

**EFFECTO ANTI-INFLAMATORIO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LA RAÍZ DE
LA PLANTA *Polygala paniculata* EN RATONES INOCULADOS CON DOSIS
SUBLETAL DE VENENO DE *Bothrops asper* (Serpentes: Viperidae)**

NANCY PATRICIA MOSQUERA B

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
POPAYÁN
2009**

**EFFECTO ANTI-INFLAMATORIO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LA RAÍZ
DE LA PLANTA *Polygala paniculata* EN RATONES INOCULADOS CON
DOSIS SUBLETAL DE VENENO DE *Bothrops asper* (Serpentes: Viperidae)**

NANCY PATRICIA MOSQUERA

**Trabajo de grado para optar el título de
Bióloga**

Director

FABIO ANTONIO CABEZAS, Ph. D.

Asesor

SANTIAGO AYERBE GONZÁLEZ, MD.

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
PROGRAMA DE BIOLOGÍA
POPAYÁN
2009**

Nota de aceptación:

Ph, D. Fabio Antonio Cabezas F.
Director

Ph,D. Jaime Martín F
Jurado

Mg. José T. Beltrán
Jurado

Popayán, 10 de Febrero del 2009.

A Dios por proveerme la gracia de cumplir cada día
Con el trabajo encomendado.
A mi familia por su esfuerzo,
Apoyo incondicional y motivación constante.
A mis amigos por su colaboración.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por la sabiduría, el entendimiento y la ciencia otorgada para realizar con satisfacción esta investigación y poder así terminar de manera exitosa esta etapa de mi vida.

A mi madre Olga Elvira Bravo por su amor, comprensión y el apoyo incondicional.

A mi esposo Rigoberto y a mi hijo Juan Esteban por su amor, apoyo sin condiciones y el ánimo necesario para seguir luchando.

Al Ph, D. Fabio Antonio Cabezas, mi director, por creer en mí, por la confianza, colaboración absoluta, dedicación y el tiempo para dirigir esta investigación y los grandes aportes académicos realizados.

Al MD. Santiago Ayerbe, mi asesor, por su amistad, por su apoyo, colaboración, aportes científicos y la excelente asesoría para la ejecución correcta de esta investigación.

Al Mg. Silvio Carvajal, por su colaboración y asesoría prestada para poder desarrollar este trabajo.

A los integrantes del laboratorio Andrés y Jorge por toda la colaboración prestada y aportes en el transcurso del trabajo y por valiosa amistad.

A todas las personas que hacen parte de mi vida y que me motivaron para culminar felizmente esta etapa.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	15
1. FORMULACION DEL PROBLEMA	17
2. JUSTIFICACIÓN	19
3. OBJETIVOS	21
3.1 OBJETIVOS GENERAL	21
3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS	21
4. ANTECEDENTES	22
5. MARCO TEORICO	24
5.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES <i>Polygala paniculata</i>	24
5.1.1 Taxonomía de <i>Polygala paniculata</i>	26
5.1.2 Componentes de <i>Polygala paniculata</i>	26

5.1.3	Usos de <i>Polygala paniculata</i>	26
5.2	<i>Bothrops asper</i>	27
5.2.1	Taxonomía de <i>Bothrops asper</i>	27
5.2.2	Características morfológicas	28
5.2.3	Hábito	29
5.2.4	Reproducción	29
5.2.5	Actividades enzimáticas del veneno de <i>Bothrops asper</i>	29
5.2.6	Manifestaciones clínicas causadas por el envenenamiento	30
5.2.6.1	Efectos locales Causados por el Envenenamiento Bothropico	30
5.2.6.2	Efectos Sistémicos Casados por el Envenenamiento por <i>Bothropico</i>	32
5.2.7	Diagnostico de la intensidad del accidente bothrónico	33
5.2.8	Medidas para contrarrestar el envenenamiento	34
5.3	DICLOFENACO SODICO (VOLTAREN)	34
5.3.1	Componentes	34
5.3.2	Indicaciones	34

5.3.3	Farmacocinética	35
5.3.4	Farmacodinamia	36
5.3.5	Dosis y vía de administración	37
5.4	CALIBRADOR O VERNIER DIGITAL	37
6.	METODOLOGIA Y DISEÑO EXPERIMENTAL	39
6.1	MATERIAL VEGETAL Y PREPARACION DEL EXTRACTO	39
6.2	PRESENCIA DE FLAVONOIDES EN EL EXTRACTO ETANÓLICO DE LA RAÍZ DE <i>P paniculada</i>	40
6.3	ANIMALES DE EXPERIMENTACION	41
6.4	OBTENCION DEL VENENO	42
6.5	CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS	44
6.6	SELECCIÓN DE LAS DOSIS EXPERIMENTALES	45
6.6.1	Concentraciones del extracto	46
6.6.2	Concentraciones de Voltaren (fármaco de referencia)	46
6.6.3	Concentraciones de Vaselina	46

6.7	VIA DE INOCULACION DEL VENENO	46
6.8	DISTRIBUCION Y TRATAMIENTO DE LOS ANIMALES	47
6.9	FORMACIÓN DEL EDEMA INDUCIDO POR EL VENENO DE <i>B asper</i>	48
6.10	APLICACIÓN DE TRATAMIENTOS	48
6.11	TIEMPO DE OBSERVACION	48
6.12	MÉTODOS Y TÉCNICAS PARA EL ANÁLISIS DE DATOS	49
7.	RESULTADOS	50
7.1	CONCENTRACION PROTEICA DEL VENENO DE <i>Bothrops asper</i>	50
7.2	FORMACIÓN DEL EDEMA	50
7.3	EFEECTO ANTIINFLAMATORIO	53
7.4	RELACIÓN ENTRE EL COLOR DE LA MANCHA Y DE LA ESTRUCTURA DE LOS FLAVONOIDES	61
8.	EFEECTO DE LA APLICACIÓN DEL VENENO Y EXTRACTO DE LA RAIZ DE LA PLANTA <i>Polygala paniculata</i>	64
9.	CONCLUSIONES	68

10.	RECOMENDACIONES	69
	BIBLIOGRAFIA	70
	ANEXOS	80

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Medidas para Contrarrestar el Envenenamiento Causado por <i>B asper</i> .	34
Tabla 2. Promedios obtenidos en mm de la almohadilla plantar tratados con solución salina y veneno <i>B asper</i>	50
Tabla 3. Valores medios de la diferencia del grosor de la almohadilla plantar de la pata control - de la pata tratada	51
Tabla 4. Valores medios de la diferencia del grosor de la almohadilla plantar de la pata control respecto al inicio del ensayo	51
Tabla 5. Valores medios de la diferencia del grosor de la almohadilla plantar antes aplicar el tratamientos respecto al inicio del ensayo	52
Tabla 6. Valores medios de la diferencia del grosor de la almohadilla plantar a las 3,6,9 y 12 horas respecto al inicio del ensayo	54
Tabla 7. Comparaciones múltiples (sustancia)	55
Tabla 8. Comparaciones de la reducción del edema entre los diferentes tiempos después del tratamiento	60
Tabla 9. Características espectrales (UV) de algunos grupos de flavonoides	61

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. <i>Polygala paniculata</i>	25
Figura 2. <i>Bothrops asper</i>	27
Figura 3. Dentición de <i>Bothrops asper</i>	28
Figura 4. Edema Causado por el Veneno <i>Bothrops asper</i>	31
Figura 5. Flictenas Causadas por el Veneno <i>Bothrops asper</i>	31
Figura 6. Calibrador pie de rey digital	38
Figura 7. Ratones <i>Mus musculus</i>	41
Figura 8. Sujetadores para Manipulación de Serpientes	42
Figura 9. Sujeción y extracción del Veneno de la serpiente <i>Bothrops asper</i>	43
Figura 10. Inoculación vía subcutánea	47
Figura 11. Medición del grosor la almohadilla plantar (mm) con el calibrador pie de rey digital	49

Figura 12. Diferencias de las sustancias (Extracto, Voltaren y vaselina)	56
Figura 13. Efecto antiinflamatorio de las diferentes concentraciones del extracto <i>P paniculata</i> a las 3, 6,9 y 12 h	57
Figura 14. Efecto antiinflamatorio de las diferentes concentraciones de voltaren a las 3, 6,9 y 12 h	58
Figura 15. Efecto antiinflamatorio de las diferentes concentraciones de la vaselina a las 3, 6,9 y 12 h	58
Figura 16. Izquierda, edema antes del tratamiento y derecha, después del tratamiento (<i>P paniculata</i>)	60
Figura 17. Cromatograma, identificación de color y Rf de la mancha	62
Figura 18. Espectro de absorción para la mancha A y B	63

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo A. Instrumento para la obtención de datos relacionados con la planta.	80
Anexo B. Peso (g) y medición de la almohadilla plantar antes del inicio del ensayo (mm)	81
Anexo C. Formación del edema.	82
Anexo D. Efecto antiinflamatorio (mm) a las 3, 6, 9 y 12 horas	83

INTRODUCCIÓN

Más del 90% de las mordeduras de serpientes reportadas cada año en Latinoamérica son influenciadas por serpientes del género *Bothrops* (18). Dos de los signos más relevantes del envenenamiento Bothropico son el edema y desfibrinación, los cuales pueden contribuir a un daño local, hipotensión y hemorragia (48).

El departamento del Cauca por encontrarse estratégicamente ubicado en una zona geográfica significativa, presenta condiciones favorables de hábitats que han permitido el desarrollo y establecimiento de una fauna ofídica variada. Así este Departamento cuenta con la Cuenca del Pacífico, Cuenca del río Patía, con el Valle Alto del mismo nombre y la Cuenca del Amazonas. Por lo anterior podemos encontrar aproximadamente un 80% de las serpientes venenosas que se han reportado para Colombia. A pesar de la gran diversidad de ofidios en el Departamento del Cauca, el mayor porcentaje de accidentes son ocasionados por *B asper* (43).

En el noroeste de Colombia, el 60% de las víctimas de mordedura de serpiente son inicialmente tratadas por curanderos quienes usan las plantas medicinales en diferentes formas de acuerdo a las condiciones clínicas del paciente (46). En el departamento del Cauca el ofidismo ha sido tratado con las raíces de la planta *P paniculada* en forma de emplasto (1), los resultados de estos estudios son promisorios, lo cual justifica estudios más detallados de la misma.

Considerando lo anterior, en el presente estudio se determinó la actividad antiinflamatoria de la planta *Polygala paniculata* en ratones de la cepa *Mus*

musculus inoculados con una dosis subletal de veneno de serpiente *Bothrops asper*, y se comparó la actividad con un fármaco (Diclofenaco sódico) utilizado diariamente para tratar las inflamaciones y un grupo control (Vaselina). El extracto de la raíz de *P paniculata* presentó una evidente reducción del edema con un 2.86 % a las 3 h, 11.03% a las 6h, 43.47% a las 9h y 54.33% a las 12h para la concentración alta, 0.20% a las 3 h, 3.95% a las 6h, 12.47% a las 9h y 29.1% a las 12h para la concentración media y para concentración baja 0% a las 3h, 4% a las 6h, 9.79% a las 9h y 21.95% a las 12h relación al grupo control, comparados por medio de análisis de varianza ($p < 0.05$). Estos resultados estadísticamente significativos, sirven como punto de partida para nuevas investigaciones siendo de gran importancia para la humanidad, ya que diariamente se presenta el accidente ofídico causado principalmente por el veneno de *B.asper*. Además, se identificó componentes en este extracto, de naturaleza flavonoide, como posibles responsables del efecto observado.

1. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

Los accidentes producidos por mordeduras de ofidios se han descrito desde los inicios de la humanidad. En los últimos años en el mundo se han reportado entre 120.000 a 130.000 muertes anuales ocasionadas por la mordedura de serpientes venenosas. En Colombia aproximadamente cada año se reportan entre 2000 y 3000 accidentes de Ofidismo, con una tasa de accidentabilidad de 7,5/100.000 habitantes. (49), y una letalidad que oscila entre el 0.042 y 7.6%; siendo este accidente causado principalmente por los géneros *Bothrops* (90-95%), donde el 50% pueden ser atribuidos a la terciopelo *B asper* (49); en el Cauca se han registrado valores de letalidad por accidente ofídico del 6.2 % (5) y a finales del siglo XX declino a cero (1); sin embargo, en los tres primeros meses del 2005 se registraron 19 casos de Ofidismo en el Hospital Universitario Nivel III “San José” con dos accidentes fatales que equivalen a una mortalidad del 10.53% siendo la especie *B. asper* causante del 87.87% de los accidentes que ocurren por serpientes en este Departamento. El veneno de *Bothrops asper* tiene efecto edematizante a nivel del sitio de la mordedura por la acción de las Metaloproteinasas (Hemorraginas) y los inhibidores de la agregación plaquetaria (Trombolectina y Trombocitina) que actúan sobre el endotelio vascular sanguíneo y linfático, permitiendo el escape de plasma y/o linfa hacia el espacio extravascular (24-18). Esto genera dolor, agrava el síndrome compartimental, genera isquemia tisular, favorece la sobre infección de la herida y prolonga la estadía hospitalaria de los pacientes aún después de neutralizada la acción pro-coagulante y desfibrinante del veneno con la seroterapia antiofídica.

Una vez neutralizado el veneno, queda un edema residual sintomático importante que los anti-inflamatorios corrientes no han sido eficaces en contrarrestarlo. Por otra parte presentan efectos colaterales que agravan la salud del paciente como

es el caso de la inmunosupresión observada después de la administración de Corticoides y la antiagregación plaquetaria que producen los derivados del ácido Acetil Salicílico y los anti-inflamatorios no esteroideos (AINES) ó el efecto deletéreo en la mucosa gástrica si se suministran vía oral ó parenteral.

2. JUSTIFICACIÓN

Actualmente, el desarrollo de la fitoterapia ha recibido gran atención tanto por parte de la comunidad científica, como por las industrias farmacéuticas. A pesar de la gran aceptación y su extenso uso terapéutico por la población en general, las plantas medicinales han sido poco evaluadas científicamente, por tanto se hace necesario estudios detallados en el sentido de verificar y afirmar su calidad, seguridad y eficacia.

Los productos naturales se presentan como fuente de compuestos con actividad biológica, así, el descubrimiento de prototipos para el desarrollo de nuevos fármacos o de nuevos agentes terapéuticos, representa una posibilidad para el tratamiento de diversas patologías logrando aportar una mejor calidad de vida para los pacientes.

Uno de los problemas de salud pública son los envenenamientos por mordeduras de serpiente, se ha considerado que la serpiente *Bothrops asper*, conocida popularmente como terciopelo, barba amarilla o nauyaca, es la que ocasiona la mayoría de accidentes en Centroamérica (2), además es la causante del 80% de los accidentes que ocurren por serpientes en el Departamento del Cauca, lo cual suscita un interés mucho mayor para realizar este estudio con la especie mencionada, antes que cualquier otra.

Se conoce que el único tratamiento científicamente validado para los envenenamientos Ofídicos es la administración parenteral de antivenenos producidos en caballos o en ovejas. (55). Los antivenenos son altamente eficaces

en la neutralización de los efectos sistémicos inducidos por los venenos, sin embargo, la neutralización de los efectos locales (hemorragia, edema y necrosis) se logra sólo parcialmente, debido a la rapidez con que estos efectos se desencadenan y en muchos casos, al retardo en la administración del antiveneno (26-27). Los extractos de plantas tropicales constituyen importantes reservorios de potenciales sustancias inhibitoras de toxinas de venenos (41). Dada la frecuencia de ofidismo por *Bothrops asper* en Colombia y principalmente en nuestra región, y puesto que se ha demostrado actividad antiinflamatoria en las plantas, el frecuente uso popular de la raíz de la planta *Polygala paniculata* y la necesidad de sustancias naturales o sintéticas que neutralicen las toxinas responsables de estos efectos locales y que puedan utilizarse como complemento de la seroterapia. Por ello, a través de este estudio se evaluó la propiedad antiinflamatoria de la planta *Polygala paniculata*; siendo esta investigación de gran impacto para la humanidad, ya que diariamente se presenta el accidente ofídico y la estadía hospitalaria se vería acortada al contrarrestar el efecto inflamatorio del veneno, permitiendo el rápido retorno de las víctimas a sus parcelas y reduciendo así el impacto socio-económico negativo del Ofidismo en los campesinos y agricultores, víctimas principales de este flagelo.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto anti-inflamatorio, mediante la aplicación tópica, del extracto etanólico de la raíz de la planta *Polygala paniculata* ("Mentol de monte") en ratones inoculados con dosis subletal de veneno de serpiente *Bothrops asper*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar la actividad antiinflamatoria de tres concentraciones del extracto etanólico de la raíz de la planta *Polygala paniculata* en el edema producido por el veneno de *Bothrops asper* inoculado en ratones *Mus musculus*.
- Comparar por medio de pruebas estadísticas el efecto antiinflamatorio del extracto etanólico de la raíz de *Polygala paniculata* con Diclofenaco sódico (Voltaren) y la Vaselina (grupo control).
- Verificar cualitativamente la presencia de flavonoides del extracto etanólico de la raíz de la planta *Polygala paniculata*.

4. ANTECEDENTES

La raíz de la planta *Polygala paniculata* ha sido utilizada principalmente como antipirético, la decocción de toda la planta para la inflamación orofaríngea y en la amigdalitis aguda (46); hay estudios en donde el extracto hidroalcoólico de la planta presenta actividad anticonceptiva y protectora gástrica (35) así mismo existe evidencia sobre su uso como antiofídico por indígenas en el Brasil desde hace muchos años, pero su efectividad aun no se ha comprobado (31-38), el macerado de esta ha sido empleado para tratar la mordedura de serpiente, desde la década de los 70 en el siglo pasado por el Pediatra Toxinólogo Santiago Ayerbe, inicialmente en el Hospital Nivel I de Bolívar (Cauca) y posteriormente en el Hospital Universitario Nivel III "San José" de Popayán. A raíz de lo anterior, dos estudiantes de la Escuela de Enfermería de la Universidad del Cauca realizaron un trabajo de investigación en donde se evaluó la actividad analgésica y tóxica aguda(46), con resultados muy satisfactorios lo cual justifica continuar el estudio mas detallado de la planta, con el fin de determinar todo su potencial terapéutico.

Algunos componentes de la planta *P. paniculata* fueron identificados y aislados. (14), se aislaron en su análisis tres xantonas llamado 1-hidroxi-5-metoxi-2,3-metilenodioxixantona, 1,5-dihidroxi-3,2-dimetoxixantona y 1-hidroxi-2,3,5-trimetoxixantona). Además, se encuentra camarinas como otros compuestos y se observó un flavonoide rutina. Dos esteroides fueron caracterizados también como el delta espinasterol y 25-espinasterol. Recientes estudios demostraron que el extracto hidroalcoholico de *P. paniculata* (EHPP) posee una significativa actividad antioxidante, esta actividad estaba relacionada con su efecto protector contra neurotoxina crónica inducida por el tratamiento de ratones con metilmercurio (MeHg) (19). Los autores sugirieron que el efecto del extracto, se relaciona con

xantonas y la presencia de flavonoides, que son compuestos con importantes efectos antioxidantes.

5. MARCO TEORICO

5.1 CARACTERISTICAS GENERALES DE *Polygala paniculata*

Polygala paniculata conocida como “mentol de monte”, “quereme de monte”, “hierba de la erisipela”(Cauca), “sarpotela” (Antioquia), “alcanfo-do campo (Brasil),”canchalagua” (en Nariño); se encuentra desde los 0-2000 msnm pertenece a la familia **Polygalaceae**, caracterizada por ser herbácea, leñosa, de hojas simples, esparcidas u opuestas con estípulas o sin ellas, flores mediadamente zigomorfas, con plano simétrico antero posterior, cáliz pentámero, con los tres sépalos extremos, verdes, pequeños, y los dos internos mayores y petaloides; corola con tres pétalos, el delantero más desarrollado que los laterales; 8 estambres por lo regular soldados por sus filamentos en un tubo abierto superiormente; ovario bilocular, fruto capsular.

Las plantas de esta familia son predominantemente encontradas en regiones tropicales. Entre las plantas de esta familia, se incluyen las del género *Polygala*, que comprende cerca de 500 especies, presentándose la mayor parte de las veces en la forma de arbustos o de pequeñas trepadoras que cubren ramas de árboles. (21). Los miembros de la familia Polygalaceae son conocidos por contener una gran diversidad de compuestos químicos, muchos de los cuáles exhiben significativa actividad biológica. Investigaciones fitoquímicas en diferentes especies de *Polygala* revelaron varios compuestos incluyendo saponinas (12-16), xantonas (40), cumarinas y flavonóides (14). Recientemente, se ha demostrado que el extracto acuoso de las raíces de *Polygala tenuifolia* W. inhibió la liberación de factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y interleucina 1 beta (IL-1 β). Además de

eso, fue demostrado que el extracto de las raíces de esta planta también presentó acción neuroprotectora contra la muerte celular inducida por la N-metil-D-aspartato (NMDA) en células cerebelares de ratones (36). El extracto hidroalcohólico de la *Polygala fallax* H., cuando fue analizado in vivo, presentó un importante efecto antiinflamatorio, promoviendo una disminución del edema de oreja provocado por la administración tópica de xilol (34). En un estudio con otra planta de la familia Polygalaceae, la *Polygala cyparissias* St.Hillaire & Moquin, fue demostrado que tanto su extracto hidroalcohólico como la 1,7-dihidroxi-2,3-dimetoxi xantona, aislada a partir de este extracto, presentaron notable actividad anticonceptiva. (35).

La planta *Polygala paniculata* es una hierba de unos 50 cm., muy ramificada, hojas alternas muy pequeñas 1-13 mm de largo, y 2 mm de ancho, flores en racimos terminales, pequeños, con pétalos blancos o rosados, raíz fasciculada, fibrosa corta. (Figura 1). Al arrancar la planta desprende un olor a mentol, que no persiste dado que pocos minutos después pierde su aroma. (46).

Figura 1. *Polygala paniculata*



5.1.1 Taxonomía de *Polygala paniculata*

Reino: Plantae

Filo: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Polygales

Familia: Polygalaceae

Genero: Polygala

Especie: *Polygala paniculata*

5.1.2 Componentes de *Polygala paniculata*. La preparación medicinal, esta formada por un rizoma nudoso, provisto en su parte superior de los restos del tallo y de las hojas, junto con la raíz principal, anillada por arriba y más de 1,5 cm de grueso. Contiene los siguientes compuestos activos: glucósido saponínico, senegina y ácido poligámico, además posee metil salicílico y valerianato de metilo. (20). Según Soler y Batlle, en la planta existen dos saponinas glucosiladas, senegina y ácido poligámico. Según Cristiano *et al.* 2003 han identificado tres xantonas (denominadas 1-hidroxi-5-metoxi-2,3-metilenodioxixantona, 1,5-dihidroxi-3,2-dimetoxixantona y 1-hidroxi-2, 3,5-trimetoxixantona) y la presencia de otros compuestos como cumarinas y un flavonóide rutina fue observada. Dos esteróides también fueron caracterizados como el espinasterol y delta 25-espinasterol.

5.1.3 Usos de *Polygala paniculata*. A nivel popular la raíz se ha utilizado como antipirética, la decocción de toda la planta se usa en forma de gargarismos en la inflamación orofaríngea y en la amigdalitis aguda. Además se emplea como antitusígeno, especialmente en forma de decocción de las raíces (46). Son utilizadas en forma de emplasto para el tratamiento ocasionada por la mordedura

de serpientes. (4). Su té es utilizado en la medicina popular para el tratamiento del asma, bronquitis crónica, afecciones del aparato respiratorio, artritis, problemas renales, dolor de estómago, diarrea, así como tonificante (39-45). Como antecedente esta planta también ha sido utilizada para evaluar la actividad analgésica y toxicidad aguda en ratones. (46).

5.2 *Bothrops asper*

La especie *Bothrops asper* descrita por Garman en 1883 es conocida con el nombre en inglés como Western Lancead y con nombres vulgares como “Equis Negra”, “Terciopelo” o “Barba Amarilla” (8). (Figura 2).

Figura 2. *Bothrops asper*



Fuente: Alejandro Martínez, Rodrigo Navia. Espécimen: Serpentario (CIBUC)

5.2.1 Taxonomía de *Bothrops asper*

Reino: Animal

Filum: Chordata

Clase: Reptilia

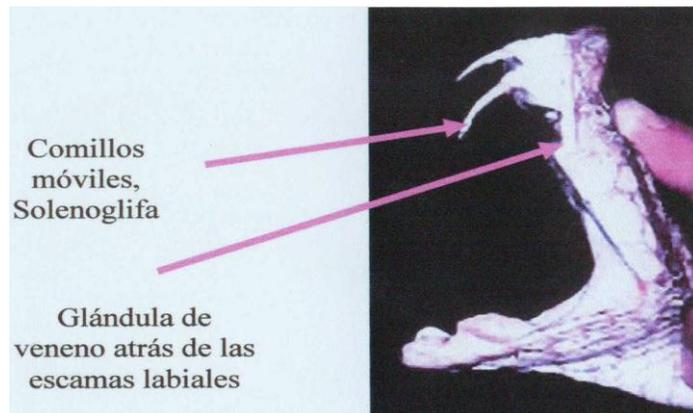
Orden: Squamata

Suborden: Serpentes (Ophidia)

Familia: Viperidae
Subfamilia: Crotalinae
Género: *Bothrops*
Especie: *asper*

5.2.2 Características morfológicas. Puede llegar a medir hasta 2 m de longitud y sus colmillos hasta 2.8 cm. de característica solenoglifa, es decir se ubican en la parte anterior del maxilar superior el cual al rotar forman un ángulo de 90° al momento del ataque, su dimorfismo sexual se distingue por el tamaño, pues las hembras suelen ser mayores que los machos a la misma edad (48) (Figura 3).

Figura 3. Dentición de *Bothrops asper*



Fuente: Alberto Alape MD.Ph.D., Instituto Clodomiro Picado U. de Costa Rica.

Es una serpiente ovovivípara, de cabeza grande de forma triangular, cubierta con pequeñas escamas. Presenta fosetas termoreceptoras o fosas térmicas y ojos con pupila elíptica vertical. Su coloración es de café oscuro o carmelita (algunas son gris claro), sobre la cual aparecen en su dorso diseños en forma de equis,

mariposas o corbatines de color café oscuro, negro o bordeado de blanco entre otros, su vientre es uniforme de color crema (47).

5.2.3 Hábito. Es de hábito principalmente crepuscular y nocturno, refugiándose durante el día en huecos naturales de troncos o raíces o en cuevas de animales. Se alimentan principalmente de roedores, pequeños reptiles y aves. Su hábitat natural corresponde al bosque húmedo tropical desde 0-1700 m.s.n.m; sin embargo es una serpiente muy adaptable se la puede encontrar en campos de cultivo, rastrojos, potreros enmalezados, pasto de ganadería y muy cerca de asentamientos humanos; suele preferir la cercanía de los cursos de agua; en muchas poblaciones colombianas se han encontrado ejemplares en las zonas urbanas: patios, jardines, parques públicos y basureros. (48). Su distribución va desde el sur de México, Guatemala, Costa Rica, Honduras, Panamá, Colombia, Venezuela y Ecuador.

5.2.4 Reproducción. Su reproducción es ovovivípara y las tasas de nacimiento pueden ser muy altas. Una hembra adulta puede tener un parto por año y en cada parto tener entre 10 y 60 viboreznos, cuya tasa de supervivencia puede ser hasta del 90%. Esta es la razón de que algunas zonas del país sea una serpiente muy abundante y sea la causante del mayor número de accidentes.

5.2.5 Actividades enzimáticas del veneno de *Bothrops asper*. El veneno es un producto de secreción exocrina de las glándulas venenosas, y cumple una función inmovilizadora y defensiva. Generalmente es utilizado para inmovilizar a las presas, matarlas e iniciar la digestión (50).

El veneno de *B. asper* tiene actividades esterásicas y fosfolipasicas, pues contiene enzimas como fosfolipasas, fosfomonoesterasas, alfa-aminoacidooxidasas, acetilcolinesterasas, enzimas proteolíticas de la serina –proteínasa y varias clases de metaloproteinasas, arginina-esterasa, 5- nucleotidasa y NAD nucleosidasas (40). También posee actividades proteolíticas, hemorrágicas y coagulantes. La acción proteolítica produce aminas y péptidos vasoactivos, tales como: bradiquinina, histamina y serotonina que causan lesión capilar, lo cual se traduce por hemorragias petequiales, hematuria, hematemesis, epistaxis y hemorragias viscerales (55).

5.2.6 Manifestaciones clínicas causadas por el envenenamiento. Se encuentran dos tipos de efectos bien definidos en el envenenamiento por mordedura de *B asper*: manifestaciones locales y sistémicas.

5.2.6.1 Efectos locales Causados por el Envenenamiento Bothropico

Dolor intenso: Se presenta inmediatamente después de la mordedura.

Edema: inflamación y salida de líquido de los vasos sanguíneos. (Ver figura 4)

Figura 4. Edema Causado por el Veneno *Bothrops asper*



Fuente: Santiago Ayerbe MD. Hospital Universitario Nivel III "San José", Popayán, Cauca.

Flictenas: Pueden ser hemorrágicas y son el efecto de la acción destructora de las metaloproteínas sobre el endotelio, vasos linfáticos y venosos. (Figura 5)

Figura 5. Flictenas Causadas por el Veneno *Bothrops asper*



Fuente: Santiago Ayerbe MD. Hospital Universitario Nivel III "San José", Popayán, Cauca.

5.2.6.2 Efectos Sistémicos Casados por el Envenenamiento Bothropico

Cuadro hemorrágico sistémico: un sangrado sistémico en órganos y mucosas que puede originar hipovolemia (disminución del volumen sanguíneo), y por ende un choque cardiovascular (síndrome debido a la insuficiente perfusión de sangre circulante en los tejidos). La hemorragia es ocasionada por las hemorraginas del veneno sobre los capilares.

Coagulopatias: la enzima tipo trombina actúa sobre el fibrinógeno produciendo microtrombos (coágulos sanguíneos pequeños en el interior del vaso) de fibrina. Como consecuencia de estas acciones se la desfibrinación, con la disminución de los niveles de fibrinógeno y con prolongación de los tiempos de coagulación.

Choque cardiovascular: es uno de los efectos principales como causas de muerte en individuos mordidos. El sangrado y la exudación causados tanto a nivel local como sistémico originan un cuadro hipovolemico que puede llegar hasta un choque cardiovascular.

Oliguria o anuria: Como consecuencia de una insuficiencia renal aguda producida por daño en el endotelio renal. En mujeres embarazadas, se ha descrito que causa aborto por desprendimiento de la placenta. (18-24)

5.2.7 Diagnóstico de la intensidad del accidente bothrópico

Grado 0. Sin envenenamiento: Huellas de mordedura sin otros cambios en 6 horas.

Grado 1. Leve: Edema de 12cm ó menos; dolor intenso ascendente, hemorragia escasa en el sitio de mordedura, sin necrosis de tejido, sin hemorragias en otros órganos y el tiempo de coagulación de la sangre puede estar prolongado, es decir entre 10 y 30 minutos.

Grado 2. Moderado: Edema entre 12-25 cm; dolor intenso y constante, hemorragia en el sitio de mordedura, escasas ampollas hemorrágicas y flictenas, taquicardia, y el tiempo de coagulación de la sangre es infinito, es decir no coagula en 30 minutos.

Grado 3. Severo: Edema entre 25-50 cm; dolor intenso y constante, hemorragia local, abundantes ampollas hemorrágicas y flictenas, necrosis de tejidos, hipotensión grave, hemorragia en varios órganos a la vez y alto riesgo de insuficiencia renal aguda.

Grado 4. Grave: Edema mayor a 50 cm hasta el hemitronco ipsilateral a la lesión. Los efectos locales son mínimos pero los sistémicos se presentan muy pronto y con suma gravedad que entraña un alto riesgo de muerte desde los primeros minutos. (2).

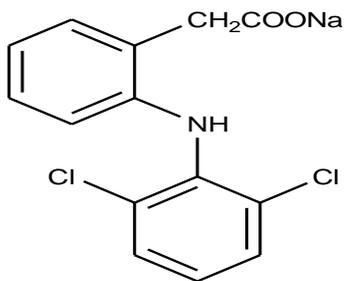
5.2.8 Medidas para contrarrestar el envenenamiento. Estas medidas al igual que los grados de envenenamiento se comparten con todas las especies del genero *Bothrops*. Cada ampollita del Antiveneno Polivalente Bothrónico- Crotálico fabricado por el Instituto Nacional de Salud (INS) neutraliza 70mg de veneno de *Bothrops spp* y 10 mg de veneno de *Crotalus durissus cumanenses* (2) (Tabla 3).

Tabla 1. Medidas para Contrarrestar el Envenenamiento Causado por *B asper*.

Grado de Ofidismo	Antiveneno Polivalente a Emplear
Grado 0 y I	No usar antiveneno
Grado II	2 á 4 ampollas
Grado III	5 á 8 ampollas
Grado IV	9 y + ampollas y/o hemodiálisis, repitiendo la dosis de antiveneno post- diálisis

(Modificado Ayerbe, 2002)

5.3 DICLOFENACO SODICO (VOLTAREN)



5.3.1 Componentes del Voltaren. Emulsión oleosa en un gel acuoso al 1,16% correspondiente al 1% de diclofenaco sódico.

5.3.2 Indicaciones. Inflamación postraumática de tendones, ligamentos y articulaciones, por ejemplo debida a esguinces, distensiones y contusiones.

Formas localizadas de reumatismo de partes blandas, p. ej; endovaginitis, bursitis, síndrome hombro-mano y periartropatía. Formas localizadas de reumatismo degenerativo, por ejemplo., osteoartrosis de las articulaciones periféricas y de la columna vertebral (53).

5.3.3 Farmacocinética:

Absorción: La cantidad de diclofenaco absorbido sistémicamente de VOLTAREN® EMULGEL® es proporcional al tamaño del área tratada y depende, tanto de la dosis total aplicada como del grado de hidratación de la piel. La absorción equivale aproximadamente al 6% de la dosis aplicada del diclofenaco después de la aplicación tópica de 2.5 g de VOLTAREN® EMULGEL® en 500 cm² de piel, determinada por la eliminación renal total, en comparación con las tabletas de VOLTAREN® EMULGEL®. Una oclusión de 10 horas conduce a un incremento de tres veces en la cantidad de diclofenaco absorbido.

Distribución: Las concentraciones de diclofenaco han sido medidas en plasma, tejido sinovial y líquido sinovial después de la administración tópica de VOLTAREN® EMULGEL® en las manos y articulaciones de las rodillas. Las concentraciones plasmáticas máximas son aproximadamente 100 veces más bajas que después de la administración oral de la misma cantidad de diclofenaco. Un 99.7% de diclofenaco se une a las proteínas séricas, principalmente albúmina (99.4%).

Metabolismo: La biotransformación de diclofenaco implica particularmente glucuronidación de la molécula intacta, pero principalmente hidroxilación única y múltiple que resulta en varios metabolitos fenólicos, la mayoría de los cuales son convertidos a conjugados de glucurónido. Dos de los metabolitos fenólicos son biológicamente activos, sin embargo, a una extensión mucho más pequeña que el diclofenaco.

Eliminación: El aclaramiento sistémico total de diclofenaco del plasma es de 263 ± 56 ml/min. La vida media plasmática terminal es de 1-2 horas. Cuatro de los metabolitos, incluyendo los dos activos, también tienen vidas medias cortas en el plasma de 1-3 horas. Un metabolito, 3'-hidroxi-4'-metoxi-diclofenaco, tiene una vida media mayor, pero es virtualmente inactivo. El diclofenaco y sus metabolitos son excretados principalmente en la orina.

5.3.6 Farmacodinamia:

Grupo farmacoterapéutico: Productos tópicos para el dolor articular y muscular. Preparaciones antiinflamatorias, no esteroideos para uso tópico. (Código ATC M02A A15).

Mecanismo de acción: El diclofenaco es un medicamento antiinflamatorio no esteroideo (AINEs) con marcadas propiedades analgésicas, antipiréticas y antiinflamatorias. La inhibición de la síntesis de prostaglandina es el mecanismo primario de acción del diclofenaco.

5.3.7 Dosis y vía de administración

Adultos y adolescentes de 12 años de edad y mayores: VOLTAREN® EMULGEL® debe ser aplicado en el área afectada 3 a 4 veces al día y friccionado suavemente sobre la piel.

La cantidad necesaria depende del tamaño del área adolorida: 2 a 4 g de VOLTAREN® EMULGEL® (una cantidad que oscila del tamaño de una cereza al de una nuez) es suficiente para tratar un área de aproximadamente 400-800 cm². Después de la aplicación, las manos deben lavarse, excepto que estas constituyan el sitio que está siendo tratado. (Novartis farmacéutica, s.a. de c.v).

La duración del tratamiento depende de la indicación y la respuesta clínica. El gel no debe ser usado por más de 14 días para las lesiones de tejidos blandos o reumatismo de tejidos blandos, o 21 días para el dolor artrítico, a menos que sea recomendado por un médico.(32)

5.4 CALIBRADOR O VERNIER DIGITAL

Se denomina **vernier**, en honor al matemático francés Pierre Vernier (1580-1637), quien inventó la escala secundaria de un calibre destinada a apreciar fracciones de la unidad, aumentando la precisión. En castellano se utiliza con frecuencia el término nonio.

Este instrumento es usado para medir objetos de dimensiones relativamente pequeñas, desde centímetros hasta fracciones de milímetros ($1/10$ de milímetro o hasta $1/20$ de milímetro) (42).

Este instrumento es versátil por su diseño, pues permite medir en distintas formas (figura 6).

Figura 6. Calibrador pie de rey digital.



6. METODOLOGIA Y DISEÑO EXPERIMENTAL

6.1 MATERIAL VEGETAL Y PREPARACION DEL EXTRACTO

La parte experimental se inició con la recolección de la planta en el Municipio de Belén (Nariño), en las Veredas Palma Chiquita, Campo de María y Sebastianillo; durante el mes de Junio de 2007. Un ejemplar de la planta se conserva en el Herbario de la Universidad del Cauca con el registro N. P. Mosquera 01. En la recolección se utilizó el instrumento basado en manuales de investigación fitoquímica y farmacológica. (Anexo A), con el fin de reunir la mayor cantidad de datos relativos al material vegetal.

Para la obtención del extracto se separó la parte aérea de la raíz y se secó a temperatura ambiente, durante aproximadamente ocho días. Luego se llevó a molienda (peso del producto 230g) y se sometió a maceración continua por espacio de 48 horas en etanol al 96%, a temperatura ambiente; el solvente se renovó en tres ocasiones, Enseguida se filtró obteniendo un filtrado libre de partículas vegetales sólidas y se concentró en el rotaevaporador a 40° C, y finalmente se secó al horno a una temperatura de 30° C, obteniendo 3.0 g de extracto etanólico seco.

6.3 PRESENCIA DE FLAVONOIDES EN EL EXTRACTO ETANÓLICO DE LA RAÍZ DE *P paniculata*

Los eluentes que fueron utilizados en la cromatografía bidimensional de papel. (2D), se prepararon con la siguiente composición:

El primer eluyente está compuesto por terc-butanól, ácido acético y agua, en una proporción de 3:1:1, y el segundo se compone de ácido acético y agua en proporción de 3: 17.

Los cromatogramas se desarrollaron en láminas de papel cromatográfico Whatman N° 3, de 20 cm x 20 cm. En cada una de las laminas cromatográficas se colocó la muestra con un capilar en la esquina izquierda del papel de cromatografía, luego se introdujo el papel a una profundidad de aproximadamente 0.5 cm en la mezcla eluyente, terbutanól, ácido acético y agua. El desarrollo tardó 8-10 horas, posteriormente el papel fue secado e introducido en la mezcla eluyente Acido acético y agua (15%) después de girarlo 90° en el sentido contrario al de las manecillas del reloj.

Al finalizar el proceso, se retira el cromatograma de la cámara y se dejó secar; luego se reveló con la lámpara ultravioleta se observando dos componentes en la muestra, cada uno con un color característico.

Posteriormente se calcula el Rf para cada componente (manchas en la lamina), mediante la siguiente fórmula.

$R_f = \text{distancia origen y centro de la mancha} / \text{Distancia origen y frente del solvente}$

Finalmente se recortó cada mancha y cada trozo de papel se depositó en un vaso de precipitado en solución metanólica para la extracción respectiva bajo agitación magnética, con el fin de aislar el pigmento y caracterizarlo mediante análisis espectral de ultravioleta.

6.4 ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Se usaron 45 ratones *Mus musculus*, cepa de ratones puros empleados para la investigación, ratones machos con un peso entre 16-18 g, provenientes del Centro de Investigaciones Biomédicas de la Universidad del Cauca (CIBUC). (Figura 7).

Figura 7. Ratones *Mus musculus*



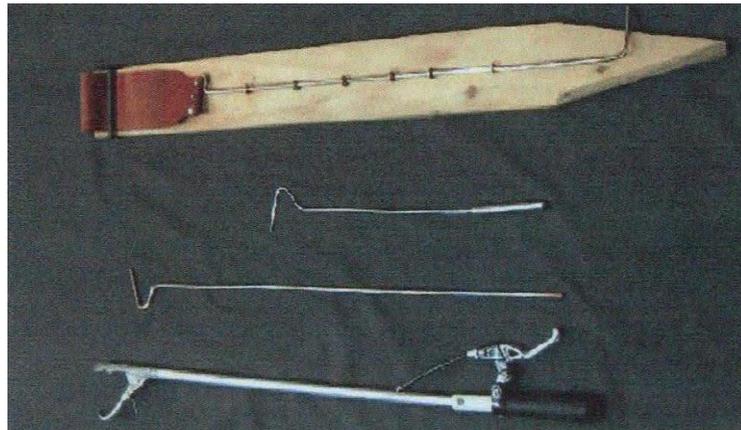
Se utilizó el espécimen adulto de *B asper* procedente del municipio del Tambo, departamento del Cauca, mantenidos en cautiverio, en condiciones similares de

luz, humedad y temperatura en el Centro de Investigaciones Biomédicas de la Universidad del Cauca (CIBUC).

6.5 OBTENCION DEL VENENO

Se realizo la extracción del veneno del espécimen adulto de *B asper*, este procedimiento se llevo a cabo de manera manual, empleando un sujetador, dos ganchos sencillos y un gancho de presión (Figura 8), diseñados especialmente para inmovilizar y manipular las serpientes. Estos implementos se consiguieron en préstamo en el Centro de investigaciones Biomédicas de la Universidad del Cauca (CIBUC). Para la recolección del veneno se empleó un Beaker recubierto con látex en condiciones estériles.

Figura 8. Sujetadores para Manipulación de Serpientes



Fuente: Leney Solarte Rodrigo Navia. Centro De Investigaciones Biomédicas de la Universidad del Cauca (2005).

Estando inmovilizada la serpiente se procedió a emplear el método Europeo de ejecución que usa tres soportes, el dedo anular en un extremo, el índice en la cabeza y el dedo pulgar sujetando el otro extremo de la cabeza de la serpiente. Estas posiciones de agarre imposibilitan al reptil de girar y morder.

Figura 9. Sujeción y extracción del Veneno de la serpiente *Bothrops asper*



Fuente: Santiago Ayerbe MD. (2002)

En el procedimiento se acerca el embudo a la serpiente para que muerda el látex de manera natural y una vez ubicados los colmillos de la serpiente se masajeó su maxilar superior procurando presionar las glándulas del veneno para obtener una muestra considerable (figura 9).

Una vez obtenido, el veneno se centrifugo para cuantificar la concentración de proteínas y se almacenó a -70°C . Posteriormente se liofilizo durante 24 horas y se disolvió en solución salina 0.9% para su utilización.

6.6 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

Para establecer la cuantificación de proteínas del veneno se llevó a cabo el siguiente procedimiento: al veneno obtenido y mantenido en un tubo *eppendoff* se le agregó 1 ml de solución salina de NaCl 0.9% para obtener una solución madre y se procedió a homogeniza con un vortex, posteriormente se realizó una centrifugación a 6000 rpm por 30 minutos (57), con el fin de separar los componentes inactivos del veneno y obtener la concentración proteica aislada en el sobrenadante.

Para la cuantificación de proteínas se empleó un factor de dilución de 50, disolviendo 10 μ l del sobrenadante en 490 μ l de solución salina NaCl (0.9%), la cual se vertió en una celda estéril. En el procedimiento se empleó como blanco para la lectura la solución salina NaCl (0.9%), la lectura de absorbancia se hizo a 280 nm en un equipo espectrofométrico Génesys 6. El cálculo de la concentración en mg de proteína se realizo con la siguiente fórmula;

$$C_{fv} \text{ (mg/mL)} = (A_{280}) (F_{d1}) (F_{d2}) (Vt)$$

Cfv: Concentración final del veneno

A₂₈₀: Absorbancia a 280 nm.

Fd: Factor de dilución

Vt: Volumen del veneno obtenido

Al obtener la concentración del veneno puro se calculó la concentración de la solución madre mediante la siguiente fórmula:

$$C_2 = V_1 C_1 / V_2$$

C₁ Concentración Inicial

C₂ Concentración Final

V₁ Volumen Inicial

V₂ Volumen Final

6.7 SELECCIÓN DE LAS DOSIS EXPERIMENTALES

En este estudio se consideró una DL₅₀ del veneno de *B asper* reportada en la literatura de 6.52 µg/g con un intervalo de confianza del 95% de 6.23 – 6.83 (55), para una concentración de 192,9876 mg/mL. Teniendo en cuenta que la concentración obtenida fue de 190.855 mg/mL se obtuvo una DL₅₀ 6.59 µg/g, un valor que está dentro del rango ya establecido (6.23 – 6.83). Con base en este valor se calculó mediante ensayo y error la dosis máxima tolerada, empleando ensayos de 4 grupos de dos ratones, a los cuales se les aplicó dosis subletales, con seguimiento de 12 horas. La DMT se tomó como la dosis subletal para la inoculación de los ratones.

Los fitomedicamentos presentan baja toxicidad al ser utilizados por vía tópica, estos también pueden tener efectos secundarios cuando estos son ingeridos indiscriminadamente en cantidades inadecuadas (44); de esta manera se hizo un ensayo preliminar evaluando las siguientes concentraciones 1mg/g (extracto y voltaren) y 1.75mg/g de vaselina en 10 ratones; la sustancia fue sostenida en contacto con la piel con un ayuda de un parche, se observó durante 12 horas reacciones como convulsiones y reacciones alérgicas en la piel, debido a que no presentaron ninguna reacción estas se tomaron como las concentraciones altas.

Concentraciones del extracto.

Concentración Alta: 1mg/g de extracto + 1mg/g de vaselina

Concentración Media: 0.5mg/g de extracto + 1.5mg/g de vaselina

Concentración Baja: 0.25mg/g de extracto + 1.75mg/g de vaselina

Concentraciones de voltaren (fármaco de referencia)

Concentración Alta: 1mg/g de voltaren

Concentración Media: 0.5mg/g de voltaren

Concentración Baja: 0.25mg/g de voltaren

Concentraciones de Vaselina

Concentración Alta: 1mg/g de vaselina

Concentración Media: 1.5mg/g de vaselina

Concentración Baja: 1.75mg/g de vaselina

6.7 VIA DE INOCULACION DEL VENENO

Para determinar la dosis subletal, la inoculación del veneno se llevó a cabo por vía intraperitoneal, debido a que es una vía de absorción rápida.

Para determinar el efecto inflamatorio se llevo a cabo por vía subcutánea en la almohadilla plantar. Esta inoculación se llevo a cabo con jeringas de insulina de 1ml (figura 10).

Figura 10. Inoculación vía subcutánea



6.8 DISTRIBUCION Y TRATAMIENTO DE LOS ANIMALES

El experimento se realizó mediante un diseño de bloques aleatorizados. Se distribuyeron al azar 45 ratones, en 5 grupos con 9 animales cada uno, (cada grupo se colocaron en cajas de aluminio inoxidable), los cuales fueron inoculados con el veneno de *B asper* y posteriormente se les aplicaron los tratamientos. Los 9 tratamientos se aleatorizaron entre los entre los 9 ratones de cada caja, a razón de un tratamiento por ratón. En total cada tratamiento fue repetido 5 veces correspondiente a los cinco bloques (cinco cajas, 1 caja por día).

Los 9 ratones de cada bloque se les midió el grosor de la almohadilla plantar de la pata derecha e izquierda antes de inocularles el veneno mediante el calibrador pie de rey digital (anexo B).

6.9 FORMACIÓN DEL EDEMA INDUCIDO POR EL VENENO DE *B asper*

Los animales recibieron por vía subcutánea en la almohadilla plantar el veneno de serpiente *B asper*; cada ratón de cada grupo recibió 0.002 µl/g de veneno disuelto en solución salina (0.9%) en la almohadilla plantar de la pata derecha, igual volumen de solución salina (0.9%) recibió la pata izquierda (control). La diferencia entre los valores obtenidos de las dos patas (veneno y solución salina) fueron usados para determinar el edema producido por el veneno.

6.10 APLICACIÓN DE TRATAMIENTOS

Los 9 tratamientos en cada uno de los bloques, fueron administrados por vía cutánea para cada ratón. Dentro de cada bloque los ratones fueron escogidos de manera aleatoria para aplicar los diferentes tratamientos. El primer ratón recibió la concentración alta (extracto + vaselina), el segundo concentración media (extracto + vaselina) y el tercero la concentración baja (extracto + vaselina); los seis ratones siguientes recibieron las tres concentraciones de voltaren y vaselina respectivamente, de acuerdo al peso del ratón.

6.11 TIEMPO DE OBSERVACION

La inflamación se cuantificó midiendo el espesor de la almohadilla plantar (mm), a los 15', 30' y 1 h utilizando el calibrador digital (anexo C). Después de la

aplicación de los tratamientos se midió con el calibrador digital la reducción del edema en (mm) a las 3, 6, 9 y 12 horas (figura 11, anexo D).

Figura 11. Medición del grosor la almohadilla plantar (mm) con el calibrador pie de rey digital.



Fuente: autor (2007).

6.11 MÉTODOS Y TÉCNICAS PARA EL ANÁLISIS DE DATOS

Para el estudio de la actividad anti-inflamatoria se aplicó el análisis de varianza (Anova con medidas repetidas), mediante el paquete estadístico SPSS versión 11.5 para Windows. Se consideró como significativo una $p < 0,05$.

7. RESULTADOS

7.1 CONCENTRACION PROTEICA DEL VENENO DE *Bothrops asper*

La concentración de proteína del veneno puro de *Bothrops asper* fue equivalente a 190.855 mg/mL y la concentración de la solución madre a partir de la cual se preparó la solución de trabajo fue 54.53 mg/mL.

7.2 FORMACIÓN DEL EDEMA

En la tabla 2 se presentan los promedios correspondientes a la medición de la almohadilla plantar de los ratones inculados con solución salina (control) y veneno *B asper*, a los 15 min, 30min y 1 hora.

Tabla 2. Promedios obtenidos en mm de la almohadilla plantar de los ratones tratados con solución salina y veneno *B asper*.

	Promedios		
	15 min	30min	1hora
Solución salina	2.55	2.22	1.97
Veneno <i>B asper</i>	3.57	3.99	3.99

En la Tabla 3 se presenta el promedio de la diferencia del grosor de la almohadilla plantar de la pata control (solución salina) y de la pata tratada (veneno de *B asper*), en (mm), con el fin de evaluar la evolución del edema causado por el veneno *B asper* en ratones a los 15', 30' y 1 hora.

Tabla 3. Valores medios de la diferencia del grosor de la almohadilla plantar de la pata control (solución salina) - de la pata tratada (veneno *B asper*)

n = 45	15'	30'	1h
Veneno <i>B asper</i> - Solución salina	1.02	1.77	2.02
Porcentaje	50.49	87.62	100

n = tamaño de la muestra El porcentaje de inflamación se calcula considerando el 100% a 1 hora.

En la tabla 4 se resume el promedio de la diferencia del grosor de la almohadilla plantar de la pata tratada con solución salina con respecto al inicio del ensayo (antes de inocular la solución salina), con el fin confirmar si existe una inflamación por parte de la solución salina a las 3, 6,9 y12h.

Tabla 4. Valores medios de la diferencia del grosor de la almohadilla plantar de la pata control (solución salina) respecto al inicio del ensayo.

Pata control tiempo	Media	Desv. Típica	N
PC 0h	,0020	,00505	45
PC 3h	,0000	,00000	45
PC 6h	,0000	,00000	45
PC 9h	,0000	,00000	45
PC 12h	,0000	,00000	45

De acuerdo a la media, la solución salina se absorbe completamente, por tanto no hay efecto inflamatorio con la solución salina.

En la tabla 5 se presentan los valores medios de la diferencia del grosor de la almohadilla plantar de la pata tratada con veneno *B asper* con respecto al inicio del ensayo (antes de inocular el veneno), antes de aplicar los tratamientos (extracto, voltaren y vaselina).

Tabla 5. Valores medios de la diferencia del grosor de la almohadilla plantar antes aplicar el tratamientos respecto al inicio del ensayo

Sustancia	Concentración	Media t=0 *	Desv. típica
Extracto	alta	2,0320	0,08198
	media	2,0280	0,06760
	baja	1,9880	0.03701
voltaren	alta	2,0000	0,03674
	media	1,9940	0,03050
	baja	2,0220	0,32938
vaselina	alta	2,0300	0,06633
	media	2,0240	0,02881
	baja	2,0220	0,08258

*t = 0 a 1 hora de aplicación del veneno de *B asper* ó antes de aplicar los tratamientos (extracto, voltaren y vaselina)

Según los promedios, antes de aplicarse los tratamientos ó a la 1 hora de haber aplicado el veneno, la inflamación es muy similar en los ratones tratados

7.3 EFECTO ANTIINFLAMATORIO

Después de la aplicación de los tratamientos se midió el grosor de la almohadilla plantar de la pata derecha tratada con veneno *B asper* con respecto al inicio del ensayo. En la Tabla 6 se presentan los promedios y la desviación estandar de la diferencia del grosor de la almohadilla a las 3, 6,9 y 12 h.

Tabla 6. Valores medios de la diferencia del grosor de la almohadilla plantar a las 3, 6,9 y 12 horas respecto al inicio del ensayo

Sustancia	Concentración	Media t=3	Desv.tip	Concentración	Media t=6	Desv.tip	Concentración	Media t=9	Desv.tip	Concentración	Media t=12	Desv.tip
Extracto	Alta	1,9720	0,09066	alta	1,8060	0,14046	alta	1,9860	0,19857	alta	0,9280	0,20017
	media	2,0220	0,06042	media	1,9440	0,07925	media	1,7660	0,11718	media	1,4320	0,16709
	baja	2,0220	0,04099	baja	1,9400	0,03162	baja	1,8240	0,07537	baja	1,5780	0,14307
voltaren	Alta	2,0000	0,03674	alta	2,0000	0,03674	alta	2,0000	0,03674	alta	2,0000	0,03554
	media	1,9940	0,03050	media	1,9940	0,03050	media	1,9940	0,03650	media	1,9940	0,44090
	baja	2,0240	0,32300	baja	2,0240	0,32300	baja	2,0240	0,32300	baja	2,0240	0,32391
vaselina	alta	2,0300	0,06633	alta	2,0300	0,06633	alta	2,0320	0,06458	alta	2,0320	0,06458
	media	2,0240	0,02881	media	2,0240	0,02881	media	2,0240	0,02881	media	2,0240	0,02966
	baja	2,0220	0,08258	baja	2,0220	0,08258	baja	2,0220	0,08258	baja	2,0220	0,08258

Al comparar los promedios a las 3, 6,9 y12 horas con el momento inicial (t=0), se observa que el extracto de la raíz la planta *Polygala paniculata* ocasiona efecto antiinflamatorio en las tres concentraciones evaluadas donde la concentración alta presenta mayor efecto; también se observa que el voltaren y la vascelina no presentaron efecto antiinflamatorio en los tiempos ni en las tres concentraciones evaluadas.

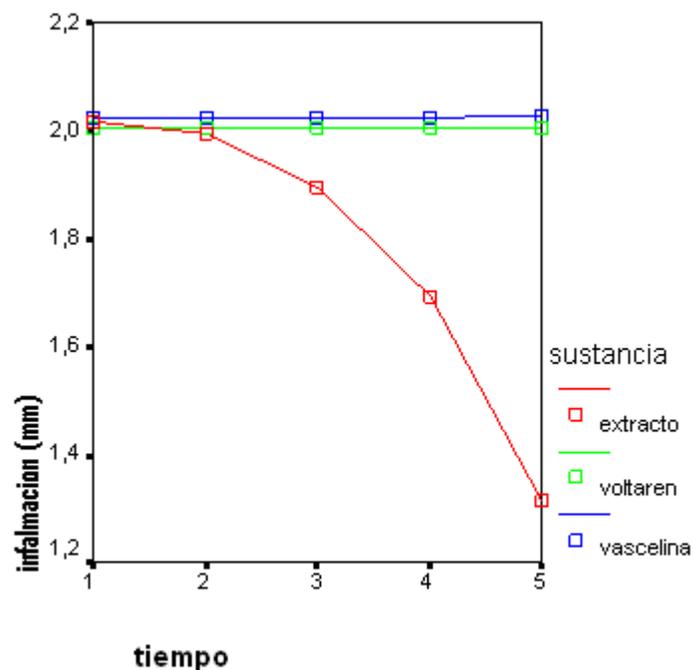
Al realizar el análisis de comparaciones múltiples de T3 Dunnet. Se determinaron diferencias estadísticamente significativas entre las respuestas de las diferentes sustancias ensayadas (Tabla 10).

Tabla 7. Comparaciones múltiples (sustancia)

	(I) sustancia	(J) sustancia	Diferencia entre medias (I-J)	Error típ.	Significación	Intervalo de confianza al 95%.	
						Límite inferior	Límite superior
T3 de Dunnet	extracto	voltaren	- ,2239(*)	,03650	,000	-,3209	-,1268
	extracto	vascelina	- ,2435(*)	,03863	,000	-,3442	-,1428
	voltaren	extracto	,2239(*)	,03650	,000	,1268	,3209
		vascelina	-,0196	,01729	,598	-,0641	,0249
	vascelina	extracto	,2435(*)	,03863	,000	,1428	,3442
		voltaren	,0196	,01729	,598	-,0249	,0641

Con una sig de $0.000 < 0.05$ se concluye que hay una diferencia estadísticamente significativa entre el extracto y el Voltaren, con una sig de 0.000 el extracto difiere estadísticamente de la Vaselina y del Voltaren con una sig de $0.598 > 0.05$ se concluye que no hay diferencia entre el Voltaren y la Vaselina; estas diferencias se ilustran en la siguiente figura:

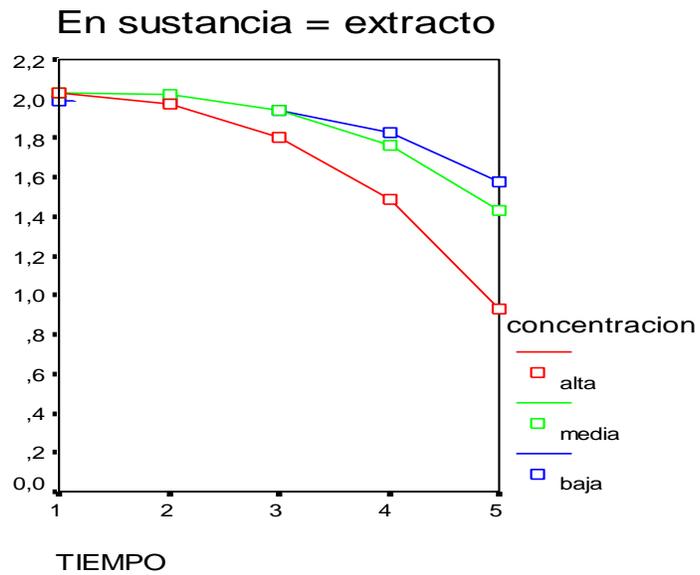
Figura 12. Diferencias de las sustancias (Extracto, Voltaren y vaselina)



En la figura se puede observar que el extracto tiene actividad antiinflamatoria muy notoria desde las 3 horas y más aun a las 12 horas; el voltaren y la vaselina no presentaron este efecto en los tiempos evaluados.

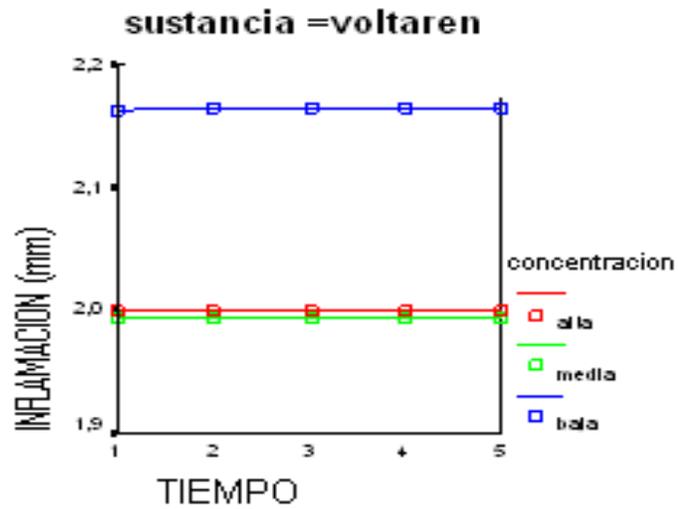
En las figuras 13, 14 y 15 se puede observar el efecto de las sustancias y las concentraciones evaluadas en los diferentes tiempos.

Figura 13. Efecto antiinflamatorio de las diferentes concentraciones del extracto *P paniculata* a las 3, 6,9 y 12 h



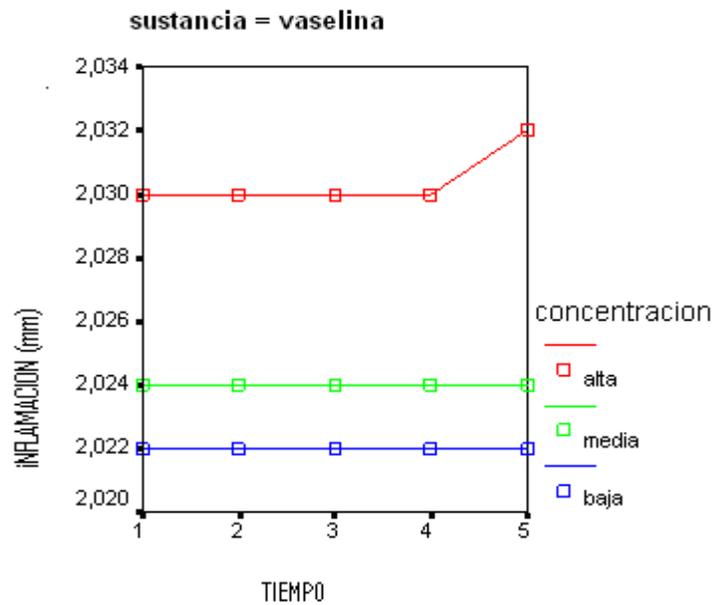
Se observa que el extracto tiene efecto antiinflamatorio en las tres concentraciones evaluadas, la concentración alta presenta mayor efecto antiinflamatorio; este efecto es mejor a las 12 horas.

Figura 14. Efecto antiinflamatorio de las diferentes concentraciones de voltaren a las 3, 6,9 y 12 h



El voltaren no presento efecto antiinflamatorio en las concentraciones evaluadas.

Figura 15. Efecto antiinflamatorio de las diferentes concentraciones de la vaselina a las 3, 6,9 y 12 h



La vaselina no presento efecto antiinflamatorio en las concentraciones evaluadas.

- 1= 1h después de haber aplicado el veneno
- 2= 3 h después de aplicación del tratamiento
- 3 =6h después de aplicación del tratamiento
- 4= 9h después de aplicación del tratamiento
- 5= 12h después de aplicación del tratamiento

Para mirar el efecto antiinflamatorio por parte del extracto se calcula mediante la siguiente formula.

$$\% \text{ de reducción del edema} = \frac{x \text{ del control (vaselina)} - x \text{ tratamiento}}{x \text{ del control}} \times 100$$

La prueba antiinflamatoria del extracto etanólico de *Paniculata* a concentraciones tanto altas como medias y bajas demostró diferencia significativa con respecto al grupo control ($p < 0.05$) (tabla 8).

Tabla 8. Comparaciones de la reducción del edema entre los diferentes tiempos después del tratamiento

Tratamiento (n=9)	Concentración	Promedio 3h	Promedio 6h	Promedio 9h	Promedio 12h
Extracto <i>P paniculata</i>	Alta	2.86%	11.03%	43.47%	54.33%
	Media	0.20%	3.95%	12.74%	29.31%
	Baja	0%	4.00%	9.79%	21.95%
Vaselina	Alta	0%	0%	0%	0%
	Media	0%	0%	0%	0%
	Baja	0%	0%	0%	0%

La actividad antiinflamatoria se observa que aumenta con el tiempo siendo mejor a las 12 horas (figura 16) con un 54.33% para la concentración alta, 29.31% para la media y 21.95% para la baja.

Figura 16. Izquierda, edema antes del tratamiento y derecha, después del tratamiento (*P paniculata*)



7.4 Relación entre el color de la mancha y de la estructura de los flavonoides.

La siguiente descripción de color y estructura de los flavonoides son de referencia que se siguió para determinar los resultados de este estudio.

- Azul fluorescente
- a) Flavonas y flavononas carentes de un 5-OH Libre.
 - b) Flavonoles carentes de un 5-OH libre pero con el 3-OH sustituido.
 - c) Isoflavonas carentes de un 5-OH libre

En la tabla 9 se presenta las características espectrales de algunos grupos de flavonoides y son de referencia para el estudio de los resultados.

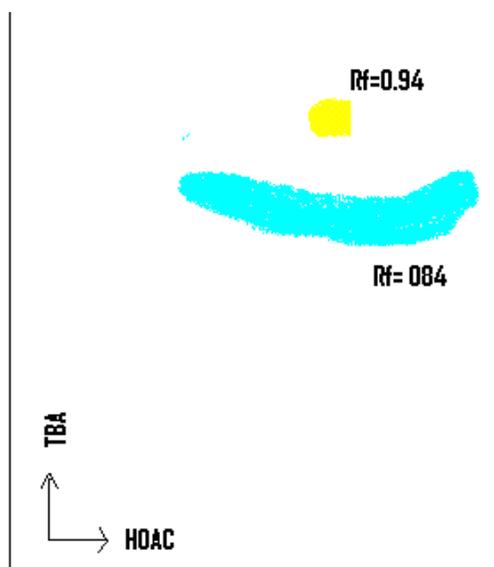
Tabla 9. Características espectrales (UV) de algunos grupos de flavonoides

NOMBRE	Rango de λ máxima en nm	
	Banda I	Banda II
Flavan-3-ols		275 -280
Flavononas	310-330	275-290
Flavonas	330-350	250-270
Flavonoles	350-390	250-270
Chalconas	360-390	240-260
Auronas	390-430	240-260
Antocianinas	475-560	275-280
Isoflavonas	310-330	240-280

Fuente: Domínguez, 1973

En la figura 17 se presenta el color y el Rf de las manchas

Figura 17. Cromatograma, identificación de color y Rf de la mancha.



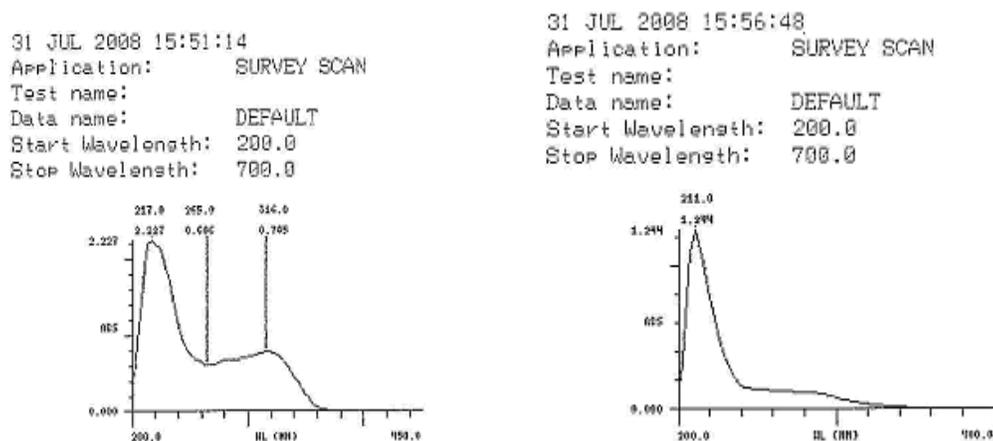
En la siguiente tabla se describen los resultados obtenidos a partir de la separación de los compuestos mediante cromatografía de papel 2D, y de su análisis espectroscópico UV.

Tabla 10. Datos cromatográficos y espectroscópicos

Mancha	Rf encontrado	λ (nm) encontrado	Color
A	0.84	316- 265	azul
B	0.94	211	Amarillo-verdoso

En la siguiente figura se ilustra el espectro de absorción de la mancha A y B

Figura 18. Espectro de absorción para la mancha A y B



a) Mancha A

b) mancha B

Para la mancha A, Según el color azul y el estudio espectroscópico con un máximo de absorción 316 nm y 265 nm (figura 18), el cual se encuentra en el rango 310-330 para la banda I y en el rango 240-280 para la banda II, (tabla 18) indicando que el compuesto flavonoide corresponde al grupo de las Isoflavonas.

Para la mancha B, el máximo de absorción es de 211 (figura 19), el cual aun no es reportado en las fuentes investigadas; por tanto no fue posible determinar a que grupo de flavonoides pertenece.

8. EFECTO DE LA APLICACIÓN DEL VENENO Y EXTRACTO DE LA RAIZ DE LA PLANTA *Polygala paniculata*

Estudios anteriores relacionados con el edema inducido por el veneno de *B asper*, inoculado en la almohadilla plantar ha mostrado que, cuando se usan dosis bajas de veneno (es decir 1 µg por ratón), el edema es rápido y transitorio, alcanzando su máximo a 1 hr después de la inyección (37). En el contraste, cuando una dosis más alta de veneno se inyecta (es decir 50µg por ratón), el edema es rápido pero con respuesta sostenida (37-29). Para este estudio la cantidad de µg/ratón fue de 44,88µg aprox., donde se observa que el edema es rápido (a los 15'-50,49%), alcanzando su máximo a la 1 hr y con una respuesta sostenida.

En literatura consultada sobre la planta *Polygala paniculata*, se encuentra que tiene efectos antiinflamatorios de forma anecdótica, en casos de faringitis y amigdalitis aguda en las cuales se utiliza las raíces en forma de decocción, además el macerado de las raíces es utilizado en el ofidismo en Hospital Universitario San José de la ciudad de Popayán, donde se reporta que hay una reducción del edema en un 50% a las 12horas y 100% a las 24horas. (4); para esta investigación se encontró que hay una reducción del edema causado por el veneno *B asper*, en un 2.86 % a las 3 h, 11.03% a las 6h, 43.47% a las 9h y 54.33% a las 12h para la concentración alta, 0.20% a las 3 h, 3.95% a las 6h, 12.47% a las 9h y 29.1% a las 12h para la concentración media y para concentración baja 0% a las 3h, 4% a las 6h, 9.79% a las 9h y 21.95% a las 12h; de esta manera se confirma estadísticamente el efecto antiinflamatorio de planta *Polygala paniculata*, siendo el mayor efecto el de la concentración mas alta con un 54.33% a las 12h (Figura 16).

El extracto *P paniculata*, además de poseer acción analgésica demostrada (46), tiene una gran actividad antiinflamatoria, siendo capaz de reducir el edema de la pata inducido por veneno de *B asper*; esta actividad puede ser atribuida a uno o a varios compuestos presentes en el extracto entre ellos los flavonoides. Las propiedades anti-inflamatorias de los flavonoides se deben a su acción antioxidante y a su habilidad de actuar contra las histaminas y otros mediadores de inflamación, como las prostaglandinas y los leucotrienos; se les ha descrito una importante serie de actividades farmacológicas, tales como la inhibición de la actividad plaquetaria y actividad antimicrobiana en general (12). También presenta actividad antiinflamatoria y capacidad para inhibir fosfolipasas A2 (22). Compuestos de naturaleza flavonoide como las antocianinas disminuyen la fragilidad capilar y tienen acciones antiinflamatorias (30). Además la presencia de catequizas, flavonas, antocianinas y taninos podrían tener acción quelante del zinc requerido para la actividad enzimática de las melatropoinasas hemorraginas.

Como observa que la vaselina no presento actividad antiinflamatoria, debido a que esta es farmacologicamente inerte y químicamente estable; pero esta al ser combinada con el extracto pudo haber facilitado la penetración del principio activo, ya que esta es conocida como emoliente, donde aumenta la hidratación de la capa cornea; la cual es responsable a la resistencia a la difusión, representando el obstáculo principal a la penetración de los medicamentos por su alto contenido de queratina, lípidos y bajo contenido de agua.(10); por tanto, la hidratación es uno de los objetivos inmediatos de la terapia farmacológica. La vaselina fue apropiada para este preparado, ya que esta no se fijo al principio activo permitiendo así la liberación a la piel, lo que con lleva a pensar que hubo una buena compactibilidad farmacéutica entre el extracto y la vaselina.

El fármaco Diclofenaco Sodico (voltaren), a pesar de ser un antiinflamatorio, en este estudio este no presento reducción del edema causado por el veneno de *B asper* , esto se debe a que el fármaco no tiene los componentes o principio activo presentes en la planta, además el voltaren no tuvo efecto debido a que es un fármaco utilizado para tratar inflamaciones de origen traumático, y para este estudio el edema es causado por veneno, siendo esta inflamación mas compleja debido a que lo producen mas componentes o mediadores; otra razón que este fármaco no tiene efecto frente a este edema, debido a que este tiene una vida media plasmática corta de 1-2 horas, por tanto para que haya efecto pudo haberse necesitado otras aplicaciones.

La metodología empleada para la determinación de concentración de proteínas en esta investigación fue la empleada por (56), encontrándose que los datos obtenidos son similares a pesar de que Yasnó encontró una concentración de 192,9876mg/ml, las diferencias poco significativas en la concentración de proteínas puede deberse a la edad, dieta, estado de salud, clima, contaminación ambiental, tiempo de cautiverio, etc (11). Para este estudio la concentración es de 190.885mg/ml, aunque esta por debajo del promedio reportado 205mg/ml, se encuentra dentro del rango establecido para esta especie (100-310mg/ml). Este resultado está de acuerdo con lo establecido por Chipaux, donde afirma que la concentración del veneno es directamente proporcional a la edad de la serpiente. El ejemplar al cual se le cuantificó el veneno esta dentro del estado adulto razón por la cual la concentración no alcanza a superar el promedio establecido y sin embargo, su valor cumple el rango establecido.

Para la concentración del veneno 192, 9876mg/ml reportada por Yasnó el valor de la DL50 es de (6.52µg/g), teniendo en cuenta que la concentración para este estudio es de 190,885mg/ml se tomó como DL50 6.59µg/g(6.23 – 6.83); esta diferencia no es significativa ya que el valor determinado se encuentra dentro del

intervalo de la media establecida por Yasnó. Es de notar que los valores de concentración de proteínas y la respectiva DL50 tienen relación inversa pues a mayor concentración de proteínas menor valor de la DL50.

9. CONCLUSIONES

1. La aplicación tópica del extracto de la raíz de la planta *P paniculata* presentó un gran efecto antiinflamatorio a concentraciones 1mg/g, 0.5mg/g, 0.25mg/g frente al edema de la pata inducido por veneno de *B asper*.
2. El Voltaren no presentó efecto antiinflamatorio en la reducción del edema inducido por el veneno *B.asper* en la pata de ratones *Mus musculus*.
3. La planta *P paniculata* sería de gran ayuda como terapia adicional a los pacientes que han sufrido la mordedura de la serpiente *B asper*, ya que los efectos locales como el edema, son daños irreversibles y pobremente neutralizados por el antiveneno.
4. El análisis químico del extracto permitió observar compuestos de tipo flavonoide (isoflavonas), los cuales podrían jugar un papel en el efecto antiinflamatorio observado.

10. RECOMENDACIONES

1. Realizar investigaciones confirmatorias destinadas a aislar el principio activo de la planta *Polygala paniculata* por medio de fraccionamiento fitoquímico con solventes de diferente polaridad, con el fin de establecer su verdadero potencial terapéutico.
2. A partir de estos resultados se sugiere continuar estudios con la finalidad de caracterizar de forma más detallada los mecanismos biológicos responsables del efecto antiinflamatorio.
3. Ampliar los estudios con otras dosis subletales de veneno *Bothrops asper*

BIBLIOGRAFÍA

1. AYERBE, Santiago. Ofidismo en el Departamento del Cauca, Colombia. Epidemiología, Etiología, Clínica y Complicaciones. En: Rev. Fac. Cien. Univ. Cauca. Popayán. Vol. 2, no. 4 (dic.2000); p.21-27.
2. AYERBE, Santiago. Ofidismo en Colombia. Enfoque Diagnostico y Tratamiento. Capitulo 52, p. 757-768 En: Ordóñez, C. A, Ferrada, R y Buitrago, R (Eds) 2002. Cuidado Intensivo y Trauma, Bogota. p. 880.
3. AYERBE, Santiago. Pautas para el manejo de las mordeduras de serpientes. Temas de Pediatría Nestle. 1995. p.1-31.
4. AYERBE, Santiago. Tratamiento de ofidismo en el Departamento del Cauca. Colombia .En: Rev. Fac. Cien. Univ. Cauca. Popayán. Vol.3, no 1. 2001; p.20-26
5. AYERBE, Otero, L. M; Gálvez, D y Paredes, A. Estudio retrospectivo sobre Ofidiotoxicosis en el Departamento del Cauca.2ª parte. Aspectos clínicos, epidemiológicos y complicaciones. En: Cuadernos de Medicina Popayán (Col), Vol. 4, Nº (1-2).1979.p. 33-45.

6. BOLAÑOS, R. Las serpientes venenosas de Centroamérica y el problema del ofidismo. Primera parte. Aspectos zoológicos, epidemiológicos y biomédicos. Costa Rica .1982. p. 165-184. Citado por: CASTRO, Oscar *et al.* Neutralización del efecto hemorrágico inducido por veneno de *Bothrops asper* (Serpentes: Viperidae) por extractos de plantas tropicales. En: Biol. Trop. San José set. Vol.47, no.3.1999; p.1-10.

7. CALIXTO, J. B. Medicamentos fitoterápicos. En : Plantas medicinais sob a ótica da uímica moderna. YUNES, R. A; CALIXTO, J. B. Chapecó: Editora Argos, 2001. p. 7- 315.

8. CAMPBELL, JA; y WW. Lamar. The Venomous Reptiles of the Latin America. Nuevo York. 1989. p. 425.

9. CAMPBELL, JA; y WW. Lamar, The Venoms Reptiles of the Western Hemisphere. Comstock Public. Assoc./Cornell Univ. Press. Vol.1, 2004; p .1-146.

10. CARNEAN, M; BUZO, G; RODRIGEZ, JC; AVILA, JR. Administración tópica y transdérmica. En: Administración de medicamentos. Teoría y práctica. Ed. Santos Ramos B, Guerrero Aznar MD. Ed. Díaz de Santos. 1994. p. 75-98.

11. CHIPPAUX J.P; WILLIAMS V. y WHITE J. Snake Venom Variability: Methods of study, Results and Interpretation. En: Toxicon Vol.29. 1991. p. 1279-1303.

12. CHUNG, I. MOORE, K.H. Gan, C.N. Lin, F.N. Ko y C.M. Teng. Antiplatelet effects and vasorelaxing action of some constituents of formosan plants. 1993. p. 929-934.

13. COLMENARES D, Ana Julia y RAMIREZ, Arnoldo. Treinta Plantas Medicinales del Valle del Cauca. Fundamentos Fotoquímicos y Farmacológicos que sustentan sus usos. Cali, Universidad del Valle.1997.

14. CRISTIANO, R.; PIZZOLATTI, M.G.; DELLE, F.M.; REZENDE C.M.; BRANCO, A. Two xanthenes from *Polygala paniculata* and confirmation of the 1-hydroxy-2, 3, 5-trimethoxy-xanthone at trace level by HRGC-MS. En: Z. Naturforsch [C]. Vol. 58, no.7-8; 2003; p. 490-494.

15 DALL`ACQUA, S; INNOCENTI, G; VIOLA, G; PIOVAN, A.; CANIATO, R; APPELLETTI, E. M. Cytotoxic compounds from *Polygala vulgaris*. En: Chem. Pharm. Bull Vol. 50, no.11. 2002, p. 1499 -1501.

16. DESBENE. S; HANQUET B; SHOYMA Y; WAGNER H.; LACAILLEDUBOIS M.A. Biologically active triterperne saponins from callus tissue of *Polygala amarelle*. En: J. Nat. Prod. Vol. 62, no. 6. 1999. p. 923-926.

17. DOMINGUEZ, Xorge Alejandro. Métodos de Investigación Fitoquímica. 1ed. México: Limusa, 1973. p. 229.

18. FAN, HW y CARDOSO JLC. Clinical toxicology of snakebite in south America. En: meir J y WhiteJ, Handbook of clinical toxicology of animal, Venoms and Poinsons. CRC. Press, Boca Raton, FL, USA, 1995. p. 667-688.
19. FARINA, M.; FRANCO, J.L.; RIBAS, C.M.; MEOTTI, F.C.; PIZZOLATTI, M.G.; DAFRÉ, A.L.; SANTOS, A. R. S. Protective effects of *Polygala paniculata* extract against methylmercury-induced neurotoxicity in mice. J. Pharm. Pharmacol., v.57, p.1-6, 2005.
20. GARCIA BARRIGA, Hernando. Flora Medicinal de Colombia. Tomo II. Colombia: Editores Tercer Mundo, 1992. p. 76 – 88.
- 21 GENTRY, A H. A field guide to the families and genera of woody plants of orthwest south America (Colombia, Ecuador e Peru). Chicago: The University of Chicago Press.1996. p. 689-693.
22. Gil, B; M.J. Sanz, M.C. Terencio, R. Gunasegaran, M. Paya y M.J. Alcaraz. Morelloflavone, a novel biflavonoid inhibitor of human secretory phospholypase A2 with anti-inflammatory activity. En: Biochem. Pharmacol. Vol. 53, (1997); p. 733-740.
23. GUTIERREZ, José Maria. Comprendiendo los Venenos de Serpientes: 50 años de investigaciones en América Latina. En: Biología tropical. Costa rica. Vol. 50, no. 2 (jun.2002); p. 377-394.

24. GUTIERREZ, José Maria. Clinical toxicology of snakebite in Central America, 1995. p. 645 - 667.
25. GUTIERREZ, José Maria, BARRIOS, Mariano et al. Neutralización del Efecto Hemorrágico inducido por Veneno de *Bothrops asper* (Serpentes: Viperidae) por Extractos de Plantas Tropicales. EN: Biología Tropical. San José. Vol. 47, no 3, (1999); p. 605-616.
26. GUTIERREZ, José Maria, G. León, G. Rojas, B. Lomonte, A. Rucavado y F. Chávez. Neutralization of local tissue damage induced by *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom. En: Toxicon.1998. p. 1529-1538.
27. GUTIERREZ, José Maria B. Lomonte. Local tissue damage induced by *Bothrops* snake venoms. Mem. Inst. Butantan. 1989. p. 211-223.
29. GUTIERREZ, José Maria, ARROYO, O y BOLAÑOS, R. Mionecrosis, hemorragia y edema inducidos por *Bothrops asper* en ratón blanco. En: Toxicon. Vol. 18. 1989. p. 603-610.
30. HARBONE, JB y J.G. Reene. The anthocyanins .the flavonoides. Londres.1998. p.1-20.

31. HOEHNE, F. C. Plantas e Substancias Vegetais Tóxicas e Mediciniais. ed. Graphicars, São Paulo- Río.1939. P.166-167. Citado por: AYERBE, Santiago. Ofidismo en Colombia. Enfoque, Diagnostico y Tratamiento. Capitulo 52, p. 757-768 En: Ordóñez, C. A, Ferrada, R y Buitrago, R (Eds) 2002. Cuidado Intensivo y Trauma, Bogotá. p. 880.
32. INSEL P. Analgésicos-antipiréticos y antiinflamatorios, y fármacos antigotosos. En: Hardman J, Limbird L, Molinoff R, Ruddon R, Goodman A, eds. Goodman & Gilman. Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica. 9 ed. México DF: McGraw-Hill Interamericana; 1996. pp. 683-4.
33. KANG, Y.S. Behavioural pharmacology of polygala saponins indicates potential antipsychotic efficacy. En: Pharmacol. Biochem. Behav. Vol; 71, no.1-2. 2002, p. 191-195.
34. KOU, J.; MA R.; ZHU D.; YAN Y. *Blood* - activating and anti-inflammatory actions of *Polygala fallax*. En: Zhong Yao Cai. Vol. 26, no.4. 2003, p. 268-71.
35. LAPA, Fernanda. Actividad antiinflamatoria, anticonceptiva y protectora gástrica del extracto hidroalcoólico de *Polygala paniculata* L. Curitiba, 2006; p.77. Trabajo de Maestría (farmacóloga). Universidad Federal de Paraná en el Departamento de Ciencias Fisiológicas de Santa Catarina.
36. LEE, H.J. BAN, J.Y; KOH, S.B.; SEONG, N.S.; SONG, K.S.; BAE, K.W.; SEONG, Y.H. Polygalae radix extract protects cultured rat granule cells against damage induced by NMDA. En: Am. J. Chin. Med. Vol. 32, no.4, 2004. p. 599-610.

37. LOMONTE, B; TARKOWSKI, A y HANSON, L. A. Host response to *Bothrops asper* snake venom: análisis of edema formación, inflammatory cells and cytokine release in a Mouse model. En: inflammation. Vol. 17.1993.p. 93-105.
38. LORENZI, H. Plantas Daninhas do Brasil, 2 ed. Inst. Plantarum de Estados da flora Ltda. 2000. p. 510. Citado por: AYERBE, Santiago. Ofidismo en Colombia. Enfoque, Diagnostico y Tratamiento. Capitulo 52, p. 757-768 En: Ordóñez, C. A, Ferrada, R y Buitrago, R (Eds) 2002. Cuidado Intensivo y Trauma, Bogota .p.880
39. LORENZI, H, MATOS, F.J.A. Plantas Mediciniais do Brasil. São Paulo.2002. p. 386.
40. MARKLAND, F.S. Snake Venoms and the Haemostatic System. EN: Toxicon. Vol. 36. 1998. p. 1749-1800.
41. MARTZ, W. 1992. Plants with a reputation against snakebite. Toxicon 30: 1131-1142.
42. MILLAN, S Procedimientos de Mecanizado, Madrid: Editorial Paraninfo. 2006.

43. NAVIA PIZO, Rodrigo. 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. Popayán, 2005.p. 111 Trabajo de grado (Biólogo). Universidad del Cauca. Facultad de Ciencias Naturales y Exactas de la Educación.

44. NAVARRO MORL, Maria concepción, uso racional de las plantas medicinales, <http://www.pharmaceutical.care,es/esp/2000/>

45. NEWALL, A.C.; ANDERSON A.L.; PHILLIPSON, D.J.Herbal Medicines: A guidefor health-care professionals. 3 ed. London: The pharmaceutical press, 1996. p. 241.

46. ORTIZ, Johana. y PEDRAZA, Helen. Actividad Analgésica y Toxicidad Aguda del mentol de monte (*polygala paniculata*) en ratones. Popayán, 2002; 79 p. Trabajo de grado (Enfermera Jefe). Universidad del Cauca. Facultad de Ciencias de la Salud.

47. OTERO R; FONEGRA R, JIMENEZ SL.Snabikes and ethnobotany in the nortwest región of Colombia .part.1: Tradicional use of plants. 2000. p.493-504.

48. OTERO R, GUTIERREZ J y MESA MB. Complications of bothrops, Portihdium, and Bothriechis snakebites en Colombia. A clinicaland epidemiological study of 39 cases atended in a university hospital. En: toxicon.2002.Vol40. p. 1107-1114.

49 PATIÑO, BLANCA STELLA. El del de Boletín Grupo de Estudio de Animales Silvestres. Colombia. 2002-2003.

50. PINEDA, D y JM, RENJIFO. Accidente Ofidico. P. 17-19. En: Pineda, D (ed.). Accidentes por Animales Venenosos. División de Biblioteca y Publicaciones, Instituto Nacional de Salud. Bogotá. 2002. p.194.

51. RENJIFO, J.M y M. LUNDBERG. Anfibios y reptiles de Urrá. Editorial Colina. Medellín, Colombia. 1999. p. 53-93.

52. ROSENFELD, G. Symptomatology, pathology and treatment of snake bites in South America. En W. Bucherl & E. Buckley (eds.). Venomous Animals and Their Venoms. Academic Press, Nueva York. 1971. p. 345-384.

53. ROSENSTEIN, Emilio. Diccionario de Especialidades Farmacéuticas. 29 ed. Bogotá: PLM, 2001. p.1127.

54 RUCAVADO A, Soto M, Kamiguti AS, Theakston RD, Fox JW, Escalante T, Gutiérrez JM. Characterization of aspercetin, a platelet aggregating component from the venom of the snake *Bothrops asper* which induces thrombocytopenia and potentiates metalloproteinase-induced hemorrhage. Thrombosis and Haemostasis. En: Thromb. Haemost. Vol. 85. 2001. p. 710-715.

55. WARRELL, D.A. Clinical features of envenoming from snake bites, 1996.p. 64-76. En: C. Bon y M.Goyffon. Envenoming and their treatments. Foundation Marcel Merieux, Lyon.

56. TORO, M. F; OTERO, R; GUTIERRES, J. M; NUÑES, V; ROBLES, A; ESTRADA, R; SEGURA, E; GARCIA, M; DIAZ, E. A Y RAMIREZ, E. C. A Randomized Double-Blind Clinical Trial of Two Antivenoums in Patients Bitten By *Bothrops atrox* in Colombia. EN: Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Higiene.Vol.90.1996.p.696-700.

57. YAZNO, F. Determinación del Efecto Citotóxico y Genotóxico del Veneno de Serpiente *Bothrops asper* (VIPERIDE) en Eritrocitos de la Sangre Periférica de Ratones (*Mus musculus*) Mediante la prueba de Micronúcleos. 2005.65. p. Trabajo de Grado (Biólogo) Universidad del Cauca, Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y de la Educación. Departamento de Biología.

ANEXO A

INSTRUMENTO PARA LA RECOLECCIÓN DE PLANTAS

MATERIALES

Azadón de jardinería

Bolsas plásticas

Cinta plástica o engomada

ASPECTOS GENERALES

Fecha: _____ Número de colección _____

Nombre del colector: _____

LOCALIDAD

Departamento: _____ Municipio: _____

Altura sobre el nivel del mar: _____

Lugar geográfico

Río: _____ Cerro: _____ Vereda: _____ Llanura: _____

ASPECTOS GEOGRÁFICOS

Abundancia

Raro: _____ Común: _____

Habitad

Orilla del río: _____ A la sombra: _____

Tipo de suelo

Seco: _____ Húmedo: _____ Arcilloso: _____ Blando: _____ Compacto: _____

ANEXO B

**Peso (g) y medición de la almohadilla plantar antes del inicio del ensayo
(mm)**

Marca del ratón	Peso (g)	Almohadilla pata derecha (mm)	Almohadilla planta izq. (mm)

ANEXO C

FORMACIÓN DEL EDEMA

Ratón	15´		30´		60´	
	Pata solución salina	Pata veneno	Pata solución salina	Pata veneno	Pata solución salina	Pata veneno

ANEXO D

EFFECTO ANTIINFLAMATORIO (mm) a las 3, 6, 9 y 12 horas

marca	EXTRACTO <i>P paniculata</i>				Voltaren				Vaselina			
	3h	6h	9h	12h	3h	6h	9h	12h	3h	6h	9h	12h

