizado estudios de proteómica de esta población, de acuerdo con estos resultados, podría inferirse una alta abundancia de serina proteasas similares a trombina entre los componentes de su veneno, para confirmar esta hipótesis será necesario profundizar al respecto (Mora, D, com. pers.).

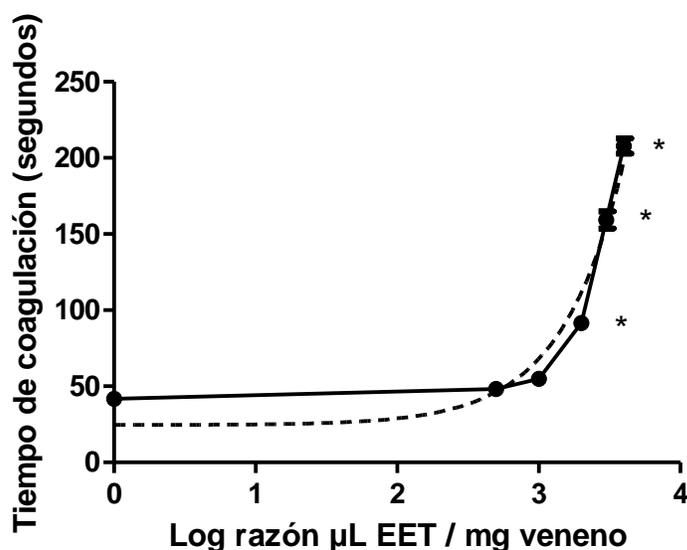
**Tabla 5.** Comparación de la dosis coagulante mínima de las tres poblaciones. En cada experimento se presenta la media y  $\pm$  DE (n=6).

<b>Veneno <i>B. asper</i></b>	<b>Dosis coagulante mínima (<math>\mu</math>g)</b>	<b>Fuente del dato</b>
<b>Población río Cauca</b>	<b>0,206 <math>\pm</math> 0,026</b>	Presente trabajo
<b>Población Pacífico</b>	<b>0,37 <math>\pm</math> 0,05</b>	Mora-Obando <i>et al.</i> , 2014 (50)
<b>Población río Patía</b>	<b>0,96 <math>\pm</math> 0,10</b>	Mora-Obando <i>et al.</i> , 2014 (50)

La actividad coagulante del veneno de *Bothrops asper* se explica por la formación inestable de las redes de fibrina a partir del fibrinógeno debido a la presencia de toxinas, similares a trombina, que activan las plaquetas y el factor XII, donde los factores moleculares V y VI que se encuentran en el veneno activan directamente

el factor X (vía común). Las acciones conjuntas de plaquetas, el factor XII y el factor X conducen a un estado hipercoagulable en el paciente. A medida que el fibrinógeno se convierte en fibrina, se vuelve más inestable y susceptible de lisis por sistemas fibrinolíticos naturales. Por lo tanto, el fibrinógeno se consume en grandes cantidades, evitando que la sangre se coagule y cause coagulación intravascular diseminada (5) y finalmente puede llevar a un proceso hemorrágico (101).

En cuanto a la neutralización de la actividad coagulante, la Dosis eficaz del EET de *P. auritum* fue de 2363,870  $\mu$ L de extracto / mg de veneno. La Figura 8 muestra que las últimas tres razones presentan diferencias significativas respecto al control, entre las cuales se encuentra la DE<sub>50</sub>.



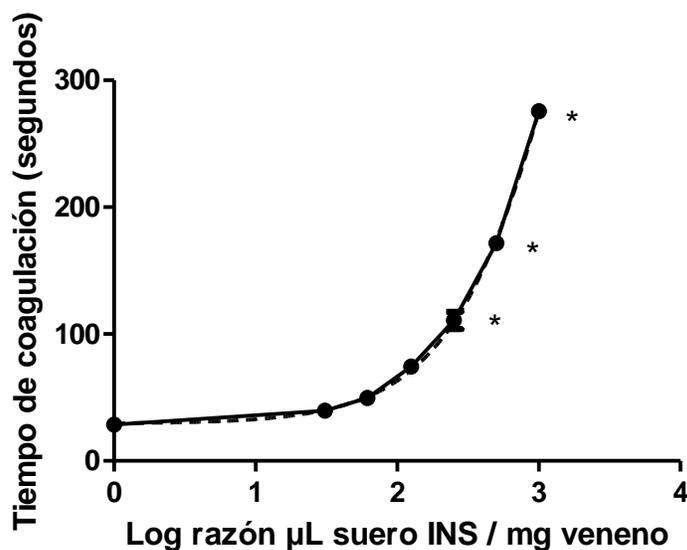
**Figura 8.** Neutralización de la actividad coagulante del veneno de *B. asper* por el EET de *P. auritum*. \* Razones con diferencias significativas  $p < 0,05$ . La línea punteada representa la regresión logarítmica ( $R^2 = 0,9558$ ). Las razones de EET / veneno fueron transformadas a escala logarítmica, 0= control positivo; 2,699= 500; 3= 1000; 3,301= 2000; 3,477= 3000; 3,602= 4000. Los resultados son presentados como el promedio del tiempo en segundos  $\pm$  DE (n=6).

El mecanismo de acción podría explicarse por interacción de los metabolitos secundarios presentes en la planta con las enzimas serina proteinasas tipo

trombina, lo que ha sido demostrado previamente con extracto de la planta *Mikania glomerata* (Asteraceae), el cual inhibe la actividad coagulante inducida por los venenos de *Bothrops jararacussu*, *Bothrops neuwiedi* y *Bothrops moojeni*, los autores proponen que el extracto actúa como un poderoso inhibidor de esta enzima aunque se desconoce el mecanismo de acción (102).

La actividad neutralizante también puede deberse a la afinidad de los componentes químicos presentes en el extracto con los factores (VIII, IX, XI y XII) implicados en la cascada de coagulación. Magalhães y colaboradores (2011) (103) afirman que las principales proteínas procoagulantes en el veneno de *Bothrops atrox* actúan esencialmente en la vía común de la cascada, lo que puede indicar que los extractos actúan inhibiendo tanto las enzimas de tipo trombina del veneno y como la trombina endógena.

La dosis eficaz del suero antiofídico del Instituto Nacional de Salud fue de 193,057  $\mu$ L de antiveneno / mg de veneno (Figura 9), la cual es mucho menor que la dosis eficaz del EET de *P. auritum* (Tabla 7).



**Figura 9.** Neutralización de la actividad coagulante del veneno de *B. asper* por el suero antiofídico polivalente del INS. \* Razones con diferencias significativas  $p < 0,05$ . La línea punteada representa la regresión logarítmica ( $R^2 = 0,9975$ ). Las razones de suero INS / veneno fueron transformadas a escala logarítmica, 0= control positivo; 1,495= 31,25;

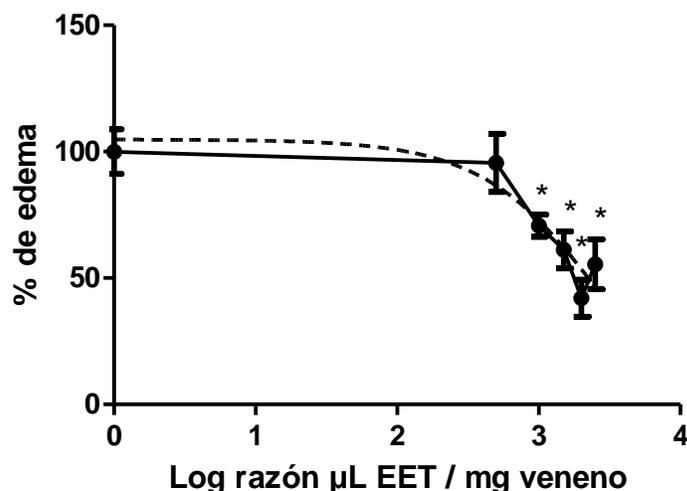
1,796= 62,5; 2,097= 125; 2,398= 250; 2,699= 500; 3= 1000. Los valores son expresados como promedio del tiempo en segundos  $\pm$  DE (n=6).

Lo anterior se explica porque el suero antiofídico es una solución de inmunoglobulinas purificadas a partir de plasma equino hiperinmune, en cambio el extracto es una combinación de metabolitos secundarios, con potencial para inhibir algunos efectos de accidente botrópico. En este sentido, es necesario aislar los componentes del extracto para obtener posiblemente la totalidad de su eficacia.

#### **7.6. Actividad edematizante y su respectiva neutralización**

La dosis edematizante mínima para la población de la cuenca del río Cauca fue de  $0,768 \pm 0,065 \mu\text{g}$ , la cual no es comparable con la de las otras poblaciones debido a que se evaluaron dosis fijas de veneno. La actividad edematizante es una actividad farmacológica multifactorial que depende de la acción sinérgica de varias toxinas, lo que sugiere que la actividad enzimática no es estrictamente necesaria para inducir este efecto pues se desencadenan un complejo proceso inflamatorio en los tejidos, asociado con la liberación de sustancias no proteicas como las aminas (histamina, bradiquinina, serotonina y acetilcolina) que llevan a la hipotensión y dolor severo en las víctimas (104). Las FLA<sub>2</sub> juegan un papel importante porque hidrolizan los glicerofosfolípidos, generando lisofosfolípidos y ácidos grasos los cuales son precursores de la formación de eicosanoides, además es responsable de la degranulación de mastocitos lo que potencializa el edema (105).

La DE para esta actividad se obtuvo a una razón de 1787,708  $\mu\text{l}$  de EET / mg de veneno (Figura 10).

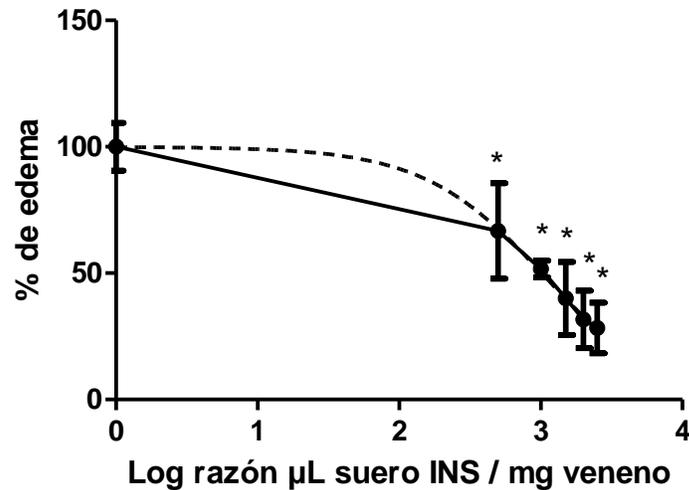


**Figura 10.** Neutralización de la actividad edematizante del veneno de *B. asper* por el EET de *P. auritum*. \* Razones con diferencias significativas  $p < 0,05$ . La línea punteada representa la regresión logarítmica ( $R^2 = 0,7706$ ). Las razones de EET / veneno fueron transformadas a escala logarítmica, 0= control positivo; 2,699= 500; 3= 1000; 3,176= 1500; 3,301= 2000; 3,398= 2500. Los valores son expresados como el promedio del porcentaje de edema  $\pm$  DE (n=4).

La actividad edematizante posiblemente es neutralizada por el contenido de triterpenos y esteroides de la planta, los cuales han sido reportados como potentes agentes anti-inflamatorios (94,95). Como lo corrobora el estudio realizado con extracto de *Humirianthera ampla* (Icacinaceae), que neutraliza efectivamente el edema provocado por los venenos de *Bothrops jararacussu*, *B. atrox* y *Bothrops jararaca* debido a la presencia de diterpenoides, triterpenoides y esteroides (72). Además como afirma Mourão De Moura y colaboradores (2014) los metabolitos secundarios pueden actuar como inhibidores enzimáticos, inmunomoduladores e inactivadores químicos (3).

La DE del suero del INS se obtuvo a una razón de 1364,723  $\mu\text{L}/\text{mg}$  de veneno (Figura 11), se probaron razones que sobrepasaban los 1000  $\mu\text{L}$  de antiveneno / mg de veneno debido a que no hubo neutralización con la dosis nombrada ni con las inferiores, la razón no difiere mucho de la dosis eficaz del EET de *P. auritum*,

pero los análisis estadísticos mostraron diferencias significativas entre estas (Tabla 7).

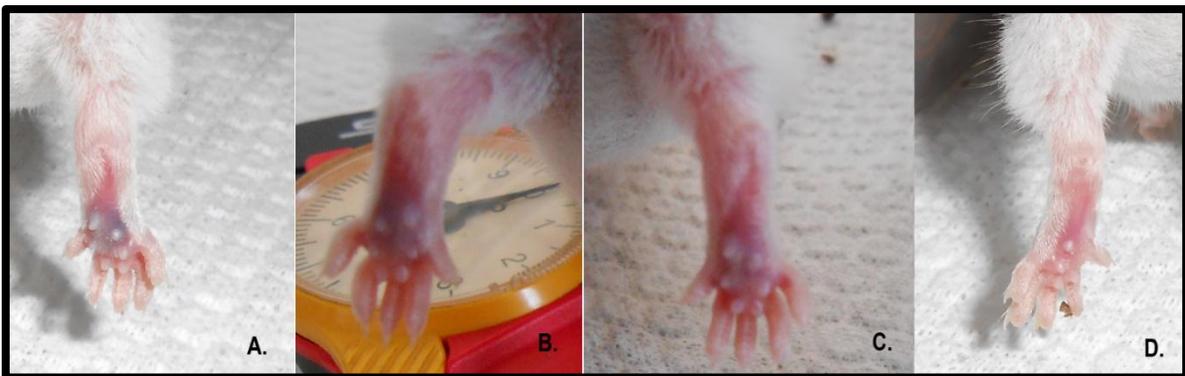


**Figura 11.** Neutralización de la actividad edematizante del veneno de *B. asper* por el suero antiofídico polivalente del INS. \* Razones con diferencias significativas  $p < 0,05$ . La línea punteada representa la regresión logarítmica ( $R^2 = 0,8434$ ). Las razones de EET / veneno fueron transformadas a escala logarítmica, 0= control positivo; 2,699= 500; 3= 1000; 3,176= 1500; 3,301= 2000; 3,398= 2500. Los valores son expresados como el promedio del porcentaje de edema  $\pm$  DE (n=4).

Se ha demostrado que los efectos locales producidos durante un envenenamiento no son bien neutralizados por los sueros usados actualmente como tratamiento. Por ejemplo, Rojas y colaboradores (2005) probaron la neutralización de dos sueros antiofídicos (Perú y Costa Rica) sobre el veneno de *Bothrops brazili* y observaron resultados negativos, el suero producido en Perú no neutralizó el efecto edematizante con la dosis más alta; el suero antiofídico producido por Costa Rica mostró una DE a una razón de  $1452 \pm 203 \mu\text{L}$  de antiveneno / mg de veneno (87). Los resultados reflejan que el extracto de *P. auritum* tiene un efecto antiinflamatorio similar al del suero del INS, por lo que podría ser usado como un complemento del suero antiofídico del INS y convertirse en una buena alternativa para las personas que viven en zonas rurales, quienes no tienen la facilidad de

llegar a un centro de salud a tiempo; no obstante, es necesario realizar más estudios al respecto.

En el tejido donde se inyectó el veneno para determinar la dosis efectiva edemática se observó una posible necrosis (Figura 12). La mionecrosis es provocada por la acción de las FLA<sub>2</sub>, las cuales inician una serie compleja de eventos de degeneración asociados con hipercontracción y daño mecánico de la membrana plasmática, activación de los canales y sobrecarga Ca<sup>2+</sup> mitocondrial conduciendo a apoptosis y necrosis de las células musculares. El morado que presenta la pata del ratón posiblemente es un proceso de necrosis que es neutralizado paulatinamente por el EET de *P. auritum*.



**Figura 12.** Inflamación producida por el veneno de *B. asper* en la actividad edematizante. **A.** Control positivo y la neutralización de *P. auritum* a diferentes razones **B.** 500 **C.** 1000 **D.** 1500 µL de EET / mg de veneno. Fotografías: Rengifo, A (2017).

Las citoquinas juegan un papel importante en la mediación de la respuesta inflamatoria del veneno. Los estudios clínicos han descrito el aumento en suero de la Interleucina 6 (IL-6) e IL-8 en víctimas de las mordeduras de serpientes del género *Bothrops* durante los 5 primeros días (106). La IL-1, IL-6 y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) juegan un papel crítico en la producción de proteínas de fase aguda por el hígado; actúan sobre el hipotálamo para inducir fiebre y en el endotelio de la médula ósea para liberar neutrófilos, que son la primera población de células en cruzar las paredes de los vasos y penetrar en los sitios de

inflamación. La IL-10 desempeña un importante papel como regulador en la respuesta de fase aguda debido a su capacidad primaria de suprimir la producción de IL-1, IL-6 y TNF- $\alpha$  por los macrófagos (107). Con base a esta información, la inhibición de la acción inflamatoria y coagulante del veneno de *B. atrox* por el extracto de la planta *Marsypianthes chamaedrys* (Lamiaceae), no afectó la concentración de IL-10, lo que representa un aspecto positivo de la acción del extracto, ya que no interfiere con la autorregulación de la respuesta inmune e inhibe la migración de leucocitos y la liberación de las citoquinas pro-inflamatorias IL-6 y TNF- $\alpha$  (103).

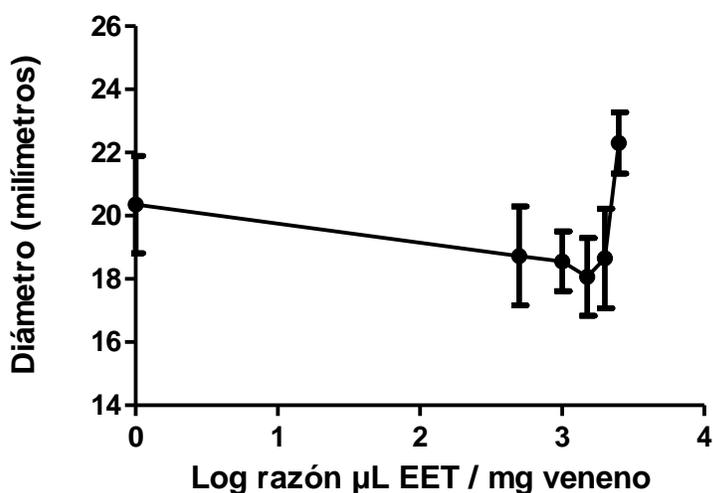
### 7.7. Actividad hemorrágica y su respectiva neutralización

La dosis hemorrágica mínima fue mayor que el de las poblaciones del río Patía y el Pacífico (Tabla 6), lo que se traduce en una actividad hemorrágica menor. Esta baja dosis podría estar relacionada con una menor abundancia de metaloproteinasas de tipo I (responsables de la hemorragia local) las cuales son dependientes de zinc; degradan las proteínas de la lámina basal y de la matriz extracelular y son citotóxicas para las células endoteliales, por lo que desestabilizan los capilares, ocasionando la salida de eritrocitos y con ello la hemorragia. La mayoría de las metaloproteinasas son  $\alpha$ -fibrinogenasas, las cuales degradan el fibrinógeno e inhiben la agregación plaquetaria (108).

**Tabla 6.** Comparación de la dosis hemorrágica mínima de las tres poblaciones. En cada experimento se presenta la media y  $\pm$  DE (n=4).

<b>Veneno <i>B. asper</i></b>	<b>Dosis hemorrágica mínima (<math>\mu</math>g)</b>	<b>Fuente del dato</b>
<b>Población Río Patía</b>	0,24 $\pm$ 0,04	Mora-Obando <i>et al.</i> , 2014 (50)
<b>Población Pacífico</b>	1,44 $\pm$ 0,20	Mora-Obando <i>et al.</i> , 2014 (50)
<b>Población Río Cauca</b>	3,553 $\pm$ 0,292	Este trabajo

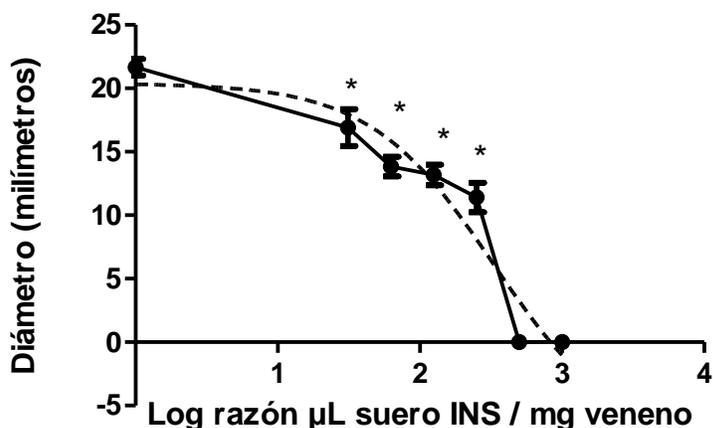
Como observa en la Figura 13, el EET de *P. auritum* no neutralizó la actividad hemorrágica del veneno, lo que se explicaría posiblemente por la ausencia de metabolitos capaces de interactuar o presentar una acción quelante a través de la formación de complejos de  $Zn^{2+}$  con la metaloproteinasas (17), principales responsables de esta actividad en el veneno de *B. asper*. El aumento del diámetro de la lesión en la razón de 2500  $\mu$ L de EET / mg de veneno probablemente pudo ser una reacción individual de uno de los ratones el cual hizo que los valores promedio aumentaran, ya que no existen reportes en la literatura de que los metabolitos secundarios potencialicen la acción de las metaloproteinasas. Además, en el control con solo extracto no se observó ninguna lesión.



**Figura 13.** Neutralización de la actividad hemorrágica del veneno de *B. asper* por el EET de *P. auritum*. Las razones de EET / veneno fueron transformadas a escala logarítmica, 0= control positivo; 2,699= 500; 3= 1000; 3,176= 1500; 3,301= 2000; 3,398= 2500. Los valores son expresados como el promedio del diámetro  $\pm$  DE (n=4).

Por el contrario, la actividad hemorrágica fue neutralizada eficazmente por el suero del INS a una razón de 290,321  $\mu$ L de suero del INS / mg de veneno (Figura 14). Lo que probablemente se debe a la buena interacción que tienen las

inmunoglobulinas del suero con las metaloproteinasas, logrando controlar este importante síntoma del envenenamiento por mordedura de serpiente.



**Figura 14.** Neutralización de la actividad hemorrágica del veneno de *B. asper* por el suero antiofídico polivalente del INS. \* Razones con diferencias significativas  $p < 0,05$ . La línea punteada representa la regresión logarítmica ( $R^2 = 0,7904$ ). Las razones de suero INS / veneno fueron transformadas a escala logarítmica, 0= control positivo; 1,495= 31,25; 1,796= 62,5; 2,097= 125; 2,398= 250; 2,699= 500; 3= 1000. Los valores son expresados como promedio del diámetro  $\pm$  DE (n=4).

Al realizar la comparación de la eficacia del EET de *P. auritum* contra el suero antiofídico (Tabla 7) se puede inferir que el suero es mucho mejor en cuanto a la neutralización del efecto coagulante y hemorrágico, pero tanto el extracto como el suero tienen un efecto similar neutralizando el edema. Esto sugiere que la planta tiene potencial como neutralizante de esta actividad local y podría explorarse como complemento del suero, de encontrar resultados positivos, sería de gran impacto social esencialmente en las zonas rurales, donde el tiempo que transcurre entre la mordedura y la llegada al centro de salud puede ser prolongado.

Asimismo, se comparó la eficacia del suero antiofídico del INS contra el veneno de *B. asper* de la cuenca del río Cauca y la población del Pacífico, dando como resultados variaciones de las dosis efectivas siendo mejor para la población del Pacífico. Esto confirma que la neutralización del veneno de las especies o poblaciones con las que se fabrica el suero es apropiada, sin embargo, aunque se

presenta reactividad cruzada, al probar con un veneno diferente disminuye su potencial. Por lo cual es importante tener en cuenta la variación intraespecífica del veneno durante el proceso de la fabricación de antivenenos y se recomienda el uso de especies y poblaciones propias de la región donde ocurren con mayor frecuencia los envenenamientos.

**Tabla 7.** Comparación entre las dosis efectivas del extracto de *P. auritum* y del suero del INS para cada una de las actividades biológicas.

<b>Dosis Efectivas</b>	<b>Actividad coagulante (<math>\mu</math>l de antiveneno/mg de veneno)</b>	<b>Actividad Edematizante (<math>\mu</math>l de antiveneno/mg de veneno)</b>	<b>Actividad Hemorrágica (<math>\mu</math>l de antiveneno/mg de veneno)</b>
EET de <i>P. auritum</i>	2363,870 $\pm$ 49,948*	1787,708 $\pm$ 288,734*	-
Suero del INS Contra el veneno de la población del río Cauca	193,057 $\pm$ 5,961*	1364,723 $\pm$ 153,370*	290,321 $\pm$ 16.567
Suero del INS contra el veneno de la población Pacífico (109)	126	-	183

\* Dosis eficaz con diferencias significativas  $p < 0,05$ . – Ausencia de neutralización en las dosis probadas. En cada experimento se presenta la media  $\pm$  DE.

## 7.8 Observaciones adicionales

La incubación del extracto vegetal con el veneno previa a la inyección de la mezcla en ratones no degrada las proteínas. Esto ha sido demostrado por otros autores, quienes manifiestan que no se observan cambios en el perfil electroforético del veneno de *B. jararacussu* con el extracto metanólico de *Cordia verbenacea* (110). Tampoco se evidencia un cambio en la intensidad de las bandas del perfil electroforético, lo que sugiere que los componentes del extracto pueden actuar ocupando los sitios activos u otros sitios de las toxinas, inducir cambios conformacionales en las proteínas y evitar, de forma competitiva o no competitiva, la unión del sustrato a las enzimas (111).

Los extractos vegetales son un excelente recurso alternativo de agentes antiofídicos. En muchas partes del mundo aún los extractos vegetales son tradicionalmente evocados para las mordeduras de serpientes (112) y en muchos casos se hace necesaria evidencia científica de sus actividades farmacológicas. Muchas plantas ya han sido estudiadas como se muestra en los antecedentes, pero aún faltan muchas por investigar.

## 8. CONCLUSIONES

- Se determinó por tamizaje fitoquímico cualitativo que el extracto etanólico de *P. auritum* presenta cumarinas, saponinas, triterpenos y lignanos, los cuales tienen alto potencial biológico en la neutralización del efecto coagulante y edematizante del veneno de *B. asper* de la población de la cuenca del río Cauca. Sin embargo, no se obtuvieron resultados positivos en cuanto a la neutralización de la hemorragia en las dosis probadas.
- El contenido de fenoles es alto comparado con otros estudios realizados con la misma planta, los cuales tienen propiedades astringentes y pueden ser responsables de la actividad inhibitoria del veneno de serpiente.
- La toxicidad frente a *A. salina* del EET de *P. auritum* es moderadamente tóxica y lo contrario pasa con el aceite esencial que está dentro del rango de extremadamente tóxico. Por lo cual se debe tener cuidado con las concentraciones a las cuales se manejan los extractos vegetales en cuanto al tratamiento del accidente ofídico.
- El EET de *P. auritum* neutralizó el edema y el efecto coagulante, aunque no fue tan efectivo como el suero del INS.
- Los ensayos de las actividades biológicas de la población de *B. asper* de la cuenca del río Cauca realizados en este estudio reflejan variaciones intraespecíficas en comparación con venenos de las otras poblaciones, de la misma especie en estudios anteriores.

## 9. RECOMENDACIONES

- Fraccionar el EET de *P. auritum* y realizar ensayos similares con el fin de identificar el o los componentes activos asociados a la neutralización de los efectos edemático y coagulante.
- Evaluar las actividades antimiotóxica, antiproteolítica y antidesfibrinante del EET de *P. auritum* frente al veneno de *B. asper*.
- Realizar estudios comparativos con los venenos de las otras dos poblaciones de *B. asper* debido a las diferencias funcionales reportadas previamente.
- Probar métodos utilizados por las comunidades como por ejemplo emplastos, infusiones, etc, en las investigaciones para que sean más reales en la práctica.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

1. WHO. Fact sheet N° 337. Snake antivenoms [Internet]. 2015. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs337/es/>
2. SIVIGILA. Protocolo de vigilancia en salud pública. Accidente ofídico [Internet]. 2014. Available from: [http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/Subdireccion-Vigilancia/sivigila/Protocolos SIVIGILA/PRO Accidente Ofidico.pdf](http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/Subdireccion-Vigilancia/sivigila/Protocolos%20SIVIGILA/PRO%20Accidente%20Ofidico.pdf)
3. Mourão De Moura V, Serra Bezerra AN, Veras Mourão RH, Varijão Lameiras JL, Almeida Raposo JD, Luckwu De Sousa R, et al. 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* [Internet]. 2014;85:59–68. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2014.04.009>
4. Abubakar MS, Sule MI, Pateh UU, Abdurahman EM, Haruna a. K, Jahun BM. In vitro snake venom detoxifying action of the leaf extract of *Guiera senegalensis*. *J Ethnopharmacol*. 2000;69(3):253–7.
5. Gómez-Betancur I, Benjumea D, Patiño A, Jiménez N, Osorio E. Inhibition of the toxic effects of *Bothrops asper* venom by pinostrobin, a flavanone isolated from *Renalmia alpinia* (Rottb.) MAAS. Vol. 155, *Journal of Ethnopharmacology*. 2014. p. 1609–15.
6. SIVIGILA. Vigilancia rutinaria Departamental [Internet]. 2016. Available from: <http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/Subdireccion-Vigilancia/sivigila/Paginas/vigilancia-rutinaria.aspx>
7. Otero R, Núñez V, Jiménez SL, Fonnegra R, Osorio RG, García ME, et al. Snakebites and ethnobotany in the northwest region of Colombia. Part II: Neutralization of lethal and enzymatic effects of *Bothrops atrox* venom. *J*

- Ethnopharmacol. 2000;71(3):505–11.
8. Vásquez J, Jiménez SL, Gómez IC, Rey JP, Henao AM, Marín DM, et al. Snakebites and ethnobotany in the Eastern region of Antioquia, Colombia - The traditional use of plants. J Ethnopharmacol. 2013;146(2):449–55.
  9. Vásquez J, Alarcón JC, Jiménez SL, Jaramillo GI, Gómez-Betancur IC, Rey-Suárez JP, et al. Main plants used in traditional medicine for the treatment of snake bites in the regions of the department of Antioquia, Colombia. J Ethnopharmacol [Internet]. 2015;170:158–66. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2015.04.059>
  10. Pereañez J a, Núñez V, Patiño AC, Londoño M, Quintana JC. Inhibitory Effects of Plant Phenolic Compounds on Enzymatic and Cytotoxic Activities Induced By a Snake Venom Phospholipase a. VITAE, Rev LA Fac QUÍMICA Farm. 2011;18(3):295–304.
  11. Patiño AC, López J, Aristizábal M, Quintana JC, Benjumea D. Efecto inhibitorio de extractos de *Renealmia alpinia* Rottb. Maas (Zingiberaceae) sobre el veneno de *Bothrops asper* (mapaná). Biomédica Rev del Inst Nac Salud [Internet]. 2012;32(3):365–74. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23242293>
  12. I.N.S. Vigilancia y control en salud pública. Protocolo de vigilancia de accidente ofídico [Internet]. 2010. Available from: [https://www.minsalud.gov.co/comunicadosPrensa/Documents/ACCIDENTE\\_OFIDICO.pdf#search=accidente%2520bothropico](https://www.minsalud.gov.co/comunicadosPrensa/Documents/ACCIDENTE_OFIDICO.pdf#search=accidente%2520bothropico)
  13. Gutiérrez JM, Arroyo O, Bolaños R. Mionecrosis, hemorragia y edema inducidos por el veneno de *Bothrops asper* en ratón blanco. Toxicon. 1980;18(5–6):603–10.
  14. Gutiérrez JM, Chaves F. Efectos proteolítico, hemorrágico y mionecrótico de los venenos de serpientes costarricenses de los géneros *Bothrops*, *Crotalus* y *Lachesis*. Toxicon. 1980;18(3):315–21.

15. Gutiérrez JM, Rucavado A, Chaves F, Díaz C, Escalante T. Experimental pathology of local tissue damage induced by *Bothrops asper* snake venom. *Toxicon*. 2009;54(7):958–75.
16. Ayerbe-González S. Ofidismo en Colombia: Enfoque, Diagnostico y Tratamiento. In: Ordoñez C., Ferrada R, Buitrago R, editors. *Cuidado Intensivo y Trauma*. 2a ed. Bogotá: Editorial Distribuna Ltda; 2009.
17. Leanpolchareanchai J, Pithayanukul P, Bavovada R. Anti-necrosis potential of polyphenols against snake venoms. *Immunopharmacol Immunotoxicol* [Internet]. 2009;31(4):556–62. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19874222>
18. Mourão De Moura V, Freitas De Sousa LA, Dos-Santos MC, Almeida Raposo JD, Evangelista Lima A, Bezerra de Oliveira R, et al. Plants used to treat snakebites in Santarém, western Pará, Brazil: An assessment of their effectiveness in inhibiting hemorrhagic activity induced by *Bothrops jararaca* venom. *J Ethnopharmacol* [Internet]. 2015;161:224–32. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2014.12.020>
19. Cardoso, J.L., Fan HW, França FO, Jorge MT, Leite RP, Nishioka SA, et al. Randomized comparative trial of three antivenoms in the treatment of envenoming by lance-headed vipers (*Bothrops jararaca*) in São Paulo, Brazil. *J Q Med*. 1993;86:315–325.
20. Da Silva JO, Coppede JS, Fernandes VC, Sant’Ana CD, Ticli FK, Mazzi M V., et al. Antihemorrhagic, antinucleolytic and other antiophidian properties of the aqueous extract from *Pentaclethra macroloba*. *J Ethnopharmacol*. 2005;100(1–2):145–52.
21. Ode OJ, Asuzu IU. The anti-snake venom activities of the methanolic extract of the bulb of *Crinum jagus* (Amaryllidaceae). *Toxicon*. 2006;48(3):331–42.
22. Gutiérrez JM, León G, Rojas G, Lomonte B, Rucavado A, Chaves F. Neutralization of local tissue damage induced by *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom. *Toxicon*. 1998;36(11):1529–38.

23. León G, Monge M, Rojas E, Lomonte B, Gutiérrez JM. Comparison between IgG and F(ab')<sub>2</sub> polyvalent antivenoms: Neutralization of systemic effects induced by *Bothrops asper* venom in mice, extravasation to muscle tissue, and potential for induction of adverse reactions. *Toxicon*. 2001;39(6):793–801.
24. WHO. Monographs on medicinal plants commonly used in the Newly Independent States (NIS) [Internet]. 2010. Available from: <http://apps.who.int/medicinedocs/documents/s17534en/s17534en.pdf>
25. Reyes Chilpa R, Jimenez Estrada M. Quimica de las plantas alexiteras. *Interciencia*. 1995;5(20):257–63.
26. Otero R, Fonnegra R, Jiménez SL, Núñez V, Evans N, Alzate SP, et al. Snakebites and ethnobotany in the northwest region of Colombia. Part I: Traditional use of plants. *J Ethnopharmacol*. 2000;71(3):493–504.
27. Otero R, Núñez V, Barona J, Fonnegra R, Jiménez SL, Osorio R., et al. Snakebites and ethnobotany in the northwest region of Colombia. Part III: Neutralization of the haemorrhagic effect of *Bothrops atrox* venom. *J Ethnopharmacol*. 2000;73:233–41.
28. Otero R, Valderrama Hernández R, Osorio RG, Posada LE. Programa de atención primaria del accidente ofídico: una propuesta para Colombia. *Iatreia* [Internet]. 1992;5(2):96–102. Available from: <https://aprendeenlinea.udea.edu.co/revistas/index.php/iatreia/article/view/3481>
29. Otero R, Tobón GS, Gómez LF, Osorio R, Valderrama R, Hoyos D, et al. Accidente ofídico en Antioquia y Chocó. *Acta Médica Colomb*. 1992;17(4):229–49.
30. Asuzu IU, Harvey a. L. The antisnake venom activities of *Parkia biglobosa* (Mimosaceae) stem bark extract. *Toxicon*. 2003;42(7):763–8.
31. Biondo R, Pereira AMS, Marcussi S, Pereira PS, França SC, Soares AM.

- Inhibition of enzymatic and pharmacological activities of some snake venoms and toxins by *Mandevilla velutina* (Apocynaceae) aqueous extract. *Biochimie*. 2003;85(10):1017–25.
32. Borges MH, Soares AM, Rodrigues VM, Andrião-Escarso SH, Diniz H, Hamaguchi A, et al. Effects of aqueous extract of *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) on actions of snake and bee venoms and on activity of phospholipases A2. *Comp Biochem Physiol - B Biochem Mol Biol*. 2000;127(1):21–30.
  33. Borges MH, Soares a. M, Rodrigues VM, Oliveira F, Fransheschi a. M, Rucavado A, et al. Neutralization of proteases from *Bothrops* snake venoms by the aqueous extract from *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae). *Toxicon*. 2001;39(12):1863–9.
  34. Cavalcante WLG, Campos TO, Dal Pai-Silva M, Pereira PS, Oliveira CZ, Soares AM, et al. Neutralization of snake venom phospholipase A2 toxins by aqueous extract of *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) in mouse neuromuscular preparation. *J Ethnopharmacol*. 2007;112(3):490–7.
  35. Melo P a., Do Nascimento MC, Mors WB, Suarez-Kurtz G. Inhibition of the myotoxic and hemorrhagic activities of crotalid venoms by *Eclipta prostrata* (Asteraceae) extracts and constituents. *Toxicon*. 1994;32(5):595–603.
  36. Otero R, Fonnegra R, Jiménez SL. Planta utilizadas contra mordeduras de serpientes en Antioquia y Chocó Colombia. Medellín: Grandacolor; 2000. 223-225 p.
  37. Campbell JA, Lamar WW. The venomous reptiles of the Western Hemisphere. Ithaca, NY: Comstock; 2004.
  38. Alape-Girón A, Sanz L, Escolano J, Flores-Díaz M, Madrigal M, Sasa M, et al. Snake venomomics of the lancehead pitviper *Bothrops asper*. Geographic, individual, and ontogenetic variations. *J Proteome Res*. 2008;7(8):3556–71.
  39. Sasa M, Wasko DK, Lamar WW. Natural history of the terciopelo *Bothrops*

*asper* (Serpentes: Viperidae) in Costa Rica. *Toxicon* [Internet].

2009;54(7):904–22. Available from:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.06.024>

40. Ayerbe González S, Latorre Ledezma JP. Manual Para La Prevención Y Mejoramiento En La Atención Del Paciente Con Accidente Ofídico. In: Editorial. Popayán: Gobernación del Departamento del Cauca, Secretaría Departamental de Salud; 2010.
41. Folleco-Fernández AJ. Taxonomía del complejo *Bothrops asper* (Serpentes:Viperidae) en el sudoeste de Colombia. Revalidación de la especie *Bothrops rhombeatus* (García 1896) y descripción de una nueva especie. *Rev Noved Colomb*. 2010;10:1–34.
42. Liévano-Bonilla AF. Comparación morfológica de tres poblaciones de serpientes del complejo *Bothrops asper* (SERPENTES: VIPERIDAE) del suroccidente colombiano. Tesis de pregrado en Biología. Universidad del Cauca; 2016.
43. Angulo Y, Lomonte B. Biochemistry and toxicology of toxins purified from the venom of the snake *Bothrops asper*. *Toxicon* [Internet]. 2009;54(7):949–57. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2008.12.014>
44. Stocker K, Barlow GH. The coagulant enzyme from *Bothrops atrox* venom (Batroxobin). *Methods Enzymol*. 1976;45:214–23.
45. Hofmann H, Bon C. Blood coagulation induced by the venom of *Bothrops atrox*. 2. Identification, purification and properties of two factor x activators. *Biochemistry*. 1986;26:780–7.
46. Gutiérrez JM, Rucavado A. Snake venom metalloproteinases : Their role in the pathogenesis of local tissue damage. *Biochimie*. 2000;82:841–50.
47. Arni RK, Ward RJ. Phospholipase A2 - a structural review. *Toxicon*. 1996;34(8):827–41.
48. Gutiérrez J maría, Lomonte B. Phospholipase A2 myotoxins from *Bothrops*

snake venoms. *Toxicon*. 1995;33(11):1405–24.

49. Navia Pizo RE. Determinación de la dosis letal 50 del veneno de tres poblaciones de *Bothrops asper* (Serpentes:viperidae) y su incidencia epidemiológica en el departamento del Cauca, Colombia. Tesis de pregrado en Biología. Universidad del Cauca; 2005.
50. Mora-Obando D, Guerrero-Vargas JA, Prieto-Sánchez R, Beltrán J, Rucavado A, Sasa M, et al. Proteomic and functional profiling of the venom of *Bothrops ayerbei* from Cauca, Colombia, reveals striking interspecific variation with *Bothrops asper* venom. *J Proteomics* [Internet]. 2014;96:159–72. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2013.11.005>
51. Tebbs MC. Revision of Piper (Piperaceae) in the New World. 2. The taxonomy of Piper section Churumayu [Internet]. *Bulletin British Museum (Natural History)*. Botany series. 1990. p. 193–236. Available from: <http://www.biodiversitylibrary.org/page/2239754#page/1/mode/1up>
52. Agudelo H, Vélez N, Sepúlveda N, Macías P D. Riqueza Biótica Quindiana. Universida. Agudelo Henao CA, editor. Armenia: Centro de Estudios e Investigaciones en Biodiversidad y Biotecnología de la Universidad del Quindío; 2006.
53. Piñol TM, Palazón J. Metabolismo secundario. In: *Fisiología y Bioquímica vegetal*. Interameri. España; 1993. p. 287–8.
54. Verpoorte R, Alfermann AW. *Metabolic Engineering of Plant Secondary Metabolism*. London: Kluwer Academic; 2000. 1-3 p.
55. Pineda R, Vizcaíno S, García CM, Gil G J, Durango DL. Chemical composition and antifungal activity of *Piper auritum* Kunth and *Piper holtonii* C. DC. against phytopathogenic fungi. *Chil J Agric Res*. 2012;72(4):507–15.
56. Conde-Hernández LA, Guerrero-Beltrán JÁ. Total phenolics and antioxidant activity of *Piper auritum* and *Porophyllum ruderale*. *Food Chem*. 2014;142:455–60.

57. Vega M. R, Lagarto P. A. Evaluación del efecto antiinflamatorio del extracto de *Piper auritum* H.B.K. y toxicidad aguda oral. Rev Cuba Plantas Med. 1999;4(1):11–4.
58. Vizoso P. A, García L. A, Ramos R. A. Ausencia de potencial genotóxico in vitro e in vivo de un extracto fluido de *Piper auritum* H.K.B. Rev Cuba Plantas Med. 1999;3(2):57–64.
59. Perez G. RM, Flores C. LB, Neira G. AM. Evaluation of the antioxidant and anti-glycation effects of the hexane extract from *Piper auritum* leaves in vitro and beneficial activity on oxidative stress and advanced glycation end-product-mediated renal injury in streptozotocin-treated diabetic rats. Molecules. 2012;17(10):11897–919.
60. Neira Gonzalez AM, Perez Gutierrez RM, Flores Cotera LB. Antidiabetic Activity of *Piper auritum* Leaves in Streptozotocin-Induced Diabetic Rat , Beneficial Effect on Advanced Glycation Endproduct. Chin J Integr Med. 2014;1–9.
61. Barreto Delgado E, García-Mateos, Ma del R, Ybarra-Moncada M del C, Luna-Morales C, Martínez-Damián MT. Propiedades Entomotóxicas de los extractos vegetales de *Azadirachta indica* , *Piper auritum* y *Petiveria alliacea* para el control de *Spodoptera exigua* Hübner. Revista Chapingo Ser Hortic. 2012;18(1):55–69.
62. García Ríos A, Leyva MA, Martínez JR, Stashenko EE. Determinación de la composición química y actividad antioxidante in vitro del aceite esencial *Piper auritum* Kunth ( Piperaceae ) difundida en la costa colombiana. Sci Tech. 2007;(33):439–42.
63. Caballero-Gallardo K, Olivero-Verbel J, Pino-Benítez N, Stashenko EE. Chemical composition and bioactivity of *Piper auritum* and *P. multiplinervium* essential oils against the red flour beetle, *Tribolium castaneum* ( Herbst ). Boletín Latinoam y del Caribe Plantas Med y Aromáticas. 2014;13(1):10–9.
64. Chatzopoulou PS, Katsiotis ST. Procedures influencing the yield and the

- quality of the essential oil from *Juniperus communis* L . berries. Pharm Acta Helv. 1995;70:247–53.
65. Sánchez Y, Pino O, Correa TM, Naranjo E, Iglesia A. Estudio Químico Y Microbiológico del Aceite Esencial De *Piper auritum* KUNTH (Caisimón de anís). Rev Protección Veg. 2009;24(1):39–46.
66. Sánchez Y, Correa TM, Abreu Y, Pino O. Efecto del aceite esencial de *Piper auritum* Kunth y sus componentes sobre *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson y *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Pammel) Dowson. Rev Protección Veg [Internet]. 2013;28(3):204–10. Available from: [/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=&lang=pt](http://scielo.php?script=sci_arttext&pid=&lang=pt)
67. Monzote L, García M, Montalvo AM, Scull R, Miranda M. Chemistry, cytotoxicity and antileishmanial activity of the essential oil from *Piper auritum*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2010;105(2):168–73.
68. Vizcaíno S, Pineda R, García C, Gil J, Durango D. Metabolism and antifungal activity of safrole, dillapiole and derivatives against *Botryodiplodia theobromae* and *Colletotrichum acutatum*. Boletín Latinoam y del Caribe Plantas Med y Aromáticas. 2016;15(1):1–17.
69. Conde-Hernández LA, Espinosa-Victoria JR, Guerrero-Beltrán JÁ. Supercritical extraction of essential oils of *Piper auritum* and *Porophyllum ruderale*. J Supercrit Fluids [Internet]. 2017;127:97–102. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.supflu.2017.03.026>
70. Martínez-Naranjo HA. Evaluación de la actividad antioxidante y citotóxica en extractos etanólicos totales de hojas de *Zephyranthes carinata* (Amaryllidaceae). Tesis de pregrado en Química. Universidad del Cauca; 2017.
71. Castro O, Gutiérrez JM, Barrios M, Castro I, Romero M, Umaña E. Neutralización del efecto hemorrágico inducido por el veneno de *Bothrops asper* (Serpentes: Viperidae) por extractos de plantas tropicales. Rev Biol Trop. 1999;47(3):605–16.

72. Strauch MA, Tomaz MA, Monteiro-Machado M, Ricardo HD, Cons BL, Fernandes FF a, et al. Antiophidic activity of the extract of the Amazon plant *Humirianthera ampla* and constituents. *J Ethnopharmacol.* 2013;145(1):50–8.
73. Pino OP, Lazo FJ. Ensayo de Artemia: Útil herramienta de trabajo para ecotoxicólogos y químicos de productos naturales. *Rev Protección Veg.* 2010;22(1):34–43.
74. Parra AL, Yhebra RS, Sardiñas IG, Buella LI. Comparative study of the assay of *Artemia salina* L . and the estimate of the medium lethal dose ( LD50 value ) in mice , to determine oral acute toxicity of plant extracts. *Phytomedicine.* 2001;8(5):395–400.
75. Hamidi MR, Jovanova B, Panovska TK. Toxicological evaluation of the plant products using Brine Shrimp ( *Artemia salina* L . ) model. *Maced Pharm Bull.* 2014;60(1):9–18.
76. Mors WB, Do Nascimento MC, Parente P J, Da Silva MH, Melo PA, Suarez-Kurtz G. Neutralization of lethal and myotoxic activities of south American rattlesnake venom by extracts and constituents of the plant *Eclipta prostrata* (Asteraceae )\*. *Toxicon.* 1989;27(9):1003–9.
77. Mors W, Nascimento MC, Ruppelt B, Alvares N. Plant natural products active against snake bite - the molecular approach. *Phytochemistry.* 2000;55(6):627–42.
78. Núñez V, Castro V, Murillo R, Ponce-Soto LA, Merfort I, Lomonte B. Inhibitory effects of *Piper umbellatum* and *Piper peltatum* extracts towards myotoxic phospholipases A2 from Bothrops snake venoms: Isolation of 4-nerolidylcatechol as active principle. *Phytochemistry.* 2005;66(9):1017–25.
79. Shenoy PA, Nipate SS, Sonpetkar JM, Salvi NC, Waghmare AB, Chaudhari PD. Anti-snake venom activities of ethanolic extract of fruits of *Piper longum* L. (Piperaceae) against Russell's viper venom: Characterization of piperine as active principle. *J Ethnopharmacol [Internet].* 2013;147(2):373–82.

Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2013.03.022>

80. Lamarque A, Zygadlo J, Labuckas D, López L, Torres M, Maestri D. Fundamentos Teórico-Prácticos de Química Orgánica. Encuentro. Córdoba; 2008. 41-53 p.
81. Domínguez X. Métodos de Investigación Fitoquímica. Editorial Limusa; 1979.
82. Folin O, Ciocalteu V. On tyrosine and Tryptophane determinations in Proteins. Biol Chem. 1927;
83. Li AN, Li S, Li H Bin, Xu DP, Xu XR, Chen F. Total phenolic contents and antioxidant capacities of 51 edible and wild flowers. J Funct Foods. 2014;6(1):319–30.
84. Galindo-Sanabria A, López SI, Gualdrón R. Estudio fitoquímico preliminar y letalidad sobre *Artemia salina* de plantas colombianas. Rev Colomb Ciencias Químico-Farmacéuticas. 1997;26:15–9.
85. Syahmi A, Vijayarathna S, Sasidharan S, Latha LY, Kwan YP, Lau YL, et al. Acute Oral Toxicity and Brine Shrimp Lethality of *Elaeis guineensis* Jacq., (Oil Palm Leaf) Methanol Extract. Molecules. 2010;15:8111–21.
86. Gené JA, Roy A, Rojas G, Gutiérrez JM, Cerdas L. Comparative study on coagulant, defibrinating, fibrinolytic and fibrinogenolytic activities of Costa Rican crotaline snake venoms and their neutralization by a polyvalent antivenom. Toxicon. 1989;27(8):841–8.
87. Rojas E, Quesada L, Arce V, Lomonte B, Rojas G, Gutiérrez JM. Neutralization of four Peruvian *Bothrops sp.* snake venoms by polyvalent antivenoms produced in Perú and Costa Rica: preclinical assessment. Acta Trop. 2005;93:85–95.
88. Gutiérrez JM, Gené JA, Rojas G, Cerdas L. Neutralization of proteolytic and hemorrhagic activities of Costa Rican snake venoms by a polyvalent antivenom. Toxicon. 1985;23(6):887–93.

89. Yang G, Jin Q, Xu C, Fan S, Wang C, Xie P. Synthesis , characterization and antifungal activity of coumarin-functionalized chitosan derivatives. *Int J Biol Macromol* [Internet]. 2017; Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.08.009>
90. Zeng Chen L, Wei Wei S, Bo L, Quan Wang J, Xiu C, Jian Tang W, et al. New arylpyrazoline-coumarins : Synthesis and anti-inflammatory activity. *Eur J Med Chem*. 2017;138:170–81.
91. Toyama DO, Marangoni S, Diz-filho EBS, Oliveira SCB, Toyama MH. Effect of umbelliferone ( 7-hydroxycoumarin , 7-HOC ) on the enzymatic, edematogenic and necrotic activities of secretory phospholipase A2 ( sPLA2 ) isolated from *Crotalus durissus collilineatus* venom. *Toxicon* [Internet]. 2009;53(4):417–26. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2008.12.018>
92. Da Silva J, Fernandes RS, Ticli F, Oliveira CZ, Mazzi M, Franco J, et al. Triterpenoid saponins, new metalloprotease snake venom inhibitors isolated from *Pentaclethra macroloba*. *Toxicon*. 2007;50:283–91.
93. Mitić-ćulafić D, Vuković-gaćić B, Knežević-vukčević J, Stanković S, Simić D. Comparative study on the antibacterial activity of volatiles from sage ( *Salvia officinalis* L .). *Arch Biol Sci*. 2005;57(3):173–8.
94. Fernández MA, De las Heras B, García MD, Sáenz MT, Villar A. New insights into the mechanism of action of the anti-inflammatory triterpene lupeol. *Pharm Pharmacol*. 2001;53:1533–9.
95. Yamashita K, Lu H, Lu J, Chen G, Yokoyama T, Sagara Y, et al. Effect of three triterpenoids , lupeol , betulin , and betulinic acid on the stimulus-induced superoxide generation and tyrosyl phosphorylation of proteins in human neutrophils. *Clin Chim Acta*. 2002;325:91–6.
96. Gopi K, Renu K, Sannanaik Vishwanath B, Jayaraman G. Protective effect of *Euphorbia hirta* and its components against snake venom induced lethality. *J Ethnopharmacol* [Internet]. 2015;165:180–90. Available from:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2015.02.044>

97. Leanpolchareanchai J, Pithayanukul P, Bavovada R, Saparpakorn P. Molecular Docking Studies and Anti-enzymatic Activities of Thai Mango Seed Kernel Extract Against Snake Venoms. *Molecules*. 2009;14:1404–22.
98. López Belchí MD. Toxicidad volátil de monoterpenoides y mecanismos bioquímicos en insectos plaga del arroz almacenado. Tesis Doctoral en Química. Universidad de Murcia.; 2008.
99. Olivero-Verbel J, Güette-Fernandez J, Stashenko E. Acute toxicity against *Artemia franciscana* of essential oils isolated from plants of the genus *Lippia* and *Piper* collected in Colombia. *Boletín Latinoam y del Caribe Plantas Med y Aromáticas*. 2009;8(5):419–27.
100. Sánchez L, Neira A. Bioensayo general de letalidad en *Artemia salina*, a las fracciones del extracto etanólico de *Psidium guajava* . L y *Psidium guineense* . Sw. *Cult científica*. 2005;40–5.
101. Braud S, Bon C, Wisner A. Snake venom proteins acting on hemostasis. *Biochimie*. 2000;82:851–9.
102. Maiorano VA, Marcussi S, Daher MAF, Oliveira CZ, Couto L, Gomes OA, et al. Antiophidian properties of the aqueous extract of *Mikania glomerata*. *J Ethnopharmacol*. 2005;102:364–70.
103. Magalhães A, Santos GB Dos, Verdam MCDS, Fraporti L, Malheiro A, Lima ES, et al. Inhibition of the inflammatory and coagulant action of *Bothrops atrox* venom by the plant species *Marsypianthes chamaedrys*. *J Ethnopharmacol*. 2011;134(1):82–8.
104. Oliveira CZ, Maiorano VA, Marcussi S, Sant’Ana CD, Januário AH, Lourenço M V, et al. Anticoagulant and antifibrinogenolytic properties of the aqueous extract from *Bauhinia forficata* against snake venoms. *J Ethnopharmacol*. 2005;98:213–6.
105. Burke JE, Dennis EA. Phospholipase A2 structure / function , mechanism

- and signaling. *J Lipid Res.* 2009;237–42.
106. Barraviera B, Lomonte B, Tarkowski A, Hanson L, Meira D. Acute-Phase reactions, including cytokines, in patients bitten by *Bothrops* and *Crotalus* snakes in Brazil. *J Venom Anim Toxins.* 1995;1:11–22.
  107. Fiorentino DF, Zlotnik A, Mosmann TR, Howard M, O'Garra A. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J Immunol.* 1991;147(11):3815–22.
  108. Kamiguti AS, Hay C, Theakston D, Zuzel M. Insights into the mechanism of caused by snake venom. *Toxicon.* 1996;34(6):627–42.
  109. Patiño Jaramillo ÁJ. Determinación del efecto neutralizante del suero sanguíneo de *Clelia equatoriana* (Amaral, 1924) al veneno de *Bothrops asper* (Garman, 1883) del Cauca, Colombiano. Tesis de pregrado en Biología. Universidad del Cauca; 2017.
  110. Ticli FK, Hage LIS, Cambraia RS, Pereira PS, Magro AJ, Fontes MRM, et al. Rosmarinic acid, a new snake venom phospholipase A2 inhibitor from *Cordia verbenacea* (Boraginaceae): Antiserum action potentiation and molecular interaction. *Toxicon.* 2005;46(3):318–27.
  111. Fernández M, Ortiz W, Pereáñez J, Martínez D. Evaluación de las propiedades antiofídicas del extracto etanólico y fracciones obtenidas de *Renealmia alpinia* (Rottb) Mass (Zingiberaceae) cultivada in vitro. *VITAE, Rev LA Fac QUÍMICA Farm.* 2010;17(1):75–82.
  112. Mors W. Plants active against snakebite. *Econ y Med Plant Res.* 1991;5:353–73.

## ANEXO 1

Especímenes de *P. auritum* en el Herbario de la Universidad del Cauca (CAUP)

**Cauca:** Mpío. de Popayán. Vereda Cajete. 2° 28' 41.17" N - 76° 40' 19.91" O. Alt. 1744 m.s.n.m. (Angie M. Rengifo, 01).

**Cauca:** Mpío. de Guapi. Escuela Levante en marcha. 2° 34' 1.178" N - 77° 53' 2.112" O. Alt. 4 m.s.n.m.(Angie M. Rengifo, 02)

**Cauca:** Mpío. de Morales. Cabecera municipal. Barrio Simón Bolívar. 2° 44' 825" N - 76° 36' 47.721" O. Alt. 1635 m.s.n.m. (Angie M. Rengifo, 03)

**Cauca:** Mpío. de Popayán. Corregimiento la Rejoya, finca de la Rejoya, Unicauca. Alt: 1800 m.s.n.m. (B.R. Ramírez P, 23.911)

**Cauca:** Mpío. de Miranda. Bocatoma municipal. 3° 15' N – 76° 14' W. Alt. 1050 m.s.n.m. (N.J. Mina. P, 22)

**Cauca:** Mpío. de Patía, corregimiento del Patía. Casa de Ana Melia Caicedo. 2° 04' 9.54" N – 77° 3' 6.61" W. Alt. 630 m.s.n.m. (Raquel Lorena Tabernerero).

**Cauca:** Mpío. del Tambo. Verede Caña Agria. Alt. 1740 m.s.n.m. (Y. A. Mera y F. Arcos, 24)

**Cauca:** Mpío. del Tambo. Vereda la Independencia. Alt. 1745-2000 m.s.n.m. (C.M. Trujillo. S, 13)

**Cauca:** Mpío. de Popayán. Sector Norte de la Ciudad, entre Bellavista y la variante. 2° 26' N – 76° 37' W. Alt. 1800. (B.R. Ramírez, 12.917)

**Cauca:** Mpío. de Balboa. Corregimiento San Alfonso, vereda Andes Bajos. Alt. 2100-2200 m.s.n.m. (Beatriz Yolanda Adrada, 08)

**Cauca:** Mpío. de Timbio. Vda Los robles. Km 5. Alt. 1750 m.s.n.m. (J.C. Villegas, 15).

**Cauca:** Mpio. de Bolívar. Corregimiento La Carbonera alrededores de la población, cerca de la quebrada Salinas. 1° 55' 42" N – 77° 03' 40" W. Alt. 650 m.s.n.m. (D. Macías. P, B.R. Ramírez y G. Varona, 5753)

**Cauca:** Mpio. de Patía, Corregimiento Patía. Alrededores de la Institución Educativa Capitán Bermúdez. 2° 04' 18" N – 77° 03' 28.9". Alt. 630 m.s.n.m. (D. Macías, B. R Ramírez y G. Varona, 5134)

**Risaralda:** Mpio. Pueblo Rico. Corregimiento de Santa Cecilia. Alt. 400-750 m.s.n.m. (Román Ospina, 100)

**Antioquia:** Mpio. El Bagre. Vereda Malena, Nor este Antioqueño, Serranía de San Lucas, Sitio La Esperanza. Quebrada Babilla. Alt. 300 m.s.n.m. (C.E Gonzáles, 2.348).

**Antioquia:** Mpio. de Anorí. Vereda Cruces. La peñolera. Río Anorí. Alt. 800 m.s.n.m (C. E. Gonzales, 2368)

**Valle del Cauca:** Mpio. de Buenaventura. Km 25-29 Vía Buenaventura – Cali. 3° 52' N – 76° 51' W. Alt. 220-270 m.s.n.m. (B.R. Ramírez y D. Macías P, 18.480)