

## Inhibición de las actividades proteolítica y fosfolipasa A<sub>2</sub> del veneno de *Bothrops asper* por el extracto etanólico de *Neurolaena lobata* (L.) Cass.

*Inhibition of proteolytic and phospholipase A<sub>2</sub> activities of Bothrops asper venom by the ethanolic extract of Neurolaena lobata (L.) Cass.*

Patricia Saravia-Otten<sup>1\*</sup>, Rosario Hernández<sup>1</sup>, Nereida Marroquín<sup>2</sup>, Gabriela García<sup>1</sup>, Federico Nave<sup>3</sup>, Lorena Rochac<sup>2</sup>, Vicente Genovez<sup>1</sup>, Max Mérida<sup>2</sup>, Sully M. Cruz<sup>2</sup>, Armando Cáceres<sup>2</sup>, José M. Gutiérrez<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Bioquímica, <sup>2</sup>Laboratorio de Investigación de Productos Naturales (Lipronat), Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, <sup>3</sup>Dirección General de Investigación (Digi), Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala. <sup>4</sup>Instituto Clodomiro Picado, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica, Costa Rica

\*Autor al que se dirige la correspondencia: [psaravia02@gmail.com](mailto:psaravia02@gmail.com)

Recibido: 30 de enero 2020 / Revisión: 11 de febrero 2020 / Aceptado: 14 de enero 2021

### Resumen

*Neurolaena lobata* es utilizada tradicionalmente en Centroamérica para tratar la mordedura de serpiente, pero su efectividad para contrarrestar el envenenamiento producido por *Bothrops asper* ha sido poco estudiada. Se evaluó la capacidad del extracto etanólico de sus hojas para inhibir las actividades proteolítica, fosfolipasa A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>; evaluada como hemólisis indirecta) y coagulante del veneno in vitro. El material vegetal fue colectado en Izabal, Guatemala, secado, se hicieron extracciones con etanol y se evaluó la presencia de actividades proteolítica, PLA<sub>2</sub> y coagulante intrínsecas en ensayos de concentración-actividad. Los efectos inhibitorios de la actividad proteolítica y PLA<sub>2</sub> del veneno se evaluaron después de pre-incubar concentraciones variables del extracto con concentraciones fijas de veneno. La inhibición de la actividad coagulante del veneno no fue evaluada porque el extracto presentó actividad anticoagulante intrínseca dependiente de la concentración. El extracto inhibió completamente las actividades proteolítica (CE<sub>50</sub> = 15.7 µg/µl) y PLA<sub>2</sub> (CE<sub>50</sub> = 32.5 µg/µl) del veneno. El análisis fitoquímico utilizando ensayos macro y semimicrométricos de cromatografía en capa fina, demostró la presencia de flavonoides, cumarinas, saponinas, taninos, sesquiterpenlactonas y aceites esenciales en el extracto. Su efecto sobre las proteínas del veneno se evaluó por electroforesis SDS-PAGE, mostrando cambios en el patrón electroforético atribuidos a la formación de complejos moleculares con los metabolitos del extracto. Los resultados indican que el extracto podría inhibir los efectos tóxicos del veneno inducidos por las metaloproteinasas dependientes de zinc (SVMPs) y PLA<sub>2</sub>s, pero podría afectar las alteraciones en la coagulación, coadyuvando en la desfibrinogénesis inducida por el veneno.

Palabras claves: Guatemala, efecto coagulante, envenenamiento ofídico, metabolitos especializados, antídoto

### Abstract

*Neurolaena lobata* has been used by traditional healers in Central America to treat snakebite, but its ability to neutralize *Bothrops asper* envenomations needs to be proved. This study evaluated the inhibitory potential of the ethanolic extract of the leaves of *N. lobata* against proteolytic, phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) and coagulant activities of the venom in vitro. Leaves were collected in Izabal, Guatemala, dried, extracted with ethanol and concentration-response assays were conducted to detect intrinsic proteolytic, PLA<sub>2</sub> (evaluated as indirect hemolysis) and coagulant activities. Assays for anti-proteolytic and anti-PLA<sub>2</sub> activities were performed after pre-incubation of several amounts of extract with a fixed concentration of venom. Inhibition assay for the coagulant effect of the venom was not tested because pre-incubation of thrombin with the extract prolonged the clotting time of plasma in a concentration-dependent manner. Proteolytic (EC<sub>50</sub> = 15.7 µg/µl) and PLA<sub>2</sub> (EC<sub>50</sub> = 32.5 µg/µl) activities of the venom resulted completely inhibited by the extract. Phytochemical profiles, determined by micrometric assays and semi microanalysis by thin layer chromatography, showed the presence of flavonoids, coumarins, saponins, tannins, sesquiterpene lactones and essential oils in the extract. SDS-PAGE was used to assess the action of the extract on the venom proteins. Results showed changes in the electrophoretic profile, probably due to the formation of insoluble complexes with plant specialized metabolites. These findings demonstrated that the extract could be able to inhibit toxic effects triggered by zinc-dependent snake venom metalloproteinases (SVMPs) and PLA<sub>2</sub>s but might aggravate the alterations induced by the venom in coagulation.

Keywords: Guatemala, coagulant effect, antidote, specialized metabolites, snakebite



## Introducción

El envenenamiento ofídico es un problema de salud pública importante a nivel mundial y una de las 20 enfermedades desatendidas determinadas como prioritarias por la Organización Mundial de la Salud (WHO, 2017). En la región centroamericana ocurren alrededor de 5,500 casos anuales, pero el número de accidentes ofídicos podría ser mucho mayor, ya que no se registran los casos que no son tratados en los centros de salud (Chippaux, 2017; Gutiérrez, 2014). La mayoría de los accidentes ofídicos son producidos por la mordedura de la serpiente *Bothrops asper* (barba amarilla, terciopelo o equis). El envenenamiento se caracteriza por producir daño tisular prominente en el sitio de la mordedura, con manifestaciones que incluyen edema, hemorragia y necrosis de tejidos blandos. En casos más graves se producen manifestaciones sistémicas, caracterizadas principalmente por sangrado, coagulopatía, daño renal y choque cardiovascular. En algunos casos, el envenenamiento produce secuelas físicas a largo plazo, como desfiguración o amputación (Gutiérrez, Escalante et al., 2009; Gutiérrez, Rucavado et al., 2009). Estos efectos son el resultado de la acción de los componentes del veneno, principalmente las metaloproteinasas dependientes de zinc (SVMPs), fosfolipasas A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>s) y serina proteinasas (SVSPs) (Angulo & Lomonte, 2009).

El único tratamiento validado para contrarrestar el envenenamiento es la administración intravenosa de antivenenos, los cuales son efectivos para neutralizar los efectos sistémicos, pero no tanto para contrarrestar el daño local, el cual aparece muy pronto después de la mordedura y es irreversible, a menos que se trate a tiempo el caso (Felix-Silva et al., 2017). El uso de antivenenos presenta serias limitaciones en las regiones rurales en donde ocurre la mayor parte de los accidentes ofídicos, debido a que el acceso a los centros de atención médica es difícil y la disponibilidad de antivenenos puede ser escasa. Por esta razón, muchos de los envenenamientos ofídicos en la región centroamericana son tratados por curanderos tradicionales con antídotos preparados con plantas medicinales nativas, según prácticas ancestrales (Coe & Anderson, 2005; Giovannini & Howes, 2017).

En la actualidad, la búsqueda de antídotos preparados con plantas se ha enfocado en la identificación de plantas de uso etnomédico que contrarresten eficazmente la acción de los componentes del veneno que producen daño local, tales como las PLA<sub>2</sub>s y

SVMPs del veneno de *B. asper*, ya que proporcionaría a la población afectada una alternativa terapéutica complementaria que podrían administrarse en el sitio en donde ocurre el accidente, lograría disminuir las secuelas del envenenamiento (Félix-Silva et al., 2017) y permitiría que los afectados pudieran trasladarse a tiempo a un centro de atención hospitalaria para recibir el tratamiento con antiveneno para neutralizar los efectos sistémicos.

Existen al menos 208 especies vegetales en la región centroamericana que se utilizan para este propósito, siendo los géneros *Piper*, *Aristolochia*, *Hamelia*, *Ipomoea*, *Passiflora* y *Peperomia* los más frecuentemente reportados, aunque aún es necesario realizar estudios clínicos que validen científicamente su efectividad terapéutica (Giovannini & Howes, 2017). *Neurolaena lobata* (L.) R. Br. ex Cass, (Astereaceae) (tres puntas, mano de lagarto, gavilana) es una de las plantas de uso tradicional para tratar la mordedura de serpiente en Centroamérica y Colombia (Giovannini & Howes, 2017; Otero, Fonnegra et al., 2000; Saravia et al., 2001). Es una planta encontrada en Centroamérica, sur de México, el Caribe (Turner, 1982), así como en la región oeste de Colombia (Otero, Fonnegra et al., 2000) y región norte de Brasil (Gracioso et al., 1998). Diversos estudios reportan que extractos y fracciones orgánicas de esta planta tienen propiedades antiulcerosas (Gracioso et al., 2000), antimicrobianas (Lentz et al., 1998), antinociceptivas (Gracioso et al., 1998) y antiinflamatorias (McKinnon et al., 2014; Walshe-Roussel et al., 2013). Estas propiedades podrían explicar su uso tradicional como antiofídico, ya que podrían contrarrestar los efectos locales del envenenamiento. Además, también podría favorecer la posterior cicatrización en el sitio de la mordedura, ya que el estudio realizado por Nayak y colaboradores (2014) reportó que la administración tópica del extracto etanólico de las hojas *N. lobata* promovió la cicatrización cutánea exitosa en un modelo animal, lo cual se atribuyó a la capacidad de los taninos y saponinas de la planta para contrarrestar la hemorragia, detener el crecimiento de bacterias y acelerar el proceso de cicatrización.

Existen pocos estudios que validen la capacidad de *N. lobata* para neutralizar los efectos del envenenamiento por mordedura de las serpientes del género *Bothrops*. En el estudio realizado por Castro y colaboradores (1999) en Costa Rica, el extracto etanólico de *N. lobata* no mostró efecto neutralizante del efecto hemorrágico del veneno de *B. asper* en ratones, mientras que en Colombia el extracto etanólico logró una inhibición parcial (44%) de dicho efecto del veneno de

*B. atrox* (Otero, Núñez et al., 2000). En el estudio realizado por Saravia y colaboradores (2001), se reportó que en el norte de Guatemala se utilizan las hojas de la planta para tratar el envenenamiento. Aunque no existe una receta en común en la preparación, modo de empleo y dosificación, se reportó la administración oral de una infusión preparada con las hojas, así como la aplicación sobre la mordedura de cataplasmas preparados con las hojas usadas para hacer la infusión, o bien, masticadas por el paciente junto con hojas de tabaco (Hay, 2002). Aunque en la evaluación preliminar de sus extractos acuoso y etanólico no se logró la neutralización de los principales efectos del veneno (Saravia et al., 2001), se encontró que potencialmente podría neutralizar el efecto hemorrágico local. Sin embargo, también se encontró que tenían actividades intrínsecas que afectaban la hemostasia.

Dada la importancia clínica de estos hallazgos y considerando los múltiples usos tradicionales de *N. lobata* en la región, en este estudio se dio continuidad a la evaluación de la eficacia del extracto etanólico de sus hojas para inhibir las actividades proteolítica, PLA<sub>2</sub> y procoagulantes del veneno de *B. asper*, para los cuales se preincubaron mezclas que contenían veneno y extracto. Se identificaron los principales metabolitos especializados presentes en la composición química del

extracto y se evaluó su acción sobre las proteínas del veneno mediante electroforesis SDS-PAGE.

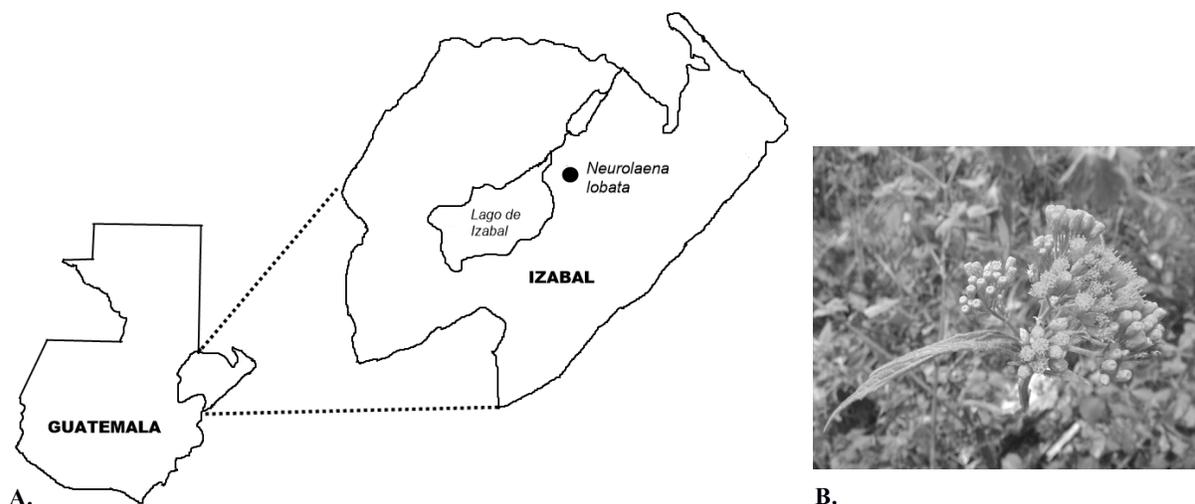
## Materiales y Metodos

### Colecta del material vegetal

La colecta se realizó con base en un muestreo estratificado, preferencial y por conveniencia en el departamento de Izabal, Guatemala (Carretera entre la Ruidosa y Río Dulce, Livingston, Izabal. N 15° 35' 32.7" O 088° 55' 48.9") a 50 m s.n.m., según se muestra en el mapa de colecta elaborado por el Br. Balmore Valladares (Figura 1). Las hojas se colectaron de poblaciones silvestres que crecen espontáneamente en los matorrales y bosques cercanos a las viviendas de las comunidades visitadas. La recolección, embalaje y transporte se realizó conforme a los principios de las buenas prácticas de colecta y el proceso conforme a las técnicas convencionales de secado y molienda. Se depositó una muestra en el Herbario CFEH (*Cemat Farmaya Ethnobotanical Herbarium*) del Laboratorio de Productos Naturales Farmaya y se le asignó el número de registro CFEH 1,389.

Figura 1

Mapa de colecta de *Neurolaena lobata* (L.) Cass



Nota. A. Mapa de la ubicación de colecta de las hojas de *Neurolaena lobata* (L.) Cass. en el departamento de Izabal. B. Individuo de *N. lobata* (Tres puntas) en etapa de floración en el departamento de Izabal (Fotografía tomada por Max Mérida).

## Preparación de extractos vegetales

El extracto etanólico de las hojas se obtuvo por percolación según la metodología descrita previamente (Saravia-Otten et al., 2017). Se pesaron 300 g del material vegetal seco, se agregó etanol al 50% y se percoló durante 24 h con recambios del disolvente. Los menstros extraídos se concentraron en rotavapor y los extractos concentrados se llevaron a sequedad en un desecador con sílica. El extracto seco se pesó y se determinó que el porcentaje de rendimiento fue del 35.8%.

## Veneno de *B. asper*

Se utilizó una mezcla de veneno colectado en el serpentario del Instituto Clodomiro Picado, Universidad de Costa Rica, el cual fue obtenido a partir de no menos de 40 especímenes adultos provenientes de la región del Pacífico de Costa Rica. La mezcla de veneno fue centrifugada, liofilizada y almacenada a -20 °C hasta su uso.

## Diseño experimental de los bioensayos

Para cada una de las actividades estudiadas, antes de enfrentar el veneno con el extracto vegetal se evaluó la presencia de dichas actividades intrínsecas en los extractos de la planta, a las concentraciones contenidas en las proporciones veneno:extracto (p:p) definidas para cada ensayo. Para ello se efectuó un estudio de la relación concentración-actividad como se describió previamente (Saravia-Otten et al., 2017). Para las pruebas de actividad hemolítica indirecta intrínseca de la planta, se evaluaron concentraciones del extracto de 6-96 µg/µl, para la actividad proteolítica intrínseca las concentraciones fueron de 3.9-62.5 µg/µl, para la actividad coagulante y anticoagulante intrínseca se analizaron concentraciones de 0.053-50 µg/µl. La presencia de actividades intrínsecas en el extracto vegetal, invalidarían los resultados de las pruebas de inhibición.

Para los ensayos de inhibición se utilizó el ensayo de preincubación, el cual consiste en incubar controles y mezclas conteniendo la concentración reto (CR) del veneno con concentraciones variables del extracto a 37 °C por 30 min, al cabo de los cuales se estudió la actividad inhibitoria de cada efecto, empleando los mismos métodos utilizados en los estudios de la relación concentración-actividad. La capacidad inhibitoria se expresó en términos porcentuales, en donde el 100%

correspondió a la inhibición total del efecto evaluado y el 0% a un efecto de igual magnitud al inducido por el veneno solo. La potencia del extracto se expresó como la concentración efectiva media (CE<sub>50</sub>), definida como la concentración del extracto capaz de inhibir el 50% del efecto estudiado.

## Actividad PLA<sub>2</sub>

La actividad enzimática PLA<sub>2</sub> se midió por el ensayo de hemólisis indirecta, utilizando el método agarosa-yema de huevo-eritrocitos como se describe en Gutiérrez y colaboradores (1988). La CR consistió en una dosis hemolítica indirecta mínima (HDmI), definida como la cantidad de veneno (0.24 µg/µl) que indujo un halo hemolítico de 20 mm de diámetro, después de 20 h de incubación. Los ensayos de inhibición se realizaron enfrentando la CR de veneno al extracto en mezclas que contenían veneno:extracto (p:p) en proporciones de 1:25 hasta 1:400. Como controles negativos se utilizaron PBS solo para el veneno y DMSO en PBS (5% v/v) para el extracto. Como control positivo se usó la CR de veneno. Mezclas y controles se incubaron por 30 min a 37 °C, posteriormente se colocaron 15 µl de cada una de las muestras en los pozos del gel de agarosa-yema de huevo-eritrocitos, se incubaron a 37 °C por 20 h, después de las cuales se midieron los halos de hemólisis. La actividad hemolítica indirecta se expresó como porcentaje, tomando como 100% el diámetro del halo hemolítico del pozo que contenía el control positivo y 0% el del pozo que contenía el control negativo.

## Actividad proteolítica

La actividad proteolítica sobre azocaseína se evaluó según el método de Wang y colaboradores (2004) con las modificaciones descritas en Saravia-Otten y colaboradores (2017). La cantidad de productos de degradación del sustrato se determinó midiendo la absorbancia del sobrenadante a 450 nm luego de la precipitación de la mezcla con ácido tricloroacético. Como control positivo se utilizó la CR de veneno (1.25 µg/µl), mientras que el control negativo contenía PBS pH 7.2. Para las pruebas de inhibición se prepararon mezclas que contenían CR de veneno:extracto (p:p) en proporciones de 1:3.125 hasta 1:50. La interferencia del color del extracto etanólico contenido en cada mezcla se eliminó con un control interno, el cual contenía la solución tampón de trabajo sin azocaseína y la con-

centración correspondiente del extracto. La actividad proteolítica se calculó restando al valor de absorbancia de cada mezcla analizada, la absorbancia de su control interno, y se expresó en porcentaje, tomando como el 100% la actividad del control positivo, la cual se determinó restando la absorbancia del control negativo (PBS; 0% de actividad) al valor de absorbancia del tubo que contenía la CR de veneno.

### Actividad coagulante y anticoagulante

La actividad coagulante intrínseca se evaluó utilizando plasma humano citratado según el método de Theakston y Reid (1983). Como control negativo (0% de actividad) se utilizó PBS y el control positivo fue una solución de trombina (2.7 UNIH/ml), según instrucciones del fabricante (Wiener Lab.). La actividad anticoagulante intrínseca (antitrombina) se evaluó incubando una concentración fija de trombina con concentraciones variables del extracto. Como control de coagulación se utilizó la solución de trombina incubada con PBS y como control de no coagulación se usó solo PBS. En ambas pruebas se reportaron como anticoagulantes aquellas concentraciones de extracto que no presentaron formación de un coágulo evidente luego de 60 min de incubación una vez que se agregó la mezcla conteniendo trombina. Para los ensayos de inhibición del efecto coagulante del veneno, la CR (0.00215 µg/µl) se enfrentaría al extracto a razón veneno:extracto (p:p) de 1:400 hasta 1:25, utilizando como positivo la CR de veneno (100% de actividad) y PBS como control negativo (0% de actividad).

### Análisis por electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

El análisis SDS-PAGE se realizó en geles de poliacrilamida al 12.5% (Laemmli, 1970). Se prepararon soluciones conteniendo veneno solo como control y mezclas que contenían veneno y extracto etanólico en proporciones desde 1:2.5 hasta 1:20 (veneno:extracto, p:p) y se incubaron a 37 °C por 30 min. Posteriormente se filtraron utilizando una membrana de 0.22 µm (DynaGard, Microgon), se hirvieron por 10 min y se cargaron 10 µl de cada mezcla en el gel, conteniendo 30 µg de veneno. La electroforesis se corrió en condiciones reductoras a 150 V por 1 h. Las proteínas se tiñeron con azul brillante de Coomassie. El patrón electroforético del veneno se comparó frente al patrón de las mezclas veneno:extracto, utilizando como marcador

de peso molecular el *BenchMark Pre-Stained protein Ladder* (Life Technologies).

### Análisis fitoquímico del extracto vegetal

Se determinó la presencia de taninos mediante la técnica macrométrica de tubos descrita por Kuklinski (2000). La presencia de flavonoides, antocianinas, catequinas, alcaloides, aceites esenciales, cumarinas, sesquiterpenlactonas y saponinas se determinaron por cromatografía en capa fina según lo descrito en Lock (1994), Ministerio de Sanidad y Consumo y colaboradores (2002), Wagner y Bladt (1996, 2001). Los estándares fueron quercetina, rutina, ácido clorogénico e hiperósido para flavonoides; rojo de Sudán para antocianinas; estándar de catequinas; atropina, papaverina y piperina para alcaloides; limoneno, eugenol, timol, mentol, anetol y eucaliptol para aceites esenciales; umbeliferona, ácido *p*-cumárico, cumarina y extracto de canela para cumarinas; saponina al 0.1% para saponinas y artemisinina al 0.1% para sesquiterpenlactonas.

### Diseño y análisis estadístico

Para la determinación de actividades del extracto vegetal se realizó un diseño de bloques completos no aleatorizados. Los tratamientos correspondieron a las concentraciones de extracto evaluadas en las pruebas de actividad intrínseca y a las relaciones veneno: extracto en las pruebas de inhibición. Los ensayos se realizaron en tres días diferentes (bloques), con cinco réplicas por ensayo por conveniencia, para un total de 15 lecturas. Los resultados de las actividades proteolítica y PLA<sub>2</sub> intrínsecas se evaluaron por un análisis de varianza de dos vías de cada tratamiento frente al control negativo, con un nivel de significancia de .05. Para todos los análisis de varianza se calculó además el tamaño del efecto por medio del índice eta parcial al cuadrado ( $\eta_p^2$ ). Cuando el análisis de varianza demostró que existían diferencias significativas, se realizó la prueba de comparaciones de Dunnett de cada tratamiento frente al control negativo. Los resultados de la actividad coagulante intrínseca se evaluaron por la prueba de hipótesis binomial y los de la actividad anticoagulante intrínseca por un análisis de regresión lineal, ambos con un nivel de significancia de .05. El análisis de las pruebas de inhibición de los efectos proteolíticos y PLA<sub>2</sub> del veneno se realizó mediante un análisis de regresión de la curva concentración-actividad para determinar el mejor modelo de ajuste,

con un nivel de significancia de .05. Con base en este modelo, se calculó para cada extracto la  $CE_{50}$  con un intervalo de confianza del 95%. Para determinar los cambios producidos en el perfil electroforético del veneno en presencia del extracto vegetal, se realizó un análisis descriptivo de las bandas proteicas de las mezclas veneno:extracto en comparación con las del veneno solo. El análisis fitoquímico fue descriptivo, reportándose la presencia o ausencia de los metabolitos especializados evidenciados.

## Resultados

### Actividad $PLA_2$

Se determinó que el extracto no posee actividad  $PLA_2$  intrínseca a las concentraciones evaluadas (6-96  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) mediante el ensayo de hemólisis indirecta (datos no mostrados). El análisis de la capacidad inhibitoria del efecto  $PLA_2$  del veneno se realizó preparando mezclas con razones CR:extracto de 1:25 a 1:400 (p:p). Los resultados mostraron que el extracto tenía un efecto inhibitorio de la actividad del veneno a todas las concentraciones evaluadas ( $p < .001$ ), con un valor de  $\eta_p^2$  de 1.00. El extracto logró contrarrestar el 100% de la actividad del control de veneno cuando éste se enfrentó a la proporción más alta (1:400, que corresponde a 96  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ), demostrando actividades inhibitorias  $\geq 50\%$  cuando se utilizó en proporciones 1:200 y 1:100 (p:p) (Tabla 1). Como se muestra en la misma tabla, se requirieron 32.5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  IC 95% [28.7, 36.8] del extracto para alcanzar la  $CE_{50}$ .

### Actividad proteolítica

La evaluación del extracto etanólico demostró que no posee actividad proteolítica intrínseca a las concentraciones utilizadas (3.9-62.5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) (datos no mostrados). Se encontró actividad inhibitoria significativa ( $p < .001$ ) del efecto proteolítico del veneno en el extracto etanólico cuando se evaluó en las relaciones CR:veneno de 1:3.125-1:25 (p:p), ya que la relación 1:50 (que contenía 62.5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  del extracto) no pudo ser analizada debido a que superó los límites de precisión de la lectura espectrofotométrica. La relación 1:25 (p:p) logró la inhibición del 100% del efecto proteolítico del veneno, mientras que la relación 1:12.5 inhibió aproximadamente el 50% (Tabla 1). El análisis de varianza mostró que el valor de  $\eta_p^2$  de la prueba fue de .99. La potencia del extracto se muestra en la misma tabla,

ya que se determinó que se requieren 15.7  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  IC 95% [14.8, 16.5] del extracto para inhibir el 50% de la actividad proteolítica del veneno.

### Actividad coagulante y anticoagulante

Ninguna de las concentraciones evaluadas del extracto vegetal (0.053-50  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) demostró poseer actividad coagulante intrínseca a las concentraciones del estudio (datos no mostrados). Sin embargo, la evaluación de la actividad anticoagulante intrínseca (antitrombina), mostró que inducía la prolongación del tiempo de coagulación de forma dependiente de la concentración (Figura 2), por lo cual, aunque el plasma coaguló antes de los 60 min, las pruebas de inhibición del efecto coagulante del veneno no se realizaron, ya que los resultados serían difíciles de interpretar debido a esta actividad antitrombina intrínseca del extracto.

### Análisis por electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

El análisis por electroforesis SDS-PAGE de veneno y mezclas mostró que el extracto de *N. lobata* induce un cambio en el patrón de bandas de proteínas del veneno, principalmente en la mezcla que contenía veneno:extracto en relación 1:20 (Figura 3). Se observó la desaparición de las bandas de masas moleculares aproximadas de 39, 45 y 55 kDa. Además, se observó una disminución en la intensidad de las bandas de proteína con masa molecular aparente de 50 y 28 kDa. La banda de menor masa molecular (14 kDa aproximadamente) mostró una disminución en su intensidad en todas las muestras que contenían veneno y extracto, de manera concentración-dependiente. Así mismo, en las relaciones veneno:extracto más altas (1:10 y 1:20, p:p) se detectó la aparición de una banda de alto peso molecular ( $> 180$  kDa) que no se observó en el control de veneno. No se detectaron bandas de proteínas en el extracto vegetal en las electroforesis realizadas.

### Análisis fitoquímico

La determinación macro y semimicrométrica de metabolitos especializados del extracto etanólico demostró la presencia de flavonoides, cumarinas, saponinas, taninos, sesquiterpenlactonas y aceites esenciales en su composición química. No se detectó la presencia de antocianinas, catequinas y alcaloides (Tabla 2).

Tabla 1

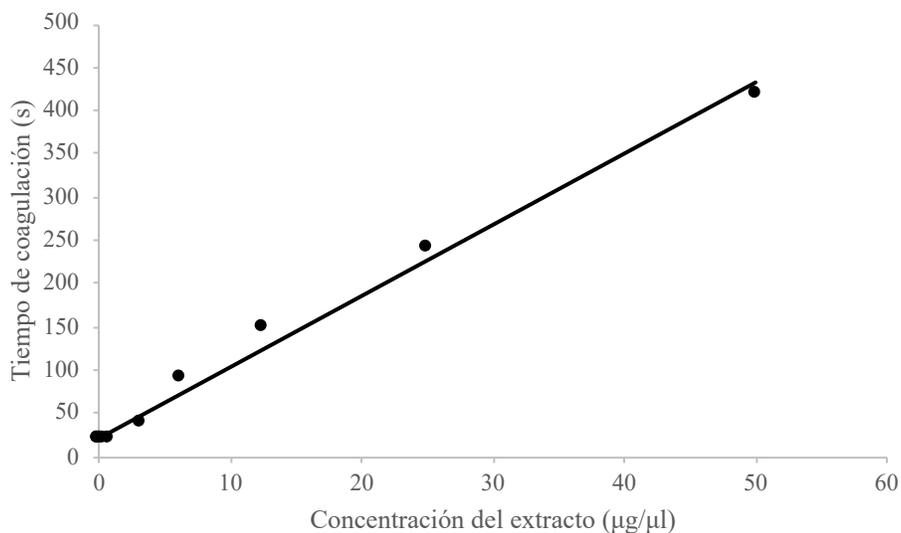
*Inhibición de actividades enzimáticas del veneno de B. asper por el extracto etanólico de N. lobata*

Actividad PLA <sub>2</sub>			Actividad proteolítica		
Razón veneno: extracto (p:p)	Inhibición % <sup>a</sup>	CE <sub>50</sub> [IC 95 %] <sup>b</sup>	Razón veneno: extracto (p:p)	Inhibición % (DE) [IC 95 %] <sup>c</sup>	CE <sub>50</sub> [IC 95 %] <sup>b</sup>
1:400	100	32.5 [28.7, 36.8]	1:50	ND <sup>d</sup>	15.7 [14.8, 16.5]
1:200	70		1:25	100 (5.3)	
1:100	50		1:12.5	49.3 (2.3) [48.1, 50.5]	
1:50	30		1:6.25	25.3 (2.1) [24.2, 26.3]	
1:25	20		1:3.125	10.3(2.8) [8.9, 11.7]	

*Nota.* <sup>a</sup>Se presenta solamente el promedio del porcentaje de inhibición de tres ensayos independientes realizados en quintuplicado (n = 15) ya que la desviación estándar es cero. <sup>b</sup>Concentración efectiva media expresada en µg de extracto/µl e intervalo de confianza del 95%. <sup>c</sup>Se presentan el promedio del porcentaje de inhibición (desviación estándar) de tres ensayos independientes realizados en quintuplicado (n = 15) y el intervalo de confianza del 95%. <sup>d</sup>No determinada por sobrepasar el límite de detección del espectrofotómetro.

Figura 2

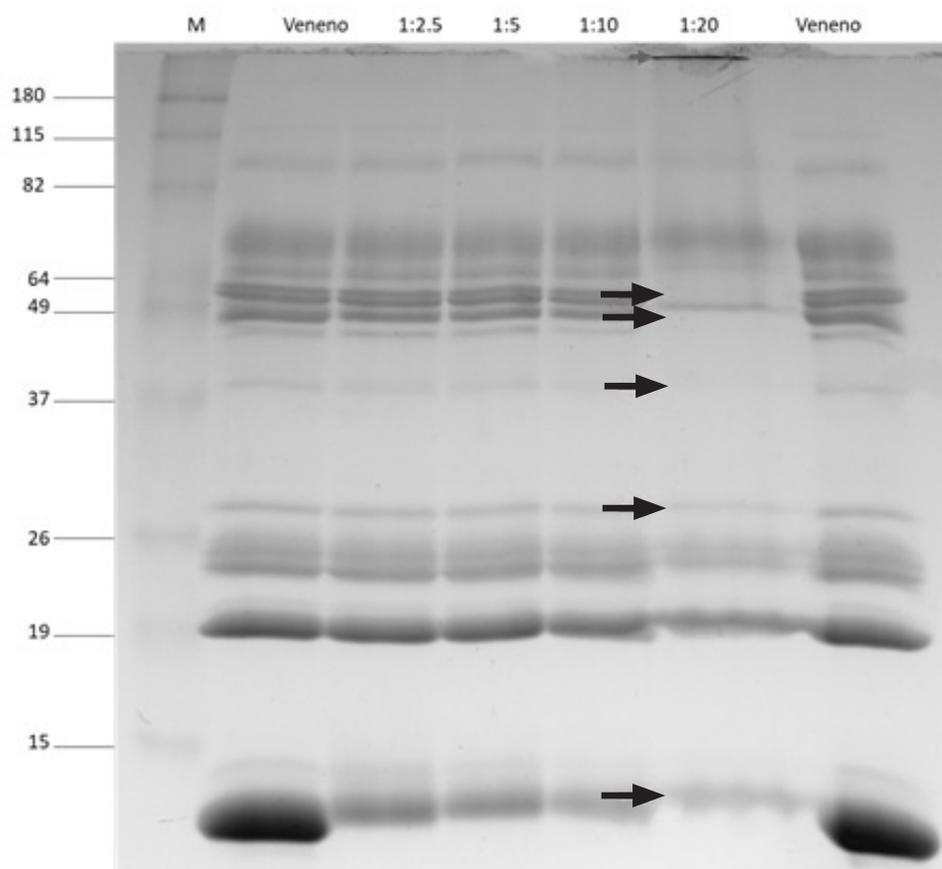
*Actividad anticoagulante (antitrombina) intrínseca del extracto etanólico de N. lobata*



*Nota.* La gráfica describe la actividad antitrombina intrínseca, dependiente de la dosis, del extracto etanólico de *N. lobata*. El comportamiento observado demuestra una relación lineal ( $r^2$  0.991), entre la dosis de planta evaluada y el tiempo de coagulación del plasma (s); relación que es estadísticamente significativa ( $p < .001$ ), considerando las concentraciones de extracto evaluadas (0.053 – 50 µg/µl).

Figura 3

Electroforesis SDS-PAGE del veneno de *B. asper* crudo y preincubado con el extracto etanólico de *N. lobata* en diferentes proporciones



*Nota.* Cambios en el patrón electroforético en SDS-PAGE (condiciones reductoras) del veneno de *B. asper* luego de la incubación con el extracto etanólico de *N. lobata*. El veneno se preincubó con el extracto en mezclas en proporciones veneno:extracto desde 1:2.5 hasta 1: 20 (p:p). Se cargaron 10  $\mu$ l de cada mezcla en un gel de poliacrilamida al 12.5%, como control se cargó veneno solo. (M) Marcador de peso molecular. Las flechas señalan las bandas de proteína en donde se observan los principales cambios en comparación con el control de veneno.

Tabla 2

Tamizaje fitoquímico del extracto etanólico de *N. lobata*

Metabolitos secundarios presentes	Metabolitos especializados no identificados <sup>a</sup>
Flavonoides, cumarinas, saponinas, taninos, sesquiterpenlactonas, aceites esenciales.	Antocianinas, catequinas y alcaloides.

*Nota.* <sup>a</sup>Metabolitos especializados que no se detectaron en el extracto empleando las metodologías descritas en el estudio.

## Discusión

El uso etnomédico de las hojas, tallo, ramas y partes aéreas de *N. lobata* para el tratamiento del envenenamiento producido por la mordedura de serpiente ha sido reportada previamente (Giovannini & Howes, 2017). En el norte de Guatemala se utilizan las hojas de la planta para la preparación de los antidotos (Hay, 2002), las cuales también se utilizan en la medicina tradicional en Belice para tratar afecciones inflamatorias (Walshe-Roussel et al., 2013) y en Trinidad Tobago como cicatrizantes (Nayak et al., 2014). Con el fin de evaluar la capacidad del extracto etanólico de las hojas para inhibir los efectos PLA<sub>2</sub>, proteolítico y coagulante del veneno, en este estudio se modificaron las condiciones de extracción de los principios activos de la planta utilizados en un estudio preliminar (Saravia et al., 2001), ya que se ha demostrado que la actividad biológica resulta afectada por el método empleado para preparar los extractos vegetales (Santos et al., 2014).

Los resultados de este estudio demostraron que el extracto etanólico de las hojas de *N. lobata* inhiben completamente las actividades proteolítica y PLA<sub>2</sub> (evaluada como hemólisis indirecta) del veneno de *B. asper* en los ensayos de preincubación in vitro. Este hallazgo es importante, ya que estas actividades enzimáticas son producidas por las principales toxinas del veneno, SVMPs y PLA<sub>2</sub>s (Asp 49), respectivamente (Angulo & Lomonte, 2009). La acción combinada de SVMPs y PLA<sub>2</sub>s miotóxicas induce, en gran parte, el complejo cuadro clínico del envenenamiento por mordedura de *B. asper*, que se caracteriza por la rápida manifestación de patologías locales severas irreversibles (Gutiérrez, Rucavado et al., 2009). Así mismo, en los envenenamientos moderados y severos se induce la aparición de efectos sistémicos, producidos principalmente por la acción de las SVMPs tipo P-III, en combinación con la acción de serina proteinasas (SVSPs) y proteínas parecidas a las lectinas tipo C del veneno (Gutiérrez, Escalante et al., 2009).

Aunque la inhibición in vitro de la actividad proteolítica del veneno sobre azocaseína no es necesariamente indicativa de la capacidad de un extracto para neutralizar la hemorragia local en ratones (Gutiérrez et al., 2017), se han reportado estudios en donde los extractos de plantas que lograron la inhibición de la proteólisis in vitro también neutralizaron el efecto hemorrágico en animales (Patiño et al., 2013; Preciado et al., 2018), lo cual coincide con la observación de que la hidrólisis de azocaseína la efectúan sobre todo las

SVMPs. Estudios previos realizados en Costa Rica y Colombia (Castro et al., 1999; Otero, Núñez et al., 2000) reportaron que los especímenes de *N. lobata* colectados en dichos países no neutralizaron el efecto hemorrágico en ratones, sin embargo, debe tomarse en cuenta que generalmente las sustancias activas de las plantas se encuentran en muy pequeñas cantidades que pueden verse afectadas por múltiples factores, como la temporalidad de la colecta, clima, composición de la tierra o la parte de la planta a partir de la cual se hace la extracción (Mors et al., 2000). Por lo tanto, dado que el extracto etanólico de *N. lobata* colectada en Guatemala inhibió el 100% de la actividad proteolítica del veneno (CE<sub>50</sub> de 15.7 µg/µl), su capacidad antihemorrágica deberá reevaluarse in vivo con el fin de validar su uso para contrarrestar este importante efecto local del veneno.

Por otro lado, la inhibición in vitro de los efectos PLA<sub>2</sub> y procoagulantes del veneno de *B. asper* han demostrado tener una buena correlación con la neutralización de la letalidad en ratones, que es la prueba utilizada como estándar de oro en la evaluación preclínica de la eficacia de los antivenenos (Gutiérrez et al., 2017). En este estudio el extracto etanólico de *N. lobata* inhibió el 100% la actividad hemolítica indirecta del veneno (indicativa de su actividad PLA<sub>2</sub>) con una CE<sub>50</sub> de 32.5 µg/µl, lo cual es indicativo de que podría neutralizar parte de los efectos locales del veneno, ya que se ha demostrado que los extractos crudos o fracciones orgánicas de varias plantas con actividad anti-PLA<sub>2</sub> también neutralizan parcialmente la miotoxicidad y efecto edematizante del veneno de serpientes de los géneros *Bothrops* y *Crotalus* en modelos animales (Pereañez et al., 2014; Posadas et al., 2019).

La actividad inhibitoria demostrada por el extracto puede ser explicada por la presencia de flavonoides, taninos, saponinas y cumarinas en la composición química de la planta, ya que la inhibición de las SVMPs y PLA<sub>2</sub>s de las serpientes *Bothrops* por estos metabolitos ha sido ampliamente reportada (Carvalho et al., 2013; Santosh et al., 2013). Estos metabolitos especializados también han sido detectados en extractos que neutralizan el efecto hemorrágico del veneno (Castro et al., 1999; da Silva et al., 2007; Mourão de Moura et al., 2014).

La interacción de los polifenoles con proteínas que poseen iones metálicos como Zn<sup>2+</sup> y Ca<sup>2+</sup> produce la formación de complejos insolubles que precipitan (Patiño et al., 2012). Según esta noción, la actividad inhibitoria de las SVMPs se ha asociado principalmen-

te a la presencia de flavonoides, por su capacidad para quelar  $Zn^{+2}$ , esencial para que las metaloproteinasas ejerzan su acción enzimática (Parellada et al., 1998; Preciado et al., 2018). Otro mecanismo propuesto es la formación de puentes de hidrógeno cercanos al sitio activo, dando como resultado la inhibición de la actividad enzimática por bloqueo del sitio activo e interacción con el ión  $Zn^{+2}$  (Pithayanukul et al., 2009). De igual forma, las PLA<sub>2</sub>s son enzimas cuya actividad depende del  $Ca^{+2}$ , por lo tanto, los compuestos fenólicos presentes en el extracto también podrían ser responsables de remover este ion (Lättig et al., 2007). En Colombia, el compuesto biflavonoide moreloflavona inhibió la actividad de una PLA<sub>2</sub> aislada de *Crotalus durissus cumanensis*, el mecanismo de inhibición propuesto sugiere que se produce un bloqueo de interacción enzima-sustrato mediante la formación de puentes de hidrógeno con la enzima en el sitio de unión del sustrato. Adicionalmente, se sugirió que podría producirse el desplazamiento del  $Ca^{+2}$  requerido para la catálisis (Pereañez et al., 2014). Se ha sugerido también que los compuestos químicos de los extractos vegetales son capaces de inhibir los efectos tóxicos de los venenos de serpiente por proteólisis directa efectuada por proteinasas del extracto (Mourão de Moura et al., 2014). Para determinar si el mecanismo de inhibición de las enzimas del veneno detectadas se debía a la formación de este tipo de complejos mediados por los metabolitos especializados del extracto, o bien, a la degradación proteolítica del veneno, se realizó el análisis electroforético por SDS-PAGE. Los resultados mostraron que algunas bandas del veneno desaparecieron, así como que la intensidad de otras disminuyó considerablemente en la mezcla que contenía la proporción más alta del extracto (1:20, p:p), sin embargo, se determinó que esto no se debió a proteólisis, ya que no se detectó la aparición de bandas de menor peso molecular que pudieran sugerir degradación proteolítica. La aparición de una banda de muy alto peso molecular en el borde del gel electroforético en las mezclas veneno:extracto se hizo evidente conforme aumentó la cantidad de extracto. Estos hallazgos apuntaron a que los cambios observados en el patrón electroforético del veneno se deben a la formación de complejos de alto peso molecular con los metabolitos del extracto, posiblemente flavonoides y taninos, según lo descrito en estudios similares (Mourão de Moura et al., 2014; Patiño et al., 2012). La disminución de las actividades enzimáticas del veneno correlaciona con la reducción de bandas cuya masa molecular corresponden a las de algunas SVMPS (45-

64 kDa), PLA<sub>2</sub>s (14 kDa) y serina proteinasas (39 kDa) del veneno (Angulo & Lomonte, 2009).

Varios estudios han reportado que las propiedades antiinflamatorias de *N. lobata* se relacionan con la presencia de sesquiterpenlactonas en su composición. Los mecanismos de acción propuestos hasta ahora señalan que las sesquiterpenlactonas actúan modulando la expresión de moléculas proinflamatorias. Experimentos realizados por Lajter y colaboradores (2014) con sesquiterpenlactonas extraídas de las partes aéreas de *N. lobata* colectadas en Guatemala disminuyeron la producción de IL-8 en células endoteliales. El extracto etanólico y sesquiterpenlactonas aisladas de la planta colectada en Belice demostraron ser poderosos agentes antiinflamatorios mediante la inhibición de TNF- $\alpha$  (Walshe-Roussel et al., 2013), sustentando su uso tradicional para tratar condiciones inflamatorias por los curanderos maya-q'eqchies de Belice, Centroamérica y el Caribe. McKinnon y colaboradores (2014) demostraron que el extracto metanólico y las sesquiterpenlactonas aisladas de *N. lobata* del norte de Guatemala inhibieron la producción de moléculas proinflamatorias (IL-8 y selectina E) in vitro y redujeron el edema en un modelo animal, lo cual confirmó su potencial terapéutico para contrarrestar la inflamación. En el contexto del envenenamiento ofídico, sus propiedades antiinflamatorias in vivo sugieren que las sesquiterpenlactonas presentes en *N. lobata* del norte de Guatemala y Belice pueden tener también una acción directa sobre las PLA<sub>2</sub>s del veneno, lo cual deberá ser evaluado en estudios posteriores.

Previamente se detectó actividad anticoagulante intrínseca en el extracto acuoso de las hojas de *N. lobata* (Saravia et al., 2001) pero no en el etanólico. Sin embargo, al modificarse las condiciones de extracción de los compuestos activos en este estudio, el extracto etanólico también demostró prolongar el tiempo de coagulación de manera concentración-dependiente. Esta actividad de la planta podría explicarse por la presencia de los metabolitos especializados detectados en el extracto etanólico, ya que se sabe que los flavonoides inhiben la actividad enzimática de serina proteinasas, como trombina, plasmina y tripsina (Jedinák et al., 2006), posiblemente por interacción directa con el sitio activo de las enzimas (Cuccioloni et al., 2009). Además, se ha reportado que la presencia de flavonoides, taninos, terpenoides y cumarinas en extractos vegetales produce la inhibición de serina proteinasas (Patiño et al., 2013), por lo que se puede pensar que esos metabolitos de *N. lobata* son responsables de la actividad antitrombina del extracto etanólico.

En conclusión, estas observaciones demuestran que el extracto etanólico de las hojas de *N. lobata* inhibe las actividades proteolítica y PLA<sub>2</sub> del veneno de *B. asper*. Dado que estas actividades se asocian a importantes acciones tóxicas de este veneno, los resultados del estudio plantean la posibilidad de que este extracto sea capaz de inhibir la toxicidad del veneno, lo cual se debe abordar en estudios posteriores. Sin embargo, debe profundizarse en el estudio de sus propiedades anti-trombina, ya que podría afectar las alteraciones en la coagulación, coadyuvando en la desfibrinogénación inducida por el veneno. Así mismo, se requiere identificar a las moléculas responsables de interactuar con las SVMs, PLA<sub>2</sub>s y SVSPs para comprender mejor los mecanismos de inhibición y la posible aplicación de estos metabolitos o sus derivados.

### Agradecimientos

Agradecemos la valiosa colaboración de Bruno Lomonte y Ricardo Figueroa. La investigación fue realizada con fondos aportados por la Dirección General de Investigaciones (Digi) dentro del Programa Universitario de Investigación Interdisciplinaria en Salud (partida presupuestal 4.8.63.1.05, año 2018).

### References

- Angulo, Y., & Lomonte, B. (2009). Biochemistry and toxicology of toxins purified from the venom of the snake *Bothrops asper*. *Toxicon*, 54(7), 949-957. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2008.12.014>
- Carvalho, B. M. A., Santos, J. D. L., Xavier, B. M., Almeida, J. R., Resende, L. M., Martins, W., Marcussi, S., Marangoni, S., Stábeli, R. G., Calderon, L. A., Soares, A. M., Da Silva, S. L., & Marchi-Salvador, D. P. (2013). Snake venom PLA<sub>2</sub>s inhibitors isolated from Brazilian plants: Synthetic and natural molecules. *BioMed Research International*, Article e153045. <https://doi.org/10.1155/2013/153045>
- Castro, O., Gutiérrez, J. M., Barrios, M., Castro, I., Romero M., & Umaña, E. (1999). Neutralización del efecto hemorrágico inducido por veneno de *Bothrops asper* (Serpentes: Viperidae) por extractos de plantas tropicales. *Revista de Biología Tropical*, 47(3), 605-616.
- Chippaux, J. P. (2017). Incidence and mortality due to snakebite in the Americas. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 11(6), Article e0005662. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005662>.
- Coe, F. G., & Anderson, G. J. (2005). Snakebite ethnopharmacopoeia of eastern Nicaragua. *Journal of Ethnopharmacology*, 96(1-2), 303-323. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2004.09.026>
- Cuccioloni, M., Mozzicafreddo, M., Bonfili, L., Cecarini, V., Eleuteri, A. M., & Angeletti, M. (2009). Natural occurring polyphenols as template for drug design. Focus on serine proteases. *Chemical Biology & Drug Design*, 74(1), 1-15. <https://doi.org/10.1111/j.1747-0285.2009.00836.x>
- da Silva, J. O., Fernandes, R., S., Ticali, F. K., Oliveira, C. Z., Mazzi, M. V., Franco, J. J. Juliatti, S., Pereira, P. S., Soares, A. M., & Sampaio, S. V. (2007). Triterpenoid saponins, new metalloprotease snake venom inhibitors isolated from *Pentaclethra macroloba*. *Toxicon*, 50(2), 283-291. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2007.03.024>
- Felix-Silva, J., Silva-Junior, A. A., Zucolotto, S. M., & Fernandes-Pedrosa M. (2017). Medicinal plants for the treatment of local tissue damage induced by snake venoms: An overview from traditional use to pharmacological evidence. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, Article e2748256. <https://doi.org/10.1155/2017/5748256>
- Giovannini, P., & Howes M. R. (2017). Medicinal plants used to treat snakebite in Central America: Review and assessment of scientific evidence. *Journal of Ethnopharmacology*, 199, 240-256. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.02.011>
- Gracioso, J. S., Hiruma, C. A., & Souza Brito. (2000). Antiulcerogenic effect of a hydroalcoholic extract and its organic fractions of *Neurolaena lobata* (L.) R. Br. *Phytomedicine*, 74(4), 283-289. [https://doi.org/10.1016/S0944-7113\(00\)80045-8](https://doi.org/10.1016/S0944-7113(00)80045-8)
- Gracioso, J. S., Paulo, M. Q., Hiruma, Lima C. A., & Souza Brito, A. (1998). Antinociceptive effect in mice of a hydroalcoholic extract of *Neurolaena lobata* (L.) R. Br. and its organic fractions. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 50(12), 1425-1429. <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.1998.tb03370.x>

- Gutiérrez, J. M. (2014). Current challenges for confronting the public health problem of snakebite envenoming in Central America. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 20(7). <https://doi.org/10.1186/1678-9199-20-7>
- Gutiérrez, J. M., Ávila, C., Rojas, E., & Cerdas, L. (1988). An alternative *in vitro* method for testing the potency of the polyvalent antivenom produced in Costa Rica. *Toxicon*, 26(4), 411-413. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(88\)90010-4](https://doi.org/10.1016/0041-0101(88)90010-4)
- Gutiérrez, J. M., Escalante, T., & Rucavado, A. (2009). Experimental pathophysiology of systemic alterations induced by *Bothrops asper* snake venom. *Toxicon*, 54(7), 976-987. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.01.039>
- Gutiérrez, J. M., Rucavado, A., Chaves, F., Díaz, C., & Escalante, T. (2009). Experimental pathology of local tissue damage induced by *Bothrops asper* snake venom. *Toxicon*, 54(7), 958-975. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.01.038>
- Gutiérrez, J. M., Solano, G., Pla, D., Herrera, M., Segura, A., Vargas, M., Villalta, M., Sánchez A., Sanz, L., Lomonte, B., León, G., & Calvete, J. J. (2017). Preclinical evaluation of the efficacy of antivenoms for snakebite envenomings: State-of-the-art and challenges ahead. *Toxins*, 9(5). <https://doi.org/10.3390/toxins9050163>
- Hay, Y. O. (2002). Estudio etnofarmacológico de plantas utilizadas en la medicina tradicional para el tratamiento de leishmaniasis cutánea, del paludismo y de la mordedura de serpientes, en tres departamentos de Guatemala. Universidad de San Carlos de Guatemala, Service de Coopération au Développement, Institut de Recherche pour le Développement.
- Jedinák, A., Maliar, T., Grancai, D., & Nagy, M. (2006). Inhibition activities of natural products on serine proteases. *Phytotherapy Research*, 20(3), 214-217. <https://doi.org/10.1002/ptr.1836>
- Kuklinski, C. (2000). *Farmacognosia. Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural*. Omega.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
- Lajter, I., Vasas, A., Béni, Z., Forgo, P., Binder, M., Bochkov, V., Zupkó, I., Krupitza, G., Frisch, R., Kopp, B., & Hohmann, J. (2014). Sesquiterpenes from *Neurolaena lobata* and their antiproliferative and anti-inflammatory activities. *Journal of Natural Products*, 77(3), 576-582. <https://doi.org/10.1021/np400834c>
- Lättig, J., Böhl, M., Fischer, P., Tischer, S., Tietböhl, C., Menschikowski, M., Gutzeit, O., Metz, P., & Pisabarro, M. T. (2007). Mechanisms of inhibition of human secretory phospholipase A<sub>2</sub> by flavonoids: Rationale for lead design. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 21(8), 473-483. <https://doi.org/10.1007/s10822-007-9129-8>
- Lentz, D., Clark, A. M., Hufford, C. D., Meurer-Grimes, B., Passteiter, C. M., Cordero, J., Ibrahimi, O., & Okunade, A. L. (1998). Antimicrobial properties of Honduran medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 63(3), 253-263. [https://doi.org/10.1016/s0378-8741\(98\)00100-7](https://doi.org/10.1016/s0378-8741(98)00100-7)
- Lock, O. (1994). *Investigación Fitoquímica* (2.<sup>a</sup> ed.). Fondo Editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú.
- McKinnon, R., Binder, M., Zupkó, I., Afonyushkin, T., Lajter, I., Vasas, A., de Martin, R., Unger, C., Dolzing, H., Diaz, R., Frisch, R., Passreiter, C. M., Krupitza, G., Hohmann, J., Kopp, B., & Bochkov, V. N. (2014). Pharmacological insight into the anti-inflammatory activity of sesquiterpene lactones from *Neurolaena lobata* (L.) R. Br. ex Cass. *Phytomedicine*, 21(12), 1695-1701. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2014.07.019>
- Ministerio de Sanidad y Consumo, Agencia Española del Medicamento, & Boletín Oficial del Estado (España). (2002). *Real Farmacopea Española: Publicada por el Ministerio de Sanidad y Consumo, por mandato de la ley 25/1990, de 20 de diciembre, del Medicamento* (2.<sup>a</sup> ed.).
- Mors, W. B., do Nascimento, M. C., Ruppelt Pereira, B. M., & Alvares Pereira, N. (2000). Plant natural products active against snake bite – the molecular approach. *Phytochemistry*, 55(6), 627-642. [https://doi.org/10.1016/s0031-9422\(00\)00229-6](https://doi.org/10.1016/s0031-9422(00)00229-6)

- Mourão de Moura, V., Serra Bezerra, A. N., Veras Mourao, R. H., Varjao Lameiras, J. L., Almeida Raposo, J. D., Luckwu de Sousa, R., Boechat, A. L., Bezerra de Oliveira, R., de Menezes Chalkidis, H., & Dos-Santos, M. C. (2014). A comparison of the ability of *Bellucia dichotoma* Cogn. (Melastomataceae) extract to inhibit the local effects of *Bothrops atrox* venom when pre-incubated and when used according to traditional methods. *Toxicon*, 85, 59-68. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2014.04.009>.
- Nayak, B. S., Ramlogan, S., Rao, A. V., & Maharaj, S. (2014). *Neurolaena lobata* L. promotes wound healing in Sprague Dawley rats. *International Journal of Applied and Basic Medical Research*, 4(2), 106-110. <https://doi.org/10.4103/2229-516X.136791>.
- Otero, R., Fonnegra, R., Jiménez, S. L., Núñez, V., Evans, N., Alzate, S. P., García, M. E., Saldarriaga, M., Del Valle, G., Osorio, R. G., Díaz, A., Valderrama, R., Duque, A., & Vélez, H. N. (2000). Snakebites and ethnobotany in the northwest region of Colombia Part I: Traditional use of plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 71(3), 493-504. [https://doi.org/10.1016/s0378-8741\(00\)00243-9](https://doi.org/10.1016/s0378-8741(00)00243-9)
- Otero, R., Núñez, V., Barona, J., Fonnegra, R., Jiménez, S. L., Osorio, R. G., Saldarriaga, M., & Díaz, A. (2000). Snakebites and ethnobotany in the northwest region of Colombia. Part III: Neutralization of the haemorrhagic effect of *Bothrops atrox* venom. *Journal of Ethnopharmacology*, 73(1-2), 233-241. [https://doi.org/10.1016/s0378-8741\(00\)00321-4](https://doi.org/10.1016/s0378-8741(00)00321-4)
- Parellada, J., Suárez, G., & Guinea, M. (1998). Inhibition of zinc metallopeptidases by flavonoids and related phenolic compounds: Structure-activity relationships. *Journal of Enzyme Inhibition*, 13(5), 347-359. <https://doi.org/10.3109/14756369809021480>
- Patiño, A. C., Benjumea, D. M., & Pereañez, J. A. (2013). Inhibition of venom serine proteinase and metalloproteinase activities by *Renalmia alpinia* (Zingiberaceae) extracts: Comparison of wild and in vitro propagated plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 149(2), 590-596. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2013.07.033>
- Patiño, A. C., López, J., Aristizábal, M., Quintana, J. C., & Benjumea, D. (2012). Efecto inhibitorio de extractos de *Renalmia alpina* Rottb. Maas (Zingiberaceae) sobre el veneno de *Bothrops asper* (mapaná). *Biomédica*, 32(3), 365-374. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v32i3.591>
- Pereañez, J. A., Patiño, A. C., Núñez, V., & Osorio, E. (2014). The biflavonoid morelloflavone inhibits the enzymatic and biological activities of a snake venom phospholipase A<sub>2</sub>. *Chemico-Biological Interactions*, 220, 94-101. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2014.06.015>.
- Pithayanukul, P., Leanpolchareanchai, J., & Saparpakorn, P. (2009). Molecular docking studies and anti-snake venom metalloproteinase activity of Thai mango seed kernel extract. *Molecules*, 14(9), 3198-3213. <https://doi.org/10.3390/molecules14093198>.
- Posadas, S., Rodríguez, B., Lobo-Echeverri, T., Ramos, R. S., Hyslop, S., & Núñez, V. (2019). Effects of two fractions of *Swietenia macrophylla* and catechin on muscle damage induced by *Bothrops* venom and PLA<sub>2</sub>. *Toxins*, 11(1), 40. <https://doi.org/10.3390/toxins11010040>.
- Preciado, L., M., Comer, J., Núñez, V., Rey-Suárez, P., & Pereañez, J. A. (2018). Inhibition of a snake venom metalloproteinase by the flavonoid myricetin. *Molecules*, 23(10), 2662. <https://doi.org/10.3390/molecules23102662>.
- Santhosh, M. S., Hemshekhar, M., Sunitha, K., Thushara, R. M., Jnaneshwari, S., Kemparaju, K., & Girish, K. S. (2013). Snake venom induced local toxicities: plant secondary metabolites as an auxiliary therapy. *Mini Reviews in Medical Chemistry*, 13(1), 106-123.
- Santos, C. B., Bernardino, G. Z., Soares, F. J., Espindola, J. D., Arruda, P. M. R. Paula, JU. R., Conceicao, E. C., & Barra, M. T. F. (2014). Preparo e caracterização de tinturas das folhas de chá verde [*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze] Theaceae. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 16(4), 826-831. [https://doi.org/10.1590/1983-084X/10\\_063](https://doi.org/10.1590/1983-084X/10_063)

- Saravia, P., Cáceres, A., Velásquez, R., & Lara, O. (2001) Plantas con actividad antiofídica en Guatemala. I. Identificación y evaluación de su capacidad neutralizante (Proyecto FODECYT 47-99). Guatemala: Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.
- Saravia-Otten, P., Hernández, R., Marroquín, N., García, G., Mérida, M., Cruz, S., Orozco, N., Cáceres, A., & Gutiérrez, J. M. (2017). Inhibición de los efectos coagulante, fosfolipasa A<sub>2</sub> y proteolítico del veneno de *Bothrops asper* por plantas usadas tradicionalmente en Centroamérica. *Ciencia, Tecnología y Salud*, 4(2), 203-216. <https://doi.org/10.36829/63CTS.v4i2.355>
- Theakston, R. D. G., & Reid H. A. (1983). Development of a simple standard assay procedures for the characterization of snake venoms. *Bulletin of World Health Organization*, 61(6), 949-956.
- Turner, B.L. (1982). Taxonomy of *Neurolaena* (Asteraceae-Heliantheae). *Plant Systematics and Evolution*, 140, 119-139. <https://doi.org/10.1007/BF02407293>
- Wagner, H., & Bladt, S. (1996). *Plant Drug Analysis* (2<sup>nd</sup> ed.). B S Publishers.
- Wagner, H., & Bladt, S. (2001). *A thin layer chromatography atlas* (2<sup>nd</sup> ed.). Springer.
- Walshe-Roussel, B., Choueiri, C., Saleem, A., Asim, M., Caal, F., Cal, V., Otarola Rojas, M., Pesek, T., Durst, T., & Arnason, J. T. (2013). Potent anti-inflammatory activity of sesquiterpene lactones from *Neurolaena lobata* (L.) R. Br. ex Cass., a Q'eqchi' Maya traditional medicine. *Phytochemistry*, 92, 122-137. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2013.05.004>
- Wang, W., Shih C., & Huang, T. (2004). A novel P-I class metalloproteinase with broad substrate-cleaving activity, agkislysin, from *Agkistrodon acutus* venom. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 324(1), 224-230. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.09.031>
- World Health Organization, (2017). Report of the Tenth Meeting of the WHO strategic and technical advisory group for Neglected Tropical Diseases. 29-30 March 2017 WHO, Geneva. [https://www.who.int/neglected\\_diseases/NTD\\_STAG\\_report\\_2017.pdf](https://www.who.int/neglected_diseases/NTD_STAG_report_2017.pdf)