NEUTRALIZACIÓN DEL VENENO DE *Bothrops asper* CON PLANTAS DE LA FAMILIA ZINGIBERACEAE UTILIZADAS EN LA ETNOBOTÁNICA DEL ACCIDENTE OFÍDICO EN EL ORIENTE ANTIOQUEÑO

JULIETA VÁSQUEZ ESCOBAR

Trabajo de investigación presentado para optar al título de Magister en Ciencias Farmacéuticas

Dirigida por:

JUAN CARLOS ALARCÓN PÉREZ
Biólogo, MsC en Biología, Doctor en Biología
Coordinador Programa de Ofidismo / Escorpionismo
Universidad de Antioquia
Docente Facultad de Química Farmacéutica

Posgrado en Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias
Facultad de Química Farmacéutica
Universidad de Antioquia
2012

A mis padres.

Nadie ha recibido más afecto

ni un apoyo tan incondicional

como el que ustedes me han dado.

Gracias por creer en mí.

Agradecimientos

- A los curanderos Epifanio Echavarría y Daría Guisao (San Rafael); Miguel Ángel Betancur y Gustavo Henao (San Luis) y Eduardo Atehortúa, José Giraldo y Luis González (San Carlos) por compartir su tiempo y conocimientos.

- A mis padres y mi hermana, por estar conmigo y entenderme cuando necesite de ellos.
- A mi tutor, Dr. Juan Carlos Alarcón Pérez, por su paciencia, orientación y apoyo.
- A los profesores Silvia Luz Jiménez y Mauricio Sánchez, por su colaboración y orientación.
- A Gelmy Luz Ciro y Leidy Johana Vargas por su paciencia, su apoyo, sus consejos y todos los regaños.
- A Juan Carlos Quintana por su paciencia, enseñanzas, apoyo y colaboración.
- A mis amigos (Caro, Joha A, Cata, Cris, Joha BG, Adri, Abba, Aleja, Jose, Memo), sin su amistad, su apoyo y su comprensión, terminar no habría sido posible. Gracias por entender mi ausencia, mis locuras e intentar regresarme a la cordura.
- A Ana María Henao por soportarme en las salidas de campo.
- A Isabel Cristina Gómez, Jessica Paola Rey, Daniela María Marín y Jefferson Oneiver Romero, por su participación en el proyecto “Evaluación *in vitro* de la capacidad neutralizante de las plantas utilizadas para el tratamiento de las mordeduras se serpientes en el oriente antioqueño” en el que se enmarca el presente trabajo.
- A Maritza Fernández y Arley Camilo Patiño por su ayuda en la realización de las pruebas i*n vivo.*
- A mis compañeros del Programa de Ofidismo/Escorpionismo y del Serpentario de la Universidad de Antioquia.
- Al Comité para el Desarrollo de la Investigación -CODI- por la financiación del proyecto “Evaluación in vitro de la capacidad neutralizante de las plantas utilizadas para el tratamiento de las mordeduras se serpientes en el oriente antioqueño”.

Tabla de contenido

Índice de tablas *5*

Índice de figuras *6*

INTRODUCCIÓN 7

Selección de familia Zingiberaceae *13*

METODOLOGÍA *18*

Zona de estudio *18*

Colección, preservación y determinación del material botánico *19*

Preparación de Extractos *20*

Venenos *20*

Inhibición in vitro de los efectos del veneno *21*

Perfil Electroforético *23*

Reconocimiento de metabolitos secundarios *23*

Inhibición in vivo de los efectos del veneno *23*

Análisis estadístico *25*

RESULTADOS *26*

Información etnobotánica *26*

Preparación de los tratamientos 31

Vías de administración, posología y terapias adjuntas 32

Tratamiento mágico-religioso 33

Especies utilizadas pertenecientes a la familia Zingiberaceae *34*

Inhibición in vitro de los efectos del veneno *38*

Inhibición del efecto proteolítico 38

Inhibición del efecto coagulante 39

Inhibición del efecto hemolítico indirecto 40

Perfil electroforético 41

Inhibición *in vivo* del efecto hemorrágico del veneno 42

Inhibición *in vivo* de la actividad letal del veneno 45

Evaluación de la toxicidad aguda de los extractos etanólicos 45

Reconocimiento de metabolitos secundarios *46*

DISCUSIÓN *47*
CONCLUSIONES *53*
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS *55*
Anexo A - ENCUESTA A CURANDEROS DEL ORIENTE ANTIOQUEÑO *71*
Anexo B - Permiso de Colecta e Investigación *73*
Anexo C - Aval de Comité de Ética para la Experimentación con Animales *74*

Índice de tablas

Tabla 1. *Características y neutralización de los antivenenos antiviperinos registrados en Colombia (invima.gov.co; 2013)* *9*

Tabla 2. *Plantas usadas para el tratamiento de las mordeduras de serpientes en el oriente antioqueño.* *30*

Tabla 3. *Inhibición del efecto proteolítico de Bothrops asper sobre azocaseína por extractos etanólicos liofilizados de plantas de la familia Zingiberaceae.* *39*

Tabla 4. *Diferencias de tiempos de coagulación de Bothrops asper por extractos etanólicos liofilizados de plantas de la familia Zingiberaceae.* *40*

Tabla 5. *Inhibición del efecto hemolítico indirecto de Bothrops asper por extractos etanólicos liofilizados de plantas de la familia Zingiberaceae.* *41*

Tabla 6. *Inhibición del efecto hemorrágico de Bothrops asper por extractos etanólicos liofilizados de plantas de la familia Zingiberaceae.* *42*

Tabla 7. *Sobrevivencia de ratones inyectados (i.p.) con extractos etanólicos de la plantas de la familia Zingiberaceae.* *45*

Tabla 8. *Metabolitos secundarios presentes en los extractos etanólicos de las plantas de la familia Zingiberaceae que poseen actividad inhibitoria de los efectos del veneno de B. asper in vitro.* *46*

Índice de figuras

Figura 1. *Zona geográfica de estudio.* *19*

Figura 2. *SDS-PAGE. Inhibición del veneno de B. asper por extractos de plantas de la familia Zingiberaceae.* *42*

Figura 3. *Inhibición del efecto hemorrágico inducido por el veneno de B. asper por extractos etanólicos liofilizados de plantas de la familia Zingiberaceae.* *43*

Figura 4. *Halos hemorrágicos inducidos por el veneno de B. asper y su inhibición por el extracto de hojas de R. alpinia.* *44*

Figura 5. *Inhibición in vivo de la actividad hemorrágica inducida por el veneno de B. asper por los extractos de tallos y hojas de Renealmia alpinia.* *44*

INTRODUCCIÓN

El accidente ofídico es un grave problema de salud pública en áreas tropicales y subtropicales del mundo (Mebs, 2002), pues se producen aproximadamente 5'500.000 accidentes/año, con síntomas de envenenamiento en más de la mitad de las mordeduras y una tasa de letalidad que puede ser superior al 2% (Pineda & Rengifo, 2002; Stock *et al.*, 2007); de estos, ocurren en Latinoamérica cerca de 150.000 envenenamientos/año, con una letalidad superior al 3%, y en Colombia, se presentan más de 4.114 mordeduras/año, con unos índices de muerte cercanos al 0,9% (INS, 2012).

En este país, una de las zonas geográficas más afectadas es el departamento de Antioquia (letalidad superior al 0.8%; INS, 2012), y dentro de este, las regiones de Urabá, Nordeste, Suroeste y Oriente; destacándose en ésta última, los municipios de San Rafael, San Carlos y San Luis (Orozco, 2009; DSSA, 2011). Estos datos y cifras resultan de la exigencia de notificación del accidente al Grupo de Zoonosis del Instituto Nacional de Salud, ya que al comportase como un problema prioritario de Salud Pública, requiere un manejo inmediato, con notificaciones obligatorias de la aparición de casos por municipio y departamento que deben realizarse con periodicidad semanal por parte de las entidades de carácter público y privado que captan los eventos de interés en salud pública (INS, 2011); sin embargo, estas cifras podrían ser más elevadas si se incluyeran los casos no registrados por factores, tales como, el escaso acceso a sistemas de información de zonas rurales aisladas, o el empleo inicial, luego de la mordedura, de medicinas alternativas propias del acervo cultural de algunas comunidades (Otero *et al,* 2001).

La gran mayoría de los accidentes que ocurren en Colombia son causados por serpientes del género *Bothrops* (90-95% de los envenenamientos) (Otero, 2007), cuyos venenos son mezclas biológicamente activas de polipéptidos y proteínas (Pineda & Rengifo, 2002), aminoácidos libres, ácidos orgánicos (especialmente citrato), azúcares (monosacáridos como la glucosa, galactosa y manosa), lípidos (ácidos grasos), nucleósidos, nucleótidos (adenosina, guanosina, inosina), aminas biogénicas (acetilcolina y otras colaminas), agua, detritos celulares, iones y bacterias (Meier & Stocker, 1995; Otero 2007), que provocan

envenenamientos con sintomatología local como edema, flictenas, necrosis de tejido muscular y conectivo; y manifestaciones sistémicas que pueden generar nefrotoxicidad y generalmente involucran alteración de la hemostasia con pequeños sangrados o choque cardiovascular por hemorragia severa (Gowda, 1997; Kamiguti & Cardoso, 1989; Lomonte *et al.,* 1994; Otero, 2002; Santoro & Sano-Martins, 2004).

Para contrarrestar el envenenamiento, se cuenta desde hace más de un siglo con el antiveneno, el único tratamiento científicamente validado y efectivo (Bon, 1996; Calmette, 1986) y cuyas dosis dependen del grado de envenenamiento que presente un paciente (leve, moderado o grave).

En Colombia, el suministro del antiveneno y la atención de los pacientes con ofidiotoxicosis son obligatorios, por lo que se debe garantizar el personal técnico necesario para realizar las actividades de prevención y control desde el nivel municipal al departamental y la consecución de suero antiofídico. Este se considera un medicamento esencial cubierto por el Plan Obligatorio de Salud –POS– y su suministro debe estar garantizado tanto para la población amparada por las Empresas Promotoras de Salud (EPS contributivas y subsidiadas), como para la población no asegurada, razón por la que el inventario de suero antiofídico debe permanecer actualizado, al igual que las redes prestadoras de servicios que garanticen el manejo oportuno de pacientes (CNSSS, 2002, 2009; CRES, 2011).

El suero antiofídico puede ser polivalente o monovalente. El suero polivalente se emplea para el tratamiento de envenenamientos ocasionados por los géneros *Bothrops* (mapaná), *Crotalus* (cascabel) y, en algunos casos por reacción cruzada, *Lachesis* (verrugoso); mientras que el suero monovalente se utiliza en el envenenamiento de un solo tipo de serpiente (antibotrópico, anticrotálico, antilachésico o anticoral).

En años anteriores, en el país, el suero antiofídico polivalente se adicionó al listado de Medicamentos Vitales No Disponibles, del Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos –INVIMA– (INVIMA, 2011); pero solo permanecen en el listado los sueros antielapídicos (corales (*Micrurus*) y la serpiente marina (*Pelamis platurus*)) (INVIMA, 2013) y se producen y comercializan el suero polivalente y el suero monovalente

antibotrópico, por lo que para el tratamiento de ofidiotoxicósis causadas por *Crotalus* y *Lachesis*, se debe emplear el antiveneno polivalente (INS, 2011).

Los antivenenos disponibles en Colombia, difieren en sus características bioquímicas, potencia y hasta en la forma de presentación, pues algunos son líquidos con vida media de dos años y exigencia de cadena de frio (2-8 °C), y otros liofilizados, con vida media de tres años y posibilidad de conservación a temperatura ambiente en un lugar fresco (< 35 °C), sin exposición al sol (Tabla 1) (Otero, 2007).

Antiveneno	Suero antiofídico polivalente	Suero antiofídico polivalente liofilizado	Antivipmyn Tri®
Fabricante	Instituto Nacional de Salud (Santa fe de Bogotá D.C.)	Laboratorios Probiol S.A. (Santa fe de Bogotá D.C.)	Instituto Bioclón S.A. de C.V. (México D.F.)
Forma farmacéutica	Sin clasificar (Solución inyectable)	Polvo	Polvo
Principio activo	Inmunoglobulinas especificas neutralizantes del veneno del género *Crotalus* (10 mg) y del género *Bothrops* (70 mg)	Inmunoglobulinas de origen equino que neutralizan como mínimo el veneno: *Bothrops atrox* y *B. asper* (25 mg); *Lachesis muta* y *Crotalus durissus* (10 mg)	FAB (F(AB)2 +FAB) (85 %), componentes de bajo peso molecular (15 %), 780 DL_{50} de veneno deshidratado de *Bothrops* sp (30 mg), 220 DL_{50} de veneno deshidratado de *Crotalus* sp (7 mg), 200DL_{50} de veneno deshidratado de *Lachesis* sp (15 mg)
Vías de administración	Intravenosa	Intravenosa - Intramuscular	Parenteral
Indicaciones	Inmunoglobulinas específicas para el tratamiento del envenenamiento causado por de los géneros *Bothrops* y *Crotalus* sp.	Neutraliza el veneno de serpientes de los géneros *Bothrops*, *Crotalus* y *Lachesis*	Neutraliza el veneno de serpientes de los géneros *Bothrops*, *Crotalus* y *Lachesis*
Vida util	2 años	3 años	3 años
Registro sanitario	INVIMA 2012M-0013350	INVIMA 2001M-0000844	INVIMA 2004M-0003093
Modalidad	Fabricar y vender	Fabricar y vender	Importar y vender

Tabla 1. Características y neutralización de los antivenenos antiviperinos registrados en Colombia (invima.gov.co; 2013)

Los antivenenos, resultan parcialmente eficaces en la neutralización de las manifestaciones locales (Gutiérrez & Lomonte, 2003; Oliveira *et al.*, 2005; Otero *et al.*, 1996, 2002, 2006; Otero-Patiño *et al.*, 2012) por factores tales como la disparidad en la cinética y dinámica del veneno y del antiveneno, la separación de los complejos

veneno/antiveneno, la rápida acción de las toxinas en el lugar de la mordedura y el retardo en la administración del antiveneno (Otero, 2002). Además, son inmunoglobulinas heterólogas derivadas de plasmas hiperinmunes de équidos o caprinos inmunizados con veneno, y pueden desencadenar reacciones de hipersensibilidad tempranas (24 horas posteriores a la aplicación) o tardías (entre 5 y 24 días después), siendo las primeras, anafilácticas, anafilactoides (90%) o pirogénicas por contaminación de los productos durante la manufactura o la manipulación; y las segundas (con ocurrencia en el 30 a 75% de los pacientes) con manifestaciones que pueden incluir fiebre, artralgia, prurito, linfadenopatía y proteinuria (Otero, 1998, 2007; Patiño *et al.*, 2012).

A la fecha, se desconocen las cifras sobre las necesidades reales de antivenenos en el país, pero considerando los registros de accidentalidad y las necesidades del sector pecuario; éstas no deben distar de las manifestadas en años anteriores, en las que se consideraba una demanda cercana a las 53.000 ampollas/año, de las cuales el 53,66% se debían destinar para el sector salud y el restante para el sector pecuario (Otero *et al.*, 2001).

Actualmente, la mayoría de los pacientes mordidos por serpientes reciben tratamiento con el suero antiofídico (76,46% de los casos registrados en 2012) y el empleado no es siempre el adecuado, especialmente en accidentes con serpientes del género *Micrurus*, lo cual puede deberse a la falta de identificación de la serpiente agresora y de clasificación adecuada del accidente acorde con el cuadro clínico (INS, 2012). Al ser el antiveneno un medicamento costoso y de difícil producción, se ha visto que en otros países, los laboratorios de producción de antiveneno, solo suplen la demanda de sus países de origen, existiendo, además, la dificultad común en no contar con un eficiente mecanismo de distribución de los antivenenos en zonas rurales alejadas en las que se presenta mayor número de accidentes; en Colombia, la distribución de los sueros es una obligación de los prestadores de servicios de salud, y como tal es vigilada por la Superintendencia Nacional de Salud; sin embargo, no se cuenta con un inventario a nivel país respecto a la distribución de antivenenos (Zambrano, 2012).

La alta frecuencia de accidentes en zonas rurales, en las que son comunes las medicinas tradicionales, ha promovido el uso de éstas, como alternativa inicial, en el tratamiento de los envenenamientos, empleándose estas medidas tradicionales aproximadamente en el

80% de la población mundial (Alam & Gomes, 2003; Chopra *et al.,* 1956; Kirtikar & Basu, 1975; Lewis & Elvin-Lewis, 1977; Nadkarni, 1976; Oliveira *et al.*, 2005; Usher, 1974) y nuestro país no escapa a esa realidad, pues cerca del 30% de las víctimas de mordedura de serpiente utilizan algún tipo de práctica no médica en el momento del accidente, siendo frecuente el empleo de plantas medicinales (Abadía, 1977; Flórez, 1951; Fonnegra & Roldan, 1994; INS, 2012; Otero *et al,* 2001); de hecho, en un estudio realizado por Otero *et al.* (2000 a), con diferentes comunidades rurales de los departamentos de Antioquia y Chocó, se colectaron un total de 75 plantas utilizadas, empleando extractos acuosos o etanólicos, para el tratamiento de las mordeduras de serpientes por los chamanes de cada región, y de éstas, cerca del 50% mostraron neutralización (moderada o alta) del efecto hemorrágico inducido por el veneno de *B. asper*, y un 16% de ellas, inhibieron el efecto letal del veneno (1,5 i.p. DL_{50}= 99,3 μg) (Otero *et al,* 2000b, c).

Los estudios etnobotánicos analizan las relaciones entre grupos humanos y entorno vegetal, evaluando la utilidad de las plantas en el establecimiento de relaciones de vida social (rituales, juegos, música, entre otros), o su importancia e impacto, en aspectos tales como: elaboración de instrumentos y herramientas, protección (viviendas, vestuarios), alimentación, curación de las enfermedades y comunicación con sus congéneres (papeles, tintas, tatuajes, tejidos); por ello, se complementa con la etnofarmacología para describir el uso tradicional y los efectos de las sustancias naturales dotadas de actividad biológica, y con la ecoetnobotánica, para estudiar la interacción de los conglomerados humanos con el mundo vegetal, la agricultura sostenible y su equilibrio con el medio ambiente y la botánica económica (Cotton, 1996).

En consecuencia, los estudios etnobotánicos ofrecen beneficios potenciales en la solución a problemas de salud actuales en términos locales y globales, pues permiten la identificación y promoción de productos naturales, el reconocimiento de especies vulnerables objeto de esfuerzos específicos de conservación (Cotton, 1996), la obtención y síntesis de medicamentos clínicamente efectivos tales como, anfetaminas, barbitúricos, sulfonamidas y tranquilizantes, o porque permiten la identificación de principios activos útiles como analgésicos o antineoplásicos particularmente eficaces en el tratamiento de leucemias, linfomas, neuroblastomas y otros tipos de cáncer (Phillipson, 2007).

Como resultado de estudios etnobotánicos relacionados con el accidente ofídico, se cuenta con un número importante de plantas de diferentes familias, potencialmente inhibidoras de los efectos tóxicos del veneno de *B. asper* (Castro *et al,.* 1999; Melo *et al.,* 1994; Mors *et al.,* 1989; Núñez *et al.,* 2005; Reyes-Chilpa *et al.,* 1994); sea por la presencia de principios activos propios de algunas plantas (Núñez *et al.,* 2005; Reyes-Chilpa *et al.,* 1994), o por la de algunos componentes como los flavonoides, que pueden quelar los átomos de zinc, requeridos por las metaloproteinasas del veneno de las serpientes y que son las responsables de la actividad hemorrágica del veneno (Castro *et al.,* 1999).

Varias investigaciones han reportado la presencia de actividad anti-hemorrágica, anti-letal, anti-desfibrinante y anti-miotóxica en los extractos de *Eclipta prostrata* y el componente cumestano wedelolactona, que inhibe *in vitro* el efecto hemorrágico del veneno de *Bothrops jararaca*, *Bothrops jararacussu* y *Lachesis muta* (Melo & Ownby, 1999), e inhibe los efectos letal y miotóxico de *Crotalus durissus terrificus* (Melo *et al.,* 1994; Mors *et al.*, 1989).

Otros ejemplos de lo anterior, son los extractos de *Piper peltatum* y *P. umbelatum* que poseen capacidad inhibitoria de la actividad enzimática de la miotoxina I del veneno de *Bothrops atrox*; y uno de sus componentes, el 4-nerodilcatecol, reduce la actividad enzimática y los efectos miotóxico y edematizante inducidos por esta toxina; a través de modificaciones de tipo covalente en la molécula de miotoxina (Núñez *et al*., 2005).

Además, los extractos de las raíces de *Hemidesmus indicus*, *Pluchea indica*, *Vitex negundo*, *Emblica officinalis* y *Aristolochia indica*, inhiben *in vitro* e *in vivo* el efecto hemorrágico inducido por los venenos de *Vipera russellii*, *Echis carinatus*, *Naja naja*, *Ophiophagus hannah* (Alam & Gómez, 1995); y los extractos de raíz de *Hemidesmus indicus*, de las cuales se aísla un compuesto denominado HI-RVIF, que al ser administrado vía intravenosa a ratones, presenta inhibición significativa de los efectos letal, hemorrágico y desfibrinante ocasionados por el veneno de *Vipera russellii* (Alam *et al.*, 1994).

Selección de familia Zingiberaceae

Algunas de estas plantas utilizadas por comunidades campesinas, indígenas y negras, en el tratamiento de la mordedura de serpientes, pertenecen a las zingiberáceas (Lans *et al.*, 2001; Otero *et al.*, 2000 a, b, c). Se seleccionaron los pertenecientes a ésta familia (*Alpinia purpurata*, *Renealmia alpinia*, *Renealmia aromatica*, *Renealmia cernua* y *Renealmia nicolaioides*) por la cantidad de ellas informadas por los curanderos del oriente antioqueño (17,24%); por su amplia distribución en el territorio antioqueño; porque en estudios previos se validó la actividad inhibitoria de los efectos del veneno de *B. asper* de una de las más utilizadas, en diferentes aspectos en la etnobotánica a nivel mundial (*Renealmia alpinia*), aunque con estructuras vegetales diferentes (Otero *et al.,* 2000a, b, c).

Asimismo, en estudios realizados para evaluar la capacidad inhibitoria de las zingiberáceas sobre el veneno de las serpientes, se ha logrado aislar de las raíces de *Curcuma longa* la ar-turmenona, un potente inhibidor del efecto hemorrágico inducido por el veneno de *Bothrops jararaca* y del efecto letal del veneno de *Crotalus durissus terrificus* (Ferreira *et al.*, 1992), y gran cantidad de especies de esta familia botánica han sido reportadas, en diferentes partes del trópico como Brasil y Nepal, como antidoto en envenenamientos ocasionados por animales, dentro de estas especies reportadas con este uso, se encuentran *Amomum aromaticum* (semillas), *Amomum subulatum* (vainas), *Curcuma aromatica* (rizoma), *Curcuma caesia* (rizoma y semillas), *Curcuma longa* (rizoma), *Elettaria cardamomum* (semillas y vainas), *Hedychium coronarium* (planta entera), *Hedychium spicatum* (rizoma), *Zingiber officinale* (rizoma), *Zingiber montanum* (rizoma) (Coe & Anderson, 2005; Molander *et al.*, 2012; Samy *et al.*, 2008; Tuntiwachwuttikul *et al.*, 2000; Tushar *et al.,* 2010).

Las zingiberáceas, una de las más importantes familias del trópico, y reconocidas en estudios botánicos realizados en países como Brasil, Nicaragua, India, Perú y Surinam (Coe & Anderson, 2005; Coelho-Ferreira, 2009; Milliken & Albert, 1997; Ruysschaert et al., 2009; Sanz-Biset et al., 2009; Tushar et al., 2010) son conocidas por sus usos como especias y tintes, por sus resinas y aceites esenciales (Ibarra-Manríquez et al., 1997; Molander et al., 2012; Tuntiwachwuttikul et al., 2000) que las convierten en recurso natural

con impacto en la alimentación, medicina y perfumes (Jantan et al., 2003; Tuntiwachwuttikul et al., 2000).

Además, es una familia con muchas especies utilizadas en la medicina tradicional y herbolaria alrededor del mundo a la que se le atribuyen actividades contra enfermedades generales (Lentz *et al.*, 1998; Ruysschaert *et al.*, 2009; Sanz-Biset *et al.*, 2009; Tchuendem *et al.*, 1999; Tuntiwachwuttikul *et al*, 2000), crónicas (Tuntiwachwuttikul *et al*, 2000; Victório *et al.*, 2009), gastrointestinales (Brandão *et al.*, 2008; Lentz *et al.*, 1998; Ruysschaert *et al.*, 2009; Sanz-Biset *et al.*, 2009), respiratorias (Sanz-Biset *et al.*, 2009; Villaflores *et al.*, 2010); problemas neurofisiológicos (Ruysschaert *et al.*, 2009) o dérmicos (Brandão *et al.*, 2008; Lentz *et al.,* 1998; Sanz-Biset *et al.*, 2009; Tuntiwachwuttikul *et al.*, 2000); y como, antimicrobiana (Tuntiwachwuttikul *et al*, 2000; Villaflores *et al.*, 2010), antiparasitaria (Tuntiwachwuttikul *et al.*, 2000; Ruysschaert *et al.*, 2009; Tchuendem *et al.*, 1999) e insecticida (Tuntiwachwuttikul *et al.*, 2000), y probablemente debido a su contenido metabólico en el que se incluyen **mono- y sesquiterpenoides** (Tchuendem *et al.*, 1999; Tuntiwachwuttikul *et al.*, 2000), **Diarilheptanoides** (Sabitha *et al.*, 2007; Tuntiwachwuttikul *et al.*, 2000), **Aril alcaloides, Fenilpropanoides, Fenilbutanoides, Óxido de ciclohexano** (Tuntiwachwuttikul *et al.*, 2000) y **Flavonoides** (Gu *et al.*, 2002; Su *et al.*, 2003)..

Aun así, a pesar de la importancia de la familia Zingiberaceae en el trópico y la medicina tradicional, la información existente en la literatura, sobre las cinco especies reportadas en el oriente antioqueño, y estudiadas en este trabajo, no es amplia para todas ellas, especialmente en cuanto a sus usos etnomédicos y contenido de metabólitos; resaltando la siguiente información para cada especie:

Alpinia purpurata (Vieill.) K. Schum.

Esta matandrea, empleada en el tratamiento de la tuberculosis, y con actividad larvicida, antibacterial, vasodilatadora, antioxidante y anticancerígena (Chan *et al.*, 2008; Raj *et al.*, 2012; Santos *et al.*, 2012; Victório et al., 2009; Villaflores *et al.*, 2010), es conocida como ginger rojo o platanillo, y apetecida por sus brácteas rojas y su fácil crecimiento, lo que ha ocasionado que la mayoría de los estudios realizados a esta especie estén orientados a para su preservación pos cosecha (Chantrachit & Paull, 1998). A la fecha no hay registros

de su actividad como antídoto para los envenenamientos ocasionados por las serpientes, pero por los estudios realizados a esta planta se conoce que la composición química de flores, hojas y rizomas, se encuentran aceites esenciales monoterpenos α- y β-pineno y β-cariofileno, diterpenos tipo labdano, y el alcaloide piperina; además de carbohidratos, flavonoides (kumatakina), fenoles, taninos, sitosteril glicosidos y las antocianidinas, shogaol y gingerol, que han demostrado resultados promisorios en el tratamiento de enfermedades inflamatorias como la artritis (Sirat & Liamen, 1995; Subramanian & Suja, 2011; Villaflores *et al.*, 2010; Zoghbi *et al.*, 1999).

Renealmia alpinia (Rottb.) Maas

De las plantas de la familia Zingiberaceae reportadas en los municipios de estudio para el tratamiento de la mordedura de serpiente, ésta ha sido previamente reportada con este uso en la región noroccidental de Colombia y su actividad inhibitoria del veneno de *Bothrops asper* se ha validado experimentalmente (Otero *et al.*, 2000 a, b, c); sin embargo, el uso del tallo como chupadera y de las hojas no era conocido.

Las validaciones experimentales de los extractos de esta planta, han demostrado efectividad como analgésico, protección contra los efectos letales de *B. asper* (Patiño *et al.*, 2012) y como inhibidor de los efectos, hemorrágico, edematógeno y de la fosfolipasa A_2 (Lomonte *et al.*, 2009; Otero *et al.*, 2000a, b; Núñez *et al.*, 2004). Dentro de los componentes descritos en esta planta, se encuentran diterpen labdanos, cumarinas y taninos (Alarcón *et al.*, 2008; Yang *et al*., 1999; Zhou *et al.,* 1997), y probablemente por ello se le atribuyen usos como febrífugo, antifúngico, repelente de ectoparásitos, para el tratamiento de heridas, molestias estomacales, ulceras malignas, hemorragias, infecciones vaginales y epilepsia (Coe, 2008; de Mesquita et al., 2009; Lans et al., 2001; Ruysschaert et al., 2009; Valadeau *et al.*, 2009) y con actividad leishmanicida (Valadeau *et al.*, 2009).

Renealmia aromatica (Aubl.) Griseb.

Los reportes de usos etnobotánicos, o de contenido metabólico de esta especie, son escasos; de hecho, solamente se conoce su utilización por parte de las comunidades quechuas como un agente modificador del olor corporal para la caza o la pesca (Sanz-

Biset *et al.,* 2009); y la comunidad Pech en Honduras, como limpiadores de la piel y como antiinflamatorio (Lentz *et al.*; 1998).

Renealmia cernua (Sw. Ex Roem. & Schult) J.F. Macbr.

De esta especie no se conocen usos etnobotánicos, ni su contenido de metabolitos, ni actividades biológicas; solamente se conoce de su distribución geográfica que incluye la selva tropical de la Costa Atlántica, Costa Rica y Panamá (Butler *et al.*, 2008; Särkinen *et al.*, 2007)

Renealmia nicolaioides Loes.

Planta a la que no se le han descrito usos etnobotánicos, y en los pocos estudios realizados se han logrado aislar dos ciclohexenil chalconas, la panduratin A y la nicolaioidesin C, la primera con efecto inhibitorio de las proteasas NS3 de los virus HIV-1 y Dengue-2, y con actividad de aminopeptidasas N e inducción de la muerte celular en células cancerígenas; mientras que la segunda resulta inductora de la quinona reductasa en cultivos celulares de hepatoma y de muerte celular en células humanas de cáncer pancreático (Gu *et al.*, 2002; Majumdar *et al.*, 2011).

Con los antecedentes descritos y la necesidad de validar los usos tradicionales de las plantas, éste trabajo evaluó la inhibición de las actividades coagulante, proteolítica y hemolítica indirecta del veneno de la serpiente *B. asper* con extractos de algunas plantas de la familia Zingiberaceae utilizadas por la medicina tradicional en los municipios antioqueños de San Luis, San Carlos y San Rafael. Estas poblaciones presentaron, durante el 2011, 16, 12 y 16 casos, respectivamente, de mordeduras de serpiente, equivales al 61,1% de los accidentes ocurridos en el oriente antioqueño y al 8,4% de los accidentes presentados en Antioquia (DSSA, 2011); además cuentan con una gran riqueza florística y alta incidencia en la accidentalidad con ofidios (Orozco, 2009, 2010).

Se evalúa así el efecto de estos extractos etanólicos, para validar el posible efecto inhibitorio de las plantas, sobre los 3 grupos principales de toxinas del veneno: las

serinproteasas, con el ensayo de actividad coagulante; metaloproteinasas, con el ensayo de proteólisis, y fosfolipasas A2, con el ensayo de hemólisis indirecta, como pruebas iniciales de tamizaje, para validar el uso tradicional de las plantas para el tratamiento de las mordeduras de serpientes y no las formas de preparación de los tratamientos. Y se favorece, con esta validación, al potencial desarrollo, a mediano plazo, de un producto fitoterapéutico profiláctico que puede ser útil en la seroterapia convencional y puede convertirse en un recurso de primera mano, una vez aprobados todos sus estudios de seguridad y eficacia, al alcance de las comunidades rurales distantes, contribuyendo al tratamiento de los efectos locales típicos del envenenamiento en los que el antiveneno posee un efecto parcial.

METODOLOGÍA

Zona de estudio

Se realizaron 10 salidas de campo a los municipios de San Carlos (06°11'N 74°59'O), San Rafael (06°18'N 75°01'O) y San Luis (06°02'N 74°59'O) (oriente antioqueño) (Figura 1), ubicados entre 695 y 2000 msnm, con una temperatura promedio de 24 °C y una densidad poblacional entre 36 y 68 hab/Km^2, generalmente dedicada a la agricultura, ganadería, industria maderera y turismo.

Para este estudio se tomaron como participantes conocedores del tema algunos curanderos de cada municipio, pues son personas reconocidas por su comunidad con experiencia en la realización de curaciones de enfermedades con productos naturales. A estos curanderos se les aplicó una encuesta semi-estructurada[1] (Anexo A: Encuesta a curanderos del suroeste antioqueño) (Alexiades, 1996) con el fin de obtener información sobre los especímenes vegetales utilizados en el tratamiento inicial de las mordeduras de serpientes y sobre las partes empleadas, las formas de uso y las dosis aplicadas, además de indagar sobre los aspectos que incluyen las creencias que han surgido alrededor de estos tratamientos tradicionales.

[1] Una encuesta semi-estructurada es aquella que se realiza de forma flexible pero está basada en el uso de una entrevista guía: una lista de preguntas y tópicos que necesitan cubrirse, usualmente en un orden particular. El entrevistador es libre de seguir pistas pero tiene una agenda específica. Ésta forma de entrevista es particularmente útil una vez se identifican las preguntas de búsqueda específicas y se requiere de mayor detalle (Alexiades, 1996).

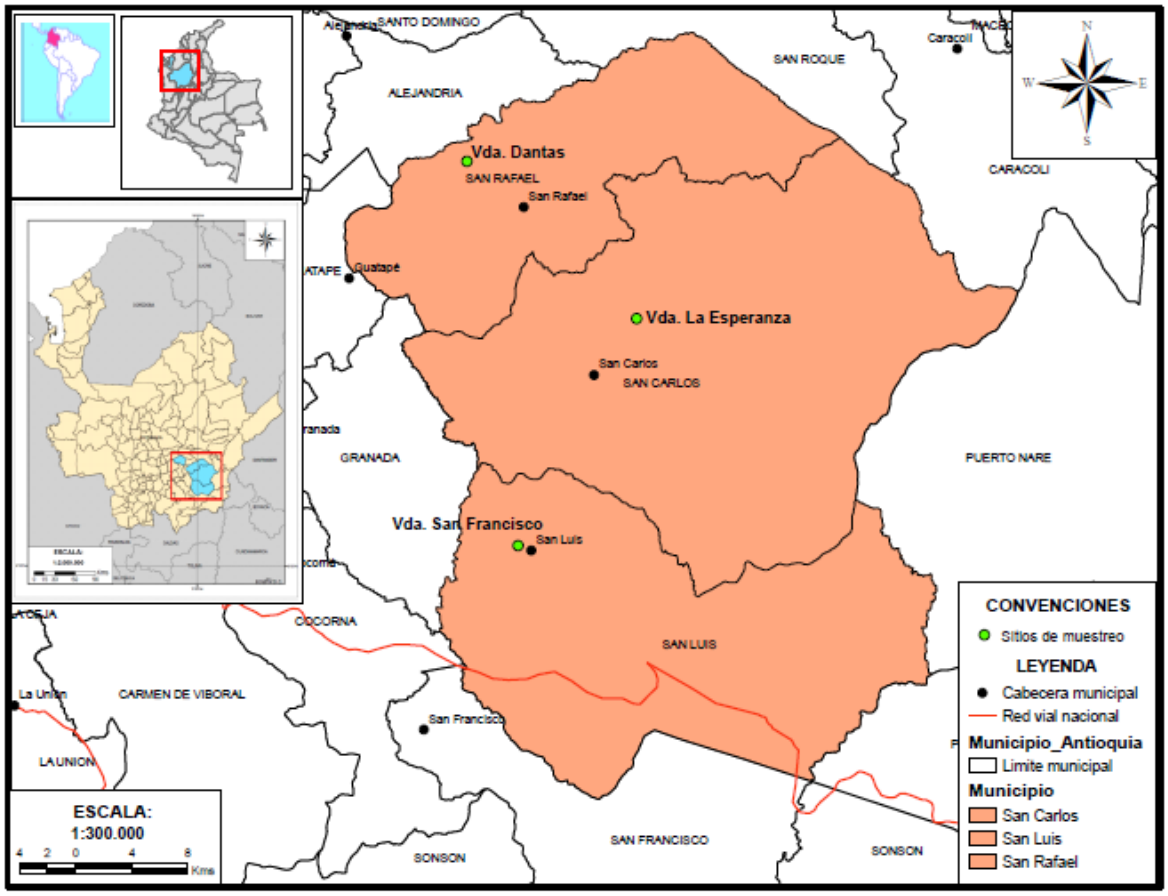

Figura 1. Zona geográfica de estudio.
A: Ubicación Colombia en Sur América. **B**: Mapa político de Colombia, señalando Antioquia en el cuadro rojo. **C**: Mapa político de Antioquia destacando la región oriente y los municipios de estudio. **D**: Mapa específico de los municipios de San Carlos, San Luis y San Rafael. Elaborado por Víctor Manuel Salgado Quintana Geógrafo UNAL, Bogotá.

Colección, preservación y determinación del material botánico

Las plantas reportadas para el tratamiento de las mordeduras de serpientes fueron colectadas en estado adulto, con sus estructuras de reproducción completas y en compañía de cada uno de los curanderos en sus huertos caseros o en la vegetación próxima a sus viviendas, tomando las respectivas notas de campo (fecha, ubicación exacta y breve descripción de caracteres generales) para facilitar la determinación taxonómica (Anexo B – Permiso de Colecta e Investigación) (Fonnegra, 1990; Gentry, 1993). A este material vegetal se le asignó un número interno de colección, se prensó, se

preservó en alcohol al 70% y finalmente se secó (75°C/48 horas), antes de la remisión al Herbario de la Universidad de Antioquia -HUA- para su determinación, registro e ingreso a la colección (ver Tabla 1).

Preparación de Extractos

Con ayuda de los entrevistados, se colectaron 350 g. de material fresco correspondiente a las partes utilizadas de cada una de las plantas seleccionadas (hojas, tallos y raíz de *Alpinia purpurata*; hojas y tallos de *Renealmia alpinia*, hojas y tallos de *Renealmia aromatica*, tallos de *Renealmia cernua* y hojas y tallos de *Renealmia nicolaioides*) y el material fue secado, molido, sometido a percolación con etanol al 96% durante 48 horas. Posteriormente, la solución etanólica se concentró en un rotaevaporador (BÜCHI R – 124, Flawil, Switzerland), liofilizado (Labconco® 6L, Kasas City, USA) y almacenado a -20 °C hasta su utilización (Weniger, 1991).

Ésta metodología de preparación se seleccionó, ya que por la polaridad del etanol, pueden obtenerse la mayoría de los metabolitos, especialmente los compuestos polifenólicos, presentes en el material vegetal; además, no se emplean los procedimientos descritos por los curanderos, porque algunos de ellos supondrían ola degradación de metabolitos susceptibles a altas temperaturas.

Venenos

A partir de especímenes mantenidos en el Serpentario de la Universidad de Antioquia (Medellín, Colombia) e incluidos en la colección COLBIOFAR 149, registrada ante el Instituto de Investigaciones de Recursos Biológicos Alexander Von Humboldt, se obtuvo el veneno por extracción manual de 40 ejemplares adultos sanos de *B. asper* procedentes de diferentes regiones de Colombia. Esta mezcla de constituyó de esta manera para disminuir el impacto que tiene la alta variabilidad y poder tener pruebas cuyos resultados puedan ser utilizados en cualquier parte del país. Esta mezcla homogénea, una vez

centrifugada (2500 rpm durante 10 minutos a 4 °C) y liofilizada, fue congelada a -20 °C hasta su utilización.

Inhibición *in vitro* de los efectos del veneno

Para determinar *in vitro* las actividades inhibitorias de los efectos coagulante, proteolítico y hemolítico, se prepararon mezclas (peso/peso) de las dosis mínimas de veneno inductoras de los efectos y extracto de las plantas en proporciones 1:5, 1:10 y 1:20, se almacenaron a 37 °C durante 30 minutos y una vez concluido éste tiempo se realizaron los ensayos, de acuerdo a los siguientes protocolos.

- **Actividad Proteolítica:** en ensayos realizados por triplicado y empleando como Dosis Proteolítica mínima –DPm- del veneno 10 µg (Otero *et al.*, 2000c), se prepararon muestras de veneno y extracto (en las proporciones mencionadas) disueltas en amortiguador Tris-HCl pH 7,4, de las cuales 20 µL se mezclaron con 100 µL azocaseína (10 mg/ml) y se transfirieron a temperatura de incubación por espacio de 90 minutos. Al término de éste tiempo, se detuvo la reacción por adición de 200 µL de ácido tricloroacético (5%). La mezcla se centrifugó (2500 rpm/5 min), y al sobrenadante obtenido se le agregó 100 µL NaOH (0.5 M). La actividad proteolítica se determinó por cuantificación de la absorbancia (450nm), utilizando amortiguador Tris-HCl pH 7,4 como blanco y los extractos de las muestras y el veneno, tratados con el procedimiento descrito anteriormente, como controles negativos y positivo, respectivamente (Wang *et al.,* 2004). Los resultados se expresan como el porcentaje de inhibición del efecto proteolítico. Este se determinó con la diferencia entre las absorbancias obtenidas para el extracto y la mezcla veneno-extracto y calculando el porcentaje de inhibición tomando la absorbancia del veneno como el 100% de proteólisis.

- **Actividad Coagulante:** en ensayos realizados por triplicado, se mezclaron 300 µL de plasma humano, colectados en tubos con citrato de sodio (3,9 g/dL), con 50 µL de una solución de un microgramo de veneno con las diferentes cantidades (5, 10 y 20 µg) de cada uno de los extractos de la planta en Solución Buffer de Fosfato –

PBS- pH 7,2 (Núñez *et al.*, 2004). Se utilizó la solución tampón, los extractos de las muestras y el veneno, tratados con el procedimiento antes descrito, como controles negativos y positivo, respectivamente. Se estableció como referencia el tiempo de inicio de la coagulación (Theakston & Reid*,* 1983; Gené *et al.,* 1989). Los resultados corresponden a la diferencia entre el tiempo de coagulación obtenido con las mezclas veneno-extracto y el tiempo de coagulación del control positivo de cada mezcla.

- **Actividad Hemolítica Indirecta:** se definió como Dosis Hemolítica indirecta mínima – DHIm – (2,2 µg para el veneno de *B. asper*) la menor cantidad de veneno que, luego de 20 horas a temperatura de incubación, genera un halo de 20 mm (Otero *et al.*, 1992). La actividad hemolítica indirecta se determinó en ensayos realizados por triplicado, las mezclas preparadas de veneno y extracto (en las proporciones mencionadas) disueltas en PBS pH 7,2, se incubaron por un periodo de 30 minutos y se transfirieron a platos con agarosa-yema de huevo-eritrocitos (Gutiérrez *et al.*, 1988), en los que permanecieron en una cámara húmeda por 20 horas a temperatura de incubación (37 °C). Pasado éste tiempo, se determinó la actividad inhibitoria por medición de los halos de inhibición, utilizando PBS pH 7,2, los extractos de las muestras y el veneno, sometidos al procedimiento descrito, como controles negativos y positivos respectivamente. como control positivo, los cuales fueron sometidos al procedimiento ya descrito. Los resultados se expresan como el porcentaje de inhibición del efecto hemolítico indirecto, calculado tomando la medida del diámetro del halo de hemólisis del veneno como el 100% de hemólisis.

Los extractos que, en las pruebas de inhibición de los efectos del veneno *in vitro*, mostraron actividad se sometieron además a los siguientes ensayos: perfil electroforético, reconocimiento de metabolitos secundarios y ensayos de inhibición de los efectos inducidos por el veneno *in vivo.*

Perfil Electroforético

Con el fin de evidenciar *in vitro* el efecto de cada uno de los extractos sobre el veneno y elucidar algún posible mecanismo de acción de los extractos, veneno de *B. asper*, extractos de las plantas, mezclas (veneno y extractos de plantas) y un marcador de peso molecular (5 – 250 kDa), se dispusieron sobre geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 12% en condiciones no desnaturalizantes y se sometieron al campo eléctrico (100 V) durante 60 minutos. Finalmente, se tiñeron las proteínas con azul de Coomassie R-250, se lavó el exceso de éste (Laemmli, 1970) y se analizaron las masas moleculares.

Reconocimiento de metabolitos secundarios

El análisis fitoquímico preliminar de los extractos para la detección de metabolitos secundarios como alcaloides, compuestos caridiotónicos, esteroides y/o terpenoides, flavonoides, quinonas, antocianidinas, saponinas, taninos y cumarinas, se efectuó de acuerdo con los métodos descritos por Sanabria (1983) y Domínguez (1979).

Inhibición *in vivo* de los efectos del veneno

- **Animales y mantenimiento:** ratones Swiss Webster (machos y hembras) criados en el bioterio en la zona de animales convencionales, SIU, de la Universidad de Antioquia, con 3 a 4 semanas de edad y un peso promedio entre 18 – 20 g, sin diferencia de peso superior al 20%. Los animales mantenidos con libre acceso a agua y alimentación (Rodentina, Purina, Colombia) se transfirieron a una sala de experimentación con condiciones controladas (26 ± 3 °C, humedad relativa de 60%, y fotoperiodicidad de día largo con 12 horas luz/12 horas oscuridad) (Anexo C – Aval de Comité de Éstica para la Experimentación con Animales).

- **Inhibición *in vivo* de la actividad hemorrágica del veneno:** para determinar *in vivo* la actividad inhibitoria del efecto hemorrágico, se prepararon mezclas (peso/peso) de 2 Dosis Hemorrágicas mínimas del veneno (3,2 µg/ratón) y extractos de las plantas en proporción 1:20 disueltas en 0,1 mL de PBS pH 7,2, se almacenaron a 37 °C durante 30 minutos y una vez concluido éste tiempo se inyectó un grupo de cuatro ratones, por cada uno de los extractos (vía subcutánea), que fueron sacrificados dos horas después de este procedimiento. Los halos de hemorragia abdominal se cuantificaron, utilizando los extractos de las muestras como controles negativos inyectados en grupos de 4 ratones por extracto y el veneno como control positivo inyectado en un grupo de 2 ratones (Kondo *et al.*, 1960; Gutiérrez *et al*., 1981).

- **Inhibición *in vivo* de la actividad letal del veneno:** para determinar *in vivo* la actividad inhibitoria del efecto letal, se prepararon, durante tres días consecutivos, soluciones de extractos de las plantas en concentración de 75 mg/kg de peso del ratón disueltos en 500 µL de PBS pH 7.2, excepto para *R. alpinia* que se preparó en concentración 62,5 mg/Kg de peso del ratón. Estas soluciones fueron inyectadas, cada 24 horas ± 1 hora, a grupos de 7 ratones (vía intraperitoneal). Posteriormente, cuatro ratones de cada grupo fueron inyectados (vía intraperitoneal) con una solución de 1,5 Dosis Letales 50 del veneno (105 µg/ratón), mientras los tres restantes fueron inyectados con PBS pH 7,2 como control negativo. Administraciones de PBS pH 7,2 durante los tres primeros días y una administración en el cuarto día de 1,5 DL_{50} de veneno en el cuarto día a dos ratones, fue tomada como control positivo. Los ratones sobrevivientes fueron sacrificados 48 horas después de inoculados (Patiño *et al.*, 2012). Las modificaciones realizadas a la técnica de Inhibición in vivo de la actividad letal del veneno, corresponde a evaluar la eficacia del extracto, no en la búsqueda de un tratamiento que remplace el antiveneno; por el contrario, un tratamiento profiláctico.

- **Toxicidad aguda:** una dosis de 2000mg de extracto/Kg de peso, disueltos en 0.5 mL de Solución Buffer de Fosfato (PBS) pH 7.2, se inyectaron vía intraperitoneal (i.p) grupos de cuatro ratones, registrando las muertes en un plazo de tiempo posterior a la inyección no superior a 48 horas y sus cambios de peso al finalizar el

experimento. Administración de PBS pH 7,2 a dos ratones fue tomada como control negativo; método de Spearman-Karber (WHO, 1981; OECD, 2001).

Análisis estadístico

Los resultados de la pruebas, expresados como la media ± S.D. (desviación estándar), fueron sometidos a Análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido por un Test de Comparación Múltiple de Bonferroni para establecer diferencias entre las concentraciones empleadas en cada prueba y los resultados obtenidos de la mezcla de cada extracto con el veneno, considerando diferencias significativas con $p<0.05$.

Para la elaboración de las gráficas y el análisis estadístico se utilizó el software GraphPad Prism Versión 5.

RESULTADOS

Información etnobotánica

En los municipios de San Luis, San Carlos y San Rafael se entrevistaron, en diferentes ocasiones, a siete curanderos con edades comprendidas entre los 39 y 80 años ($\bar{X}$ = 54) y una experiencia en el tratamiento de accidente ofídico, manifiesta por ellos, de 16 a 40 años ($\bar{X}$ = 25,7), en los que han utilizado, con diferentes formas de preparación, de 2 a 11 plantas diferentes ($\bar{X}$ = 6,7). Una vez realizadas las entrevistas, se colectaron e identificaron 29 especies de plantas utilizadas (Tabla 2), 11 de las cuales (37,9%) no habían sido previamente reportadas como inhibitorias de los efectos tóxicos de venenos de serpientes en la literatura consultada utilizando las bases de datos Science Direct y PubMed.

No.	Familia/Especie Consecutivo de colección	Nombre vernáculo en el área de estudio	Origen	No. curanderos	Parte utilizada	Forma de administración	Forma de preparación	Vía de administración
AMARYLLIDACEAE								
1	*Allium sativum* L. ** 179216	Ajo	Introducida	1	Bulbo	Cataplasma	Decocción	Externa
APOCYNACEA								
2	*Allamanda cathartica* L. ** † 174513	Copito de oro	Introducida	1	Partes aéreas	Bebida	Maceración	Oral
ARACEAE								
3	*Alocasia cucullata* (Lour.) G. Don ** 6239	Huevo berraco	Introducida	1	Raíz	Chupadera[2]	Calentamiento directo	Externa
4	*Dieffenbachia parlatorei* Linden & André * 175678	Trocoezaino	Nativa	1	Tallo	Cataplasma Chupadera	Maceración Calentamiento directo	Externa Externa
5	*Dracontium spruceanum* (Schott) G.H. Zhu ** 174094 - 174095	Mataculebra Zapatoca Mapaná	Nativa	2	Tallo Raíz	Chupadera Chupadera Cataplasma	Calentamiento directo Maceración	Externa Externa Externa
6	*Homalomena peltata* Mast. ** † 175186	Hoja de mono	Nativa	1	Hojas	Cataplasma	Maceración	Externa
7	*Philodendron heleniae* Croat * 175162	Abrazapalo	Nativa	1	Hojas	Cataplasma	Decocción	Externa
ARISTOLOCHIACEAE								

[2] Chupadera: se realiza con los tallos de las plantas a los cuales se les hace una incisión en forma de cruz y luego se asan de forma que la incisión esté en contacto directo con el calor y luego, aún caliente se coloca sobre el sitio de la mordedura, pues se considera que estos tallos calientes absorben el veneno de la serpiente.

8	*Aristolochia cordiflora* Mutis ex Kunth ** 175681	Carímbulo	Nativa	2	Hojas	Bebida	Maceración	Oral
					Tallo	Chupadera	Calentamiento directo	Externa
ASTERACEAE								
9	*Ambrosia cumanensis* Kunth * † 175161	Artamisa	Nativa	1	Partes aéreas	Vahos	Decocción	Externa
10	*Austroeupatorium inulaefolium* (Kunth) R.M. King & H. Rob. * † 175680	Salvia	Nativa	1	Hojas	Bebida	Maceración	Externa
						Cataplasma		Externa
11	*Mikania guaco* Bonpl. ** † 174090	Guaco morado	Nativa	6	Hojas	Bebida	Decocción	Oral
						Bebida	Maceración	Oral
					Tallo	Chupadera	Calentamiento directo	Externa
						Cataplasma	Maceración	Externa
						Torniquete		Externa
12	*Neurolaena lobata* (L.) Cass. ** † 174093	Gavilana	Nativa	2	Hojas	Bebida	Decocción	Oral
					Partes aéreas	Bebida	Maceración	Oral
						Baños		Externa
13	*Pseudelephantopus spicatus* (Juss. Ex Aubl.) C.F. Baker ** 174091 - 174089	Suelda	Nativa	1	Planta entera	Baños	Decocción	Externa
						Cataplasma	Decocción	Externa
HAEMODORACEAE								
14	*Xiphidium caeruleum* Aubl. ** † 145187	Mano de dios	Nativa	1	Hojas + Tallo	Bebida	Maceración	Oral
LAMIACEAE								
15	*Ocimum micranthum* Willd. ** †	Albahaca blanca o de	Nativa	1	Partes aéreas	Baños	Maceración	Externa

	175159	castilla						
MENISPERMACEAE								
16	*Cissampelos fasciculata* Benth. * † 175188	Curarina	Nativa	1	Hojas	Bebida	Decocción	Oral
PIPERACEAE								
17	*Piper auritum* Kunth ** † 176173	Santa María	Nativa	1	Hojas	Bebida Cataplasma	Maceración	Oral Externa
18	*Piper purpuraspicatum* Callejas, ined * 177099	Guayaquil	Nativa	3	Hojas Tallo	Gotas Bebida Chupadera	Maceración Decocción Calentamiento directo	Externa Oral Externa
PLANTAGINACEAE								
19	*Plantago major* L. ** † 175160	Llantel	Introducida	2	Hojas Partes aéreas	Baños Cataplasma Bebida Baños	Decocción Maceración Maceración	Externa Externa Oral Externa
POACEAE								
20	*Saccharum officinarum* L. ** 179129	Caña de azúcar	Introducida	3	Tallo	Chupadera	Calentamiento directo	Externa
SCROPHULARIACEAE								
21	*Scoparia dulcis* L. ** † 174514	Escobilla Escudilla	Nativa	2	Planta entera Partes aéreas	Gotas Torniquete	Decocción	Externa Externa Externa
SIMAROUBACEAE								
22	*Simaba cedron* Planch. ** 6449	Cedrón	Nativa	1	Semilla	Gotas	Maceración	Externa
SIPARUNACEAE								

23	*Siparuna gesnerioides* (Kunth) A. DC. * 176172	Limoncillo de monte	Nativa	1	Hojas	Bebida	Maceración	Oral
SOLANACEAE								
24	*Nicotiana tabacum* L. ** † 179215	Tabaco	Nativa	1	Hojas	Cataplasma	Decocción Fermentación	Externa Externa
ZINGIBERACEAE								
25	*Alpinia purpurata* (Vieill.) K. Schum. * 174092	Matandrea	Nativa	1	Hojas	Cataplasma	Maceración	Externa
26	*Renealmia alpinia* (Rottb.) Maas ** 176375 - 176395	Matandrea blanca	Nativa	1	Hojas Tallo	Cataplasma Chupadera	Maceración Calentamiento directo	Externa Externa
27	*Renealmia aromatica* (Aubl.) Griseb. * 176396 - 176397 - 176398 - 176399	Matandrea blanca	Nativa	1	Hojas Tallo	Bebida Chupadera	Maceración Calentamiento directo	Oral Externa
28	*Renealmia cernua* (Sw. ex Roem. & Schult.) J.F. Macbr. * 176400 - 176401	Matandrea de moño rojo	Nativa	1	Hojas	Bebida Cataplasma	Maceración	Oral Externa
29	*Renealmia nicolaioides* Loes. * 176171 - 176376	Matandrea roja	Nativa	1	Hojas Tallo	Cataplasma Chupadera	Maceración Calentamiento directo	Externa Externa

Tabla 2. Plantas usadas para el tratamiento de las mordeduras de serpientes en el oriente antioqueño.
* Especies reportadas, por primera vez, contra la mordedura de serpientes
** Especies utilizadas en otras regiones o evaluadas sobre actividades inhibitorias de venenos de serpientes en trabajos anteriores
† Especies utilizadas, además, para el tratamiento de la sintomatología local del accidente ofídico.

Preparación de los tratamientos

Los entrevistados, manifestaron que generalmente preparan sus tratamientos con el material vegetal seco, salvo los que incluyen las hojas de *Alpinia purpurata*, que se emplean en estado fresco. Además mencionaron que las estructuras individuales de las plantas más empleadas en el tratamiento de las mordeduras de serpientes, son las hojas (43,59%) y los tallos (23,08%), aunque también hay formulaciones en las que se incluyen otras estructuras de la planta, se destacan las partes aéreas o incluso las plantas enteras (con raíces). La mayoría de preparaciones se hacen por maceración acuosa o alcohólica (51,92%) o decocción (25,00%) de las partes seleccionadas.

Los preparados requieren, en su mayoría (78,85%), la presencia de vehículos líquidos, por lo que se elaboran generalmente en medio acuoso, aunque ocasionalmente se utiliza un medio alcohólico para lograr la extracción de compuestos presentes en el material vegetal. Además de estos, son frecuentes los tratamientos con chupaderas (21,15%) y para ello someten el material a un calentamiento directo, sin extracción de metabolitos, y con un eventual deterioro de ellos por las altas temperaturas.

Las plantas referenciadas en la Tabla 2 y utilizadas para el tratamiento de la mordedura de serpientes no son comúnmente empleadas por los curanderos de la región, salvo *Mikania guaco* (utilizada por el 85,7% de los curanderos encuestados) y *P. purpuraspicatum* y *S. officinarum* (por más del 40% de ellos), (ver tabla 2); aunque las formas de preparación sí son de uso común, algunas de las cuales son: **calentamiento directo** (asado de tallos que contienen incisiones en forma de cruz); **decocción** (calentamiento del material vegetal en agua hasta ebullición); **fermentación** (material vegetal es envuelto en papel periódico, previamente humedecido con agua de panela, y almacenado en oscuridad por 40 días) y **maceración** (material vegetal desmenuzado o cortado en pedazos y sometido a extracción con alcohol o agua en frío).

Los encuestados relatan diferentes formas de preparación o administración para la misma especie; por ejemplo *Mikania guaco:* se puede preparar en zumo, o picándola y empleándola como emplasto, o utilizar el tallo a manera de torniquete sobre la extremidad afectada, sin adicionar agua ni alcohol; *Nicotiana tabacum*: se prepara por fermentación de las hojas con unas gotas de agua de panela, se envuelven en periódico durante 40 días y luego se aplican sobre la mordedura o también se prepara

con ajo picado, se calienta la mezcla con agua y luego se coloca tibia sobre la herida; o *Scoparia dulcis* que se cocina en agua y se administra, a la mayor temperatura posible, en forma de torniquete o como baños de agua recién hervida, en toda la extremidad afectada o donde haya sido la mordedura.

Además de esto, algunos de los tratamientos referenciados por los curanderos son mezclas definidas; tal es el caso del "contraveneno", que incluye 5 L de aguardiente, 10 hieles de guagua (*Cuniculus paca*), media libra de guaco (*Mikania guaco*), 1 almendra de cedrón (*Simaba cedron*), media libra de almendra de contracapitana (*Aristolochia rigens*), 5 gr de hojas y tallo de Guayaquil (*Piper purpuraspicatum*), 5 hojas de tabaco fermentadas o colillas (*Nicotiana tabacum*) y 100 gr de carímbulo picado (*Aristolochia cordiflora*), que se utiliza para toda picadura y mordedura de animal ponzoñoso, administrando 5 gotas sobre la mordedura o picadura, o, 25 gotas por cada 5 cuartas de largo de la serpiente responsable del accidente[3].

Vías de administración, posología y terapias adjuntas

La forma de aplicación de los tratamientos reportados, incluye: **bebidas** (vía oral en un vehículo líquido); **baños** (exposición de la parte afectada a un flujo intenso o prolongado de un vehículo líquido con el material vegetal inmerso, generalmente caliente o tibio); **chupaderas** (incisión en el tallo de la planta, calentamiento y aplicación directa sobre la mordedura); **cataplasma** (material vegetal solo o mezclado con soluciones acuosas o alcohólicas y aplicado frío o caliente sobre el área afectada); **gotas** (suministro en pequeñas partículas de una solución acuosa o alcohólica que extrae los metabolitos); **torniquete** (realizado con el tallo de *Mikania guako*, y dispuesto algunos centímetros arriba de la mordedura alrededor del miembro afectado y con ayuda de un mecanismo que permita una constricción progresiva efectiva, tal como un bastón que es rotado varias veces); y **vahos** (tratamiento de la zona afectada con vapores de una solución acuosa del material vegetal). De estas, la más utilizada es la vía tópica (73,08%), especialmente la aplicación de cataplasmas calientes o fríos (31,48%), preparados en agua sobre los orificios producidos por la mordedura y las

[3] La efectividad del "contraveneno" no pudo ser evaluada experimentalmente en el presente trabajo por el difícil acceso a este tratamiento y el alto costo tanto económico como ético, de la consecución del mismo. Por otra parte, el permiso otorgado por CORNARE (Anexo B), incluye únicamente el trabajo con flora silvestre.

heridas o daños generados en los tejidos por el veneno, seguida de administraciones orales como las bebidas (27,78%).

De las 29 especies reportadas por los curanderos para el tratamiento de las mordeduras de serpientes, 14 (48,27%) son usadas para tratar la sintomatología local producida por el envenenamiento tal como la inflamación (*Mikania guaco*, *Scoparia dulcis*, *Sida acuta*) y el dolor (*Scoparia dulcis*), mientras que las restantes, son empleadas además para tratar el envenenamiento ocasionado por animales ponzoñosos como la raya, el escorpión, la araña o el lagarto venenoso.

Los tratamientos empleados para las mordeduras de serpientes en el oriente antioqueño, no reportan una posología precisa en cuanto a cantidad o tiempos de administración del tratamiento según el estado del paciente (tiempo después del accidente, edad, sexo, contextura, ingesta de comida o bebidas antes del accidente y el tipo de serpiente causante de la mordedura), simplemente se repite cuanto sea necesario hasta que el accidentado mejore su condición; sin embargo, para algunos curanderos, la dieta representa un factor importante para el tratamiento del accidente ofídico y con incidencia en el logro de un resultado exitoso; por ello, recomiendan la suspensión de alimentos altos en grasas, sales, alimentos derivados de lácteos, huevo e incluso el contacto con el agua y sugieren el aislamiento, especialmente de las mujeres en embarazo o en su periodo de menstruación, al punto de permitir el contacto del paciente, únicamente, con el curandero.

De igual manera, los curanderos tienen la creencia que el pronóstico de un paciente, en su mayoría hombres, se ve agravado si este ha sostenido relaciones sexuales en los días previos al accidente.

Tratamiento mágico-religioso

Aspectos importantes descritos por los curanderos son los secretos, los rezos y oraciones, que son utilizados para curar a las personas que padecen de un envenenamiento por la mordedura de serpientes; los dos últimos se aplican para el mejoramiento del paciente y resultan ser más importantes que el tratamiento mismo con las plantas que ellos seleccionen; incluso, los curanderos refieren que el rezo

puede hacerse a distancia o vía telefónica con el fin de detener la distribución del veneno, hasta el momento en que el curandero puede reunirse con el paciente. Estos rezos y oraciones, se realizan como peticiones a un ser supremo en el que el curandero crea; mientras que los secretos, aunque también son oraciones, son transmitidos bajo condiciones especiales que debe tener el aprendiz, y son utilizados por los curanderos que poseen gran experiencia, pues, en algunos casos, se debe pagar un diezmo, invocando las ánimas o almas de personas fallecidas que padecen en el purgatorio. Para que esto funcione, el diezmo se paga tratando 9 pacientes con el secreto, y el décimo paciente se deja morir. Por la gravedad de esto, los curanderos lo utilizan como último recurso.

De otra parte, la mayoría de los curanderos, reportan que para que el tratamiento del envenenamiento con plantas funcione, la colecta de las plantas se debe realizar con agradecimiento previo a la madre tierra y a la planta misma.

El contraveneno no es el único tratamiento que incluye productos de origen animal; en la región existe la creencia que el hecho de cortarle la cabeza a la serpiente que ha ocasionado el accidente, evitará que el veneno se disperse en el cuerpo, o bien, se realiza un macerado con la cabeza del animal para aplicarlo sobre la mordedura; sin embargo, al quitarle la vida a la serpiente, tanto los curanderos como la comunidad no realizan ningún agradecimiento, pues la creencia es que las serpientes son animales enviados por el demonio.

Especies utilizadas pertenecientes a la familia Zingiberaceae

Del total de 29 especies de plantas colectadas e identificadas, 5 especies (17,24%) resultaron incluidas en la familia Zingiberaceae: *Alpinia purpurata*, *Renealmia alpinia*, *Renealmia aromatica*, *Renealmia cernua* y *Renealmia nicolaioides.* Esta familia posee una amplia distribución en el departamento antioqueño, con presencia notoria de *Alpinia purpurata, Alpinia zurumbet, Hedychium coronarium, Renealmia alpinia, Renealmia cernua* y *Zingiber spectabile,* especies nativas y documentadas aproximadamente en el 48% de los municipios del departamento, principalmente en el Valle de Aburrá (Medellín), oriente (San Luis, Guarne, Cocorná y Sonsón), suroeste

(Venecia y Jericó), bajo Cauca (Caucasia, Tarazá y Zaragoza) y Urabá (Mutatá) (Tropicos.org, 2012).

Alpinia purpurata (Vieill.) K. Schum.

Nombre vulgar: Matandrea

Descripción botánica: planta herbácea, perenne, con largos tallos delgados. Puede alcanzar una altura de 5 m, aunque por lo general sólo llega a 2 m. Sus hojas son verdes, lanceoladas, opuestas y de gran tamaño, hasta 70 cm de largo y 20 cm de ancho. Sus inflorescencias, de 30 a 40 cm, terminadas en una espiga llena de brácteas rojas en cuyo interior se encuentran unas pequeñas flores blancas. Para tratar el accidente ofídico, los curanderos utilizan hojas frescas de plantas, macerándolas en poca cantidad de agua y aplicándolas en forma de cataplasma sobre el sitio afectado.

Alpinia purpurata
San Carlos, Antioquia.
Fotografía: Jessica Paola Rey S.

Alpinia purpurata
Inflorescencia
San Carlos, Antioquia.
Fotografía: Jessica Paola Rey S.

Renealmia alpinia (Rottb.) Maas

Nombre vulgar: Matandrea blanca

Descripción botánica: planta herbácea que alcanza los 6 m de altura. Posee hojas simples, alternas, sin estipulas y largo-lanceoladas, que pueden adquirir hasta 110 cm de longitud y 11 cm de ancho, con nervadura paralela, vaina de la hoja abierta y con lígula. Su inflorescencia racemosa, es basal con longitudes de 20 hasta 50 cm; brácteas son rosado-rojizas, raquis pardo-rojizo y flor tubular de coloración amarilla o rojiza. Para el tratamiento del accidente ofídico, los curanderos de la región maceran las hojas en agua y las administran en forma de emplasto sobre el sitio de la mordedura, mientras que los tallos son utilizados en forma de chupadera, también orientada sobre la mordedura.

Renealmia alpinia
San Rafael, Antioquia
Fotografía: Julieta Vásquez E.

Renealmia aromatica (Aubl.) Griseb.

Nombre vulgar: Matandrea blanca

Descripción botánica: planta que alcanza los 2,7 m de alto. Posee hojas lanceolado-oblongas, simples, alternas, sin estipulas, con tamaños de hasta 110 cm de longitud y 11 cm de ancho y nervadura paralela. La inflorescencia racemosa, posee flores tubulares de cáliz rojo y corola amarilla, y frutos rojos.

Para tratar el accidente ofídico, se maceran las hojas en agua o se hierve agua y en ella se ponen las hojas y se dan como tomas o bebidas. Los tallos son manejados en forma de chupadera y dispuestos sobre el lugar de la mordedura.

Renealmia aromatica
San Luis, Antioquia
Fotografía: Julieta Vásquez E.

Renealmia aromatica
Inflorescencia
San Luis, Antioquia
Fotografía: Julieta Vásquez E.

Renealmia cernua (Sw. Ex Roem. & Schult.) J.F. Macbr.

Nombre vulgar: Matandrea de moño rojo

Descripción botánica: planta herbácea con altura cercana a los 2 m, hojas elípticas de aproximadamente 30 cm de largo, con ápice acuminado, base cuneada y ligeramente redondeada. Su inflorescencia es en espiga terminal y de color amarilla a rojas.

Para tratar el accidente ofídico, los curanderos de la zona, utilizan las hojas, maceradas en agua y las administran como bebida o emplasto.

Renealmia cernua
Inflorescencia
Tropicos.org

Renealmia nicolaioides Loes.

Nombre vulgar: Matandrea roja

Descripción botánica: planta herbácea que alcanza los 6 m de altura. Posee tallos rojizos, hojas simples, alternas, sin estipulas y largo-lanceoladas, que pueden llegar a medir hasta 110 cm de longitud y 11 cm de ancho, su nervadura es paralela, y la vaina de la hoja es abierta, con lígula. La inflorescencia es de 20 a 50 cm de longitud; las brácteas de la inflorescencia rojizas, raquis pardo-rojizo.

El tratamiento del accidente ofídico se realiza utilizando las hojas y los tallos, las primeras se someten a maceración en agua y los tallos son tratados como chupaderas, utilizándose en los dos casos sobrepuestos sobre la zona afectada.

Renealmia nicolaioides
San Rafael, Antioquia
Fotografía: Julieta Vásquez E.

Inhibición *in vitro* de los efectos del veneno

Inhibición del efecto proteolítico

El efecto proteolítico de veneno sobre la azocaseína produjo una absorbancia promedio de 0,244 ± 0,08. Los extractos de hojas y tallos de *R. alpinia* mostraron el mayor efecto inhibitorio con cada una de las proporciones evaluadas (1:5, 1:10, 1:20) alcanzando un 84,79 ± 3,1; 94,33 ± 9,8; 92,06 ± 13,7 % para el extracto de hojas y 83,19 ± 3,5; 91,84 ± 10,0, 89,49 ± 9,2 % para el extracto de los tallos. Los extractos de raíz de *Alpinia purpurata* y hojas de *Renealmia nicolaioides*, no se destacaron por su efecto inhibitorio en las proporciones más bajas (1:5 para *A. purpurata* y 1:5 y 1:10 para *R. nicolaioides*); sin embargo, inhibieron el efecto proteolítico del veneno de *B. asper* en la mayor proporción (55,77 ± 2,5 y 62,74 ± 7,7 %, respectivamente); y, en esta misma concentración, aunque con un efecto inhibitorio menor (40,89 ± 2,7 %), muestra actividad el extracto de tallos de *Renealmia aromatica* (ver Tabla 3). Ningún control negativo presentó actividad proteolítica al compararse con el efecto producido por el veneno de *B. asper*.

Especie	Parte utilizada	Porcentaje de inhibición ± SD		
		1:5	1:10	1:20
Alpinia purpurata	Hojas	0,00%	0,00%	0,00%
Alpinia purpurata	Tallo	0,00%	1,17% ± 1,3	17,41% ± 3,6 †
Alpinia purpurata	Raíz	25,04% ± 3,8	57,43% ± 6,3	55,77% ± 2,5 ‡
Renealmia alpinia	Hojas	84,79% ± 3,1	94,33% ± 9,8	92,06% ± 13,7
Renealmia alpinia	Tallo	83,19% ± 3,5	91,84% ± 10,0	89,49% ± 9,2
Renealmia aromatica	Hojas	0,00%	0,00%	0,00%
Renealmia aromatica	Tallo	0,00%	18,60% ± 7,1	40,89% ± 2,7 *
Renealmia cernua	Tallo	0,00%	0,00%	1,19% ± 2,1
Renealmia nicolaioides	Hojas	11,39% ± 0,5	9,62% ± 2,8	62,74% ± 7,7 †
Renealmia nicolaioides	Tallo	0,00%	0,00%	1,16% ± 1.3

Tabla 3. Inhibición del efecto proteolítico de *Bothrops asper* sobre azocaseína por extractos etanólicos liofilizados de plantas de la familia Zingiberaceae.
Análisis estadístico: se realizó una ANOVA de una vía seguida de un test de comparación múltiple de Bonferroni ($p<0.05$), con las siguientes diferencias significativas: ***** Entre las tres proporciones del mismo extracto; **†**: entre las proporciones 1:5- 1:20 y 1:10-1:20; **‡**: entre las proporciones 1:5-1:10 y 1:5-1:20.

Inhibición del efecto coagulante

Un microgramo de veneno de *B. asper* indujo coagulación del plasma en 18,68 ± 4,02 segundos. El efecto inhibitorio de los extractos en las mezclas del veneno, con cada uno de ellos, fue más evidente con la raíz de *Alpinia purpurata* con retardos del tiempo de coagulación de 30,00 ± 3,0 y 129,00 ± 6,6 segundos para las proporciones de 1:5 y 1:10; con relación a la proporción 1:20, se presentó un retardo del tiempo de coagulación superior a los 3 minutos, similar al observado con el extracto de hojas de *Renealmia alpinia* a esta misma proporción. Un efecto anticoagulante menor se presentó con los extractos de tallos de *A. Purpurata* y *R. alpinia* en la proporción más elevada con tiempos de retardo de 32,43 ± 2,3 y 21,33 ± 3,1 segundos (ver Tabla 4). Los controles negativos no mostraron actividad coagulante en ninguna de las cantidades evaluadas (5, 10 y 20 µg).

Especie	Parte utilizada	Aumento del tiempo de coagulación ± SD (segundos)		
		1: 5	1:10	1:20
Alpinia purpurata	Hojas	0,00	0,00	7,03 ± 1,4 ‡●
Alpinia purpurata	Tallo	2,15 ± 0,5	11,50 ± 2,4	32,43 ± 2,3 †◊
Alpinia purpurata	Raíz	30,00 ± 3,0	129,00 ± 6,6	> 180 ± 0,0 *◊
Renealmia alpinia	Hojas	0,67 ± 0,6	14,67 ± 1,2	> 180 ± 0,0 †◊
Renealmia alpinia	Tallo	0,00	6,33 ± 1,2	21,33 ± 3,1 †◊
Renealmia aromatica	Hojas	0,48 ± 0,2	1,55 ± 0,4	2,21 ± 0,4 †
Renealmia aromatica	Tallo	0,00	0,00	2,67 ± 1,2
Renealmia cernua	Tallo	1,40 ± 0,6	6,87 ± 0,9	10,81 ± 0,3 †○
Renealmia nicolaioides	Hojas	0,00	1,65 ± 0,4	13,33 ± 0,7 ‡●
Renealmia nicolaioides	Tallo	0,00	0,00	0,75 ± 0,7

Tabla 4. Diferencias de tiempos de coagulación de *Bothrops asper* por extractos etanólicos liofilizados de plantas de la familia Zingiberaceae.
Análisis estadístico: se realizó una ANOVA de una vía seguida de un test de comparación múltiple de Bonferroni ($p<0.05$), con las siguientes diferencias significativas: ***:** entre el veneno y las tres proporciones del mismo extracto; **†:** entre el veneno y las proporciones 1:10 y 1:20; **‡:** entre el veneno y la proporción 1:20; ◊**:** entre las tres proporciones del mismo extracto; ●**:** entre las proporciones 1:5-1:20 y 1:10-1:20 del mismo extracto; ○**:** entre las proporciones 1:5-1:20 del mismo extracto.

Inhibición del efecto hemolítico indirecto

La Dosis Hemolítica Indirecta mínima (DHIm) del veneno de *B. asper* (2.2 µg) generó un halo de 19,33 ± 1,1 mm de diámetro. El extracto de hojas de *Renealmia alpinia* mostró la mayor inhibición de este efecto del veneno en las proporciones evaluadas, con porcentajes de inhibición de 47,06 ± 0,06, 45,72 ± 0,08 y 40,04 ± 0,03; seguido por el extracto de raíz de *Alpinia purpurata* en las dos proporciones mayores evaluadas (30,97 ± 4,4 y 37,89 ± 1,8 5, respectivamente). Estas diferencias fueron estadísticamente significativas en todos los casos en relación al control positivo ($p<0.05$) (ver Tabla 5).

Especie	Parte utilizada	Porcentaje de inhibición ± SD		
		1:5	1:10	1:20
Alpinia purpurata	Hojas	6,92% ± 3,1	15,74% ± 5,0	28,46% ± 3,4 *
Alpinia purpurata	Tallo	0,00%	0,00%	12,02% ± 2,6 *
Alpinia purpurata	Raíz	10,26% ± 4,9	30,97% ± 4,4	37,89% ± 1,8 †
Renealmia alpinia	Hojas	47,06% ± 5,7	45,72% ± 8,2	40,04% ± 2,8
Renealmia alpinia	Tallo	0,00%	11,55% ± 0,4	30,72% ± 2,3 *
Renealmia aromatica	Hojas	0,00%	5,26% ± 0,0	8,77% ± 3,0
Renealmia aromatica	Tallo	0,00%	7,50% ± 3,5	7,50% ± 3,5
Renealmia cernua	Tallo	6,84% ± 2,7	13,69% ± 5,5	18,95% ± 2,8 ‡
Renealmia nicolaioides	Hojas	0,00%	0,00%	10,00% ± 0,0
Renealmia nicolaioides	Tallo	5,00% ± 0,0	5,00% ± 0,00	8,33% ± 2,9

Tabla 5. Inhibición del efecto hemolítico indirecto de *Bothrops asper* por extractos etanólicos liofilizados de plantas de la familia Zingiberaceae**.**
Análisis estadístico: se realizó una ANOVA de una vía seguida de un test de comparación múltiple de Bonferroni ($p<0.05$), con las siguientes diferencias significativas: ***:** entre las proporciones 1:5- 1:20 y 1:10-1:20 del mismo extracto; **†**: entre las proporciones 1:5-1:10 y 1:5-1:20 del mismo extracto; **‡**: entre las proporciones 1:5- 1:20 del mismo extracto.

Perfil electroforético

La electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida mostró reducción de todas las bandas del veneno, especialmente la de un peso aproximado de 31 KDa, con los extractos de tallos y raíz de A. purpurata y hojas y tallos de R. alpinia, (ver Figura 2). Además, no se observaron proteínas en ninguno de los extractos.

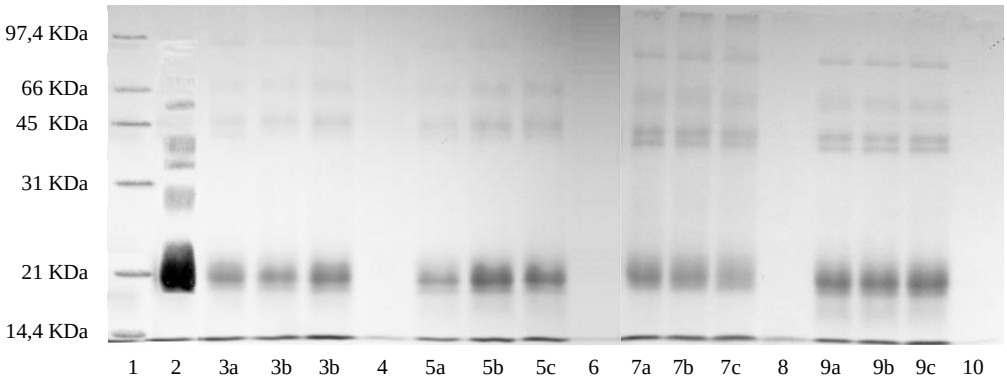

Figura 2. SDS-PAGE. Inhibición del veneno de *B. asper* por extractos de plantas de la familia Zingiberaceae.
1: Marcadores de peso molecular; **2:** Veneno de *B. asper*; **3:** Veneno de *B. asper* y extracto de raíz de *A. purpurata* en proporciones: **a)** 1:5; **b)** 1:10; **c)** 1:20; **4:** Extracto de raíz de *A. purpurata*; **5:** veneno de *B. asper* y extracto de tallos de *A. purpurata* en proporciones: **a)** 1:5; **b)** 1:10; **c)** 1:20; **6:** Extracto de tallos de *A. purpurata*; **7:** Veneno de *B. asper* y extracto de hojas de *R. alpinia* en proporciones: **a)** 1:5; **b)** 1:10; **c)** 1:20; **8:** Extracto de raíz de *A. purpurata*; **9:** veneno de *B. asper* y extracto de tallos de *A. purpurata* en proporciones: **a)** 1:5; **b)** 1:10; **c)** 1:20; **10:** Extracto de tallos de *A. purpurata*;

Inhibición *in vivo* del efecto hemorrágico del veneno

Al medir los halos de hemorragia producidos por el veneno de *B. asper* en ratones, tres de las muestras evaluadas como potenciales inhibidores de éste efecto presentaron una inhibición más notoria: las hojas de *Renealmia nicolaioides, Renealmia alpinia,* y la raíz de *Alpinia purpurata* (ver Tabla 6). Al realizar una comparación estadística de las medias de los resultados obtenidos con todas las muestras se encontraron diferencias significativas entre el extracto de hojas de *R. nicolaioides* y los demás extractos, exceptuando el extracto de hojas de *R. alpinia* (ver Figura 3). En el momento de medición de los halos de hemorragia, no se evidenció presencia de hemorragia en los ratones que fueron tratados exclusivamente con los extractos.

Especie	Parte utilizada	Porcentaje de ninhibición ± SD (Proporción 1:20)
Alpinia purpurata	Hojas	21,43% ± 2,4
Alpinia purpurata	Tallo	19,53% ± 3,2
Alpinia purpurata	Raíz	26,75% ± 2,1
Renealmia alpinia	Hojas	26,91% ± 6,0
Renealmia alpinia	Tallo	21,14% ± 6,4
Renealmia nicolaioides	Hojas	38,30% ± 2,7

Tabla 6. Inhibición del efecto hemorrágico de *Bothrops asper* por extractos etanólicos liofilizados de plantas de la familia Zingiberaceae.

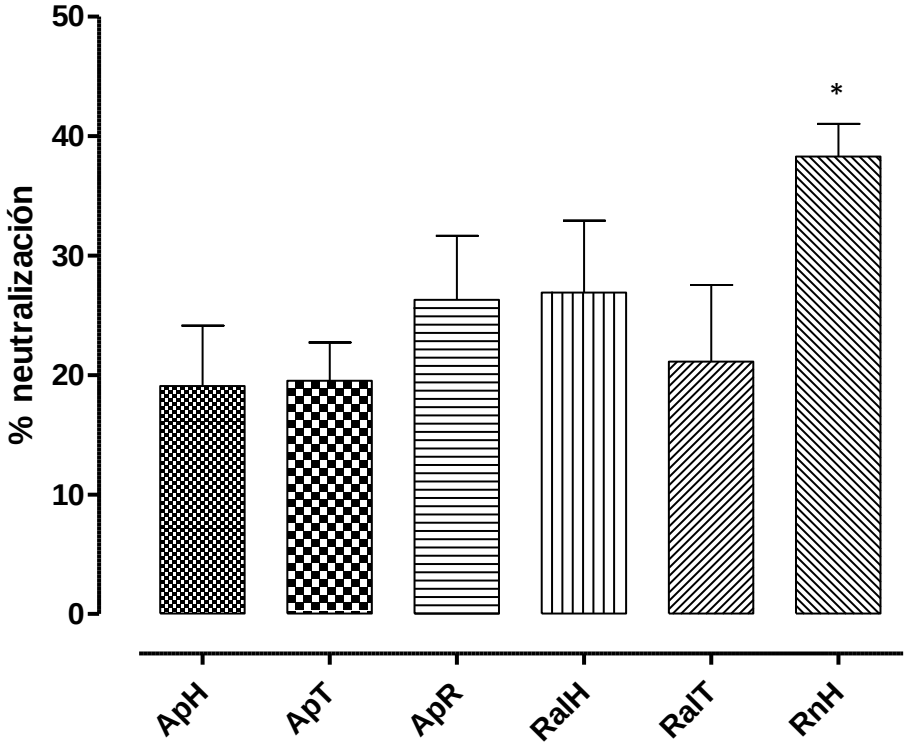

Figura 3. Inhibición del efecto hemorrágico inducido por el veneno de *B. asper* por extractos etanólicos liofilizados de plantas de la familia Zingiberaceae.
Los resultados de la relación 1:20, se muestran como la media ± SD. **Extractos:** ApH: Hojas de *Alpinia purpurata*, ApT: Tallos de *Alpinia purpurata*, ApR: Raíz de *Alpinia purpurata*, RalH: Hojas de *Renealmia alpinia*, RalT: Tallos de *Renealmia alpinia*, RnH: Hojas de *Renealmia nicolaioides*. **Análisis estadístico**: se realizó una ANOVA de una vía seguida de un test de comparación múltiple de Bonferroni ($p<0.05$). Diferencias significativas (*****) entre el extracto de hojas de *R. nicolaioides* y los demás extractos, exceptuando el extracto de hojas de *R. alpinia*.

En el momento de finalizar la prueba de inhibición de la actividad hemorrágica inducida por el veneno de *B. asper* y aunque en la piel de los ratones tratados con extracto y veneno no hubo disminución en el área de los halos de la hemorragia, la severidad de estos, fue menor que la observada en la piel de los ratones inyectados exclusivamente con veneno de *B. asper* (ver Figura 4).

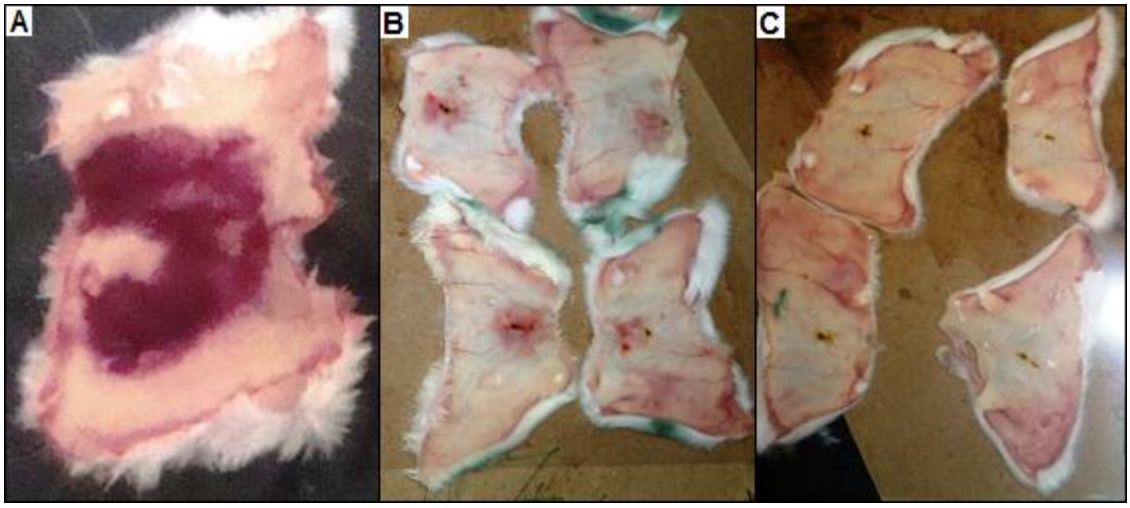

Figura 4. Halos hemorrágicos inducidos por el veneno de *B. asper* y su inhibición por el extracto de hojas de *R. alpinia*.
A: Ratones con 3,2 µg/ratón de veneno de *Bothrops asper*. **B:** Ratones con 2DHm de veneno de *B. asper* y extracto de hojas de *R. alpinia* (3,2 µg de veneno y 64µg de extracto). **C:** Ratones con extracto de hojas de *R. alpinia* (64 µg/ratón).

Una vez removida la piel, se evidencia hemorragia profusa en los surcos viscerales de los ratones inyectados con veneno, y en menor medida, a los que se inyectaron con veneno + extractos. Los ratones inyectados exclusivamente con extractos no presentaron hemorragia (ver figura 5).

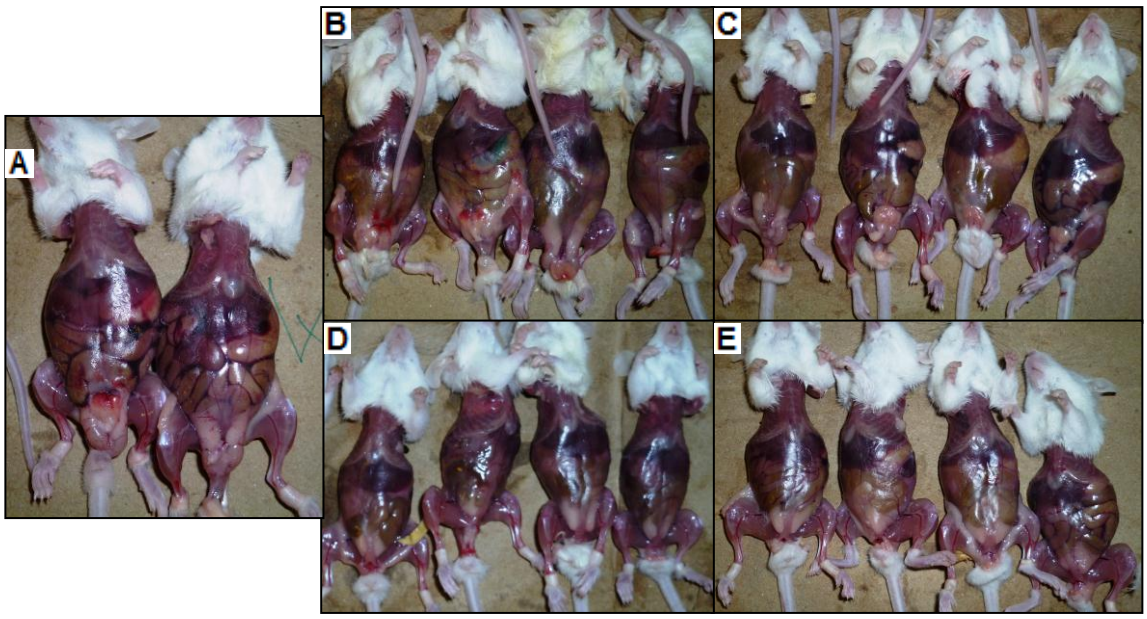

Figura 5. Inhibición *in vivo* de la actividad hemorrágica inducida por el veneno de *B. asper* por los extractos de tallos y hojas de *Renealmia alpinia*.
A: Ratones con 3,2 µg/ratón de veneno de *Bothrops asper*. **B:** Ratones con 2DHm de veneno de *B. asper* y extracto de hojas de *R. alpinia* (3,2 µg de veneno y 64µg de extracto). **C:** Ratones con extracto de hojas de *R. alpinia* (64 µg/ratón).

Inhibición *in vivo* de la actividad letal del veneno

Los extractos etanólicos de las especies de la familia Zingiberaceae demostraron gran potencial para inhibir, en las condiciones experimentales planteadas, el efecto letal ocasionado por 1,5 DL_{50} (105 µg) del veneno de *Bothrops asper*, cuando se administran intraperitonealmente (cada 24 horas durante tres días) antes de la inoculación del veneno (ver Tabla 7).

Especie	Parte utilizada	Dosis/día (mg/Kg)	Sobrevivencia
Alpinia purpurata	Tallo	75,0	100,00%
Alpinia purpurata	Raíz	75,0	50,00%
Renealmia alpinia	Hojas	62,5	100,00%
Renealmia nicolaioides	Hojas	75,0	100,00%

Tabla 7. Sobrevivencia de ratones inyectados (i.p.) con extractos etanólicos de la plantas de la familia Zingiberaceae.

Durante la realización de la prueba, los ratones que fueron tratados únicamente con las respectivas dosis de extracto (75 mg/Kg de tallo y raíz de *A. purpurata* y hojas de *R. nicolaioides* y 62.5 mg/Kg de hojas de *R. alpinia*) en los primeros tres días y PBS pH 7.2 en el cuarto día (controles negativos), sobrevivieron; por el contrario, los ratones a los que se les administró PBS pH 7.2 durante tres días y luego, el cuarto día, 1,5 DL50 de veneno de *B. asper*, murieron una hora después de la administración de éste (controles positivos).

Evaluación de la toxicidad aguda de los extractos etanólicos

Durante el tiempo de observación posterior a la administración intraperitoneal de los extractos etanólicos de tallo y raíz de *A. purpurata* y hojas de *R. alpinia* y *R. nicolaioides* a una dosis de 2000mg/Kg de peso corporal, no se evidenció ninguna muestra de toxicidad, tampoco se presentaron muertes en los diferentes grupos de ratones ni alteraciones en los pesos de los ratones.

Reconocimiento de metabolitos secundarios

La identificación preliminar de los metabolitos secundarios presentes en los extractos de diferentes estructuras de dos miembros de esta familia muestra ausencia de saponinas, taninos y quinonas y la presencia de metabolitos comunes como los flavonoides, las cumarinas, y algunos compuestos cardiotónicos (ver Tabla 8).

Plantas Metabolito	*Alpinia purpurata* (raíz)	*Alpinia purpurata* (tallo)	*Renealmia nicolaioides* (hojas)	*Renealmia alpinia* (hojas)*
Alcaloides	-	-	+	-
Flavonoides	+	+	+	+
Leucoantocianidinas	+	+/-	-	-
Cardiotónicos	+/-	+/-	+	-
Saponinas	-	-	-	-
Taninos	-	-	-	+
Triterpenoides y/o Esteroides	-	+	+	+
Quinonas	-	-	-	-
Cumarinas	+	+	+	+
Antocianidinas	-	+	+	-

Tabla 8. Metabolitos secundarios presentes en los extractos etanólicos de las plantas de la familia Zingiberaceae que poseen actividad inhibitoria de los efectos del veneno de *B. asper in vitro*.
-: Ausencia cualitativa del grupo de metabolitos ensayado; **+:** Presencia cualitativa del grupo de metabolito; **+/-:** no se pudo determinar, por el ensayo cualitativo, la presencia o ausencia del grupo de metabolitos. *: Perfil fitoquímico obtenido del trabajo realizado por Alarcón et al., 2008.

DISCUSIÓN

En el mundo se han reportado más de 750 especies de plantas empleadas por la medicina tradicional para el tratamiento de mordeduras de serpientes y pocas de ellas han sido experimentalmente evaluadas para validar su efectividad en ensayos controlados (Houghton & Osibogun, 1993). De cualquier manera, se han logrado aislar algunos compuestos con actividad inhibitoria de los efectos del veneno de serpientes y se han propuesto teorías encaminadas a establecer potenciales mecanismos de acción basadas en el contenido de metabólitos del extracto o la estructura del compuesto aislado, pues esta inhibición puede ser debida a un compuesto único, o al efecto sinérgico de los metabolitos presentes en los extractos (Gowda, 1997).

Las poblaciones campesinas de los municipios de San Carlos, San Luis y San Rafael, utilizan sus recursos de flora y fauna en el tratamiento del envenenamiento causado por mordeduras de serpientes. Este trabajo reporta 29 especies vegetales utilizadas por los curanderos en dicha región. Este número de especies es relativamente alto teniendo en cuenta el número de curanderos entrevistados y el área de estudio; Otero y colaboradores obtuvieron 101 especies vegetales reportadas en el tratamiento del accidente ofídico entrevistando 20 conocedores (chamanes y curanderos tradicionales) (Otero *et al.*, 2000a). Adicionalmente se observó que 11 (38%) de las plantas informadas fueron reportadas previamente por Otero y colaboradores (Otero *et al.*, 2000a) y una de ellas, *Renealmia alpinia* (Zingiberaceae), presenta actividad inhibitoria de los efectos del veneno de *B. asper* evaluada *in vitro* e *in vivo* (Otero *et al.*, 2000 a, b, c; Patiño *et al.*, 2012). Esto supone una alta migración y flujo del conocimiento en las comunidades rurales del país, puesto que las zonas geográficas previamente estudiadas fueron los Parques Nacionales Utría y Katios, (Antioquia–Chocó).

Este conocimiento relativamente generalizado, supera las barreras geográficas, pues varios géneros, e incluso especies vegetales, han sido reportados, con el mismo fin, en otros países de América, como Nicaragua y Panamá (Coe & Anderson, 2005; Gupta et al., 2005); además de su uso por tribus africanas y diferentes grupos étnicos de la India (Basha & Sudarsanam, 2012; Samy *et al.*, 2008; van Wyk, 2008).

Del total de especies reportadas por los entrevistados (Tabla 1), 24 son nativas y solo 5 introducidas (Tropicos.org, 2012), lo que es explicable dada la riqueza florística del país, y porque el total de la población de plantas nativas de Colombia puede oscilar entre 35.000 y 40.000 especies (26.000 especies de plantas fanerógamas). Esta enorme riqueza, es consecuencia de la localización de Colombia en la zona intertropical, en la participación en las cuencas del Amazonas, del Pacífico y del Caribe, en su pasado geológico, en su complejo sistema orográfico, en su diversidad climática y en la relativamente reciente presencia humana (Gómez, 2004).

En la zona de estudio, los curanderos utilizan fundamentalmente las partes aéreas (87%), principalmente hojas y tallos (43,59 y 23,08%, respectivamente), y son muy pocos los que emplean las flores, los frutos y el sistema subterráneo, ésta práctica concuerda con lo observado en otras regiones del país (Pérez, 1996; Otero *et al.*, 2000a) y en países cercanos (Gupta *et al.*, 2005), pero difiere del uso en países como India, en el que se emplean diferentes estructuras, especialmente subterráneas, para el tratamiento de las mordeduras de serpientes (Samy *et al.*, 2008; Singh *et al.*, 2002).

El sometimiento previo del material vegetal a algún proceso de extracción (77%) para garantizar la liberación de los metabolitos activos y permitir la administración en forma oral (bebidas) o tópica (baños y emplastos o cataplasmas), son métodos conocidos para el tratamiento de las mordeduras de serpientes, también en otras regiones del país (Otero *et al.*, 2000a) y del exterior (Coe & Anderson, 2005; Gupta *et al.*, 2005; Otero *et al.*, 2000 a; Samy *et al.*, 2008); mientras que, la preparación de tratamientos con calentamiento directo y su posterior aplicación como chupadera sobre la mordedura, no es una práctica empleada frecuentemente en otros lugares para el tratamiento de la mordedura de serpientes, y sí lo es en la región, al punto que el 20,37 % de los tratamientos son realizados por éste método.

En el oriente antioqueño, los curanderos, atribuyen importancia a los ámbitos mágico-religioso, las dietas, posologías y cuidados especiales, en el éxito de los tratamientos de las mordeduras de serpientes; especialmente, si al igual que otros grupos étnicos alrededor del mundo (Bonet & Vallès, 2007; Samy *et al.*, 2008; van Wyk *et al.,* 2008), incluyen la cabeza del animal agresor. Igualmente y de acuerdo con la creencia católica predominante en Colombia desde la colonización española en la que las serpientes han sido la representación del mal, la perspectiva de los curanderos hacia las serpientes, es que este animal es la representación del demonio en la tierra, la encarnación del mal, concordando con la primera imagen del Diablo en la iconografía

cristiana, que fue la serpiente del Edén; por lo cual, cualquiera de ellas, sea venenosa o no, debe ser aniquilada.

La información transmitida por los curanderos, aquí consignada, y las conversaciones sostenidas con la comunidad en general, muestran un gran arraigo de ésta población hacia sus creencias y percepciones, no solo sobre la mordedura, sino también sobre el tratamiento de ella y la percepción de las serpientes, lo cual representa una parte vital de su identidad como población campesina antioqueña, que emana de una cultura y se basan en la tradición que se transite oralmente o mediante gestos y se modifica con el transcurso del tiempo a través de un proceso de recreación colectiva, convirtiéndose en patrimonio intangible y vulnerable dada su índole efímera.

Los venenos del género *Bothrops*, se ubican en el grupo de los proteolíticos y coagulantes, de modo que los ensayos de inhibición de los efectos proteolítico, coagulante, hemolítico indirecto y hemorrágico reflejan la capacidad de un extracto de interferir en la acción de enzimas presentes en el veneno de *B. asper*, constituidos por muchas proteínas y péptidos (toxinas), que se pueden agrupar en un número pequeño de familias de proteínas principales, siendo estas: fosfolipasas A_2, metaloproteinasas dependientes de Zinc, serin proteinasas, proteínas tipo lectinas tipo C, desintegrinas, proteínas ricas en cisteína (CRISPs), péptidos potenciadores de bradicinina y L-aminoácidooxidasas, entre otras (Gutiérrez, 2011, Fernández *et al.*, 2011).

La acción proteolítica del veneno de *B. asper* es generada principalmente por un tipo de toxinas, las hemorraginas o metaloproteasas, enzimas que causan separación de las uniones intercelulares de las células endoteliales y la posterior extravasación de los glóbulos rojos (Markland, 1998a, b). Como se esperaba, los resultados mostraron una alta capacidad de inhibición del efecto proteolítico del veneno por los extractos de hojas y tallos de *Renealmia alpinia,* lo que concuerda con los datos encontrados por los estudios realizados por Otero y col. (2000c) y Patiño y col. (2012).

No obstante, la inhibición mostrada por los extractos de las nuevas plantas evaluadas fue inferior a la presentada por los extractos de *R. alpinia* y se detectó principalmente en la raíz de *Alpinia purpurata* y las hojas de *Renealmia nicolaioides, el cual* presentó una inhibición significativa de este efecto en la concentración mayor.

Los extractos de hojas de *R. alpinia*, raíz de *A. purpurata* y hojas de *R. nicolaioides*, mostraron en las pruebas cualitativas de identificación de metabolitos secundarios,

presencia de flavonoides, para los cuales se ha reportado la capacidad de formar complejos con Zn^{2+}, alterando la actividad proteolítica mediada en parte por metaloproteinasas dependientes de Zinc (Dobbin & Hider, 1990; McDonald *et al.*, 1996; Haslam, 1996). Esta capacidad de acomplejar iones metálicos también ha sido descrita para los taninos, como se ha demostrado con la catequina y la epicatequina, de las cuales los taninos son formas poliméricas (Sazuka *et al.*, 1997), estos compuestos, presentes en el extracto de hojas *R. alpinia*, podrían explicar porqué para el extracto de esta planta se evidencia una mayor inhibición, ya que el efecto puede deberse a una acción sinérgica de ambos grupos de metabolitos.

Diversos autores han destacado la utilidad de los taninos en la desintoxicación de los venenos de diferentes especies de serpientes (Okonogi *et al.*, 1979). Se ha propuesto que las propiedades de los taninos podrían deberse a su capacidad para formar complejos con las proteínas que componen los venenos de serpientes (Mors *et al.*, 1989), compuestos cuya presencia se ha reportado en *R. alpinia* y que podrían explicar su eficacia en la inhibición de los efectos del veneno estudiados en este trabajo, como por ejemplo, la inhibición del efecto coagulante, como se ha reportado en otros estudios (Otero *et al.*, 2000; Patiño *et al.*, 2012).

El efecto del veneno de *B. asper* en la coagulación de la sangre, se basa en favorecer la formación de fibrina a partir de fibrinógeno mediante la presencia de serinproteasas y otras toxinas que activan las plaquetas y el factor XII, mientras que los factores moleculares V y VI, presentes en el veneno, activan directamente el factor X; ocasionando, estas acciones conjuntas, un estado de hipercoagulabilidad en el paciente. A medida que el fibrinógeno se transforma en fibrina, ésta se vuelve más lábil y susceptible a lísis por el sistema fibrinolítico natural, consumiendo fibrinógeno en grandes cantidades; traduciéndose en la incapacidad de coagulación de la sangre y finalizando en una coagulación intravascular diseminada (Markland, 1998a, b; Gutiérrez, 2011).

Los componentes de los extractos podrían interactuar con estas enzimas y evitar su efecto en la coagulación del plasma (Oliveira *et al.*, 2005), que se evidenció en los resultados, en los que el retardo de la coagulación es dependiente de la cantidad de extracto empleada, especialmente para el extracto de raíz de *A. purpurata* y hojas de *R. alpinia*; sin embargo, el mecanismo de acción es aún desconocido, pero puede ser debido a un compuesto único, o al efecto sinérgico de los metabolitos presentes en ellos (Gowda, 1997).

Las PLA_2 se identifican por su capacidad para hidrolizar fosfolípidos específicamente en la posición sn-2 del enlace éster (Six & Dennis, 2000), generando miotoxicidad, neurotoxicidad, alteraciones en la hemostasia (anticoagulación y agregación plaquetaria), edema y cardiotoxicidad (Andriao-Escarso *et al.,* 2000; Barbosa *et al.,* 2005; Costa Torres *et al.,* 2010; Evangelista *et al.,* 2010; Gutiérrez & Lomonte, 1995; Kini, 2003; Kini & Evans, 1987; Landucci *et al.,* 2000; Murakami *et al.,* 2005).

La inhibición de estás enzimas del venenos de *B. asper*, evaluadas por la actividad hemolítica indirecta, fue especialmente notoria en el extracto de hojas y tallos de *R. alpinia*, seguido por el extracto de la raíz de *A. purpurata*, mientras que los demás extractos no mostraron una actividad inhibitoria significativa de este efecto. En estos extractos se evidenció, mediante la identificación de metabolitos secundarios, la presencia de compuestos polifenólicos, como flavonoides, a los cuales se les ha demostrado que pueden formar complejos con metales como el Ca^{2+}, y que al poseer grupos hidroxilo, pueden formar puentes de hidrógeno con los aminoácidos Asp49 e His48 del sitio activo o con Tyr28, Gly30, Gly32 y Gly33 del loop de unión al calcio de las PLA_2, que posteriormente podrían bloquear la acción enzimática de estas proteínas (Leanpolchareanchai *et al.*, 2009).

Diferentes autores han demostrado que el tratamiento previo de los venenos con extractos de plantas disminuyen la presencia de proteínas de los venenos (Núñez *et al.,* 2004; Patiño *et al.,* 2012), lo cual se hace evidente mediante la desaparición de bandas de los venenos en la electroforesis realizadas a los extractos de raíz y tallos de *A. purpurata* y hojas y tallos de *R. alpinia*, cuando estos fueron previamente tratados con los extractos, esta disminución podría deberse a la precipitación de los complejos formados.

Además, se logró evidenciar una correlación entre la inhibición del veneno en los efectos evaluados, principalmente entre la inhibición de los efectos proteolítico y hemorrágico; y proteolítico y coagulante, debido a la capacidad de las enzimas que interfieren en estas actividades y su capacidad para producir la lisis de las proteínas; este comportamiento es especialmente notorio en los extractos de raíz de *A. purpurata*, hojas y tallos de *R. alpinia* y tallos de *R. nicolaioides*, dicha actividad antihemorrágica puede deberse, además, a la presencia de antocianinas, ya que se ha descrito que estos compuestos disminuyen la fragilidad capilar y tienen acciones anti-inflamatorias (Harborne & Renee, 1988). De la misma manera, los compuestos

polifenolicos, como la antocianinas y los flavonoides, también pueden formar complejos con Zn^{2+}, explicando la disminución de la actividad proteolítica y hemorrágica, mediada en parte por metaloproteinasas dependientes de Zinc (Dobbin & Hider, 1990; McDonald et al., 1996; Haslam, 1996).

En estudios previos, la inhibición del efecto letal del veneno de *B. asper* con los rizomas de *R. alpinia*, ya había sido demostrada cuando su administración se realiza de forma conjunta (Otero *et al.*, 2000b); o con extractos de hojas administrados (75 mg de extracto /Kg de ratón) de manera independiente al veneno (Patiño *et al.*, 2012). Los resultados de este trabajo demuestran que con dosis menores de diferentes extractos de *R. alpinia* se puede lograr un 100% de inhibición del efecto letal inducido por el veneno de *B. asper;* además, la efectividad de los otros dos extractos de diferentes especies de la familia Zingiberaceae evaluados en este trabajo (principalmente tallos de *A. purpurata* y hojas de *R. nicolaioides*), es comparable con los resultados obtenidos para *R. alpinia*, pues son capaces de inhibir, en su gran mayoría, el efecto protector de la letalidad con administraciones diarias de 75 mg de extracto/ Kg de peso de ratón de manera previa, pues esta dosis ha sido reportada previamente como inhibitoria del efecto letal del venenos de *B. asper* para dicha especie.

En estudios anteriores se había reportado la seguridad de diferentes extractos de hojas de *R. alpinia* mediante la evaluación de la toxicidad aguda, la cual no produjo efectos adversos a la dosis de 2.000 mg/kg (Patiño *et al.*, 2012); en éste trabajo, se demuestra la seguridad de los extractos de tallo y raíz de *A. purpurata* y hojas de *R. nicolaioides* con la misma dosis, con la sobrevivencia de los todos los ratones tratados durante el tiempo de experimentación. Es importante resaltar que la inhibición de los efectos tóxicos del veneno, especialmente la inhibición del efecto letal, se logran con concentraciones mucho más bajas que las ensayadas para el experimento de toxicidad, lo que hace de los extractos etanólicos de estas plantas una buena opción para continuar los estudios de nuevas alternativas que coadyuven a disminuir los efectos tóxicos ocasionados por los venenos de las serpientes.

CONCLUSIONES

El trabajo rescata los usos tradicionales de las plantas y creencias que rodean el accidente ofídico en las comunidades campesinas del oriente antioqueño, encontrando algunas especies sin reportes previos sobre su fitoquímica, o sobre este y otros usos, y una planta en proceso de descripción como nueva especie (*Piper purpuraspicatum* Callejas, Ined).

Las formas de preparación, la posología y las vías de administración de las plantas usadas, a través de los años, como una opción que tienen las comunidades rurales para afrontar las diferentes necesidades en salud; es un conocimiento que se debe preservar y validar experimentalmente, para conservar la tradición, perpetuar algunas prácticas y disminuir la fragilidad que conlleva la tradición oral.

La efectividad de los extractos de las plantas de la familia Zingiberaceae, principalmente de los extractos de raíz de *Alipinia purpurata* y hojas de *Renealmia alpinia* y *Renealmia nicolaioides*, como inhibidores de efectos ocasionados por el veneno de *B. asper*, conduce a pensar que existen en esta familia, metabolitos responsables de las actividades; por esto se deben continuar los estudios tendientes a aislarlos e identificarlos y desarrollar una matriz que mejore la disolución de los compuestos de estos extractos y su absorción y distribución en el organismo, además de su estabilidad y potencia en dicha matriz a través del tiempo.

Considerando los resultados de toxicidad aguda, los extractos evaluados podrían convertirse en una ayuda (fundamentalmente de carácter preventivo) para aquellas poblaciones vulnerables; por esta razón, se deben continuar los estudios con otros modelos biológicos para evaluar dosificaciones y vías de administración, pues los resultados ofrecen potenciales beneficios como eventuales coadyuvantes del antiveneno en el tratamiento del accidente ofídico, en la medida en que pueden ser empleados como un tratamiento profiláctico, que al ser administrado previamente, proteja al accidentado de la gravedad de la alteraciones fisiopatólogicas que causa el veneno.

La metodología empleada para evaluar la capacidad inhibitoria del efecto letal, es eficaz para validar la utilidad de los extractos como una ayuda de carácter profiláctico, en el tratamiento del envenenamiento por mordeduras de serpientes, que ayude a

prevenir, con administraciones diarias del extracto previas a la envenenamiento, los daños que provoque el veneno, que puedan conducir como la pérdida de miembros por la rápida instalación de la sintomatología local o el posible daño ocasionado en diferentes órganos, que puede llevar ala muerte, mientras el paciente es remitido a un centro de salud, donde puedan suministrarle el antiveneno.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abadía, G., 1977. Compendio general de folklore Colombiano. Editorial Andes, Bogotá, pp. 422–49.

Alam, M.I., Audi, B., Gómez, A., 1994. Isolation, purification and partial characterization of viper venom inhibiting factor from the root extract of the Indian medicinal plant sarsaparilla (*Hemidesmus indicus* R. Br.). Toxicon 32, 1551–1557.

Alam, M.I. & Gómez, A., 1995. Indian medicinal plants active against Elapidae and Viperidae snake venoms. En: Abstracts First International Congress on Envenomations and their Treatments. París: Institut Pasteur.

Alam, M.I. & Gomes, A., 2003. Snake venom neutralization by Indian medicinal plants (*Vitex negundo* and *Emblica officinalis*) root extracts. Journal of Ethnopharmacology 86, 75–80.

Alarcón, J.C., Martínez, D.M., Quintana, J.C., Jiménez, S.L., Díaz, A., Jiménez, I., 2008. Propagación in vitro de *Renealmia alpinia* (Rottb), planta con actividad antiofídica. Vitae15 (1), 61-69.

Alexiades, Miguel N., 1996. Selected guidelines for ethnobotanical research: A field manual. The New York Botanical Gardens scientific Publications Program. Bronx, New York, USA. pp. 53–89.

Andriao-Escarso, S.H., Soares, A.M., Rodrigues, V.M., Angulo, Y., Diaz, C., Lomonte, B., Gutiérrez, J.M., Giglio, J.R., 2000. Myotoxic phospholipases A(2) in bothrops snake venoms: effect of chemical modifications on the enzymatic and pharmacological properties of bothropstoxins from Bothrops jararacussu. Biochimie 82, 755-763.

Bon, C. 1996. The sérum-thérapie was discovered 100 years ago. Toxicon 34(2):142–143

Barbosa, P.S., Martins, A.M., Havt, A., Toyama, D.O., Evangelista, J.S., Ferreira, D.P., Joazeiro, P.P., Beriam, L.O., Toyama, M.H., Fonteles, M.C., Monteiro, H.S., 2005.

Renal and antibacterial effects induced by myotoxin I and II isolated from Bothrops jararacussu venom. Toxicon 46, 376-386.

Basha, S.K. & Sudarsanam, G., 2012. Traditional use of plants against snakebite in Sugali tribes of Yerramalais of Kurnool district, Andhra Pradesh, India. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine S575-S579.

Bonet, M.À. & Vallès, J., 2007. Ethnobotany of Montseny biosphere reserve (Catalonia, Iberian Peninsula): Plants used in veterinary medicine. Journal of Ethnopharmacology 110, 130–147.

Brandão, M.G.L., Zanetti, N.N.S., Oliveira, P., Grael, C.F.F., Santos, A.C.P., Monte-Mór, R.L.M., 2008. Brazilian medicinal plants described by 19th century European naturalists and in the Official Pharmacopoeia. Journal of Ethnopharmacology 120, 141–148.

Butler, R., Montagnini, F., Arroyo, P., 2008. Woody understory plant diversity in pure and mixed native tree plantations at La Selva Biological Station, Costa Rica. Forest Ecology and Management 225, 2251-2263.

Calmette, L.C.A., 1896. The treatment of animals poisoned with snake venom by the injection of anti-venomous serum. The Lancet, 2: 449-450.

Castro, O., Gutiérrez, J.M., Barrios, M., Castro, I., Romero, M., Umaña, E., 1999. Neutralización del efecto hemorrágico inducido por veneno de *Bothrops asper* (Serpentes: Viperidae) por extractos de plantas tropicales. Revista de Biología Tropical 47, 605–616.

Chantrachit, T. & Paull, R.E., 1998. Effect of hot water on red ginger (*Alpinia purpurata*) inflorescence vase life. Postharvest Biology and Technology 14, 77-86.

Chan, E.W.C., Lim, Y.Y., Wong, L.F., Lianto, F.S., Wong, S.K., Lim, K.K., Joe, C.E., Lim, T.Y., 2008. Antioxidant and tyrosinase inhibition properties of leaves and rhizomes of ginger species. Food Chemistry 109, 477-483.

Chopra, R.N., Nayar, S.L., Chopra, I.C., 1956. Glossary of Indian Medicinal Plants. Council of Scientific and Industrial Research, New Delhi, India, pp. 330.

Coe, F. G., 2008. Rama midwifery in eastern Nicaragua. Journal of Ethnopharmacology 117, 136-157.

Coe, F. G. & Anderson, G. J., 2005. Snakebite ethnopharmacopoeia of eastern Nicaragua. Journal of Ethnopharmacology 96, 303-323.

Coelho-Ferreira, M., 2009. Medicinal knowledge and plant utilization in an Amazonian coastal community of Muradá, Pará State (Brazil). Journal of Ethnopharmacology 126, 159-175.

Comisión de Regulación en Salud –CRES–, 2011. Acuerdo No. 29 de 2011 – Por el cual se sustituye el Acuerdo 028 de 2011 que define, aclara y actualiza integralmente el Plan Obligatorio de Salud.

Consejo Nacional de Seguridad Social en Salud –CNSSS–, 2002. Acuerdo No. 228 de 2002 - Por medio del cual se actualiza el Manual de Medicamentos del Plan Obligatorio de Salud y se dictan otras disposiciones.

Consejo Nacional de Seguridad Social en Salud –CNSSS–, 2009. Acuerdo No. 008 de 2009 - Por el cual se aclaran y actualizan integralmente los Planes Obligatorios de Salud de los Regímenes Contributivo y Subsidiado.

Costa Torres, A.F., Dantas, R.T., Toyama, M.H., Diz Filho, E., Zara, F.J., Rodrigues de Queiroz, M.G., Pinto Nogueira, N.A., Rosa de Oliveira, M., de Oliveira Toyama, D., Monteiro, H.S., Martins, A.M., 2010. Antibacterial and antiparasitic effects of Bothrops marajoensis venom and its fractions: Phospholipase A2 and L-amino acid oxidase. Toxicon 55, 795-804.

Cotton, C.M., 1996. Ethnobotany: principles and applications. Edd John Wiley & Sons Ltda. West Sussex, Inglaterra. Cap 12: 347-374.

de Mesquita, M.L., de Paula, J.E., Pessoa, C., de Moraes, M.O., Costa-Lotufo, L.V., Grougnet, R., Michel, S., Tillequin, F., Espindola, L.S., 2009. Cytotoxic activity of Brazilian Cerrado plants used in traditional medicine against cancer cell lines. Journal of Ethnopharmacology 123, 439-445.

Dirección Seccional de Salud de Antioquia – DSSA, 2011. Eventos de interés en Salud Pública.

Dobbin, P.S. & Hider, R.C., 1990. Iron chelation therapy. Chemistry in Britain, 26, 565-568.

Domínguez, X.A., 1979. Métodos de investigación fitoquímica. México, Limusa.

Evangelista, I.L., Martins, A.M., Nascimento, N.R., Havt, A., Evangelista, J.S., de Noroes, T.B., Toyama, M.H., Diz-Filho, E.B., Toyama Dde, O., Fonteles, M.C., Monteiro, H.S., 2010. Renal and cardiovascular effects of Bothrops marajoensis venom and phospholipase A2. Toxicon 55, 1061-1070.

Fernández, M., Ortiz, W., Pereañez, J.A., Martínez, D., 2011 Evaluación de las propiedades antiofídicas del extracto etanólico y fracciones obtenidas de *Renealmia alpinia* (Rottb) mass (Zingiberaceae) cultivada *in vitro*. Vitae 17 (1), 75-82.

Ferreira, L.A.F. Henriques, O.B., Andreoni, A.A.S., Vital, G.R.F., Campos, M.M.C., Habermehl, G.G., de Moraes, V.L.G., 1992. Antivenom and biological effects of ar-trumerone isolated from *Curcuma longa* (Zingiberaceae). Toxicon 30 (10), 1211-1218.

Flórez, L., 1951. Medicina, magia y animismo en Segovia de Antioquia. Revista de Folklore, Instituto Etnológico Nacional 6, Colombia. pp 185–195.

Fonnegra, R., 1990. Taxonomía de plantas vasculares: Conceptos básicos. Universidad de Antioquia, Medellín.

Fonnegra, R. & Roldan, F.J., 1994. Simposio sobre plantas medicinales y/o toxicas. Imprenta de Colombia, Medellín, pp. 241.

Gené, J.A., Roy, A., Rojas, G., Gutiérrez, J.M., Cerdas, L., 1989. Comparative study on coagulant, defibrinating. fibrinolytic and fibrinogenolytic activities of Costa Rican crotaline snake venoms and their neutralization by a polyvalent antivenom. Toxicon 27, pp. 841–848.

Gentry, A. H., 1993. A field guide to the families and genera of woody plants of Northwest South America (Colombia, Ecuador, Peru). Conservation International, Washington, D.C.

Gómez M., A., 2004. Conservation of native plants in Colombia – A real drama. In: International Congress of Botanical Gardens. Barcelona, España.

Gowda, T.V., 1997. Interaction of snake venom phospholipases A_2 with plant isolates. In: Kini, R.M. (Ed.), Venom phospholipases A_2 enzymes. John Wiley & Sons, Chichester.

Gu, J.Q., Park, E.J., Vigo, J.S., Graham, J.G., Fong, H.H., Pezzuto, J.M., Kinghorn, A.D., 2002. Activity-guided isolation of constituents of *Renealmia nicolaioides* with the potential to induce the phase II enzyme quinone reductase. Journal of Natural Products, 65 (11), 1616–20.

Gupta, M.P., Solís, P.N., Calderón, A.I., Guinneau-Sinclairc, F., Correa, M., Galdames, C., Guerra, C., Espinosa, A., Alvenda, G.I., Robles, G., Ocampo, R., 2005. Medical Ethnobotany of the Teribes of Bocas del Toro, Panama. Journal of Ethnopharmacology 96, 389–401

Gutiérrez, J.M., 2011. Envenenamientos por mordeduras de serpientes en América Latina y el Caribe: Una visión integral de carácter regional. Bol Mal Salud Amb 51 (1), 1-16.

Gutiérrez, J.M., Chaves, F., Bolaños, R., Cerdas, L., Rojas, E., Arroyo, O., Portilla, E., 1981. Neutralización de los efectos locales del veneno de *Bothrops asper* por un antiveneno polivalente. Toxicon 19, 493–500.

Gutiérrez, J.M., Ávila, C., Rojas, C., Cerdas, L., 1988. An alternative *in vitro* method for testing the potency of the polyvalent antivenom produced in Costa Rica. Toxicon 26 (4), 411-413.

Gutiérrez, J.M. & Lomonte, B., 1995. Phospholipase A2 myotoxins from Bothrops snake venoms. Toxicon 33, 1405-1424.

Gutiérrez, J.M. & Lomonte, B., 2003. Efectos locales en el envenenamiento ofídico en América Latina: Animais Peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes In: Costa Cardoso, J.L., de SiqueiraFrança, F.O., Wen, F.H., Sant'AnaMálaque, C.M. & Haddad, V., Eds.), Sarvier Editora, São Paulo, Brasil. pp. 310-323.

Harborne, J.B. & Renee, J.G., 1988. The anthocyanins. In: Harborne, J.B. (ed.). The Flavonoids. Chapman and Hall, Londres. p.p. 1-20.

Haslam, E., 1996. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: Possible modes of action. Journal of Natural Products 59, 205-215.

Houghton, P.J. & Osibogun, I.M., 1993. Flowering plants used against snakebite. Journal of Ethnopharmacology 39, 1-29.

Ibarra-Manríquez, G., Ricker, M., Angeles, G., Sinaca Colín, S., Sinaca Colín, M.A., 1997. Useful plants of the Los Tuxtlas rain forest (Veracruz, Mexico): Considerations of their market potential. Economic botany 51 (4), 362-376.

Instituto Nacional de Salud – INS, 2012. Informe del evento accidente ofídico, hasta el décimo segundo periodo epidemiológico del año 2012.

Instituto Nacional de Salud – INS, 2011. Protocolo de Vigilancia y Control de Accidente Ofídico. Versión: 00 Aprobado: 08/08/2011.

Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos – INVIMA, 2011. Listado de Medicamentos Vitales No Disponibles. Actualizado a Diciembre de 2011.

Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos – INVIMA, 2013. Listado de Medicamentos Vitales No Disponibles. Actualizado a Marzo 2013.

Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos – INVIMA, 2013. Consultas, Registros y Documentos Asociados. Disponible en: http://www.invima.gov.co/index.php?option=com_content&view=article&id=792%3Ac

onsultas-registros-y-documentos-asociados&catid=112%3Atramites-y-servicios&Itemid=161. Consultado el 19 de Abril de 2013.

Jantan, I.B., Yassin, M.S.M., Chin, C.B., Chen, L.L., Sim, N.L., 2003. Antifungal activity of the essential oils of nine Zingiberaceae species. Pharmaceutical Biology 41, 392–397.

Kamiguti, A.S. & Cardoso, J.L.C., 1989. Hemostatic changes caused by the venoms of South American snakes. Toxicon 27, 955-963.

Kini, R.M., 2003. Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A2 enzymes. Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology 42, 827-840.

Kini, R.M. & Evans, H.J., 1987. Structure-function relationships of phospholipases. The anticoagulant region of phospholipases A2. J Biol Chem 262, 14402-14407.

Kirtikar, K.R. & Basu, B.D., 1975. Indian Medicinal Plants, vols. 1–4. International book Distributors, Dehradun, India, pp. 2793.

Kondo, H., Kondo, S., Ikesawa, H., Murata, R., Ohsaka, A., 1960. Studies on the quantitative method for determination of haemorrhagic activity of Habu snake venom. Japanese Journal of Medical Science and Biology 13, 43–51.

Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227 (5259), 680-685.

Lans, C., Harper, T., Georges, K., Bridgewater, E., 2001. Medicinal and ethnoveterinary remedies of hunters in Trinidad. BMC Complementary and Alternative Medicine 1, 10.

Landucci, E.C., de Castro, R.C., Toyama, M., Giglio, J.R., Marangoni, S., De Nucci, G., Antunes, E., 2000. Inflammatory oedema induced by the lys-49 phospholipase A(2) homologue piratoxin-i in the rat and rabbit. Effect of polyanions and p-bromophenacyl bromide. Biochem Pharmacol 59, 1289-1294.

Leanpolchareanchai, J., Pithayanukul, P., Bavovada, R., Saparpakorn, P., 2009. Molecular docking studies and anti-enzymatic activities of Thai mango seed kernel extract against snake venoms. Molecules 14 (4), 1404-1422.

Lentz, D.L., Clark, A.M., Hufford, C.D., Meurer-Grimes, B., Passreiter, C.M., Cordero, J., Ibrahimi, O., Okunade, A.L., 1998. Antimicrobial properties of Honduran medicinal plants. Journal of Ethnopharmacology 63, 253-263.

Lewis, W.H. & Elvin-Lewis, M.P.F., 1977. Medical Botany—Plants Affecting Man's Health. Wiley Interscience Publication John Wiley and Sons, New York, NY, pp. 345–347.

Lomonte. B., Lundgren. J., Johansson. B., Bagge, U., 1994. The dynamics of local tissue damage induced by *Bothrops asper* snake venom and myotoxin II on the mouse cremaster muscle: an intravital and electron miocroscopic study. Toxicon 32, 41-55.

Lomonte, B., León, G., Angulo, Y., Rucavado, A., Núñez, V., 2009. Neutralization of *Bothrops asper* venom by antibodies, natural products ans synthetic drugs: Contributions to understanding snakebite envenomings and their treatment. Toxicon 59, 1012-1028.

Majumdar,I.D., Devanabanda, A., Fox, B., Schwartzman, J., Cong, H., Porco Jr, J.A., Weber, H.C., 2011. Synthetic cyclohexenyl chalcone natural products possess cytotoxic activities against prostate cancer cells and inhibit cysteine cathepsins *in vitro.* Biochemical and Byophysical Research Communications 416, 397-402.

Markland, F.S., 1998a. Snake venoms and the hemostatic system. Toxicon 36, 1749-1800.

Markland, F.S., Jr., 1998b. Snake venom fibrinogenolytic and fibrinolytic enzymes: an updated inventory. Registry of Exogenous Hemostatic Factors of the Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. Thrombosis and haemostasis 79, 668-674.

McDonald, M., Mila, I., Scalbert, A., 1996. Precipitation of metal ions by plant polyphenols: Optimal conditions and origin of precipitation. Journal of Agricultural Food and Chemistry, 44:599-606.

Mebs, D., 2002. *Venomous and Poisonous Animals.* A Handbook for Biologists, Toxicologists and Toxinologists, Physicians and Pharmacists, Medpharm Scientific Publishers, Stuttgart.

Meier, J. & Stocker, K.F., 1995. Biology and distribution of venomous snakes of medical importance and the composition of snake venoms. In: Meier, J., White, J. (Eds.), Handbook of Clinical Toxicology of Animal, Venoms and Poisons. CRC Press, Boca Raton. 367-412.

Melo, P.A., Nascimento, M.C., Mors, W.B., Suarez-Kurtz, G., 1994. Inhibition of the myotoxic and hemorrhagic activities of crotalid venoms by *Eclipta prostata* (Asteraceae) extracts and constituents. Toxicon 32, 595-603.

Melo, P.A. & Ownby, C.L., 1999. Ability of wedelolactone, heparin, and p-bromophenacyl bromide to antagonize the myotoxic effects of two crotaline venoms and their PLA2 myotoxins. Toxicon 37, 199-215.

Milliken, W. & Albert, B., 1997. The use of medicinal plants by the Yanomami Indians of Brazil, Part II. Economic botany 51 (3), 264-278.

Molander, M., Saslis-Lagoudakis, C.H., Jäger, A.K., Rønsted, N., 2012. Cross-cultural comparison of medicinal floras used against snakebites. Journal of Ethnopharmacology 139, 863-872.

Mors, W.B., do Nascimento, M.C., Parente, J.P., Da Silva, M.H., Melo, P.A., Suarez-Kurtz, G., 1989. Neutralization of lethal and myotoxic activities of South American rattlesnake venom by extracts and constituents of the plant *Eclipta prostrata* (Asteraceae). Toxicon 27, 1003–1009.

Murakami, M.T., Arruda, E.Z., Melo, P.A., Martinez, A.B., Calil-Elias, S., Tomaz, M.A., Lomonte, B., Gutiérrez, J.M., Arni, R.K., 2005. Inhibition of myotoxic activity of Bothrops asper myotoxin II by the anti-trypanosomal drug suramin. Journal of molecular biology 350, 416-426.

Nadkarni, K.M., 1976. Indian Materia Medica, vols. I–II. Popular Prakashan Private Limited (Popular Press), Bombay, pp. 1–968.

Núñez, V., Otero, R., Barona, J., Saldarriaga, M., Osorio, R.G., Fonnegra, R., Jiménez, S.L., Díaz, A., Quintana, J.C., 2004. Neutralization of the edema-forming, defibrinating and coagulant effects of *Bothrops asper* venom by extracts of plants used by healers in Colombia. Neutralizing Journal of Medical and Biological Research 37, 969-977.

Núñez, V., Castro, V., Murillo, R., Ponce-Soto, L.A., Merfort, I., Lomonte, B., 2005. 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 66, 1017–1025.

Okonogi, T., Hattori, Z., Ogiso, A., Mitsui, S., 1979. Detoxification by persimmon tannin of snake venoms and bacterial toxins. Toxicon 17, 524-527.

Oliveira, C.Z., Maiorano, V.A., Marcussi, S., Sant'Ana, C.D., Januário, A.H., Lourenço, M.V. Sampaioi, S.V., França, S.C., Pereira, P.S., Soares, A.M., 2005. Anticoagulant and antifibrinogenolytic properties of the aqueous extract from *Bauhinia forficata* against snake venoms. Journal Ethnopharmacology 98, 213-216.

Organization for Economic Cooperation and Development – OECD, 2001. Guideline for testing of chemicals. Acute oral toxicity – Acute toxic class method. Diciembre 17, 2001.

Orozco R., 2009. Departamento de Antioquia, Accidente Ofídico 2008, Dirección Factores de Riesgo Seccional de Salud, Antioquia.

Orozco R., 2010. Departamento de Antioquia, Accidente Ofídico 2008, Dirección Factores de Riesgo Seccional de Salud, Antioquia.

Otero R., 1998. Seroterapia y tratamiento del accidente ofídico en Antioquia y Chocó. Primer simposio colombiano de toxinología.

Otero, R. 2002. Seroterapia antivenenosa. Ventajas del uso de antivenenos del tipo IgG, F(ab´)2 o Fab en picaduras de escorpiones y mordeduras de serpientes. Revista de Pediatría. 37, 8-16.

Otero R., 2007. Envenenamiento Ofídico. Fundamentos de Pediatría. Tomo V, cap 48, pp 551-569.

Otero, R., Tobón, G.S., Gómez, L.F., Osorio, R., Valderrama, R, Hoyos, D., Urreta, J.E., Molina, S., Arboleda, J.J., 1992. Accidente ofídico en Antioquia y Chocó. Aspectos clínicos y epidemiológicos (marzo 1989-febrero de 1990). Acta Médica Colombiana 17 pp. 229-249.

Otero, R., Gutiérrez, J.M., Núñez, V., Robles, A., Estrada, R., Segura, E., Toro, M.F., García, M.E., Díaz, A., Ramírez, E.C., Gómez, G., Castañeda, J., Moreno, M.E., 1996. A randomized double-blind clinical trial of two antivenoms in patients bitten by *Bothrops atrox* in Colombia. The Regional Group on Antivenom Therapy Research (REGATHER). Trans R Soc Trop Med Hyg., 90:696-700.

Otero, R., Fonnegra, R., Jiménez, S.L., Núñez, V., Evans, N., Alzate, S.P., García, M.E., Saldarriaga, M., del Valle, G., Osorio, R.G., Díaz, A., Valderrama, R., Duque, A., Vélez, H.N., 2000a. Snakebites and ethnobotany in the northwest region of Colombia. Part I: Traditional use of plants. Journal of Ethnopharmacology 71, 493–504.

Otero, R., Núñez, V., Jiménez, S.L., Fonnegra, R., Osorio, R.G., García, M.E., Díaz, A., 2000b. Snakebites and ethnobotany in the northwest region of Colombia: part II: neutralization of lethal and enzymatic effects of *Bothrops atrox* venom. Journal of Ethnopharmacology 71, 505-511.

Otero, R., Nuñez, V., Barona, J., Fonnegra, R., Jiménez, S.L., Osorio, R.G., Saldarriaga, M., Díaz, A., 2000c. Snakebites and ethnobotany in the northwest region of Colombia. Part III: Neutralization of the haemorrhagic effect of *Bothrops atrox* venom. Journal of Ethnopharmacology 73, 233–241.

Otero, R., Callejas, M.E., Gutiérrez, J., Lotero, G.J., Rodríguez, O., Villa, N.E., Osorio, R.G., Bastidas, M., Díaz, A., Núñez, V., 2001. Necesidades reales de antivenenos en Colombia. Características de los productos y del mercado. Revista epidemiológica de Antioquia 26, 49-59.

Otero, R., Gutiérrez, J., Mesa, M.B., Duque, E., Rodríguez, O., Aranga, J.L., Gómez, F., Toro, A., Cano, F., Rodríguez, L.M., Caro, E., Martínez, J., Cornejo, W., Gómez, L.M., Uribe, F.L., Cárdenas, S., Nuñez, V., Diaz, A., 2002. Complications of *Bothrops,*

Porthidium, and *Bothriechis* snakebites in Colombia. A clinical and epidemiological study of 39 cases attended in a university hospital. Toxicon 40, 1107–1114.

Otero, R., León, G., Gutiérrez, J.M., Rojas, G., Toro, M.F., Barona, J., Rodríguez, V., Díaz, A., Núñez, V., Quintana, J.C., Ayala, S., Mosquera, D., Conrado, L.L., Fernández, D., Arroyo, Y., Paniagua, C.A., López, M., Ospina, C.E., Alzate, C., Fernández, J., Meza, J.J, Silva, J.F., Ramírez, P., Fabra, P.E., Ramírez, E., Córdoba, E., Arrieta, A.B., Warrell, D.A., Theakston, R.D,, 2006. Efficacy and safety of two whole IgG polyvalent antivenoms, refined by caprylic acid fractionation with or without beta-propiolactone, in the treatment of *Bothrops asper* bites in Colombia. Trans R Soc Trop Med Hyg.,100:1173-82.

Otero-Patiño, R., Segura, A., Herrera, M., Angulo, Y., León, G., Gutiérrez, J.M., Barona, J., Estrada, S., Pereañez. A,, Quintana, J.C., Vargas, L.J., Gómez, J.P., Díaz, A., Suárez, A.M., Fernández, J., Ramírez, P., Fabra, P., Perea, M., Fernández, D., Arroyo, Y., Betancur, D., Pupo, L., Córdoba, E.A., Ramírez, C.E., Arrieta, A.B., Rivero, A., Mosquera, D.C, Conrado, N.L., Ortiz, R., 2012. Comparative study of the efficacy and safety of two polyvalent, caprylic acid fractionated [IgG and F(ab')2] antivenoms, in *Bothrops asper* bites in Colombia. Toxicon. 59:344-55.

Patiño, A.C., López, J., Aristizábal, M., Quintana, J.C., Benjumea, D., 2012. Efecto inhibitorio de extractos de *Renealmia alpinia* Rottb. Maas (Zingiberaceae) sobre el veneno de *Bothrops asper* (mapaná). Biomédica 32, 365-74.

Pérez, A.E. 1996. Plantas útiles de Colombia. 5a edición del centenario, Bogotá. Fondo FEN Colombia. Vol.1. pp 56-87.

Phillipson, J.D., 2007. Phytochemistry and pharmacognosy. Phytochemistry 68, 2960–2972.

Pineda, D. & Rengifo J.M., 2002. Accidentes por Animales Venenosos. Santa Fe de Bogotá, Instituto Nacional de Salud, 31-63.

Raj, C.A., Ragavendran, P., Sophia, D., Rathi, M.A., Gopalakrishnan, V.K., 2012. Evaluation of *in vitro* antioxidant and anticancer activity f *Alpinia purpurata*. Chinese Journal of Natural Medicines 10 (4), 263-268.

Reyes-Chilpa, R., Gómez-Garibay, F., Quijano, L., Magos-Guerrero, G.A., Ríos, T., 1994. Preliminary results on the protective effect of (-)-edunol, a pterocarpan from *Brongniartia podalyrioides* (Leguminosae), against *Bothrops atrox* venom in mice. Journal of Ethnopharmacology 42, 199–203.

Ruysschaert, S., von Andel, T., Van de Putte, Kobeke, Van Damme, P., 2009. Bathe the baby to make it strong and healthy: Plant use and child care among Saramaccan Maroons in Suriname. Journal of Ethnopharmacology 121, 148–170.

Sabitha, G., Yadagiri, K., Yadav, J.S., 2007. A short and efficient synthesis of renealtins A and B. Tetrahedron Letters 48, 8065–8068.

Samy, R.P., Thwin, M.M., Gopalakrishnakone, P., Ignacinuthu, S., 2008. Ethnobotanical survey of folk plants for the treatment of snakebites in Southern part of Tamilnadu, India. Journal of Ethnopharmacology 115, 302–312.

Sanabria, A., 1983. Análisis fitoquímico preliminar. Departamento de Farmacia, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá.

Santos, G.K.N., Dutra, K.A., Barros, R.A., da Câmara, C.A.G., Lira, D.D., Gusmão, N.B., Navarro, D.M.A.F., 2012. Essential oils from Alpinia purpurata (Zingiberaceae): Chemical composition, oviposition deterrence, larvicidal and antibacterial activity. Industrial Crops and Products 40, 254-260.

Santoro, M.L. & Sano-Martins, I.S., 2004. Platelet dysfunction during *Bothrops jararaca* snake envenomation in rabbits. Journal of Thrombosis and Haemostasis 92, 369-83.

Sanz-Biset, J., Campos-de-la-Cruz, J., Epiquién-Rivera, M.A., Cañigueral, S., 2009. A first survey on the medicinal plants of the Chazuta valley (Peruvian Amazon). Journal of Ethnopharmacology 122, 333–362.

Särkinen, T.E., Newman, M.F., Maas, P.J.M., Maas, H., Poulsen, A.D., Harris, D.J., Richardson, J.E., Clark, A., Hollingsworth, M., Pennington, R.T., 2007. Recent oceanic long-distance dispersal and divergence in the amphi-Atlantic rain forest genus Renealmia L.f. (Zingiberaceae). Molecular Phylogenetics and Evolution 44, 968-980.

Sazuka, M., Imazawa, H., Shoji, Y., Mita, T., Hara, Y., Isemura, M., 1997. Inhibition of collagenases from mouse lung carcinoma cells by green tea catechins and black tea theaflavins. Bioscience, Biotechnology & Biochemistry, 61, 1504–1506.

Singh, A.K., Raghubanshi, A.S., Singh, J.S., 2002. Medical ethnobotany of the tribals of Sonaghati of Sonbhadra district, Uttar Pradesh, India. Journal of Ethnopharmacology 81, 31-41.

Sirat, H.M. & Liamen, Md.R., 1995. Chemical constituent of Alpinia purpurata. Pertanika Journal of Science and Technology 3 (1), 67-71.

Six, D.A. & Dennis, E.A., 2000. The expanding superfamily of phospholipase A(2) enzymes: classification and characterization. Biochim Biophys Acta 1488, 1-19.

Stock, R.P., Massougbodji, A., Alagon, A., Chippaux, J., 2007. Bringing antivenoms to Sub-Saharan Africa. Natural Biotechnology. 25, 173-177.

Su, B., Jung Park, E., Schunke Vigo, J., Graham, J.G., Cabieses, F., Fong, H.H.S., Pezzuto, J.M., Kinghorn, A.D., 2003. Activity-guided isolation of the chemical constituents of *Muntingia calabura* using a quinone reductase induction assay. Phytochemistry 63, 335–341.

Subramanian, V. & Suja, S., 2011. Phytochemical screening of *Alpinia purpurata* (Veill). Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences 2 (3), 866-871.

Tchuendem, M.H.K., Mbah, J.A., Tsopmo, A., Foyere Ayafor, J., Sterner, O., Okunjic, C.C., Iwu, M.M., Schuster, B.M., 1999. Anti-plasmodial sesquiterpenoids from the African *Reneilmia cincinnata*. Phytochemistry 52, 1095-1099.

Theakston, R.D.G. & Reid, H.A., 1983. The development of simple standard assay procedures for the characterization of snake venoms. Bull. WHO. 61, pp. 949–956.

Tropicos.org. Missouri Botanical Garden. [En línea] 10 de Mayo de 2012. [Citado el: 10 de Mayo de 2012.] <http://www.tropicos.org>.

Tushar, Basak, S., Sarma, G.C., Rangan, L., 2010. Ethnomedical uses of Zingiberaceous plants of Northeast India. Journal of Ethnopharmacology 132, 286-296.

Tuntiwachwuttikul, P., Pancharoen, O., Prawat, U., 2000. Phytochemistry of the Zingiberaceae. Studies in Natural Products Chemistry 23, 797-865.

Usher, G., 1974. A Dictionary of Plants Used by Man. Constable and Company Ltd., London, pp. 619.

Valadeau, C., Pabon, A., Deharo, E., Albán-Castillo, J., Estevez, Y., Lores, F.A., Rojas, R., Gamboa, D., Sauvain, M., Castillo, D., Bourdy, G., 2009. Medicinal plants from the Yanesha (Peru): Evaluation of the leishmanicidal and antimalarial activity of selected extracts. Journal of Ethnopharmacology 123, 413-422.

van Wyk, B.-E., 2008. A review of Khoi-San and Cape Dutch medical ethnobotany. Journal of Ethnopharmacology 119, 331–341

Victório, C.P., Kuster, R.M., Moura, R.S., Lage, C.L.S., 2009. Vasodilator activity of extracts of field *Alpinia purpurata* (Vieill) K.Schum and *A. zerumbet* (Pers.) Burtt et Smith cultured *in vitro*. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences 45 (3), 507-514.

Villaflores, O.B., Macabeo, A.P.G., Gehle, D., Krohn, K., Franzblau, S.G., Aguinaldo, A.M., 2010. Phytoconstituent from *Alpinia purpurata* and their *in vitro* inhibitory activity against *Mycobacterium tuberculosis*. Pharmacognosy Magazine 6 (24), 339-344.

Wang, W.J., Shih, C.H., Huang, T.F. 2004. A novel P-I class metalloproteinase with broad substrate-cleaving activity, agkislysin, from *Agkistrodon acutus* venom. Biochemical and biophysical research communications 324, 224-30.

Weniger, B., 1991. Theory and instrumentation involved with extraction, control, quality insurance and registration of natural products. First International Advanced Course on Technology and Control of Drugs. Perugia, Italy, pp. 31 - 40.

World Health Organization – WHO, 1981. Progress in the characterization of venoms and standarization of antivenoms. Geneva: WHO.

Yang, S.W., Zhou, B.N., Malone, S., Werkhoven, M.C.M., Van Troon, F., Wisse, J.H., Kingston, D.G.I., 1999. A new labdane diterpenoid from *Renealmia alpinia* collected in the Suriname rainforest. Journal of Natural Products 62, 1173–1174.

Zambrano, A.M., 2012. Accidente ofídico como evento de interés en salud pública en Colombia: aportes al diseño de estrategias de gestión. Trabajo de investigación presentado como requisito parcial para optar al título de: Magíster en Administración. Facultad de Ciencias Económicas, Universidad Nacional de Colombia. Santa fe de Bogotá, D.C., Colombia.

Zhou, B.N., Baj, N.J., Glass, T.E., Malone, S., Werkhoven, M.C., van Troon, F., David, Wisse, J.H., Kingston, D.G., 1997. Bioactive labdane diterpenoids from *Renealmia alpinia* collected in the Suriname rainforest. Journal of Natural Products 60, 1287–1293.

Zoghbi, M.dG., Andrade, E.H.A., Maia, J.M.S., 1999. Volatile constituents from leaves and flowers of *Alpinia speciosa* K. Schum., and *A. purpurata* (Viell.) Schum. Flavor and Fragance Journal 14, 411-414.

Anexo A - ENCUESTA A CURANDEROS DEL ORIENTE ANTIOQUEÑO

PROGRAMA DE OFIDISMO UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA

1. Nombre:_____ Edad: _____
   Lugar de la encuesta:_____ Municipio: _____
2. ¿Cuánto tiempo hace que recomienda plantas para la cura de las enfermedades?
   _____
3. ¿Para qué enfermedades utilizan las plantas en ésta región?
   _____
4. ¿Cuáles son las plantas más usadas? _____
   _____
5. ¿Trata personas mordidas por culebras con plantas medicinales?
   SI _____ NO_____
6. ¿Cuántas personas mordidas por culebras ha tratado? _____
   _____
7. PLANTAS RECOMENDADAS PARA EL TRATAMIENTO DE MORDEDURAS DE CULEBRAS
   Nombre común de la planta: _____
   Mordedura para la que es utilizada: _____
   _____
   Parte utilizada: _____
   _____
   Forma de uso: _____
   _____
   _____
   Forma de preparación: _____
   _____
   _____
   Mezclas realizadas: _____
   _____
   _____
   Cantidad empleada: _____
   _____
   Tiempo de tratamiento: _____

_____

Colección: _____

_____

Observaciones: _____

_____

_____

_____

_____

8. ¿Conoce plantas para el tratamiento de hemorragias? SI___ NO ____

   ¿Cuáles? _____

9. ¿Conoce plantas para el tratamiento de inflamación? SI___ NO ____

   ¿Cuáles? _____

10. ¿Conoce plantas para el tratamiento de gangrenas? SI___ NO ____

    ¿Cuáles? _____

11. ¿Conoce plantas utilizadas para la mordedura o picadura de otros animales venenos? SI___NO____

    ¿Cuáles? _____

12. Conoce otros curanderos que traten la mordedura de serpientes?

    SI ___ NO ____

    (Nombre y ubicación) _____

Anexo B - Permiso de Colecta e Investigación

Cornare

BICENTENARIO
de la independencia de Colombia
1810-2010

170, 0002022

El Santuario, 06 DIC. 2010

Doctor
JUAN CARLOS ALARCÓN P.
Coordinador
Programa de Ofidismo/Escorpionismo
Universidad de Antioquia
Carrera 50 No 63-65
Medellín

ASUNTO: Permiso de Estudio de Flora. Rad. 112-5898-2010

Atento saludo:

Teniendo en cuenta la informacíon enviada por ustedes para adelantar el estudio de las plantas antiofídicas que tradicionalmente han sido utilizadas por la población del Oriente Antioqueño y dado que se trata de plantas localizadas en las parcelas o en los jardines de los pobladores por lo que no se requiere acudir a los bosques naturales para hacer la colección; les informamos que no es necesario tramitar el permiso de Estudio para Flora Silvestre.

Por lo anterior, pueden proceder a adelantar el estudio o investigación sin trámite alguno ante Cornare.

Atentamente;

Javier Valencia González
Subdirector de Servicio al Cliente

H.C.Y

Corporación Autónoma Regional de las cuencas de los ríos Negro - Nare "CORNARE" Autopista Medellín - Bogotá Km 54 El Santuario Antioquia NIT: 890985138-3 Tel. 546 1616, Fax: 546 0229, Email: scliente@cornare.gov.co, servicios@cornare.gov.co, Regionales: Páramo: 869 1569 - 869 1536, Valles de San Nicolás: 561 3656 - 561 3709, Bosques: 834 5529, Porce-Nus: 866 0126, Aguas: 861 1414, Granja Los Olivos: 546 3099, CITES Aeropuerto José María Córdova - Telefax: (054) 538 2040 - 287 4329, ONMT: 561 38 58 Ext. 122

Anexo C - Aval de Comité de Ética para la Experimentación con Animales

UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA

Comité de Ética para la Experimentación con Animales

Medellín, 18 de mayo de 2012

Investigador
JUAN CARLOS ALARCÓN PÉREZ
Programa Ofidismo/Escorpionismo
Universidad de Antioquia

Protocolo: "Neutralización del veneno de *Bothrops asper* con plantas de la familia Zingiberaceae utilizadas contra la mordedura de serpientes en los municipios antioqueños de San Carlos, San Luis y San Rafael".

Cordial saludo.

Después de realizadas los cambios sugeridos al protocolo en referencia y como consta en el acta No. 76 de la reunión realizada el 10 de mayo a las 4:00 pm en la sala de reuniones de la Vicerrectoría de Investigaciones de la Universidad de Antioquia, me permito comunicarle que cumple con los lineamientos establecidos por el **Comité de Ética para la Experimentación con Animales** de la Universidad de Antioquia.

Con toda atención.

Juan Rpo.
JUAN GONZALO RESTREPO SALAZAR
Coordinador
Comité de Ética para la Experimentación con Animales
Universidad de Antioquia

Vicerrectoría de Investigaciones (U de A) - Teléfono (574) 2195190
http://siu.udea.edu.co – Correo electrónico: etica.animal@siu.udea.edu.co
Medellín – Colombia