

BÚSQUEDA DE ALTERNATIVAS TERAPÉUTICAS PARA EL ACCIDENTE OFÍDICO EN RESIDUOS AGROINDUSTRIALES DE FRUTAS TROPICALES

RESEARCH OF THERAPEUTIC ALTERNATIVES FOR SNAKEBITE IN AGROINDUSTRY RESIDUES OF TROPICAL FRUITS

Jaime A. PEREAÑEZ^{1*}, Arley C. PATIÑO¹, Gelmy CIRO¹, Leidy J. VARGAS¹, Julieta VÁSQUEZ¹,
Andrea SALAZAR¹, Jessica P. REY¹

Recibido: Julio 28 de 2009 Aceptado: Septiembre 3 de 2009

RESUMEN

Este estudio pretende demostrar que residuos de la agroindustria, como son las semillas de *Vitis vinifera* y *Citrus sinensis*, y la almendra de *Mangifera indica*, poseen capacidad neutralizante de algunos efectos enzimáticos inducidos por los venenos de *Bothrops asper* y *Porthidium nasutum*; además, actividad inhibitoria del crecimiento de algunos microorganismos de la flora normal de los colmillos y la boca de las serpientes; es así como se determina que los extractos de *M. indica* y *V. vinifera* poseen buena capacidad inhibitoria de la actividad de fosfolipasa A₂ dependiente de la dosis, y una mayor potencia neutralizante hacia tal actividad del veneno de *P. nasutum*. Frente al efecto proteolítico inducido por el veneno de las dos víboras, *V. vinifera* presenta los mejores porcentajes de inhibición dependiendo de la cantidad de extracto utilizado. Sobre la actividad coagulante del veneno de *B. asper*, *M. indica* y *V. vinifera* logran prolongar el tiempo de coagulación hasta ~ 31 y 13 veces respectivamente, el tiempo del correspondiente control positivo. *M. indica* y *V. vinifera* inhiben el crecimiento de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. Por el contrario, el extracto etanólico de las semillas de *C. sinensis* no presenta resultados de inhibición muy prometedores.

Palabras clave: *Bothrops asper*, *Porthidium nasutum*, *Mangifera indica*, *Vitis vinifera*, *Citrus sinensis*, taninos.

ABSTRACT

This paper tries to demonstrate that agroindustrial residues, such as *Vitis vinifera* and *Citrus sinensis* seeds and the *Mangifera indica* Kernel, have the capacity of neutralize some of the enzymatic effects induced by *Bothrops asper* and *Porthidium nasutum* venoms, in addition to the inhibitory ability of some microorganism growth of the normal flora of the serpent fangs and mouth. That is the extracts of *M. indica* and *Vitis vinifera* have a good inhibitory ability of the phospholipase A₂ activity in a dose dependent manner and if they have a major neutralizing potency against the *P. nasutum* venom activity. Against the proteolytic effect induced by both snakes venom, *V. vinifera* shows the best inhibition percentages in a dependent way of the amount of extract used. Against the coagulant activity of *B. asper* venom, the species *M. indica* and *V. vinifera* are able to prolong the coagulation time up ~ 31 and 13 times, respectively, to the corresponding positive control time. *M. indica* and *V. vinifera* inhibit the growth of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. On the other hand, the etanolic extract of *C. sinensis* seeds does not show promising inhibition results.

Keywords: *Bothrops asper*, *Porthidium nasutum*, *Mangifera indica*, *Vitis vinifera*, *Citrus sinensis*, tannins.

¹ Programa de Ofidismo/Escurpionismo. Universidad de Antioquia. A.A. 1226. Medellín, Colombia.

* Autor a quien se debe dirigir la correspondencia: andres.pereanez@siu.udea.edu.co

INTRODUCCIÓN

El accidente ofídico sigue siendo un problema de salud pública en países tropicales como Colombia y muchos otros de América Latina. En nuestro país se registran cerca de 3.000 accidentes ofídicos al año, de los cuales el 90-95% son producidos por serpientes de la familia *Viperidae*, y especialmente por los géneros *Bothrops*, *Porthidium* y *Bothriechis*, siendo las especies *Bothrops asper* y *Bothrops atrox* (mapaná equis) responsables de más del 50%, mientras que a *Porthidium nasutum* (patoco, veinticuatro) se le atribuye el 15,6% de las mismas (1). Sus venenos inducen efectos locales y sistémicos tales como edema, hemorragia, dermonecrosis, mionecrosis, alteraciones de la coagulación, hipotensión, insuficiencia renal aguda, entre otros (2, 3).

Desde hace más de un siglo, el tratamiento específico para el accidente ofídico ha sido el suministro de antivenenos (4); sin embargo, se ha demostrado que estos no resuelven todos los efectos inducidos por los venenos de víboras, ya que tienen limitada capacidad neutralizante de los efectos locales, tales como hemorragia, edema y mionecrosis debido a su rápida instalación (4, 5).

La medicina tradicional ha utilizado durante varios siglos, plantas para el tratamiento del accidente ofídico. Aunque se ha reportado el uso a nivel mundial de cerca de 700 plantas como antiofídicas, la efectividad de pocas ha sido evaluada en ensayos controlados (6, 7, 8, 9). En trabajos recientes, el extracto metanólico de las semillas de la uva (*Vitis vinifera*) inhibió las actividades proteolítica, coagulante, de hialuronidasa, hemorrágica, edematizante y mionecrótica de los venenos de *Doboa russelli* y *Echis carinatus* (10, 11), mientras que el extracto etanólico de la almendra del mango (*Mangifera indica*) inhibió la actividad enzimática de fosfolipasa A₂, hialuronidasa y L-aminoácido oxidasa de los venenos de *Callosellasma rhodostoma* y *Naja naja kauothia* (12); así mismo el extracto etanólico de los frutos maduros de *Citrus limon* mostró capacidad inhibitoria del efecto letal y la hemorragia del veneno de *B. atrox* (7, 8).

En la actualidad, la industria agrícola produce cada año un gran volumen de residuos, tanto sólidos como líquidos, resultado de los procesos de producción, preparación y consumo de sus productos. Estos desechos, además de constituir un riesgo medioambiental, representan un problema económico debido a su poco rendimiento y al cos-

te adicional que implica su disposición final (13). Razón por la cual se requiere hacer sostenible la explotación de los recursos. Por este motivo, estas industrias están centrando su interés en recuperar, reciclar, aumentar la calidad y, sobre todo, encontrar nuevas aplicaciones a estos residuos con el fin de sacar el mayor rendimiento posible de ellos. Si se dispone de la tecnología adecuada (y de procesos de extracción económicamente viables), estas sustancias residuales pueden ser convertidas en nuevos productos, o ser recicladas para usarse como materia prima en procesos secundarios, en otras industrias, o incluso como combustible alternativo.

Por esta razón, este estudio buscó determinar si los extractos etanólicos de desechos de la agroindustria, como las semillas de uva (*Vitis vinifera*) y naranja (*Citrus sinensis*), y la almendra (cotiledones y embrión) del mango (*Mangifera indica*), poseen actividad inhibitoria sobre los efectos enzimáticos de los venenos de *B. asper* y *P. nasutum* de Colombia, y actividad antimicrobiana sobre *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, microorganismos de la flora normal de la boca y los colmillos de serpiente (14, 15), con el fin de encontrar una alternativa o tratamiento coadyuvante de los antivenenos, que pueda conducir a la mejora del pronóstico y a la evolución de los efectos locales del accidente ofídico.

METODOLOGÍA

Venenos

Se utilizó una mezcla homogénea de veneno obtenida por ordeño manual de 40 y 20 especímenes adultos de *B. asper* y *P. nasutum* respectivamente, los cuales procedían de los departamentos de Antioquia y Chocó y habían sido mantenidos en cautiverio en el Serpentario de la Universidad de Antioquia. El veneno fue centrifugado, el sobrenadante liofilizado y congelado a -70°C hasta su uso.

Preparación de los extractos

Los frutos se compraron en el mercado local y fueron identificados y clasificados por el Herbario de la Universidad de Antioquia como *Mangifera indica* (Tommy), *Vitis vinifera* (Isabella) y *Citrus sinensis* (Valencia). Las semillas de los frutos se extrajeron manualmente y se secaron en estufa convencional a temperatura de 37°C durante 48 horas. A las semillas de *C. sinensis* se les realizó un desengrase con éter de petróleo en un equipo

soxhlet. Posteriormente el material vegetal seco y desengrasado se sometió a un proceso de percolación con etanol al 96% durante 48 horas, y finalmente se concentró usando un rotaevaporador (Büchi R-124); por último los extractos se liofilizaron y almacenaron a -20°C .

Inhibición de la actividad de fosfolipasa A_2 (PLA₂)

Para esto se cuantificó la actividad hemolítica indirecta, usando el método de agarosa - yema de huevo - eritrocitos, descrito por Gutiérrez y colaboradores (16). Se utilizó una dosis hemolítica mínima indirecta (DHmI) de cada veneno (2,2 μg de *B. asper* y 30 μg de *P. nasutum*, respectivamente). Los ensayos de inhibición se llevaron a cabo incubando mezclas de cantidades variables de cada extracto con una DHmI (relaciones 1:10 y 1:5 veneno: extracto) a 37°C por 30 minutos. Los halos de hemólisis fueron medidos después de 20 horas de incubación a la misma temperatura. Cada uno de los extractos fue controlado para determinar su capacidad hemolítica indirecta, teniendo en cuenta las mismas dosis utilizadas en los ensayos de inhibición. Los experimentos fueron realizados por triplicado.

Inhibición de la actividad proteolítica sobre la caseína

Se siguió la técnica descrita por Lomonte y Gutiérrez (17). En resumen, 0,6 mg de cada veneno, dosis recomendada para los venenos de la zona (18), fueron preincubados a 37°C por 30 minutos, con cantidades variables de cada extracto (relaciones 1:10 y 1:5 veneno : extracto); posteriormente un mililitro de cada mezcla fue adicionado a dos mililitros de caseína al 1% en PBS, pH 7,2; después de 30 minutos, la reacción fue detenida con la adición de ácido tricloroacético al 5%, y se dejó en reposo 30 minutos. Finalmente los tubos fueron centrifugados a 690 g por 10 minutos. La absorbancia del sobrenadante fue determinada a 280 nm, en un espectrofotómetro contra un blanco de reactivos. Cada uno de los extractos fue controlado para determinar su actividad proteolítica, teniendo en cuenta las mismas dosis utilizadas en los ensayos de inhibición. Los experimentos fueron realizados por triplicado.

Inhibición de la actividad coagulante

El efecto coagulante del veneno de *B. asper* se determinó por el método descrito por Theakston y

Reid (19). Las pruebas de inhibición se efectuaron preincubando a 37°C un microgramo de veneno de *B. asper* disuelto en 50 μL de PBS pH 7,2; con diferentes cantidades de cada uno de los extractos (relaciones 1:10 y 1:5 veneno : extracto), durante 30 minutos. La mezcla fue adicionada a 300 μL de plasma humano citrado, obtenido de donantes sanos, y finalmente el tiempo de coagulación fue registrado. Cada uno de los extractos fue controlado para determinar su actividad coagulante, teniendo en cuenta las mismas dosis utilizadas en los ensayos de inhibición. Los experimentos fueron realizados por triplicado. No se llevó a cabo esta prueba con el veneno de *P. nasutum* debido a que no posee esta actividad (18).

Electroforesis SDS-PAGE

La electroforesis se realizó sobre gel de poliacrilamida al 12% en condiciones no reducidas, como lo describe Laemmli (20). 40 μg de veneno se incubaron con 400 μg de cada extracto (relación 1:10) durante 30 minutos, a 37°C , y se corrieron en una cámara Mini Protean-II® (BioRad) durante 60 minutos a 150 voltios. El veneno y los extractos solos fueron incubados en los mismos tiempos y corridos en las mismas condiciones. Las proteínas fueron coloreadas empleando azul de Coomassie R 250.

Cepas bacterianas y evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos

Los microorganismos utilizados fueron *Escherichia coli* ATCC 8739 y *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, mediante el método de difusión en agar descrito por du Toit y colaboradores (21), con algunas modificaciones. Inicialmente se preparó el inóculo de cada bacteria a una absorbancia equivalente a 0,5 de Mcfarland (1×10^8 UFC/mL). Luego se distribuyó el inóculo en cajas de petri con agar Mueller-Hinton y se le realizaron 5 pozos con la ayuda de un sacabocados, en los cuales se adicionó 30 μL de cada uno de los extractos a una concentración de 25 mg/mL; como controles positivo y negativo se usó cloranfenicol y DMSO respectivamente. Las placas se incubaron por 24 horas a 35°C , y posteriormente se registró el halo de inhibición de crecimiento en cm. Los ensayos se realizaron por triplicado.

Evaluación fitoquímica preliminar

El análisis fitoquímico preliminar de los extractos, para la detección de metabolitos secundarios como alcaloides, lactonas, esteroides y/o terpenoi-

des, flavonoides, naftoquinonas, antraquinonas, saponinas, taninos y cumarinas, se efectuó de acuerdo con los métodos propuestos por Sanabria (22) y Domínguez (23).

Análisis estadístico

Se realizó un ANOVA de una vía seguido por un test de Bonferroni, con el fin de establecer una comparación múltiple entre las muestras y los respectivos controles. Los ensayos fueron realizados por triplicado y los resultados se expresaron como la media $\pm$ S.E.M (error estándar de la media). Se consideraron diferencias significativas cuando $p < 0,05$.

RESULTADOS

Inhibición de la actividad hemolítica indirecta

Contra la actividad hemolítica indirecta inducida por los venenos de *B. asper* y *P. nasutum*, el extracto de *M. indica* en una relación 1:10 fue el que presentó mayor efecto inhibitorio ($82,83 \pm 1,46$ y $100 \pm 0,0$, respectivamente), mientras que el de *C. sinensis* en una relación 1:5 fue el que mostró menor capacidad neutralizante ($2,01 \pm 1,46$ y $14,67 \pm 1,83$, respectivamente) (Véase figuras 1A, 1B y tabla 1).

En ambos ensayos, el efecto inhibitorio fue dependiente de la cantidad de extracto utilizado y todas las muestras exhibieron diferencia significativa con respecto al extracto de *M. indica* en una relación 1:10. Ninguno de los extractos mostró actividad hemolítica indirecta.

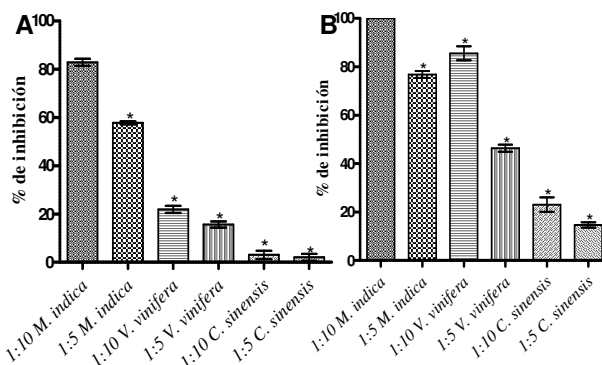


Figura 1. (A) Inhibición de la actividad hemolítica indirecta del veneno de *B. asper*. Se utilizó una DHmI (2.2 μ g) para generar un halo de hemólisis de 20 mm después de 20 h de incubación. **(B)** Inhibición de la actividad hemolítica indirecta del veneno de *P. nasutum*. Se utilizó una DHmI (30 μ g) para generar un halo de hemólisis de 20 mm después de 20 h de incubación. * representa diferencia significativa con respecto a *M. indica* en una relación 1:10 ($p < 0.05$).

Tabla 1. Inhibición de las actividades enzimáticas de los venenos de *B. asper* y *P. nasutum* y del crecimiento de microorganismos por extractos de *M. indica*, *V. vinifera* y *C. sinensis*.

Veneno	Ensayo	Extracto					
		<i>M. indica</i>		<i>V. vinifera</i>		<i>C. sinensis</i>	
		1:5	1:10	1:5	1:10	1:5	1:10
<i>B. asper</i>	PLA ₂ ^a	57,79 $\pm$ 0,65	82,83 $\pm$ 1,46	15,59 $\pm$ 1,30	21,86 $\pm$ 1,44	2,01 $\pm$ 1,46	3,05 $\pm$ 1,69
<i>P. nasutum</i>		76,81 $\pm$ 1,45	100 $\pm$ 0,00	46,38 $\pm$ 1,45	85,51 $\pm$ 2,90	14,67 $\pm$ 1,06	23,08 $\pm$ 2,97
<i>B. asper</i>	Proteolítica ^a	63,55 $\pm$ 4,60	61,53 $\pm$ 4,60	43,32 $\pm$ 3,56	71,57 $\pm$ 5,62	7,97 $\pm$ 1,46	13,11 $\pm$ 1,99
<i>P. nasutum</i>		48,69 $\pm$ 3,91	65,32 $\pm$ 2,29	43,82 $\pm$ 2,65	71,46 $\pm$ 5,83	0,00 $\pm$ 0,00	13,71 $\pm$ 4,93
<i>B. asper</i>	Coagulante ^b	311,6 $\pm$ 22,09	859,7 $\pm$ 3,82	166,5 $\pm$ 7,32	359,0 $\pm$ 40,54	27,33 $\pm$ 0,49	26,42 $\pm$ 0,32
	Antimicrobiano <i>S. aureus</i> ^c	1,78 $\pm$ 0,09		1,10 $\pm$ 0,06		0,03 $\pm$ 0,03	
	Antimicrobiano <i>E. coli</i> ^c	1,40 $\pm$ 0,06		0,97 $\pm$ 0,03		0,00 $\pm$ 0,00	

^a Los resultados se presentan como la media $\pm$ SEM del porcentaje de inhibición de ensayos llevados a cabo por triplicado.

^b Los resultados se presentan como la media $\pm$ SEM del tiempo de coagulación del plasma en segundos. El control positivo presentó un tiempo de coagulación de $26,57 \pm 1,89$ s.

^c Los resultados se presentan como la media $\pm$ SEM del halo de inhibición de crecimiento del respectivo microorganismo. De cada extracto fueron utilizados 25 mg/mL. El cloranfenicol presentó halos de inhibición del crecimiento de $3,1 \pm 0,06$ cm y $2,97 \pm 0,03$ cm para *S. aureus* y *E. coli*, respectivamente.

Inhibición de la actividad proteolítica sobre la caseína

M. indica mostró capacidad inhibitoria del efecto proteolítico sobre caseína inducido por el veneno de *B. asper*, independiente de la cantidad de extracto utilizado, mientras que *V. vinifera* en relación 1:10 presentó el mayor efecto neutralizante ($71,57 \pm 5,62$) y en esta dosis no presenta diferencia significativa con el extracto de *M. indica* en las dosis ensayadas; adicionalmente la uva reveló que su efecto protector depende de la cantidad de extracto. Por otro lado *C. sinensis* exhibió los porcentajes mas bajos de inhibición (Véase figura 2 A y tabla 1).

Contra el efecto proteolítico sobre caseína inducido por el veneno de *P. nasutum*, todos los extractos presentan capacidad inhibitoria dependiente de la cantidad de extracto utilizado; sin embargo, *V. vinifera* en relación 1:10 sigue siendo el extracto con mayor poder neutralizante ($71,46 \pm 5,38$), mientras que *C. sinensis* en relación 1:5 no mostró inhibición alguna (Véase figura 2 B y tabla 1). Ninguno de los extractos mostró actividad proteolítica sobre la caseína.

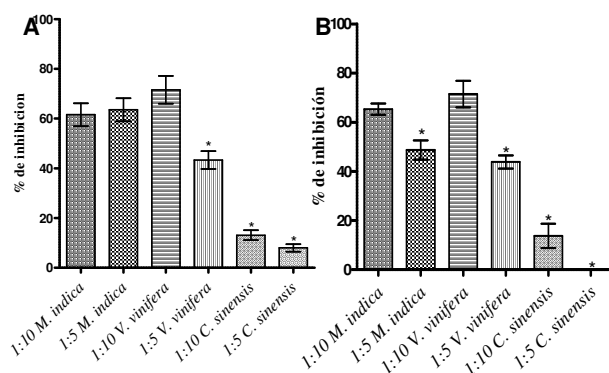


Figura 2. (A) Inhibición del efecto proteolítico del veneno de *B. asper* sobre la caseína. **(B)** Inhibición del efecto proteolítico del veneno de *P. nasutum* sobre la caseína. *Representa diferencia significativa con respecto a *V. vinifera* en una relación 1:10 ($p < 0,05$). En ambos ensayos se utilizó 0.6 mg veneno/mL como control positivo.

Inhibición de la actividad coagulante del veneno de *B. asper*

Un mg de veneno de *B. asper* indujo un tiempo de coagulación de $26,57 \pm 1,89$ s. De nuevo el extracto de *M. indica* en una relación 1:10 fue el que presentó mayor efecto inhibitorio, prolongando el tiempo de coagulación del plasma hasta $859,7 \pm 3,82$ s.

Tanto este extracto como el de *V. vinifera* mostraron capacidad neutralizante dependiente de la dosis, y diferencias significativas con respecto al control positivo en las cantidades de extracto utilizadas. Por su parte, *C. sinensis* no arrojó actividad alguna ($p > 0,05$) (Véase figura 3 y tabla 1). Ninguno de los extractos mostró actividad coagulante (tiempo de coagulación mayor 1800 s).

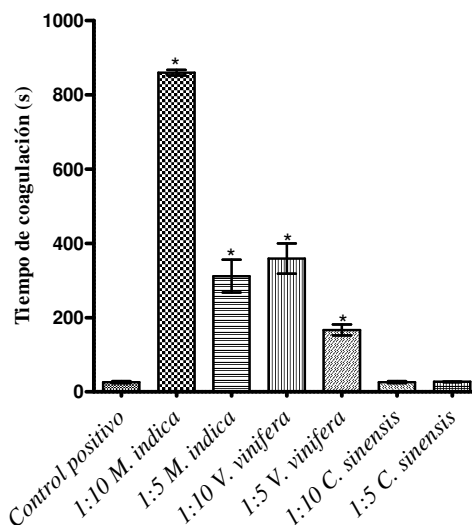


Figura 3. Inhibición de la actividad coagulante del veneno de *B. asper*. Un μ g de veneno indujo un tiempo de coagulación de $26,57 \pm 1,89$ s. *Representa diferencia significativa con respecto al control positivo ($p < 0,05$).

Electroforesis

En la electroforesis del veneno de *B. asper* y los extractos, se puede observar que *M. indica* causa posiblemente una precipitación de las proteínas del veneno que se encuentran en un rango de masas moleculares 26,8 y 70,7 KDa aproximadamente; al mismo tiempo este extracto y *C. sinensis* disminuyen la intensidad de las proteínas alrededor de 17,4 y 18,2 KDa (Véase figura 4A carril 3 y 5). Así mismo, *V. vinifera* provoca una posible precipitación de todas las proteínas del veneno, aunque este efecto es menos marcado sobre las que se encuentran entre 17,4 y 18,2 KDa aproximadamente (Véase figura 4A carril 7).

En la electroforesis del veneno de *P. nasutum* y los extractos, se puede observar que *M. indica* posiblemente causa una precipitación de las proteínas del veneno que se encuentran en un rango de masas moleculares 79,4 y 26,9 KDa aproxima-

mente, al mismo tiempo disminuye la intensidad de las proteínas de alrededor de 17,4 y 20,1 KDa (Véase figura 4B carril 3). Por otro lado, *C. sinensis* disminuye la intensidad de las proteínas del veneno que se encuentran cerca de 17,4 KDa (Véase figura 4B carril 5). Así mismo, *V. vinifera* provoca una posible precipitación de todas las proteínas del veneno, aunque este efecto es menos marcado sobre las que se encuentran alrededor de 17,4 KDa (Véase figura 4B carril 8). Finalmente todos los extractos causan

una desaparición de las proteínas del veneno que están alrededor de 14,4 KDa.

Por otro lado, el extracto de *M. indica* no presenta proteínas visualizables en el SDS-PAGE (Véase figura 4B carril 4), mientras que los de *C. sinensis* y *V. vinifera* muestran proteínas con pesos moleculares de 67,4; 36,5 y 28,8 KDa; y 38,9 y 40,7 KDa, respectivamente, las cuales se superponen con las del veneno cuando son corridos conjuntamente (Véase figura 4 B carriles 6 y 8).

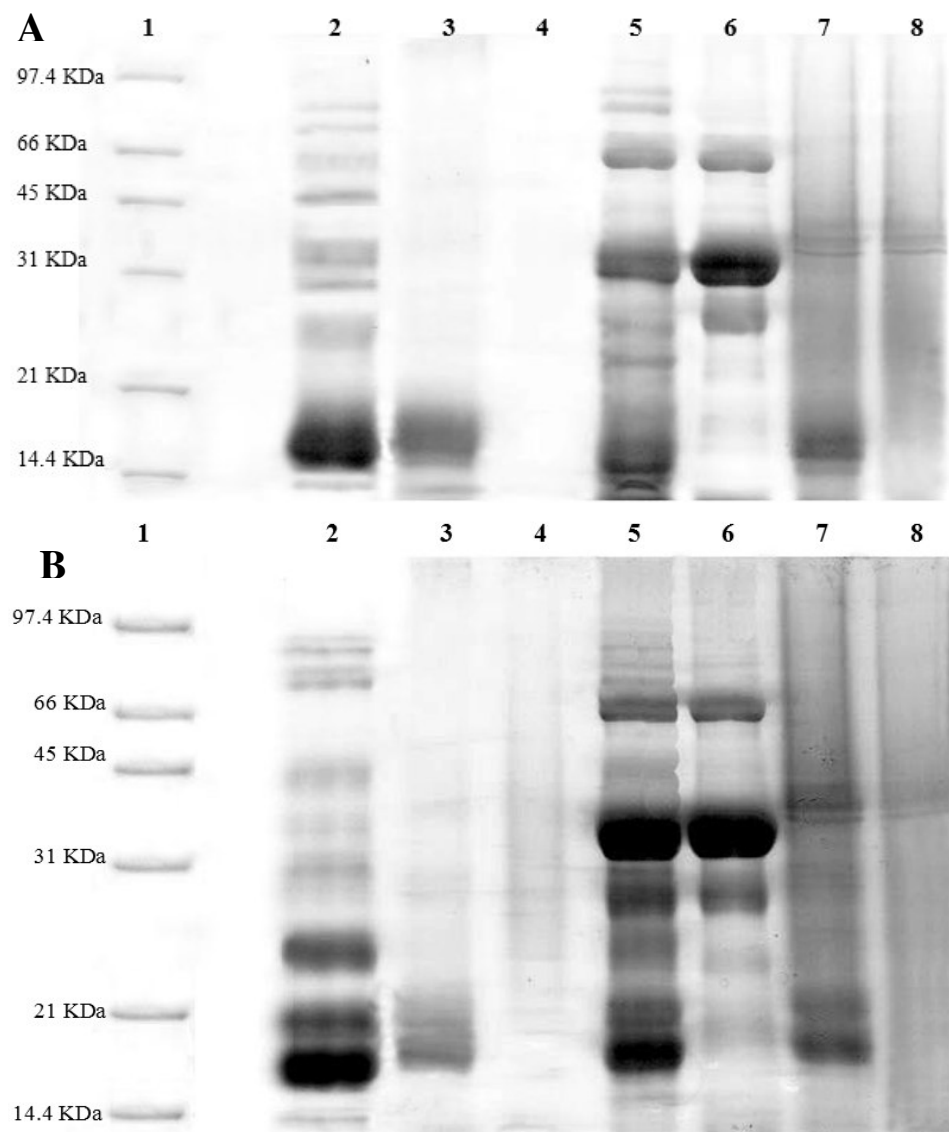


Figura 4. A. Electroforesis del veneno de *B. asper* con los diferentes extractos. 1 Marcadores de peso molecular, 2 Veneno, 3 *M. indica* + *B. asper*, 4 *M. indica*, 5 *C. sinensis* + *B. asper*, 6 *C. sinensis*, 7 *V. vinifera* + *B. asper*, 8 *V. vinifera*. B. Electroforesis del veneno de *P. nasutum* con los diferentes extractos. 1 Marcadores de peso molecular, 2 Veneno, 3 *M. indica* + *P. nasutum*, 4 *M. indica*, 5 *C. sinensis* + *P. nasutum*, 6 *C. sinensis*, 7 *V. vinifera* + *P. nasutum*, 8 *V. vinifera*. En todos los casos 40 μ g de veneno se incubaron con 400 μ g de cada extracto (relación 1:10) durante 30 minutos a 37°C, y posteriormente fueron corridos en geles de poliacrilamida al 12 % y revelados con azul de Coomassie.

Actividad antimicrobiana de los extractos

El cloranfenicol presentó halos de inhibición del crecimiento de *S. aureus* y *E. coli* de $3,1 \pm 0,06$ cm y $2,97 \pm 0,03$ cm, respectivamente. A pesar de que ningún extracto tuvo actividad comparable con el control positivo, *M. indica* mostró el mayor efecto inhibitorio sobre el crecimiento de los dos microorganismos utilizados en la prueba ($1,78 \pm 0,09$ y $1,40 \pm 0,06$, que representa el $59,62 \pm 3,52$ y $35,37 \pm 11,84\%$ de la actividad del cloranfenicol respectivamente); mientras que *V. vinifera* exhibió comportamiento similar contra las dos bacterias y *C. sinensis* no manifestó actividad apreciable (Véase figura 5 y tabla 1).

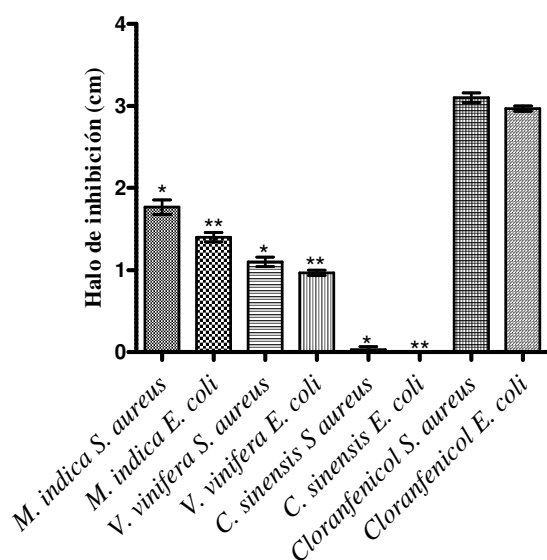


Figura 5. Inhibición del crecimiento de *S. aureus* y *E. coli*. Los extractos fueron usados en una concentración de 25 mg/mL, como controles positivo y negativo se usó cloranfenicol y DMSO respectivamente. *Representa diferencia significativa con respecto a cloranfenicol *S. aureus*. **Representa diferencia significativa con respecto a cloranfenicol *E. coli*.

Marcha fitoquímica preliminar

Los extractos de *M. indica* y *V. vinifera* comparten metabolitos secundarios, como taninos, leucoantocinidinas, antocianidinas, y saponinas, mientras que *C. sinensis* solo tiene presencia de esteroides/triterpenoides y leucoantocianidinas (Véase tabla 2).

Tabla 2. Marcha fitoquímica preliminar y cuantificación de proteínas.

Metabolito secundario	<i>Mangifera indica</i>	<i>Vitis vinifera</i>	<i>Citrus sinensis</i>
Alcaloides	Negativo	Negativo	Negativo
Esteroides y/o triterpenoides	Negativo	Negativo	Positivo
Flavonoides	Negativo	Negativo	Negativo
Taninos	Positivo	Positivo	Negativo
Cumarinas	Negativo	Negativo	Negativo
Antocianidinas	Positivo	Positivo	Negativo
Cardiotónicos	Negativo	Positivo	Negativo
Saponinas	Positivo	Positivo	Negativo
Leucoantocianidinas	Positivo	Positivo	Positivo
Nafto y antraquinonas	Negativo	Negativo	Negativo

DISCUSIÓN

Desde hace más de un siglo el tratamiento específico para el accidente ofídico es el antiveneno (4), pero dado que su capacidad neutralizante de los efectos locales del envenenamiento es limitada y que con frecuencia produce reacciones adversas de hipersensibilidad y requiere exigentes condiciones de almacenamiento y administración (4, 5), se impone la búsqueda de alternativas terapéuticas para este problema de salud pública. En este orden de ideas, y aprovechando el conocimiento etnobotánico de los habitantes de las áreas rurales de diferentes partes del mundo, las plantas se convierten en herramientas de primera mano en la búsqueda de dichas alternativas. Es así entonces, como el extracto de *Eclipta prostrata* y su componente wedelolactona, inhibieron *in vitro* el efecto hemorrágico del veneno de *Bothrops jararaca*, *Bothrops jararacussu* y *Lachesis muta* (24), así como el efecto letal y miotóxico de *Crotalus durissus terrificus* (25). Mientras que los extractos de *Piper peltatum* y *P. umbellatum* inhibieron la actividad enzimática de la miotoxina I del veneno de *Bothrops atrox*, uno de sus compuestos, el 4-nerolidilcatecol, demostró una reducción en la actividad enzimática y de los efectos miotóxico y edematizante inducidos por esta toxina; de este compuesto se demostró que inducía modificaciones de tipo covalente en la molécula de miotoxina (26). Así mismo, los extractos de las raíces de *Hemidesmus indicus*, *Pluchea indica*, *Vitex negundo*, *Embllica officinalis* y *Aristolochia indica*, neutralizaron *in vitro* e *in vivo* el efecto hemorrágico inducido por el veneno de *Vipera russellii*, *Echis carina-*

tus, *Naja naja*, *Ophiophagus hannah* (27), mientras que los extractos de los rizomas de *Heliconia curtispatha*, *Heliconia latispatha* y *Heliconia wagneriana* inhibieron las actividades hemolítica indirecta, proteolítica y coagulante del veneno de *B. asper* (28).

En este estudio se pretendió demostrar cómo residuos de la agroindustria, como son las semillas de *V. vinifera* y *C. sinensis*, y la almendra de *M. indica*, tienen capacidad neutralizante de algunos efectos enzimáticos inducidos por los venenos de *B. asper* y *P. nasutum*, así como poder inhibitorio del crecimiento de algunos microorganismos que se encuentran presentes en los colmillos y la boca de las serpientes, que después de la mordedura pueden llevar a una infección secundaria que agrave los signos y síntomas locales del envenenamiento. Es así como se determinó que el extracto de *M. indica* es un excelente inhibidor de la actividad de PLA₂ de los venenos probados, y de la actividad coagulante del veneno de *B. asper*, además de poseer una buena capacidad neutralizante del efecto proteolítico de las dos víboras colombianas. Aunque el mecanismo de acción para este extracto todavía no es claro, se podría pensar que los taninos, compuestos presentes en él, tal y como se demostró en este y otros estudios (29, 30), juegan un papel importante en este aspecto. Posiblemente la precipitación de proteínas observada en la electroforesis de *M. indica* con los venenos de *B. asper* y *P. nasutum*, haga parte de un mecanismo no selectivo, que corresponde a la formación de complejos de diferentes masas moleculares entre estos compuestos polifenólicos y las diferentes proteínas de los venenos (31). Adicionalmente se podría pensar en un mecanismo más específico, tal y como se demostró en el estudio de Leanpolchareanchai y colaboradores (12), donde justamente fueron utilizados este mismo extracto y sus taninos, pentagalolglucopiranos, metilgalato y ácido gálico, para inhibir la actividad de PLA₂, de hialuronidasa, de L-aminoácido oxidasa y hemorrágica, de los venenos de *Calloselasma rhodostoma* y *Naja naja kaouthia*; allí, al realizar estudios de docking molecular se observó que estos compuestos formaban puentes de hidrógeno con los aminoácidos Asp49 e His48 del sitio activo y con Tyr28, Gly30, Gly32 y Gly33 del loop de unión al calcio de las PLA₂, que posteriormente podrían bloquear la acción enzimática de estas proteínas. Asimismo, la quelación de cationes como el Ca²⁺ y el Zn²⁺, cofactores para las PLA₂ y las metaloproteasas respectivamente, enzimas de los venenos que conjuntamente desencadenan la

mayor parte del daño local (32, 33), podría ser un tercer mecanismo propuesto, ya que este extracto ha mostrado dicha actividad sobre iones de Fe²⁺ (29).

Por otro lado, el extracto de la semilla de *V. vinifera* mostró buena capacidad inhibitoria de la actividad de PLA₂ de los venenos de *B. asper* y *P. nasutum*, con porcentajes de inhibición de 21,86 ± 1,44 y 85,15 ± 2,89 respectivamente, en una relación 1:10, probablemente porque el último de los venenos posee menor cantidad de estas proteínas y/o las que posee son menos potentes que las de *B. asper* (18). En cuanto a la actividad proteolítica, *V. vinifera* presentó capacidad neutralizante comparable contra los venenos de *B. asper* y *P. nasutum*, con porcentajes de inhibición de 71,96 ± 5,38 y 71,57 ± 5,62 respectivamente, en una relación 1:10. Estos resultados son semejantes a los obtenidos con este extracto frente a la actividad proteolítica del veneno de *Echis carinatus* (70% de inhibición en una relación 1:10) (10). En cambio, contra el veneno de *Daboia russelli* fue suficiente una relación 1:8 para obtener una neutralización del 100% de la actividad mencionada (11); todo lo anterior teniendo en cuenta que las condiciones experimentales fueron similares. Tales variaciones en estos resultados podrían deberse a diferentes patrones de expresión de proteasas, que, como se conoce, pueden variar de especie a especie (34). Asimismo, frente a la actividad coagulante del veneno de *B. asper*, *V. vinifera* en una relación 1:10 prolongó el tiempo de coagulación hasta 359,0 ± 40,65 s (aproximadamente 13 veces el tiempo del control positivo). Al comparar estos resultados con los obtenidos contra *E. carinatus* se debió utilizar una relación veneno extracto de 1:45, para alcanzar aproximadamente el mismo tiempo de coagulación (10). Las diferencias en los resultados frente a este efecto podrían indicar una variación en los patrones de expresión de enzimas procoagulantes en los venenos mencionados, tales como serinproteasas tipo trombina (35). Adicionalmente, las proteínas observadas en el SDS-PAGE de *V. vinifera* (38,9 y 40,7 KDa) pueden corresponder a subunidades del componente proteico mayoritario de la semilla de esta fruta, el cual posee una masa molecular de aproximadamente 400 KDa y pertenece al grupo de las globulinas; a su vez, dicho compuesto está constituido por subunidades de diferentes masas moleculares que interactúan no covalentemente, entre las que se encuentran unas de 38-44 KDa (36), que quizás correspondan a las observadas en este estudio. La razón por la cual las otras subuni-

dades de dicha proteína no son registradas, podría ser que el método utilizado para la preparación del extracto desnaturaliza la proteína en cuestión y las otras subunidades no son solubles en etanol.

Aunque el mecanismo de inhibición de *V. vinifera* no es claro aún, posiblemente, al igual que para *M. indica*, los taninos –compuestos de los cuales se demostró presencia en este extracto, tanto en este como en otros estudios (37)– podrían actuar como complejantes inespecíficos de las proteínas del veneno (31); además, se ha demostrado que el extracto de la semilla de *V. vinifera* también tiene capacidad quelante sobre cationes (38).

Si bien el extracto de frutos maduros de *Citrus limon* mostró resultados promisorios como agente neutralizante de algunos efectos del veneno de *B. atrox* (7, 8), el extracto etanólico de las semillas de *C. sinensis* no dio resultados muy prometedores en la inhibición de efectos de los venenos de *B. asper* y *P. nasutum*, posiblemente por las diferencias que existen en la droga utilizada y por el hecho de que aunque dichas plantas pertenecen al mismo género y familia, son especies diferentes.

A pesar de que el uso de la profilaxis antimicrobiana en el accidente ofídico aún se encuentra en discusión (39), y que las infecciones bacterianas en el sitio de la mordedura son una importante causa de complicaciones en este evento, ya que se calcula que el 7-15% de los pacientes desarrollan infecciones superficiales o profundas (40), la utilización de agentes con acción conjunta sobre las toxinas del veneno y los microorganismos causantes de dichas infecciones, conduciría a una mejora en el pronóstico de los signos y síntomas locales de los pacientes. Es aquí entonces donde los extractos de *M. indica* y *V. vinifera* cobran gran importancia, porque como fue demostrado en este y en otros estudios, poseen ambas actividades (10 - 12, 41, 42). Son necesarios trabajos futuros para el aislamiento de las moléculas responsables de las acciones descritas, ya que el hallazgo de estas sustancias permite profundizar en los mecanismos de acción de las toxinas y posibilita el desarrollo de productos farmacéuticos que mejoren el pronóstico y la evolución de pacientes que han sufrido un accidente ofídico, además de conducir a un mejor aprovechamiento de estos residuos agroindustriales.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Antioquia por el soporte financiero que nos brindó y a nuestro compañero Juan Carlos Quintana por la lectura crítica de este manuscrito.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Otero R, Tobón GS, Gómez LT, Osorio R, Valderrama R, Hoyos D, *et al.* Accidente ofídico en Antioquia y Chocó. Aspectos clínicos y epidemiológicos (marzo 1989-febrero 1990). Acta Médica Colombiana. 1992a; 14 (4): 229-249.
- Fan HW, Cardoso JLC. Clinical toxicology of snakebite in South America. En: Meier J & White J (Editores), Handbook of Clinical Toxicology of Animal, Venoms and Poisons. Boca Ratón: CRC Press; 1995. pp. 667-688.
- Gutiérrez JM. Clinical toxicology of snakebite in Central America. En: Meier J & White J (Editores), Handbook of Clinical Toxicology of Animal, Venoms and Poisons. Boca Ratón, FL: CRC Press; 1995. pp. 645-665.
- Bon C. The serum - therapie was discovered 100 years ago. Toxicol. 1996; 34 (2): 142-143.
- Lomonte B, Lungren J, Johansson B, Bagge U. The dynamics of local tissue damage induced by *Bothrops asper* snake venom and myotoxin II on the mouse cremaster muscle: an intravital and electron microscopic study. Toxicol. 1994; 32 (1): 41-55.
- Otero R, Núñez V, Jiménez SL, Fonnegra R, Osorio RG, García ME, *et al.* Snakebites and ethnobotany in the northwest region of Colombia: Part I: Traditional use of plants. J Ethnopharmacol. 2000a; 71 (3): 493-504.
- Otero R, Núñez V, Barona J, Fonnegra R, Jiménez SL, Osorio RG, *et al.* Snakebites and ethnobotany in the northwest region of Colombia: Part II: Neutralization of lethal and enzymatic effects of *Bothrops atrox* venom. J Ethnopharmacol. 2000b; 71 (3): 505-511.
- Otero R, Núñez V, Barona J, Fonnegra R, Jiménez SL, Osorio RG, *et al.* Snakebites and ethnobotany in the northwest region of Colombia. Part III: Neutralization of the haemorrhagic effect of *Bothrops atrox* venom. J Ethnopharmacol. 2000c; 73 (1-2): 233-241.
- Samy RP, Thwin MM, Gopalakrishnakone P, Ignacimuthu S. Ethnobotanical survey of folk plants for the treatment of snakebites in Southern part of Tamilnadu, India. J Ethnopharmacol. 2008; 115 (2): 302-312.
- Mahadeswaraswamy YH, Nagaraju S, Girish KS, Kemparaju K. Local Tissue Destruction and Procoagulation Properties of *Echis carinatus* venom: Inhibition by *Vitis vinifera* Seed Methanol Extract. Phytother Res. 2008; 22 (7): 963-969.
- Mahadeswaraswamy YH, Devaraja S, Kumar MS, Goutham YNJ, Kemparaju K. Inhibition of local effects of Indian *Daboia/Vipera russelli* venom by the methanolic extract of grape (*Vitis vinifera* L.) seeds. Indian J Biochem Biophys. 2009; 46 (2): 154-160.
- Leanpolchareanchai J, Pithayanukul P, Bavovada R, Saparpakorn P. Molecular docking studies and anti-enzymatic activities of Thai mango seed kernel extract against snake venoms. Molecules. 2009; 14 (4): 1404-1422.
- Laufenberg G, Kunz B, Nystroem M. Transformation of vegetable waste into value added products: (A) the upgrading concept; (B) practical implementations. Bioresour Technol. 2003; 87 (2): 167-198.
- Arroyo O, Bolaños R, Muñoz G. The Bacterial Flora of Venoms and Mouth Cavities of Costa Rican Snakes. Bull Pan Am Health Organ. 1980; 14 (3): 280-285.

15. Bolaños R, Brunker T. Bacteriología del veneno y de las glándulas veneníferas de *Bothrops asper* y *Crotalus durissus durissus* de Costa Rica. Rev Cost Cienc Med. 1983; 4 (supl 1): 27-29.
16. Gutiérrez JM, Avila C, Rojas C, Cerdas L. An alternative in vitro method for testing the toxicity of the polyvalent antivenom produced in Costa Rica. Toxicon. 1988; 26 (4): 411-413.
17. Lomonte B, Gutiérrez JM. La actividad proteolítica de los venenos de serpientes de Costa Rica sobre la caseína. Rev Biol Trop. 1983; 31 (1): 37-40.
18. Otero R, Osorio RG, Valderrama R, Giraldo CA. Efectos farmacológicos y enzimáticos de los venenos de serpientes de Antioquia y Chocó (Colombia). Toxicon. 1992b; 30 (5/6): 611-620.
19. Theakston RDG, Reid HA. Development of simple standard assay procedures for the characterization of snake venoms. Bull World Health Organ. 1983; 61 (6): 949-956.
20. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 1970; 227 (5259): 680-685.
21. Du Toit EA, Rautenbach M. A sensitive standardised microgel well diffusion assay for the determination of antimicrobial activity. J Microbiol Methods. 2000; 42 (2): 159-165.
22. Sanabria A. Análisis fitoquímico preliminar. Bogotá: Departamento de Farmacia. Universidad Nacional de Colombia; 1983.
23. Domínguez XA. Métodos de investigación fitoquímica. México: Limusa; 1979.
24. Melo PA, Ownby CL. Ability of wedelolactone, heparin, and p-bromophenacyl bromide to antagonize the myotoxic effects of two crotaline venoms and their PLA₂ myotoxins. Toxicon. 1999; 37 (1): 199-215.
25. Mors WB, Nascimento MC, Parente JP, Da Silva MH, Melo PA, Suárez-Kurtz G. Neutralization of lethal and myotoxic activities of South American rattlesnake venom by extracts and constituents of the plant *Eclipta prostrata* (Asteraceae). Toxicon. 1989; 27 (9): 1003-1009.
26. Núñez V, Castro V, Murillo R, Ponce-Soto LA, Merfor I. Inhibitory effects of *Piper umbellatum* and *Piper peltatum* extracts towards myotoxic phospholipases A₂ from Bothrops snake venoms: isolation of 4-nerolidylcatechol as active principle. Phytochemistry. 2005; 66 (9): 1017-1025.
27. Alam MI, Gómez A. Indian medicinal plants active against Elapidae and Viperidae snake venoms. En: Abstracts First International Congress on Envenomations and their Treatments. París: Institut Pasteur; 1995.
28. Pereañez JA, Jiménez S, Quintana JC, Núñez V, Fernández M, Restrepo Y. Inhibición de las actividades proteolítica, coagulante y hemolítica indirecta inducidas por el veneno de *Bothrops asper* por extractos etanólicos de tres especies de heliconias. Vitae. 2008; 15 (1): 157-164.
29. Nithitanakool S, Pithayanukul P, Bavovada R. Antioxidant and hepatoprotective activities of Thai mango seed kernel extract. Planta Med. 2009; DOI: 10.1055/s-0029-1185507.
30. Arogba SS. Mango (*Mangifera indica*) kernel: chromatographic analysis of the tannin, and stability study of the associated polyphenol oxidase activity. J Food Comp Anal. 2000; 13 (2): 149-156.
31. Haslam E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: Possible modes of action. J Nat Prod. 1996; 59 (2): 205-215.
32. Gutiérrez JM, Ownby CL. Skeletal muscle degeneration induced by venom phospholipases A₂: insights into the mechanisms of local and systemic myotoxicity. Toxicon. 2003; 42 (8): 915-931.
33. Gutiérrez JM, Rucavado A. Snake venom metalloproteinases: Their role in the pathogenesis of local tissue damage. Biochemie. 2000; 82 (9-10): 841-850.
34. Fox JW, Serrano SM. Insights into and speculations about snake venom metalloproteinase (SVMP) synthesis, folding and disulfide bond formation and their contribution to venom complexity. FEBS J. 2008; 275 (12): 3016-3030.
35. Kini RM. Anticoagulant proteins from snake venoms: structure, function and mechanism. Biochem J. 2006; 397 (3): 377-387.
36. Gianazza E, Tedesco G, Villa P, Scienza A, Cargnello G, Righetti PG, et al. Characterization of the major proteins from *Vitis vinifera* seeds. Plant Science. 1989; 62 (1): 73-81.
37. Peng Z, Hayasaka Y, Iland PG, Sefton M, Hoj P, Waters EJ. Quantitative Analysis of Polymeric Procyanidins (Tannins) from Grape (*Vitis vinifera*) Seeds by Reverse Phase High-Performance Liquid Chromatography. J Agric Food Chem. 2001; 49 (1): 26-31.
38. Maffei-Facino R, Carini M, Aldini G, Berti F, Rossoni G, Bombardelli E, et al. Procyanidines from *Vitis vinifera* seeds protect rabbit heart from ischemia/reperfusion injury: Antioxidant intervention and/or iron and copper sequestering ability. Planta Med. 1996; 62 (6): 495-502.
39. Cuesta J, Peña L, Zuluaga AF. ¿Es necesaria la profilaxis antibiótica en la ofidiotoxicosis? Infect. 2008; 12 (1): 280-289.
40. Kerrigan KR, Mertz BL, Nelson SJ, Dye JD. Antibiotic prophylaxis for pit viper envenomation: prospective, controlled trial. World J Surg. 1997; 21 (4): 369-373.
41. Kabuki T, Nakajima H, Arai M, Ueda S, Kuwabara Y, Dosako S. Characterization of novel antimicrobial compounds from mango (*Mangifera indica* L.) kernel seeds. Food Chemistry. 2000; 71 (1): 61-66.
42. Jayaprakasha GK, Selvi T, Sakariah KK. Antibacterial and antioxidant activities of grape (*Vitis vinifera*) seed extracts. Food Res Int. 2003; 36 (2): 117-122.