

Instituto de Investigaciones Farmacéuticas (INIFAR)  
Facultad de Farmacia, Universidad de Costa Rica

## Efecto de plantas usadas etnomédicamente sobre la actividad hemorrágica y proteolítica inducida por *Bothrops asper*

MSc. Beatriz Badilla Baltodano,<sup>1</sup> MSc. Fernando Chaves Mora,<sup>2</sup> Biol. Luis Jorge Poveda Álvarez,<sup>3</sup> Sandra Jiménez Castro<sup>4</sup> y Gina Rodríguez Rodríguez<sup>4</sup>

### RESUMEN

Se evaluó la capacidad para neutralizar la acción hemorrágica y proteolítica causada por el veneno de la serpiente *Bothrops asper* de extractos acuosos de 5 plantas utilizadas etnomédicamente para tratar este problema. Este trabajo forma parte de un estudio de tamizaje farmacológico sobre las plantas usadas por los curanderos para tratar las mordeduras de serpientes. Se usaron extractos liofilizados de las hojas de *Buddleja americana* H.B.& K. (Buddlejaceae), *Mikania guaco* Humb. & Bonpl. (Asteraceae), *Piper darienense* C.DC. in DC. (Piperaceae), *Vernonia patens* Kunth (GCI) (Asteraceae), y de la raíz de *Echinacea purpurea* (L.) Moench (Asteraceae). Se usó el modelo de *Kondo* modificado para evaluar la actividad antihemorrágica y 2 métodos para determinar el efecto sobre la actividad proteolítica a saber, en tubo y en microplato con caseína y caseína biotinilada, respectivamente. Se encontró que el extracto de hojas de *Vernonia patens* produjo disminución, aunque no significativa de la actividad antihemorrágica y que algunos otros extractos por el contrario, mostraron aumento de la hemorragia o indujeron edema. Ninguna de las plantas estudiadas fue capaz de inhibir la actividad proteolítica del veneno de *B. asper*

**Palabras clave:** Hemorragia, proteólisis, plantas, extractos acuosos, *Bothrops asper*, *Buddleja americana*, *Mikania guaco*, *Piper darienense*, *Vernonia patens*, *Echinacea purpurea*.

La serpiente *Bothrops asper* es la principal causante del accidente ofídico en Centroamérica.<sup>1</sup> Se encuentra ampliamente distribuida en Costa Rica<sup>2</sup> y es conocida popularmente con el nombre de “terciopelo” o “barba amarilla”.<sup>3</sup> Su veneno produce efectos locales y sistémicos muy notables tales como edema, hemorragia, mionecrosis, problemas de coagulación y nefrotoxicidad.<sup>4</sup>

Arroyo y otros,<sup>5</sup> registraron una incidencia de 15,6 mordeduras de serpiente por 100 000 habitantes con una reducción drástica de la mortalidad (0,003/100 000) y Sasa y Vasquez,<sup>6</sup> en una revisión del tema en Costa Rica, mostraron que a pesar de que el número de mordeduras en la década del 1990-2000 fue relativamente constante (504 personas) la incidencia de mortalidad se ha reducido considerablemente, probablemente debido a las campañas que se han desarrollado para el uso del suero antiofídico.

Las plantas han sido usadas como medicina tradicional para el tratamiento de la mordedura de serpiente<sup>7,8</sup> y es frecuente el informe médico del uso de infusiones de ellas, por esta razón se seleccionaron las 5 plantas más usadas por los curanderos tradicionales para tratar este problema, con el objetivo de evaluar su actividad sobre el efecto hemorrágico y proteolítico de estos venenos.

## MÉTODOS

### Material botánico y preparación de los extractos

Las plantas fueron seleccionadas por el etnobotánico *Luis J. Poveda* y recolectadas en la estación seca (noviembre-marzo). *M. guaco* y *V. patens* fueron colectadas en Guápiles (Limón), *P. darienense* en San Luis de Cutris, San Carlos (Alajuela), *B. americana* en San Joaquín de Flores (Heredia) y *E. purpurea* fue gentilmente donada por Industria Los Patitos (Heredia). Un ejemplar de cada espécimen fue depositado en el Herbario Juvenal Valerio Rojas de la Universidad Nacional con los siguientes números *M. guaco* JVR10236, *V. patens* JVR 10237, *P. darienense* JVR 19239, *B. americana* JVR 10238 y *E. purpurea* JVR 10240.

En todos los casos se usaron las hojas a excepción de *E. purpurea* en que fue utilizada la raíz. El material botánico fue secado por 3 días a una temperatura de 40 °C y luego reducido a un polvo fino (2 mm) en un molino *Willey*. Se obtuvo un extracto acuoso (10 %) de cada una de las plantas mediante infusión con agua destilada a 37 °C, que posteriormente fue filtrada, concentrada y liofilizada. El liofilizado fue conservado a 4 °C hasta su uso.

### Animales

Se usaron ratones *Swiss Webster* con una masa corporal comprendida entre 20-22g provenientes del Bioterio del Laboratorio de Ensayos Biológicos (LEBi) de la Universidad de Costa Rica. Fueron mantenidos en condiciones ambientales controladas con alimentación y agua *ad libitum*.

### Inhibición de la actividad hemorrágica

Este efecto fue determinado en grupos de 4 ratones siguiendo la técnica de *Kondo* y otros<sup>9</sup> modificada por *Gutiérrez* y otros.<sup>10</sup> Se seleccionaron 7 cantidades (2,5; 5; 10; 20; 30; 40 y 60 mg) de los extractos liofilizados de las plantas que fueron preincubadas por 30 min a temperatura de cuarto (ambiente) con 200 µg/mL de veneno de *B. asper* para obtener una gama de relaciones extracto/veneno. Luego, 100 µL de cada sobrenadante fue inyectado en la piel del abdomen de los animales de experimentación, lo que correspondería a 10 dosis hemorrágicas mínimas (DHM) de veneno (1 DHM = 2µg). El diámetro de hemorragia fue medido en la piel. Los controles de veneno (10 DHM = 20 µg) y el extracto fueron llevados a cabo de la misma manera. La actividad antihemorrágica fue expresada en porcentaje, usando el diámetro de veneno, como 100 %. La capacidad neutralizante se expresó como la dosis efectiva 50 % (ED<sub>50</sub>), definida como el radio de mg de extracto/200 µg de veneno, en el cual el diámetro del área hemorrágica fue reducida un 50 % cuando se compara con las lesiones inducidas por el veneno (10 MHD). El diámetro hemorrágico fue calculado con la siguiente fórmula:  $d = 2\sqrt{\text{área}/\pi}$ .

### Inhibición de la actividad proteolítica

Esta actividad fue determinada realizando 2 tipos de ensayos; el método en tubo con caseína 1 % w/v descrito por *Friederich* y *Tu*<sup>11</sup> modificado por *Lomonte* y *Gutiérrez*,<sup>12</sup> además se realizó la técnica en placa de microtítulo descrita por *Koritsas* y *Atkinson*<sup>13</sup>

modificada por *Franceschi* y otros,<sup>14</sup> que usa como sustrato N,N-dimetilcaseína biotinilada (Sigma).

En los experimentos de neutralización en el que se usó caseína como sustrato, se utilizó como reto una dosis mínima proteolítica de *B. asper* (1,4 mg/mL). Las absorbancias se leyeron a 280 nm (Shimadzu UV-60) y los resultados fueron expresados en U/mg.

En el ensayo de *Koritsas y Atkinson*<sup>13</sup> cada placa de microtítulo (Immulon II, Dynatech, EE.UU.) fue recubierta con 0,2 µg/100 µL, de N,N-dimetilcaseína biotinilada preparada en una amortiguador de NaHCO<sub>3</sub> (0,1M) pH 8,5 y disuelto en amortiguador de recubrimiento (Tris 0,1M, NaCl 0,15M pH 9,0) de acuerdo con *Franceschi* y otros.<sup>14</sup> En primer lugar, mezclas de extracto-veneno (40 ó 2,5 mg/200 µg veneno disueltos en PBS, pH 7,2) fueron incubados 30 min a temperatura de cuarto/ambiente con agitación constante, luego 100 µL de los sobrenadantes de esas mezclas fueron colocados en cada pocillo e incubados 24 h a 37 °C. Después de la incubación, las placas fueron lavadas 5 veces con PBS-Tween 0,05 % (v/v) y 100 µL del conjugado avidina-peroxidasa (Sigma), diluido 1:4000 con PBS, fueron adicionados a cada pocillo y las placas, incubadas por 30 min a 25 °C. Luego se lavaron y después de lavadas se agregó a cada pozo 100 µL de una solución de sustrato (2 mg/mL de O-fenilendiamina, 0,012 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en citrato de sodio 0,1M pH 5,0) y se incubaron por 3 min a temperatura de cuarto/ambiente. La reacción fue detenida con 50 µL de HCl 2M y las absorbancias fueron medidas a 492 nm en un lector de microplacas Spectra SLT. Se preparó una curva de calibración en cada placa, conteniendo varias cantidades de 0 a 200 ng. Los resultados fueron expresados como el porcentaje de inhibición de proteólisis de cada extracto analizado contra la medida del 100 % caseína biotinilada. En ambos experimentos, las muestras fueron corridas por triplicado.

### Análisis estadístico

Los datos se expresaron como promedio ± desviación estándar. Se usó la prueba t de *Student* para comparar los datos de los grupos y el control con un nivel de significación de  $p < 0,05$  y  $p < 0,01$ .

## RESULTADOS

### Inhibición de la actividad hemorrágica

Los extractos de *V. patens* neutralizaron significativamente este efecto a concentraciones de 10 mg extracto/200 µg veneno y 40 mg extracto/200 µg veneno en 1 mL, con un porcentaje de inhibición de 18,63 y 22,07, respectivamente (tabla 1). *M. guaco* mostró una débil neutralización a dosis de 5 y 10 mg y el efecto desapareció en la dosis de 40 mg (tabla 2). Los extractos de *B. americana*, *E. purpurea* y *P. darienense* presentaron un ligero efecto neutralizante en la mancha hemorrágica sin importancia estadística.

Tabla 1. *Efecto inhibitorio del extracto acuoso de hojas de Vernonia patens sobre la actividad hemorrágica inducida por el veneno de B. asper*

Concentración (1 mL) (mg de extracto liofilizado/	Diámetro hemorrágico (mm)	Porcentaje de inhibición
--	------------------------------	--------------------------

200 µg veneno)		
0,0	24,15 ± 1,79	0,0
2,5	22,73 ± 1,93	5,88
5,0	24,30 ± 1,68	0,0
10,0	19,65 ± 1,14*	18,63
40,0	18,82 ± 1,21*	22,07

Valores ± DE, \* =  $p < 0,05$  diferencia significativa con respecto al control (Prueba t de Student)

Tabla 2. Efecto inhibitorio del extracto acuoso de hojas de *Mikania guaco* sobre la actividad hemorrágica inducida por el veneno de *B. asper*

Concentración ( 1 mL) (mg de extracto liofilizado/ 200 µg veneno)	Diámetro hemorrágico (mm)	Porcentaje de inhibición
0,0	21,12 ± 1,68	0,0
2,5	21,40 ± 0,76	0,0
5,0	20,39 ± 0,58	3,46
10,0	20,01 ± 1,97	5,26
40,0	21,34 ± 0,94	0,0

Valores ± DE, \* =  $p < 0,05$  diferencia significativa con respecto al control (Prueba t de Student)

#### Inhibición de la actividad proteolítica

Ninguno de los extractos fue capaz de neutralizar la dosis proteolítica mínima (1,4 mg). Todas las mezclas de extracto veneno presentaron la misma absorbancia a 280 nm.

#### Ensayo del microplato

Ningún extracto fue capaz de inhibir la actividad proteolítica. *B. americana* presentó un resultado falso positivo debido a la coloración de sus pigmentos.

## DISCUSIÓN

Algunas plantas son usadas en la medicina popular con el objetivo de eliminar los problemas producidos por la mordedura de serpiente,<sup>7</sup> de ahí el interés que surge de buscar entre la naturaleza plantas de las que se puedan extraer sustancias que ayuden a resolver parte de la patogenicidad local de este problema, sin embargo, pocas plantas han sido estudiadas con la intención de encontrar sustancias que sean realmente de utilidad. Algunos extractos o sus componentes han mostrado ser efectivos en la inhibición de la letalidad,<sup>15</sup> miotoxicidad,<sup>16</sup> efectos hemorrágicos<sup>17</sup> así como anticoagulantes y como reductores parciales del edema,<sup>15</sup> todos ellos efectos de las serpientes pertenecientes a la familia Viperidae.

En este estudio solamente *V. patens* redujo la actividad hemorrágica a las relaciones de extracto/veneno de 10 mg/200 mg y 40 mg /200 µg, sin embargo a 60mg /200 µg el

extracto produjo un ligero edema en los animales. A pesar de que el mecanismo de acción del efecto hemorrágico no ha sido dilucidado, la acción quelante del zinc podría ser la responsable. En el estudio realizado por *Castro* y otros<sup>18</sup> en el que se evaluaron 50 extractos alcohólicos de plantas costarricenses, se encontró que 18 de ellos tenían actividad antihemorrágica. El estudio fitoquímico de estas plantas mostró la presencia de flavonas, catequinas, taninos y antocianinas, todos ellos con la capacidad de inhibir la hemorragia por el mecanismo de quelación del zinc requerido para la actividad catalítica de las metaloproteasas.<sup>18</sup>

La hemorragia es una de los más importantes efectos causados por el veneno de *B. asper*. Esta actividad es producida por varias metaloproteasas, enzimas dependientes de zinc<sup>19</sup> de las cuales 4 han sido caracterizadas.<sup>4,14</sup> Basado en estos hallazgos se han ensayado en terapéutica varios inhibidores de las toxinas hemorrágicas tales como el EDTA y algunos hidroxamatos. En trabajos anteriores se ha encontrado que compuestos como flavonoides, taninos condensados, catequinas y antocianinas son capaces de producir quelación del zinc requerido para la actividad hemorrágica de las metaloproteasas y este podría ser el mecanismo responsable de los efectos observados.

No se encontró correlación entre las propiedades antihemorrágicas y la inhibición de la actividad proteolítica, ya que en estos últimos ensayos no se produjo ninguna inhibición.

Los efectos locales tales como hemorragia, edema, necrosis y dermonecrosis<sup>20</sup> se desarrollan muy rápidamente en el proceso anómalo de la mordedura de la serpiente *B. asper*. Estos son daños irreversibles y pobremente neutralizados por el antiveneno, por lo tanto, la búsqueda de extractos de plantas con actividad sobre estos efectos causados por la familia Viperidae, podría ser de gran ayuda como una terapia adicional para estos pacientes.

Los resultados obtenidos permiten concluir que de los extractos estudiados solamente *V. patens* mostró una actividad antihemorrágica significativa y que ninguno de los extractos probados fue capaz de inhibir la actividad proteolítica del veneno de *B. asper*.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado con el apoyo financiero de la Vicerrectoría de Investigación Universidad de Costa Rica (N° 817-98-514) y del Consejo Nacional para Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICIT) de Costa Rica.

## SUMMARY

### **Effect of ethnomedically used plants on the hemorrhagic and proteolytic activity induced by *Bothrops asper***

The capacity of aqueous extracts from 5 plants ethnomedically used to neutralize the hemorrhagic and proteolytic action caused by the poison of *Bothrops asper* snake was evaluated. This report is part of a study of pharmacological screening on the plants used by healers to treat snake bites. Freeze-dried extracts from the leaves of *Buddleja americana* H.B. & K. (Buddlejaceae), *Mikania guaco* Humb. & Bonpl. (Asteraceae), *Piper darienense* C.DC. in DC. (Piperaceae), *Vernonia patens* Kunth (GCI)

(Asteraceae), and from the root of *Echinacea purpurea* (L.) Moench (Asteraceae) were used. The modified Kondo model was utilized to evaluate the antihemorrhagic activity. Two methods were used to determine their effect on the proteolytic activity: one in tube and the other in microplate with casein and biotinilated casein, respectively. It was found that the extract of leaves from *Vernonia patens* produced a reduction, although not significant, of the antihemorrhagic activity, and that, on the contrary, some extracts showed an increase of the hemorrhage, or induced edema. None of the studied plants was able to inhibit the proteolytic activity of the *B. Asper* poison.

**Key words:** Hemorrhage, proteolysis, plants, aqueous extracts, *Bothrops asper*, *Buddleja americana*, *Mikania guaco*, *Piper darienense*, *Vernonia patens*, *Echinacea purpurea*.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bolaños R. Serpientes venenosas y ofidismo en Centroamérica. San José Costa Rica: Ed. Universidad de Costa Rica;1984.
2. Solórzano A, Cerdas L. Reproductive biology and distribution of the terciopelo, *Bothrops asper* Garman (Serpentes: Viperidae) in Costa Rica. *Herpetologica*. 1998;45:444-50.
3. Campbell JA, Lamar WW. The venomous reptiles of Latin America. New York: Comstock Publishing Associates;1989.
4. Gutiérrez JM. Clinical toxicology of snakebite in Central America . En: Meier J, White J, editors. Handbook of Clinical Toxicology of Animal Venoms and Poisons. Florida CRC: Boca Ratón;1995.p.645-65.
5. Arroyo O, Rojas G, Gutiérrez JM. Epidemiología del accidente ofídico en Costa Rica. *Acta Médica Costarric*. 2000;41(4):3-29.
6. Sasa M, Vásquez S. Snakebite envenomation in Costa Rica : a review. of incidence in the decade 1990-2000. *Toxicon*. 2003;41:19-22.
7. Martz W . Plants with a reputation against snakebite. *Toxicon*. 1992;30:1131-42.
8. Otero R, Fonnegra R, Jiménez SL, Núñez V, Evans N, Alzate SP, et al. Snakebites and ethnobotany in northwest region of Colombia . Part II. Neutralization of lethal and enzymatic effects of *Bothrops atrox* venom. *J Ethnophar*. 2000;71:493-504.
9. Kondo H, Kondo S, Ikezawa L, Murata RJ. Studies on the quantitative method for the determination of hemorrhagic of Habu snake venom. *Med Sci Biol*. 1960;13 43-51.
10. Gutiérrez JM, Gené JA, Rojas G, Cerdas L. Neutralization of proteolytic and hemorrhagic activities of Costa Rica snake venoms by polyvalent antivenom. *Toxicon*. 1985;23:887-93.
11. Friederich C,Tu AT. Role of metals in snake venoms for hemorrhagic, esterase and proteolytic activities. *Biochem Pharmacol*.1971;20 (7):1549-56.
12. Lomonte B, Gutiérrez JM . La actividad proteolítica de los venenos de serpiente de Costa Rica sobre la caseína. *Rev Biol Trop*. 1983;31(1):37-40.
13. Koritsas VM, Atkinson HJ. An assay for detecting nanogram levels of proteolytic enzymes. *Analytic Biochem*. 1995;277:22-6.
14. Franceschi A, Rucavado A, Mora N, Gutiérrez JM. Purification and characterization of BaH4, a hemorrhagic metalloproteinas e from the venom of the snake *Bothrops asper* . *Toxicon*. 2000;38:83-77.

15. Borges MH, Soares AM, Rodrigues VM, Andrião-Escarso SH, Diniz H, Hamaguchi A, et al. Effects of aqueous extract of *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) on actions of snake and bee venoms and on activity of phospholipases A<sub>2</sub>. *Comp Biochem Physiol*. 2000;127:21-30.
16. Batina M de FC, Cintra ACO, Veronese ELG, Lavrador MAS, Giglio JR, Pereira PS. Inhibition of the lethal and myotoxic activities of *Crotalus durissus terrificus* venom by *Tabernaemontana catharinensis*: identification of one of the active components. *Planta Médica*. 2000;66:424-8.
17. Borges MH, Soares AM, Rodrigues VM, Oliveira F, Franceschi AM, Rucavado A, et al. Neutralization of proteases from *Bothrops* snake venoms by the aqueous extract from *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae). *Toxicon*. 2001;39:1863-9.
18. Castro O, Gutiérrez JM, Barrios M, Castro I, Romero M, Umaña E. Neutralización del efecto hemorrágico inducido por veneno de *Bothrops asper* (Serpentes: Viperidae) por extractos de plantas tropicales. *Rev Biol Trop*. 1999;47(3):597-607.
19. Bjarnason JB, Fox JW. Hemorrhagic metalloproteases from snake venoms. *Pharmacol Ther*. 1994;62:325-72.
20. Gutiérrez JM, Rucavado A. Snake venom metalloproteinases: their role in the pathogenesis of local tissue damage. *Biochimie*. 2000;82:841-50.

Recibido: 12 de julio de 2005. Aprobado: 12 de diciembre de 2005.

MSc. *Beatriz Badilla Baltodano*. Instituto de Investigaciones Farmacéuticas (INIFAR), Facultad de Farmacia, Universidad de Costa Rica. Tel (506) 207 3477 / (506) 392 6225. e-mail: [bbadilla@cariari.ucr.ac.cr](mailto:bbadilla@cariari.ucr.ac.cr)

<sup>1</sup>MSc. Farmacología. INIFAR. Facultad de Farmacia. Profesora Asociada.

<sup>2</sup>MSc. Instituto Clodomiro Picado, Facultad de Microbiología. Catedrático.

<sup>3</sup>Biólogo Especialista. INIFAR

<sup>4</sup>Licenciatura en Farmacia. INIFAR