

**Universidad del Valle de Guatemala
Facultad de Ciencias y Humanidades
Departamento de Bioquímica y Microbiología**



Inhibición in vitro del efecto hemolítico del veneno de la serpiente mano de piedra (*Atropoides mexicanus*) causado por alcaloides de *Sansevieria trifasciata* y *Tradescantia spathacea*

Trabajo de graduación presentado por
Jorge Eduardo Chang Estrada
para optar al grado académico de Licenciado en Bioquímica y Microbiología

Guatemala

2017

**Inhibición in vitro del efecto hemolítico del veneno de la serpiente mano de
piedra (*Atropoides mexicanus*) causado por alcaloides de *Sansevieria trifasciata*
y *Tradescantia spathacea***

**Universidad del Valle de Guatemala
Facultad de Ciencias y Humanidades
Departamento de Bioquímica y Microbiología**



Inhibición in vitro del efecto hemolítico del veneno de la serpiente mano de piedra (*Atropoides mexicanus*) causado por alcaloides de *Sansevieria trifasciata* y *Tradescantia spathacea*

Trabajo de graduación presentado por
Jorge Eduardo Chang Estrada
para optar al grado académico de Licenciado en Bioquímica y Microbiología

Guatemala


2017

Vo.Bo

(f) 
Dra. Pamela Pennington

Tribuna Examinadora

(f) 
Dra. Kristina Rios

(f) 
Dra. Pamela Pennington

(f) 
Lic. José Miguel Morales

Fecha de aprobación: Guatemala, 15 de Marzo de 2017

Prefacio

La idea de este proyecto comenzó cuando asistí a una charla sobre venenos impartida por Msc. Daniel Ariano. En ese momento me quedé impactado, asombrado y sobre todo fascinado por el tema impartido al punto de decir que quería trabajar en ello. En el año 2015, estando en cuarto año de la carrera; investigando un poco llegué a una idea de trabajo y gracias a la catedra de Msc. Daniel Ariano y el apoyo de Msc Lucía Nitsch y Dra. Dalia Lau pude generar una idea innovadora y de uso potencial en el país.

La primera propuesta de investigación consistía en determinar la inhibición del veneno de la serpiente *Atropoides mexicanus* (la cual se seleccionó por ser una de las causantes de accidente ofídico menos estudiado en el país) mediante unas plantas utilizadas en Brasil; pero claro esto no era aplicable para Guatemala, puesto que las plantas no se cultivaban en el país. Por ello, hablando una tarde con la Lic. María René Álvarez llegamos al consenso de trabajar con plantas de uso folclórico de la cultura guatemalteca y por ello decidí trabajar con *Tradescantia spathacea* y *Sanseveira trifasciata*.

El siguiente paso consistió en la búsqueda activa de literatura con el propósito de encontrar que se había investigado a la fecha sobre el tema, ¿quiénes lo realizaban? Y sobre todo que podía hacer. Con ello se llegó a una idea más clara de investigación, la cual apoyo desde el inicio y el todo momento la Dra. Krisztina Ríos.

. Por último quiero agradecer a todas aquellas personas que me ayudaron durante la realización de esta investigación:

A mis padres por su apoyo incondicional a lo largo de toda mi carrera universitaria.

A Msc. Lucía Nitsch por creer en mí desde el inicio y sobre todo por apoyarme en todo momento.

A Carlo Martínez, Cristian Ruiz, Daniela Aparicio, Alicia Valdez, Melissa Villatoro y Alejandro Súchite por ayudarme en la fase experimental y por no dejar que me rindiera.

A la Dra Dalia Lau por siempre creer en mí y por ayudarme en todo lo que necesité.

A Licda Ana Luisa Mendizabal por su asesoría y apoyo.

A la Dra. Krisztina Ríos por ser la persona que nunca perdió la fe en mí, en esta investigación y sobre todo por ser una guía profesional y en mi desarrollo como persona.

Al Lic. José Miguel Morales por ser una guía durante la investigación y por donarme material de trabajo.

A Sergio Sánchez por ser vital en la extracción de alcaloides de ambas plantas y por su ayuda en la manipulación de plantas e implementación de distintos métodos de extracción de alcaloides.

A Msc. Daniel Ariano por la donación de material de trabajo y por enseñarme las técnicas y manejo para manipulación de serpientes y su veneno.

Al laboratorio de microbiología del departamento de Bioquímica y Microbiología de la Universidad del Valle de Guatemala por los materiales y equipo que me brindaron.

A zootropic por la donación de veneno.

*<<Nuestra gloria más grande no consiste en no haberse caído nunca
Sino en haberse levantado después de cada caída >>*

Confucio

Índice

| | |
|---------------------------------|------|
| Prefacio | iv |
| Lista de cuadros | vii |
| Lista de figuras | viii |
| Resumen | x |
| I.Introducción | 1 |
| II.Objetivos | 2 |
| III.Justificación | 3 |
| IV.Marco teórico | 5 |
| V.Métodos | 19 |
| VI.Resultados | 26 |
| VII.Discusión | 35 |
| VIII.Conclusiones | 40 |
| IX.Recomendaciones | 41 |
| X.Bibliografía | 42 |
| XI.Anexos | 47 |

Lista de cuadros

| | |
|--|----|
| Cuadro 1. Componentes enzimáticos del veneno de las serpientes de la familia Viperidae, con su masa esperada (kDa)..... | 12 |
| Cuadro 2. Componentes comunes de bajo peso molecular en el veneno de la familia Viperidae..... | 13 |
| Cuadro 3. Componentes hemolíticos del veneno del género <i>Atropoides</i> identificados por HPLC con una columna RP100 C ₁₈ de 250 x 4mm, con 5µm de tamaño de partícula; siendo eluido a 1mL/min | 13 |
| Cuadro 4. Alcaloides presentes en plantas del género <i>Sanseveira</i> | 16 |
| Cuadro 5. Composición química de <i>T. spathacea</i> de acuerdo a dos métodos de extracción | 18 |
| Cuadro 7. Plan de análisis de datos..... | 23 |
| Cuadro 8. Cuantificación de alcaloides para <i>Sanseveira trifasciata</i> y <i>Tradescantia spathacea</i> según cada fase de extracción..... | 26 |
| Cuadro 9. Resultado de GC- masas para en análisis de alcaloides de <i>S. trifasciata</i> , en él se ven las áreas de cada pico y el compuesto que se sospecha. | 27 |
| Cuadro 10. Resultado de GC-masas para el análisis de alcaloides de <i>T. spathacea</i> , en él se ven las áreas de cada pico y el compuesto que se sospecha. | 28 |
| Cuadro 11. Análisis de Shaphiro Wilk para evaluar supuesto de normalidad en los datos de absorbancia para curvas de hemólisis. Datos analizados en paquete estadístico R versión 3.1.2 | 48 |
| Cuadro 12. Análisis estadístico de la prueba Kruskal Wallis para evaluación de varianza para la comparación entre tratamientos inhibitorios (planta vs antiofídico) . | 49 |
| Cuadro 13. Porcentaje de inhibición en el efecto hemolítico del veneno de <i>A. mexicanus</i> según cada tratamiento realizado..... | 54 |
| Cuadro 14. Manejo de material biológico y como manejar un laboratorio según cada riesgo..... | 56 |
| Cuadro 15. Toxicidad y propiedades físico-químicas de los reactivos más utilizados.... | 57 |

Lista de figuras

| | |
|--|----|
| Figura 1. Distribución de la herpetofauna en Centro América, según la clasificación de Ryan (1963)..... | 7 |
| Figura 2. Cascada de coagulación y los agonistas que actúan sobre la cascada (vistos en color rojo)..... | 9 |
| Figura 3. Dentadura solegnoglifa de serpientes pertenecientes a la familia Viperidae, caracterizada por tener los colmillos al frente de la mandíbula; además, los colmillos poseen un orificio de salida del veneno en el centro del mismo..... | 10 |
| Figura 4. Distribución de <i>A.mexicanus</i> en Guatemala según estudios de López en el 2014. El área roja muestra los departamentos de Petén, Baja Verapaz, Quetzaltenando, Huehuetenango e Izabal..... | 11 |
| Figura 5. Fotografía de <i>A.mexicanus</i> proveniente de zootropic ciudad capital. | 11 |
| Figura 6. Planta <i>Sanseveira trifasciata</i> cuyo extracto es utilizado para el tratamiento de accidentes ofídicos en el folclore guatemalteco..... | 15 |
| Figura 7. <i>Tradescantia spathacea</i> | 17 |
| Figura 8. Montaje en porta objeto para bioensayos cualitativos..... | 21 |
| Figura 9. Esquema de la metodología realizada en la investigación | 25 |
| Figura 10. Ensayo cualitativo de Dragendor en TLC para evaluar la presencia de alcaloides dependiendo de la fase de extracción..... | 26 |
| Figura 11. Gráfico de barras para evaluar el porcentaje de inhibición en el efecto hemolítico del veneno de <i>A. mexicanus</i> mediante cada tratamiento realizado. | 29 |
| Figura 12. Resultado de bioensayos cualitativos para controles negativos, positivos y la evaluación de la inhibición del efecto hemolítico del veneno de <i>A. mexicanus</i> mediante cada tratamiento realizado..... | 30 |
| Figura 13. Curva de hemolisis para control negativo y positivo del efecto hemolítico del veneno de <i>A. mexicanus</i> . <i>Lisis eritrocítica medida por medio de espectofotometría</i> . 31 | |
| Figura 14. Curva de hemolisis para control positivo del efecto hemolítico del veneno de <i>A. mexicanus</i> (<i>azul</i>) e inhibición mediante tratamiento con <i>T. spathacea</i> (<i>rojo</i>)...... | 32 |
| Figura 15. Curva de hemólisis para control de inhibición del efecto hemolítico del veneno de <i>A. mexicanus</i> con un antisuero comercial (<i>azul</i>) e inhibición mediante tratamiento con <i>S. trifasciata</i> (<i>rojo</i>)...... | 33 |

| | |
|--|----|
| Figura 19. Comportamiento de los alcaloides a diferentes pH, perdiendo o ganando electrones. | 47 |
| Figura 20. Cromatograma de GC-masas para análisis de alcaloides de <i>S. trifasciata</i> | 50 |
| Figura 21. Resultado de lectura para el cromatograma de GC-masas para <i>S. trifasciata</i> | 51 |
| Figura 22. Cromatograma de GC-masas para análisis de alcaloides de <i>T. spathacea</i> | 52 |
| Figura 23. Resultado de lectura para el GC- masas para <i>T.spathacea</i> | 53 |
| Figura 24. Resultado de Dragendorf para evaluar la presencia de alcaloides de <i>S.trifasciata</i> | 54 |
| Figura 25. Diseño experimental para continuación futura del análisis de inhibición de los alcaloides de <i>S.trifasciata</i> sobre el efecto hemolítico del veneno de <i>A.mexicanus</i> | 58 |

Resumen

En Guatemala se reportaron alrededor de 500 accidentes ofídicos por serpientes de las familias Viperidae y Elapidae, dentro de las cuales podemos encontrar especies como *Atropoides mexicanus* (familia Viperidae) y *Micrurus browni* (familia Elapidae), según informes del Instituto Clodomiro Picado en el 2012. Guatemala no cuenta con tratamientos propios para tratar el envenenamiento causado por mordeduras de serpientes; por ello todos los sueros utilizados en el tratamiento provienen de institutos costarricenses, mexicanos o brasileños. La importancia del estudio radica en que la alternativa del uso de alcaloides de plantas medicinales permitirá que el país implemente sus propios recursos para el tratamiento de envenenamiento por serpientes de la familia Viperidae; así mismo, esta investigación generará una opción económica para la producción de antiofídicos; ya que las farmacéuticas del país no consideran viable la elaboración de antiofídicos convencionales por su alto costo de producción. El objetivo general del estudio fue evaluar si existe inhibición del efecto hemolítico del veneno de *A. mexicanus* por parte de extractos de alcaloides de *Sansevieria trifasciata* y *Tradescantia spathacea*. Por ello se extrajeron los alcaloides de las plantas analizadas, comprobando la presencia de alcaloides con análisis de Dragendorff; luego se realizaron bioensayos de microscopía para hemólisis y análisis de UV para comprobación de hemólisis. Como resultados se encontró una inhibición posiblemente causada por los alcaloides de las plantas analizadas sobre los componentes hemolíticos del veneno de la serpiente mano de piedra, sobre todo por parte de los alcaloides de *Sanseveira trifasciata* los cuales según el análisis de Kruskal Wallis (hecho en paquete estadístico R, versión 3.1.2) son más eficientes que el uso de un antiofídico comercial pentavalente..

I. Introducción

Guatemala, país rico en flora y fauna debido a su ubicación geográfica. Dentro de su fauna, destacan organismos venenosos como *Atropoides mexicanum*, mejor conocida como mano de piedra. Pero, esta misma riqueza ha proporcionado organismos vegetales para usos medicinales. Por ello se plantea la hipótesis que los alcaloides de *Sansevieria trifasciata* y *Tradescantia spathacea* poseerán un efecto inhibitorio en la acción hemotóxica del veneno de *Atropoides mexicanum*.

Según datos de la OMS 240,000 personas son afectadas mundialmente por el envenenamiento causado por la mordedura de serpientes ; de éstas se estima que unas 20,000 mueren por los efectos de las toxinas(WHO,2010). En Guatemala se reportaron 7,377 envenenamientos entre el 2001 y el 2010 (Centro Nacional de Epidemiología 2016). En Guatemala el único tratamiento contra mordeduras de serpientes son los antiofídicos proporcionados por el Instituto Clodomiro Picado de Costa Rica; por ello es importante encontrar nuevos tratamiento contra el envenenamiento causado por mordedura de serpiente. El uso de plantas medicinales, contra el envenenamiento, se hace presente desde el uso de *Tradescantia spathacea* por parte de los mayas. Por ello el presente trabajo pretende evaluar la capacidad inhibitoria en el efecto hemolítico del veneno de *Atropoides mexicanum* mediante bioensayos y en pruebas *in vitro*.

Para evaluar la capacidad neutralizante de los alcaloides primero se realizaron extracciones de alcaloides de las plantas, purificándolos mediante acidificación y basificación del medio donde se encuentran; finalmente se evaluó la presencia de los alcaloides mediante pruebas de Dragendorff en tubos de ensayo y en cromatografías de capa fina. Para la evaluación de los ensayos *in vitro* se realizó un ensayo de microscopía, en el cual se visualizó la hemólisis de los eritrocitos, se realizaron curvas de hemólisis en UV-vis midiendo la hemólisis de los eritrocitos a una abosrbancia de 700 nm. Por último, se realizó un SDS PAGE como un experimento preliinar para visualizar el corrimiento de los componentes del veneno en cada tratamiento realizado.

II. Objetivos

A. General

1. Evaluar si existe inhibición *in vitro* del efecto hemolítico del veneno de *A. mexicanus* por parte de extractos de alcaloides de *Sansevieria trifasciata* y *Tradescantia spathacea*.

B. Específicos

1. Obtener extractos que contengan alcaloides de *Sanseveira trifasciata* y *Tradescantia spathacea*.
2. Evaluar la actividad hemotóxica del veneno de *Atropoides mexicanus* para su implementación en ensayos inhibitorios con placas de agar sangre, microscopía y técnicas espectrofotométricas.
3. Evaluar la acción inhibitoria de los alcaloides de *Sanseveira trifasciata* y *Tradescantia spathacea* sobre el efecto hemolítico del veneno de *Atropoides mexicanus*
4. Generar información para las bases de un tratamiento alternativo por uso de extractos vegetales de *Sanseveira trifasciata* y *Tradescanthia spathacea*

III. Justificación

En Guatemala se reportan alrededor de 500 accidentes ofídicos por serpientes de la familia Viperidae y Elapidae, según informes del Instituto Clodomiro Picado en 2012. Esto se debe a la distribución tan amplia de serpientes de estas familias; sobre todo con el caso de *Atropoides mexicanus* la cual se puede encontrar desde los 0 metros sobre el nivel del mar hasta los 2700 metros sobre el nivel del mar. Esto ocasiona que poblaciones agrícolas del país se encuentren susceptibles a mordeduras de esta serpiente; la cual se estima que, según informes del mismo Clodomiro Picado, ocasiona 5 muertes al año (Instituto Clodomiro Picado, 2009)

Atropoides mexicanus posee un veneno mayormente hemolítico y miotóxico, debido a su concentración de Fosfolipasa A₂. Esto genera que las personas presenten eritemas y en ocasiones necrosis. Las consecuencias de esto puede variar según la disponibilidad de tratamientos de los centros de salud en el interior del país; la variación puede ser desde unos días de recuperación, hasta la pérdida de la parte afectada por la mordida. El tratamiento convencional en el país es la aplicación de 5 dosis de antiofídico (como dosis mínima), aplicación de antibiótico de amplio espectro y aplicación de vacuna tetánica y antirrábica (en algunos casos). Los antiofídicos obtenidos provienen en su mayoría del instituto Clodomiro Picado (Costa Rica), el instituto Butantán (Brazil) y el MYN (México); estos son preparaciones de inmunoglobulinas en general para serpientes de la familia Viperidae y serpientes de la familia Elapidae, según reporta Morales 2012 y Lomonte 2012.

La alternativa del uso de alcaloides de plantas medicinales permitirá que el país implemente sus propios recursos para el tratamiento de envenenamiento por serpientes de la familia Viperidae. Puesto que el país no cuenta con tratamientos propios para tratar las mordeduras de serpientes; por ello todos los sueros utilizados pertenecen a institutos costaricenses, mexicanos o brasileños. Así mismo, esta investigación generaría una opción económica para la producción de antiofídicos; ya que las farmacéuticas del país no consideran viable la elaboración de antiofídicos convencionales por su alto costo de producción. Finalmente, el conocimiento que genere esta investigación serviría de piloto para educar al interior del país con respecto a la

conservación de herpetofauna; sobre todo permitiría que las personas le pierdan el miedo a las especies que ocasionan accidentes ofídicos en el país.

IV. Marco teórico

A. Toxinología

Accidentes ofídicos en Guatemala: Los accidentes ofídicos son aquellos ocasionados por la mordedura de alguna serpiente. En Guatemala se registran anualmente de 600 a 700 mordeduras de serpientes y cerca de 10 muertes. El 50% de los accidentes ofídicos son ocasionados por viperidos, dentro de los cuales la barba amarilla (*Bothrops asper*) es la principal causante (Hardy, 1994).

Según información del SIGSA (Sistema de Información Gerencial de Salud) del Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social (MSPAS), se registraron en promedio 526 ataques ocasionados por serpientes pertenecientes a la familia Viperidae y Elapidae, en promedio, entre los años 2011-2015. Los departamentos más afectados por accidentes ofídicos son Alta Verapaz y Peten (Sigsa 2016).

Impacto del accidente ofídico: Los accidentes ofídicos comúnmente se dan en poblaciones agricultoras, esto se debe a que estas comunidades se encuentran expuestas en campo abierto y perturban el nicho ecológico de las Viperidae. Más específicamente las poblaciones más afectadas son las que se encuentran entre los 0-2700 metros sobre nivel del mar que, son las altitudes en las cuales se puede encontrar la serpiente *A. mexicanus* (Guerra 2015).

Dentro de las poblaciones, afectadas por accidentes ofídicos resultantes en mortalidad, podemos encontrar que un 55.85% son hombres, 44.15 % son mujeres, para el área sur de Guatemala; se reportó un total de 66.67% de hombres afectados, con un 33.3% de mujeres afectadas, para el área del Progreso; se encontró un total del 100% de los hombres afectados, para el área de Chimaltenango; un total de 54% de hombres afectados y 38% de mujeres afectadas, para el área de Escuintla; un total del 50% de los hombres afectados y un 50% de las mujeres afectadas para el área de Santa Rosa; un total de 35.29% de los hombres afectados con un 64.71% de las mujeres afectadas para el área de Huehutenango; un total de 46.67% de afectados hombres con un 53.33% de mujeres afectadas para Quiché; un total del 100% de afectados hombres para Totonicapán; un total de 50% de los hombres afectados y un 50% de las mujeres afectadas para el área de Sololá; un total de 25% de afectados hombres y un 75% de mujeres afectadas para Quetzaltenango; un total de 75% de afectados hombres y un 25% de

mujeres afectadas para San Marcos; dentro de los departamentos más afectados (Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social, 2007)

Política nacional sobre el manejo de accidentes ofídicos: Al momento del ataque primero que nada se lava la herida con jabón y agua, para luego vendarla o cubrirla; mientras se realiza el traslado de la persona, hacia un centro médico, se puede hidratar a la persona y se le toma los signos vitales periódicamente; finalmente se debe de quitar cualquier prenda que genere presión o que afecte la presión sanguínea (Morales, 2012)

Al momento de socorrer a una persona que fue afectada por un accidente ofídico, lo mejor es identificar la especie que generó el ataque o bien recordar las características del animal, como su color, tamaño, forma de la cabeza, lugar donde ocurrió el ataque, etc (Morales, 2012)

Nacionalmente se trata a todos los afectados por accidente ofídico de la siguiente manera:

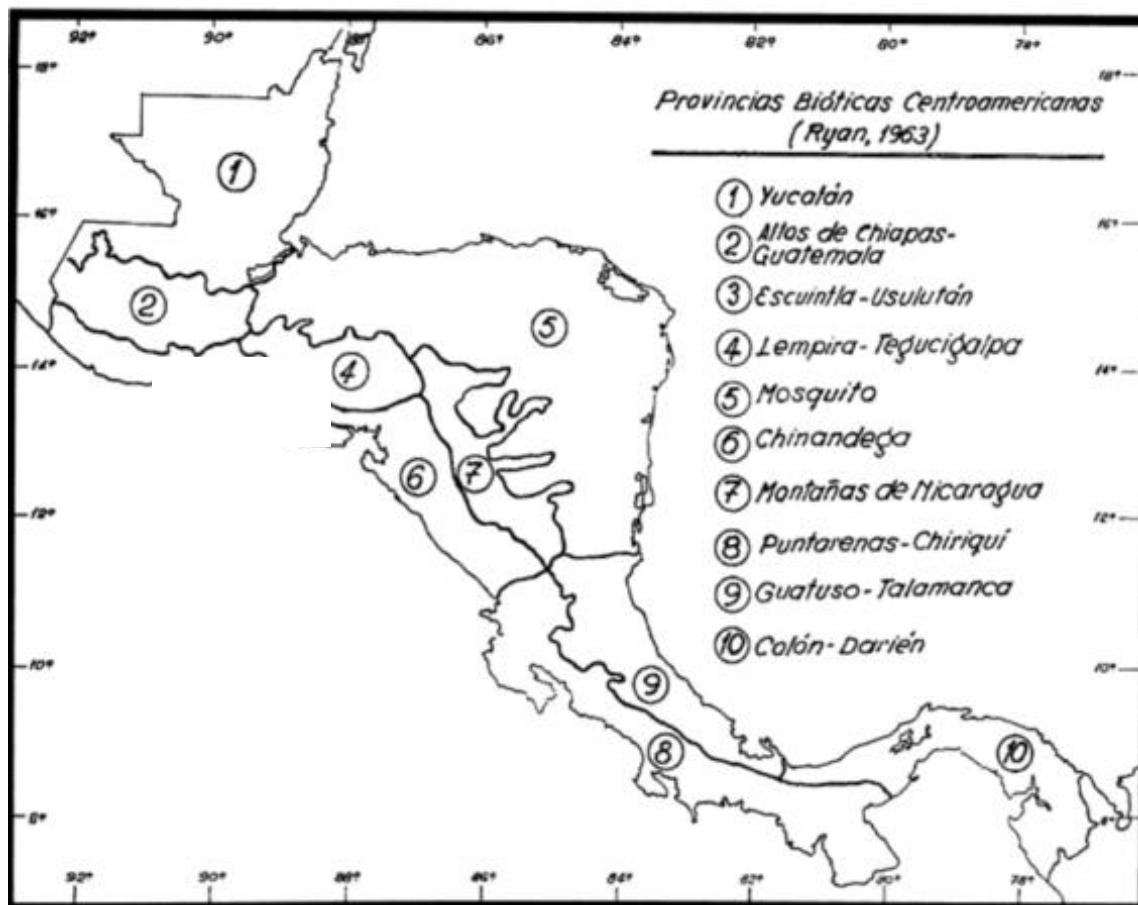
- Se administra suero antiofídico polivalente de 5mL, como único tratamiento (la dosis mínima es de 5 aplicaciones, es decir 5 dosis de 5mL)
- Se administra antibiótico de amplio espectro para evitar infecciones por bacterias oportunistas
- Se administran analgésicos
- Se administra la vacuna contra el tétanos y contra la rabia

(Guerra 2015)

B. Herpetofauna mesoamericana.

En 1963 Ryan propuso dividir a Centro América en diez provincias bióticas: Yucatán, Altos de Chiapas-Guatamala, Escuintla-Usulután, Lempira-Tegucigalpa, Mosquito, Chinandega, Montañas de Nicaragua, Punta Arena-Chiriquí, Guatuso-Tañamanca y Colón-Darién como se ilustra en la Figura 1.

Figura 1. Distribución de la herpetofauna en Centro América, según la clasificación de Ryan (1963)



Este análisis se realizó en base a la distribución de la herpetofauna centroamericana, la cual definió a la región neotropical de acuerdo a lo descrito por Sclater (1982) y Wallace(1876). De acuerdo con Bousquets (2005) la herpetofauna centroamericana se compone principalmente por grupos de géneros con uno o dos patrones principales de distribución. Un grupo incluye géneros con distribución mesoamericana, predominante en todas las elevaciones de América Central, desde el istmo de Tehuantepec hasta el centro de Panamá y en las tierras bajas de ambas costas de México hasta los límites de las condiciones tropicales al norte; el otro grupo se compone de los géneros distribuidos en la región sudamericana (Bousquets, 2005).

1. Distribución en Guatemala. Guatemala presenta la herpetofauna restringida a nichos fríos y húmedos, representada por 26 géneros distribuidos ampliamente por todo el país.

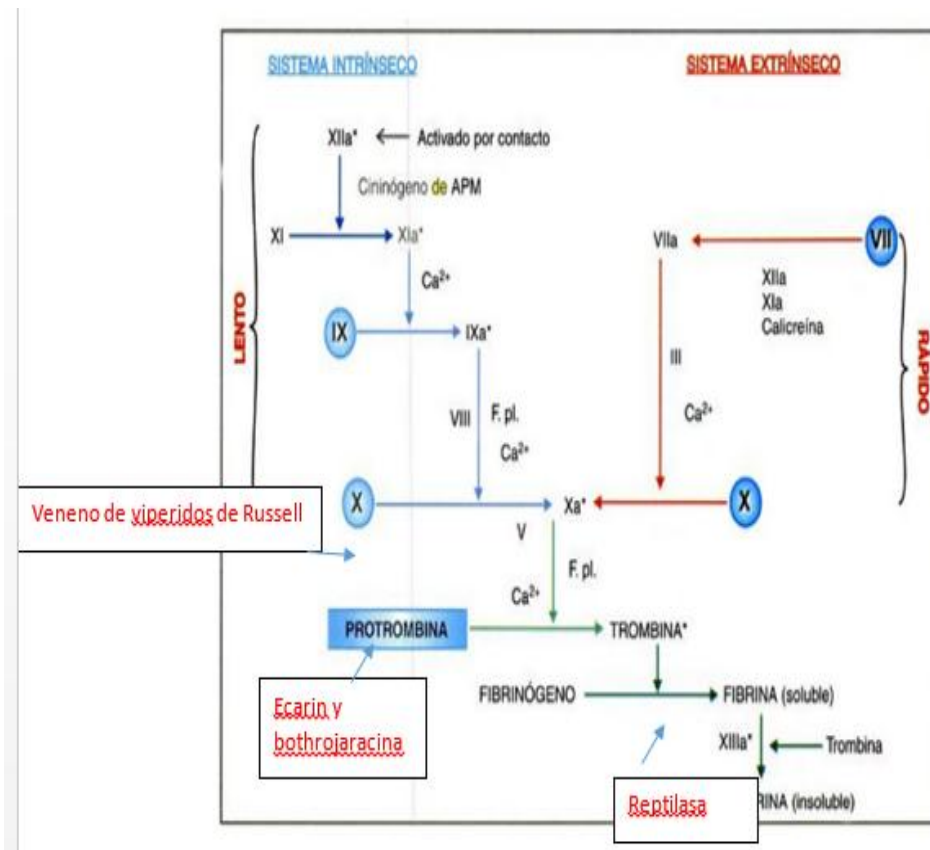
Epidemiológicamente se han reportado entre 500 a 600 accidentes ofídicos por año a causa de Viperidae, siendo mayor la frecuencia de afectados durante la época lluviosa, que corresponde a la época activa para la agricultura. Dentro de los casos reportados, un 50% de los afectados fueron mordidos en el pie, un 30% en la mano y un 20% en otras áreas del cuerpo (Mackessy, 2009).

Localmente el envenenamiento genera edema y dolor causado por la acción directa de los componentes del veneno en la red microvascular, y la generación y liberación de mediadores de inflamación, como histamina, eicosanoides, óxido nítrico y citosinas, los cuales actúan directamente o indirectamente en el incremento de la permeabilidad vascular. El edema causa dos consecuencias pato-fisiológicas, (1) el movimiento neto de fluido de compartimientos vasculares hacia el compartimiento intersticial, lo que resulta en hipovolemia y (2) la inducción de un incremento en la presión intersticial en los compartimientos del músculo, o síndrome compartimental (Mackessy, 2009).

Además, el veneno puede generar hemorragias, sobre todo en el caso de *A. mexicanus* la cual posee un alto nivel de hemotoxicidad. El efecto se ocasiona por las metaloproteinasas dependientes de zinc. En el caso de hemorragia estas enzimas inducen una hidrólisis selectiva en la estabilidad de la pared de los capilares y membranas de los glóbulos rojos. Como consecuencia se genera una presión hemodinámica forzada en comparación a la presión normal (Mackessy, 2009).

Los efectos sistémicos relacionados con la hemotoxicidad son causados especialmente por metaloproteinasas de la clase P-III, las cuales inducen daño microvascular sistémico, desencadenando hemorragias en el sistema. Muchos venenos de vipéridos son ricos en agonistas de trombina como las serina proteinasas, activadores de protrombina y factor X, las cuales son metaloproteinasas en el veneno. Esto resulta en la formación de micro coágulos en el torrente sanguíneo, lo que repercute en la falta de fibrinógeno al momento de activar la casacada de coagulación, generando hemorragias sin control (Mackessy, 2009). Esto se puede apreciar en la figura 2.

Figura 2. Cascada de coagulación y los agonistas que actúan sobre la cascada (vistos en color rojo)



(Adaptada de Tripathi, 2008)

C. *Atropoides mexicanus*

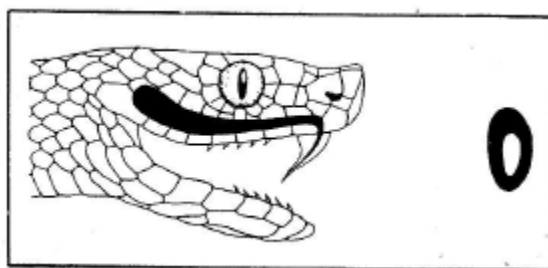
A. mexicanus es una serpiente de la familia Viperidae clasificada dentro del género Agkistrodon. Se distribuyen en diversos hábitats, siendo particularmente abundantes en el bosque tropical lluvioso y en áreas tropicales alteradas para el desarrollo de la agricultura. Esta serpiente en particular no posee crótalo (como las cascabel), pero sí presentan una dentadura solenoglifa característica de la familia Viperidae; la cual se ubica al frente de la mandíbula y posee un orificio de salida del veneno en el centro del colmillo (Figura 3) (Mackessy, 2009). Esta posee un comportamiento agresivo y por su coloración se le confunde con facilidad con el área donde se encuentra. Al verse bajo amenaza lanza pequeñas mordidas, las cuales la levantan del suelo, lo que genera que se vea como si saltara (López, 2014).

Los adultos de *A. mexicanus* pueden llegar a medir entre 400-600 mm de largo, pero hay adultos que han llegado a los 800 mm de largo. El dorso de su cabeza posee una coloración entre café claro y oscuro, con o sin marcas negras. Una marca negra se extiende desde su ojo hasta su mandíbula; aproximadamente de 15 a 20 rombos café oscuro se extienden a lo largo de su cuerpo hasta su cola; algunos se funden para formar un patrón de zig-zag. Los especímenes de Guatemala comúnmente poseen rombos café con un tono morado, rosado o rojo ; esto se puede observar en la Figura 5 (Campbell and Lamar, 2004)

Las serpientes con la edad tienden a poseer una coloración más oscura y se convierten totalmente melanística en algunas partes; además, posee de 7 a 12 intersupraoculares y los supraoculares son frecuentemente fragmentados pequeños; posee de 9-12 supralabiales, de 10-14 infralabiales, 23-31 filas dorsales, 114-135 ventrales y de 22-39 subcaudales sin división (Campbell and Lamar, 2004)

La distribución de *A. mexicanus* puede variar entre la cual se puede encontrar desde los 0 metros sobre nivel del mar hasta los 2700 metros sobre nivel del mar. Más específicamente su mayor distribución se encuentra en los departamentos de Petén, Baja Verapaz, Alta Verapaz, Quetzaltenango, Huehuetenango e Izabal; como se ilustra en la Figura 4 (Campbell and Lamar, 2004)

Figura 3. Dentadura solegnoglifa de serpientes pertenecientes a la familia Viperidae, caracterizada por tener los colmillos al frente de la mandíbula; además, los colmillos poseen un orificio de salida del veneno en el centro del mismo



(Adaptada de Mackessy 2010)

Figura 4. Distribución de *A.mexicanus* en Guatemala según estudios de López en el 2014. El área roja muestra los departamentos de Petén, Baja Verapaz, Quetzaltenando, Huehuetenango e Izabal.

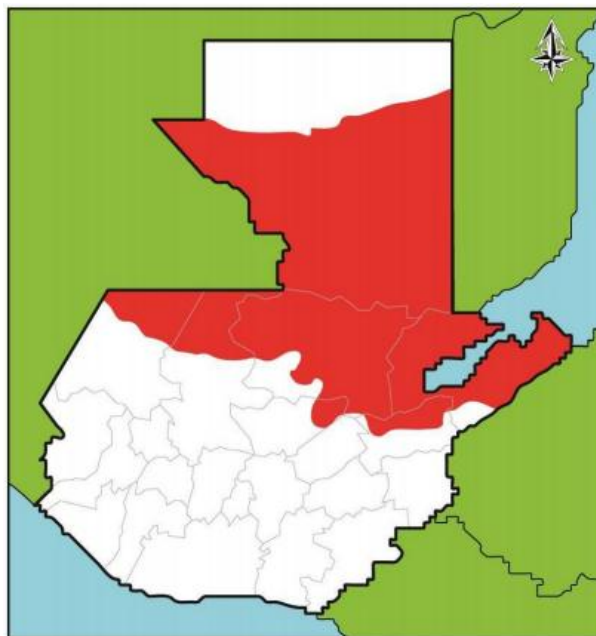


Figura 5. Fotografía de *A.mexicanus* proveniente de zootropic ciudad capital.



(Tomada por Jorge Chang,2015)

1. Composición del veneno de *Atropoides mexicanus* En general la composición del veneno de los vipéridos son fosfodiesterasas (con un peso de 94 a 140 KDa), las cuales son enzimas encargadas de la hidrólisis de ácidos nucleicos y nucleótidos -5'-nucleotidasas (52-82 KDa)- las cuales liberan nucleósidos y hialuronidasas (73 KDa) que hidrolizan el ácido hialurónico, entre otros componentes (Cuadro 1).. El veneno de las serpientes del género *Atropoides* se compone en su mayoría por fosfolipasas A2 y metaloproteinasas dependientes de Zn, lo que explica el alto nivel hemolítico del veneno de *Atropoides mexicanus* (Mackessy, 2009).

Cuadro 1. Componentes enzimáticos del veneno de las serpientes de la familia Viperidae, con su masa esperada (kDa)

| Componente del veneno | Masa aproximada (kDa) | Función |
|----------------------------------|-----------------------|---|
| <i>Fosfodiesterasas</i> | 94-140 | Cataliza la ruptura de enlace fosfodiester |
| <i>5'-nucleotidasa</i> | 53-82 | Degrada nucleotidos |
| <i>Fosfomonosterasa alcalina</i> | 90-110 | Encargada de la mineralización del fosfato |
| <i>Hialuronidasa</i> | 73 | Encargada de la degradación de ácido hialurónico |
| <i>L-amino oxidasa</i> | 85-150 | Encargada de la roptura de aminoácidos |
| <i>Metaloproteinasas:</i> | | Encargada de la roptura de capitalres |
| <i>M12 repolisina P-III</i> | 43-85 | Encargada de la roptura de capitalres |
| <i>M12 repolisina P-II</i> | 25-30 | Encargada de la roptura de capitalres |
| <i>M12 repolisina P-I</i> | 20-24 | Encargada de la roptura de capitalres |
| <i>Fosfolipasa A2</i> | 13-15 | Encargada de la roptura de menmrana celular y uniones de fosfolípidos |
| <i>Arginina estereasa</i> | 25-36 | Funcion de hidrolasa |

(Información obtenida de Mackessy 2009)

Cuadro 2. Componentes comunes de bajo peso molecular en el veneno de la familia Viperidae

| Componente del veneno | Masa aproximada (kDa) |
|---|-----------------------|
| <i>Fosfolipasa A2 basada en neurotoxicidad presináptica</i> | 24 |
| <i>Lectinas del tipo C</i> | 27-29 |
| <i>Myotoxinas-no del tipo PLA2</i> | 4-5.3 |

Información obtenida de (Mackessy 2009)

El análisis en HPLC muestra los componentes enzimáticos del veneno del género *Atropoides*, esto se muestran en el cuadro 3.

Cuadro 3. Componentes hemolíticos del veneno del género *Atropoides* identificados por HPLC con una columna RP100 C₁₈ de 250 x 4mm, con 5µm de tamaño de partícula; siendo eluido a 1mL/min

| Familia de proteína | Masa aproximada | Fracción en HPCL |
|------------------------------|-----------------|------------------|
| Desintegrina de tamaño medio | 7710.3 (g/mol) | 11 |
| PLA2 sv VEGF | 14 409 (g/mol) | 19 |
| PLA2 | 34-16 kDa | 20 |
| PLA2 miotoxina | 13 751 (g/mol) | 21 |
| Preteínasa PLA2 | 38 kDa | 24 |
| Proteínasa | 30-3 kDa | 26 |
| PI metaloproteínasa | 26kDa | 32 |
| M12 metaloproteínasa P-III | 110 kDa/ 42kDa | 40 |

(Información obtenida de Ángulo *et al*, 2008)

D. Tratamiento del accidente ofídico

1. Antiofídicos comerciales El principio del tratamiento con antiofídicos se mantiene desde el siglo XIX. Este método se basa en el aislamiento de inmunoglobulinas IgM a partir de animales inmunizados con uno o más venenos, y que desarrollan una respuesta inmune adaptativa contra la mezcla del veneno (Lomonte-Vigliotti, 2012).

Los principios de la fabricación de suero antiofídico fueron descritos a finales del siglo XIX, estos se mantienen vigentes a la fecha. Estos sueros se preparan a partir del plasma de animales inmunizados con uno o más venenos, que desarrollan una respuesta inmune humoral

contra los componentes del veneno. Los anticuerpos son aislados del plasma completo, purificados y liofilizados para la elaboración del producto médico (Lomonte-Vigliotti, 2012).

Algo importante es que los sueros antiofídicos que se preparen deben de ser representativos para las especies endémicas del área y población objetivo, esto ya que no se fabricaría un suero contra *Dendroaspis polylepis* (mamba negra) –familia Elapide- para utilizarlo en Guatemala, ya que esta serpiente se distribuye únicamente en África. Para Guatemala, la serpiente de la familia Elapidae de interés es la coral (*Micrurus sp.*). Las serpientes que se ordeñan para obtención de veneno deben de permanecer al menos dos meses en un cuarto especial, el cual se localiza lo más lejos posible del cuarto de producción, con el fin de no estresar al animal. En este cuarto las serpientes se almacenan en jaulas separadas, las cuales deben proveerles el espacio suficiente para movilizarse (WHO, 2010).

2. Tratamientos no tradicionales A lo largo de la historia las culturas han utilizado sus creencias para la medicina, dentro de las cuales muchas veces se han utilizado deidades, energía, plantas y sustancias a las cuales se les confiere el carácter medicinal. Para las mordeduras de serpientes hay varios métodos folclóricos utilizados, como por ejemplo el uso de las llamadas “ piedras serpiente” las cuales han sido utilizadas en el folclore británico contra la mordedura de serpientes; a estas piedras se les atribuye el carácter de absorción de veneno. Otro método implementado en la cultura británica es el remedio fabricado de leche de vaca de color con mantequilla; esta bebida se dice que absorbe el veneno (Hatfield, 2004). Sin lugar a duda el método más visto a lo largo de todas las culturas es el uso de plantas medicinales, las cuales han tomado un papel protagónico a lo largo de la historia.

a. Uso de plantas medicinales. La etnobotánica para el tratamiento de accidentes ofídicos ha sido una alternativa de tratamiento que muchas comunidades utilizan. Estas comunidades utilizan sus propios ritos, hábitos y especies vegetales. Dentro de estas especies encontramos a *Abrus precatorius* en la India, *Sansevieria trifasciata* y *Tradescantia spathacea* en Guatemala (Vyas *et al* 2013 y Poll 2010).

Dentro de las propiedades que poseen las plantas medicinales en las culturas se puede encontrar actividad antioxidante como es el caso del uso de cafeína o el té; además, se ha encontrado el uso de plantas medicinales con acciones anti-inflamatorias como es el caso de *Bixa*

Orellana, *Brownea rosa de monte*, *Dracontium croatii*, etc; por otra parte, ciertas plantas como *Pleopeltis percussa* y *Heliconia curtispatha* poseen actividad anti hemorrágica y anti coagulante; cabe mencionar que ciertas plantas se han usado para inhibir actividades enzimáticas, como es el caso de las plantas usadas contra mordedura de diversas serpientes, dentro de las cuales *Masypianthes chamaedrys* ha mostrado un gran impacto en la neutralización de enzimas provenientes de *Bothrops jararacá*; finalmente ciertas plantas como *Mikania laevigata* poseen actividades antimicrobianas (Gupta and Peshin, 2012)

Figura 6. Planta *Sanseveira trifasciata* cuyo extracto es utilizado para el tratamiento de accidentes ofídicos en el folclore guatemalteco



(Pöll y Álvarez, 2010)

b. Planta A *Sanseveira trifasciata* (Oreja de burro). Descripción botánica: Esta planta es usada comúnmente con fines ornamentales; su distribución varía desde elevaciones medias hasta elevaciones altas. Sus hojas son lanceoladas-lineales, cóncavas de 50-140 cm de largo y de 5-9 cm de ancho, de color verde oscuro, sus flores blancas forman una panícula estrecha). Sus hojas maduras presentan un bandeo verde claro y oscuro, los cuales se cruzan a lo largo de la hoja; estos poseen de 70-90 cm de largo y de 5-6 centímetros de ancho (Standley and Steyermark, 1946;Ighodaro *et al.*, 2015)

Sanseveira trifasciata posee varias sustancias químicas a lo largo de sus hojas y raíces, dentro de los cuales podemos encontrar taninos, saponinas, alcaloides, flavonoides, fenoles y aceites volátiles; los cuales pueden ser extraídos en fase etérea y etanólica mediante la implementación de un aparato de soxhlet (Ighodaro *et al.*, 2015)

El listado de alcaloides se presenta en el siguiente cuadro, el mismo muestra la separación de los compuestos por cromatografía de gases.

Cuadro 4. Alcaloides presentes en plantas del género *Sanseveira*

| Componente | Tiempo de retención (min) | Composición Peso húmedo (mg/kg). | Composición Peso seco (mg/kg). |
|--|---------------------------|----------------------------------|--------------------------------|
| <i>9-Octadecenamida</i> | 10.741 | 4.39 | 12.59 |
| <i>Dihidro-oxo-demetoxihaemantamina</i> | 12.175 | 3.65 | 10.46 |
| <i>Augustamina</i> | 13.625 | 8.98 | 25.73 |
| <i>Oxaoassoamina</i> | 15.086 | 3.44 | 9.85 |
| <i>Crinina-3α-ol</i> | 16.473 | 6.06 | 17.36 |
| <i>Bufanidrina</i> | 17.357 | 9.24 | 26.46 |
| <i>Powelina</i> | 18.532 | 0.39 | 1.12 |
| <i>Undulatinaa</i> | 19.338 | 0.80 | 2.30 |
| <i>Ambelina</i> | 20.349 | 9.11 | 26.09 |
| <i>6-hidroxibufanidrina</i> | 21.008 | 2.18 | 6.24 |
| <i>6-hidroxipowelina</i> | 22.191 | 3.64 | 10.43 |
| <i>Crinamidina</i> | 23.044 | 7.22 | 20.68 |
| <i>6-hidroxiundulatina</i> | 23.735 | 6.28 | 17.99 |
| <i>1β,2β-Epoxiambelina</i> | 24.802 | 4.06 | 11.64 |
| <i>Epoxi-3,4-dimetoxicrinano-11-ona</i> | 25.825 | 24.74 | 70.90 |
| <i>6-Hidroxicrinamidina</i> | 26.810 | 0.75 | 2.15 |
| <i>Mitrafilina</i> | 27.757 | 1.43 | 4.09 |
| <i>Componentes sin identificar</i> (Ikewuchi <i>et al</i> 2014) | 2.619 | 14.43 | 41.36 |

La importancia de la composición de *Sanseveira trifasciata* se debe a su actividad antiofídica contra otros venenos de la familia Viperidae, como lo reportado por Saravia en el 2015, la composición de *Sanseveira trifasciata* posee una actividad neutralizante sobre la fosfolipasa A2 y efectos proteolíticos en el veneno de *Bothrops asper* (Saravia *et al.*, 2015). Además, se ha visto que la composición de la planta posee efectos antipiréticos (disminuyen la fiebre) y efectos analgésicos, por lo cual esta planta es también utilizada en el folclore medicinal

de otras regiones del mundo como Malasia (Anbu *et al.*, 2009). Actualmente se estudia el potencial antidiabético de esta planta en la India (Dey *et al.*, 2014)

Figura 7. *Tradescantia spathacea*



(Pöll and Alvarez, 2010)

c. Planta B. *Tradescantia spathacea*. Descripción botánica: Antiguamente conocida como *Rhoeo discolor*. Es una planta de origen americano y en Cuba se le considera como una hierba silvestre. Es común en patios y jardines. Crece en las Antillas mayores, menores, en la Florida, Bahamas y México (Gupta *et al.*, 1995)

Es una hierba de poca altura, se le considera carnosa y algo pilosa en las vainas de las hojas. Posee tallos robustos de 0.7 a 2 cm de altura y de 1 a 5 cm de grueso. Posee hojas escasas casi rectas, lanceolado-oblongas, de 2 a 3.5 cm de longitud y de 3.5 cm de ancho. Sus hojas son verde oscuras en la cara superior y purpúreas en la parte inferior. Sus flores están casi ocultas dentro de sus brácteas y poseen una umbela multiflorar, pedicelos de 1 cm de largo, sépalos de 5 cm y pétalos libres (agrupados en 3 unidades) de 5 a 6 mm de largo, de color blanco (Gupta *et al.*, 1995). La composición química de esta especie se resume en el cuadro 5.

La decocción de las hojas y flores de la planta se han utilizado en tratamientos contra la gripe, asma, tos y ronquera. Posee actividad astringente, por lo que se utiliza contra hemorragias y en trastornos menstruales. En Haití se le utiliza como un método abortivo y contra la amenorrea (Gupta *et al.*, 1995). En Guatemala, específicamente en Petén, se ha descrito el uso de la infusión de la planta contra accidentes ofídicos; actividad que se cree utilizaban los Mayas al momento de curar ataques de serpientes.

Cuadro 5. Composición química de *T. spathacea* de acuerdo a dos métodos de extracción

| Clase de molécula/ método | Decocción | Control de decocción | Infusión | Control de infusión | Extracto metanólico |
|------------------------------|-----------|----------------------|----------|---------------------|---------------------|
| <i>Taninos</i> | Presente | Presente | Presente | Presente | Presente |
| <i>Terpenos</i> | Presente | Presente | Presente | Presente | Presente |
| <i>Alcaloides</i> | Presente | Ausente | Presente | Ausente | Presente |
| <i>Glicosidos</i> | Presente | Presente | Presente | Presente | Presente |
| <i>Saponinas</i> | Presente | Presente | Presente | Presente | Presente |
| <i>Antocianinas</i> | Presente | Presente | Presente | Presente | Presente |

V. Métodos

A. HIPÓTESIS

- Hipótesis de trabajo Existe presencia de inhibición en el efecto hemolítico del veneno de *A. mexicanus* mediante la implementación de una infusión de alcaloides de *Sanseveira trifasciata* y *Tradescantia spathacea* .
- Hipótesis nula: No existe presencia de inhibición en el efecto hemolítico del veneno de *A. mexicanus* mediante la implementación de una infusión de alcaloides de *Sanseveira trifasciata* y *Tradescantia spathacea* .

B. PROCEDIMIENTO

- **Colecta y secado de material vegetal:** Las plantas fueron donadas por el MSc. Daniel Ariano, asesor de este trabajo. Las cuales se colectaron en la zona 6 de la Ciudad de Guatemala a una Latitud de 14.65 o y una Longitud de -90.5o. La colecta consistió en 40 g de *Sansevieria trifasciata* y 24 g *Tradescantia spathacea*. Previo a su utilización las plantas se guardaron en una desecadora durante 1 mes, envueltas en papel periódico hasta que estas pierdan su composición de agua.
- **Fuente de veneno:** El veneno se obtuvo de especímenes de *Atropoides nummifer* provenientes de la fundación Zootropic ubicada en la Ciudad de Guatemala. Las serpientes fueron manipuladas por el MSc. Daniel Ariano quién colectó 1.5 mL de veneno. Previo a su utilización el veneno se almacenó a -20 oC
- **Extracción de alcaloides:** Para la extracción se siguió el siguiente procedimiento:
 - Se trituró 24 g (peso seco) de material vegetal, con un mortero.
 - Se realizó una infusión del material vegetal con 500 mL de solución de metanol-agua destilada (50:50) en un beaker de 1 L. La infusión fue de aproximadamente 20 minutos.
 - Se filtró con gasa (4 capas) a un nuevo beaker de 500 mL.
 - Se evaporó el solvente hasta que queden aproximadamente 25 mL, colocando el beaker en una estufa dentro de la campana de extracción.
 - Se añadió HCl al 10 % (v/v) hasta que alcance un pH = 3 (aproximadamente 5 – 10 mL).

- Se agregaron 10 mL de éter, mezclar suavemente y se utilizó una ampolla de decantación para separar las fases. Se utilizó un Beakers de 50 mL. Repetir 2 veces más. Los alcaloides permanecerán en la fase acuosa.
 - Se añadió NH_4OH 10% (v/v) a la fase acuosa de alcaloides hasta que alcance un $\text{pH} = 8$ (aproximadamente 5 – 10 mL).
 - Se agregó 10 mL de éter y utilizó una ampolla de decantación para separar las fases realizando una extracción líquido/líquido.. Repetir 2 veces más.
 - La capa acuosa contiene los alcaloides y por lo tanto debe ser almacenada.
- (Morales *et al* 2015)

Nota: la planta A representa a *Sansevieria trifasciata* y la planta B representa la planta *Tradescantia spathacea*

- Prueba de Dragendorff: Para realizar el ensayo se colocaron 5 mL del extracto de planta, seguido se colocaron unas gotas de HCl cocentrado cocentrado (lo suficiente para llegar a un pH de 2-2.5); finalmente se agregó 2 mL del reactivo de Dragendorf. Un precipitado naranja demuestra un resultado positivo para alcaloides.
- (Marcano and Hasegawa, 2002)
- Cromatografía de capa fina para análisis de alcaloides:
 - En una capa de sílica gel se colocó unas gotas del material vegetal (colocar unas gotas con un capilar), se dejó secar el material y se colocó la placa en un beaker con una mezcla de cloroformo y etanol a 19:1 (a una altura donde el éter cubra 1 cm de la placa)
 - Se dejó correr la cromatografía hasta que el frente de la fase móvil alcance el final de la placa. Se roció la placa con el reactivo de Dragendorff.
 - Un resultado positivo se verá como una mancha café en el lugar donde haya alcaloides entre los componentes que se separaron de la muestra vegetal.

(Marcano and Hasegawa, 2002)
 - Bioensayos de hemotoxicidad:
 - Ensayo hemolítico –microscopía
 - Se colocaron gotas de sangre de carnero (8 μL) en portaobjetos.
 - Rápidamente agregar 10 μL de veneno a uno de los portaobjetos.

- Utilizando un palillo de madera se agitó la mezcla y se observaron los cambios.
- hubiera coagulación registrar el tiempo en el que sucede.
- Se observó en un microscopio la lisis de eritrocitos
- Se repitió la preparación con 10 μL de veneno y 100 μL del extracto de alcaloides, o de la sustancia que se analizará.
- Como control positivo se utilizó 100 μL de suero antiofídico.
- Se realizaron 5 mediciones por tratamiento.

Nota: La distribución se realizará en base a la Figura 8.

Figura 8. Montaje en porta objeto para bioensayos cualitativos



En la Figura 8 se muestra la distribución de gotas de sangre para las pruebas de coagulación y de microscopía. En la imagen el número 1 representa la muestra que solo contiene sangre, el número 2 la muestra de sangre con veneno, el número 3 la muestra de sangre + veneno + planta A, el número 4 la muestra de sangre + veneno + planta B, el número 5 la muestra de sangre + veneno+ antiofídico y el número 6 la muestra de sangre y agua.

- Ensayo de hemólisis por espectrofotometría
 - Para la medición se utilizó un espectrómetro UV-VIS (Agilent, modelo 8453) con precisión de 0.0001 nm. Para llevar a cabo el experimento se colocaron en una celda 270 μL de sangre de carnero, la cual servirá como blanco, luego de medir el blanco se agregaron los siguientes reactivos para cada curva:
- Curva de hemólisis positiva: 20 μL de veneno puro

- Curva de inhibición de hemólisis control: 20 μ L de veneno y 50 μ L de antiofídico polivalente comercial
- Curva de muestra 1: 20 μ L de veneno y 50 μ L de extracto planta *Sansiveira trifasciata*
- Curva de muestra 2: 20 μ L de veneno y 50 μ L de extracto planta *Tradescantia s'pathacea*
- Curva de hemolisis negativa: 50 μ L de sangre.

(Ayres *et al.*, 2015)

- Se tomó las absorbancias a 700 nm por 15 min, realizando mediciones cada minuto. Al final se graficarán las absorbancias y se medirá la inhibición de hemólisis con la siguiente ecuación:

$$\text{Inhibición de hemólisis} : 100 - \frac{t^{\frac{1}{2}}_{\text{control}} \times 100}{t^{\frac{1}{2}}_{\text{muestra}}}$$

En la ecuación, $t^{1/2}$ control indica el tiempo en el que la absorbancia llegó a la mitad de la absorbancia máxima, para la curva de hemolisis positiva, y la $t^{1/2}$ muestra es el tiempo en que la absorbancia máxima decayó a la mitad de su valor para las curvas de muestra.

Nota: se realizaron cinco réplicas para cada curva

(Ayres *et al.*, 2015)

- Electroforesis SDS PAGE para separación de proteínas contenidas en el veneno de *A. mexicanus*, contenidas en una dilución 1:125 del veneno puro.

Para la realización del SDS PAGE se preparó 10 mL de gel de separación con los siguientes reactivos:

- 4.1 mL de agua destilada
- 3.3 mL de solución de acrilamida al 30%
- 2.5 mL de buffer de tris HCl (pH =8.8)
- 90 μ L de persulfato de amonio al 10%
- 10 μ L de TEMED

Para la preparación de 5 mL del gel de concentración se colocaron los siguientes reactivos:

- 2.95 mL de agua destilada
- 0.75 mL de solución de acrilamida al 30%
- 1,25 mL de buffer tris-HCl (pH=6.8)
- 45µL de persulfato de amonio al 10%
- 5µL de TEMED

Luego se prepararon los geles vertiendo los reactivos en las placas de electroforesis para que estos polimerizaran. Ya con el gel polimerizado, las muestras se prepararon colocando 50µL de buffer de laemli, calentándolas por 5 min a 100 °C y colocándolas en los pozos del gel. Finalmente se corrió el gel por 18 min a 70 voltios y por 50 min a 100 voltios.

(Ariano, 2003)

C. Estadística

Los resultados se analizaron con una prueba de Kruskal Wallis de dos factores en el cual se evaluó la capacidad neutralizante de los alcaloides de las plantas contra la capacidad neutralizante de un antiofídico convencional. Además se realizaron cuadros de contingencia para luego graficarlos (resultado Figura 11). El análisis se realizó en el paquete estadístico R, versión 3.1.2.

- Plan de análisis de datos.

Cuadro 7. Plan de análisis de datos

| Análisis | Medición |
|---|---|
| <i>Prueba de Dragendorff para detección de alcaloides</i> | Se espera encontrar un precipitado en los extractos de alcaloides y un barrido en la cromatografía de capa fina, en la cual al momento de agregar el reactivo de Dragendorf colorea de negro los alcaloides presentes. Será una medición puramente cualitativa, presencia y ausencia de alcaloides. |
| <i>Hemólisis por microscopía</i> | Conteo de glóbulos rojos lisados y no lisados, en un campo definido, visto en el microscopio |
| <i>Hemólisis por UV-VIS</i> | Conteo de glóbulos rojos lisados, medido a 700 nm por 15 min en un espectrofotómetro UV-VIS. Con los datos de absorbancia se obtendrá el tiempo en el que la mitad de la población de eritrocitos fue lisada y así se |

Análisis

Medición

verificará la posible inhibición de hemólisis. Para ello se obtendrá una curva de absorbancia en la cual se graficará la absorbancia vs el tiempo. La inhibición de hemólisis se medirá con la siguiente ecuación :

Inhibición de hemólisis

$$: 100 - \frac{t^{\frac{1}{2}}_{control} \times 100}{t^{\frac{1}{2}}_{muestra}}$$

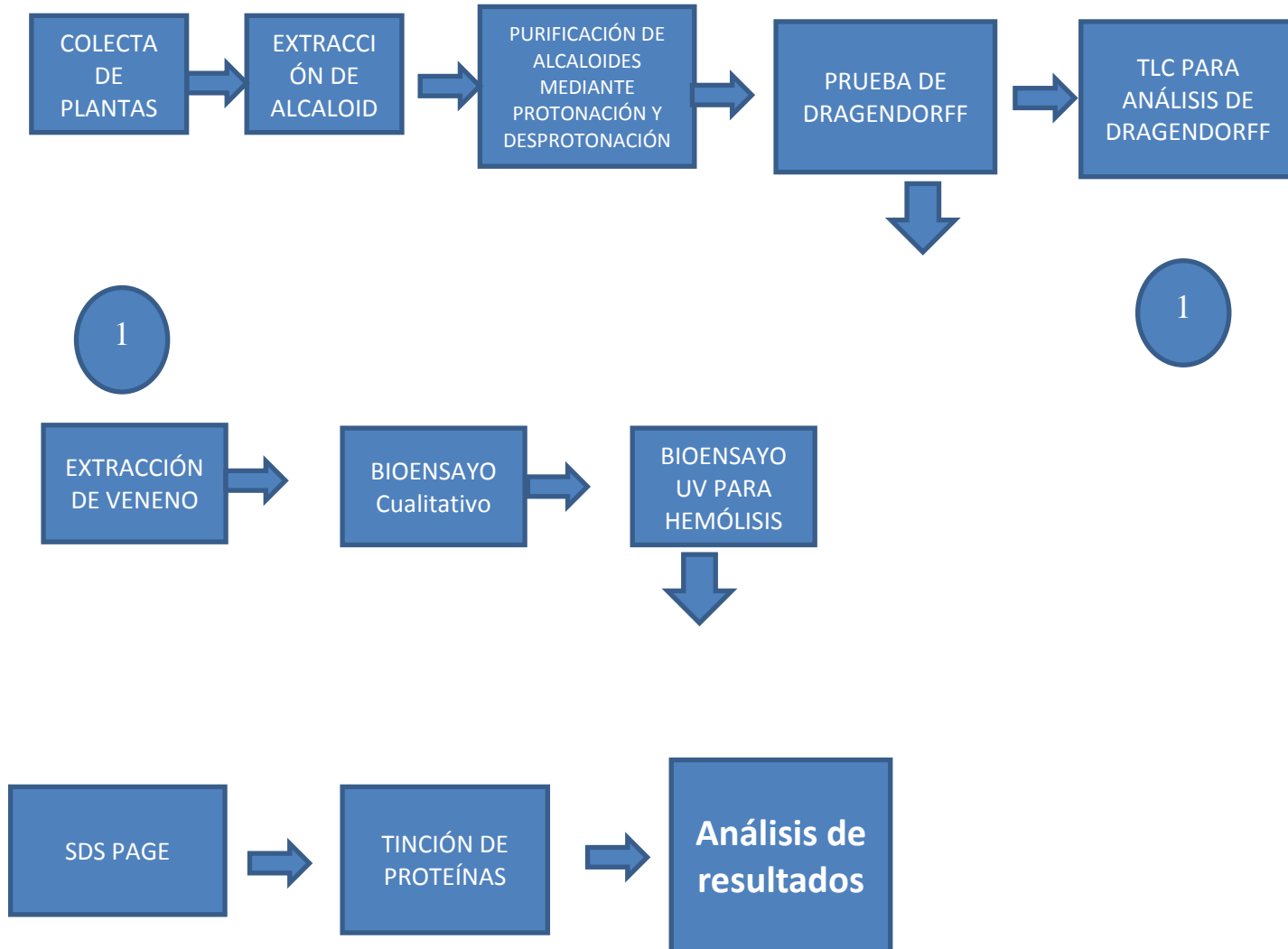
Ensayo de coagulación cualitativo

SDS PAGE

Presencia o ausencia de coagulación en sangre sin fibrina

Visualización de corrida para cada pozo según el tratamiento dado. Será una prueba cualitativa en la cual solo se espera ver diferencia entre el corrimiento de los tratamientos. Para ello se visualizara si las proteínas del veneno sufrieron de alguna alteración al momento de ser tratadas con los extractos de alcaloides.

Figura 9. Esquema de la metodología realizada en la investigación



VI. Resultados

A. Prueba de Dragendorff para presencia de alcaloides

Se logró corroborar la presencia de alcaloides para ambas plantas como se puede observar en el Cuadro 8. Como se puede observar la mayor concentración de alcaloides se encontró en la extracto ácida, medio acuoso, para *S. trifasciata*, y en la extracción básica medio acuoso para ambas plantas. Así mismo, no se encontraron alcaloides en la fracción básica medio orgánico.

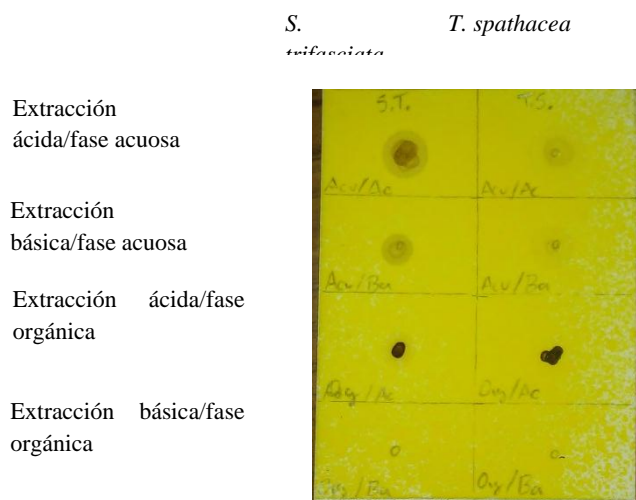
Cuadro 8. Cuantificación de alcaloides para *Sanseveira trifasciata* y *Tradescantia spathacea* según cada fase de extracción.

| Planta/Medio | <i>Sanseveira trifasciata</i> | <i>Tradescantia spathacea</i> |
|---|-------------------------------|-------------------------------|
| <i>Extracción ácida medio acuoso</i> | +++++++ | + |
| <i>Extracción ácida medio orgánico</i> | ++ | + |
| <i>Extracción básica medio acuoso</i> | +++++++ | +++++++ |
| <i>Extracción básica medio orgánico</i> | ----- | ----- |

Los signos de “+” indican la intensidad para un resultado positivo (mientras más signos posea la fracción más intenso fue el resultado en la presencia de alcaloide) y los signos “-“ indican un resultado negativo en la presencia de alcaloides.

En la figura 10 se puede ver el resultado de TLC para la detección de alcaloides; en ello la columna izquierda pertenece a *S. trifasciata* y la columna derecha a *T. spathacea*. Como se puede observar donde más alcaloides se encontraron fue en la tercera fila, la cual pertenece a la extracción ácida, medio orgánico.

Figura 10. Ensayo cualitativo de Dragendor en TLC para evaluar la presencia de alcaloides dependiendo de la fase de extracción



Como se puede ver en los Cuadros 9 y 10 la mayoría de compuestos poseen un anillo aromático o un heterociclo a base de nitrógeno. Se repiten mucho el tipo de compuesto al que se sospecha, esto se debe a la gran variedad de alcaloides que posee la planta.

En el Cuadro 9 se puede ver la base química de cada fragmento analizado por el equipo. No se pudo determinar un compuesto directo puesto que la biblioteca del equipo no cuenta con datos de alcaloides. Además, se ve el tiempo de retención y el área de cada pico lo que puede ser proporcional a la concentración del mismo. ¿Tiene algún control?

En el Cuadro 10 no se puede ver ningún compuesto a base de nitrógeno. Esto puede que se deba a contaminación en la muestra por exceso de solventes o una fragmentación en los alcaloides. Además, los ciclos tan largos encontrados puede que sean residuos de los alcaloides. Los resultados originales se encuentran en anexos figuras 20-21

En el Cuadro 12 se puede ver la base química de cada fragmento analizado por el equipo. No se llegó a un compuesto directo puesto que la biblioteca del equipo no cuenta con datos de alcaloides. Además se ve el tiempo de retención y el área de cada pico lo que puede ser proporcional a la concentración del mismo.

Cuadro 9. Resultado de GC- masas para en análisis de alcaloides de *S. trifasciata*, en él se ven las áreas de cada pico y el compuesto que se sospecha.

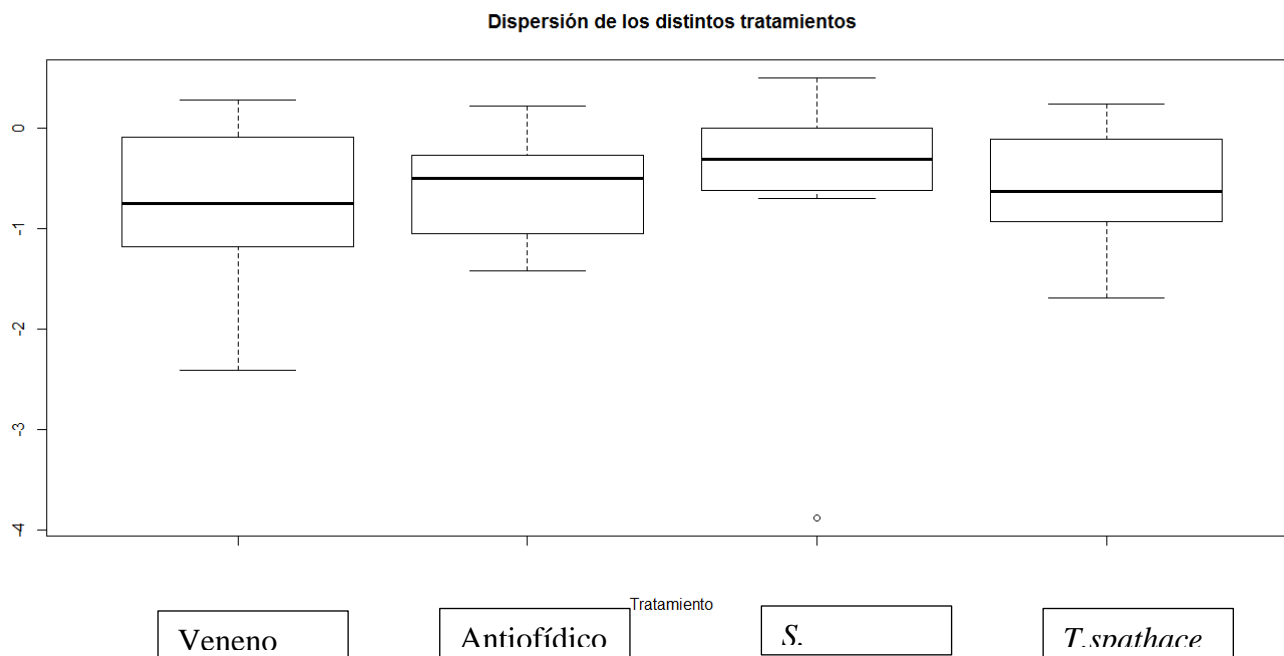
| Número de pico | Tiempo de retención (min) | Área (%) | Compuesto que se sospecha |
|----------------|---------------------------|----------|---|
| 2 | 46.111 | 15.40 | Heterociclo de Nitrógeno |
| 3 | 51.028 | 14.03 | Ácido benzoico, compuesto nitrogenado o ciclopentil |
| 4 | 55.362 | 14.38 | Compuesto aromático |
| 5 | 59.411 | 13.94 | Compuesto aromático y ácido mercaptoacético |
| 6 | 63.668 | 15.70 | Compuesto nitrogenado |

Cuadro 10. Resultado de GC-masas para el análisis de alcaloides de *T. spathacea*, en él se ven las áreas de cada pico y el compuesto que se sospecha.

| Número de pico | Tiempo de retención (min) | Área (%) | Compuesto que se sospecha |
|----------------|---------------------------|----------|---|
| 1 | 55.340 | 41.16 | Compuesto de 6 carbonos y compuesto a base de ciclohexano |
| 2 | 55.645 | 23.16 | Pentametileno, ciclopenteno |
| 3 | 58.501 | 27.72 | Heptadecanol y nonadecanol |
| 4 | 67.380 | 7.97 | Compuesto de 6 y 8 carbonos |

B. Bioensayos para inhibición del efecto hemolítico

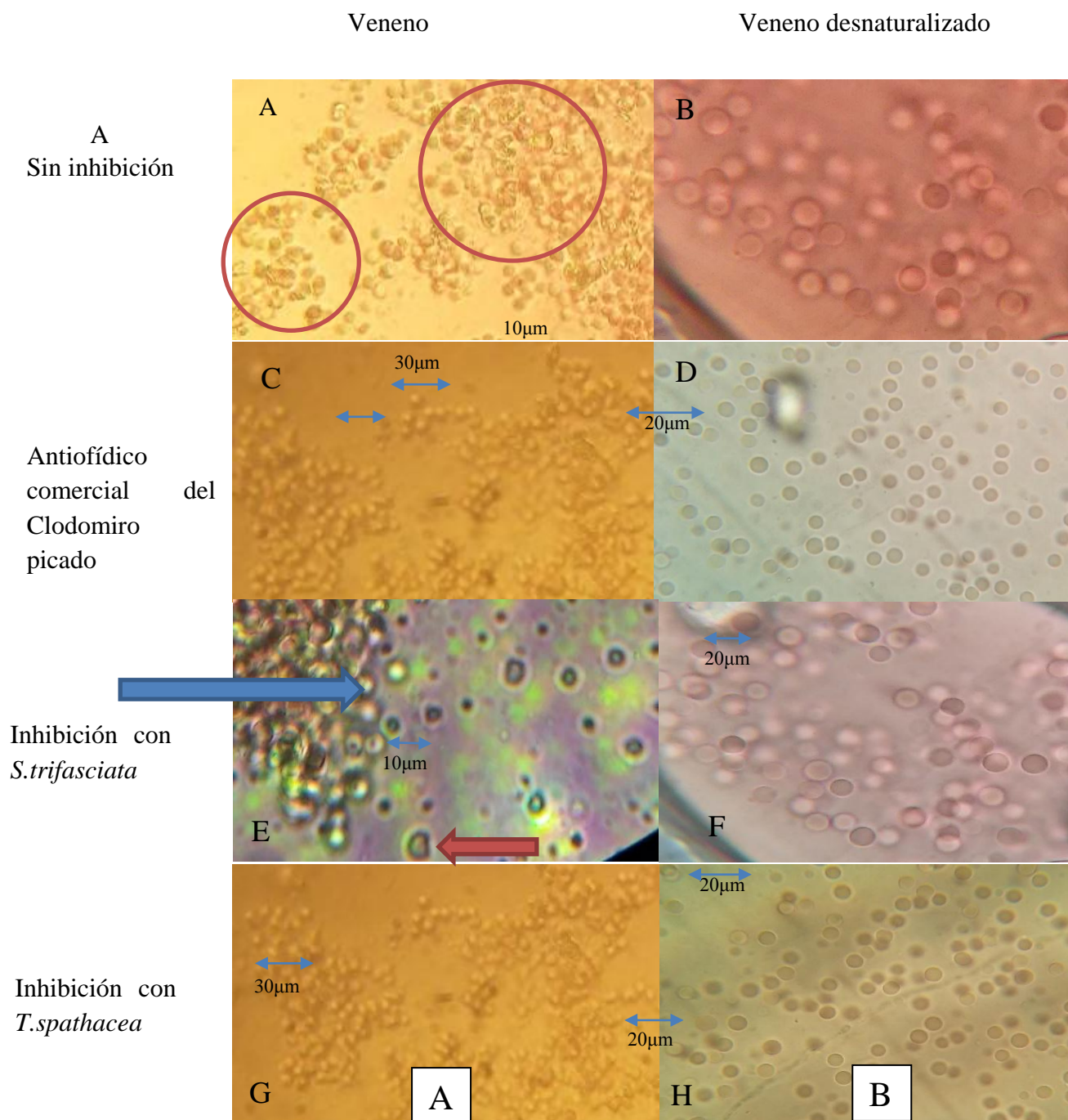
Figura 11. Diagrama de caja y bigote para la dispersión de datos de cada tratamiento según las absorbancias medidas.



Se puede ver la dispersión de los datos a lo largo del tercer y primer cuartil según la distribución, se puede ver que los datos que se distribuyen de una manera más homogénea son los datos de *S. trifasciata*, uno de los datos más dispersos son los del tratamiento de solo veneno.

En la Figura 11 se puede ver la eficiencia inhibitoria de cada tratamiento. En ello podemos ver que el tratamiento que logró una mejor inhibición fue el tratamiento con los alcaloides de *S. trifasciata*, el cual pertenece al tratamiento realizado con los alcaloides de *S. trifasciata*. A su vez, se puede observar que no hay diferencia significativa entre el tratamiento con *T. spathacea* y el tratamiento con antiofídico comercial (Kruskal Wallis, $p < 0.05$); esto se puede ver en la prueba de kruskal wallis realizada (ver Cuadro 12 y Figura 26 de anexos).

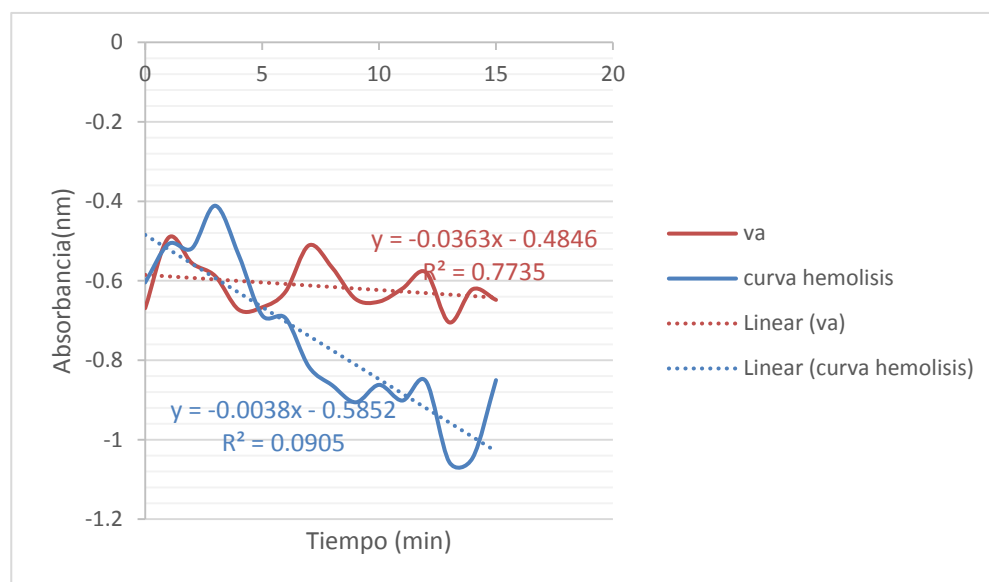
Figura 12. Resultado de bioensayos cualitativos para controles negativos, positivos y la evaluación de la inhibición del efecto hemolítico del veneno de *A. mexicanus* mediante cada tratamiento realizado



En la Figura 12 se ve el resultado para cada tratamiento. La parte A denota una hemólisis positiva ocasionada únicamente por el tratamiento con veneno (los círculos rojos denotan los eritrocitos lisados); la parte B,D,E,F denota un control negativo vista de sangre con los mismos tratamientos pero con la diferencia de que se inhibió el veneno calentándolo por 25 min; en la parte C se denota una inhibición positiva ocasionada del tratamiento con veneno y antifúngico comercial: en la parte E se denota una inhibición positiva ocasionada del tratamiento con veneno y alcaloides de *S. trifasciata*; en la parte G se denota una inhibición positiva ocasionada del tratamiento con veneno y *T. spathacea*. Las partes B,D,E,F,H se visualizaron en un aumento de 1000X; las partes A,C,G se visualizaron en un aumento de 100X-.Para los tratamientos de alcaloides se utilizó la fase acuosa en la extracción básica.

La Figura 12 corrobora los datos cuantitativos obtenidos. Como se puede ver en la parte A los eritrocitos están amorfos y la mayoría fue lisada; además, en la parte B,D,F,H podemos ver eritrocitos integros y prácticamente todos poseen una forma simétrica. En la parte C se ven eritrocitos lisados y no lisados; viendo la mayor parte de la población lisada.La parte E demuestra eritrocitos lisados y no lisados; en ello marcado en rojo podemos ver un eritrocito que acaba de sufrir de lisis y en azul uno que no fue lisado; la mayor parte de la población no sufrió de lisis. La parte G se puede ver eritrocitos lisados y no lisados

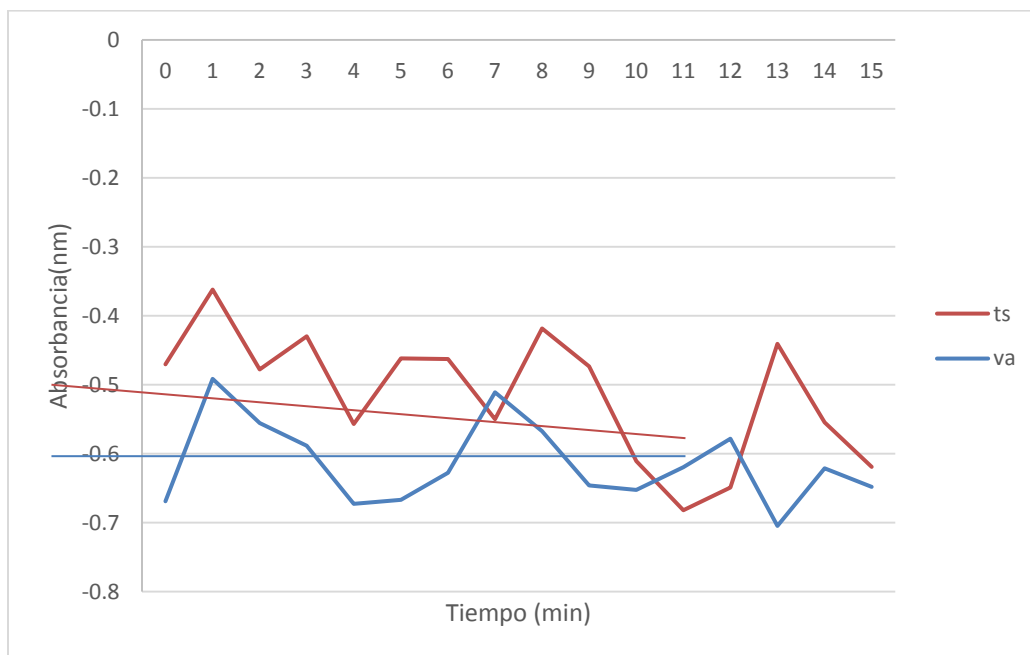
Figura 13. Curva de hemólisis para control negativo y positivo del efecto hemolítico del veneno de *A. mexicanus*. *Lisis eritrocítica medida por medio de espectrofotometría*. En la curva roja se ve el control positivo con antifúngico comercial (va) y en azul el control negativo del tratamiento de sangre y veneno.



En la Figura 13 se muestra la curva de hemólisis positiva (tratamiento solo con veneno en azul) y la curva de inhibición en la que se observa reducción de la tasa de hemólisis (curva en rojo llamada “va”). Los datos se obtuvieron al realizar 5 réplicas de 16 mediciones en los bioensayos de espectrofotometría. Para los tratamientos de alcaloides se utilizó la fase acuosa en la extracción básica.

Como podemos observar en la Figura 13 la curva de hemólisis positiva muestra una pendiente negativa bastante pronunciada. La línea no es recta debido al efecto de acumulación de biomasa ocasionado por el veneno. La curva de inhibición positiva muestra una pendiente más positiva, lo que indica una integridad mayor en los eritrocitos; a su vez esto se corrobora con las Figura 12.

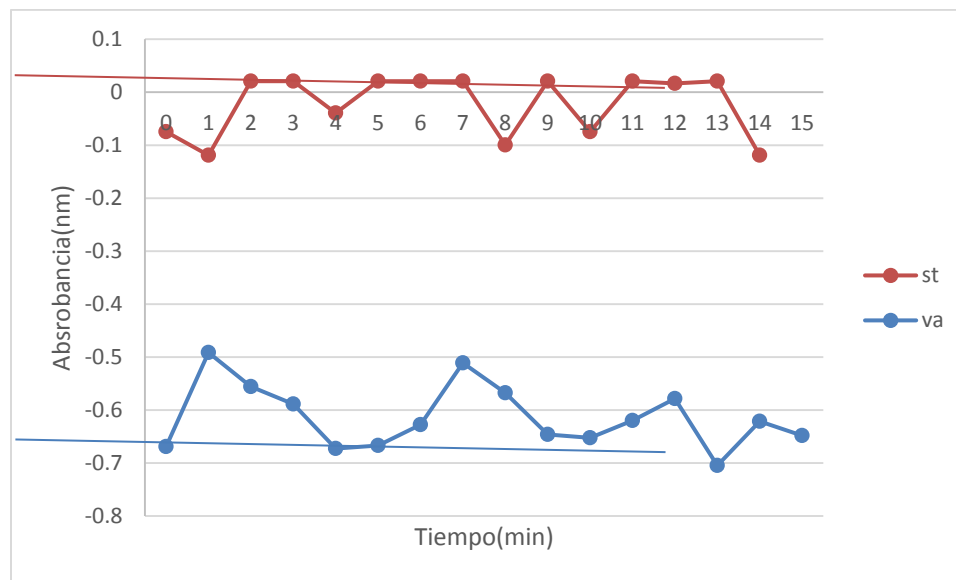
Figura 14. Curva de hemólisis para control positivo del efecto hemolítico del veneno de *A. mexicanus* (azul) e inhibición mediante tratamiento con *T. spathacea* (rojo).



La figura muestra curva de inhibición positiva (curva en azul llamada “va”) y la curva de inhibición con el tratamiento de alcaloides de *T. spathacea* (curva roja llamada “ts”) Los datos se obtuvieron al realizar 5 réplicas de 16 mediciones en los bioensayos de espectrofotometría. Para los tratamientos de alcaloides se utilizó la fase acuosa en la extracción básica.

En la Figura 14 se puede ver la diferencia entre el tratamiento de inhibición y el tratamiento con *T. spathacea*. En ello se puede ver que ambas pendientes son casi iguales en cuanto a comportamiento, por lo mismo no se puede deducir una diferencia entre tratamientos.

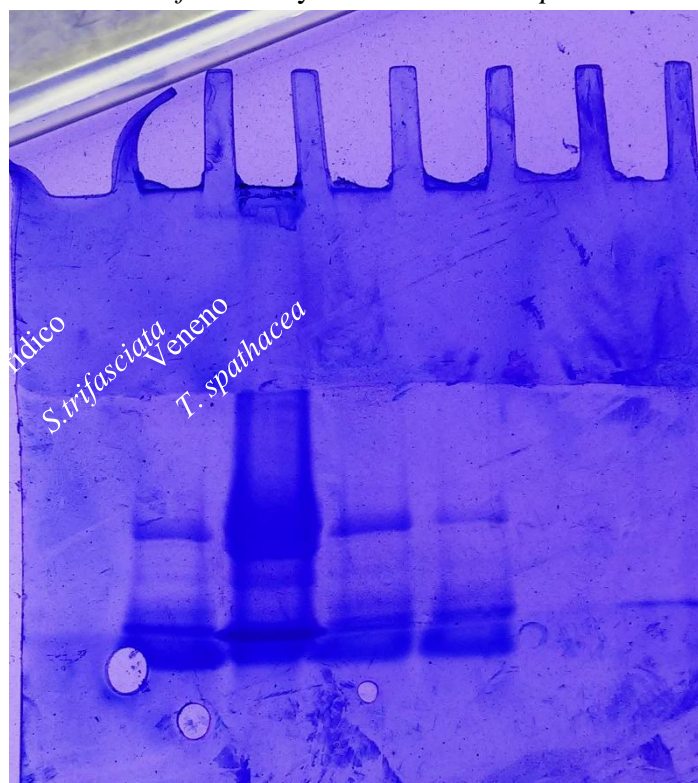
Figura 15. Curva de hemólisis para control de inhibición del efecto hemolítico del veneno de *A. mexicanus* con un antisuero comercial (azul) e inhibición mediante tratamiento con *S. trifasciata*(rojo).



La curva de inhibición positiva (curva en azul llamada “va”) y la curva de inhibición con el tratamiento de alcaloides de *S. trifasciata* (curva roja llamada “st”) Los datos se obtuvieron al realizar 5 réplicas de 16 mediciones en los bioensayos de espectrofotometría. Para los tratamientos de alcaloides se utilizó la fase acuosa en la extracción básica.

En la Figura 15 se puede ver la comparación entre el tratamiento de inhibición positiva y el tratamiento con *S. trifasciata*, en ello se ve una gran diferencia en cuanto a la tendencia y comportamiento, siendo la curva del tratamiento con *S. trifasciata* la que se comportó casi como una constante, deduciendo que la población se mantuvo casi igual a lo largo de la corrida.

Figura 16. SDS PAGE para experimento preliminar de proteínas del veneno de *Atropoides mexicanus*, así como el análisis del efecto del tratamiento con antiofídico comercial, alcaloides de *S. trifasciata* y alcaloides de *T. spathacea*.



Carril 1 la separación de proteínas del veneno de *A. mexicanus*, en ello se ven 5 bandas obtenidas; en el carril dos se encuentra el tratamiento de veneno y antiofídico comercial del Clodomiro picado; en el carril 3 se puede ver el tratamiento de veneno y alcaloides de *S. trifasciata* y en el carril 4 se ve el tratamiento de veneno y alcaloides de *T. spathacea*. El gel contiene un porcentaje 10% de Acrilamida/Bisacrilamida, se corrió a 100 V y se tiñó con una solución colorante de Commasie Blue (según protocolo de Ariano 2003).

En el carril uno se puede ver el corrimiento de veneno, para el cual se ven 5 bandas separadas y un agrupamiento proteico al fondo de la corrida. En el carril de antiofídico se ven bandas anchas y bastante intensas. En el carril de *S. trifasciata* se ven 5 bandas de separación y un agrupamiento de proteínas al final de la corrida (no se ve diferencia con el carril 1). Finalmente en el carril de *T. spathacea* se ve que la intensidad de la tinción disminuyó y la banda 1 casi desapareció en comparación con el carril de veneno.

VII. Discusión

A. Pruebas para identificación de alcaloides

El objetivo de esta parte del estudio fue obtener un extracto con los alcaloides de las plantas analizadas. Se buscó un extracto vegetal porque esto abarca un campo alternativo en el tratamiento del accidente ofídico, puesto que permite un modo de acción más económico para los gobiernos y las instituciones de salud. Actualmente se está apoyando mucho este tipo de investigación, sobre todo en países que sufren de un alto porcentaje de accidentes ofídicos (Brazil, Costa Rica, etc) (De Moura *et al.*, 2014; Yarlequé *et al.*, 2012)

Folclóricamente se ha visto el uso de plantas medicinales contra la mordedura de serpientes, esto bajo muchas creencias. En Guatemala se reporta mucho el uso de *Sanseveira trifasciata* contra la acción del veneno de diversas serpientes, pero no se ha realizado un estudio sobre la existencia de un efecto inhibitorio de los metabolitos secundarios, en las enzimas del veneno de Viperidos; así como el uso de *Tradescantia spathacea* en la cultura maya contra ataque de serpientes (Pöll and Alvarez, 2010)

Se eligió el reactivo de Dragendorff para detectar alcaloides por su eficiencia y facilidad de uso. Este método protona la amina del alcaloide, produciendo un par de iones que forman especies de $[BiL_4]^-$ y $[HNR_3]^+$; esto genera que los alcaloides precipiten con una coloración naranja (Waksmundzka-Hajnos *et al.*, 2008)

Para reducir la presencia de otros metabolitos secundarios se realizaron dos extracciones, una básica y una ácida. La finalidad del cambio de pH es que en un medio ácido el nitrógeno del heterociclo de los alcaloides se encuentre protonado, ocasionando que tenga una carga positiva y por ende que pueda migrar a una capa polar. Por ello al momento de realizar los lavados con el solvente, los alcaloides podían migrar a una fase acuosa (como se ve en el Cuadro 10 y en la figura 18 de anexos). Así mismo, la segunda extracción desprotonó el nitrógeno del heterociclo y al llegar a un pH bastante básico, afectó el grupo hidroxilo (OH) de la estructura de algunos alcaloides; esto ocasionó que los alcaloides migraran a una fase orgánica. Al ver los resultados del cuadro 10 se puede observar que esto no ocurrió para la extracción básica, por lo que se cree

que no se llegó al pK del alcaloide y por ende se necesitaba un pH aún más básico (mayor de 13); este es el motivo por el cual la mayor presencia se encontró en la fase acuosa (anexo figura 19) (Deyl, 2000; Hasselman 2016)

El análisis de GC-masas indica la presencia de posibles alcaloides, puesto que la base molecular de estos es un anillo a base de nitrógeno (el cromatograma y estructura de los alcaloides se encuentran en anexos Figura 19, 20 y 21). Además, un tiempo de retención y un área mayor en cada pico puede indicar una concentración mayor de los alcaloides, los tiempos de retención son mayores a los encontrados en la literatura ya que no se contó con la columna específica para corrida, ni con un equipo de HPLC-masas. El análisis de masas mostró hallazgos interesantes, primero que nada podemos ver un gran pico con poco tiempo de retención, el cual pertenece a una mezcla de solventes (agua, metanol, trasas de éter, etc). Así mismo, podemos ver en el Cuadro 10 el análisis para *S. trifasciata* muestra una amplia gama de compuestos nitrogenados, lo que confirma la extracción de alcaloides para esta planta. Algo curioso es que podemos observar trasas de compuestos aromáticos, lo cual puede pertenecer a ciertos alcaloides de *S. trifasciata*; se sospecha de la presencia de agustamina e hidroxicrimanidima. El motivo por el cual el tiempo de retención fue mayor al encontrado en la literatura se debe a contaminantes en el extracto, a un posible uso de una columna poco eficiente para separar alcaloides y a una baja concentración del mismo (Dey *et al.*, 2014; Ikewuchi *et al.*, 2014)

El Cuadro 10 muestra el análisis de masas para *T. spathacea*. En él se puede observar que puede haber compuestos pertenecientes a alcaloides, pero debido a una baja concentración y posiblemente a contaminaciones en el medio, estos no pudieron ser identificados.

B. Bioensayos para evaluación del efecto hemolítico

Para esta parte se trabajó con el objetivo de evaluar la capacidad hemotóxica del veneno; esto ya está documentado, pero la evaluación ayudó como un control negativo en todos los experimento. El efecto se midió de manera cualitativa y cuantitativa. En los métodos cualitativos, se observó el efecto de lisis en eritrocitos mediante microscopía; como se puede apreciar en la Figura 11 los eritrocitos sometidos a tratamiento con veneno fueron lisados, esto se debe a las diversas enzimas de carácter hemolítico del veneno, dentro de las cuales la fosfolipasa A2 es una

de las encargadas de separar la unión de membranas lipídicas (Burke and Dennis, 2009). Además la acción de metaloproteinasas dependientes de zinc también ocasionó la lisis de los eritrocitos (Burke and Dennis, 2009)

El mejor control negativo se puede ver en la Figura 12, ya que esta contiene veneno inhibido y alcaloides activos. La importancia de tener los alcaloides activos es que con ello se comprobó que estos no afectan la integridad de los eritrocitos y que la presencia del exceso de solvente en los extractos no es representativo para crear un medio hipotónico. A su vez, la importancia de tener el veneno inhibido se debe a que con ello se corroboró que el veneno fue el responsable de la lisis en los eritrocitos (Mackessy, 2009)

En la Figura 12 se observa la población lisada y no lisada para cada tratamiento. Como se puede observar que no hay una diferencia entre la implementación del antiofídico comercial y el uso de alcaloides de *T. spathacea*; esto se corrobora con la prueba de kruskal wallis realizada (ver anexo Cuadro 13); así mismo, al ver el análisis de kruskal wallis se ve que el uso de alcaloides de *S. trifasciata* fue más efectivo para inhibir la acción de efecto hemolítico del veneno de *A. mexicanus* (mismo efecto se ve en la Figura 12). Esto es posible que se debe a que los alcaloides ocupen el sitio activo de la enzima ocasionando que esta no pueda efectuar su acción de lipasa. La alta eficiencia de los alcaloides de *S. trifasciata* en comparación con *T. spathacea*, se puede deber a la concentración de los mismos y a una mejor integridad en los alcaloides del mismo (De Moura *et al.*, 2014).

La Figura 12 corrobora este resultado ya que muestran la forma en que los eritrocitos mantuvieron su integridad a pesar de ser sometidas a un tratamiento con veneno. Los tratamientos únicamente contenían 10 μ L de veneno en 270 μ L de sangre; esta proporción pudo ser favorable para la acción del alcaloide o el anticuerpo, ya que la reacción de estos no era 1:1, sino que llegó a ser de 5:1. Por lo mismo se recomienda realizar un experimento confirmatorio que evalúe diversas concentraciones de los alcaloides y su acción sobre el efecto hemolítico. El motivo por el cual se ven eritrocitos deformes en la figura 12 a pesar de la buena acción del alcaloide se debe a que algunos fueron lisados antes de que el alcaloide actuara, o bien a que estos no se lisaran por completo por acción tardía del alcaloide. Por ello se tiene la hipótesis de una posible inhibición competitiva entre el alcaloide y el eritrocito por el sitio

activo de la enzima; esto no se comprobó y es una recomendación para investigaciones futuras, realizando experimentos de interacción entre enzimas y alcaloides usando como sustrato fosfolípidos purificados, para evitar la contaminación por componentes celulares, y lipasas como control positivo (Voet and Voet, 2006).

Las gráficas presentadas (figuras 13-15) muestran cómo el veneno afectó a los eritrocitos durante un tiempo determinado y cómo los alcaloides o tratamientos contribuyeron a que estos mantuvieran integridad. En la figura 14 se ven el control positivo y negativo (los cuales corresponden al tratamiento de solo veneno y el tratamiento de veneno con antiofídico comercial pentavalente del Clodomiro picado). Uno de los motivos por el cual las gráficas no muestran una línea recta es porque el veneno coaguló la sangre de carnero, a pesar que esta no posee fibrina. Con ello se deduce que el veneno posee agonistas de la cascada de coagulación, más específicamente posee reptilasa; a su vez puede que los microcoagulos encontrados se formaran por la acumulación de biomasa proveniente de los eritrocitos. Los microcoagulos que formó el veneno en la sangre ocasionó que la luz del espectrofotómetro tuviera menos transmitancia y por ello las curvas poseen distorsión (Mackessy, 2009). A su vez se puede estimar el porcentaje de inhibición, para el cual la planta *S. trifasciata* posee el porcentaje más alto con un 80% (ver Cuadro 14 de anexos).

La Figura 14 muestra la diferencia entre el control positivo y el tratamiento con *T. spathacea*. En ambos se ve una constante con casi la misma pendiente, esto corrobora el análisis de kruskal wallis (Cuadro 13 de anexos) y muestra que no hay diferencia entre cada tratamiento. Bajo el mismo análisis la Figura 15 muestra la comparación con la inhibición realizada por los alcaloides de *S. trifasciata*, para los cuales se ve claramente la eficiencia de los alcaloides de la misma. El motivo por el cual la absorbancia está negativa puede deberse a que en ese momento ocurrió más transmitancia que absorbancia, lo cual corrobora que ciertos eritrocitos fueron lisados (ya que el blanco utilizado fue sangre) (Skoog *et al.*, 1997)

Finalmente la Figura 16 muestra el comportamiento proteico para cada tratamiento. El tratamiento con antiofídico comercial muestra una alta concentración proteica debido a que el antiofídico contiene anticuerpos contra las proteínas del veneno y se puede observar claramente que estos afectan todas las proteínas separadas. Así mismo se puede ver que el pozo 4 fue el que

contiene una menor carga proteica, en comparación con el control negativo (pozo 1); esto hace que se hipotétice que los alcaloides de *T. spathacea* degradan las proteínas del veneno de *A. mexicanus*. Por lo mismo se recomienda que para futuros estudios se evalúe la acción inhibitoria de los alcaloides *T. spathacea* en una mayor concentración y purificación.

VIII. Conclusiones

- Se encontró que posiblemente el extracto de alcaloides de *S. trifasciata* disminuye la actividad hemotóxica del veneno de *A. mexicanus*.
- Se corroboró el efecto hemolítico del veneno de *A. mexicanus* en ausencia de otros compuestos
- El análisis de GC-masas muestra la presencia de compuestos nitrogenados para el extracto de *S. trifasciata*, lo cual sugiere la presencia de alcaloides.
- La prueba de Dragendorff muestra un resultado positivo para ambas plantas, sobre todo en la fase acuosa , extracción básica.
- El análisis de Kruskal Wallis, para las pruebas realizadas, muestra una mayor eficiencia en el uso de alcaloides de *S.trifasciata* en comparación con el uso de antisuero comercial; así mismo, el análisis de Kruskal Wallis muestra que no hay diferencia significativa entre el uso de alcaloides de *T. spathacea* y el uso de un antiofídico comercial

IX. Recomendaciones

- Aislar los alcaloides individuales para cada planta y repetir los bioensayos.
- Realizar un análisis del efecto inhibitorio de los alcaloides de *S.trifasciata* y *T. spathacea* en línea celular
- Analizar la dosis mínima de alcaloides para la acción inhibitoria del efecto hemolítico del veneno de *A. mexicanus*
- Se recomienda realizar experimentos de interacción entre enzimas y alcaloides usando como sustrato fosfolípidos purificados, para evitar la contaminación por componentes celulares, y lipasas como control positivo.

X. Bibliografía

1. Anbu, J.S.J., Jayaraj, P., Varatharajan, R., Thomas, J., Jisha, J., Muthappan, M., 2009. *Analgesic and Antipyretic Effects of Sansevieria Trifasciata Leaves*. Afr. J. Tradit. Complement. Altern. Med. 6, 529–533.
2. Angulo, Y., Escolano, J., Lomonte, B., Gutiérrez, J.M., Sanz, L., Calvete, J.J., 2008. *Snake venomomics of Central American pitvipers: clues for rationalizing the distinct envenomation profiles of Atropoides mexicanus and Atropoides picadoi*. J. Proteome Res. 7, 708–719. doi:10.1021/pr700610z
3. Ariano, D. 2003. *Distribución e historia natural del Escorpión, Heloderma horridum charlesbogerti* Campbell y Vannini, (Sauria: Helodermatidae) en Zacapa, Guatemala y caracterización de su veneno. Universidad Del Valle de Guatemala. 80 pp.
4. Ayres, L.R., Récio, A.D.R., Burin, S.M., Pereira, J.C., Martins, A.C., Sampaio, S.V., de Castro, F.A., Pereira-Crott, L.S., 2015. Bothrops snake venoms and their isolated toxins, an L-amino acid oxidase and a serine protease, modulate human complement system pathways. J. Venom. Anim. Toxins Trop. Dis. 21, 29. doi:10.1186/s40409-015-0026-7
5. Bousquets, J.L., 2005. *Regionalización biogeográfica en Iberoamérica y tópicos afines: primeras jornadas biogeográficas de la red iberoamericana de biogeografía y entomología sistemática (RIBES XII.I-CYTED)*; [2003 en la Ciudad de México]. UNAM.
6. Burke, J.E., Dennis, E.A., 2009. *Phospholipase A2 structure/function, mechanism, and signaling*. J. Lipid Res. 50, S237–S242. doi:10.1194/jlr.R800033-JLR200
7. CDC, 2009. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 5th ed. USA.
8. Campbell, J.A., Lamar, W.W., 2004. *The Venomous Reptiles of the Western Hemisphere*. Cornell University Press, Ithaca, NY.
9. Centro nacional de epidemiología. 2016. *Insidencia de accidente ofídico en el País*. Segsa.
10. Chen, J., Wang, F., Liu, J., Lee, F.S.-C., Wang, X., Yang, H., 2008. *Analysis of alkaloids in Coptis chinensis Franch by accelerated solvent extraction combined with ultra performance liquid chromatographic analysis with photodiode array and tandem mass spectrometry detections*. Anal. Chim. Acta 613, 184–195. doi:10.1016/j.aca.2008.02.060

11. Dong, W; Wang, T y Zhang, J. 2011. *Simple, Time-Saving Dye Staining of Proteins for Sodium Dodecyl Sulfate–Polyacrylamide Gel Electrophoresis Using Coomassie Blue*. Plos One. Vol 6. No. 8. Pp. 1-3
12. Dey, B., Bhattacharjee, R., Mitra, A., Singla, R., Pal, A., 2014. *Mechanistic Explorations of Antidiabetic Potentials of Sansevieria Trifasciata*. INDO Glob. J. Pharm. Sci. 4, 113–122.
13. el butantan [WWW Document], n.d. URL http://www.butantan.gov.br/butantan/Paginas/default_es.aspx (accessed 3.28.16).
14. De Moura, V., de Sousa, L., Dos Santos, M., Almeida, J., Lima, A., Bezerra, R., 2014. *Plants used to treat snakebites in Santarém, western Pará, Brazil: an assessment of their effectiveness in inhibiting hemorrhagic activity induced by Bothrops jararaca venom*. J. Ethnopharmacol. 14, 1–33.
15. Dey, B., Bhattacharjee, R., Mitra, A., Singla, R., Pal, A., 2014. *Mechanistic Explorations of Antidiabetic Potentials of Sansevieria Trifasciata*. INDO Glob. J. Pharm. Sci. 4, 113–122.
16. Deyl, Z., 2000. *Applications*. Elsevier.
17. Guerra, D., 2015. *Ética sobre el envenenamiento ofídico en el paisaje agrario de Guatemala*. Cienc. Tecnol. Salud 2, 9.
18. Gupta, M.P., CYTED (Organization), Subprograma de Química Fina Farmacéutica, Secretaría Ejecutiva Permanente del Convenio Andrés Bello, 1995. *270 plantas medicinales iberoamericanas*, 1. ed. ed. Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo, Subprograma de Química Fina Farmacéutica : Convenio Andres Bello, Santafé de Bogotá, D.C.-Colombia.
19. Gupta, Y.K., Peshin, S.S., 2012. *Do Herbal Medicines Have Potential for Managing Snake Bite Envenomation?* Toxicol. Int. 19, 89–99. doi:10.4103/0971-6580.97194
20. Hasselman, A. 2016. *Conocimientos de Química orgánica*. UVG. Gutemala, Guatemala.
21. Hardy, D.L., 1994. *Bothrops asper (Viperidae) Snakebite and Field Researchers in Middle America*. Biotropica 26, 198–207. doi:10.2307/2388809
22. Hatfield, G., 2004. *Encyclopedia of Folk Medicine: Old World and New World Traditions*. ABC-CLIO
23. Hames, B. 1998. *Gel electrophoresis of proteins: A practical Approach*. OUP Oxford. Oxford New ork, USA. 372 pp.

24. Ighodaro, A., Anegbe, B., Ogbeide, O., Onaiwu, E., 2015. *The phytochemical and chemotherapeutic effect of three indigenous Africa plant used in asthma therapy*. J. Pharmacogn. Phytochem. 3, 244–247.
25. Inbio, 2015. *Listado de anfibios y reptiles de Guatemala*. Costa Rica. En: <http://www.inbio.ac.cr/web-ca/biodiversidad/guatemala/anfibios%20y%20reptiles%20de%20Guatemala.pdf>
26. Instituto clodomido picado, 2009. *El envenenamiento por mordedura de serpiente en Centroamérica*. Universidad de Costa Rica, Costa Rica.
27. Instituto clodomido picado, 2012. *El envenenamiento por mordedura de serpiente en Centroamérica*. Universidad de Costa Rica, Costa Rica.
28. Instituto Nacional de Higiene [WWW Document], n.d. URL <http://birmex.gob.mx/inh.html> (accessed 3.29.16).
29. Ikewuchi, C., Ayalogu, E., ; Oyeike, E., Ikewuchi, J., 2014. *Study on the alkaloid, allicin, glycoside and saponin composition of the leaves of Sansevieria liberica Gérôme and Labroy by gas chromatography* [WWW Document]. URL https://www.academia.edu/4398046/Study_on_the_alkaloid_allicin_glycoside_and_saponin_composition_of_the_leaves_of_Sansevieria_liberica_G%C3%A9r%C3%B4me_and_Labroy_by_gas_chromatography (accessed 3.16.16).
30. 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.
31. Lee, J., Lim, Y.Y., Lee, S., 2013. *Antioxidant and antibacterial activity of Rhoecopathacea (Swartz) Stearn leaves*. J Food Sci Technol 1–7.
32. Lomonte-Vigliotti, B., 2012. *Venenos de serpiente: de la investigación al tratamiento*. Snake venoms: from research to treatment.
33. López, S., 2014. *“Las representaciones de la Familia Viperidae en la Arqueología de Guatemala: especies representadas y su significado.”* San Carlos de Guatemala, Guatemala city.
34. Mackessy, S., 2009. *Handbook of Venoms and Toxins of Reptiles* [WWW Document]. CRC Press. URL <https://www.crcpress.com/Handbook-of-Venoms-and-Toxins-of-Reptiles/Mackessy/9780849391651> (accessed 3.16.16).

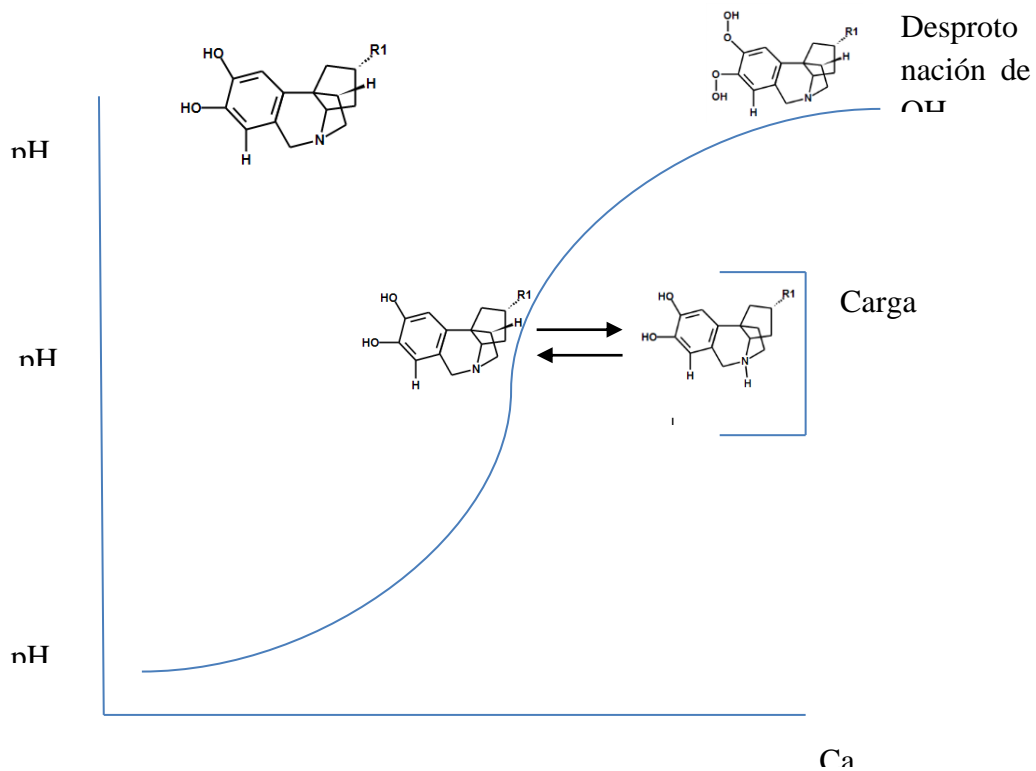
35. Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social, 2007. *Memoria anual de vigilancia epidemiológica 2007*. MSPAS.
36. Marcano, D., Hasegawa, M., 2002. *Fitoquímica Orgánica*. CDCH UCV.
37. Morales, C., 2012. *Guía de animales ponzoñosos de Guatemala: Manejo del paciente intoxicado*. San Carlos de Guatemala, Guatemala city.
38. Morales, M; Palomo, G. 2015. *Práctica toxicológica*. UVG. Guatemala , Guatemala
39. Otero,R; Núñez,V; Barona,J; Fonnegra,R; J,s;O,R;S,M y D,A.2000. *Snakebites and ethnobotany in the northwest region of Colombia, Part III: Neutralization of the haemorrhagic effect of Bothrops atrox venom*. Ethnopharmacology. 73. 233-241
40. Pöll, E., Alvarez, M., 2010. *Plantas autoctonas de Guatemala usadas en medicina tradicional*. Universidad del Valle de Guatemala, Guatemala.
41. Pulido, S. 2014. *Evaluación de la actividad enzimática de superóxido dismutasa Cu/Zn en frijol (Phaseolus vulgaris) bajo diferentes condiciones de déficit hídrico*. Universidad nacional de Colombia. 85
42. Restrepo, H.C., 2013. -OPHIDIA - *Asesoría Especializada en Toxinología y Riesgos Biológicos.: Suero Antiofídico Polivalente Liofilizado*. -OPHIDIA - Asesor. Espec. En Toxinología Riesgos Biológicos.
43. Ryan,R.M.1953. *The biotic provinces of Central America as included by mammalian distribution*. Acta zool. 6(2-3).Mexico. pp 1-55
44. Savagem J.1980. *The enigma of the central America herpetofauna:dispersal or vicariance*. Bot gard, 69. Missouri, USA. 464-547.
45. Saràvia, P., Mérida, M., Orellana, M., Hernández, R., 2015. *EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD NEUTRALIZANTE DE EXTRACTOS DE PLANTAS DE USO POPULAR EN GUATEMALA COMO ANTÍDOTOS PARA EL ENVENENAMIENTO POR MORDEDURA DE LA SERPIENTE Bothrops asper*. Cienc. Tecnol. Salud 2, 13.
46. Sistema de información gerencial de salud,2016.*Mordeduras de serpientes años 2011 al 2015*. Ministerio de salud pública y asistencia social. Guatemala, Guatemala.
47. Skoog, D.A., West, D.M., Holler, F.J., 1997. *Fundamentos de química analítica*. Reverte.

48. Standley, P.C., Steyermark, J.A., 1946. *Flora of Guatemala*, by Paul C. Standley and J.A. Steyermark. Chicago,.
49. Vyas, V.K., Brahmabhatt, K., Bhatt, H., Parmar, U., 2013. *Therapeutic potential of snake venom in cancer therapy: current perspectives*. Asian Pac. J. Trop. Biomed. 3, 156–162. doi:10.1016/S2221-1691(13)60042-8
50. Voet, D., Voet, J.G., 2006. *Bioquímica*. Ed. Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina.
51. Wallace, A. 1876. *The geographical distribution of animals*. Vol. 2. Mcmillan &Co. Londres.
52. Tripathi, K.D., 2008. *Farmacología En Odontología: Fundamentos*. Ed. Médica Panamericana.
53. Waksmundzka-Hajnos, M., Sherma, J., Kowalska, T., 2008. *Thin Layer Chromatography in Phytochemistry*. CRC Press.
54. WHO, 2010. *WHO Guidelines for the production control and regulation of snake antivenom immunoglobulins*. USA.
55. Yarlequé, A., Clavo, M., Lazo, F., Millan, B., Mendoza, J., 2012. *ACCIÓN NEUTRALIZANTE DE LA TOXICIDAD DEL VENENO DE Bothrops atrox POR EXTRACTO DE PLANTAS AMAZÓNICAS*. Soc. Quím. Perú 78, 234–242.

XI. Anexos

A. Comportamiento de alcaloides a diferente pH

Figura 19. Comportamiento de los alcaloides a diferentes pH, perdiendo o ganando electrones.



La Figura 19 muestra el comportamiento de la ambelina ($R1 = OCH_3$), esta se comporta ganando o perdiendo electrones lo que le confiere una carga a lo largo de la curva.

B. Análisis estadístico

Cuadro 11. Análisis de Shaphiro Wilk para evaluar supuesto de normalidad en los datos de absorbancia para curvas de hemólisis. Datos analizados en paquete estadístico R versión 3.1.2

| Tratamiento | P teórico | P experimental | Conclusión |
|-------------------------------|-----------|-------------------------|--|
| <i>Veneno</i> | 0.05 | 0.001719 | Se rechaza Ho concluyendo que el tratamiento no cumple con el supuesto de normalidad |
| <i>Antiofídico</i> | 0.05 | 0.0003801 | Se rechaza Ho concluyendo que el tratamiento no cumple con el supuesto de normalidad |
| <i>Tradescantia spathacea</i> | 0.05 | 1.003×10^{-11} | Se rechaza Ho concluyendo que el tratamiento no cumple con el supuesto de normalidad |
| <i>Sanseveira trifasciata</i> | 0.05 | 1.003×10^{-11} | Se rechaza Ho concluyendo que el tratamiento no cumple con el supuesto de normalidad |

Se muestra el valor P teórico y experimental para cada tratamiento realizado, la conclusión acepta o rechaza la Ho para cada tratamiento realizado.

Como se puede ver en el cuadro ningún tratamiento sigue una distribución normal por lo que no cumple con los supuestos para implementar pruebas paramétricas. Esto ya que la Ho en el supuesto es que la tendencia de los datos no es normal y como se ve todos los tratamientos poseen un valor $p_{\text{experimental}} < p_{\text{crítico}}$; por lo que Ho se rechaza.

Cuadro 12. Análisis estadístico de la prueba Kruskal Wallis para evaluación de varianza para la comparación entre tratamientos inhibitorios (planta vs antiofídico)

| Relación | | P crítico | P experimental | Conclusión |
|---|----|-----------|-------------------------|--|
| <i>Antiofídico</i> <i>Tradescantia</i> <i>spathacea</i> | vs | 0.05 | 0.4788 | Como el valor p experimental es mayor que el p crítico no se rechaza Ho y se concluye que los tratamientos no son diferentes |
| <i>Antiofídico</i> <i>Sanseveira trifasciata</i> | vs | 0.05 | 2.486×10^{-10} | Como el valor p experimental es menor que el p crítico se rechaza Ho y se concluye que los tratamientos son diferentes |

Se muestra la conclusión para cada resultado del valor p en la comparación de tratamientos inhibitorios según la prueba de Kruskal Wallis realizada en el paquete estadístico R versión 3.1.2.

C. Resultados para el análisis de GC-masas y Dragendorff

Figura 20. Cromatograma de GC-masas para análisis de alcaloides de *S. trifasciata*

```
File       :C:\msdchem\1\DATA\Tesis\160630-000001.D
Operator   : AdaM
Acquired   : 30 Jun 2016  11:09   using AcqMethod ACRITES ESENCIALES MCS DB-WAX SCAN 2.M
Instrument  : GC-MSD
Sample Name: ST
Misc Info  : Extracto
Vial Number: 1
```

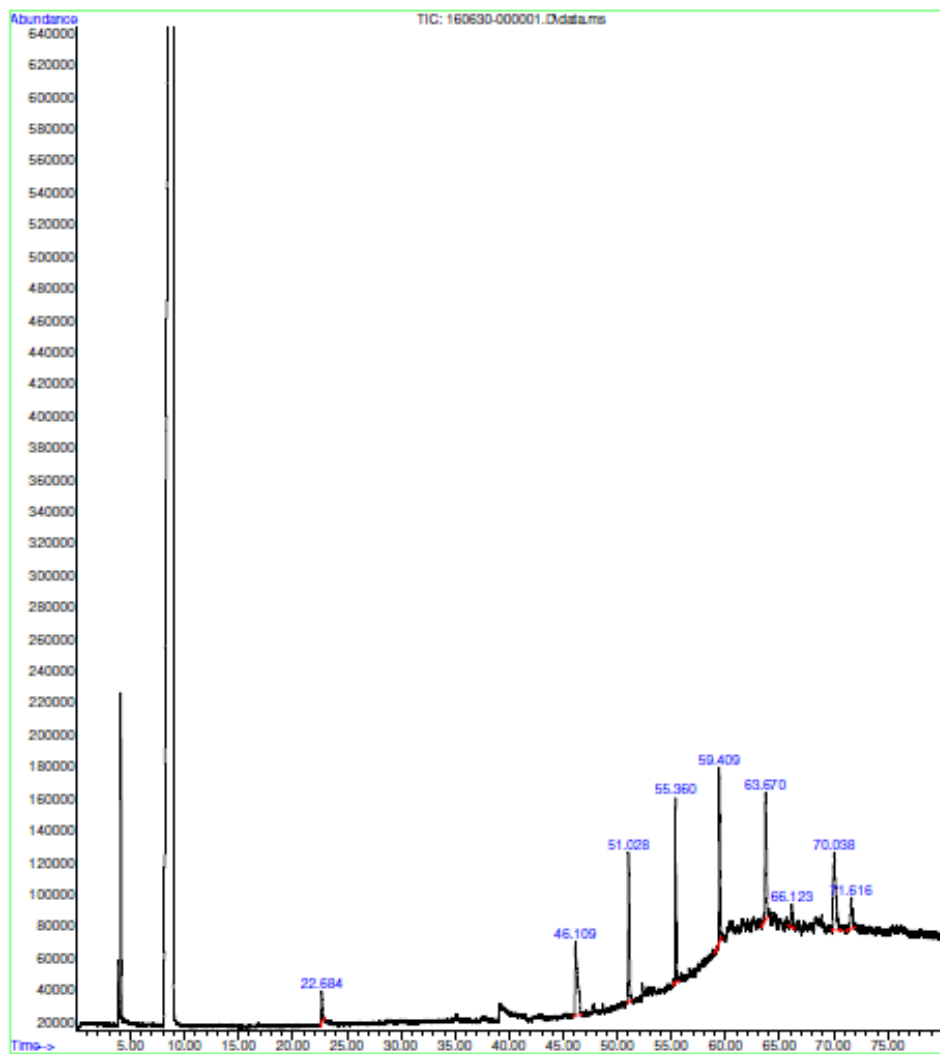


Figura 21. Resultado de lectura para el cromatograma de GC-masas para *S. trifasciata*

| LIQA | | Library Search Report | | | | |
|--|--------|-----------------------|---|--------|--------------|------|
| Data Path : C:\msdchem\1\DATA\Tesis\ | | | | | | |
| Data File : 160630-000001.D | | | | | | |
| Title : | | | | | | |
| Acq On : 30 Jun 2016 11:09 | | | | | | |
| Operator : AdaM | | | | | | |
| Sample : ST | | | | | | |
| Misc : Extracto | | | | | | |
| ALS Vial : 1 Sample Multiplier: 1 | | | | | | |
| Search Libraries: C:\Database\NIST05a.L Minimum Quality: 0 | | | | | | |
| Unknown Spectrum: Apex | | | | | | |
| Integration Events: ChemStation Integrator - autoint1.e | | | | | | |
| Pk# | RT | Area% | Library/ID | Ref# | CAS# | Qual |
| 1 | 22.685 | 2.55 | C:\Database\NIST05a.L Acetic acid | 257 | 000064-19-7 | 72 |
| | | | Acetic acid | 255 | 000064-19-7 | 72 |
| | | | Acetic acid | 254 | 000064-19-7 | 72 |
| 2 | 46.111 | 15.40 | C:\Database\NIST05a.L Silane, [[4-[1,2-bis(trimethylsilyloxy)ethyl]-1,2-phenylene]bis(oxy)]bis(trimethyl-N-(trifluoroacetyl)-O,O',O''-tris(trimethylsilyl)norepinephrine | 180822 | 056114-62-6 | 35 |
| | | | Phenethylamine, N-methyl-.beta.,3,4-tris(trimethylsilyloxy)- | 183045 | 1000072-26-3 | 35 |
| | | | | 170946 | 010538-85-9 | 35 |
| 3 | 51.028 | 14.03 | C:\Database\NIST05a.L Benzoic acid, 2,4-bis(trimethylsilyloxy)-, trimethylsilyl ester | 161138 | 010586-16-0 | 38 |
| | | | N-(trifluoroacetyl)-N,O,O',O''-tetraakis(trimethylsilyl)norepinephrine | 187076 | 1000072-26-7 | 27 |
| | | | Cyclopentasiloxane, dodecamethyl- | 161016 | 000541-02-6 | 27 |
| 4 | 55.362 | 14.38 | C:\Database\NIST05a.L 1,2-Benzenedicarboxylic acid, bis(trimethylsilyl) ester | 130648 | 002078-22-0 | 27 |
| | | | 1,2-Benzenedicarboxylic acid, bis(trimethylsilyl) ester | 130646 | 002078-22-0 | 27 |
| | | | Trisiloxane, 1,1,1,3,3,5-hexamethyl-1,3,3-bis(trimethylsilyloxy)- | 166198 | 003555-47-3 | 25 |
| 5 | 59.411 | 13.94 | C:\Database\NIST05a.L Benzoic acid, 2,4-bis(trimethylsilyloxy)-, trimethylsilyl ester | 161138 | 010586-16-0 | 27 |
| | | | Mercuric acetate, bis(trimethylsilyl)- | 82769 | 006398-62-5 | 25 |
| | | | Pentasiloxane, dodecamethyl- | 166195 | 000141-63-9 | 22 |
| 6 | 63.668 | 15.70 | C:\Database\NIST05a.L Benzoic acid, 2,5-bis(trimethylsilyloxy)-, trimethylsilyl ester | 161132 | 003618-20-0 | 38 |
| | | | N-Benzyl-N-ethyl-p-isopropylbenzamide | 112663 | 015089-22-2 | 22 |
| | | | Benzenesulfonamide, N-[(pentafluorophenyl)methylene]-.beta.,3,4-tris(trimethylsilyloxy)- | 187434 | 055429-13-5 | 14 |
| 7 | 66.125 | 2.78 | C:\Database\NIST05a.L 1,4,7,10,13,16-Hexaoxacyclooctadecane | 100942 | 017455-13-9 | 52 |
| | | | Heptaethylene glycol monododecyl ether | 184119 | 003055-97-8 | 52 |
| | | | 1,4,7,10,13,16-Hexaoxacyclooctadecane | 100938 | 017455-13-9 | 52 |
| 8 | 70.036 | 16.73 | C:\Database\NIST05a.L Dithioerythritol, O,O',S,S'-tetraakis(trimethylsilyl)- | 178865 | 1000079-30-7 | 22 |
| | | | Pentasiloxane, dodecamethyl- | 166195 | 000141-63-9 | 16 |
| ACEITES ESE...WAX SCAN 2.M Wed Jul 06 13:13:34 2016 | | | | | | |
| Page: 1 | | | | | | |
| | | | N-Benzyl-N-ethyl-p-isopropylbenzamide | 112663 | 015089-22-2 | 12 |
| | | | | | | |
| 9 | 71.615 | 4.48 | C:\Database\NIST05a.L 1,4,7,10,13,16-Hexaoxacyclooctadecane | 100939 | 017455-13-9 | 46 |
| | | | ane | | | |
| | | | 1,4,7,10,13,16-Hexaoxacyclooctadecane | 100942 | 017455-13-9 | 46 |
| | | | ane | | | |
| | | | 1,4,7,10,13,16-Hexaoxacyclooctadecane | 100938 | 017455-13-9 | 46 |
| | | | ane | | | |

En la figura 21 se muestra el análisis realizado con un cromatografo marca agilent modelo 6850 para el análisis del extracto de *S. trifasciata*.

Figura 22. Cromatograma de GC-masas para análisis de alcaloides de *T. spathacea*

```
File      :C:\msdchem\1\DATA\Tesis\160630-000002.D
Operator  : AdaM
Acquired  : 30 Jun 2016  12:36    using AcqMethod ACRITES ESENCIALES MCS DB-WAX SCAN 2.M
Instrument : GC-MSD
Sample Name: IS
Misc Info : Extracto
Vial Number: 2
```

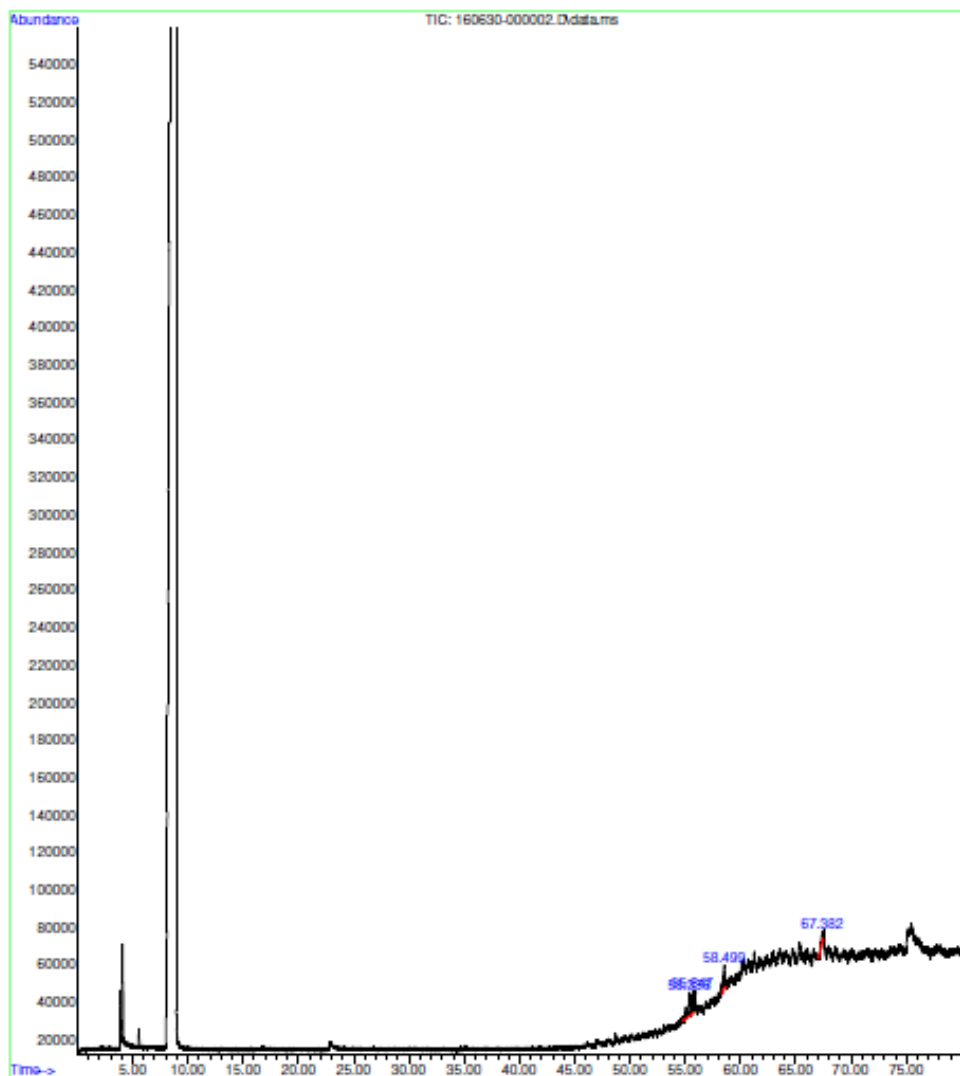


Figura 23. Resultado de lectura para el GC- masas para *T.spathacea*

```

          LIPA      LIBRARY SEARCH REPORT

Data Path : C:\msdchem\1\DATA\Tesis\
Data File : 160630-000002.D
Title      :
Acq On    : 30 Jun 2016  12:36
Operator  : AdeM
Sample    : TS
Misc      : Extracto
ALS Vial  : 2      Sample Multiplier: 1

Search Libraries:  C:\Database\NIST05a.L           Minimum Quality:  0

Unknown Spectrum:  Apex
Integration Events: ChemStation Integrator - autoint1.e

Pk#   RT   Area%   Library/ID                               Ref#   CAS#   Qual
-----
  1   55.340  41.16  C:\Database\NIST05a.L
      Hexagol                               112859  002615-15-8  72
      Hexagol                               112857  002615-15-8  72
      1,4,7,10,13,16-Hexaoxacyclooctadec  100941  017455-13-9  64
      ane
  2   55.645  23.16  C:\Database\NIST05a.L
      Pentaethylene glycol                 83342  004792-15-8  72
      Pentaethylene glycol                 83340  004792-15-8  72
      Pentaethylene glycol                 83341  004792-15-8  72
  3   58.501  27.72  C:\Database\NIST05a.L
      2-Heptadecanol                       96327  016813-18-6  52
      1,4,7,10,13,16-Hexaoxacyclooctadec  100939  017455-13-9  49
      ane
      2-Nonadecanol                       114937  026533-36-8  49
  4   67.380   7.97  C:\Database\NIST05a.L
      Hexaethylene glycol monododecyl et  179948  003055-96-7  59
      her
      Octaethylene glycol                   161142  1000289-34-2  58
      1,4,7,10,13,16-Hexaoxacyclooctadec  100940  017455-13-9  53
      ane

```

Se muestra el análisis realizado con un cromatografo marca agilent modelo 6850 para el análisis del extracto de *T.spathacea*

Figura 24. Resultado de Dragendorf para evaluar la presencia de alcaloides de *S.trifasciata*



En la imagen se muestra un precipitado naranja/marrón el cual indica la presencia positiva de alcaloides. La prueba se realizó para la extracción básica fase acuosa de la planta *S. trifasciata*.

Cuadro 13. Porcentaje de inhibición en el efecto hemolítico del veneno de *A. mexicanus* según cada tratamiento realizado

| Tratamiento | Inhibición (%) |
|-------------------------------|----------------|
| <i>Veneno</i> | 0 |
| <i>Antiofidico</i> | 66.7 |
| <i>Sanseveira trifasciata</i> | 80 |
| <i>Tradescantia spathacea</i> | 55.6 |

Se muestra el porcentaje de inhibición en el efecto hemolítico según cada tratamiento inhibitorio realizado, se puede ver que los alcaloides de *S. trifasciata* son los que más inhibición lograron.

Receta reactivo de Dragendorf

Para el ensayo de Dragendorff se prepararon los siguientes reactivos :

Se disolvieron 0.8 g de nitrato de bismuto pentahidratado en 40 mL de agua con 10 mL de ácido acético glacial

Se disolvió 8 g de ioduro de potasio en 20 mL de agua destilada.

Finalmente mezclar ambas soluciones para obtener el reactivo de Dragendorff

(Marcano and Hasegawa, 2002)

D. Manejo de riesgos

Cuadro 14. Manejo de material biológico y como manejar un laboratorio según cada riesgo

| No | Riesgo o ruta de transmisión | Practica | Barrera primaria y equipo de seguridad | Facilidades (barreras secundarias) |
|----|--|---|---|--|
| 1 | Agentes que causan enfermedades en humanos | Poseer estándares para el cuidado y mantenimiento de animales | Se requieren las normas de cuidado normales (bata, guantes, lentes) necesarias para el cuidado de ambas especies | Cuidado de animales estándar : no recirculación de aire, flujo de aire directo ideal, lavado de manos antes de manipular al animal. |
| 2 | Agentes asociados con enfermedades humanas, heridas percutáneas, ingestión y exposición de membranas mucosas | <ol style="list-style-type: none"> 1. Acceso restringido 2. Letreros de peligro biológico 3. Descontaminación de todo material que tenga contacto. | <p>Se necesita equipo para descontaminación (etanol, cloro, etc)</p> <p>Se necesita guantes, mascarilla, bata, lentes</p> | Necesidad de autoclave Lavado de manos constante |
| 3 | Agentes con potencial de causar enfermedades letales; potencial por transmisión de aerosoles | El laboratorio posee acceso controlado en todo momento, descontaminación de ropa después de entrar al laboratorio y desinfección de todo lo que lo necesite. | Se requiere de equipo para descontaminación y se necesita protección de sistema respiratorio. | Se necesita una separación entre el laboratorio y el exterior. Doble puerta necesaria, ropa especial, ventanas selladas, autoclave disponible. |

(CDC, 2009)

Cuadro 15. Toxicidad y propiedades físico-químicas de los reactivos más utilizado

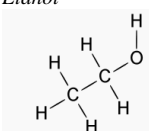
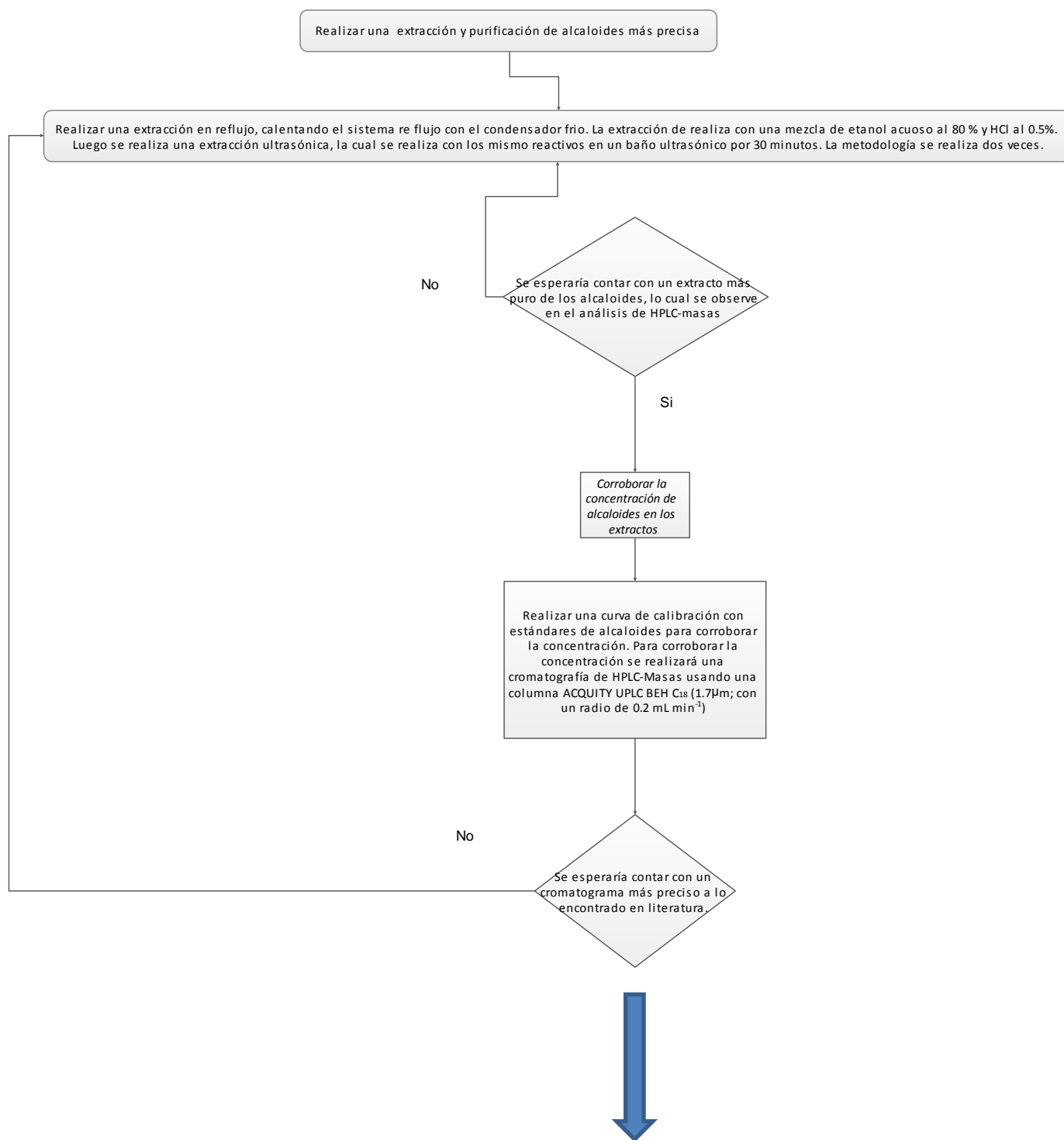
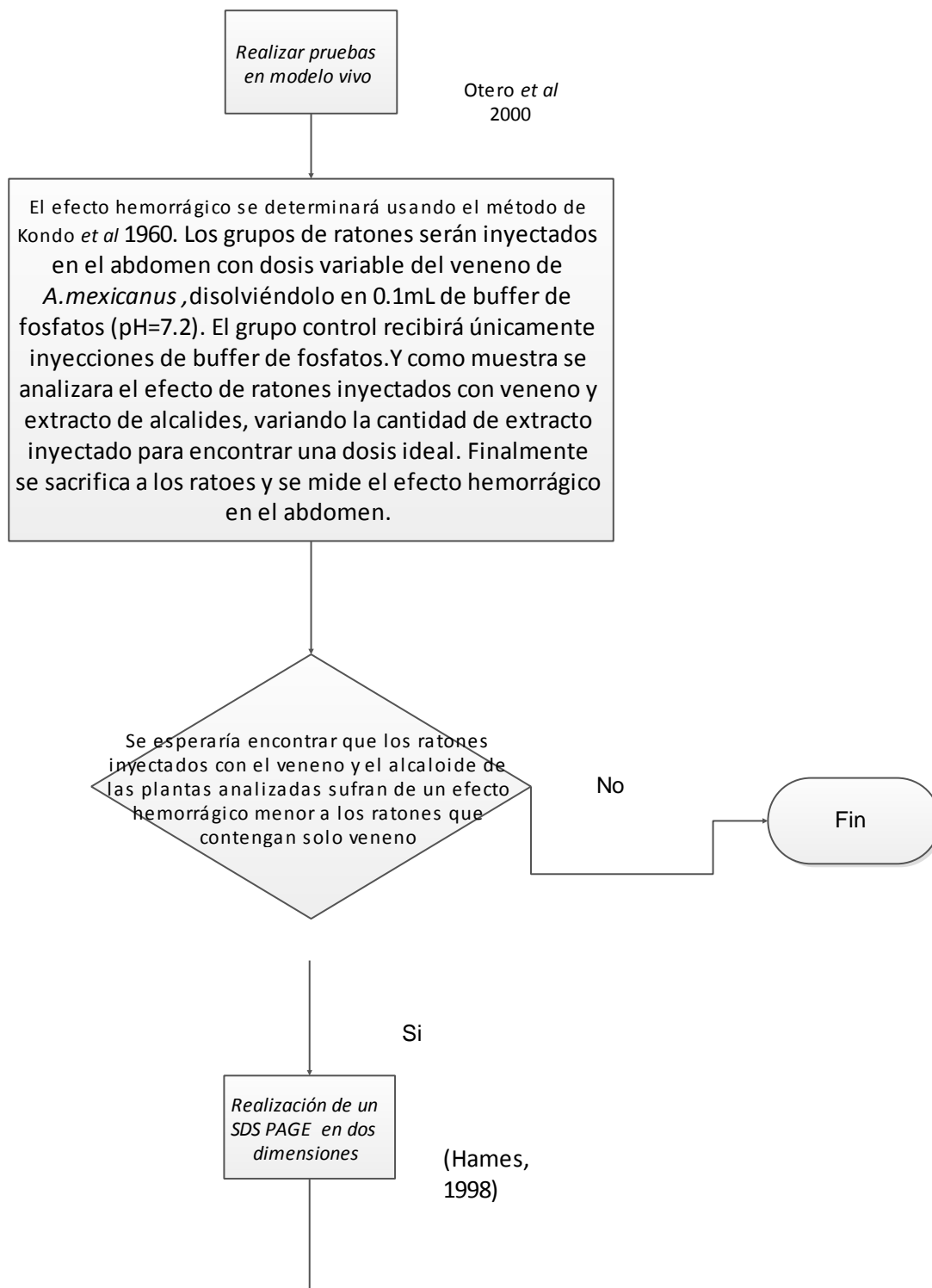
| Nombre | Fórmula | P.M. (g/mol) | P.F. °C | P. Eb °C | Solub | Densidad (g/mL) | Apariencia | toxicidad | Que hacer | Desecho |
|---|--|--------------------------------|---------|-------------|---|--------------------|---|---|---|---|
| <i>Acrilamida</i> | C ₃ H ₅ NO/CH ₂ CHCON H ₂ | 71.8 | 84.5 | 300 | Agua | 1.04 | Sólido blanco | Excesivamente tóxico si está en polvo. Puede absorberse por la piel. Neurotóxico. | Llevar a emergencia inmediatamente. | Si esta polimerizada se desecha en el basurero. De lo contrario descarte orgánicos, especiales. |
| <i>Bisacrilamida</i> | C ₇ H ₁₀ N ₂ O ₂ | | N/S | N/S | Agua | 1.2 | Sólido blanco | Tóxico si se ingere, nocivo si se inhala, irritante por contacto | Llevar al médico. | Orgánico especial |
| <i>SDS</i> | C ₂ H ₅ Cl | 64,52 | -138 | 12,3 | Leve en agua por hidrólisis lenta | | Líquido incolore. | Inflamable. Tóxico por ingestión. Irritante por inhalación. | Lavar área afectada. No inducir vómito. | Orgánico |
| <i>agua</i> | H ₂ O | 18.014 8 | 0 | 100 | | 1 | liquido | nula | nula | lavado |
| <i>Acido acético glacial</i> | C₂H₄O₂ | 60.05 g/mol | 17 | 118 | orgánico | 1.049 | liquido | Dolor de garganta, vomito, dificultad respiratoria, irritación | Lavar con agua, llevar a un lugar ventilado. | Orgánico |
| <i>Hidróxido de sodio</i> | NaOH | 54.49 | 48.72 | - 17.14 | Agua | | Sólido blanco | irritante | neutralizar | acuoso |
| <i>Eter dietílico</i> | C ₄ H ₁₀ O | 74.12 | 34.6 | -116.3 | 0.71 | Orgánico | Xing: No afecta. Xinh: Irritación en la nariz. Xabs: No tiene efecto. | Frasco de desechos. | | |
| <i>Ácido sulfurico</i> | H ₂ SO ₄ | 98.08 | 10 | 337 | Acuoso | 1.8 | liquido | Altamente toxico Corrosivo irritante | Especial | |
| <i>Etanol</i> | C₂H₆O | 46.07 | -114 | 78 | orgánico | 0.789 | liquido | Envenenamiento alcohólica, dermatitis, irritación | Llamar emergencia | orgánico |
|  | | | | | | | | | | |
| <i>Cloroformo</i> | CHCl ₃ | 119.38 | -64 | 61 | orgánico | 1.483 | liquido | Irritante y nocivo | Llevar a un lugar ventilado | orgánico |

Figura 25. Diseño experimental para continuación futura del análisis de inhibición de los alcaloides de *S.trifasciata* sobre el efecto hemolítico del veneno de *A.mexicanus*





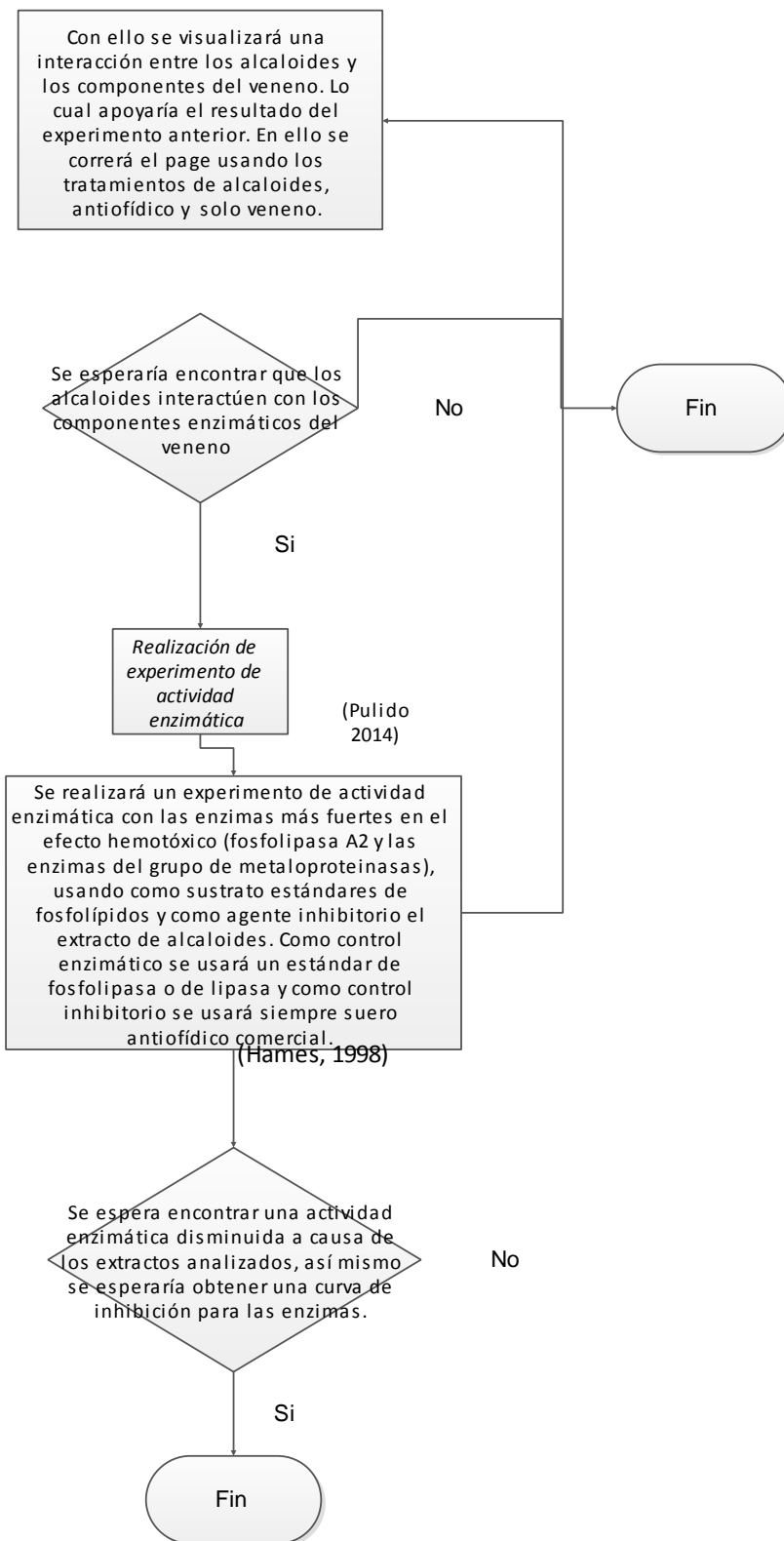
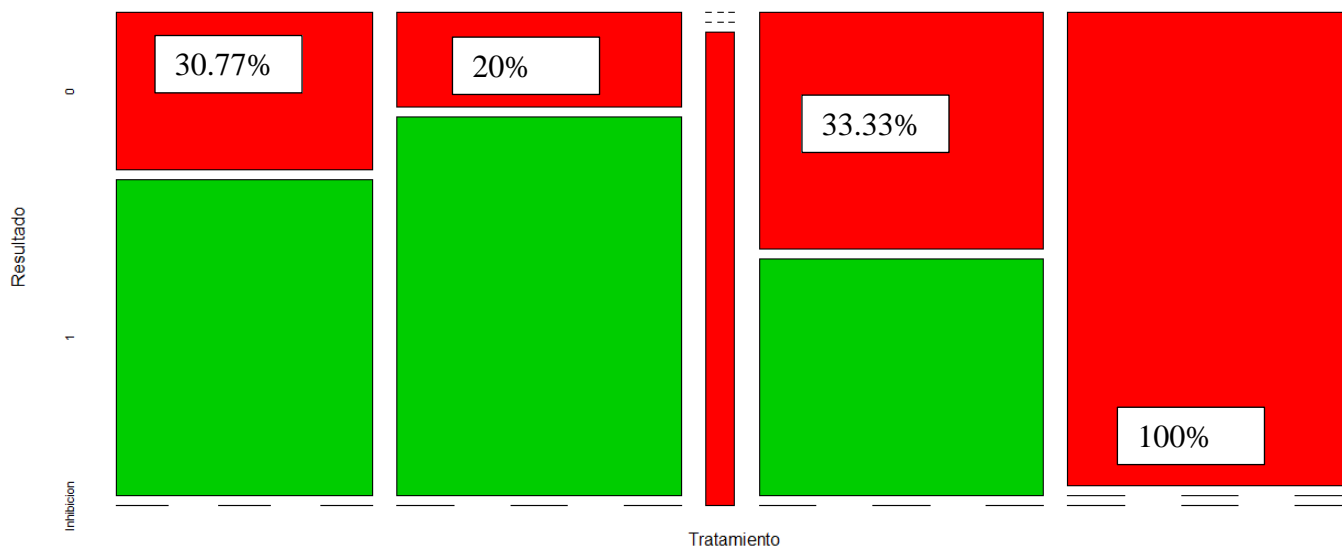


Figura 26 Gráfico de barras para evaluar el porcentaje de inhibición en el efecto hemolítico del

T. spathacea *S. sanseveira* *Antiofídico comercial* Veneno crudo
 veneno de *A. mexicanus* mediante cada tratamiento realizado.



En la imagen los datos ubicados en el “0”, color rojo, indica la población de eritrocitos que sufrieron de lisis, los datos ubicados en el “1”, color verde, indica la población de eritrocitos que no fueron lisados. La columna número 1 indica el tratamiento con *Tradescantia spathacea*, la columna número 2” indica el tratamiento con *Sanseveira trifasciata*, la columna de veneno es el tratamiento de lisis positiva (solo veneno) y la columna de antiofídico indica el tratamiento con el antiofídico comercial. Los datos se obtuvieron al realizar 5 réplicas de 16 mediciones en los bioensayos de espectrofotometría. Los porcentajes indican la lisis de los eritrocitos para cada tratamiento. Para los tratamientos de alcaloides se utilizó la fase acuosa en la extracción básica.