

**Acción antiofídica de extractos de *Myrsine guianensis*, *Jatropha curcas*
y *Zanthoxylum monogynum***

Antiphidic activity of extracts from *Myrsine guianensis*, *Jatropha curcas*
and *Zanthoxylum monogynum*

Suelen Xavier Oliveira^{1*}

Thales Douglas Souza e Silva¹

Bruno Tumang Frare¹

Lívia Maria Alves¹

Mirian Machado Mendes²

Veridiana Melo Rodrigues¹

Jeferson Chagas Nascimento³

Vanderlúcia Fonseca Paula³

Luiz Fernando Moreira Izidoro¹

¹Universidade Federal de Uberlândia. Brasil.

²Universidade Federal de Goiás. Brasil.

³Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Brasil.

*Autor de correspondencia: suelenxo@hotmail.com

RESUMEN

Objetivo: evaluar la inhibición de los venenos de las serpientes *Bothrops alternatus* y *Bothrops moojeni* por los extractos vegetales de *Jatropha curcas*, *Myrsine guianensis* y *Zanthoxylum monogynum*, en relación con las actividades coagulante, fosfolipasa y hemorrágica.

Métodos: Los extractos vegetales se obtuvieron a partir del liofilizado de hojas de *Jatropha curca*, *Myrsine guianensis* y *Zanthoxylum monogynum*. Se realizaron ensayos de inhibición *in vitro* con un grupo de control positivo (10 µg de veneno crudo), grupos experimentales que recibieron una mezcla del veneno con cada uno de los extractos, en concentraciones de 5 a 500 µg y un grupo de control negativo (500 µg de extracto). Se realizaron ensayos *in vivo* con grupos de ratones Balb/c (n = 4). A los ratones del grupo de control positivo se les inyectó solamente el veneno (25 µg); a los de los grupos experimentales, una mezcla del

veneno con cada uno de los extractos, en concentraciones de 25 a 500 µg; y a los del grupo de control negativo, solamente extracto (500 µg).

Resultados: *Jatropha curcas* y *Myrsine guianensis* inhibieron significativamente la actividad fosfolipasa a partir de la proporción 1:0,5 (veneno:extracto). Por otro lado, las actividades coagulante y hemorrágica, fueron inhibidas expresivamente a partir de las proporciones 1:1 y 1:5 con *Myrsine guianensis* y *Jatropha curcas*, respectivamente. Las actividades fosfolipasa y coagulante fueron inhibidas con *Zanthoxylum monogynum* a partir de las proporciones 1:5 y 1:10, respectivamente.

Conclusiones: Los extractos analizados inhibieron los venenos de *Bothrops alternatus* y *Bothrops moojeni* debido a la presencia de moléculas con posibles propiedades antiofídicas.

Palabras clave: serpientes; veneno; inhibición; extractos.

ABSTRACT

Objective: Evaluate the inhibition of venoms from the snakes *Bothrops alternatus* and *Bothrops moojeni* by plant extracts from *Jatropha curcas*, *Myrsine guianensis* and *Zanthoxylum monogynum* in terms of coagulant, phospholipase and hemorrhagic activities.

Methods: The plant extracts were obtained by lyophilization of leaves of *Jatropha curca*, *Myrsine guianensis* and *Zanthoxylum monogynum*. *In vitro* inhibition tests were performed with a positive control group (10 µg of crude venom), experimental groups receiving a mixture of the venom with each of the extracts at concentrations of 5 to 500 µg, and a negative control group (500 µg of extract). *In vivo* tests were performed with Balb/c mice (n = 4). The mice in the positive control group were injected only the venom (25 µg), the experimental groups received a mixture of the venom with each of the extracts at concentrations of 25 to 500 µg, and the negative control group received only extract (500 µg).

Results: *Jatropha curcas* and *Myrsine guianensis* significantly inhibited phospholipase activity at a 1:0.5 (venom:extract) proportion. Coagulant and hemorrhagic activities were markedly inhibited at 1:1 and 1:5 proportions with *Myrsine guianensis* and *Jatropha curcas*, respectively. Phospholipase and coagulant activities were inhibited with *Zanthoxylum monogynum* at 1:5 and 1:10 proportions, respectively.

Conclusions: The extracts analyzed inhibited the venoms from *Bothrops alternatus* and *Bothrops moojeni* due to the presence of molecules with possible antiophidic properties.

Keywords: snakes; venom; inhibition; extracts.

Recibido: 06/03/2018.

Aceptado: 15/01/2019.

INTRODUCCIÓN

Entre los animales capaces de atacar a los seres humanos y provocar graves lesiones se destacan las serpientes venenosas, que están ampliamente distribuidas por diversos continentes y son encontradas principalmente en el medio rural, lo que genera riesgos a la salud de las personas que allí habitan o trabajan.⁽¹⁾ De acuerdo con los datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), anualmente ocurren miles de accidentes ofídicos en distintos grados (leve, moderado o grave) y con signos/síntomas clínicos peculiares.⁽²⁾ Específicamente en Brasil, según datos publicados por el Ministerio de Salud brasileño, el número de mordeduras de serpientes venenosas ha aumentado significativamente en todas las regiones del país y, según la misma fuente, entre 2012 y 2017 se han notificado 443 912 accidentes ofídicos con 1 815 óbitos.⁽³⁾

En vista de esto, dependiendo de la región anatómica afectada, la cantidad de veneno inoculada en el organismo de la víctima, y principalmente el tiempo transcurrido entre el accidente y el inicio del tratamiento, el cuadro clínico del accidentado puede desarrollar síntomas inmediatos y tardíos con repercusión local o sistémica, según el género de la serpiente agresora.⁽⁴⁾

Como el veneno de estos animales es formado por diversas enzimas con actividad catalítica dirigida a moléculas diana específicas, la víctima puede manifestar dolor, edema, equimosis e incluso mionecrosis en el sitio de la mordedura.^(5,6,7) Desde el punto de vista sistémico, es común el surgimiento de los trastornos de la hemostasia, hemorragia, miotoxicidad y neurotoxicidad, entre otros.^(6,7,8,9,10) Por consiguiente, las personas afectadas pueden ser totalmente sanadas, desarrollar secuelas permanentes, o incluso llegar a la muerte.⁽⁴⁾

Aunque el veneno agrede intensamente el organismo del paciente, el tratamiento más efectivo ya desarrollado, casi siempre disponible y aceptado por la OMS para el tratamiento del envenenamiento ofídico es la sueroterapia.⁽¹¹⁾ Sin embargo, su acción en el sitio de la mordedura no es tan prometedora, ya que no bloquea totalmente los daños en el tejido de la región afectada por la baja concentración del suero en los tejidos más periféricos. Debido a

eso y al difícil acceso a la sueroterapia en áreas más aisladas, la medicina popular siempre utilizó el potencial de las plantas como alternativa para el tratamiento del ofidismo.⁽¹²⁾

La fisiología de las plantas es bastante compleja y proporciona la síntesis de diversos metabolitos secundarios como forma de defensa contra depredadores.⁽¹³⁾ Como la flora siempre ha sido vista como fuente de materia prima para el tratamiento de diversas enfermedades, muchas investigaciones incluyen la purificación de moléculas con potencial antiofídico. Así, las investigaciones de *Santhosh* y otros⁽¹⁴⁾ relatan la existencia de diversos compuestos antiofídicos aislados de plantas y concluyen que estos metabolitos serían útiles como tratamiento auxiliar después del envenenamiento.

Teniendo en cuenta la gran importancia de los accidentes ofídicos para la salud pública, el objetivo de este trabajo fue evaluar si los extractos de *Jatropha curcas* (*J.c*), *Myrsine guianensis* (*M.g*) y *Zanthoxylum monogynum* (*Z.m*) son capaces de inhibir los efectos tóxicos de los venenos de *Bothrops alternatus* (*B. alternatus*) y *Bothrops moojeni* (*B. moojeni*).

MÉTODOS

Venenos y animales, identificación de las plantas y preparación de los extractos vegetales

Se adquirieron los venenos de las serpientes *B. alternatus* y *B. moojeni* a partir de especímenes mantenidos en el Serpentario Bioagents (Batatais, São Paulo, Brasil) y se almacenaron a 20 °C hasta el momento de su uso. Los animales, ratones machos Balb/c de 20-25 g de peso, fueron proporcionados por el Centro de Bioterismo e Experimentação Animal (CBEA) de la Universidade Federal de Uberlândia (UFU), después de la apreciación y aprobación de todos los protocolos experimentales por la Comisión de Ética en el Uso de Animales (Protocolo CEUA/UFU: 008/12).

Se colectaron las hojas de *M.g* y *J.c* en el área rural de la ciudad Uberlândia, Minas Gerais, Brasil. Después del proceso de identificación de cada especie vegetal por el Instituto de Biología, Laboratório de Anatomia e Desenvolvimento Vegetal de la UFU, se depositó una *exsiccata* de cada especie. El método de *Izidoro* y otros,⁽¹⁵⁾ fue utilizado para procesar este material vegetal.

Brevemente, las hojas lavadas de cada planta, fueron sumergidas en agua desionizada y trituradas en licuadora durante 15 min. Se centrifugó la parte líquida a 30 000/g durante 20 min. Se congeló el sobrenadante en nitrógeno líquido, se liofilizó y se almacenó a -80 °C. El extracto de *Z.m* fue donado por los profesores Dr. Jeferson C. do Nascimento y Dra. Vanderlúcia F. de Paula de la Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Victoria da Conquista, Bahia, Brasil.

Dosificación de proteínas

Se determinó la concentración de proteínas por el método descrito por *Bradford*⁽¹⁶⁾ de acuerdo con una curva estándar de albúmina de suero bovino.

Inhibición *in vitro* de la actividad fosfolipasa (PLA₂) por los extractos de *J.c*, *M.g* y *Z.m*

Se determinó la actividad fosfolipasa por titulación potenciométrica según el método previamente descrito por *De Haas y Postema*.⁽¹⁷⁾ Una emulsión de yema de huevo en presencia de desoxicolato de sodio 0,03 M y cloruro de calcio (CaCl₂) 0,6 M fue usada como sustrato. Durante la realización del ensayo, se titularon los ácidos grasos liberados enzimáticamente con una solución estándar de hidróxido de sodio (NaOH) 0,0975 M en pH 8,0 a temperatura ambiente.

Se realizaron cuatro repeticiones (n= 4) de todos los ensayos de la actividad fosfolipasa (PLA₂) acompañadas por controles positivos, realizados solamente con 10 µg de veneno de *B. alternatus* o *B. moojeni* diluidas en 100 µL del sustrato, y controles negativos, realizados solamente con 100 µg de *J.c*, 100 µg de *M.g* o 500 µg de *Z.m* diluidas en 100 µL del sustrato. Las pruebas de inhibición con los extractos se realizaron con las mismas cantidades de sustrato y masa de veneno previamente incubados y en proporciones crecientes de veneno:extracto (1:0,5, 1:1, 1:5, 1:10, 1:20) (m:m); cuyas concentraciones variaron de 5 a 100 µg para los extractos de *M.g* y *J.c*. Para el extracto de *Z.m*, las proporciones veneno:extracto fueron de 1:1, 1:2,5, 1:5, 1:10 y 1:50 (m:m), con concentraciones de 10 a 500 µg. La actividad fosfolipasa fue calculada a partir de la cantidad de microequivalentes de base consumida/microgramo de proteína utilizada y los resultados fueron expresados como media y desviación estándar (n= 4) de los porcentajes de inhibición.

Inhibición *in vitro* de la actividad coagulante por los extractos de *J.c*, *M.g* y *Z.m*

El ensayo de actividad coagulante fue realizado cuatro veces (n= 4), conforme la técnica descrita por Assakura y otros.⁽¹⁸⁾ Se registró el tiempo necesario para coagular las mezclas de plasma con el analizador Quick-Timer (Drake), que utiliza un sistema óptico que detecta la variación brusca de densidad óptica de la muestra en el momento de la coagulación y cuyo tiempo de medición máximo es de 120 s. Los controles positivos para este ensayo fueron 150 µL de plasma bovino incubado con 10 µg de veneno de *B. alternatus* o de *B. moojeni*. Las pruebas de inhibición con los extractos se ejecutaron con las mismas cantidades de plasma y masa de veneno previamente incubadas con concentraciones crecientes de 10 a 100 µg de los extractos de *M.g* y *J.c* y de 10 a 500 µg del extracto de *Z.m*. La variación de las proporciones veneno/extracto para los extractos de *M.g* y *J.c* fue 1:1, 1:5, 1:10 y 1:20 (m:m) y para el extracto de *Z.m*, 1:1, 1:2,5, 1:5, 1:10 y 1:50 (m:m). Los controles negativos de cada extracto se realizaron con una mezcla de 150 µL de plasma bovino incubado con 100 µg de extracto de *M.g*, 100 µg de extracto de *J.c* o 500 µg del extracto liofilizado de *Z.m*, respectivamente. El tiempo necesario para la formación de la red de fibrina fue considerado como el tiempo de coagulación, considerando que un aumento en este tiempo es sinónimo de la inhibición de la actividad de coagulación. Todos los resultados fueron presentados con los valores de la media y las respectivas desviaciones estándar.

Inhibición *in vivo* de la actividad hemorrágica por los extractos de *J.c* y *M.g*

Este ensayo se realizó según la metodología descrita por Nikai y otros⁽¹⁹⁾ con algunas modificaciones. Para determinar la inhibición de la hemorragia inducida por el veneno de *B. moojeni* por el extracto de *J.c*, ratones Balb/c machos de 20-25 g de peso fueron distribuidos inicialmente en 6 grupos (n= 4). Cada animal del grupo I (control positivo) recibió una inyección intradérmica en la región dorsal que contenía 25 µg de veneno de *B. moojeni* diluido en 50 µL de PBS. Los animales de los grupos GII, GIII, GIV e GV (grupos experimentales) recibieron de la misma manera una inyección que contenía una mezcla de veneno:extracto en las siguientes proporciones 1:1, 1:5, 1:10 y 1:20 (m:m), respectivamente, correspondientes a una concentración creciente de 25 a 500 µg. Los animales del grupo GVI (control negativo) recibieron por la misma vía solamente el extracto de *J.c* (500 µg).

Después de 3 h, los animales fueron anestesiados con quetamina[®] 10 % (0,05 mL/kg) + xilacina[®] 2 % (0,025 mL/kg) y su piel fue retirada para medir el halo hemorrágico con un calibre digital DIGMESS 100.174BL y así calcular el área hemorrágica. Posteriormente, a los animales se les realizó la eutanasia por dislocación cervical. Para determinar la inhibición de la actividad hemorrágica por el extracto de *M.g*, se realizaron los mismos procedimientos metodológicos. Todos los resultados fueron presentados con los valores de las medias y sus respectivas desviaciones estándar.

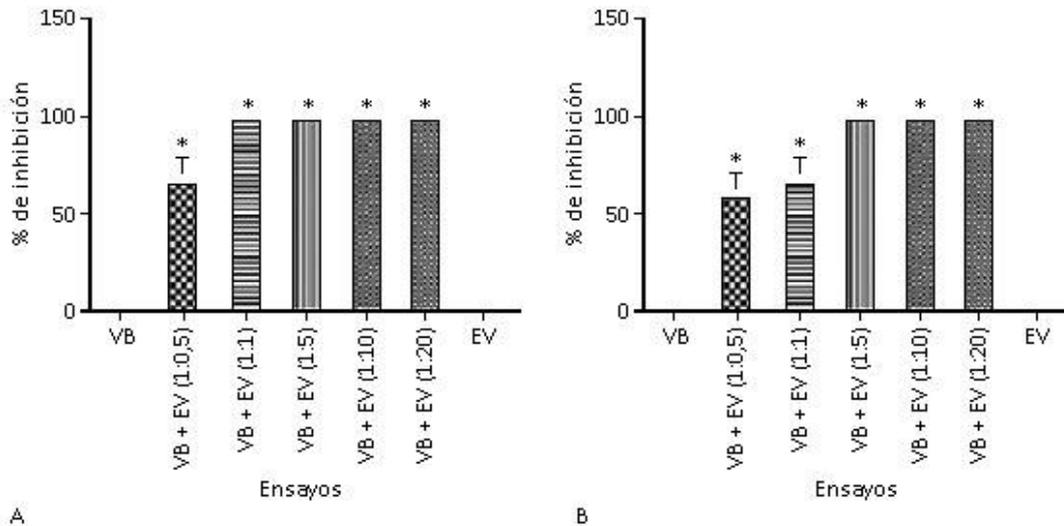
Análisis estadísticos de los datos

Las medias de cada ensayo y sus respectivas desviaciones estándar fueron obtenidas usando la prueba estadística *t-test* con un nivel de significancia del 5 % para la comparación entre los grupos. Los análisis estadísticos, así como las figuras, fueron realizados en la versión 4.0 del programa GraphPad Prism (GraphPad Software).

RESULTADOS

Inhibición *in vitro* de la actividad fosfolipasa inducida por el veneno de *B. alternatus* por medio de los extractos de *M.g* y *J.c*

Como puede observarse en la figura 1, los extractos de *J.c* y *M.g* fueron capaces de inhibir la actividad fosfolipasa inducida por el veneno de *B. alternatus*. En comparación con el veneno bothrópico (VB) crudo (0 % de inhibición), el extracto de *J.c* (Figura 1A) inhibió la actividad fosfolipasa aproximadamente un 66 %, ya en la razón 1:0,5 (veneno:extracto, m:m). En el resto de las razones, 1:1, 1:5, 1:10 y 1:20 (veneno:extracto, m:m), hubo un 100% de inhibición. Para el extracto de *M.g* (Figura 1B), se observó un 100 % de inhibición a partir de la razón 1:5 (veneno:extracto, m:m) en comparación con el VB crudo (0 % de inhibición). Ensayos realizados solamente con el extracto vegetal (EV) de *J.c* o *M.g* demostraron que estos extractos no inducen este tipo de actividad enzimática (Figuras 1A y 1B, respectivamente).



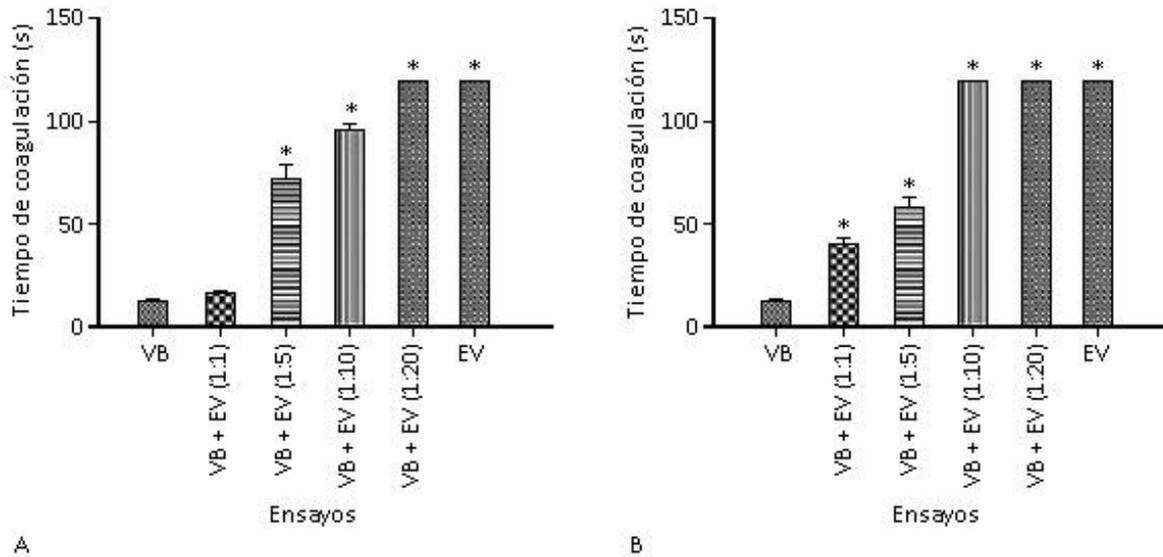
A: extracto de *J.c.* B: extracto de *M.g.* VB: veneno bothrópico (control positivo). EV: extracto vegetal (control negativo). VB + EV: veneno bothrópico incubado con extracto de *M.g.* o *J.c.* en diferentes proporciones.

*Diferencia estadísticamente significativa en relación al control positivo ($p < 0,05$), $n = 4$.

Fig. 1 - Porcentaje de inhibición de la actividad fosfolipasa inducida por el veneno de *B. alternatus* sobre los fosfolípidos.

Inhibición *in vitro* de la actividad coagulante inducida por el veneno de *B. alternatus* por medio de los extractos de *M.g* y *J.c*

La figura 2 muestra la inhibición, gracias a la acción de los extractos de *M.g* y *J.c.*, de la conversión del fibrinógeno soluble, existente en el plasma bovino, en fibrina insoluble inducida por el veneno de la serpiente *B. alternatus*. En comparación al control positivo (VB), el extracto de *M.g.* (Fig. 2, A) prolongó el tiempo de coagulación del plasma de forma parcial, pero significativa, en las proporciones veneno:extracto 1:5 y 1:10 (m:m). En la proporción 1:20 (m:m), el plasma fue incoagulable. En cuanto al extracto de *J.c.* (Figura 2B), fue capaz de prolongar parcial y significativamente el tiempo de coagulación del plasma en las proporciones 1:1 y 1:5 (m:m). En las otras proporciones, 1:10 y 1:20 (m:m), se observó que el plasma era incoagulable. Por su parte, los controles negativos, únicamente extractos de *M.g.* (Figura 2A) o *J.c.* (Figura 2B), no indujeron la coagulación del plasma.



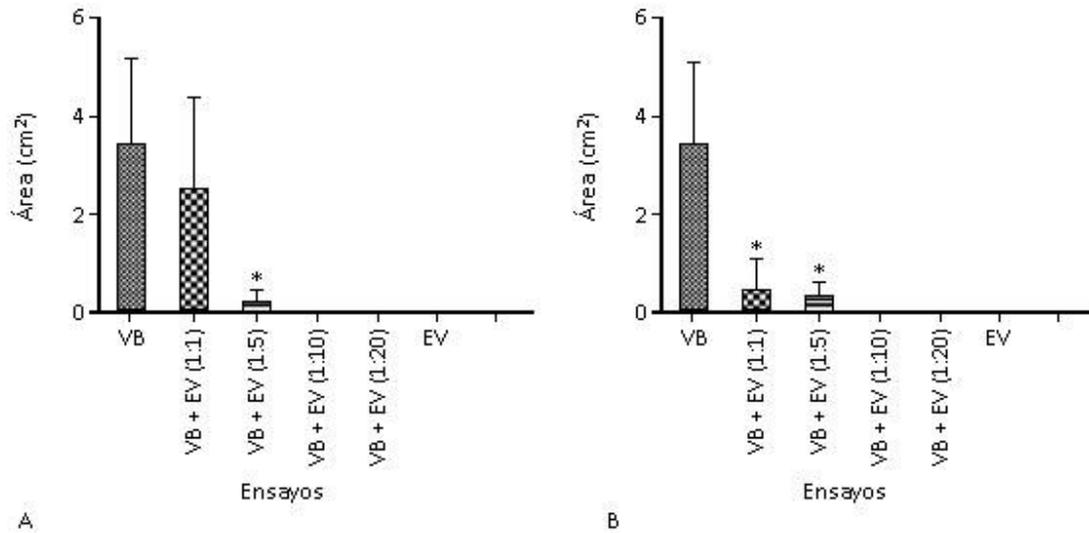
A: Extracto de *M.g*. B: extracto de *J.c*. VB: veneno bothrópico (control positivo). EV: extracto vegetal (control negativo). VB + EV: veneno bothrópico incubado con extracto de *M.g* o *J.c* en diferentes proporciones.

*Diferencia estadísticamente significativa en relación al control positivo ($p < 0,05$), $n = 4$.

Fig. 2 - Inhibición de la actividad coagulante inducida por el veneno de *B. alternatus* sobre el plasma bovino citratado.

Inhibición *in vivo* de la actividad hemorrágica inducida por el veneno de *B. alternatus* por medio de los extractos de *J.c* y *M.g*

La inhibición de la actividad hemorrágica inducida en ratones por la administración del veneno crudo de *B. alternatus* debida a los extractos de *J.c* y *M.g* se muestra en la figura 3. La inhibición de esta actividad por el extracto de *J.c* fue significativa a partir de la proporción 1:5 (m:m), mientras que a partir de la proporción 1:10 (m:m) alcanzó una inhibición del 100% (Fig. 3A). En relación con el extracto de *M.g*, la inhibición fue efectiva a partir de la razón 1:1 (m:m) alcanzando el 100 % en las razones 1:10 y 1:20 (m:m) (Fig. 3, B), en comparación con el control positivo (VB). Como se observa en las figuras 3, A y 3, B, la aplicación exclusiva de los extractos de *J.c* y *M.g* no indujo hemorragia en los animales usados en el experimento (control negativo, EV).



A: extracto de *J.c.* B: extracto de *M.g.* VB: veneno bothrópico (control positivo). EV: extracto vegetal (control negativo). VB + EV: veneno bothrópico incubado con extracto de *J.c* o *M.g* en diferentes proporciones.
 *Diferencia estadísticamente significativa en relación al control positivo ($p < 0,05$); $n = 4$.

Fig. 3. Inhibición del área hemorrágica inducida por el veneno de *B. alternatus* bajo la piel, en el dorso de ratones.

Inhibición *in vitro* de la actividad coagulante inducida por el veneno de *B. moojeni* por medio del extracto de *Z.m*

Según los datos presentados en la tabla, el extracto de *Z.m* y la solución de metanol (SA) no provocaron coagulación plasmática durante el tiempo de experimentación (controles negativos), mientras que el veneno de *B. moojeni* indujo la coagulación del plasma bovino en aproximadamente 18 segundos. Sin embargo, cuando el veneno fue incubado con extracto de *Z.m* (veneno:extracto, m:m), hubo una prolongación en el tiempo de coagulación dependiente de la dosis a partir de la razón 1:10 (veneno:extracto, m:m) que fue estadísticamente significativa.

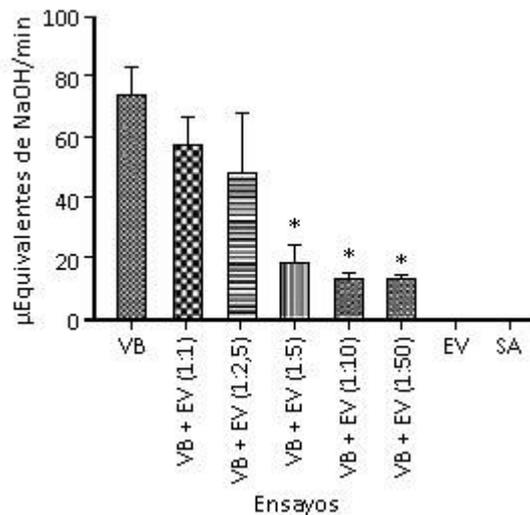
Tabla - Inhibición de la actividad coagulante inducida por el veneno de *B. moojeni* por medio del extracto de *Z.m* sobre plasma bovino citratado

Muestra	Tiempo de coagulación (s)					
	Veneno:extracto (m:m)					
		1:1	1:2,5	1:5	1:10	1:50
VB	17,8±3,2	—	—	—	—	—
<i>Z.m</i>	Incoagulable	—	—	—	—	—
SA	Incoagulable	—	—	—	—	—
VB + <i>Z.m</i>	—	19,87±0,75	25,4±2,26	28,3±0,3	*39,15±2,26	*87,80±4,48

VB: veneno bothrópico (control positivo). EV: extracto vegetal (control negativo).
 SA: solución de metanol (control negativo). VB + EV: veneno de *B. moojeni* incubado con extracto de *Z.m* en diferentes proporciones.
 *Diferencia estadísticamente significativa en relación al control positivo ($p < 0,05$), $n = 4$.

Actividad fosfolipasa

El veneno de *B. moojeni* presentó una intensa actividad fosfolipasa (control positivo), mientras que el extracto de *Z.m* y la solución de metanol no indujeron la hidrólisis de los fosfolípidos del sustrato utilizado (controles negativos). En los ensayos experimentales de inhibición, el veneno incubado con el extracto de *Z.m* en diferentes proporciones (veneno:extracto, m:m) indujo una disminución estadísticamente significativa de la propiedad enzimática estudiada a partir de la proporción 1:5 en comparación con el control positivo (Fig. 4).



VB: veneno bothrópico (control positivo). EV: extracto vegetal (control negativo). SA: solución de metanol (control negativo). VB+EV: veneno bothrópico incubado con extracto vegetal en diferentes proporciones.

*Diferencia estadísticamente significativa en relación al control positivo ($p < 0,05$), $n = 4$.

Fig. 4 - Inhibición de la actividad fosfolipasa inducida por el veneno de *B. moojeni* por medio del extracto de *Z.m*.

DISCUSIÓN

La importancia médica y económica de las plantas con potencial medicinal ha motivado varios estudios científicos y etnofarmacológicos, los cuales han resultado en la identificación de muchas moléculas con propiedades farmacológicas.⁽¹³⁾ Con base en la botánica, varias plantas han sido utilizadas desde la antigüedad con el propósito de neutralizar efectos deletéreos provocados por los venenos de serpientes, principalmente en regiones donde la sueroterapia es escasa.⁽²⁰⁾

Dependiendo de la familia y del género de la serpiente agresora, la víctima puede desarrollar tanto efectos locales como sistémicos.⁽²¹⁾ Entre los diversos componentes de los venenos de las serpientes pertenecientes a la familia *Viperidae*, y principalmente al género *Bothrops*, se destacan las fosfolipasas A₂ (PLA₂).⁽¹¹⁾ Estas fosfolipasas A₂ son enzimas responsables por la hidrólisis de fosfolípidos de las bicapas lipídicas y por la desestructuración del ambiente celular, desencadenando así los efectos iniciales del envenenamiento, como dolor, edema e hiperemia que posteriormente evolucionan para un típico proceso de inflamación aguda.⁽²²⁾ En el presente estudio, se ha verificado que los venenos de las serpientes *B. alternatus* y *B. moojeni* son fuentes de fosfolipasas A₂ y que inducen actividad fosfolipasa *in vitro*. Además, cuando estos venenos son incubados con los extractos de *J.c* y *M. g*, el 100 % de la actividad fosfolipasa es inhibida en las proporciones 1:1 y 1:5 (m:m). Sin embargo, el veneno de *B. Moojeni* tratado con el extracto de *Z.m* es parcialmente inhibido.

En la literatura, hay miles de investigaciones en relación con la inhibición de la toxicidad de venenos de serpientes de diferentes géneros y enzimas fosfolipasas A₂ a partir del extracto bruto de plantas pertenecientes a diversas familias como *Piper longum* L.,⁽²³⁾ *Connarus favosus*,⁽²⁴⁾ *Rosmarinus officinalis* L.⁽²⁵⁾ y *Cassampelos pareira*;⁽²⁶⁾ al igual que a partir de principios activos con potencial antiofídico como el ácido rosmarínico,⁽²⁷⁾ el tanino aislado de *Mimosa pudica*,⁽²⁸⁾ el ácido arjunólico⁽²⁹⁾ y el β-sitosterol,⁽³⁰⁾ entre otros.

De acuerdo con *White*,⁽³¹⁾ los venenos de las serpientes, especialmente los bothrópicos, presentan componentes que afectan directamente a la hemostasia. Por presentar acción semejante a la trombina, estos componentes son llamados de *thrombin-like* y son responsables por la conversión *in vivo* del fibrinógeno plasmático soluble en fibrina. Estas informaciones fueron totalmente corroboradas por este trabajo, ya que los venenos bothrópicos estudiados indujeron fuertemente la coagulación del plasma. Sin embargo, cuando fue incubado previamente el veneno de *B. alternatus* con extractos de *J.c* o *M.g*, este efecto fue parcial o totalmente revertido. A su vez, el extracto de *Z.m* inhibió parcialmente la coagulación plasmática provocada por el veneno de *B. moojeni*. Estos resultados están en concordancia con otras investigaciones sobre extractos vegetales que demostraron una inhibición significativa de los efectos de venenos sobre las proteínas que coordinan la cascada de coagulación.^(32,33,34,35,36,37)

Relacionado también con la hemostasia, es común que las víctimas de accidentes bothrópicos desarrollen trastornos hemorrágicos; pues los venenos de estas serpientes presentan enzimas proteolíticas responsables por la degradación de proteínas en la matriz

extracelular, generando desestructuración en la membrana del vaso y extravasación de sangre.⁽³⁸⁾ En nuestro estudio, este tipo de problema hemorrágico causado por los venenos de *B. alternatus* en ratones, fue inhibido completamente en la presencia de los extractos de *J.c* y *M.g* a partir de la proporción 1:10 (m:m). Asimismo, procesos hemorrágicos inducidos por venenos de serpientes clasificadas en diferentes familias, géneros o especies fueron inhibidos por diversos extractos vegetales, según diferentes trabajos científicos;^(23,24,25,39) lo que confirma que las plantas poseen moléculas con elevado potencial antiofídico.

Ensayos de modelaje molecular realizados por *Ticli* y otros⁽²²⁾ demostraron que el ácido rosmarínico incubado con fosfolipasas A₂ aisladas de venenos de serpientes se unen al sitio activo de estas enzimas, inhibiendo sus efectos deletéreos. Observaciones similares fueron informadas por *Mendes* y otros⁽²⁰⁾ cuando trataron una enzima metaloproteinasa de venenos de serpientes con el compuesto de origen vegetal *p*-cumarato de triacontilo, que inhibía completamente su actividad en ensayos *in vivo* e *in vitro*; además confirmaron, por medio de técnicas de simulación molecular, que esta molécula se unía al sitio activo de la enzima.

Los extractos acuosos de las plantas *M.g* y *J.c* fueron altamente eficaces en la neutralización de las actividades coagulante, fosfolipasa y hemorrágica inducidas por el veneno de la serpiente *B. alternatus*, mientras que el extracto metanólico de *Z.m* inhibió parcialmente las actividades fosfolipasa y coagulante inducidas por el veneno de *B. moojeni*. Posiblemente, estos extractos presentan metabolitos capaces de interactuar con proteínas existentes en el veneno, haciéndolas menos efectivas con respecto a su toxicidad. En el futuro, estos metabolitos podrán contribuir para el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos para el tratamiento de accidentes ofídicos.

Conflicto de intereses

Los autores no declaran conflicto de intereses.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Warrel DA. Snake bite. *Lancet*. 2010;375:77-88.
2. World Health Organization (WHO). Neglected Tropical Diseases: Snakebite [Last updated on 2017 Apr 06; Last accessed on 2012 May 26]. Available from: http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/snakebites/en/index.html

3. Brasil, Ministério da Saúde. Sistema de Informação de Agravos de Notificação. Casos de acidentes por serpentes. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 2000 a 2016 [cited 2017 Apr 6]. Available from: http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/abril/28/1casos_Ofidismo_2000_2016.pdf
4. França FOS. Associação da venenemia e da gravidade em acidentes botrópicos no momento da admissão no Hospital Vital Brazil, do Instituto Butantan, SP, com variáveis epidemiológicas, clínicas e laboratoriais. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1998;31:495-6.
5. Chijiwa T, So S, Hattori S, Yoshida A, Oda-Ueda N, Ohno M. Suppression of severe lesions, myonecrosis and hemorrhage, caused by *Protobothrops flavoviridis* venom with its serum proteins. *Toxicon.* 2013;76:197-05.
6. Mamede CCN, Sousa BB, Pereira DFC, Matias MS, Queiroz MR, Morais NCG, et al. Comparative analysis of local effects caused by *Bothrops alternatus* and *Bothrops moojeni* snake venoms: enzymatic contributions and inflammatory modulations. *Toxicon.* 2011;117:37-45.
7. Burin SM, Menaldo DL, Sampaio SV, Frantz GG, Castro FA. An overview of the immune modulating effects of enzymatic toxins from snake venoms. *Int J Biol Macromol.* 2018;109:664-71.
8. Queiroz MR, Sousa BB, Pereira DFC, Mamede CCN, Matias MS, Morais NCG, et al. The role of platelets in hemostasis and the effects of snake venom toxins on platelet function. *Toxicon.* 2017;133:33-47.
9. Hatakeyama DM, Morais-Zani K, Serino-Silva C, Grego KF, Sant'anna SS, Fernandes W, et al. Examination of biochemical and biological activities of *Bothrops jararaca* (Serpentes: Viperidae; Wied-Neuwied 1824) snake venom after up to 54 years of storage. *Toxicon.* 2018;141:34-42.
10. Echeverría S, Leiguez E, Guijas C, Nascimento NG, Acosta O, Teixeira C, et al. Evaluation of pro-inflammatory events induced by *Bothrops alternatus* snake venom. *Chem Biol Interact.* 2018;281:24-31.
11. Melo LL, Mendes MM, Alves LM, Isabel TF, Vieira SAPB, Gimenes SNC, et al. Cross-reactivity and inhibition myotoxic effects induced by *Bothrops* snake venoms using specific polyclonal anti-BnSP7 antibodies. *Biologicals.* 2017;50:109-16.

12. Da Silva JO, Coppede JS, Fernandes VC, Sant`Ana CD, Ticli FK, Mazzi MV, et al. Antihemorrhagic, antinucleolytic and other antiophidian properties of the aqueous extract from *Pentaclethramacroloba*. J Ethnopharmacol. 2005;100:145-52.
13. Moccelini, SK. Estudo fitoquímico das cascas das raízes de *Zanthoxylum rigidum* Humb. & Bonpl. ex Willd (Rutaceae). Química Nova. 2009;32:131-133.
14. Santhosh MS, Hemshekhar M, Sunitha K, Thushara RM, Jnaneshwari S, Kempaeaju K, et al. Snake Venom Induced Local Toxicities: Plant Secondary Metabolites as an Auxiliary Therapy. Mini Rev Med Chem. 2013;13:106-23.
15. Izidoro LFM, Rodrigues VM, Ferro EV, Hamaguchi A, Giglio JR, Homsí-Bramdeburgo MI. Neutralization of some hematological and hemostatic alterations induced by neuwiedase, a metalloproteinase isolated from *Bothrops neuwiedi pauloensis* snake venom, by the aqueous extract from *Casearia mariquitensis* (Flaucortiaceae). Biochimie. 2003;669-675.
16. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 1976;72:248-54.
17. De Haas GH, Postema NM. Purification and properties of phospholipase A₂ from porcine pancreas. Biochem Biophys Acta. 1968;159:103-17.
18. Assakura MT, Furtado MF, Mandelbau FR. Biochemical and biological differentiation of the venoms of the lancehead vipers (*Bothrops marajoensis* and *Bothrops moojeni*). Comp Biochem Physiol. 1992;102:727-32.
19. Nikai T, Mori N, Kishida M. Isolation and biochemical characterization of hemorrhagic toxin from the venom of *Crotalus atrox*. Biochem Biophys Res Commun. 1984;231:309-11.
20. Mendes MM, Vieira SAPB, Gomes MSR, Paula VF, Alcântara TM, Homsí-Brandeburgo MI, et al. Triacetyl p-coumarate: An inhibitor of snake venom metalloproteinases. Phytochemistry. 2013;86:72-82.
21. Tavares AV, Araújo KAM, Marques MRV, Vieira AA, Leite RS. The epidemiology of snakebite in the Rio Grande do Norte State, Northeastern Brazil. Rev Inst Med Trop São Paulo. 2017;59:1-10.
22. Schaloske RH, Dennis EA. The phospholipase A₂ superfamily and its group numbering system. Biochem Biophys Acta. 2006;1761:1246-59.

23. Shenoy PA, Nipate SS, Sonpetkar JM, Salvi NC, Waghmare AB, Chaudhari PD. Anti-snake venom activities of ethanolic extract of fruits of *Piper longum* L. (Piperaceae) against Russell's viper venom: Characterization of piperine as active principle. J Ethnopharmacol. 2013;147:373-82.
24. Silva TP, Moura VM, Souza MCS, Santos VNC, Silva KAMM, Mendes MGG, et al. *Connarus favosus* Planch.: An inhibitor of the hemorrhagic activity of *Bothrops atrox* venom and a potential antioxidant and antibacterial agent. J Ethnopharmacol. 2016;183:166-75.
25. Salama WH, Abbdel-Aty AM, Fahmy AS. Rosemary leaves extract: Anti-snake action against Egyptian *Cerastes cerastes* venom. J Tradit Complement Med. 2017;xxx:1-11.
26. Verrastro BR, Torres AM, Ricciardi G, Teibler P, Maruñak S, Barnaba C, et al. The effects of *Cissampelos parreira* extract on envenomation induced by *Bothrops diporus* snake venom. J Ethnopharmacol. 2018;212:36-42.
27. Ticli FK, Hagea LIS, Cambraia RS, Pereira PS, Magro AJ, Fontes MRM, et al. Rosmarinic acid, a new snake venom phospholipase A₂ inhibitor from *Cordia verbenacea* (Boraginaceae): antiserum action potentiation and molecular interaction. Toxicon. 2005;46:318-27.
28. Ambikabothly J, Ibrahim H, Ambu S, Chakravarthi S, Awang K. Efficacy evaluations of *Mimosa pudica* tannin isolate (MPT) for its anti-ophidian properties. J Ethnopharmacol. 2011;137:257-62.
29. Fernandes FFA, Tomaz MA, El-Kik CZ, Monteiro-Machado M, Strauch MA, Cons BL, et al. Counteraction of *Bothrops* snake venoms by *Combretum leprosum* root extract and arjunolic acid. J Ethnopharmacol. 2014;155:552-62.
30. Raghavamma STV, Rao NR, Rao GD. Inhibitory potential of important phytochemicals from *Pergularia daemia*(Forks.) chiov., on snake venom (*Naja naja*). J. Genet Eng Biotechnol. 2016;14:211-7.
31. White J. Snake venoms and coagulopathy. Toxicon. 2005;45:951-67.
32. Costa JO, Fonseca KC, Garrote-Filho MS, Cunha CC, Freitas MV, Silva HS, et al. Structural and functional comparison of proteolytic enzymes from plant latex and snake venoms. Biochimie. 2010;92:1760-5.
33. Strauch MA, Tomaz MA, Monteiro-Machado M, Ricardo HD, Cons BL, Fernandes FFA, et al. Antiophidic activity of the extract of the Amazon plant *Humirianthera ampla* and constituents. J Ethnopharmacol. 2013;145:50-8.

34. Patiño AC, Benjumea DM, Pereañez JA. Inhibition of venom serine proteinase and metalloproteinase activities by *Renalmia alpinia*(Zingiberaceae) extracts: Comparison of wild and in vitro propagated plants. J Ethnopharmacol. 2013;149:590- 6.
35. Baraldi PT, Magro AJ, Matioli FF, Marcussi S, Lemke N, Calderon LA, et al. A novel synthetic quinolinone inhibitor presents proteolytic and hemorrhagic inhibitory activities against snake venom metalloproteases. Biochimie. 2016;121:179-88.
36. Magalhaes A, Santos GB, Verdam MCS, Fraporti L, Malheiro A, Lima ES, et al. Inhibition of the inflammatory and coagulant action of *Bothrops atrox* venom by the plants species *Marsypianthes chamaedrys*. J Ethnopharmacol. 2011;134:82-8.
37. Moura VM, Souza LYA, Guimarães NC, Santos IGC, Almeida PDO, Oliveira RB, et al. The potential of aqueous extract of *Beluccia dichotoma Cogn.* (Melastomataceae) to inhibit the biological activities of *Bothrops atrox* venom: A comparison of specimens collected in the states of Pará and Amazonas, Brazil. J Ethnopharmacol. 2017;196:168-77.
38. Matsui T, Fujimura Y, Titan, K. Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. Biochem Biophys Acta. 2000;1477:146-56.
39. Hasan N, Azam NK, Ahmed N, Hirashima A. A randomized ethnomedicinal survey of snake bite treatment in south western parts of Bangladesh. J Tradit Complement Med. 2016;6:337-42.

Conflicto de intereses

No existe conflicto de intereses.