

PLANTAS COMO ANTIVENENO:
DEL MITO AL LOGOS

Ana María Torres • Francisco Camargo
Bárbara Verónica Ricciardi Verrastro
Gabriela Ricciardi • Eduardo Dellacassa

PLANTAS COMO ANTIVENENO:
DEL MITO AL LOGOS



La publicación de este libro fue realizada con el apoyo de la Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC) de la Universidad de la República.

Los libros publicados en la presente colección han sido evaluados por académicos de reconocida trayectoria, en las temáticas respectivas.

La Subcomisión de Apoyo a Publicaciones de la CSIC, integrada por Alejandra López, Luis Bértola, Carlos Demasi, Fernando Miranda y Andrés Mazzini ha sido la encargada de recomendar los evaluadores para la convocatoria 2014.

© Los autores, 2014

© Universidad de la República, 2015

Ediciones Universitarias,
Unidad de Comunicación de la Universidad de la República (UCUR)

18 de Julio 1824 (Facultad de Derecho, subsuelo Eduardo Acevedo)

Montevideo, CP 11200, Uruguay

Tels.: (+598) 2408 5714 - (+598) 2408 2906

Telefax: (+598) 2409 7720

Correo electrónico: <infoed@edic.edu.uy>

<www.universidad.edu.uy/bibliotecas/dpto_publicaciones.htm>

ISBN: 978-9974-0-1279-0

CONTENIDO

PRESENTACIÓN DE LA COLECCIÓN BIBLIOTECA PLURAL.....	7
INTRODUCCIÓN.....	11
VÍBORAS VENENOSAS. ACCIDENTE OFÍDICO.....	15
Víboras venenosas	15
El antiveneno o suero antiofídico.....	26
Primeros auxilios	30
ESTADO DEL CONOCIMIENTO SOBRE PLANTAS ALEXITÉRICAS.....	31
ACTIVIDAD ALEXITÉRICA DE PLANTAS AUTÓCTONAS.....	53
Estudios <i>in vivo</i> : Inhibición de la actividad letal.....	62
Conclusiones generales.....	63
ANEXO.....	65
Metodología de trabajo.....	65
Evaluación de la significación de resultados.....	83
BIBLIOGRAFÍA.....	87

Presentación de la Colección Biblioteca Plural

La Universidad de la República (Udelar) es una institución compleja, que ha tenido un gran crecimiento y cambios profundos en las últimas décadas. En su seno no hay asuntos aislados ni independientes: su rico entramado obliga a verla como un todo en equilibrio.

La necesidad de cambios que se reclaman y nos reclamamos permanentemente no puede negar ni puede prescindir de los muchos aspectos positivos que por su historia, su accionar y sus resultados, la Udelar tiene a nivel nacional, regional e internacional. Esos logros son de orden institucional, ético, compromiso social, académico y es, justamente a partir de ellos y de la inteligencia y voluntad de los universitarios que se debe impulsar la transformación.

La Udelar es hoy una institución de gran tamaño (presupuesto anual de más de cuatrocientos millones de dólares, cien mil estudiantes, cerca de diez mil puestos docentes, cerca de cinco mil egresados por año) y en extremo heterogénea. No es posible adjudicar debilidades y fortalezas a sus servicios académicos por igual.

En las últimas décadas se han dado cambios muy importantes: nuevas facultades y carreras, multiplicación de los posgrados y formaciones terciarias, un desarrollo impetuoso fuera del área metropolitana, un desarrollo importante de la investigación y de los vínculos de la extensión con la enseñanza, proyectos muy variados y exitosos con diversos organismos públicos, participación activa en las formas existentes de coordinación con el resto del sistema educativo. Es natural que en una institución tan grande y compleja se generen visiones contrapuestas y sea vista por muchos como una estructura que es renuente a los cambios y que, por tanto, cambia muy poco.

Por ello es necesario

- a. Generar condiciones para incrementar la confianza en la seriedad y las virtudes de la institución, en particular mediante el firme apoyo a la creación de conocimiento avanzado y la enseñanza de calidad y la plena autonomía de los poderes políticos.
- b. Tomar en cuenta las necesidades sociales y productivas al concebir las formaciones terciarias y superiores y buscar para ellas soluciones superadoras que reconozcan que la Udelar no es ni debe ser la única institución a cargo de ellas.
- c. Buscar nuevas formas de participación democrática, del irrestricto ejercicio de la crítica y la autocrítica y del libre funcionamiento gremial.

El anterior Rector, Rodrigo Arocena, en la presentación de esta colección, incluyó las siguientes palabras que comparto enteramente y que complementan adecuadamente esta presentación de la colección Biblioteca Plural de la

Comisión Sectorial de Investigación Científica (csic), en la que se publican trabajos de muy diversa índole y finalidades:

La Universidad de la República promueve la investigación en el conjunto de las tecnologías, las ciencias, las humanidades y las artes. Contribuye, así, a la creación de cultura; esta se manifiesta en la vocación por conocer, hacer y expresarse de maneras nuevas y variadas, cultivando a la vez la originalidad, la tenacidad y el respeto por la diversidad; ello caracteriza a la investigación —a la mejor investigación— que es, pues, una de la grandes manifestaciones de la creatividad humana.

Investigación de creciente calidad en todos los campos, ligada a la expansión de la cultura, la mejora de la enseñanza y el uso socialmente útil del conocimiento: todo ello exige pluralismo. Bien escogido está el título de la colección a la que este libro hace su aporte.

Roberto Markarian

Rector de la Universidad de la República

Mayo, 2015

In memoriam al profesor Armando I. A. Ricciardi

*El profesor A. Ricciardi fue un académico
cuya trayectoria ha sido, y es, reconocida
en su país (Argentina) y a nivel internacional
por su capacidad como investigador
en el área de la química de los productos naturales
y sus aplicaciones. Un campo en el que hizo
importantes contribuciones reflejadas
en sus publicaciones y su reconocida capacidad
como docente.*

*Quienes hemos tenido la oportunidad de conocerlo
nos sentimos afortunados y honrados
de haber podido colaborar
con el profesor A. Ricciardi pero, sobre todo,
de haber tenido la suerte de disfrutar
de su amistad, vivir buenos momentos y al mismo
tiempo verificar su rigor científico
y gran capacidad intelectual.*

Introducción

El estudio de las plantas medicinales se remonta al principio de la evolución del hombre sobre la Tierra, siendo la fitoterapia considerada como la medicina más ancestral por excelencia. Son numerosas las observaciones del empleo de plantas por los animales, por ejemplo las comadrejas cuando deben enfrentarse a una serpiente suelen envolverse en hojas de llantén, y las águilas andinas cuando son picadas frotran sus partes heridas sobre la planta *Mikania guaco* con propiedades antiofídicas. Se puede destacar entre otros hechos, lo sucedido con el conquistador Diego Rojas que fue herido por los indígenas con una flecha envenenada y observándolos encontró el antídoto en el zumo de *Dorstenia brasiliensis*, contrayerba.

Al conocimiento de los productos naturales vegetales se vincula el interés en la diversidad biológica, la preservación de las especies autóctonas, la posibilidad de lograr especies, variedades, híbridos o clones con rendimiento elevado estable mediante bioingeniería, el aseguramiento de la calidad, la producción de materias primas vegetales por cultivos controlados, alternativas de producción diversificada a regiones aptas, el menor costo de los fitoterápicos con respecto a los fármacos de síntesis, aceptación de la medicina tradicional en poblaciones en las que la fitoterapia es la base de toda terapia, etc. Es decir, un problema científico de interés botánico, fitoquímico, quimiotaxonomico, pero también económico (Ricciardi, 2000).

En Sudamérica, se cuenta con una extensa tradición en el empleo de plantas medicinales, que se remonta a la época de los indígenas, conocimiento que nos transmitieran los cronistas españoles y jesuitas de la época de la colonia y se publicaran como: *Materia Médica Misionera* (1945) de autoría atribuida al Hno. Pedro de Montenegro, S.J.; *De Natura Novi Orbis* (1588) de José de Acosta; *Descripcion chorographica del Terreno Rios, arboles y animales de las dilatadissimas Provincias del Gran Chaco, Gualamba, y de los Ritos y costumbres de las innumerables naciones barbaros e infideles que le habitan. Con una cabal Relacion Historica de lo que en ellos han obrado para conquistarlas algunos Gobernadores y Ministros Reales, y los Misioneros Jesuitas para reducirlos a la fe del Verdadero Dios* (1733) del padre Pedro Lozano de la Compañía de Jesús; *Historia de Abiponibus, equestris bellicos aque Paraquariae natione* (1783-1784) de Martín Dobrizhoffer, obra traducida al castellano en 1967 como *Historia de Abiponibus* por la Clara Vedoya de Guillén y editado por la Facultad de Humanidades de la U.N.N.E. (trad.); *Hacia allá y para acá. Una estada entre los indios mocobíes* (1749-1767), de Florián Paucke; *Saggio sulla storia naturale della provincia del Gran Chaco e sulle pratiche, e su' costumi dei popoli che l'abitano* (1789) de José Jolis, traducida y editada con el título de *Ensayo sobre la Historia natural del Gran Chaco* en 1972; *Historia de la conquista del Paraguay, Río de la Plata y Tucumán* (1882) de José Guevara; *Paraguay Natural* (1767) de José Sánchez Labrador; *Descripción historia y geografía de la*

ciudad de San Juan de Vera de las siete Corrientes, sus términos y jurisdicción (1759) de Bernardino López de Luján.

Obras más recientes como las de Félix de Azara y Amado Bonpland *Diario botánico* (1849); Pedro Iturralde *Erbe medicinali del Chaco* (1925); Martínez Crovetto *Uso de plantas medicinales por las etnias indígenas*; Chifa y Ricciardi relevamiento publicado en 2000 por la fundación Miguel Lillo, *Miscelánea 117* que proveen un cúmulo de información de gran interés, debido a la posibilidad de validación de esas propiedades y el empleo de plantas, en condiciones de calidad y contenido en principios activos controlados y certificados o como fuente de nuevos fármacos y sin efectos colaterales indeseables (Ricciardi, 2005; Ricciardi, 2010b).

En 1998, los editores del *New England Journal of Medicine* declararon «es tiempo que la comunidad científica detenga el libre andar de la medicina alternativa». En respuesta a esto, en la actualidad, las principales firmas farmacéuticas del mundo estudian, investigan y desarrollan medicamentos provenientes del reino vegetal, ya sea a través de la planta entera, del aislamiento de sus principios activos o a través de hemisíntesis química a partir del principio vegetal. Existen en el mundo 25 000 especies vegetales utilizadas como medicinales y, según la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 1994, casi el 80% de la población mundial depende de ellas para la atención primaria de su salud (Alonso, 2008; Duke *et al.*, 2009; Cañigüeral *et al.*, 2003). Existen dos realidades muy disímiles: el uso muy arraigado de plantas medicinales en las poblaciones rurales (por inexistencia o falta de acceso a la asistencia sanitaria) y el uso en las grandes ciudades donde es una alternativa más (Cañigüeral *et al.*, 2003).

Con respecto a las especies autóctonas, sería necesario primero generar la demanda, ya que se trata de productos regionales desconocidos en otros ámbitos (Cañigüeral *et al.*, 2003; Duke *et al.*, 2009). Se debe, por lo tanto, estudiar sistemáticamente las plantas, encarándolo de manera multidisciplinar para que con el aporte de cada disciplina se puedan obtener fármacos o drogas novedosas de importancia para el hombre (Alonso, 2008; Rates, 2001; Zhang y Demain, 2005). Por otra parte, el empleo de plantas medicinales no está exento de riesgos; debe ser descripto el perfil fitoquímico, farmacológico, farmacognóstico y toxicológico de las especies con rigurosidad científica; debe tenerse en cuenta la posibilidad de variaciones fitoquímicas, fenológicas o ecológicas que puedan alterar la actividad específica y controlarse el riesgo de contaminaciones (Lopez y Pérez, 2009; Mukherjee, 2009).

Este trabajo se orienta al estudio de la tradición de empleo de plantas para tratar las intoxicaciones por acción de venenos de víboras (actividad alexitérica) que se ha mantenido entre las distintas etnias aborígenes y llega hasta nuestros días. Hoy se encuentran en bancos de datos publicaciones y trabajos reconocidos internacionalmente información que sustenta la interacción entre plantas, sus extractos o componentes y venenos animales, reconociendo así las propiedades atribuidas en la tradición vernácula.

Todas, o la gran mayoría de estas publicaciones, están referidas a plantas y serpientes de otras regiones o países pero no se encuentran referencias científicas, excepto las publicadas por nuestro grupo de investigación, acerca de la inhibición o neutralización de la toxicidad de venenos de serpientes de nuestra región, por plantas autóctonas.

En Uruguay cerca del 100% de los accidentes tienen como agente causal al género *Bothrops* y en Argentina el 97%, de este el 80% corresponde a la especie *Bothrops diporus* (Achaval *et al.*, 1993; Achaval, 1997; Fagundez y Carreira, 2000; Meneghel *et al.*, 2001; Achaval y Olmos, 2003; Carreira *et al.*, 2005; <<http://www.infecto.edu.uy/revisiointemas/tema11/ofidiotema.htm>>).

Hasta el momento, el único tratamiento médico posible ante un accidente ofídico es la administración de suero antiveneno heterólogo obtenido por inmunización en caballos, lo cual no está exento de riesgos (*shock* anafiláctico, hipertermia, enfermedad del suero, etc.), necesita condiciones de mantenimiento, administración por parte de personal idóneo, etc. (Pino Cheroni, 1994; Morais, 2012). Por otra parte hay tener en cuenta que dicho antiveneno tiene baja efectividad sobre las acciones locales producidas por el veneno inmediatamente luego de la picadura (dolor, edema, hemorragia local y necrosis).

Si se tiene en cuenta que los accidentes por picaduras de víboras son un grave problema de Salud Pública, con mayor incidencia en zonas rurales donde buena parte de la población frecuentemente se encuentra alejada de centros asistenciales, es evidente el interés en el estudio de las plantas alexíteras, ya que podrían ser utilizadas como recurso terapéutico para neutralizar el veneno o simplemente paliar los síntomas locales de envenenamiento (dolor, sangrado, inflamación e infección).

Los extractos de plantas representan una fuente extremadamente rica en compuestos farmacológicamente activos, y los metabolitos secundarios aislados (fenoles, flavonoides, alcaloides, esteroides, etc.), podrían ser importantes en el desarrollo de nuevas terapéuticas, nuevas drogas sintéticas, etc. Por lo tanto, las especies vegetales pueden ser beneficiosas para el tratamiento de los accidentes ofídicos. Es fácil advertir las implicancias favorables que tiene el desarrollo de un trabajo de este tipo, si se considera las reacciones adversas que puede producir el tratamiento habitual, entendiéndose que si se pudiera lograr un extracto vegetal de efectiva actividad, ello significaría un enorme avance en la seguridad inherente a esta terapéutica.

También es importante destacar que este trabajo está orientado a revalorizar el vasto conocimiento ancestral de las etnias que poblaron y pueblan nuestra región, con más de 400 años de uso avalado solo por la práctica, lo cual constituye un acto de justicia.

Víboras venenosas. Accidente ofídico

Víboras venenosas

Los venenos animales son secreciones producidas para emponzoñamiento de otras especies, mediante un mecanismo de transferencia activo o pasivo. Su composición sumamente compleja y la toxicidad varían con la especie, edad y tamaño del individuo, hábitat y factores ecológicos, alimentación, exposición a xenobióticos, estado de depleción de las glándulas, estado sanitario de los colmillos y la existencia de variedades inmunológicas.

A su vez, se denomina ofidismo al emponzoñamiento como consecuencia de la mordedura de serpientes con inyección de veneno, accidente que pueden llevar a la muerte de la persona. En Sudamérica, pueden presentarse accidentes: botrópico (yaraaés); crotálico (cascabeles) y elapídico (corales). No todas las veces que un ofidio muerde, inyecta veneno (mordedura blanca o seca), en este caso solo puede ser causa de una infección más o menos grave o de tétanos, pero no de emponzoñamiento (Ricciardi *et al.*, 2010).

La gravedad del cuadro clínico depende no solo del animal agresor, sino también del agredido: edad, peso, estado de salud, parte del cuerpo donde se produjo la picadura (accidentes más graves en inyecciones sobre vasos sanguíneos), profundidad de la mordedura, susceptibilidad individual, etc. (Ricciardi, 1999).

La incidencia de picaduras en las distintas regiones del mundo podría resumirse en el siguiente cuadro, pudiéndose observar el elevado índice en América Latina (López Sáez *et al.*, 2009; Chippaux y Goyffon, 2000).

Región	Población x 10 ⁸	n.º mordeduras	n.º envenenamientos	n.º muertes
Europa	700	25.000	8.000	30
Próximo Oriente	160	20.000	15.000	100
América del Norte	270	45.000	6.500	15
América Latina	400	300.000	150.000	5.000
África	750	1.000.000	500.000	20.000
Asia	3.000	4.000.000	2.000.000	100.000
Oceanía	20	10.000	3.000	200
Total	5.300	5.400.000	2.682.500	125.345

Los accidentes ofídicos revisten una enorme importancia desde el punto de vista socio-sanitario. Esto es así debido a la coexistencia de una serie de factores, entre los que se destacan:

1. El gran número de casos que se reportan anualmente.
2. La complejidad del cuadro clínico derivado de la acción directa del veneno ofídico.
3. Las importantes e invalidantes secuelas físicas que se presentan a corto, mediano y largo plazo sobre la población afectada.

Este estado de situación condiciona la aparición de una doble amenaza sobre la economía de un país o región ya que afecta muy especialmente a la población rural económicamente activa y, a su vez, genera una importante y creciente presión sobre los recursos materiales y humanos del sistema sanitario, sea público o privado, para abordar integral y adecuadamente la compleja situación que implica el tratamiento médico de este tipo de casos (Gutiérrez *et al.*, 2006).

Teniendo en cuenta la frecuencia de accidentes de algunos países de América Latina: Brasil: 20 000 casos/año; Argentina: 2000 casos/año; Uruguay: 60-70 casos/año nos podemos dar una idea de la importancia sanitaria de ellos.

En Argentina, las especies venenosas que pueden encontrarse son, según la clasificación de Hoge y Romano (1972):

1. Familia *Viperidae* (dientes solenoglifos (*sole*: tubo, conducto)); Subfamilia *Crotalinae* (víboras de foseta: yararáes, sururucucú, cascabeles, mocasines, habu, etc.); género y especies:
 - *Bothrops alternatus*, yarará, víbora de la cruz, crucera.
 - *B. newwiedi diporus*, yarará chica (Ha sufrido cambios de denominación: *Bothrops diporus* (Wüster *et al.*, 2002), *Bothropoides diporus* (Fenwick *et al.*, 2009), y actualmente *Bothrops diporus* (Carrasco *et al.*, 2012).
 - *B. ammodytoides*, yarará ñata.
 - *B. atrox*, fer de lance, quemadora.
 - *B. cotiara*, yarará de vientre negro.
 - *B. jararacá*, jararacá.
 - *B. jararacussu*, yarará negra.
 - *B. moojeni*, caicaca.
 - *Crotalus durissus terrificus*, cascabel.

Figura 1



Fuente: Torres, 2011b

2. Familia *Elapidae* (con dientes proteroglifos (proteros: primeros, gli-fos: ranuras); Subfamilia *Elapinae* (víboras que habitan en bosques o desiertos, de vida reservada, subterránea, terrestre, arbórea o acuática, hábito diurno o nocturno; son las corales, cobras, cobras escupidoras, búngaros, kraits, taipán); género y especies de las corales de la región nordeste argentina:
 - *Micrurus corallinus*.
 - *M. frontalis altirostris*.
 - *M. frontalis mesopotamicus*.
 - *M. pyrrhocryptus*.

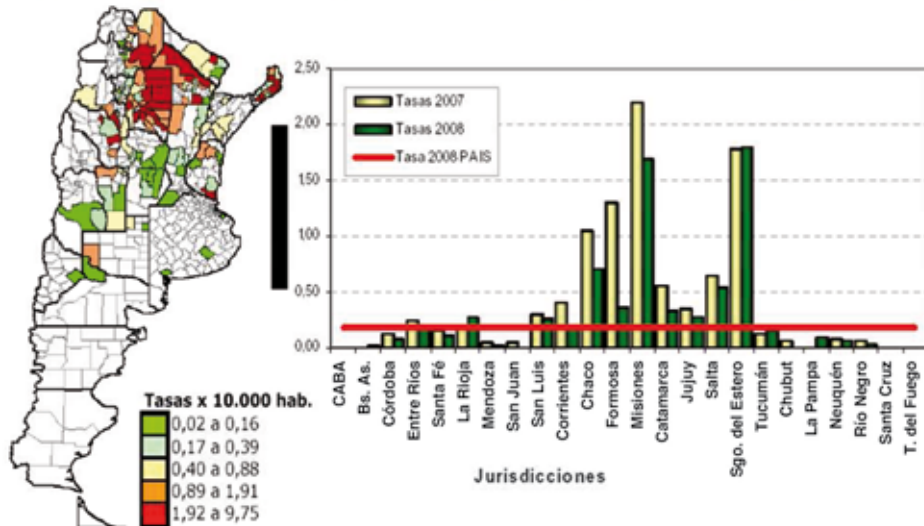
Figura 2



Fuente: Torres, 2011b

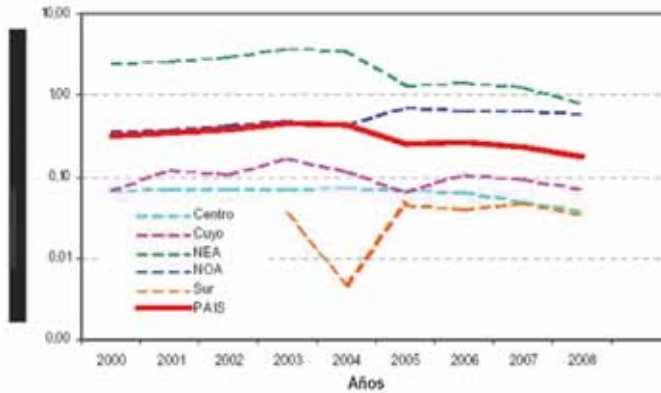
Según el boletín epidemiológico (BEP) del 2009, si tenemos en cuenta las provincias y la tasa país, se puede observar que la zona nordeste se encuentra por encima de la tasa país:

Gráfico 1. Tasas de notificación de casos de ofidismo por 10.000 habitantes según departamentos - mapa 2008 - y jurisdicciones de Argentina en los años 2007 y 2008



Fuente: Dirección de epidemiología. Ministerio de salud de la nación

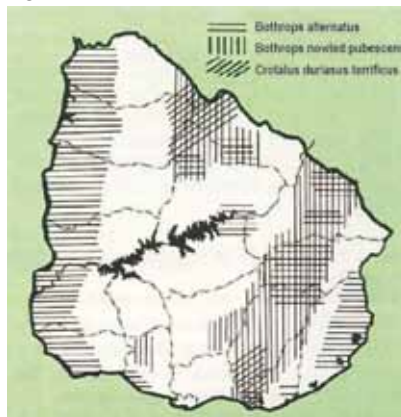
Gráfico 2. Evolución de las tasas de notificación de casos de ofidismo según regiones por 10.000 habitantes en escala logarítmica. Argentina, período 2000-2008



Fuente: Dirección de epidemiología. Ministerio de salud de la nación

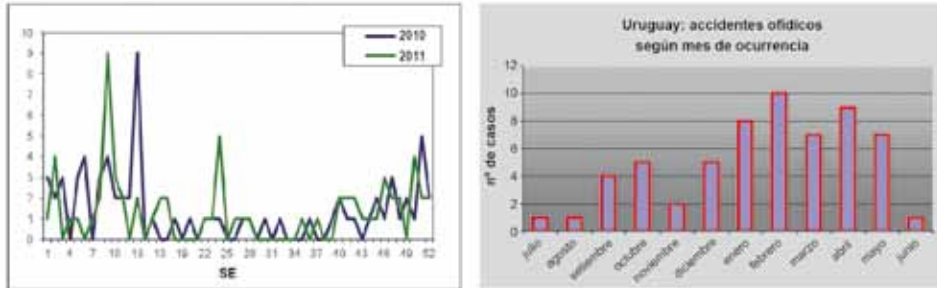
En Uruguay, las especies venenosas que pueden encontrarse son: *Bothrops alternatus*, crucera; *Bothrops pubescens*, yara; *Crótalus durissus terrificus*, cascabel y *Micrurus altirostris*, coral (BEP 2011).

Gráfico 3. Distribución geográfica de *B. alternatus*, *B. pubescens*; *C. durissus terrificus*



Fuente: Departamento de Parasitología y Micología. Udelar
 <<http://www.higiene.edu.uy/parasito/teoo9/ofid.pdf>>

Gráfico 4. La distribución de casos notificados de accidentes por ofidio según semanas epidemiológicas en 2010 y 2011



Fuente: <<http://www.higiene.edu.uy/parasito/teo09/ofid.pdf>>

En referencia a la distribución geográfica, a la fecha del informe, el 20% de las notificaciones de mordidos por ofidios corresponden al departamento de Tacuarembó, el 16% a Rivera y el 10% a Cerro Largo (Fuente: <http://www.msp.gub.uy/ucepidemiologia_4938_1.html>).

Los venenos de serpientes son mezclas de proteínas y componentes de bajo peso molecular como aminas biógenas, glucósidos, alcaloides, terpenoides, péptidos cardiotónicos y neurotóxicos, nucleósidos, iones metálicos, citratos (presentes en los vipéridos y elápidos), cuya principal función sería actuar como *buffers* o inhibidores endógenos selectivos de algunas enzimas del veneno, quelando iones metálicos bivalentes mediante la formación de complejos (Speroni, 1994; Tu, 1977).

No obstante, la mayor proporción del veneno son proteínas (95%) responsables de casi todos los síntomas fisiopatológicos que caracterizan el emponzoñamiento, entre las cuales tenemos:

Toxinas: son los compuestos más letales de los venenos y responsables de la muerte inmediata de la presa. Poseen un peso molecular generalmente menor a 30 kDa (miotoxinas, neurotoxinas, citotoxinas, etc.).

Proteínas no tóxicas pero activas farmacológicamente

Enzimas que intervienen en la digestión de las presas (hidrolasas, proteinasas, hialuronidasa, hemorraginas, etc.) (Ricciardi, 1999).

Los venenos producen además la liberación de diversas sustancias farmacológicamente activas capaces de producir alteraciones fisiológicas tan graves como las del mismo veneno, como por ejemplo histamina, bradiquinina, ácidos grasos no saturados (primariamente sobre el músculo liso), lisolecitina (altera la permeabilidad celular), compuestos que actúan sobre los mecanismos cardíacos de la conducción, etc.

Resulta interesante el hecho de que si bien los venenos tienen muchos componentes proteicos que podrían actuar como alérgenos provocando reacciones de hipersensibilidad, el número de reacciones de este tipo es muy bajo. En general,

las reacciones alérgicas violentas en los casos de ofidismo, al igual que reacciones retardadas como la enfermedad del suero, son provocadas por la administración de los sueros antiveneno, actualmente el tratamiento de referencia.

Con respecto al ofidio, el veneno es vital para su supervivencia puesto que le sirve para:

- procurar el alimento: inmoviliza a la presa para su captura. Produce la muerte rápida de la presa por paro respiratorio o cardíaco,
- iniciar la digestión del alimento,
- como elemento de defensa ante animales superiores e incluso el hombre.

Rosenfeld (1971) agrupa a los venenos en cinco tipos de acuerdo a su acción fisiopatológica:

- *venenos hemolíticos y neurotóxicos*, en los crótalos de América del Sur,
- *venenos neurotóxicos y hemolíticos*, principalmente en hidrófidos,
- *venenos neurotóxicos y proteolíticos*, en las najas,
- *venenos proteolíticos y coagulantes*, en los vipéridos: las yaras y crótalos de Norteamérica,
- *venenos neurotóxicos*, en las corales y los búngaros.

Nos enfocaremos particularmente en víboras del género *Bothrops*, yará (que en guaraní significa soberbia) ya que son las causantes de la mayor tasa de accidentes ofídicos: 100% de los accidentes en Uruguay (*B. alternatus* y *B. neuwiedi pubescens*) (BEP 2011, Dra. Araceli Pino Cheroni, Especialista Enfermedades Infectocontagiosas, Instituto de Higiene, Montevideo, Uruguay) y 97% en la Argentina (*B. alternatus* y *B. diporus*, específicamente el 80% debido a *B. diporus*) (BEP 2011). Los accidentes por especies de *B. neuwiedi pubescens* en Uruguay y *B. diporus* de Argentina poseen sintomatología general similar, dado que ambas pertenecen al Complejo *neuwiedi*.

El género *Bothrops*, es centro y sudamericano, con más de noventa especies de serpientes muy venenosas y agresivas, con cuerpo de complexión robusta, cubierto de pequeñas escamas lanceoladas y carenadas. El veneno posee acciones: *proteolítica* (debido a proteasas, fosfolipasas A, L-amino-oxidasa, hialuronidasa, nucleasa y factores liberadores de sustancias vasoactivas), *coagulante* (L-arginina-estearasa que transforma el fibrinógeno en fibrina) y *vasculotóxica* (metaloproteínas que actúan en los endotelios vasculares).

Dentro de las especies de *Bothrops* citadas en Argentina, *B. diporus* «yará chica» o «víbora cabeza de candado» es la especie que mayor número de accidentes ofídicos produce (80%) y posee un veneno mucho más activo (DL_{50} : 38,18 $\mu\text{g}/20\text{g}$ de ratón (Maruñak *et al.*, 2010) que la yará grande *B. alternatus* (DL_{50} : 55,86 $\mu\text{g}/20\text{g}$ de ratón, Acosta de Perez *et al.*, 1997). Según estudios realizados por Oliveira *et al.* (2002), en ejemplares sudamericanos la DL_{50} de *B. diporus* en ratón IV es de 26,6 $\mu\text{g}/20\text{g}$; IP 128,2 $\mu\text{g}/20\text{g}$; la dosis proteolítica mínima es de 0,27 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y la dosis citotóxica es de 14,4 \pm 4,26 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Figura 3. Características de la cabeza y cuerpo de *B. diporus*



Fuentes: Hoge e Romano, 1972 (izq.)

<<http://fotonat.org/showthread.php?bid=11&threadid=3953>> (der.)

El veneno de esta especie es una secreción viscosa, de color amarillo como consecuencia de la presencia de una flavoproteína, la L-aminoácido oxidasa (Ohler *et al.*, 2010). De 28 ejemplares provenientes de Chaco y Corrientes, con longitud promedio de 85 cm se extrajeron 213 mg de veneno por ejemplar (σ_{v-1} 0,057), y luego por desecación al vacío en el laboratorio, 42 mg de veneno promedio por ejemplar, con una relación peso seco/veneno de 19,7%. Estos valores permiten tener una idea de la cantidad de veneno que un ejemplar puede inyectar, pero deben tomarse solo como orientativos ya que no existe la seguridad de que en la extracción del veneno sea vaciada la totalidad de la glándula. Con respecto a la especie *B. alternatus*, posee mayor cantidad de veneno, extrayendo de 19 ejemplares con longitud promedio de 100 cm, 466,3 mg por ejemplar (σ_{v-1} 0,094), y por desecación 117 mg. Las enzimas presentes son muy estables si se conserva en estado de sequedad, pudiendo mantener su actividad por cuarenta años, en cambio en solución se deteriora rápidamente aun si se lo refrigera.

El veneno posee acción edematizante (DEM 2,05 $\mu\text{g}/\text{ratón}$); acción proteolítica (DPM 29,00 U/mg); actividad hemorrágica (DHM 1,5 $\mu\text{g}/\text{ratón}$); acción coagulante (DCM 0,56 μg con plasma ovino, 3,9 μg plasma bovino, 4,5 μg plasma equino y 0,4 μg plasma humano) y actividad miotóxica (White, 2005; Chippaux, JP, 2002; Acosta de Pérez *et al.*, 2000; Harvey, 1991; Chippaux *et al.*, 1991 Tu, 1997).

En lo referente a la composición proteica del veneno del género *Bothrops*, y tomando como referencia el trabajo de Öhler *et al.* (2010) para *Bothrops alternatus*, puede observarse que el mismo está compuesto por una tríada característica que, en conjunto, representa más del 70% de los constituyentes proteicos del veneno; a saber: metaloproteasas, serinoproteasas y fosfolipasas A_2 . Entre los componentes minoritarios del veneno se pueden mencionar: L-aminoácido oxidasa, desintegrinas, lectinas tipo-c, entre otros.

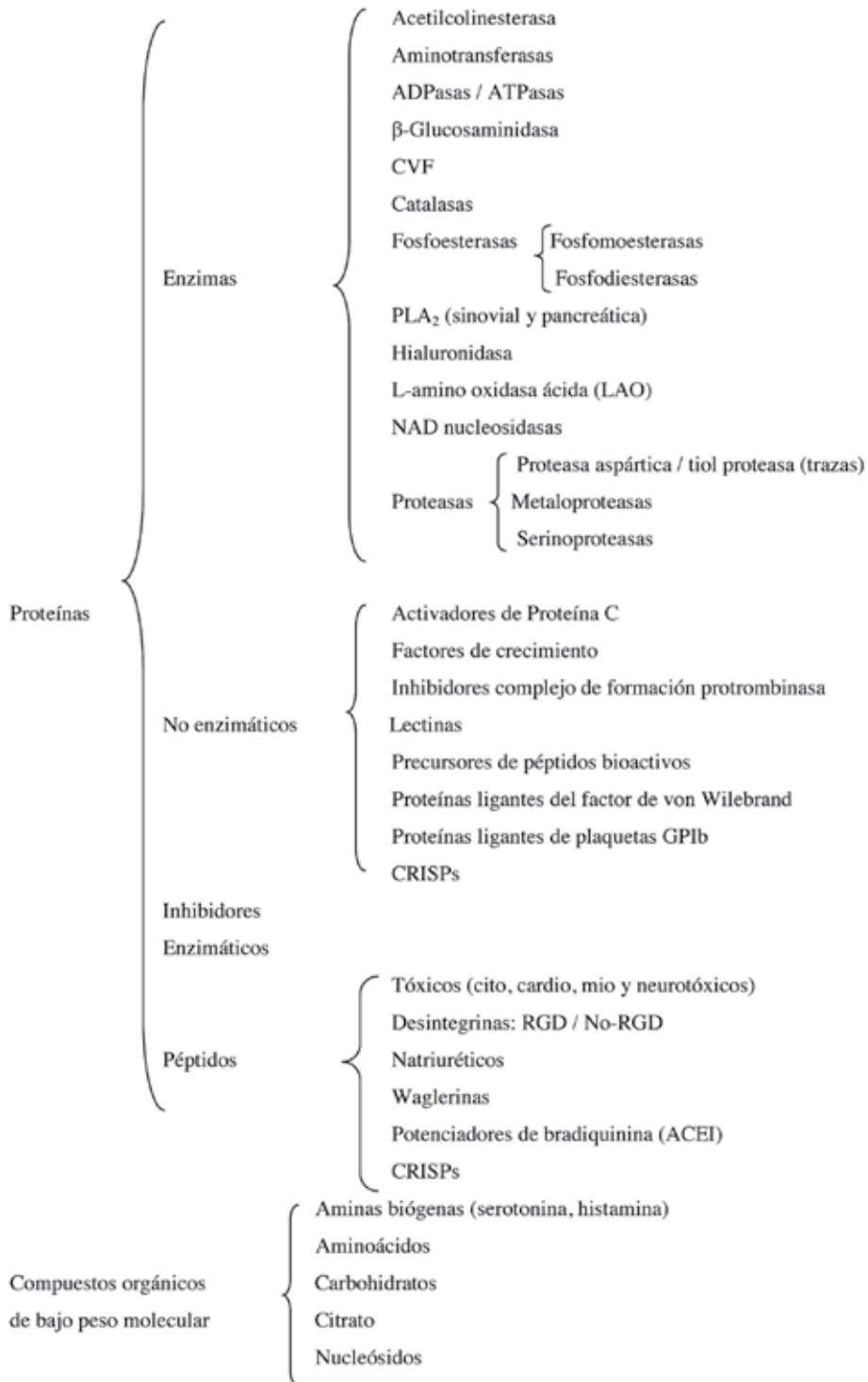
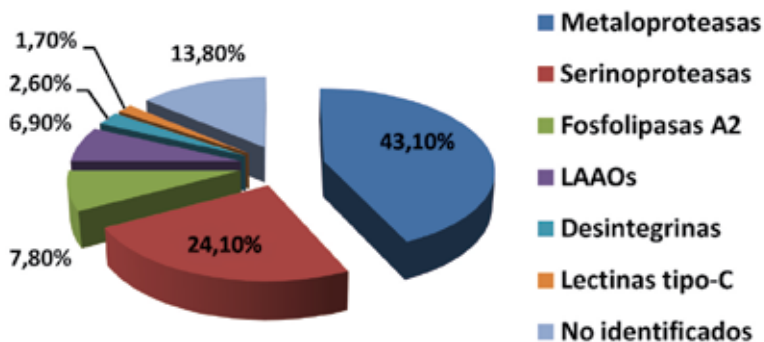




Gráfico 5. Composición del veneno de ofidios. ACE: enzima convertidora de angiotensina. CRISP: proteína secretora rica en cisteína. CVF: proteínas tipo factor veneno de cobra. PLA₂: fosfolipasa A₂



Composición proteica del veneno de *Bothrops alternatus*. LAAOs: L-aminoácido oxidasas.

Fuente: Ohler *et al.*, 2010

Las metaloproteasas son las toxinas más abundantes del veneno de *B. alternatus*, representando más del 50% de los componentes identificados del veneno en la región de 10-100 kDa. Estas toxinas son las responsables de los efectos hemorrágicos, del edema y de la mionecrosis que se asocian al accidente bothrópico. Asimismo, las metaloproteasas son capaces de activar la cascada de coagulación, actuando sobre los factores involucrados en la misma.

La elevada concentración de estas enzimas en el veneno ofídico pueden explicar los efectos hemorrágicos, locales y sistémicos, como así también los disturbios hemostáticos que se observan luego del envenenamiento.

Las serino similar-trombina proteinasas son proteinasas que constituyen el segundo gran grupo de toxinas presentes en el veneno de *Bothrops*. Ellas poseen actividad coagulante directa y fibrinolítica y son menos tóxicas que las metaloproteasas.

Las fosfolipasas A_2 constituyen un complejo grupo de enzimas, las cuales representan el tercer gran grupo de componentes que se encuentran invariablemente presentes en el veneno de ofidios del género *Bothrops*. Poseen la capacidad de hidrolizar fosfolípidos en la posición sn-2 de manera dependiente de ca (García Denegri *et al.*, 2010).

Se han detectado varias fosfolipasas en *b. diporus*, algunas de ellas son:

- Una miotoxina homóloga a una Fosfolipasa básica A_2 (Geoghegan *et al.*, 1999) cuyas variaciones geográficas en la composición, características bioquímicas y actividad biológica de las miotoxinas del veneno han sido examinadas también por Rodrigues *et al.* (1998).
- Las isoenzimas P-1 (~15 kDa, pI 4,8) y P-2 (~16,2 kDa, pI 4,6), fosfolipasas A_2 (PLA2) que inducen fuertemente la formación de edema (inhibido por la acción de histamina), pero muestran una toxicidad relativamente baja en inyección IP en ratones, como también baja actividad miotóxica, hemolítica, anticoagulante o de agregación plaquetaria.
- Una tercera isozima, P-3 (15 kDa, 14 aa) isoforma de fosfolipasa A_2 (EC 3.1.1.) de letalidad relativamente alta sobre ratón (>a 5 µg/g; por inyección IP) con actividad inductora de edema similar a las dos anteriores (Daniele *et al.*, 1995).

Cuando se considera la complejidad inherente a la composición del veneno ofídico, particularmente el que corresponde a los ejemplares de la Familia *Viperidae* (género *Bothrops*), se comprende claramente la complejidad de fenómenos y reacciones que tienen lugar una vez que el veneno entra en contacto con el tejido vivo. Ello explica, en gran medida, la aparición de fenómenos *hemorrágicos, proteolíticos y coagulantes*, tan característicamente ligados al accidente bothrópico. La importancia de este fenómeno adquiere su verdadera dimensión cuando se considera que el accidente provocado por ofidios del género *Bothrops* rara vez resulta fatal, condicionando sin embargo, en el individuo afectado, la aparición de secuelas a corto, mediano y largo plazo; lo cual lo convierte en un verdadero problema socio-sanitario para la economía y el sistema de salud de un país o región (Esteso, 1985).

Rosenfeld (1971) gradúa la gravedad del accidente en:

- *Benigno*: edema local discreto o ausente, tiempo de coagulación normal o no mayor a 15 minutos.
- *Medio*: edema local evidente, tiempo de coagulación mayor a 60 minutos con estado general conservado.
- *Grave*: edema local intenso, sangre incoagulable y estado general malo o con choque periférico.

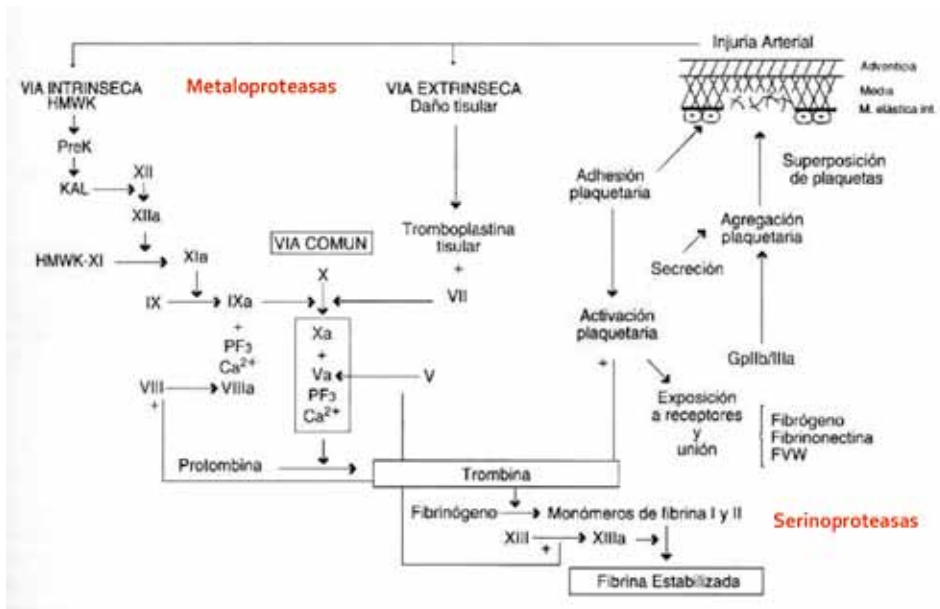
La medición del tiempo de coagulación permite, por lo tanto, distinguir si el accidente es bothrópico, si ha habido o no inyección del veneno, si la cantidad de antiveneno inyectada es suficiente y la gravedad del accidente.

Inmediatamente después de producida la inoculación del veneno ofídico se produce un fuerte dolor local con edema cianótico (aproximadamente 5 a 15

minutos después de ocurrida la inoculación del veneno). La sintomatología que se asocia con este tipo de accidentes es la misma, variando solo en intensidad según la gravedad del caso (lo cual depende fundamentalmente de la cantidad de veneno inoculada). El edema se extiende por el miembro afectado a razón de 5 a 20 cm por hora; en muy breve lapso aparece un intenso dolor al movilizar las articulaciones del mismo, con marcada cianosis, la cual se hace más evidente en virtud de la equimosis que acompaña la lesión. Durante la primera media hora del accidente tienen lugar fenómenos coagulantes, lo que se denomina *fase positiva* del accidente.

Transcurrido este período, tiene lugar la llamada fase negativa del accidente, donde predominan fenómenos hemorrágicos locales y a distancia, según la gravedad del cuadro en evolución. Los fenómenos proteolíticos tienen lugar en la fase positiva del accidente y, una vez desencadenados son irreversibles. Cuando el accidente bothrópico tiene varias horas de evolución, resulta frecuente la aparición de fenómenos tóxicos derivados del vuelco de cantidades variables de veneno al torrente circulatorio, o bien por el ingreso a él de detritos provenientes de las lesiones tisulares. En los casos más graves, existe gran compromiso sistémico, con gran afectación renal o cerebral que resultan prácticamente indistinguibles del accidente cerebrovascular clásico.

Figura 4. Cascada de coagulación. Las metaloproteasas inducen fenómenos pro-coagulantes actuando sobre factores de coagulación (vía intrínseca / extrínseca) Las serinoproteasas actúan sobre la transformación de fibrinógeno en fibrina



Fuente: < http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/cardiologia/v21n3/anticoagulaci%3b3n_en_la_angioplast.htm >.

El emponzoñamiento por *B. diporus* se manifiesta entonces con dolor, edema local (83%), en menos casos con equimosis (50%), abscesos (5%), trastornos en la coagulación sanguínea (12%) (Jorge y Riveiro, 2000), seguido de necrosis hemorrágica con efusión abundante en el sitio de punción y escarificación de la piel (17%) (Méndez y Riet, 1995). Este síndrome va acompañado de desfibrinación severa. Una vez neutralizado el veneno los niveles de fibrinógeno aumentan lentamente a expensas de fibrinógeno hepático, alcanzando valores normales a las 36 horas.

Figura 5. a. mordedura grave de *bothrops*, b. , c. , d. necrosis por *bothrops*, e., f.



Fuente: <www.redbiorriesgo.unal.edu.co/textos/Ofidios.pdf>

También en los emponzoñamientos pueden existir infecciones por *Escherichia*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Clostridium* provenientes de la boca del animal (Ricciardi, 1999; Acosta de Perez *et al.*, 2000).

El laboratorio de análisis clínicos además es importante en la evaluación del estado del paciente envenenado tanto en el diagnóstico como en el seguimiento de la evolución, requiriéndose pruebas de coagulación, hemograma, perfil renal y enzimas (para descartar miólisis intensa y complementar el estudio hepático).

El antiveneno o suero antiofídico

La sueroterapia descubierta por Calmette, L.C.A. (1894), constituye el tratamiento específico para los emponzoñamientos, ya que su empleo reduce el daño y los síntomas. Hoy se prefiere emplear el término inmunoterapia pues las preparaciones antiveneno están constituidas por fragmentos de inmunoglobulinas purificadas que se designan como antiveneno.

El antiveneno consiste en un suero hiperinmune, con anticuerpos específicos obtenidos por inmunización en animales (equinos previamente inmunizados contra el tétano), mediante inyección de cantidades progresivas de veneno. Es

importante inyectar un pool de veneno valorado en su toxicidad determinando su LD_{50} , para tener en cuenta la variabilidad natural en la composición de los venenos de ejemplares de una misma especie. Si bien la inyección de veneno crudo al equino produce el máximo de anticuerpos, es mal tolerado por el animal por lo que se lo detoxifica biológicamente por complejamiento con formalina o glutaraldehído. La adsorción del veneno a inyectar en un coadyuvante permite una liberación paulatina de los toxoides mejorando la respuesta inmunológica. Se usa el de Freund, (coadyuvante de Freund incompleto: parafina con agregado de un emulsionante no iónico (Arlacel A: monooleato de manita) o el coadyuvante de Freund completo que tiene además agregado de *Mycobacterium tuberculosis* (H37Ra, ATCC 25177) muertos y secados, o bentonita, alginato de sodio e hidróxido de aluminio.

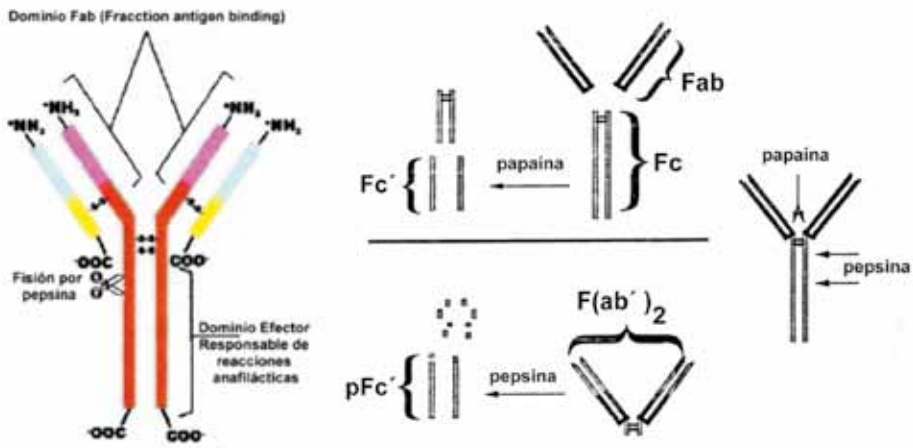
Experiencias realizadas con crotoxina muestran que por encapsulación del tóxico en liposomas no solo se reduce considerablemente la reacción tóxica, sino que es posible conseguir mayores títulos de inmunogenicidad en los antivenenos que cuando se emplea el coadyuvante de Freund. Actualmente se preconiza la detoxificación mediante radiaciones ionizantes.

Las inyecciones van aumentando paulatinamente su volumen y concentración en veneno hasta obtener en el plasma sanguíneo del animal el título necesario en anticuerpos antiveneno. Cuando esto se ha logrado lo cual implica fácilmente un período de un año o más se inicia el sangrado parcial periódico del animal extrayendo sangre de la yugular (en recipiente estéril y citrato sódico como anticoagulante. Se enfría a 4°C).

Como la administración a pacientes de antivenenos de origen equino los expone a los efectos adversos de los sueros heterólogos, los sueros son purificados precipitando las proteínas inactivas por cromatografía y por clivaje de los anticuerpos inmunoglobulínicos (IgG), para formar los fragmentos Fab o $F(ab)_2$. De estos procesamientos de purificación dependerá la actividad del antiveneno e incidencia de reacciones adversas tanto sistémicas como locales que se puedan producir, reacciones generalmente de naturaleza alérgica como la anafilaxia y la enfermedad del suero.

La sangre primeramente se centrifuga para eliminar restos celulares; luego se separan proteínas indeseables (albúminas y complemento), precipitando las γ -globulinas con sulfato de amonio. Para clivar las inmunoglobulinas se pueden utilizar enzimas proteolíticas como pepsina (por debajo de las dos uniones interdisulfuro en la parte de las terminales carboxílicas de la cadena pesada generando un dímero Fab: $(F(ab')_2$ de 100 kDa) con mejor coeficiente de difusión y tolerancia y dos fragmentos pequeños (pFc') o papaína (sobre las uniones disulfuro en la parte del grupo amino terminal de la cadena pesada separando dos fragmentos Fab menores que son bien tolerados y cuya eficacia neutralizadora está bien establecida (45 kDa c/u) y un tercero cristizable el fragmento Fc (50 kDa).

Figura 6



Fuente: Heard, O'Malley y Dart, 1999

Es conveniente el agregado de antisépticos (timerosal, mertorgán) y se ajusta el pH a 6,7. Se esteriliza por filtración. Antes de su entrega el antiveneno es sometido a controles bacteriológicos, toxicológicos y de valoración de su título capacidad inmunológica y especificidad, in vivo e in vitro.

Actualmente se puede disponer de métodos ELISA que permiten medir la concentración de veneno en sangre de pacientes, determinar la gravedad de la intoxicación y regular la dosificación en la administración del antiveneno. Esta prueba presenta la gran ventaja de poseer carácter de pronóstico, pues muchos síntomas se desarrollan tardíamente de veinticuatro a cuarenta y ocho horas luego de la mordedura y en cambio mediante el test se puede conocer la concentración de veneno en sangre después de cuatro horas del accidente.

La función del antiveneno es la de redistribuir los antígenos de los sitios periféricos al compartimiento plasmático donde son complejados por los anticuerpos; esto explicaría la supresión de la respuesta del organismo al veneno. Las inmunoglobulinas (IgG) poseen un volumen aparente de distribución similar al volumen plasmático alcanzando su máxima concentración en tejido superficial en aproximadamente seis horas y en el profundo en unas treinta horas.

El fragmento $F(ab')_2$ muestra un volumen de distribución plasmático aproximadamente doble, y pobre en tejidos, pero se redistribuye más rápidamente que las inmunoglobulinas y su máxima concentración en tejido superficial se produce en alrededor de una hora y en seis en los tejidos profundos, con vida media de aproximadamente 50 horas. Esto sugiere que si el veneno se distribuye principalmente en los tejidos y en cambio las inmunoglobulinas y fragmentos lo hacen mayormente en el plasma, es el veneno en circulación el que es neutralizado por las últimas.

Por el alto peso molecular de las proteínas del veneno unidas al antígeno, aun si se trata de los fragmentos $F(ab)$ o $F(ab')_2$, se dificulta su filtración renal lo

que hace que los antígenos desaparezcan de la orina y el complejo permanezca circulando en sangre, y su posible disociación o no es la que condiciona el riesgo de toxicidad hasta tanto sean metabolizados o eliminados.

Los fragmentos F(ab) de menor peso molecular son eliminados por filtración renal, libres o ligados a un hapteno, pero no combinados a las proteínas del veneno, lo primero reduce su vida media en el organismo y la duración de su acción; por su amplia distribución en tejidos profundos mantienen allí al complejo inmune. En cambio los fragmentos F(ab')₂ son eliminados mucho más lentamente y más aún las IgG.

El antiveneno en forma líquida, conservado entre 2-8 °C, mantiene su actividad durante varios años; el plazo de vencimiento es de tres años, lapso en el cual su capacidad neutralizadora disminuye al límite. Por tanto no es necesario desechar los sueros vencidos que se podrán utilizar en casos de emergencia teniendo en cuenta su disminución de actividad. Es conveniente que los antivenenos líquidos sean conservados al abrigo de la luz. Los antivenenos liofilizados presentan un lapso mayor de duración.

Existen diferentes tipos de sueros antivenenos

En Uruguay:

El tratamiento específico consiste en la administración del antiveneno hiperinmune equino. Presentación: frascos-ampollas de 10 ml. Neutraliza 25 mg de veneno de *B. alternatus* y 15 mg de *b. diporus*.

Se inicia la seroterapia administrando el suero específico, en perfusión i/v diluido en 100 ml de suero glucosado al 5%, en treinta minutos. Deben suministrarse al inicio 4 frascos y en caso de accidentes con niños, administrar 8 frascos. Debe conservarse entre 5 y 8 °C y no puede ser congelada. Su período de validez es de 3 años.

Desde 1988 Uruguay cuenta con producción nacional de antiveneno ofídico, producido en el Instituto de Higiene y distribuido por el Ministerio de Salud Pública a todo el territorio nacional. Las consultas se deben realizar al Centro de Información y Asesoramiento Toxicológico (CIAT) del Hospital de Clínicas y también debe realizarse la denuncia telefónica y por formulario correspondiente ante la División Epidemiología del Ministerio de Salud Pública.

En Argentina, se dispone de los siguientes sueros:

- *Suero antiveneno bothrópico bivalente* hiperinmune equino. Presentación frascos-ampollas de 10 ml. Neutraliza 25 mg de veneno de *B. alternatus* y 15 mg de *B. diporus*. Sirve para todo el país excepto Misiones (Laboratorio Central de Salud Pública, La Plata, Provincia de Buenos Aires).
- *Suero antiveneno Bothrops bivalente* (suero antiyarará). Presentación en frasco-ampolla de 10 ml. Neutraliza 41 mg de veneno de *B. alternatus* y 33 mg de veneno de *B. diporus*. Se puede utilizar en cualquier parte

del país excepto Misiones (Instituto Nacional de Microbiología «Dr. Carlos G. Malbrán»).

- *Suero antiveneno Bothrops tetravalente* (suero antiyarará Misiones). Presentación en frasco-ampolla de 10 ml. Neutraliza mínimo de 25 mg de veneno de *B. alternatus*, 25 mg de veneno de *B. diporus*, 25 mg de veneno de *B. jararacá* y 20 mg de veneno de *B. jararacussu*. Uso preferente en Misiones. (Instituto Nacional de Microbiología «Dr. Carlos G. Malbrán»).
- *Suero antiofídico polivalente*. Presentación frasco-ampolla de 10 ml. Neutraliza 4 mg de veneno de *Crotalus durissus terrificus*, 12,5 mg de venenos de *B. alternatus* y *B. diporus*. Necesita mayor número de ampollas, según la gravedad del cuadro. En lo posible sería el de última elección, solo utilizado en casos de emergencias (suero de Laboratorios Biol).

Primeros auxilios

En caso de un accidente ofídico, se sugiere seguir los siguientes pasos:

- *no* efectuar ningún tipo de incisión (aumenta el riesgo de infección y favorece el sangrado),
- *no* efectuar succión (aumenta el riesgo de infección y extrae muy poco veneno),
- *no* utilizar torniquetes (aumenta el edema, aumenta la isquemia y aumenta la lesión tisular),
- *no* aplicar compresas de hielo (causa mayor isquemia y necrosis),
- *no* suministrar descargas eléctricas. Se trata de una práctica repetidamente desautorizada en la literatura médica internacional,
- *si* inmovilizar al paciente, tranquilizarlo, hidratarlo con agua, limpiar la zona afectada y trasladarlo lo más rápido posible al centro médico más cercano para administrar el tratamiento específico (Ricciardi *et al.*, 2010).

Estado del conocimiento sobre plantas alexitéricas

Diferentes autores han realizado un exhaustivo relevamiento de las plantas alexitéricas (Reyes Chilpa *et al.*, 1995; Mors *et al.*, 2000; Ricciardi, 2005; López Sáez *et al.*, 2009; Makhija *et al.*, 2010). Se les atribuye la capacidad de aliviar uno o varios síntomas complejos como ser dolor, sangrado, inflamación, infección o incluso el mismo envenenamiento.

El conocimiento y uso de estas plantas es muy antiguo: en tratados de medicina ayurvédica de la India (siglos antes de la era cristiana) aparecen 211 plantas; en México se utilizan desde la época prehispánica; en el siglo XVI Francisco Hernández en su obra *Historia de las plantas de la nueva España* cita 119 plantas con este fin; en el siglo XVI Fray Bernardino de Sahagún cita el uso del picietl o tabaco. Algunos grupos étnicos como los Colorados, Cayapa y Coaquier del norte del Ecuador utilizan 40 especies de *Gesneriáceas*; los Colorados y Cayapa además emplean 11 especies de *Polypodiales* y 7 especies de *Piperáceas*.

Las plantas se aplican maceradas y frecuentemente cocidas sobre las heridas, también en forma de decocciones para ser ingeridas o lavar el área afectada. Un ejemplo de procedimiento utilizado es el del curandero chinanteco de Jalahui (México) Don Pedro Hernández, que abre la herida, succiona con la boca el veneno, posteriormente aplica una cataplasma de hojas frescas de *Asclepias curassavica*, *Eupatorium macrophyllum*, *Siparuna andina*, *Solanum diflorum*, *S. torvum*, *Verbesina oncofera* y finalmente saca el veneno con una hoja de *Dorstenia contrajerva* calentada en el comal o con una cataplasma del camote hervido de *Philodendron hederaceum*. El resto del tratamiento varía con los síntomas, empleando un total de 53 especies vegetales y terminando con una ceremonia limpia, acompañada de rezos.

Samy *et al.* (2008), en un estudio muy amplio en Tami Nadu (India), reportan que a los accidentados se les da a beber la decocción acuosa de las plantas, y luego se liga en la zona de la picadura la piedra *Vishakallu*, consistente en *Ocimum sanctum*, *Anisomeles malabarica*, *Leucas aspera*, *Piper betle*, *Santalum album* y piedras de la ribera del río, la cual se descarta una vez actúe como antídoto. Algunos sabores de hojas y raíces son utilizados como pronóstico: si es amargo, se juzga al paciente libre de daño, pero si el material sabe dulce, el paciente necesita urgente atención médica. Otros grupos creen que cepillándose los dientes diariamente con *Tephrosia purpurea* y *Azadirachta indica* se vuelven resistentes al veneno o, similarmente, aplican en forma externa el aceite de hojas de *Aristolochia tagala* durante la noche para prevenir las mordeduras.

Reyes Chilpa *et al.* (1995), sobre los tepehuanos de Chihuahua «los indios rara vez abren las heridas causadas por mordeduras de serpientes y para curarlas dependen de la aplicación de cataplasmas preparadas con varias plantas».

Otero *et al.* (2000a), describen el uso de más de 77 plantas en Colombia en forma de bebidas preparadas por infusión, decocción o maceración en 2 l de

agua; en forma de aplicaciones locales; como extractos alcohólicos (30-38% v/v) o mezclando varias plantas con aguardiente de caña.

Makhija *et al.* (2010), describen el uso de más de 70 plantas utilizadas en la India en forma de pasta (externa) jugo o decocción (oral) para tratar accidentes ofídicos por serpientes de los géneros *Bothrops*, *Naja*, *Echis*, *Viper*, *Bitis*, *Laticauda* y *Daboia*.

Esteso (1985), en su obra *Ofidismo en la República Argentina*, cita el folclore del país, casi siempre referido a los dichos de un antepasado respetable como el abuelo, que pasaron de familia en familia. Entre las plantas citadas y sus acciones se encuentran: la caña tacuara (paraliza y repele víboras venenosas); el ajo (*Allium sativum*) machacado puesto sobre la picadura no deja correr el veneno; el jugo de quimil (*Opuntia quimilo*: chumbera, tuna, quimil) las mata y puesto sobre la picadura detiene el veneno; el tabaco (*Nicotiana tabacum*) no deja correr el veneno sea en forma de cigarrillo armado, en hoja, picado y puesto sobre la picadura o mezclado con grasa de gallina ponedora y kerosene; los tallos de cuaco (Isipo, enredadera trepadora) como envoltura floja detiene el veneno inyectado y si se llevan en una bolsita las víboras no pican; una torta de sachá poroto (poroto silvestre) colocada sobre la picadura y mojada cada dos horas con dos gotas de álcali que no toque la piel calma el dolor y evita que el veneno progrese; la yerba del zorro, picada y en forma de cataplasma sobre la picadura no deja correr el veneno y si se le agrega álcali tiene el mismo efecto que el sachá poroto; el jugo amargo de ayapana (*Eupatorium ayapana*) es preventivo si se toman tres cucharadas diarias y en caso de picadura es curativo tomando quince cucharadas juntas; el té de raíz de bejuco (*Ipomoea acuminata*) se utiliza para lavar la picadura y la raíz en polvo colocada sobre ella detiene el veneno; el jugo de cardo santo recién exprimido (*Cnicus benedictus*) se toma como curativo durante tres días seguido y como preventivo una cucharada tres días seguidos; las hojas y raíces de contra yerba machacada (*Dorstenia contrajerba*) sobre la picadura detiene el veneno; tomar quince cucharadas del jugo amargo de hojas secas y tallos verdes de guaco (*Mikania guaco*) cura las picaduras de yarará; la mostaza negra (*Sinapis nigra*) triturada y mezclada con vinagre sobre la picadura detiene el veneno; tres o cuatro semillas de mandiroba (*Fevillea cordifolia*) ralladas y tomadas con un poco de vino detiene el veneno de yarará; el jugo de hojas de pareira brava (*Cissampelos pareira*) sobre la picadura inhibe el veneno y las hojas de la sanguinaria (*Euphorbia pilulifera*) machacadas y colocadas sobre la picadura calman el dolor, pero si se mastican las hojas el efecto es mucho más rápido.

Dentro de las plantas alexitéras cuya primera revisión realizaran Mors *et al.* (1989), las familias más importantes son:

- *Dicotiledóneas*: Asteraceae (9%), Fabaceae (7,8%), Euphorbiaceae (4,5%), Apocynaceae, Rubiaceae y Lamiaceae.
- *Monocotiledóneas*: Araceae (4%) y Zingiberaceae (1,2%)

Una revisión posterior de Houghton (1993) incrementó este número registrando 781 especies de las familias *Fabaceae* (60), *Asteraceae* (58), *Euphorbiaceae* (42), *Apocynaceae* (32), *Rubiaceae* (29), *Aristolochiaceae* (24) y

Araceae (26). Kvist (1986) revisó el uso de las *Gesneriáceas* en Sudamérica. Los países que destacan por la abundancia en plantas alexíteras son India, Brasil y México.

López Sáez *et al.* (2009), citan el uso del género *Aristolochia* (22 especies), *Ficus* (5 especies en la India además de la higuera común), *Araceae* (26), *Amaranthus* (4), *Rawwolfia* (7), *Amorphophallus* (4, *Araceae*), *Heliotropium* (5, *Heliotropiaceae*), *Asteraceae* (*Eupatorium*, *Mikania*, *Vernonia*) *Terminalia* (5, *Combretaceae*), *Ipomoea* (6, *Convolvulaceae*), *Euphorbia* y *Phyllanthus* (9 y 5, *Euphorbiaceae*), *Cassia* (6, *Fabaceae*), *Strychnos* (4, *Loganiaceae*), *Piper* (8, *Piperaceae*), *Zanthoxylum* (6, *Rutaceae*), *Solanum* (6, *Solanaceae*) y *Clerodendrum* (6, *Verbenaceae*). También muchas plantas ornamentales o alimenticias son reportadas como alexíteras: mango (*Mangifera indica*), litchi (*Litchi chinensis*), azafrán (*Crocus sativus*), papaya (*Carica papaya*), garbanzo (*Cicer arietinum*), nuez moscada (*Myristica fragrans*), pimienta (*Capsicum annuum*), longán (*Euphorbia longan*), ricino (*Ricinus communis*), ajo y cebolla (*Allium cepa*, *A. sativum*), batata (*Ipomoea batatas*), kaki (*Diospyros kaki*), hojas de alcachofas (*Cynara scolymus*), en Brasil adelfa (*Nerium oleander*) en Oriente Medio, hojas de la flor de sangre (*Asclepias curassavica*), en Centroamérica achiote (*Bixa orellana*) en la India y Filipinas, las raíces de la mandioca (*Manihot esculenta*), las semillas del cacao (*Theobroma cacao*) en Sudamérica, coco (*Cocos nucifera*), y muchas especies en la India como el girasol (*Helianthus annuus*), granado (*Punica granatum*), vid (*Vitis vinifera*) y cidro (*Citrus medica*).

Algunos cactus como *Opuntia dillenii* en la India y el alucinógeno *Lophophora williamsii* en América Central son reportados, como también las hojas del cáñamo *Cannabis sativa*, del tabaco *Nicotiana tabacum* y la planta de la adormidera *Papaver somniferum*.

Otros géneros citados como alexíteros en Argentina son *Cyperus*, *Euphorbia*, *Aloysia*, *Araujia*, *Anthemis*, *Boerhavia*, *Chiococca*, *Echium*, *Erythrina*, *Eupatorium*, *Fevillea*, *Flaveria*, *Ipomoea*, *Macfadyena*, *Morrenia*, *Nicotiana*, etc. (Ricciardi *et al.*, 1996; Ricciardi, 2005).

En otras regiones del mundo, se ha comprobado científicamente entre otras, la actividad alexítera de:

Especie vegetal	serpiente	cita
<i>Acalypha indica</i> L. (<i>Euphorbiaceae</i>)	<i>Vipera russelli</i>	Shirwaikar <i>et al.</i> , 2004
<i>Anacardium occidentale</i> (<i>Anacardiaceae</i>)	<i>Vipera russelii</i>	Ushanandini <i>et al.</i> , 2009
<i>Andrographis paniculata</i> (<i>Acanthaceae</i>)	cobra <i>Daboia russelli</i>	Nazimuddin <i>et al.</i> , 1978 Meenatchisundaram <i>et al.</i> , 2009a,b
<i>Annona senegalensis</i> (<i>Annonaceae</i>)	<i>Naja nigricolis nigricolis</i>	Adzu <i>et al.</i> , 2005
<i>Aristolochia albidia</i> (<i>Aristolochiaceae</i>)	<i>Naja nigricollis</i>	Abubakar <i>et al.</i> , 2006
<i>Aristolochia indica</i> (<i>Aristolochiaceae</i>)	<i>Daboia russelli</i> <i>Heteropneustes fossilis</i>	Dey and De, 2011 Meenatchisundaram <i>et al.</i> , 2009a Das <i>et al.</i> , 2010

Especie vegetal	serpiente	cita
<i>Aristolochia indica</i> (Aristolochiaceae), <i>Hemidesmus indicus</i> (Apocynaceae), <i>Gloriosa superba</i> (Colchicaceae), <i>Strychnos nux-vomica</i> (Loganiaceae), <i>Eclipta prostrata</i> (Asteraceae) y <i>Andrographis paniculata</i> (Acanthaceae)	Crotalus adamanteus	Samy <i>et al.</i> , 2008
<i>Aristolochia odoratissima</i> (Aristolochiaceae)	Bothrops atrox	Usubillaga <i>et al.</i> , 2005
<i>Aristolochia radix</i> (Aristolochiaceae)	Trimeresurus flavoviridis	Vishwanath <i>et al.</i> , 1987b Tsai <i>et al.</i> , 1980
<i>Aristolochia</i> sp (Aristolochiaceae)	Vipera russelli	Vishwanath y Gowda, 1987 Vishwanath <i>et al.</i> , 1985 Vishwanath <i>et al.</i> , 1987a
<i>Azadirachta indica</i> (Meliaceae)	Vipera russellii	Mukherjee <i>et al.</i> , 2008
<i>Baccharis trimera</i> (Asteraceae)	<i>Bothrops neuwiedi</i> B. jararacussu	Januario <i>et al.</i> , 2004
<i>Bauhinia forficata</i> (Fabaceae)	Crotalus durissus terrificus	Oliveira <i>et al.</i> , 2005
<i>Blutaparion portulacoides</i> (Amaranthaceae)	Bothrops jararacussu	Pereira <i>et al.</i> , 2009
<i>Brongniartia podalyrioides</i> (Fabaceae)	Bothrops atrox	Reyes-Chilpa <i>et al.</i> , 1994
<i>Buddleja americana</i> (Scrophulariaceae), <i>Mikania guaco</i> (Asteraceae), <i>Piper</i> <i>dariense</i> (Piperales), <i>Vernonia patens</i> (Asteraceae), <i>Echinacea purpurea</i> (Asteraceae)	Bothrops asper	Baltodano <i>et al.</i> , 2006
<i>Camellia sinensis</i> / <i>Thea sinensis</i> (Theaceae)	<i>Naja naja</i> , <i>Calloselasma</i> <i>rhodostoma kaouthia</i> , <i>Agkistrodon con-</i> <i>tortrix laticinctus</i> , <i>Agkistrodon halys</i> <i>blomhoffii</i> , <i>Crotalus</i> <i>atrox</i>	Pithayanukul <i>et al.</i> , 2010 Hung <i>et al.</i> , 2004
<i>Canistrocarpus cervicornis</i> (<i>alga ma-</i> <i>rrón</i>) (Dictyotaceae)	Lachesis muta	Moura <i>et al.</i> , 2010
<i>Casearia mariquitensis</i> (Salicaceae)	Bothrops neuwiedi pauloensis	Izidoro <i>et al.</i> , 2003
<i>Casearia sylvestris</i> (Salicaceae)	Bothrops jararacussu	Cintra-Francischinelli, 2008
<i>Casearia sylvestris</i> (Salicaceae)	<i>Bothrops asper</i> , <i>B.</i> <i>pirajai</i> , <i>B. mojejni</i> , <i>B. neuwiedi</i> , <i>B.</i> <i>jararacussu</i>	Borges <i>et al.</i> , 2001

Especie vegetal	serpiente	cita
<i>Casearia sylvestris</i> (Salicaceae)	<i>Bothrops</i> y <i>Crotalus</i> B. jararacussu	Borges <i>et al.</i> , 2000 Raslan <i>et al.</i> , 2002 Cavalcante <i>et al.</i> , 2007 Da Silva <i>et al.</i> , 2008 Cintra-Francischinelli <i>et al.</i> , 2008
<i>Cissampelos pareira</i> (Menispermaceae)	<i>Bothrops asper</i>	Badilla <i>et al.</i> , 2008
<i>Cordia verbenácea</i> (Boraginaceae)	Bothrops jararacussu	Ticli <i>et al.</i> , 2005
<i>Crinum jagus</i> (Amaryllidaceae)	<i>Echis ocellatus</i> , <i>Bitis arietans</i> , <i>Naja</i> <i>nigricollis</i>	Ode y Asuzu, 2006
<i>Curcuma cf. cedoaria</i> , <i>C. longa</i> y <i>C. parviflora</i> (Zingiberaceae)	<i>Naja naja siamensis</i>	Daduang <i>et al.</i> , 2005
<i>Curcuma longa</i> (Zingiberaceae)	<i>Naja naja</i>	Ferreira <i>et al.</i> , 1992 Chethankumar y Srinivas, 2008
<i>Curcuma</i> sp. (Zingiberaceae)	<i>Naja naja siamensis</i>	Ratanabanangkoon <i>et al.</i> , 1993
<i>Dipteryx alata</i> (Fabaceae)	Bothrops jararacussu	Nazato <i>et al.</i> , 2010 Puebla <i>et al.</i> , 2010
<i>Eclipta alba</i> (Asteraceae)	<i>Crotalus durissus</i> terrificus Bothrops jararacussu	Diogo <i>et al.</i> , 2009
<i>Eclipta prostrata</i> (Asteraceae)	<i>Crotalus durissus</i> terrificus, <i>Bothrops</i> <i>jararaca</i> , <i>B. jara-</i> <i>racussu</i> , <i>Lachesis</i> <i>muta</i> , <i>Calloselasma</i> <i>rhodostoma</i>	Mors <i>et al.</i> , 1989 Melo <i>et al.</i> , 1989, 1994 Pithayanukul <i>et al.</i> , 2004
<i>Embllica officinalis</i> (Euphorbiaceae) y <i>Vitex negundo</i> (Lamiaceae)	<i>Vipera russellii</i> , <i>Naja kaouthia</i>	Alam y Gomes, 2003 Sarkhel <i>et al.</i> , 2011
<i>Fagonia cretica</i> (Zygophyllaceae)	<i>Naja naja</i> karachiensis	Razi <i>et al.</i> , 2011
<i>Guiera senegalensis</i> (Combretaceae)	<i>Echis carinatus</i> , <i>Naja nigricollis</i>	Abubakar <i>et al.</i> , 2000 Sallau <i>et al.</i> , 2005
<i>Heliconia latispatha</i> Benth <i>Hemidesmus</i> <i>indicus</i> y <i>H. curtispatha</i> (Commelinidae)	Bothrops asper	Pereáñez <i>et al.</i> , 2008
<i>Heliconia psittacorum</i> y <i>Heliconia rostra-</i> <i>ta</i> (Commelinidae)	Bothrops asper	Estrada <i>et al.</i> , 2009; 2010
<i>Hemidesmus indicus</i> (Apocynaceae) y <i>Pluchea indica</i> (Asteraceae)	<i>Vipera russellii</i>	Alam <i>et al.</i> , 1996 Alam y Gomes, 1998a Alam y Gomes, 1998b
<i>Hemidesmus indicus</i> (Apocynaceae)	<i>Daboia russellii</i> , <i>Naja kaouthia</i>	Chatterjee <i>et al.</i> , 2006
<i>Hibiscus aethiopicus</i> (Malvaceae)	<i>Echis ocellatus</i> , <i>Naja n. nigricollis</i>	Hasson <i>et al.</i> , 2010
<i>Indigofera pulchra</i> (Fabaceae)	<i>Naja nigricollis</i>	Abubakar <i>et al.</i> , 2006

Especie vegetal	serpiente	cita
<i>Mandevilla illustris</i> (Apocynaceae)	<i>Crotalus durissus terrificus</i>	Biondo <i>et al.</i> , 2004
<i>Mandevilla velutina</i> (Apocynaceae)	<i>Crotalus durissus terrificus</i> , <i>Bothrops jararacussu</i> , <i>B. alternatus</i> , <i>B. moojeni</i> , <i>B. pirajai</i>	Biondo <i>et al.</i> , 2003
<i>Mangifera indica</i> (Anacardiaceae) y <i>Vitis vinifera</i> (Vitaceae)	<i>Porthidium nasutum</i> , <i>Bothrops asper</i>	Estrada <i>et al.</i> , 2009
<i>Mangifera indica</i> (Anacardiaceae)	D. russelii, <i>Calloselasma rhodostoma</i> , <i>Naja naja kaouthia</i>	Dhananjaya <i>et al.</i> , 2011 Pithayanukul <i>et al.</i> , 2009 Leanpolchareanchai <i>et al.</i> , 2009b
<i>Mikania glomerata</i> (Asteraceae)	<i>Bothrops alternatus</i> , <i>B. moojeni</i> , <i>B. newiiedi</i> , <i>B. jararacussu</i> , <i>Crotalus durissus terrificus</i>	Maiorano <i>et al.</i> , 2005 Napimoga y Yatsuda, 2010 Floriano <i>et al.</i> , 2009
<i>Mimosa pudica</i> (Fabaceae)	<i>Naja kaouthia</i>	Mahanta y Mukherjee, 2001
<i>Mimosa pudica</i> (Fabaceae)	<i>Naja naja</i> , <i>Vipera russelii</i> , <i>Echis carinatus</i> <i>N. kaouthia</i> <i>Ophiophagus hannah</i> , <i>Bungarus candidus</i> , <i>B. fasciatus</i> , <i>Calloselasma rhodostoma</i> <i>Naja naja</i> <i>Bungarus caeruleus</i>	Girish <i>et al.</i> , 2004 Ambikabothly <i>et al.</i> , 2011 Vejayan <i>et al.</i> , 2007 Meenatchisundaram <i>et al.</i> , 2009b
<i>Morus alba</i> (Moraceae)	<i>Daboia russelii</i>	Chandrashekara <i>et al.</i> , 2009
<i>Mouriri pusa</i> (Magnoliopsida), <i>Byrsonima crassa</i> (Malpighiaceae) y <i>Davilla elliptica</i> (Dilleniaceae)	<i>Bothrops jararaca</i>	Nishijima <i>et al.</i> , 2009
<i>Mucuna puriens</i> (Fabaceae)	<i>Echis carinatus</i> <i>Naja sputatrix</i> <i>Calloselasma rhodostoma</i>	Aguiyi <i>et al.</i> , 2001 Guerranti <i>et al.</i> , 2001; 2002; 2004; Tan <i>et al.</i> , 2009; Fung <i>et al.</i> , 2009; 2011; 2012
<i>Murraya paniculata</i> (Rutaceae)	<i>Bothrops asper</i> , <i>Crotalus durissus cumananensis</i>	Lobo <i>et al.</i> , 2010
<i>Musa paradisiaca</i> (Musaceae)	<i>Crotalus</i>	Borges <i>et al.</i> , 2005
<i>Padina boergesenii</i> (Dictyotaceae) y <i>Hypnea valentiae</i> (extracto de algas) (Cystocloniaceae)	<i>Naja nigricollis</i>	Vasanthi <i>et al.</i> , 2003

Especie vegetal	serpiente	cita
<i>Parkia biglobosa</i> (Fabaceae)	<i>Naja nigricollis</i> , <i>Echis ocellatus</i>	Asuzu y Harvey , 2003
<i>Pentaclethra macroleoba</i> (Fabaceae)	<i>Bothrops neuwiedi</i> B. jararacussu	Da Silva <i>et al.</i> , 2005 Da Silva <i>et al.</i> , 2007
<i>Persea americana</i> (Lauraceae)	<i>Bothrops asper</i>	Salazar <i>et al.</i> , 2009
<i>Piper</i> sp. <i>Piper umbellatum</i> , <i>Piper peltatum</i> (Piperaceae)	<i>Bothrops</i>	Nunez <i>et al.</i> , 2005
<i>Pluchea indica</i> (Asteraceae)	<i>Vipera russellii</i>	Alam <i>et al.</i> , 1996 Gomes <i>et al.</i> , 2007
<i>Pouzolzia indica</i> (Urticaceae)	<i>Vipera russellii</i>	Ahmed <i>et al.</i> , 2010
<i>Renealmia alpinia</i> (Zingiberaceae)	<i>Bothrops asper</i>	Fernández <i>et al.</i> , 2010
<i>Schizolobium parahyba</i> (Fabaceae)	<i>Bothrops alternatus</i> , <i>B. moojeni</i> , <i>Bothrops pauloensis</i> , <i>Crotalus durissus</i> <i>terrificus</i>	Vale <i>et al.</i> , 2008 Mendes <i>et al.</i> , 2008
<i>Schumanniohyton magnificum</i> (Rubiaceae), <i>Mucuna pruriens</i> (Fabaceae), <i>Ophiorrhiza mungos</i> (Rubiaceae) y <i>Cassia tora</i> (Fabaceae)	<i>Naja nigricollis</i> , <i>Naja melanoleuca</i>	Houghton, 1993 Akunyili y Akubue, 1986
<i>Serjania erecta</i> (Sapindaceae)	<i>Bothrops jararacussu</i>	Fernandes <i>et al.</i> , 2011
<i>Tabernaemontana catharinensis</i> (Apocynaceae)	<i>Crotalus durissus</i> <i>terrificus</i> , <i>Bothrops jararacussu</i>	Batina <i>et al.</i> , 2000 De Almeida <i>et al.</i> , 2004 Veronese <i>et al.</i> , 2005
<i>Tamarindus indica</i> (Fabaceae)	<i>Vipera russelli</i>	Ushanandini <i>et al.</i> , 2006
<i>Vitex negundo</i> (Lamiaceae)	<i>Vipera russellii</i> , <i>Naja kaouthia</i>	Alam y Gomes, 2003
<i>Vitis vinifera</i> (Vitaceae)	<i>Echis carinatus</i> <i>Daboia</i> , <i>Vipera russelli</i>	Mahadeswaraswamy <i>et al.</i> , 2008 Mahadeswaraswamy <i>et al.</i> , 2009
<i>Withania somnifera</i> (Solanaceae)	<i>Naja naja</i> , <i>Daboia russelii</i>	Deepa y Gowda, 2002 Machiah <i>et al.</i> , 2006 Machiah y Gowda, 2006

La pregunta importante en este punto es: ¿qué clases de metabolitos secundarios presentes en estas especies vegetales son capaces de interactuar con los target macromoleculares de tal manera de inhibir a los venenos?

Por otra parte, para poder entender mejor los mecanismos de inhibición, es necesario el estudio de los compuestos aislados, lo cual puede ser un problema ya que la purificación puede excluir componentes que actúen en combinación o sinérgicamente, como ocurre con muchas hierbas medicinales. Sin perder esto de vista, se agrupan en familias químicas los compuestos activos que son citados en bibliografía:

Componentes activos

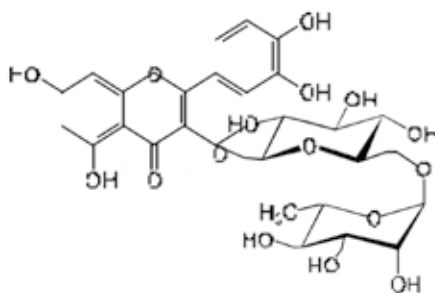
Flavonoides (Liang, 1987)

Actúan mediante la formación de complejos, se han demostrado uniones puente hidrógeno entre grupos fenólicos y amidas de cadenas proteicas. Poseen actividad antiinflamatoria, antihepatotóxica, antiarrítmica, hipocolesterolémica, antialérgica, antitumoral, etc. La actividad más importante desde el punto de vista antiveneno es la inhibición de enzimas.

a. Flavonoides simples

- *rutina*, inhibe la enzima fosfolipasa A_2 (administrada en forma conjunta con antihistamínicos, protege contra los efectos vasculares de *Bothrops atrox*) presente en *Achillea millefolium*, *Euphorbia hirta*, *Forsythia suspensa*, *Marsypianthes chamaedrys*, *Nerium oleander* y *Ruta graveolens* entre otros. Muestra por difracción de rayos x, cuatro grupos hidroxilos libres para participar en uniones puente hidrógeno y el grupo carbonilo del anillo de pirona está espacialmente disponible para fijarse a sitios activos del receptor rutina.

Figura 7



- *quercitina*, inhibe la lipoxigenasa, presente en *Albizzia lebeck*; *Allium cepa* y como glucósido en *Foeniculum vulgare*, *Helianthus annuus*, *Nerium oleander*, *Polygonum bistorta* y *Rheum palmatum*
- *morina*, se une a metales como Zn y Al, por lo tanto a metaloproteinasas que los contienen. En *Morus alba* y en *Artocarpus integrifolia* (planta antiescorpiónica).
- *primetina*, en *Primula denticulata*, *hesperitina* en *Prunus persica*; *pinostrobina*, en *Heterothalamus psiadioides*; *naringenina*, en *Prunus persica*; *galangina*, en *Heterothalamus psiadioides*; *apigenina*, en *Boehmeria nivea*; *kaempferol*, en *Cassia tora*, *Impatiens capensis*, *Nerium oleander*, *Paeonia albiflora* y *Prunus persica*; *luteolina*, en *Ajuga decumbens* y *Merremia tridentata*; *diosmetina*, en *Merrenia tridentata*; *isoramnetina*, en *Argemone mexicana*; *miricetina*, en *Myrica rubra* entre otros. Las especies *Phyllanthus niruri* y *P. urinaria* contienen quercetina, rutina, quercitrina e isoquercitrina.

Cuando se utilizan las flores como antiveneno es mucho mas conspicua la presencia de flavonoides: isoramnetina en *Calendula officinalis*; quercitina en *Hibiscus mutabilis*; miricetina en *Impatiens balsamina* y luteolina en *Lonicera japonica*.

Todos los flavonoides poseen similitud estructural: la proximidad y coplanaridad del grupo hidroxilo fenólico sobre el C5 y el grupo carbonilo pirónico. La misma característica la poseen las cromonas por ejemplo en *Schummanniophyton magnificum*.

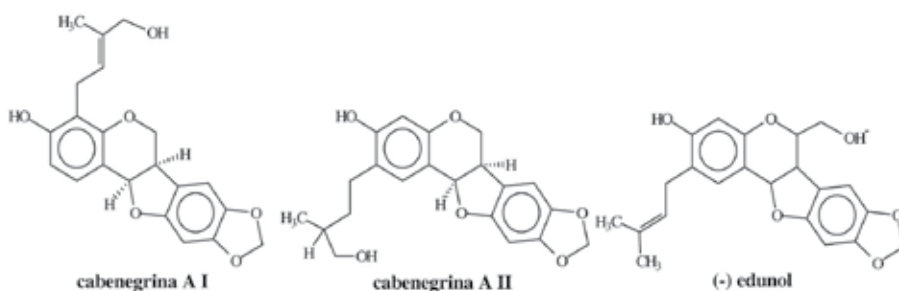
Los flavonoides, al ser ingeridos, se metabolizan a metabolitos activos por la microflora intestinal. La primera etapa es la hidrólisis de los glucósidos, luego la ruptura del anillo pirónico produciéndose pequeñas moléculas (ácidos fenólicos) que son activos contra los venenos. Por ejemplo en suero y orina humanas se puede detectar ácido protocatéquico luego de la administración oral de quercitina.

b. *Flavonoides complejos*: como isoflavonoides, pterocarpanos y coumestanos.

- *Isoflavonoides*: Poseen propiedades biodinámicas pero no son frecuentes en plantas alexíteras. Algunos ejemplos son tectoridina, iridina y sus 7-*o*-glucósidos en rizomas y raíces de *Belamcanda chinensis*, con actividades antihepatotóxicas y antiinflamatorias, muy utilizada como antiveneno en China; derricidina en *Derris sericea*.
- *pterocarpanos prenilados*: cabenegrinas A-1 y A-2, edunol. Mostraron efecto protector en ratones inyectados con veneno de *Bothrops atrox*. Compuestos con distribución quimiotaxonómica muy precisa ya que solo son sintetizados por ciertas tribus de Fabaceae (*Desmodiæ*, *Dalbergiæ*, *Sophoreæ*, *Phaseoleæ* y *Brongniartiae*) circunscriptos incluso a la subfamilia *Papilionoideæ*.

Las *cabenegrinas* (Nakagawa *et al.*, 1982) se han aislado mediante fraccionamiento del extracto hidroalcohólico de la raíz de una planta denominada «Cabeça de negra». El producto «Específico Pessoa» producido y elaborado en el nordeste de Brasil por el Laboratorio Frota (Sobral), poseía el 100% de actividad en los ensayos. En la Cuenca Amazónica, los trabajadores de las plantaciones lo utilizan como antídoto oral contra el veneno de serpientes y arañas. Curiosamente, la identidad botánica de las plantas con las que se preparaba el Específico Pessoa no se conoce; hay aproximadamente 10 plantas denominadas cabeza de negro en Sud América, y dos son reputadas como antiveneno en la región Ibiapaba del noreste brasilero: *Bredemeyera floribunda* Willd. (Polygalaceae) llamada pacari y *Harpalyce brasiliiana* (Fabaceae-Papilionoideae), la cual posee pterocarpanos muy similares lo que marca un posible parentesco.

Figura 8



Las DEM (dosis efectivas mínimas) son de 2,8mg/Kg para A-I y 2mg/kg para A-II en ratones inyectados con 2,5 veces la DL_{50} del veneno de *B. atrox*. 1 mg/kg por vía intravenosa de (-) cabenegrina A-I inyectada 15 minutos antes de inyectar veneno contrarresta después de 30-60 minutos la hipotensión, el paro cardíaco y respiratorio producido por la DL_{50} del veneno. También en corazón aislado de perro las cabenegrinas revierten los efectos cardiovasculares del veneno. Su síntesis fue patentada en Japón.

Un compuesto similar, el *edunol*, fue aislado de raíces de la «hierba de la víbora» *Brongniartia podalyrioides* y *b. intermedia* (*Fabaceae*) siendo activo también contra *b. atrox*. 3,1 mg/kg IP en ratones anula totalmente la mortalidad causada por la DL_{50} y es efectivo disminuyendo la mortalidad de 100 a 70% para 2 DL_{50} . Sin embargo dosis de 10 mg/Kg mostró un efecto protector bajo para la DL_{50} y nulo para 2 DL_{50} , esto puede ser debido a que algunos pterocarpanos como una mezcla de gliceolíinas I, II y III pueden bloquear el transporte de electrones y presentar toxicidad a altas concentraciones. En México se usan la corteza y hojas de *B. glabrata* contra mordeduras de serpientes de cascabel como también las raíces de *B. goldmanii*.

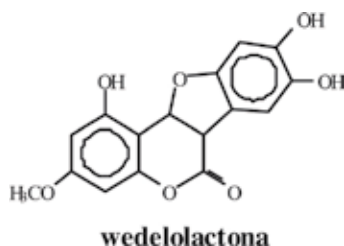
Se conocen otros pterocarpanos prenilados en plantas del género *Erythrina* como *E. berteroana*.

Da Silva *et al.* (1999), han aislado del extracto alcohólico de hojas de *Harpalyce brasiliiana* «raíz de cobra» utilizada como alexitérica, una isoflavona nueva harpalicina y el flavonol quercitina y de las raíces 3-hidroxi-4-isopentenil-8,9-metileno-dioxipterocarpano y el triterpeno pentacíclico ácido betulínico.

- *coumestanos*: wedelolactona (Mors *et al.*, 1989), fue aislada de partes aéreas de *Eclipta prostrata* (*Asteraceae*), junto a otros componentes activos como flavonoides y fitoesteroles. Inhibe la lipoxigenasa y la liberación de creatina-cinasa involucrada en los procesos inflamatorios. Activa contra veneno de *Crotalus durissus terrificus*, neutraliza su letalidad en ratones. También posee actividades antimiotóxica, antihemorrágica, antiproteolítica,

antifosfolipásica, antihepatotóxica. Es usada en Brasil y China en el tratamiento de picaduras de serpientes. En dosis de 0,54 mg/animal anula la mortalidad de 3DL₅₀ del veneno. Con respecto a *Bothrops jararaca*, la wedelolactona inhibe la actividad miotóxica *in vitro* y tiene un efecto antihemorrágico (5mg/kg) y el extracto etanólico posee un efecto protector contra la miotoxicidad del veneno. La wedelolactona, estigmasterol y sitosterol actúan sinérgicamente neutralizando *in vivo* la miotoxicidad y el efecto hemorrágico de venenos de Crotálidos (*B. jararaca*, *B. jararacussu* y *Lachesis muta*) con acción antiproteolítica y antifosfolipasa A₂ y por lo tanto antiinflamatoria.

Figura 9

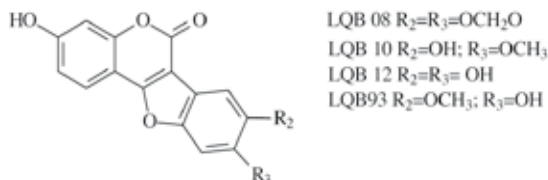


La dimetilwedelolactona fue aislada por Pithayanukul *et al.* (2004) como componente mayoritario del extracto butanólico de *Eclipta prostrata*, el cual inhibe en un 100% la actividad letal de 2 DL₅₀ del veneno de *Calloselasma rhodostoma*, también inhibe parcialmente la actividad hemorrágica, posee muy poca actividad sobre la fosfolipasa A₂ y no inhibe la actividad proteolítica. Un posible mecanismo de inhibición sería debido a la naturaleza polifenólica de este compuesto. Konarev *et al.* (2002), detectaron inhibidores de la tripsina, subtilisina y quimotripsina en semillas de *E. prostrata*.

Un estudio realizado por Diogo *et al.* (2009) en extractos de partes aéreas (wedelolactona) y raíces (demetilwedelolactona) de *E. alba* silvestre, y modificada genéticamente con *Agrobacterium rhizogenes* para aumentar la producción de los cumestanos, demostró que el clon 19 posee mayor actividad que la planta silvestre con respecto a la inhibición de la actividad miotóxica inducida por la fosfolipasa A₂ extraída del veneno de *Crotalus durissus terrificus* y *B. jararacussu*, lo cual demuestra la importancia del conocimiento de los compuestos activos presentes en los extractos.

Cumestanos sintéticos preparados por Melo *et al.* (2010), han demostrado actividad, sobre todo el LQB 93 *in vitro* inhibe completamente la liberación de CK (actividad miotóxica) e *in vivo* posee efecto antimiotóxico (ID₅₀: 0,17 mg/kg), antiedematogénico (ID₅₀: 0,14 mg/kg), inhibe la fosfolipasa A₂ y el efecto cardiotoxico de *B. jararacussu*. También la actividad hemorrágica en forma similar a la wedelolactona, y la actividad proteolítica de *B. jararaca*.

Figura 10



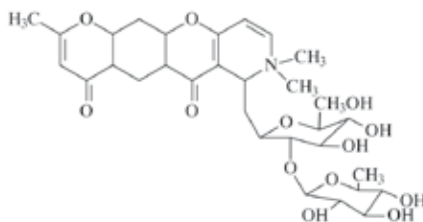
En resumen, para que estos compuestos muestren efecto protector contra venenos de crotálidos, deben poseer un esqueleto isoflavonoide, funcionalidad dioxigenada y naturaleza ácida. Las (-)-cabenequinas A-I y A-II, el (-) edunol poseen rotación óptica negativa, configuración S en los carbonos quirales 6^a y 11^a, diferenciándose por la hidroxilación del sustituyente isoprenilo y la posición de este con respecto al esqueleto principal. La magnitud del efecto protector podría deberse al grado de oxidación del grupo isoprenilo dado que el (-) edunol es el menos potente, aunque la wedelolactona que no posee este grupo es activa (Reyes Chilpa y Jiménez Estrada, 1995).

Alcaloides

Li-Shian *et al.* (2004) han aislado de las raíces y tallos de *Aristolochia elegans* alcaloides N-oxido benzoil benciltetrahydroisoquinolin éter, las aristoloquinolinas A, B y C. Otros alcaloides como (-)-(r,r)-7'-o-metilcuspidatina, alcaloide bis-1-benciltetrahydro isoquinolina puenteado entre los anillos c y c' por un éter difenilo; alcaloide bisbencilisoquinolínico; pericampilona A, isoquinolina: coridalina, thalifolina, northalifolina, N-metil caridalina. Si bien la actividad alexitéra se considera debida a los ácidos aristolóquicos.

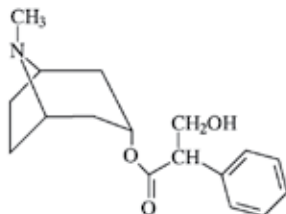
El *schumanniofósido* (Akunyili y Akubue, 1986) del jugo de la corteza de *Schumanniophyton magnificum* (Rubiaceae) es utilizado por los trabajadores nigerianos al ser mordidos por serpientes o escorpiones. Es activo disminuyendo la mortalidad en un 16% en ratones pretratados (2,06mg/kg sc de extracto de corteza) y envenenados con una DL de veneno de *Naja melanoleuca*. Es ineficaz cuando se administra 10 minutos antes o una hora después debido quizás a termolabilidad del compuesto. Estudios posteriores no adjudican la actividad a este alcaloide pero no han podido aislar el compuesto activo.

Figura 11



La *atropina* reduce la actividad del veneno de las mambas *Dendroaspis angusticeps* y *d. polylepis* al bloquear el receptor colinérgico. Este alcaloide se encuentra en Solanáceas como *Cyphomandra betacea* y *C. hartwegii* cuyo tallo subterráneo es utilizado por los guaymies de Panamá.

Figura 12



En partes aéreas y raíces de *Cissampelos pareira* se ha encontrado el alcaloide bis bencilisoquinoleínico *hayabinina*, alcaloides berberínicos *palmatina*, *hayatinina*, *hayatidina*, *insularina*; *pelosina* (d-berberina, condrodendrina), *curina* (l-berberina), *4-metilcurina*, *cicleanina*, *ciclanolina* (cissamina), *isochondrodendrina*, *tetrandrina*, *dimetiltetrandrinio*, alcaloides isoquinoleínicos del grupo de la berberina e isoberberina; alcaloides protoberberínicos: berberina. En la raíz: *hayatidina*, *hayatinina* con actividad curariforme, *laudanosina* alcaloide bencil isoquinoleínico, y *cissampareina*, alcaloide bisbencilisoquinoleínico, alcaloides tropolisoquinoleínicos: *pareirubrininas a y b*, *grandirubrina* e *isoimerubrina*, *pareitropona*, *bulbocapnina*, *corituberina*, *dicentrina*, *dehidrodicentrina*, *magnoflorina* y *nuciferina*, todos alcaloides aporfínicos.

La tetrandina es un alcaloide con propiedades analgésicas, antiinflamatorias y febrífugas, acciones que también presentan las pareirubrininas A y B, pero la tetrandrina es demasiado tóxica para ser utilizada en seres humanos; también la berberina es hipotensora, la cisampelina relajante de la musculatura lisa, incluso comercializada como tal y la palmatina posee actividad hipotensora y sedativa.

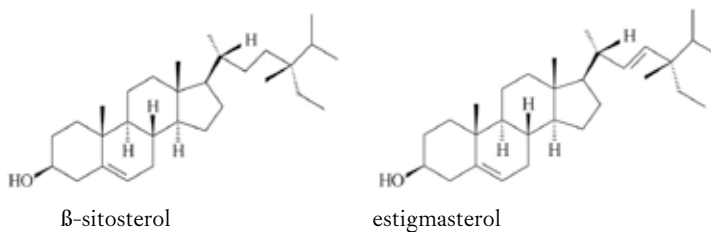
Esteroides y triterpenoides

Los esteroides tienen la capacidad de formar compuestos de adición molecular estables mediante fuerzas de *Van der Waals* e hidrofóbicas, por ejemplo los ácidos coleicos formados por los ácidos biliares, el colesterol que puede combinarse con la lisolecitina hemolítica en forma equimolecular, inhibiéndola. Algunos estudios muestran como la hemólisis provocada por la cobra india *Naja repudians* en animales es inversamente proporcional a su contenido de colesterol en sangre (Mors *et al.*, 2000).

Además de la mencionada wedelolactona, los esteroides *sitosterol* y *stigmasterol* (aislados de partes aéreas de *Eclipta prostrata*) en dosis de 2,3 mg/animal son activos contra el veneno de *Crotalus durissus terrificus* en ratones. El sitosterol que da una protección del 70% y puede encontrarse como tal o

como glucósido (sitosterolina), con acción antiinflamatoria. Compuestos como el sitosterol, con un grupo hidrofílico en un extremo, puede asociarse con otro hidrofóbico rodeándolo, formando un complejo el grupo hidrofílico hacia afuera con sus propias propiedades físico-químicas. El glucósido del estigmasterol está demostrado se une al receptor de serotonina. También es activo el *a-spinasterol* de *Polygala senega*.

Figura 13



Pueden encontrarse además en otras plantas alexíteras como: *Achillea millefolium*, *Aegle marmelos*, *Aristolochia serpentaria*, *Caesalpinia bonduc*, *Calendula officinalis*, *Cissampelos glaberrima*, *Cocculus hirsutus*, *Cynanchum paniculatum*, *Euphorbia hirta*, *Gloriosa superba*, *Marsypianthes chamaedrys*, *Ocimum basilicum*, *Ophiorrhiza mungos*, *Oldenlandia diffusa*, *Pluchea indica*, *Pothomorphe umbellata*, *Prestonia coalita*, *Serenoa repens*, *Sophora subprostrata*, *Taraxacum officinale*. Otros esteroides como *a-spinasterol*, *tigogenina* y *hecogenina* poseen actividad antiinflamatoria. Un compuesto no natural pero muy utilizado es el ácido colerético, obtenido por oxidación del ácido cólico, que brinda un 80% de protección contra la acción del veneno de *B. jararaca*.

Los derivados D-glucurónidos de la gimnemagenina aislados de *Gymnema sylvestre* (Asclepiadaceae) son activos contra *Naja* y *Vípera russelli* (Reyes Chilpa y Jiménez Estrada, 1995). El gimnemato potásico inhibe la ATPasa.

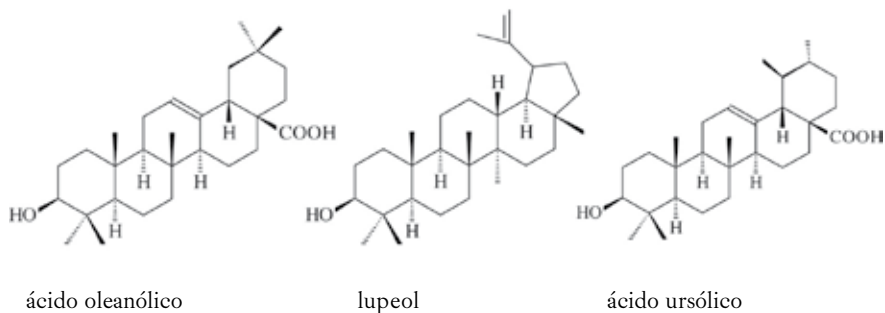
Triterpenos tetracíclicos, como los lanostanos poseen actividad antiinflamatoria y antifosfolipasa A₂ (Giner-Larza *et al.*, 2000). Según Mors (2000), no tienen actividad alexítera.

Triterpenos pentacíclicos, la estructura y conformación triterpénica de cinco anillos es necesaria para la actividad antiinflamatoria o antiveneno (Mors *et al.*, 2000).

Muchos de ellos, con actividades comprobadas como antiinflamatorios y antihepatotóxicos: ácido oleanólico (*Achyranthes aspera*, *Albizia lebeck*, *Allium cepa*, *Calendula officinalis*, *Chiococca alba*, *Forsythia suspensa*, *Marsypianthes chamaedrys*, *Ocimum basilicum*, *Plantago major*, *Thymus vulgaris*); lupeol; ácido ursólico (*Chiococca alba*, *Ehretia buxifolia*, *Marsypianthes chamaedrys*, *Nerium oleander*, *Oldenlandia diffusa*, *Rabdosia amethystoides*, *Thymus vulgaris*); taraxerol; taraxasterol; α-amirina; β-amirina (se une directamente a receptores); friedelina; epifriedelinol; alnusenona; ácido betulínico (con actividad

n-aminopeptidasa); betulina; bredemeyerósido; ácido echinocístico; cicloartenol; ácido quinóvico; presenegenina; gymnemagenina; gypsogenina. Los más activos son el ácido oleanólico y el ácido ursólico.

Figura 14



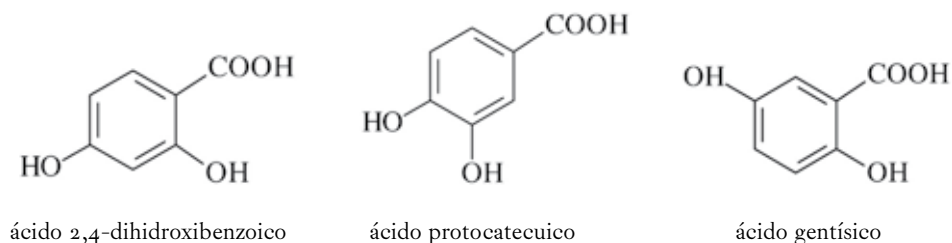
Compuestos fenólicos

Los fenoles simples pueden unirse a proteínas por uniones puente hidrógeno o uniones covalentes mucho más fuertes, ocupando sitios de unión críticos. En plantas, están prácticamente siempre en forma conjugada. Por otra parte, los fenoles son sustratos de las fenolasas, resultando quinonas que pueden unirse a proteínas con uniones covalentes. Estructuras como el *catecol* son particularmente propensas a formar quinonas que condensan con proteínas resultando una copolimerización. Son importantes constituyentes de las plantas alexíteras y se pueden dividir para el estudio en:

- a. Ácidos *hidroxibenzoicos* y sus éteres *metílicos*, son muy activos, con 83% de protección el ácido 2,4-dihidroxibenzoico; 80% el ácido 3,4-dihidroxibenzoico o ácido protocatechuico (en *Cryptolepis sinensis*, *Fagopyrum cymosum*, *Allium cepa*, *Polygonum bistorta*).

El derivado 4-O-metil éter éter del primero es un factor neutralizante de *Hemidesmus indicus* utilizada como contrayerba, se ha aislado también un factor del extracto metanólico de la raíz denominado HI-RVIF (HI de *Hemidesmus indicus*, RVIF de factor inhibidor de veneno de *V. russelli*) que *in vitro* (50 mg) inhibe 10 DL₅₀, 5 dosis hemorrágicas mínimas, 20 dosis coagulantes, y 10 actividades anticoagulantes; *in vivo* inhibe significativamente 3 DL₅₀, 2 dosis hemorrágicas y 2 dosis anticoagulantes en ratones (Alam *et al.*, 1994). El éster metílico correspondiente de algunas especies de *Primula* (glucósido primverosido) es un conocido antiveneno de la India con considerable actividad antiinflamatoria, el 2-hidroxi-4-metoxi benzaldehído es un potente inhibidor de la tirosinasa (polifenol oxidasa) con gran poder quelante.

Figura 15



Otros como *vainillina* (*Marsdenia condurango*) y su dimetil éter (*Eryngium* sp.) son utilizados como antiveneno. Así también el ácido gentísico (*Gentiana lutea*), el aldehído correspondiente al ácido protocatecuico (*Perilla ternata*), el monometil éter del ácido 2,6-dihidroxi benzoico (*Gloriosa superba*) y el ácido anísico (*Ruta montana*). El ácido p-hidroxi benzoico sin embargo es inactivo.

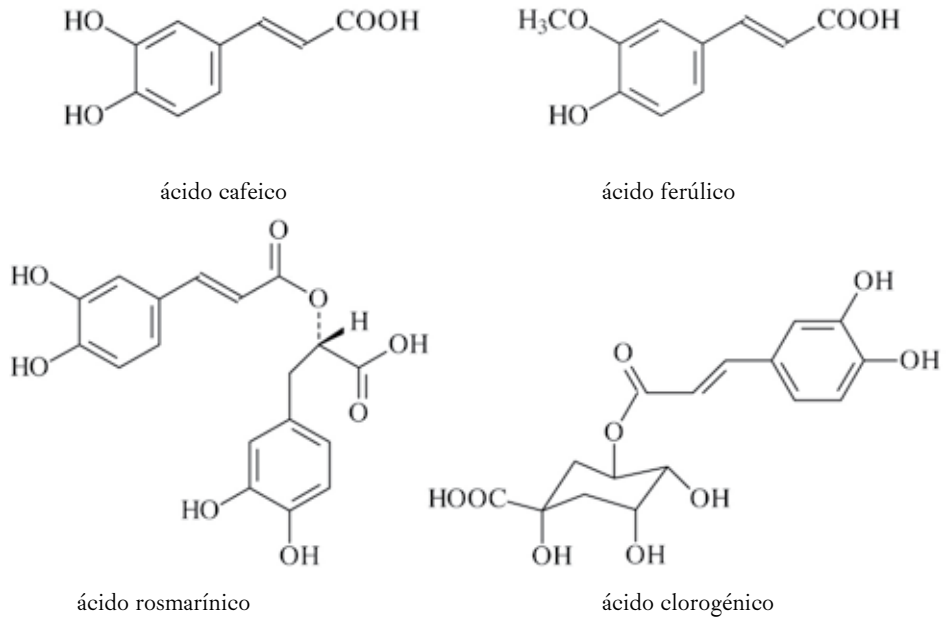
- b. Ácidos *cinámicos* y *derivados*, el ácido cafeico y el clorogénico (ácido cafeico esterificado con ácido quínico) se unen fuertemente a proteínas, provocando un cambio conformacional. El ácido *cafeico* es de gran actividad dada su propiedad de ser quelante (derivado de catecol) y su fácil oxidación a quinona por fenolasas. Entre sus actividades se pueden nombrar la de ser un fuerte inhibidor de la lipoxigenasa y antihepatotóxico. Se puede encontrar en especies como *Polygonum*, *Prestonia coalita*, *Strychnos nux-vomica*, *Taraxacum officinale*, etc; también se encuentra junto al ácido ferúlico en especies de pinos como *Pinus sylvestris* utilizados en forma externa como contraveneno. El ácido *isoferúlico* también está presente en plantas alexíteras (*Cimicifuga racemosa*), el *verbascosido* (*Buddleja* y *Forsythia*), ácido *rosmarínico* (especies de *Perilla*); ésteres del ácido cafeico se identificaron en especies de *Merremia* y son utilizados como antídotos.

El *cafeato de miricerona* (ácido cafeico esterificado con triterpeno) en *Myrica cerífera* muestra un antagonismo selectivo por el receptor de endotelina, causando la ruptura de la unión endotelina-membrana; algunos oligómeros del ácido cafeico (*Berkley spekeana* y *Echinops amplexicaulis*) son antídotos por vía oral y parenteral.

Se ha demostrado que el *éster etílico del ácido cafeico* es un ligando competitivo de los receptores de benzodiazepinas.

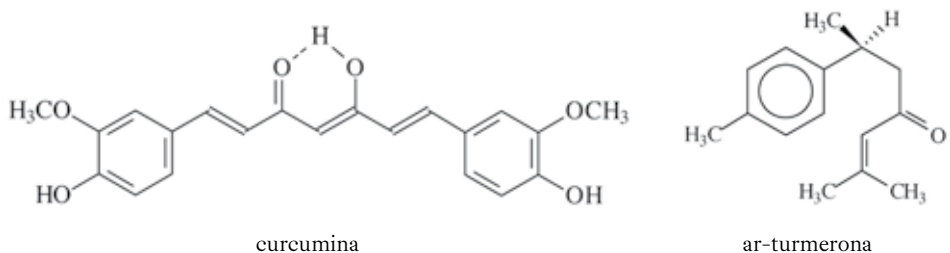
El ácido *clorogénico* es inhibidor de la enzima lipoxigenasa lo que confiere su actividad antiinflamatoria y antihepatotóxica. Se encuentra en muchas plantas alexíteras: *Achillea millefolium*, *Arctium lappa*, *Citrullus colocynthis*, *Coffea arabica*, *Fagopyrum cymosum*, *Heliantus annuus*, *Marsdenia condurango*, *Nicotiana tabacum*, especies de *Strychnos*, *Polygonum bistorta*.

Figura 16



- c. *Curcuminoides*, diaril heptanoides como *curcumina*, *demetoxi curcumina* y *bis demetoxicurcumina*, colorantes amarillos de *Curcuma longa*. La curcumina es una dicetona que, en solución a través de un tautomerismo ceto-enólico, produce un fuerte centro quelante. Inhibe totalmente la neurotoxina de *Naja naja siamensis*. Además, los curcuminoides poseen actividad antiinflamatoria, hepatoprotectora, antimutagénica, anticarcinogénica, inhibidora de la lipoxigenasa y prostaglandin-endoperoxido sintetasa. Otras cetonas insaturadas como la *ar-turmerona* de los rizomas de *Curcuma longa* inhiben la actividad de las víboras de cascabel.

Figura 17



- d. *Cumarinas*. Se considera que inhiben varias enzimas. La *cumarina* con un 40% de protección se puede encontrar en plantas alexitéras como *Dipteryx odorata*, *D. punctata*, *Liatris squarrosa*, *Mikania* sp. y *Torresea cearensis*; los derivados oxigenados como *umbelliferona* se encuentran en *Aegle marmelos*, *Daphne mezereum* e *Ipomoea batatas*, como así también *escopoletina*, la cual también es abundante en *Brunfelsia* y *Heterothalamus psiadioides* acompañada por su éter dimetílico *escoparona*.

Figura 18



Herniarina y *ayapina* se encuentran en *Eupatorium triplinerve* con actividad hemostática; *dafnina* (7-*o*-glucósido de la dafnetina) en *Daphne odora*; *suberenona* en *Ruta graveolens*; *marmina* en *Aegle marmelos*, *Dorstenia brasiliensis* y *Feronia limonia* con *bergapteno* de 20% de protección (furanocumarina), *dorstenina* y *fernolina*.

- e. *Flavonoides*, ya han sido descritos como el primer grupo en importancia como antiveneno.
- f. *Polifenoles: taninos* (ácido tánico (Okonogi *et al.*, 1970) podrían deber su actividad a su capacidad de formar complejos con las proteínas de los venenos. Por ejemplo, taninos condensados del fruto inmaduro de *Diospyros kaki* (Ebenaceae), neutralizan venenos neurotóxicos y hemorrágicos; el tanino del fruto del Persimmon es activo contra la serpiente marina «eraburu» (Reyes Chilpa y Jiménez Estrada, 1995). La presencia de concentraciones elevadas de taninos en el extracto metanólico al 95% de hojas de *Guiera senegalensis* es responsable de la actividad inhibitoria del efecto letal de los venenos de *Echis carinatus* y *Naja nigricollis*. (Abubakar *et al.*, 2000).

Los géneros mejor conocidos utilizados como plantas antivenenos con taninos son *Paeonia*, *Agrimonia* y *Rubius*. También *Euphorbia hirta* con dos elagitaninos (euforbina A y B), especies de *Acacia* por ejemplo *A. catechu*, *A. hindsii*, *A. leucophaea*, *A. nubica*, *A. polyacantha* y *A. sinuata*; hojas de *Rhus semialata*, raíz de *Rheum palmatum*, *Musa paradisiaca*, etc.

Ácidos

a. *Ácidos aristolóquicos* (Tsai *et al.*, 1980)

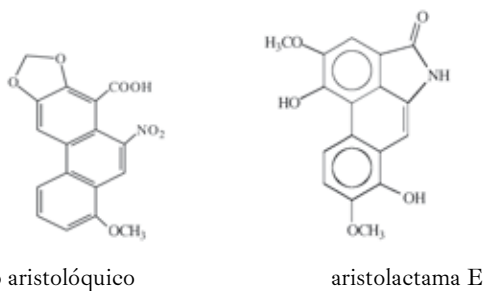
En raíces de diversas especies de *Aristolochia* como *A. radix*, activo contra *Naja naja* y *Bungarus multicinctus*. Disminuye la mortalidad en un 26% y en el segundo caso un 34% en ratones pretratados con 1251,38 mg/kg IM.

El ácido aristolóquico inhibe la inflamación inducida por agentes inmunológicos, complejos inmunes y agentes no inmunológicos como carragenina o aceite de crotón. Moreno (1993), sugiere que el mecanismo es el bloqueo directo de la PLA_2 que cataliza la liberación del ácido araquidónico, como también otros pasos que involucran la liberación de eicosanoides como las vías de la cicloxigenasa y lipoxigenasa.

Se ha demostrado por dicroísmo circular, que el ácido aristolóquico forma un complejo 1:1 con fosfolipasa A_2 de los venenos, actuando como un inhibidor no competitivo de la enzima y provocando un cambio significativo de la estructura secundaria de la proteína, caracterizado por un incremento aparente de la α -hélice, sin modificación detectable de su estructura terciaria. Inhibe por lo tanto la inflamación y el dolor (Ricciardi, 2005).

Inhibe la actividad lítica de 3 fosfolipasas A_2 del veneno de *Trimeresurus flavoviridis*, sobre todo en fosfolipasas básicas y la actividad lítica y edematosa de la fosfolipasa del veneno de *Vipera russelli*. Se encuentran generalmente acompañados por aristolactamas: E y AIIIA-6- α - β -D-glucósido.

Figura 19



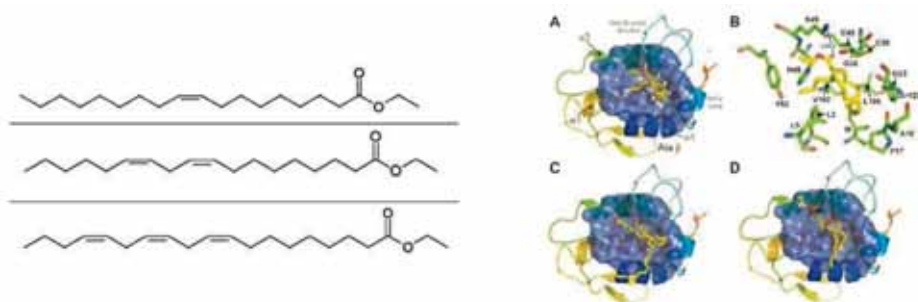
El ácido aristolóquico es altamente tóxico e irritante de las mucosas y a altas dosis emetocátrico, pudiendo conducir a parálisis respiratoria. Es nefrotóxico y carcinógeno. Los ácidos aristolóquicos I y II son mutagénicos y carcinógenos con elevado riesgo de cáncer uretral, por lo cual el Ministerio de Salud de la República Federal de Alemania ha eliminado del mercado todas las drogas conteniendo ácido aristolóquico aun en concentraciones homeopáticas. Son muy poco solubles en agua,

lo que explicaría que no se haya informado de casos de toxicidad por ingestión de decocciones, pero sí en caso de consumo de hierbas como suplemento dietario. Son solubles en alcohol. Pasa a la leche materna. Solo se admite su uso tópico en acné, fístulas cutáneas, ulceraciones dérmicas, heridas, forúnculos, herpes (Ricciardi, 2000).

b. *Ácidos grasos*

El *éster* cis octadeca-9-enoato de etilo y otros *ésteres* presentes en la fracción 3 de *Murraya paniculata* bloquean el canal hidrofóbico de la PLA₂, inhibiendo su acción (Lobo *et al.*, 2010).

Figura 20. A y B. Docking del cis octadeca-9-enoato de etilo (1) en el canal hidrofóbico de la fosfolipasa A₂ de *Bothrops asper*. C y D. comparación con la unión del ácido esteárico y la 1-O-octil-2-heptilfosfonil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina.



Fuente: Lobo *et al.* (2010)

Otros compuestos

También los polisacáridos pueden exhibir actividades antiinflamatorias e inmunomoduladoras, utilizándose como alexíteras por ejemplo *Casearia sylvestris* con una mezcla de polisacáridos, *Calendula officinalis* con heteroglicanos, etc. Además, se han aislado compuestos activos a partir de microorganismos como *Aspergillus* sp. y *Penicillium* sp.

En el mar, se ha aislado un sesteterpeno de la esponja *Luffariella variabilis*, activo contra *Bungarus multicinctus* (neutraliza la b-bungarotoxina) y contra cobras (inhibe la fosfolipasa A₂).

También algunos animales tienen proteínas en el suero que los protegen contra el veneno de serpientes como algunos *Didelphis* spp. (zarigüeyas). *D. marsupialis* es resistente al veneno de *Bothrops* debido a la presencia de la proteína antimiotóxica DM64 en el suero. DM64 neutraliza *in vitro* la citotoxicidad e *in vivo* la miotoxicidad de las miotoxinas I (mt-I/Asp49) y II (mt-II/Lys49) del veneno de *B. asper* (Rocha *et al.*, 2002). La misma fracción neutralizante se ha encontrado en la leche de *D. marsupialis*, lo cual representa una protección adicional de los neonatos contra el veneno de *B. jararaca* (Jurgilas *et al.*, 1999). DM43 inhibe la actividad fibrinogenolítica de la botrolisina y jararagina y forma un complejo estable con ambas metaloproteinasas. Es inefectiva con atrilisina c

o A; no se observa formación de complejos con jararagina c lo cual indica el rol esencial del dominio de la metaloproteinasa para que exista interacción (Neves-Ferreira *et al.*, 2002).

En conclusión, descartando las llamadas mordeduras blancas o mordeduras secas, en las cuales el ofidio no inyecta veneno, lo cual se estima que ocurre en un 30-35% de los casos y en las que el peligro es de infección o tétanos, es evidente que los constituyentes de algunas especies vegetales presentan interacción con los venenos que puede alterar su toxicidad (Ricciardi, 2005). En general, se piensa que el efecto protector es por la interacción de las toxinas y enzimas del veneno que son fundamentalmente proteínas y péptidos, con las sustancias alexitéricas. Los sitios vulnerables podrían ser por lo tanto:

- *el bloqueo* del o los sitios receptores,
- *el secuestro* de metales necesarios para el normal funcionamiento de las metaloproteinasas por ejemplo el zn. Uno de los ejemplos mejor estudiados es la acción de la heparina que neutraliza a la miotoxina II del veneno de *Bothrops asper* (fosfolipasa A₂) por formación de un complejo macromolecular. Heparina se une al sitio catiónico de la región de residuo 115-129, con posible contribución de lisina 36 y 38 de la fosfolipasa, sitio responsable de la acción citotóxica (Lomonte *et al.*, 1994).
- *otro elemento común* es que poseen actividad antiinflamatoria (*Anacardium occidentale*, *Argemone mexicana*, *Boswellia serrata*, *Brunfelsia uniflora*, *Capparis* sp., *Casearia sylvestris*, *Cyperus rotundus*, *Dolichos lablab*, *Ficus carica*, *Morus alba*, *Prosopis spicigera*, *Santolina chamaecyparissus*, *Securidaca longepedunculata*, *Stachytarpheta dichotoma*, *Terminalia* sp., *Withania somnifera*, *Zanthoxylum* sp (Houghton, 1993) e inmunoestimulantes (*Aristolochia* sp. (ácidoaristolóquico), *Stephania tetrandra* (cefarrantina), *Tylophora ovata* (tiloforina), Algunas *Asteraceae* (lactonas sesquiterpénicas), *Echinacea angustifolia* (polisacáridos, Houghton, 1993), existiendo un fuerte paralelismo entre la capacidad de las plantas y sus componentes químicos para neutralizar las acciones de los venenos y las propiedades antiinflamatorias y antihepatotóxicas, lo cual sugiere cierta analogía entre los mecanismos que gobiernan estas actividades.
- *algunas no actúan directamente* sobre el veneno pero sí sobre alguno de los síntomas como dolor (*Papaver somniferum*), hemorragia, infección, etc., como por ejemplo, los pterocarpanos prenilados erithrabyssina-II que tienen actividad antimicrobiana (evitando la septicemia, posible causa de mortalidad en los envenenamientos botrópicos), algunos coumestanos con acción antihepatotóxicas y regenerativas del hígado, tranquilizante como la reserpina de *Rawolfia* spp. (Reyes Chilpa y Jiménez Estrada, 1995).

- *interacción antígeno- anticuerpo* como en el caso de las proteínas del extracto acuoso de semillas de *Mucuna pruriens* y las enzimas del veneno de *Echis carinatus* (Guerranti *et al.*, 2002).
- *además, algunas plantas son utilizadas como alexíteras* debido al gran número de componentes activos que poseen, por ejemplo *Citrullus colocynthis* contiene sitosterol, espinasterol, ácidos cafeico, ferúlico y clorogénico, quercitina y rutina; *Eclipta prostrata* con sitosterol, estigmasterol, b-amirina, apigenina, luteolina, wedelolactona, ácido wedelico y desmetilwedelolactona; *Euphorbia hirta* con sitosterol, estigmasterol, camfesterol, cicloartenol, friedelina, a-amirina, b-amirina, taraxerol, taraxenona, ellagitaninos y glucósidos flavonoides rhamnetina y quercetina, entre otras.

Actividad alexitérica de plantas autóctonas

En Uruguay y Argentina, no existen estudios científicos relacionados, excepto los realizados por nuestro grupo de investigación (Facultad de Química, Udelar-Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura, UNNE), detectando actividad alexitérica contra el veneno de especies de *Bothrops* en plantas de la región (Dellacassa *et al.*, 2012).

Las especies vegetales estudiadas se seleccionaron teniendo en cuenta los antecedentes etnobotánicos disponibles en la bibliografía. Luego de una adecuada prospección geográfica, se recolectaron las especies y se depositaron en herbario de referencia ejemplares testigos. El material vegetal se secó por venteo en el laboratorio, separándose en sus partes constituyentes.

El material vegetal fue molido y tamizado (tamiz 12) para preparar por maceración durante 24 h los extractos acuosos (Melo *et al.*, 1994); y por maceración de 48 h los extractos alcohólicos (Otero *et al.*, 2000) y hexánicos. Los filtrados se desecaron a presión reducida y se calculó su rendimiento.

Aquellos ejemplares correspondientes a especies aromáticas fueron también procesados para obtener los aceites esenciales por destilación por arrastre con vapor de agua.

Por otra parte, personal capacitado del Serpentario Corrientes obtuvo un *pool* de veneno de varios ejemplares de *Bothrops diporus* (para evitar particularidades o variaciones genéticas) por expresión manual siguiendo la técnica de ordeño. El veneno se desecó a presión reducida y se pesó, guardándolo en freezer hasta su uso.

La actividad alexitérica se evaluó utilizando como herramienta la electroforesis SDS-PAGE (Camargo *et al.*, 2011) tanto para los extractos vegetales como para los aceites esenciales. Se utilizaron geles de separación al 12% y de *stacking* al 4%. Se consideraron como activos aquellos extractos/aceites que modificaron el patrón electroforético del veneno luego de la incubación durante 30 minutos a 37 °C mediante la disminución o desaparición de bandas del veneno o la aparición de nuevas bandas a distinto peso molecular (PM).

Se evaluó la inhibición de la actividad coagulante utilizando la técnica del plasma recalificado (Iovine y Selva, 1985), considerándose activos aquellos que prolongan el tiempo de coagulación hacia valores normales y se cuantifican en porcentajes de recuperación.

Para el estudio de la inhibición de la actividad hemolítica se utilizaron placas de agar sangre-fosfatidilcolina (Gutierrez *et al.*, 1988; Otero *et al.*, 1995).

Se evaluó la capacidad de inhibir la actividad proteolítica del veneno mediante SDS-PAGE con caseína (adaptaciones de las técnicas descritas por Pardo y Natalucci, 2002; Gay *et al.*, 2004), utilizando gel de separación al 10% y de *stacking* al 4%.

Posteriormente se fraccionaron los extractos de dos especies que demostraron actividad en todas las pruebas de inhibición: *Nectandra angustifolia* y *Mikania micrantha*. Para ambos casos se utilizó el extracto alcohólico de partes aéreas (Na2 y MM2). Se realizó el fraccionamiento bioguiado mediante cromatografía *flash* en columna utilizando una serie elutrópica de polaridad creciente (hexano, acetato de etilo, metanol) y sílica gel *flash* (60 0,04 - 0,063 mm, MN). El eluido se reunió en fracciones con igual perfil en cromatografía en placa delgada TLC, con cromatofolios de sílica gel GF y utilizando acetato de etilo-hexano (1+1) como solvente de corrida. Se observó a 254 y 365 nm y se asperjó el reactivo universal anisaldehído-ácido sulfúrico. Posteriormente se realizó el seguimiento de la actividad biológica de cada una de las fracciones mediante SDS-PAGE.

Las fracciones enriquecidas en compuestos activos obtenidas con el método anterior fueron testeadas *in vivo* mediante inhibición de la actividad letal.

Cuadro 3. Actividades de las distintas especies vegetales contra el veneno de *B. diporus*

Especie vegetal Esencias/Extractos	SDS-PAGE	Inhibición de la actividad hemolítica	Inhibición de la actividad coagulante	Inhibición de la actividad proteolítica
<i>Aloysia citriodora</i> Palau (CTES 9) cedrón, erva cidreira, lemon verbena (Cáceres <i>et al.</i> , 2012a; Cáceres <i>et al.</i> 2012b, Cáceres <i>et al.</i> , 2012c)				
Esencia directa	sí (1:10)*	sí 20%** (1:20)	sí 58% (1:10)	sí (1:120)
Esencia de aguas	sí (1:10)	sí 20% (1:20)	sí 92% (1:10)	sí (1:120)
Extracto acuoso de hojas	no	no	sí 9% (1:2,5)	no
Alcohólico de hojas	no	sí 20% (1:20)	sí 18% (1:2,5)	sí (1:120)
Hexánico de hojas	no	sí 20% (1:20)	sí 18% (1:2,5)	sí (1:120)
<i>Aristolochia gibertii</i> Hook. (CTES 6832) ysypo mil hombres, patito (Torres <i>et al.</i> , 2012a)				
Extracto acuoso de hojas	sí (1:10)	no	sí 3,5% (1:7)	no
Acuoso de tallos	no	no	no	no
Acuoso de raíces	no	no	no	no
Alcohólico de hojas	sí (1:10)	no	sí 20% (1:3)	sí (1:150)
Alcohólico de tallos	sí (1:10)	no	no	sí (1:150)
Alcohólico de raíces	sí (1:10)	no	no	sí (1:100)
<i>Aristolochia elegans</i> Mast. (CTES 7097) mil hombres, patito. (Torres <i>et al.</i> , 2012a)				
Extracto acuoso de hojas	sí (1:10)	no	no	no
Acuoso de tallos	sí (1:10)	no	no	no
Acuoso de raíces	sí (1:10)	no	no	no
Alcohólico de hojas	sí (1:10)	no	sí 31% (1:20)	sí (1:120)
Alcohólico de tallos	sí (1:10)	no	no	sí (1:120)
Alcohólico de raíces	sí (1:10)	no	sí 42% (1:40)	sí (1:80)
<i>Asclepias curassavica</i> L. (CTES 11) kaá-mará taí, vence veneno, bandera española. (Torres <i>et al.</i> , 2008; Ricciardi Verrastro <i>et al.</i> , 2012b)				
Extracto de partes aéreas acuoso	no	no	no	no

Especie vegetal Esencias/Extractos	SDS-PAGE	Inhibición de la actividad hemolítica	Inhibición de la actividad coagulante	Inhibición de la actividad proteolítica
Partes aéreas alcohólico	sí (1:10)	no	no	sí (1:160)
Partes aéreas hexano	sí (1:10)	no	sí 28% (1:30)	sí (1:160)
<i>Asclepias mellodora</i> A. St.-Hil. (CTES *) yerba de la víbora, mbói ka'á, yerba del colmillo de la víbora, solimán de la tierra, leche de víbora, mercurio. (Ricciardi Verrastro <i>et al.</i> , 2012a; Ricciardi Verrastro <i>et al.</i> , 2012b)				
Extracto de partes aéreas acuoso	sí (1:10)	no	no	no
Partes aéreas alcohólico	sí (1:10)	no	sí 28% (1:5)	sí (1:160)
Partes aéreas hexano	sí (1:10)	sí 18% (1:20)	sí 71% (1:5)	no
Raíz acuoso	sí (1:10)	no	sí 45% (1:5)	no
Raíz alcohólico	sí (1:10)	no	sí 55% (1:5)	sí (1:160)
Raíz hexano	sí (1:10)	sí 18% (1:20)	no	sí (1:160)
<i>Cissampelos pareira</i> L. (CTES 6831, 7092) Ka'apeva; ka'á-peva; ysipó morotí; pau de cobras; mil hombres; caá-pebá; cipó (Torres <i>et al.</i> , 2007a; Torres <i>et al.</i> , 2007b)				
Extracto de hojas acuoso	no (1:10)	no	no	no
Raíces acuosos	no (1:10)	no	no	no
Hojas alcohólico	sí (1:10)	sí 35% 1:10 100% 1:30	no	sí (1:80)
Tallos alcohólico	sí (1:10)	sí 25% 1:10	no	sí (1:80)
Raíces alcohólico	sí (1:10)	sí 25% 1:10	no	sí (1:80)
<i>Dorstenia brasiliensis</i> Lam. (CTES 7093) contrayerba; taropé; kaapiá; higuierilla (Torres <i>et al.</i> , 2008)				
Extracto de hojas acuoso	sí (1:10)	no	no	no
Hojas alcohólico	sí (1:10)	no	no	sí (1:80)
Raíz acuoso	sí (1:10)	no	no	no
Raíz alcohólico	sí (1:10)	no	sí 38% (1:10)	sí (1:80)
<i>Eclipta prostrata</i> (L.) L. (CTES 1912) Tangará-ka'á; eclipta; hesillo (Torres <i>et al.</i> , 2007c)				
Extracto de partes aéreas acuoso	sí (1:10)	no	no	no
Partes aéreas alcohólico	sí (1:10)	no	no	sí (1:80)
Partes aéreas hexano	sí (1:10)	sí 30% (1:20)	sí 38% (1:10)	no
<i>Iresine diffusa</i> Humb. & Bonpl. ex Willd (CTES 7099) Mbói-ka'á; yerba del colmillo de la víbora; solimán de la tierra (Torres <i>et al.</i> , 2008)				
Extracto de partes aéreas acuosa	sí (1:10)	no	no	no
Partes aéreas alcohólica	sí (1:10)	no	sí 30% (1:10)	sí (1:80)
<i>Mikania micrantha</i> Kunth (CTES 1907) guaco (Camargo <i>et al.</i> , 2008; Torres <i>et al.</i> , 2010)				
Esencia directa	sí (1:10)	no	sí 100% (1:1000)	sí (1:600)
Partes aéreas acuoso	no	no	no	no
Partes aéreas alcohólico	sí (1:10)	no	sí 30% (1:10)	sí (1:200)
Partes aéreas hexano	sí (1:10)	sí 40% (1:20)	sí 60% (1:20)	sí (1:160)

Espece vegetal Esencias/Extractos	SDS-PAGE	Inhibición de la actividad hemolítica	Inhibición de la actividad coagulante	Inhibición de la actividad proteolítica
Raíz acuoso	sí (1:10)	sí 27% (1:20)	sí 40% (1:20)	no
Raíz alcohólico	no	no	sí 30% (1:10)	sí (1:400)
Raíz hexano	sí (1:10)	no	sí 30% (1:20)	sí (1:160)
<i>Mikania periplocifolia</i> Hook. et Arn. (CTES 1911) Guaco; matacampo; Ysyó caty; Ysyópysy (Torres <i>et al.</i> , 2008; Torres <i>et al.</i> , 2010)				
Esencia directa+aguas	sí (1:10)	no	sí 52% (1:1800)	sí (1:160)
Partes aéreas acuoso	no	no	sí 32% (1:15)	no
Partes aéreas alcohólico	sí (1:10)	sí 25% (1:20)	sí 54% (1:10)	sí (1:160)
Partes aéreas hexano	no	no	sí 54% (1:20)	no
Raíz acuoso	sí (1:10)	no	no	no
Raíz alcohólico	no	no	no	sí (1:160)
Raíz hexano	sí (1:10)	sí 25% (1:20)	no	sí (1:160)
<i>Mikania coridifolia</i> (L.f.) Willd. (CTES 2461) (Camargo <i>et al.</i> , 2010; Torres <i>et al.</i> , 2010)				
Esencia directa + aguas	sí (1:10)	no	sí 56% (1:2000)	sí (1:160)
Partes aéreas acuoso	sí (1:10)	no	sí 33% (1:20)	no
Partes aéreas alcohólico	sí (1:10)	no	sí 30% (1:30)	sí (1:160)
Partes aéreas hexano	sí (1:10)	no	sí 94% (1:20)	no
Raíz acuoso	sí (1:10)	no	no	no
Raíz alcohólico	no	no	sí 35% (1:20)	sí (1:160)
Raíz hexano	sí (1:10)	sí 25% (1:20)	sí 51% (1:20)	sí (1:160)
<i>Nectandra angustifolia</i> (Schrad.) Nees & Mart. ex Nees (CTES 7094) Ajuí; ajuý; laurel amarillo, aju y hú, laurel-hu, laurel del río, laurel mini, louro-branco. (Torres <i>et al.</i> , 2010; Torres <i>et al.</i> , 2010b; Torres <i>et al.</i> , 2011b; Torres, <i>et al.</i> , 2011c; Torres, <i>et al.</i> , 2011d; Torres, 2012; Torres <i>et al.</i> , 2012b; Torres <i>et al.</i> , 2012c)				
Esencia directa	sí (1:10)	no	sí 37% (1:700)	sí (1:400)
Esencia de aguas	sí (1:10)	no	sí 100% (1:700)	sí (1:240)
Extracto acuoso de hojas	sí (1:10)	no	sí 30% (1:20)	no
Alcohólico de hojas	sí (1:10)	sí 100%(1:30)	sí 83% (1:40)	sí (1:200)
Hexánico de hojas	sí (1:10)	no	sí 52% (1:40)	sí (1:300)
<i>Nectandra megapotamica</i> (Spreng.) Mez (CTES 7104) laurel negro, canela preta, laurel hu, canela imbuia, canela-fedorenta, ayuí-hú, laurel hú, laurel canela, laurel amarillo, canela negra, laurel, ayuy morotí, ayuy pará, laurel ayuy, laurel blanco, laurel overo (Torres <i>et al.</i> , 2010; Torres <i>et al.</i> , 2012b; Ricciardi Rossetti <i>et al.</i> , 2008a)				
Esencia directa	sí (1:10)	no	no	sí (1:200)
Esencia de aguas	sí (1:10)	no	sí 82% (1:500)	sí (1:300)
Extracto acuoso de hojas	sí (1:10)	no	no	no
Alcohólico de hojas	sí (1:10)	no	no	sí (1:160)
Hexánico de hojas	sí (1:10)	no	sí 50% (1:80)	sí (1:120)

Especie vegetal Esencias/Extractos	SDS-PAGE	Inhibición de la actividad hemolítica	Inhibición de la actividad coagulante	Inhibición de la actividad proteolítica
<i>Sapium haematospermum</i> Müll. Arg (CTES 7098) Kurupika'y; lecherón; pega pega (Torres <i>et al.</i> , 2008)				
Extracto de corteza acuoso	sí (1:10)	no	no	
Corteza alcohólico	sí (1:10)	no	sí 51% (1:50)	sí (1:80)
Hojas acuoso	sí (1:10)	sí 32% (1:10)	no	no
Hojas alcohólico	sí (1:10)	no	sí 47% (1:40)	no
<i>Trixis divaricata</i> (Kunth) Spreng. (CTES 1908) (Dellacassa <i>et al.</i> , 2008; Ricciardi Rossetti <i>et al.</i> , 2008b)				
Esencia directa	sí (1:10)	no	sí 77% (1:10)	sí (1:80)
Esencia de aguas	sí (1:10)	no	sí 92% (1:10)	sí (1:80)
Extracto de partes aéreas acuoso	no	no	no	no
Partes aéreas alcohólico	no	no	no	sí (1:80)
Partes aéreas hexano	sí (1:10)	no	sí 60% (1:10)	no
Raíz acuoso	no	no	no	no
Raíz alcohólico	no	no	no	sí (1:80)
Raíz hexano	no	no	no	sí (1:80)

* Entre paréntesis (x:y) relación veneno: extracto.

** % porcentaje de inhibición del extracto/aceite.

Para SDS-PAGE como *screening* y para actividad proteolítica se considera activo *sí* y no activo *no*. Sin porcentajes

Fuente: Torres, 2011b

Antecedentes etnobotánicos de las especies

Aloysia citriodora: cedrón, hierba luisa, yerba luisa (Jozamí y Muñoz, 1982); cedrón, cedrón de Castilla (Martínez Crovetto, 1981); en Brazil: salvia limao, erva cidreira, cidrinha, cidro (González Torres, 1992); cedrón, cedrón de Castilla, verbena aromática, yerba Luisa, yerba de la princesa, hierba Luisa, María Luisa, verbena olorosa (Manfred, 1977).

Esta especie es muy utilizada en etnomedicina para preparar infusiones con las hojas, flores y brotes para el tratamiento de algunas enfermedades como indigestión, diarrea, vómitos, ansiedad, afecciones nerviosas (Cáceres, 1996); digestiones lentas, enfermedades respiratorias como asma, tos y fiebre (Bassols y Gurni, 1996). La infusión de hojas es usada como estimulante (Fester *et al.*, 1961), antimalárico, antineurálgico y tónico (Bassols y Gurni, 1996, Gupta, 1995, Toursarkissian, 1980); antiinflamatorio, analgésico, antipirético, tónico y estimulante (Oliva *et al.*, 2010); antimicrobiano, antimicótico (Sartoratto *et al.*, 2004; Oksay *et al.*, 2005) y antioxidante (Stashenko *et al.*, 2003). El aceite esencial es utilizado en perfumería y en la industria de aromas (Cáceres, 1996). En Argentina está incluida en la Farmacopea y en el Código Alimentario Argentino,

mientras que en Europa el uso en perfumería es restringido debido a reportes de propiedades fotosensibilizantes (Bandoni, 2000). Solo en algunos artículos es mencionada como antiveneno en caso de accidentes ofídicos, en forma de infusiones y cataplasmas (Manfred, 1977; Duke *et al.*, 2009).

Composición química: aceite esencial con 1,8-cineol (15%), limoneno (1%), α -pineno (0,5%), citral a (37%), citral b (22%), geraniol (11%), linalol (1%) (Terblanché y Kornelius, 1996); el aceite esencial de flores de Córdoba (Argentina): limoneno (9%), mirceno (2%), α -pineno (1%), α -tuyona (17%), mircenona (31%), alcanfor (5%), carvona (2%), lippifoli-1(6)-en-5-ona (africanona) (9%) y espatulenol (3%) (Zygadlo *et al.*, 1995); neral (12%), geranial (17%), limoneno (38%-22%), variable según el estado vegetativo; sabineno (15%-6%) y la fracción sesquiterpénica (30%-10%) con β -cariofileno, biciclogermacreno, óxido de cariofileno y otros (Ricciardi Rossetti *et al.*, 2011). La infusión de hojas de esta especie contiene 400 mg/l de verbascósido y 100 mg/l de luteolin 7-diglucuronido; la misma infusión rinde 51% de aceite esencial con 77% de citral, contenido mucho mayor que el original de las hojas (41%) (Carnat *et al.*, 1999).

Cissampelos pareira, ka'apeva, ka'á-peva, ysyπό-morotí, caá pebá, zarza, pareira brava, mil hombres, pareira falsa, hoja de mono, butua, sacha-parra, pareira brava, bejuco de ratón. Se utiliza el cocimiento de las raíces o el polvo en cataplasma contra picaduras de víboras.

Según el Hno. Pedro de Montenegro:

... porque además de ser tan parecido a ellas en sus partes como dejo dicho, es el más eficaz remedio que ellos usan en las mordeduras de todas las serpientes que arrastran por el suelo dando a beber su cocimiento y poniendo sus ojas molidas, o el polvo de su raíz sobre las heridas de suerte que el que la trahe consigo no teme a las mas malignas y ponzoñosas víboras y cerastes (sic)...

Manfred: «el jugo externamente contra las picaduras de víboras».

Jolis: «la negra es más eficaz cuando se come parte de sus hojas o se toma su polvo disuelto en un licor o se aplica machacada a la herida».

González Torres: «se toma la infusión de raíz y se aplica localmente cataplasmas de polvo o machacado de raíz y de hojas».

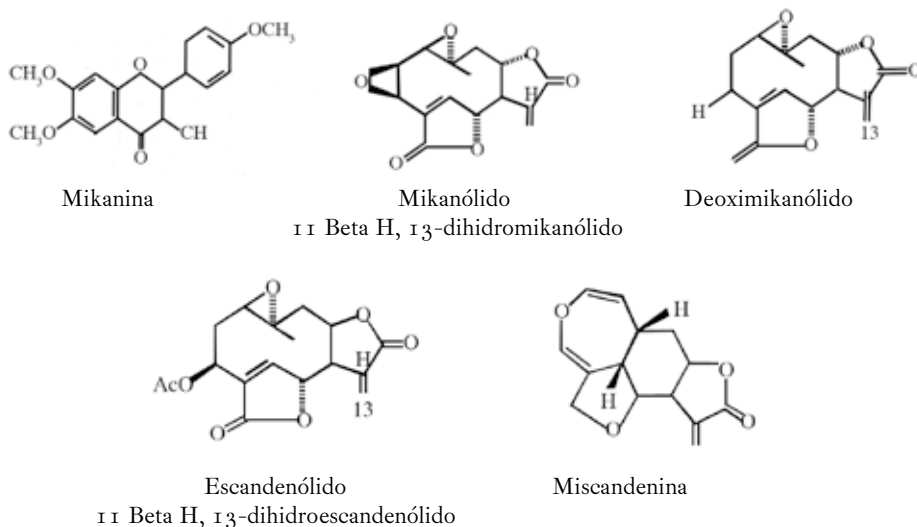
En las hojas posee cissampeloflavona, dímero chalcón-flavónico; hayatina alcaloide bis bencilisoquinoleínico, hayabinina, alcaloides berbirínicos palmatina, hayatinina, hayatidina, insularina, pelosina, curina, 4-metilcurina, cicleanina, ciclanodina, isochondodendrina, tetrandina, dimetiltetrandrinio, alcaloides isoquinoleínicos del grupo de la berberina e isoberberina, alcaloides protoberberínicos berberina y en la raíz hayatidina; hayatinina con actividad curarizante, laudanosina y cissampelina, alcaloides tropolisoquinoleínicos pareirubrininas A y B, grandirubrina e isoimerubrina, pareitropona, bulbocapnina, corituberina, dicentrina, dehidrodicentrina, magnoflorina y nuciferina, todos alcaloides aporfínicos y pareirina, sangolina (Ricciardi, 2005).

La pasta obtenida de las raíces es usada en forma tópica para fístulas, prurito, desórdenes cutáneos y la intoxicación por venenos de serpientes (Amresh *et*

al., 2003), toda la planta puede considerarse que posee actividades antiinflamatorias siendo muy potente el extracto etanólico de raíces (Amresh *et al.*, 2007).

Mikania spp. guaco, las especies se reputan como antifúngicas, antimicrobianas, broncodilatadoras, antialérgicas, antiinflamatorias en general y útiles contra mordeduras de víboras e insectos ponzoñosos, particularmente con actividad antiinflamatoria específica contra veneno de *Bothrops jararaca* (Fierro *et al.*, 1999; Maiorano *et al.*, 2005).

Figura 21



Entre sus componentes se destacan los diterpenos y las lactonas sesquiterpénicas tales como: mikanina, micanólido, dihidromicanólido, miscandenina, escandenólido y dihidroescandenólido; resultando algunos de estos compuestos tóxicos y carcinogénicos (Lobitz *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 2005).

En estudios realizados en China y en Brasil respecto de la actividad sobre la oviposición de insectos del aceite esencial de *M. micrantha* fueron identificados 22 componentes; siendo los principales constituyentes monoterpenos y sesquiterpenos (Zhang *et al.*, 2005; Limberger *et al.*, 2001; Carollo, 2008).

Poseen también alcaloides y lactonas sesquiterpénicas como micanólido, dihidromicanólido, deoximicanólido, miscandenina, dehidroescandenólido y anhidroescandenólido, algunas con efectos tóxicos y carcinogénico (Ricciardi, 2000).

Asclepias mellodora, hierba de la víbora, yerba de la serpiente, mboy-caá, yerba del colmillo de la víbora, soliman de la tierra: posee un glicósido cardenólico desglucouzarina, vincetoxina y un principio amargo la asclepiadina. Los cardenólidos inhiben la Na-K-ATPasa afectando la conductividad y contractilidad miocárdica. Es una especie tóxica para el ganado.

Según el Hno. Pedro de Montenegro:

si luego que picase o mordiere la víbora se aplica a las heridas, o dentadas la leche o recina (sic) de esta yerba apaga el veneno de suerte que no corre, ni hace

daño alguno, y si sus ojas (sic) machacadas y puestas sobre la herida o heridas en veinte y cuatro horas las cierran, dejando libre al mordido... Bebido el vino en que haiga (sic) estado la yerba en remojo, o mezclado con su zumo, es contra todas las mordeduras de las sabandijas y serpientes venenosas

Sanchez Labrador:

es remedio prontísimo contra picaduras de las víboras o de otros animales ponzoñosos. Machácase y se pone encima o se masca para el mismo efecto de aplicarla seca y reducida a polvo, dando un licor conveniente un puñado, fortalece el corazón y restablece las fuerzas perdidas por el veneno (sic).

Dobrizhoffer: «los abipones mastican las hojas, tragan su jugo y aplican sobre la mordedura las hojas masticadas».

Aristolochia spp. Se conocen como mil hombres, patito, contrahierba. Poseen amplia fama como alexíteras en decocciones de la raíz y bebidas o como polvo agregado al vino y luego aplicado a la picadura (Gonzalez Torres, 1992). Remedio infalible para las picaduras de víboras según Bonpland y Azara (Ricciardi, 2000). Las especies nombradas como alexitéricas son: *A. fimbriata* en infusiones y captasmas; *A. gibertii*; *A. labiosa*; *A. macroura* como antídoto del veneno de cobras; *A. serpentaria* a cuyas raíces se les atribuía la propiedad de ahuyentar las víboras y curar las picaduras y *A. triangularis* contra mordeduras de cobra (Ricciardi, 2005).

Poseen un aceite esencial de olor generalmente alcanforado y se caracterizan por la presencia de los ácidos aristolóquicos, ácidos fenantren carboxílicos sustituidos, a veces acompañados por aristolactamas o por un germanólido la aristolona. El aceite esencial de hojas de *a. elegans* es rico en hidrocarburos sesquiterpénicos, predominando el β -cariofileno, isocariofileno y biclicogermacreno, mientras que el aceite de otras partes de la planta como tallos y raíces se enriquece en sesquiterpenos oxigenados como *E*-nerolidol (Vila *et al.*, 1997).

Aristolochia elegans. Es una enredadera originaria de Brasil, se la encuentra en la Mesopotamia y Paraguay. Usada en México contra venenos de víboras (Argueta *et al.*, 1994), comparte con las otras Aristoloquias la actividad antiinflamatoria, la inhibición de las fosfolipasas con lo que atenúa la acción de los mediadores de la inflamación y el dolor, y actividad anticolinérgica.

En hojas posee sesquiterpenos: β -cariofileno, isocariofileno y biclicogermacreno aristolórido. Alcaloides: bis-1-benciltetrahidro isoquinolina puenteado por un éter difenilo: (-)-(R,R)-7'-*o*-metilcuspidatina; bisbencilisoquinolínico: pericampilinona A; isoquinolinicos: coridalina, thalifolina, northalifolina, N-metil caridalina; benzoil benzil tetrahidroisoquinolin éter N-óxido: aristoquinolina A, aristoquinolina B, y aristoquinolina C. Éter bifenílico: aristogina F; dos porfirinas: aristofila-A y aristofila-B; (-)-temuconina, tetralonas: aristelegona-A, aristelegona-B, aristelegona-C, y aristelegona-D; éteres bifenílicos: aristogina-A, aristogina-B, aristogina-C, aristogina-D y aristogina E; tres lignanos: aristelegina-A, aristelegina-B, y aristelegina-C y un dímero: aristolina (diterpeno unido al ácido aristolóquico); aristolactamas: aristolactama-E y aristolactama-AIIIa-6-*o*- α -D-glucósido,

9-metoxiaristolactama I, aristolactama AII, isoaristolactama AII, aristolactama AIIIa, aristolactama c n-β-D-glucósido; ácidos aristolóquicos: ác. aristolóquico I, ácido aristolóquico D. aristolósido; éteres metílicos de los ácido aristolóquicos: éster metílico del ácido aristolóquico Ia, éster metílico del ácido aristolóquico IV, éster metílico del ácido aristolóquico D.

En raíz y tallos: (*e*)-nerolidol; diterpenos: ent-kaurano-16α,17-diol, lignanos: (-)-cubebina, α-metil cubebina, β-metil cubebina, (-) hinokinina, (-)-5"-metoxihinokinina. Ácido 4-metoxi-3,4'-oxidibenzóico; alcaloides: (-)-kobusina, (+)-medioresinol (Ricciardi, 2005).

Aristolochia gibertii, ysyπό mil hombres, patito, ypemί, milhombres, contrayerba. Extractos metanólicos en ensayos sobre membranas de ratones en sistemas generadores de radicales libres, mostraron protección contra la peroxidación lipídica enzimática y no enzimática.

Dorstenia brasiliensis, contrayerba, taropé.

Hno. Pedro de Montenegro:

tiene virtud potentísimas contra las mordeduras de las fieras, que arrojan de sí ponzoña fría, como es la víbora, culebra, áspid, ceraste, escuerzos, zapos y semejantes. Poniendo su raíz machacada sobre la mordedura de la víbora, ataja el veneno que no corra, y lo estirpa, mayormente si ella es fresca o recién sacada y si luego al punto se pudiera hacer la bebida no correrá riesgo el mordido ecepto cuando mordiere en nervios, músculos o en venas y arterias que entonces aún la mejor triaca tiene bien que hacer (sic).

Sanchez Labrador transcribe de Pison: «cuando se aiga de usar como antiveneno en las picaduras de las víboras, se machaca toda la planta y se bebe el zumo exprimido, poniendo también unas gotas de él en la picadura o herida (sic)».

Matoso: «eficaz contra las mordeduras de víboras».

Sorarú y Bandoni: «el látex de sus hojas y raíz es antídoto contra mordeduras de víboras».

González Torres: «contra mordeduras de víboras venenosas y arañas; ... el cocimiento de las tuberosidades se ingiere y aplica localmente... decocción de las raíces al 20 o/00 como febrífugo, diurético y antídoto en picaduras de víboras... machacado de raíces en aplicaciones locales (sic)».

Domínguez: «la raíz es alexifármaco, diurética, sudorífica, emenagoga».

En raíces triterpenoides del tipo seco-adianano, cumarinas y furanocumarinas, 7-hidroxycumarina, marmina, psoraleno, bergapteno, 2'(1"-hidroxi-1"-metiletil)-psoraleno y bergapteno; en los rizomas: furanocumarina monoterpenoide, glucósidos de la hidroximarmesina, fenolina; en raíces dos triterpenoides del tipo 3,4-seco adianano los ácidos dorsténicos A y B, diterpeno del tipo isopimaradiénico, dorstenina, cayapina y contrayerbina, esteroides sitosterol, estigmasterol, 3-*o*-β-glucosilsitosterol.

Eclipta prostrata, eclipta, hesillo.

Constituyentes: coumestanos: wedelolactona, demetil wedelolactona, isodemetilwedelolactona, otros como α -formiltiertienilo, strychnolactona, β -sitosterol, nonacosanol, ácido esteárico, ácido laceroico, ácido 3,4-dihidroxi benzoico.

Iresine diffusa, yerba del colmillo de la víbora.

Nectandra angustifolia. Gonzalez Torres la cita como alexíttera. Conocida vulgarmente como laurel amarillo.

Sapium haematospermum, lecherón, pega-pega.

Parodi: «tomando la decocción del leño y aplicando el jugo viscoso sobre las heridas se evitan los funestos resultados consiguientes a la mordedura de las serpientes coral y cascabel».

Trixis divaricata, conocida en Brasil como solidônia, erva andorinha, erva-da-mulher, raíz de cobra, varvalhinha fue descripta por Pereira *et al.* (2005), como protector gástrico con efecto antiulceroso, utilizada como extracto hidroalcohólico.

Estudios *in vivo*: Inhibición de la actividad letal

Para determinarla se trabajó con ratones de 18-20 g, determinándose la DL₅₀ por el método de Spearman-Karber (WHO, 1981) con grupos de cuatro ratones inyectados por vía IP y registrando los resultados a las 48 h. Se tomaron los valores de DL₅₀ para *Bothrops diporus* de bibliografía (38,18 μ g).

Para disolver los extractos vegetales, dado su insolubilidad en agua, se utilizó PEG 400-ETOH-PBS (10:10:80). Los solventes PBS y PEG se esterilizaron por filtración y las soluciones a inyectar se prepararon en campana de flujo laminar.

En primer lugar se determinó el porcentaje de letalidad con una dosis de reto equivalente a 2DL₅₀ para observar aún pequeñas muestras de actividad, con el siguiente esquema: cuatro ratones inyectados con 2 DL₅₀ del veneno, 4 ratones inyectados con una dilución de fracción polar para observar la toxicidad aguda del extracto vegetal y 4 ratones inyectados con el sobrenadante de la incubación de una dilución de la fracción vegetal con 2 DL₅₀ del veneno 60 minutos a 37 °c para la observación de la inhibición de la actividad letal. Posteriormente se realizó la misma prueba para la dosis de reto sugerida por la OMS de 4DL₅₀.

Para *n. angustifolia* se trabajó con 8 mg y a las 48 h se observó el 100% de letalidad para los ratones inyectados con el veneno utilizando 2DL₅₀, 0% letalidad para los inyectados con la fracción y 0% de letalidad para los inyectados con veneno: fracción vegetal. Con 4DL₅₀, se observó 100% de letalidad para los ratones inyectados con el veneno, 0% letalidad para los inyectados con la fracción y 50% de letalidad para los inyectados con veneno: fracción vegetal.

Por lo tanto, 8 mg de la fracción polar del extracto alcohólico de *n. angustifolia* protege el 100% contra 2DL₅₀ del veneno y es la dosis efectiva 50 (DE₅₀) para 4DL₅₀ del veneno de yarará chica. Esta fracción además no presentó toxicidad aguda inyectada vía intraperitoneal (IP) (Torres *et al.*, 2012c).

Para *M. micrantha* se trabajó con 10 mg de la fracción y se observó la muerte del 100% de los ratones inyectados con el veneno a las 48 h; la muerte del 25% de los individuos inyectados con 10 mg de la fracción 4 y la muerte del 75% de los individuos inyectados con veneno: fracción vegetal.

Dosis iguales a 10 mg de fracción 4 por ratón, protegen al 25% de los individuos bajo estudio contra una solución constituida por dos veces la dosis letal 50 (2DL50) del veneno de *B. diporus*. Lamentablemente, a esa concentración, la fracción 4 ya manifiesta cierto grado de toxicidad, lo cual se pone de manifiesto a través del 25% de muertes observadas para los individuos del grupo de control negativo.

Esta observación tiene como consecuencia directa que no puedan incrementarse las concentraciones de fracción 4 a ensayar para ver si se logra un incremento en la tasa de protección.

Conclusiones generales

Los resultados obtenidos y la información presentada indican que, aunque la información es fragmentaria e incipiente, es posible realizar algunas generalizaciones:

1. Existen avances en la taxonomía de las plantas alexíteres. La importancia de las familias Asteraceae, Leguminosae y Euphorbiaceae es clara; sin embargo, es necesario identificar taxa de menor generalidad (tribus, por ejemplo).
2. Se han identificado algunos grupos de sustancias alexíteres de origen vegetal como isoflavonoides, alcaloides, triterpenoides y taninos. Los primeros parecen ser el grupo más definido. Se requieren, empero, de más estudios farmacológicos con una mayor homogeneidad en las metodologías empleadas.
3. Se han iniciado los estudios respecto al modo de acción de algunas sustancias alexíteres, sugiriéndose preliminarmente que estos podrían interactuar con algunas enzimas de los venenos. También es importante examinar sus efectos sobre síntomas secundarios al envenenamiento, los cuales podrían conferir un cierto valor terapéutico o de sobrevivencia.

En conclusión, es evidente que los constituyentes de algunas especies vegetales presentan interacción con las toxinas y enzimas del veneno que alteran su toxicidad.

Los extractos de plantas representan una fuente extremadamente rica en compuestos farmacológicamente activos, que podrían ser importantes en el desarrollo de nuevas terapéuticas. Por lo tanto, estas especies vegetales pueden ser una alternativa muy interesante al uso del suero antiveneno, en el entendido de que es necesario continuar el estudio exhaustivo de sus propiedades tanto medicinales como tóxicas para poder evaluar su uso y, de ser posible, aislar y evaluar los compuestos responsables de dicha actividad.

Mediante estas investigaciones ha sido posible validar científicamente el uso de algunas especies vegetales citadas por los aborígenes de la zona, con pruebas *in vitro* e *in vivo* que ponen de manifiesto la existencia de una evidente protección contra el veneno de *B. diporus*.

Se puede concluir que se dispone de una cantidad relevante de información como para establecer una base científica sobre el uso tradicional de las plantas contra mordeduras de serpiente.

En este sentido, es importante tener en cuenta que en general se considera que los llamados antídotos vegetales contra ofidios venenosos se pueden aplicar de dos formas:

- para neutralizar el veneno,
- para aliviar los síntomas o respuestas al veneno.

Sin embargo, el estado del conocimiento de que se dispone indica que, si bien un extracto vegetal puede actuar mitigando los efectos del daño producido localmente por acción del veneno ofídico, no es correcto afirmar que se dispone de alternativas al suero antiofídico.

Es decir que, el hecho de que los extractos de origen vegetal contengan una serie de metabolitos secundarios que pueden actuar neutralizando selectivamente algunas actividades enzimáticas del veneno de serpiente, los hace eficientes en el tratamiento de los efectos localizados del envenenamiento por mordedura de serpiente, pero solo actuando en forma complementaria a los sueros disponibles.

Anexo

Metodología de trabajo

Obtención de material vegetal y del veneno de víbora

Como en toda actividad de investigación, el primer paso implica una búsqueda bibliográfica exhaustiva de la especie vegetal a estudiar (familia, género, especies presentes en la región): usos etnomedicinales, nombre científico, sinónimos, nombres vulgares, propiedades atribuidas y confirmadas científicamente, propiedades tóxicas, etc. Se debe tener presente el órgano utilizado, ya que permitirá prever una recolección adecuada, cantidad y el tipo de extractos a obtener, así como la obtención del aceite esencial en caso de ejemplares de aromáticas.

Una vez completados los antecedentes, realizar una búsqueda en un herbario de referencia como por ejemplo el herbario CTES (IBONE) de las localidades donde se ha encontrado y recolectado la especie, para organizar su búsqueda.

Prospección del material vegetal en compañía de un Profesional Botánico. Llevar GPS para la determinación de las coordenadas de recolección, cuaderno de campo, tijeras de podar, pala de punta, botas, bolsas de arpillera, repelente, agua.

Proceder a la recolección del material vegetal siguiendo una técnica de muestreo adecuada al tipo de material. Colectar la cantidad necesaria y los órganos más importantes en bolsas de arpillera, teniendo en cuenta la preservación de la especie. Anotar todos los datos relevantes: ubicación, estado vegetativo, características del entorno, especies aledañas, etc.

Recolectar un ejemplar para depósito como testigo en herbario de referencia. Recordar que no debe ser estéril (debe tener flor, fruto o partes de estos).

Veneno ofídico

Se obtendrá por expresión manual siguiendo la técnica de ordeño por personal capacitado. Tener precaución que sea un pool de varios ejemplares de la especie a estudiar, para evitar particularidades o variaciones genéticas.

Figura 22



El veneno líquido así obtenido se deseca a presión reducida y se pesa. Se guarda en *freezer* hasta el momento de uso.

Preparación de extractos vegetales

Secar, por oreado, el material vegetal en condiciones controladas: colocar diarios en las mesadas y disponer el material separado de manera tal que pueda orearse. Mover el material esporádicamente, rotándolo para un secado homogéneo. Eliminar el material atacado por insectos/plagas.

El tiempo de secado depende de la naturaleza del material vegetal y de la humedad ambiente, generalmente es de 3 a 5 días.

Separar el material vegetal en sus partes componentes: raíces, partes aéreas, tallos, hojas. Moler con molinillo y tamizar hasta que pase tamiz 12.

Dividir en tres partes el material molido y pesar para luego calcular el rendimiento práctico.

Figura 23



Preparar:

- extracto acuoso: maceración durante 24 h con agua destilada (Melo *et al.*, 1994)
- extracto alcohólico: por maceración durante 48 h con etanol 96 ° (Otero *et al.*, 2000),
- extracto hexánico: por maceración durante 48 h con hexano.

Filtrar al vacío: el extracto acuoso se filtra sobre algodón, no con papel de filtro.

Desecar en rotavapor a presión reducida hasta residuo sólido en un erlenmeyero frasco colector tarado para sacar el rendimiento. No superar los 50 °c para evitar la pérdida de compuestos termolábiles o reacciones secundarias.

Pesar extracto.

Calcular rendimiento.



Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes: SDS-PAGE (Pilosof et al., 2000)

Preparación de las soluciones

1. Solución de Acrilamida-Bisacrilamida (\uparrow NEUROTÓXICO!)
Usar guantes y barbijo para la preparación de este reactivo. El monómero de acrilamida es neurotóxico, por lo tanto extremar los cuidados. Una vez formado el gel, la forma polimérica pierde la toxicidad. 30 g de Acrilamida, 0,8 g de Bisacrilamida, 80 ml de H_2O destilada y desionizada. Filtrar al vacío. Llevar a 100 ml volumen final.
2. *Buffer* electrodo pH= 8,3. (No usar el *buffer* recuperado luego de la electroforesis más de 5 veces).
3 g TRIS, 14,4 g glicina, 1 g SDS. Llevar a 1 l con H_2O destilada. Disolver los reactivos en 700 ml de agua destilada y luego agregar HCL 4N hasta pH 8,3. Llevar a volumen en matraz de 1 l.
3. *Buffer* gel de concentración *stacking* (4x) pH=6,8.
3 g TRIS, 30 ml H_2O destilada, 0,2 g SDS. Disolver en 40 ml de agua destilada y luego ajustar con HCL 4N el pH a 6,8. Llevar a 50 ml con H_2O en matraz.
4. *Buffer* gel de separación (10x) pH=8,8.
18,2 g TRIS, 40 ml H_2O destilada, 0,4 g SDS. Disolver en 80 ml de agua y ajustar con HCL 4N el pH a 8,8. Llevar a volumen en matraz de 100 ml con H_2O destilada.
5. *Buffer* muestra pH=6,8.
4 ml *Buffer stacking*, 4 ml glicerol, Azul de bromofenol punta de espátula, 3,36 g urea —mejora la visualización de las bandas—.
6. Persulfato de amonio
200 mg persulfato de amonio, 2 ml de H_2O destilada. Eliminar gas y congelar en eppendorf. Duración: 4 años.
7. Colorante.
1,25 g Coomassie blue R, 277 ml metanol, 46 ml Ácido acético glacial. Llevar a 500 ml H_2O destilada.
8. Decolorante.
70 ml Ácido acético glacial, 300 ml etanol —mejor si se utiliza metanol— pero utilizar en este caso guantes para evitar la absorción de metanol por piel. Evitar inhalar los vapores. Llevar a 1 l con agua destilada.
9. Patrones de peso molecular (según indicación del fabricante).
2 ml patrón de PM, 38 ml *buffer* muestra, 2 ml mercaptoetanol. Ebullición en baño maría 5 minutos.
10. Preparación de geles.
Lavar perfectamente los vidrios con un algodón con alcohol y secar con papel (rollo de cocina). Controlar que no tengan rajaduras.
Armar los vidrios en el soporte (gelera) y agregar alcohol con micropipeta de 1000 ml para comprobar que no haya pérdidas. Volcar el exceso y secar con papel haciéndolo deslizar entre los vidrios. Agregar con pipeta de 1000 ml la solución de gel de separación preparada dejando espacio para el gel de *stacking*. Precaución: seguir el orden de los reactivos. Al agregar el TEMED y persulfato comienza la polimerización. Trabajar rápidamente a partir de este punto. Sobre

todo si la temperatura ambiente es elevada. Completar hasta el borde con agua o con isopropanol.

Dejar en heladera por lo menos 12 horas para mejorar la polimerización (en estas condiciones los poros formados son más uniformes). Cuando se observa una línea de polimerización, eliminar el excedente y secar suavemente con papel de filtro el exceso de agua o isopropanol.

Cuadro 4

Gel de separación 10%				
	X1	X2	X3	X4
Acrilamida	1,65 ml	3,33 ml	4,98 ml	6,66 ml
Buffer gel	1,25 ml	2,50 ml	3,75 ml	5,00 ml
Agua	2,05 ml	4,10 ml	6,15 ml	8,20 ml
TEMED	5 ml	10 ml	15 ml	20 ml
Persulfato	30 ml	60 ml	90 ml	120 ml
Gel de separación 12%				
	X1	X2	X3	X4
Acrilamida	2,00 ml	4,00 ml	6,00 ml	8,00 ml
Buffer gel	1,25 ml	2,50 ml	3,75 ml	5,00 ml
Agua	1,75 ml	3,50 ml	5,25 ml	7,00 ml
TEMED	5 ml	10 ml	15 ml	20 ml
Persulfato	18 ml	36 ml	54 ml	72 ml
Gel de concentración «STACKING» 4%				
	X1	X2	X3	X4
Acrilamida	0,26 ml	0,53 ml	6,00 ml	1,06 ml
Buffer gel	0,50 ml	1,00 ml	3,75 ml	2,00 ml
Agua	1,20 ml	2,40 ml	5,25 ml	4,80 ml
TEMED	2 ml	4 ml	15 ml	8 ml
Persulfato	30 ml	50 ml	54 ml	100 ml

Fuente: Pilosof y Bartholomai, 2000

Preparar la solución del gel de *stacking* y agregar con micropipeta evitando la formación de burbujas. Si se hubieran formado tocarlas con papel para eliminarlas.

Colocar el peine. Controlar que esté bien lleno con el gel *stacking* para que se formen bien las calles. Dejar polimerizar.

Cuando se observe las líneas de gelificación entre los dientes del peine, sacarlo con movimiento firme ascendente. Agregar *buffer* electrodo para lavar las calles y limpiarlas con tiritas de papel de filtro para eliminar restos de gel.

Sacar de la gelera los casetes con el gel armado y colocarlos en los portageles de la cuba. Armarla teniendo en cuenta la polaridad (rojo y negro).

Llenar con *buffer* electrodo las calles limpias y sembrar las muestras siguiendo un orden escrito en el cuaderno y además identificar los geles como A, B, C y D.

Tener cuidado al sembrar, hacerlo lentamente para que no haya transferencia de una calle a otra. No sembrar las últimas calles de ambos lados (1 y 10), comenzar a sembrar desde la calle dos y hasta la nueve. Evitar sembrar en calles deformadas.

No eliminar las soluciones de acrilamida por el drenaje. Esperar que se forme el gel y tirar en la basura.

11. Preparación de muestras (Preparar primero las diluciones de los extractos y veneno para v+E porque tienen incubación previa).

Para ello prender el baño a 37 °c para que se estabilice, luego disolver cada extracto en 60 ml de su solvente de origen. Cuidar que se disuelva bien. Se puede usar vórtex o ultrasonido.

Preparar una solución de veneno para v+E, de (n+2) veces la cantidad de extractos, de esta manera alcanza perfectamente para todas las muestras y es posible un buen pipeteo.

Luego dispensar 40 ml de esta dilución del veneno en cada eppendorf con la solución de extracto. Mezclar bien y colocar en baño termostático a 37 °c durante 30 minutos.

Al terminar el tiempo de incubación, agregar el *buffer* muestra (BM) para cortar la reacción y también el BM a los *eppendorf* con veneno patrón y extractos patrones en las cantidades que se indican a continuación.

Agregar luego mercaptoetanol a todos los *eppendorf* y desnaturalizar todas las muestras a 100 °c durante 5 minutos. Se siembran los volúmenes indicados en el cuadro:

	Relación veneno:extracto 1:7	veneno:extracto 1:20
Veneno patrón		
Veneno	1 mg	1 mg
<i>Buffer</i> muestra	300 µl	300 µl
Mercaptoetanol	1,5 µl	1,5 µl
5 minutos Baño maría		
Siembra: 5 µl		
Extracto patrón		
Extracto	1,2 mg	0,6 mg
<i>Buffer</i> muestra	50 µl	25 µl
Mercaptoetanol	2,5 µl	1,25 µl
5 minutos Baño maría		
Siembra: 5 µl		
Extracto + Veneno		
Veneno	0,25 mg en 10 µl SF	0,5 mg en 20 µl SF
Extracto	1,8 mg en 15 µl solvente	10 mg en 30 µl solvente
30 minutos 37 °c el tiempo se toma a partir de que se mezclen el veneno y extracto. Agitar para un buen contacto. Colocar en baño a 37 °c		

	Relación veneno:extracto 1:7	veneno:extracto 1:20
<i>Buffer</i> muestra	2,5 µl	50 µl
Mercaptoetanol	2,5 µl	5 µl
5 minutos Baño maría		
Siembra: 3,5 µl		

Fuente: Torres, 2011b

La corrida se realiza manteniendo constante el amperaje entre 15 y 20 mA por gel. Cuando la línea azul del marcador de frente de corrida (azul de bromofenol del *buffer* muestra) llega un cm antes de terminar la corrida, anotar el tiempo transcurrido y apagar la corrida.

Sacar los geles, teniendo en cuenta el orden de la siembra, haciendo un pequeño corte transversal en el extremo superior derecho para evitar confusiones.

Colorear los geles en cristalizadores identificados con A, B, C o D de acuerdo a cuál sea el gel durante por lo menos 3 horas. Puede quedar hasta el día siguiente. Decolorarlos con solución decolorante si es posible agitando suavemente en *vortex* para que sea más homogénea y rápida la decoloración. Eliminar el decolorante y colocar el gel en agua.

Levantar las imágenes con escáner (una vez en blanco y negro y una en color alta resolución) para proceder a su análisis. Los geles se «envuelven» en papel film para ser escaneados.

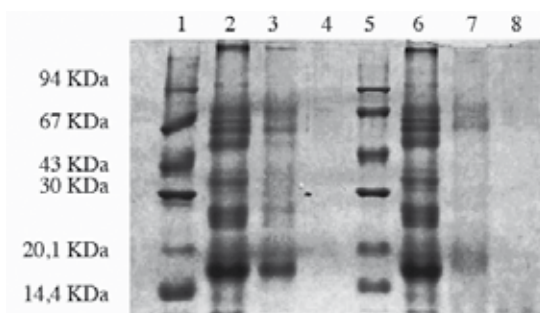
Si se colocan los geles en agua y heladera, se conservan una semana, después pueden aparecer hongos.

Ejemplo: extractos de *Nectandra angustifolia*

1) 2 µl patrones de PM, 2) 5 µl veneno, 3) 3,5 µl v+ NaI 1 (extracto acuoso de hojas de *N. angustifolia* de otoño), 4) 3 µl NaI 1, 5) 2 µl patrones de PM, 6) 5 µl veneno, 7) 3,5 µl v+ NaI 2 (extracto alcohólico de hojas de *N. angustifolia* de otoño) 8) 3 µl NaI 2

Para el *screening* de actividad alexitérica es conveniente utilizar gel de separación al 12% y para el test de inhibición de la actividad proteolítica, al 10%.

Figura 23

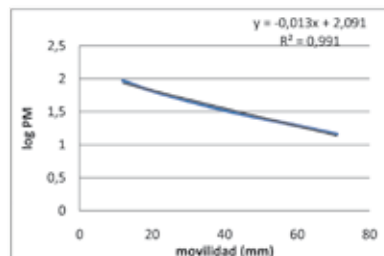


Fuente: Torres, 2011b

Cálculo de resultados e interpretación

Se miden las distancias desde la siembra a las bandas de las proteínas del patrón de peso molecular, se toman los valores de peso molecular del fabricante y se obtiene el logaritmo. Se hace una tabla con los datos y se construye el gráfico correspondiente:

Movilidad (mm)	log PM	PM (kDa)
12	1,97	94
19	1,83	67
32	1,63	43
43	1,48	30
59	1,3	20,1
71	1,16	14,4



Fuente: Torres, 2011b

Se miden las distancias de cada una de las bandas del veneno y se construye la tabla. Se aplica la fórmula de la tendencia lineal para calcular los logPM de las bandas del veneno y luego se calcula la inversa de logaritmo para obtener el PM de todas las proteínas del veneno.

Movilidad (mm) veneno	PM (kDa)	Log PM	Veneno + NaI 1	Veneno + NaI 2
19	67	1,83	↓	↓
22	61,7	1,79	↓	X
24	58,2	1,77	↓	↓
29	49	1,69	X	X
37	38,9	1,59	X	X
40	35,5	1,55	X	X
42	33,1	1,52	X	X
47	28,5	1,45	↓	X
52	24,5	1,39	x	x
62	18	1,25	↓	↓
65	16,2	1,21	↓	↓

↓disminución de la intensidad de la banda; x desaparición de la banda.

Fuente: Torres, 2011b

Se observan las bandas del veneno en las calles del v+E, y se anota si estas están iguales, disminuidas o ausentes. Se considera activo en este *screening* a todo extracto que modifique en alguna medida el perfil electroforético del veneno.

En este ejemplo, ambos extractos tienen algo de actividad, siendo mayor la del Na2 que borra la mayoría de las bandas proteicas.

Para interpretar las bandas, tener en cuenta las proteínas descriptas para el veneno de yarará: (Ricciardi, 2000; Speroni, 1994; Acosta de Perez, 2000):

Enzimas y toxinas de víperidos	PM (kDa)	Acción
Fosfolipasa A ₂ (3.1.1.4)	11-15	Altera la permeabilidad de las membranas celulares y estimula la liberación de histamina. Principal constituyente del veneno de <i>B. alternatus</i> , responsable de las acciones letal y enzimática del veneno, originando en animales de laboratorio el típico síndrome de disnea, taquicardia, arritmia y choque irreversible, con hemorragia pulmonar masiva, necrosis miocárdica y endocárdica, congestión hepática con zonas de necrosis masiva y microvacuolización hepatocítica y riñones altamente dañados con necrosis tubular y glomerular.
Fosfodiesterasa I (3.1.4.1)	11,5	Fosfatasa que actúa sobre sustratos doblemente esterificados con ácido fosfórico, eliminando sucesivamente unidades 5'-mononucleótido desde el final de la cadena del polinucleótido.
5'nucleotidasa (3.1.3.5)	100	Monoestearasa específica, actúa sobre el adenosin-5'fosfato o inosin-5' fosfato, generando ribonucleósido y ortofosfato. Si bien su letalidad no es alta, es una de las fosfatasa más activas de los venenos de ofidios.
Hialuronidasa (4.2.99.1)	38	Factor difusor o dispersante, hidroliza los enlaces glicosídicos del ácido hialurónico del tejido conjuntivo y otros mucopolisacáridos ácidos, facilitando la difusión de la toxina en los tejidos de la víctima, por la cual se la conoce también como Factor de Difusión y se piensa que es responsable del edema local.
L-amino ácido oxidasa (1.4.3.2)	100-130	Responsable de la coloración amarilla de los venenos. Es una enzima digestiva con actividad catalítica sobre diferentes sustancias y responsable de los efectos proteolíticos locales severos. Flavoproteína que cataliza la desaminación oxidativa de los L-aminoácidos a los cetoácidos correspondientes. Se cree que podría actuar como activadora de otros componentes del veneno. No tiene efectos neuromusculares.
Fosfomono-esterasa (3.1.3.2)	100	Hidrólisis de ésteres fosfato con desintegración de ácidos nucleicos y producción de nucleósidos
Fosfodiesterasa I		Hidroliza unidades terminales de 5'. Presenta acción enzimática sobre DNA y RNA. Podría contribuir a la producción de sustancias hipotensoras y no tiene efecto sobre la transmisión neuromuscular, pero puede inducir alteraciones cardiovasculares. Está presente en las cinco familias principales de ofidios venenosos del mundo.
Deoxirribonucleasa II (3.1.4.6)		Presente en elápidos y víperidos. Actúa sobre el DNA.
Ribonucleasa (2.7.7.16)	15-9	Actúa sobre la proteinogénesis celular por destrucción del RNA. Usualmente se encuentra en pequeñas cantidades.
Adenosintrifosfatasa (3.6.1.8) ATPasa		Hidrólisis de ésteres fosfato con desintegración de ácidos nucleicos y producción de nucleósidos. Presente en todos los venenos; podría tener un papel importante en la hipotensión y <i>shock</i> .
NAD-nucleosidasa (3.2.2.5)	100	Cataliza la ruptura de uniones químicas del NAD, produciendo nicotinamida y adenosín difosfato. No se ha aislado en las cascabeles, pero si en las <i>Agkistrodon contortrix</i> (cabeza de cobre) norteamericanas. Entre los elápidos se encuentra en <i>Bungarus sp.</i>

Enzimas y toxinas de vipéridos	PM (kDa)	Acción
Arimidasa (3.4.11.2)	100	
Endopeptidasa (3.4.22.9)	21.4-95	Acción similar a la de la tripsina (<i>trypsin-like</i>) capaz de producir la digestión de las proteínas tisulares. Una de las enzimas responsable de los efectos necróticos a nivel local, y también de lesiones en los órganos internos.
Arginin ester hidrolasa	27-30	No es una colinesterasa. No se encuentra en los elápidos, con excepción de la cobra real. Se cree que la liberación de bradiquinina y la actividad coagulante está relacionada con la actividad de esta enzima.
Kininogenasa (3.4.4.21)	33.5	
Balterobina <i>trombin like</i>	28- 33	Proteasa con actividad símil trombina. Glicoproteínas que se desempeñan como anticoagulantes defibrinogénantes <i>in vivo</i> y como procoagulantes o coagulantes <i>in vitro</i> .
Activante del factor x*	78	
Activante de protrombina*	56	
Miotoxinas o citotoxinas	120 a 140 restos aminoácidos y 6-8 uniones disulfuro	Responsables de efectos locales a nivel de piel, tejidos conectivos y músculos esqueléticos. Destruyen proteínas causando necrosis local. Colagenasa: digiere el colágeno, destuyendo por consiguiente la matriz intracelular.
Alternagina		metaloproteínasa que bloquea la adhesión celular.
Botrocetina		coaglutinina responsable de la agregación y aglutinación de plaquetas.
Botroalternina		lectina tipo c proteína inhibidora de la interacción trombina-receptor de la trombina.

*enzimas procoagulantes altamente específicas y que difieren según cada especie.

Los números entre paréntesis indican el número de orden de la enzima en la clasificación de enzimas de la Unión Internacional de Bioquímica, correspondiendo el primer número a:

1. Oxidorreductasas: catalizan reacciones REDOX.
2. Transferasas: catalizan la transferencia de un grupo químico de una molécula a otra.
3. Hidrolasas: catalizan reacciones de hidrólisis.
4. Liasas: catalizan la adición o eliminación de un grupo químico de un sustrato sin hidrólisis, oxidación o reducción.
5. Isomerasas: catalizan reacciones intramoleculares o reordenamientos sin pérdida o ganancia de grupos.
6. Ligasas: catalizan la formación de una molécula a partir de dos precursores por ruptura de una unión pirofosfato de ATP o similar.

Como se observa en la tabla, la mayor parte de las enzimas son hidrolasas e intervienen en la degradación y digestión de tejidos (Ricciardi, 1999).

Inhibición de la actividad coagulante del veneno

Tiempo de recalcificación del plasma citratado (Iovine y Selva, 1985)

El día anterior pesar las muestras de extractos vegetales y el veneno, según cuadro de preparación de muestras.

El día de ensayo: primero extraer las muestras de sangre, separar por centrifugación el plasma y, mientras se espera la estabilización de los plasmas separados del paquete globular, proceder a la solubilización de los extractos en sus solventes respectivos (agua, alcohol o hexano) y preparación de la solución de veneno en solución fisiológica.

Antes de largar la incubación de los extractos + veneno, hacer el tiempo de coagulación normal y el tiempo de coagulación + veneno (con la dosis coagulante mínima obtenida). Si estos valores son apropiados, largar la incubación de los extractos más veneno.

Muestra: pool de plasmas obtenidos a partir de sangre anticoagulada con citrato de sodio 3,8% (relación 1+9) y centrifugada 15 minutos a altas revoluciones. La sangre debe ser extraída al momento de realizarse la prueba *in vitro*. Debe ser un pool de plasmas para eliminar particularidades.

Separar el plasma del paquete de glóbulos y dejar reposar al menos cuarenta minutos para estabilización.

Tiempo de coagulación normal (TCN): Colocar en tubos de hemólisis

0,2 ml de plasma; 10 μ l de solución fisiológica. Dejar 30" agitando en el baño (para atemperar) y agregar 0,2 ml de CaCl_2 0,025M. Largar el cronómetro. Agitar constantemente y comenzar a mirar la formación del coágulo al minuto haciendo deslizar en el tubo inclinado la solución con suaves movimientos de la mano. Apenas se visualice el coágulo anotar el tiempo de coagulación normal (TCN). Valores normales: 60 a 180 segundos.

Tiempo de coagulación del plasma + veneno (TCV)

Realizar la misma técnica pero agregar a los 0,2 ml de plasma 10 ml de distintas diluciones de veneno y dejar 30" en el baño y agregar 0,2 ml de CaCl_2 0,025M. Largar el cronómetro y comenzar a mirar a los 30" la formación del coágulo.

Obtener así la DCM: dosis coagulante mínima, dosis que lleva el tiempo de coagulación del plasma a 1 minuto.

Tiempo de coagulación extracto + veneno (TCV+e)

La misma técnica realizar con 0,2 ml de plasma y 10 ml del sobrenadante del veneno (DCM) + extracto en relación adecuada (ej: 1:30 veneno:extracto para screening).

Dejar 30" en baño agitando y agregar 0,2 ml de CaCl_2 0,025M. Largar el cronómetro, comenzar a mirar a los 40" del agregado la formación del coágulo.

Se obtiene en este caso la capacidad del extracto para inhibir la actividad coagulante del veneno.

Hacer todas las pruebas por duplicado como mínimo. Sacar los promedios.

Calculo del % de restitución

$$\frac{TCN-TCV}{TC(v+e) - TCV} \times 100\% = \text{Capacidad del extracto para inhibir la actividad coagulante del veneno}$$

Preparación de las muestras

	Relación veneno:extracto 1:1,5	Relación veneno:extracto 1:3,0
Extractos		
Extracto	3 mg	6 mg
Solvente	0,2 ml	0,2 ml
Veneno		
Veneno	2 mg	2 mg
SF	50 ml	50 ml
Veneno + extracto		
Extracto	3mg en 0,2 ml	6mg en 0,2 ml
Veneno	5ml	5ml

30 minutos a 37 °C iniciando con intervalos de 5 minutos cada extracto-veneno para tener tiempo de realizar la prueba de coagulación.

Tener la precaución que los extractos se disuelvan bien, antes de agregar el veneno.

Cálculo de la relación veneno:extracto

$$\begin{aligned} 50 \text{ ml solución de veneno} & \text{-----} 2 \text{ mg veneno} \\ 5 \text{ ml solución de veneno} & \text{-----} x = 0,2 \text{ mg veneno} \end{aligned}$$

Figura 24



Se pone en contacto con 3 mg de extracto entonces la relación es 1:1,5

Interpretación

Si el tiempo de coagulación está cercano al de la DCM se considera que el extracto no tiene actividad. Cuanto más se acerca el tiempo al TCN mayor es la capacidad inhibitoria del extracto.

Tomar como valor de corte un porcentaje de restitución del 30%.

Inhibición de la actividad hemolítica. (Gutiérrez *et al.*, 1988; Otero *et al.*, 1995)

Sugerencias: El día anterior a la realización de la prueba: pesar todos las muestras de extractos y veneno que se van a procesar, colocar las placas de Petri envueltas convenientemente en papel de diario a esterilizar en estufa (160 °c durante por lo menos 2 horas). Esterilizar también tubos de ensayos de volumen adecuado (10 ml) para preparar las soluciones de veneno+extracto. Preparar agar base Columbia (según indicación del fabricante) y esterilizarlo en olla a presión. Guardar en heladera los frascos.

El día que se va a realizar la prueba: esterilizar la mesada a utilizar con solución de hipoclorito de sodio al 5% y encender dos mecheros enmarcando el área de trabajo. Preparar el agar sangre-fosfatidil colina y dejarlo que solidifique. Disolver los extractos y el veneno. Largar la incubación con 5 minutos de diferencia entre muestras.

Hacer los pocillos e ir sembrando 10 µl de cada sobrenadante a medida que termina la incubación.

Preparación del agar sangre fosfatidil colina (agar base Columbia + sangre + yema de huevo)

Esterilizar placas de Petri en estufa (calor seco): se colocan las placas hasta que el papel de diario que las envuelve tome un color ocre como «quemado» 2 horas a 170 °c.

Pesar 4,2 g de agar base Columbia en 100 ml de agua destilada, agregar una punta de espátula de quinona que evita la formación de hongos; calentar hasta hervor en vaso de precipitados.

Fraccionar colocando el medio en frascos individuales de aproximadamente 50 ml con tapón perforado con aguja para igualar presiones;

Esterilizar por calor húmedo durante 15 minutos en olla a presión; conservar en heladera hasta su uso.

Al momento de plaquear: fundir el agar a baño maría y atemperar (aproximadamente a 50 °c) para evitar que cuando se agregue la sangre se hemolice (agar chocolate).

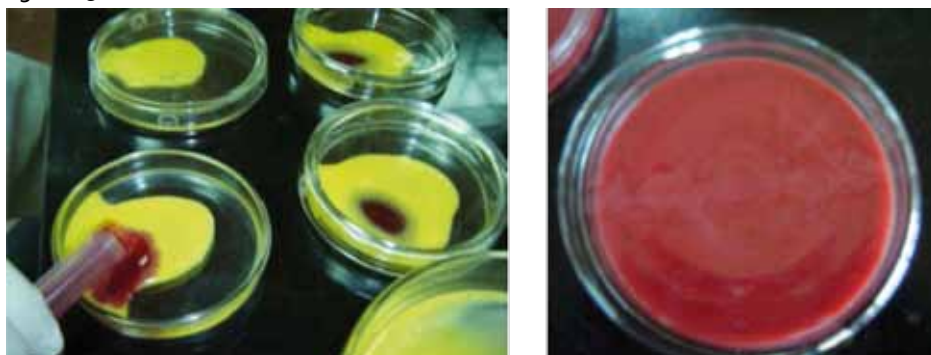
Colocar en la placa de Petri de 15 cm de diámetro:

30 ml de la solución de agar; 1,5 ml de sangre entera anticoagulada (5%); 1,5 ml de yema de huevo (5%); Mezclar con movimientos giratorios, dejando solidificar a temperatura ambiente.

Hacer pocillos en el agar con pipeta pasteur haciendo suave presión.

Identificar en la placa el inicio de la siembra con una flecha con el sentido y los pocillos con tinta indeleble.

Figura 25



Determinación de la dosis hemolítica mínima (mihd): dosis que induce un halo de hemólisis de 10 mm luego de 20 h de incubación.

Preparar distintas diluciones de veneno de manera de poder determinar la DHM. Sembrar 10 ml de cada dilución de veneno por duplicado (50 µg/ml, 25 µg/ml, 12,5 µg/ml, etc.); incubar 20 h a 37 °c en cámara húmeda; medir el halo de hemólisis.

Determinación de la capacidad neutralizante de los extractos

Pesar los extractos y disolverlos en el solvente adecuado; preparar la dilución de veneno.

Agregar 5 ml de la dilución del veneno (MIHD) a cada extracto disuelto (según se indica en el cuadro de preparación de muestras), mezclar apropiadamente. Incubar 30 minutos a 37 °c. (Largar la incubación de cada extracto+veneno con 5 minutos de diferencia de manera tal de ir sacando luego de la incubación y tener tiempo para sembrar en la placa). Sembrar 10 ml del sobrenadante en cada pocillo respectivo de la placa; incubar 20 h a 37 °c en cámara húmeda.

Medir el halo de hemólisis.

Los ensayos de inhibición de la actividad hemolítica *in vitro* se realizan siempre por duplicado como mínimo.

Preparación de las muestras

	Relación veneno:extracto 1:10	Relación veneno:extracto 1:20
Extractos		
Extracto	2,5 mg	1 mg
Solvente	0,5 ml	0,2 ml
Veneno		
Veneno	2,5 mg	2,5 mg
SF	50 ml	50 ml
Sembrar 10 µl en AS		
Veneno + extracto		
Extracto	2,5 mg en 0,5 ml	1 mg en 0,2 ml
Veneno	5 ml	1 ml
30 minutos 37 °c		
Sembrar 10 µl en AS		

Los extractos que muestran actividad deben ensayarse en otras relaciones mayores.

Fuente: Torres, 2011b

Interpretación de resultados

Se considera activo un extracto cuando el halo de hemólisis que produce el v+E preincubados 30 minutos a 37 °c es menor que el halo producido por la DHM del veneno solo.

En este ejemplo son activos los extractos 2, 3, 4 y 5 y tiene algo de actividad el 14 teniendo en cuenta la actividad del veneno puro (23 y 24).

Figura 26



Inhibición de la actividad proteolítica por SDS-PAGE

Modificación de las técnicas de Pardo y Natalucci, 2002; Gay *et al.* 2004

Preparación de los reactivos

Se utilizan las soluciones de acrilamida, *buffers* gel, *stacking* y electrodo descriptos para *sds-page* pag. 9 para un gel de separación al 10% y *stacking* al 4%.

Solución madre de Caseína 10 mg/ml

1 g caseína (0,1 g) —en su lugar puede utilizarse leche descremada y en este caso no es necesario filtrar en caliente al vacío dado que se disuelve en su totalidad— 100 ml *buffer* Tris-HCl 100 mM pH 8 (10 ml). Calentar a 20 minutos a reflujo, filtrar en caliente. Guardar a 4 °C hasta su uso (no más de 2 días).

Buffer Tris-HCl 100 mM pH 8

1,2114 g Tris, 40 ml H₂O, HClcc hasta pH, llevar a 100 ml.

Solución buffer muestra doblemente concentrada

12,5 mM Tris-HCl pH 6,8 (10 ml *buffer stacking*), 4% SDS (0,4 g), 10% 2-mercaptoetanol (1 ml)

0,4% azul de bromofenol —punta de espátula—, 20% glicerol (2 ml), 4 g de urea para mejorar la corrida.

Solución madre de Veneno 0,25 mg/ml

1 mg veneno, 4 ml en *buffer* Tris-HCl pH 8.

Extracto para veneno+extracto (1:80) Acción

1 mg de extracto en 50 µl de *buffer* Tris HCl pH 8.

Extracto patrón:

0,5 mg de extracto en 50 µl de solvente adecuado.

Observaciones y orden de preparación:

Es conveniente pesar todos los extractos, venenos y preparar las soluciones y geles un día antes de la electroforesis.

Disolver el día del ensayo los extractos (de veneno+ extracto (E+V) en *eppendorf* con los solventes adecuados (agua, alcohol o hexano) y largar la incubación de 60 minutos a

37 °c con 50 µl de la solución de veneno. En este período, si los extractos interactúan de alguna manera con las proteasas del veneno, se le da el tiempo y temperatura adecuados para que se produzca la misma.

Mientras transcurre la hora: rotular *eppendorf* para los mismos E+V ya que se deberán sacar 50 µl del sobrenadante de estos y colocarlos en *eppendorf* nuevos; disolver los extractos de extracto patrón (EP) en 50 µl del solvente adecuado y preparar veneno patrón diluyendo al medio la solución madre de veneno.

Al terminar la incubación, transferir 50 µl de cada E+V a los *eppendorf* rotulados nuevos y agregar a todos los tubos E+V, EP y VP (veneno patrón) 50 µl de la dilución de caseína y largar la segunda hora de incubación a 37 °c.

En este período, las proteasas del veneno remanente del V+E (no inhibido) el extracto patrón (si tiene proteasas vegetales) y el veneno patrón (con actividad proteolítica) realizan la proteólisis de la caseína.

Mientras transcurre la segunda hora, rotular *eppendorf* nuevos con los nombres correspondientes ya que se transferirán 50 µl del sobrenadante de la reacción en cada uno.

Preparar un *eppendorf* para el patrón de caseína, para lo cual diluir al medio la solución madre de caseína con *buffer* HCL y tomar 50 ml de la misma.

Tener en cuenta si hay preparado el patrón de PM, si no prepararlo en este momento.

Agregar a todos los tubos una vez terminada la segunda incubación, 50 ml de *buffer* muestra doblemente concentrado.

Calentar todos los tubos a ebullición por 5 minutos para desnaturalizar las proteínas.

Preparar los geles de separación y dejarlos en la heladera.

Al día siguiente, preparar los geles de *stacking*, sembrar y largar la electroforesis. Colorear.

Preparación de las soluciones de siembra

Caseína pura

50 µl solución de caseína 5 mg/ml (solución madre diluida con *buffer* Tris-HCL: 2,5 µl de solución madre de caseína + 2,5 µl de *buffer* Tris-HCL); 50 µl *buffer* muestra doblemente concentrado; desnaturalizar 5 minutos a ebullición.

Veneno + caseína

50 µl de solución de caseína 10 mg/ml; 50 µl veneno 0,125 mg/ml (solución patrón de veneno diluida con *buffer* Tris-HCL pH 8: 2,5 µl solución madre de veneno + 2,5 µl *buffer* Tris-HCL). Incubar 60 minutos 37. 50 µl del sobrenadante + 50 µl *buffer* muestra. Desnaturalizar 5 minutos a ebullición.

Veneno + extracto/aceite + caseína

50 µl de veneno 0,25 mg/ml, 50 µl de extracto 20 mg/ml. Incubar 60 minutos 37 °c. 50 µl del sobrenadante + 50 µl de solución de caseína 10 mg/ml. Incubar 60 minutos 37 °c. 50 µl del sobrenadante + 50 µl de *buffer* muestra. Desnaturalizar 5 minutos ebullición.

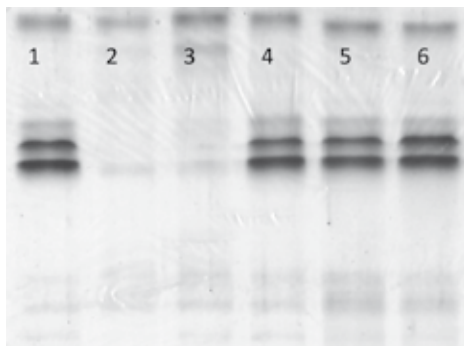
Extracto/aceite + caseína

50 µl de solución de extracto 10 mg/ml (diluido con *buffer* Tris-HCL pH: 8), 50 µl caseína 10 mg/ml

Incubar 60 minutos 37 °c. 50 µl del sobrenadante + 50 µl *buffer* muestra. Desnaturalizar 5 minutos ebullición. Blanco para observar si existen proteasas vegetales en el extracto.

Correr a 15 mA por gel, colorear, decolorar y escanear las imágenes para su posterior análisis.

Figura 27



1. Caseína pura (c), 2. Veneno más caseína (v+c), 3. Extracto 1 +v+c, 4. Extracto 1 más caseína, 5. extracto 2 +v+c, 6.extracto 2+c

Fuente: Torres, 2011b

Interpretación de resultados

Si el extracto tiene acción inhibitoria de la actividad proteolítica, en la calle correspondiente a E+v+c se verán las bandas correspondientes a la caseína, ya que el extracto al inhibir el veneno en la incubación 1 hora a 37 °c, no puede producir la proteólisis de la caseína (calle 5).

Si el extracto no tiene actividad, el veneno producirá la proteólisis y no se observarán las bandas (calle 3).

Fraccionamiento: Cromatografía flash en columna

Preparación de la muestra

Pesar 200 mg del extracto activo. Disolver en solvente adecuado preparando una mezcla con silica gel común para aumentar la superficie de contacto. Evaporar a presión reducida hasta sequedad, quedando un polvo granulado embebido con el extracto (muestra a sembrar).

Preparación de la columna

Preparar una columna de 24 x 400 mm con robinete de teflón y tapón esmerilado. Agregar un poco de algodón en el extremo inferior para contener el relleno.

Preparar el relleno de la columna preparando un barro con silica gel flash 60 0,04 - 0,063 mm, MN y agregar con embudo a la columna. Dejar unos minutos y eluir el exceso de solvente.

Colocar un algodón en la parte superior y agregar la muestra preparada.

Conectar a bomba de aire de pecera CX-1000.

Cromatografía

Eluir utilizando el programa de polaridad que sigue:

- 100 ml de hexano
- 100 ml de hexano-acetato de etilo (4+1);
- 100 ml de hexano-acetato de etilo (1+1);
- 100 ml de hexano-acetato de etilo (1+4),
- 100 ml de acetato de etilo;
- 100 ml de acetato de etilo-metanol (1+1);
- 100 ml metanol.

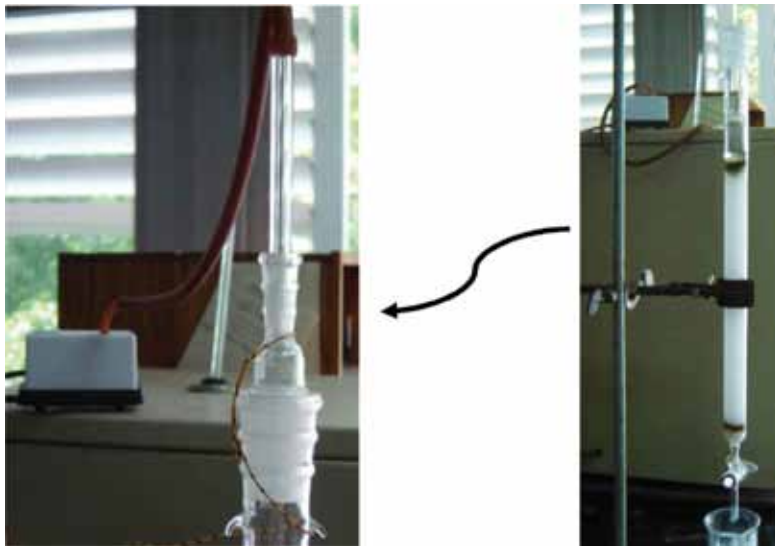
hexano	acetato de etilo	metanol
80	20	
50	50	
20	80	
	100	
	50	50
	50	100

Ir tomando el eluido en tubos de ensayos cada 5 ml aproximadamente. Para separar las fracciones, realizar TLC en cromatofolios de silica gel GF de cada uno de los tubos separados. Fase móvil: acetato de etilo-hexano (1+1).

Revelado: radiación UV a 254 y 365 nm. Asperjado de reactivo universal anisaldehído-ácido sulfúrico.

Reunir los tubos de igual perfil cromatográfico y rotular con número de fracción.

FIGURA 28



Detalle cabezal

Columna

Screening de actividad de las fracciones por SDS-PAGE

Tomar las fracciones colectadas. Realizar electroforesis SDS-PAGE en iguales condiciones a las anteriormente descritas.

Cromatografía en capa delgada

Sembrar en bandas los extractos previamente reconstituidos en solventes adecuados, en placas de silica gel GF 254. Se preparan aproximadamente 15 ml de fase móvil. El

volumen depende de la cuba de corrida. Dejar saturar con los vapores de la fase móvil durante unos minutos.

Utilizar diferentes solventes de corrida, por ejemplo acetato de etilo, acetato de etilo + metanol (9+1), acetato de etilo + metanol (8+2) hasta obtener la mejor resolución de compuestos.

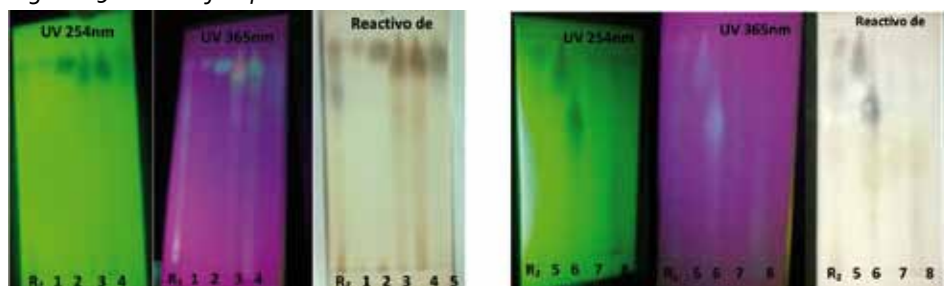
Dejar correr hasta 1 cm del borde superior y marcar el frente de corrida.

Observar con lámpara UV a 254 y 365 nm y asperjar posteriormente algún reactivo revelador como:

- cusco 10% en ácido fosfórico 50% y calor,
- anisaldehído sulfúrico (0,5 ml anisalaldehído, 10 ml ácido acético glacial, 85 ml metanol, 5 ml ácido sulfúrico), asperjar placa y calentarla a 100 °c durante 5-10 minutos para observar las diferentes coloraciones.

Observación: El reactivo universal es AZUL VIOLETA. Si toma color ROJO no utilizar. Preparar nuevo reactivo.

Figura 29. *Marcha fitoquímica*



Fuente: Fabiola, 2002; Wagner Blatt, 2001.

Alcaloides: Test de Dragendorff (ioduro de bismuto y potasio).

Solución A: 0,6 g de subnitrito de bismuto, 2 ml de ácido clorhídrico concentrado, 10 ml de agua.

Solución B: 6 g de ioduro de potasio, 10 ml de agua.

Al momento de uso, mezclar ambas soluciones con 7 ml de ácido clorhídrico concentrado y 1,5 ml de agua. El total se diluye a 400 ml con agua.

POSITIVO: en presencia de sales de alcaloides, en solución clorhídrica o sulfúrica, un precipitado amorfo de color rojo ladrillo.

Fenoles: reacción con $FeCl_3$

$FeCl_3$ al 10% en agua.

POSITIVO: coloración verde a marrón para derivados del catecol, y coloración azulada para derivados del pirogalol.

Esteroides o triterpenos: Reacción de Liebermann-Burchard

Gotas del extracto, gotas del reactivo (5 ml de anhídrido acético + 5 ml ácido sulfúrico concentrado, 50 ml de etanol absoluto).

POSITIVO: Coloración verde o azul verdoso indica la presencia de núcleo esteroidal.

Taninos: Reacción con gelatina/NaCl —placa o tubo—

1 g de gelatina + 100 ml de agua + 10 g de NaCl. Gotas del extracto con el reactivo.

POSITIVO: Abundante precipitado indica la presencia de taninos.

Flavonoides: Reacción de Shinoda

Gotas del extracto (no muy coloreado), pequeños trozos de mg metálico, gotas de HCl

POSITIVO: naranja - flavonas, Rojo cereza - flavonoles, Violeta las flavanonas.

Aminoácidos Ninhidrina al 0,1% en solución alcohólica

POSITIVO: Color violeta con los aminoácidos.

Antranoídes: Quinonas —reacciones en tubo— Solución de NaOH al 5%

POSITIVO: soluciones amarillas en benceno, viran al rojo en medio alcalino y poseen fluorescencia roja a 365 nm. Sin tratamiento químico, todas las antraquinonas dan fluorescencia amarilla o rojo-marrón a 365 nm.

Glucósidos cardiotónicos: Reactivo de Raymond-Marthoud

1 g de *m*-dinitrobenceno, 100 ml de etanol

POSITIVO: coloración roja, naranja rojiza o violeta con cardenólidos.

Saponinas: Reactivo vainillina-ácido sulfúrico —tubo—

Solución I: ácido sulfúrico al 5% en etanol.

Solución II: vainillina al 1% en etanol.

Gotas del extracto, gota de solución I, gota de solución II, calentar a Baño de María por 3-5 minutos.

POSITIVO: Coloración azul o azul violeta. Algunas pueden dar coloración amarilla. En forma de ensayo general, se puede observar la formación de espuma permanente sobre la superficie del líquido (método afrosimétrico).

Cumarinas

Fluorescencia azul, marrón o azul verdosa a 365 nm las cumarinas simples, amarilla, marrón, azul o azul verdoso las furano y piranocumarinas.

Las cumarinas no sustituidas fluorescen amarillo-verdoso luego de tratamiento con KOH o vapores de amoníaco. Las cromonas poseen fluorescencia débil con KOH 5% alcohólico (fluorescencia azul a 365 nm).

Evaluación de la significación estadística de resultados

Para evaluar desde un punto de vista estadístico los resultados obtenidos al ensayar la capacidad protectora de los extractos vegetales contra la acción coagulante o hemolítica del veneno ofídico se puede recurrir al auxilio de diversas herramientas estadísticas que permitan conocer si los resultados obtenidos pueden ser explicables simplemente por el azar o, por el contrario, existe en ellos alguna relación de tipo causa-efecto que vincule los principios activos que pudieran estar presentes en el extracto vegetal ensayado con el efecto biológico/bioquímico observado.

Los venenos ofídicos con actividad coagulante poseen la capacidad de inducir un acortamiento en el tiempo de coagulación normal de la sangre. Si los extractos vegetales ensayados poseyeran alguna capacidad protectora contra la acción coagulante del veneno ofídico, debería observarse un corrimiento (restitución) de los tiempos de coagulación, anormalmente acortados por acción del veneno ofídico, hacia valores normales.

Por otra parte, aquellos venenos ofídicos con actividad hemolítica indirecta poseen la capacidad de lisar glóbulos rojos en condiciones controladas de laboratorio. En forma análoga a lo considerado precedentemente al evaluar los resultados de la actividad coagulante del veneno ofídico, si los extractos vegetales tuvieran en su composición principios activos con la capacidad de brindar algún nivel de protección contra la acción

hemolítica indirecta del veneno ofídico, la misma debería traducirse en la observación de una disminución del halo de hemólisis obtenido al realizar las pruebas correspondientes.

El interrogante a responder en ambos casos es qué proporción de los resultados obtenidos pueden ser atribuidos al azar y qué proporción corresponde a la acción directa de los principios vegetales activos presentes en los extractos ensayados.

Para responder estos interrogantes se puede recurrir al auxilio de diferentes pruebas estadísticas (*t*-student, análisis de la varianza, chi cuadrado, test exacto de Fischer, test de Friedman, entre otros) utilizando para su análisis las poderosas herramientas que constituyen los diferentes programas estadísticos disponibles en el mercado (Infostat, Primer, spss, Stats, etc.) en sus diferentes versiones; todos igualmente útiles.

Cualquiera sea el caso, el primer paso en el análisis estadístico que se emprenda constituirá el planteamiento de las hipótesis de trabajo correspondientes.

Para el modelo analítico planteado, la hipótesis nula (H_0) será aquella que sostiene que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los conjuntos de resultados obtenidos antes y después de tratar el veneno ofídico con el extracto vegetal correspondiente. Esto implicaría afirmar que las diferencias advertidas entre los valores observados cuando la unidad de ensayo es sometida a la acción directa del veneno ofídico, en contraposición a los valores observados cuando el veneno ofídico ha sido previamente tratado con el extracto vegetal de interés analítico son solo fruto del azar y no guardan relación con los principios activos que pudieran estar presentes en él.

En oposición, la hipótesis alternativa (H_1) planteará que las diferencias observadas entre los grupos de resultados considerados no son fruto del azar sino que guardan relación con el tratamiento al que ha sido sometido el veneno ofídico. Es decir, las diferencias observadas se explicarían por la presencia de principios activos protectores contra la acción del veneno ofídico en los extractos vegetales ensayados.

Para este tipo de análisis estadístico, resulta de suma utilidad la prueba conocida como *t*-student. La cual permite seleccionar de manera objetiva y reproducible extractos vegetales con actividad alexitéra comprobada de aquellos que carecen de ella.

Una vez que, con el auxilio de la estadística, se han seleccionado los extractos vegetales con actividad alexitéra, resulta sumamente frecuente y trascendente tener que dar respuesta a la situación de orden práctico: ¿Cuál de los extractos con actividad alexitéra comprobada conviene utilizar para continuar mi investigación?

Para esta etapa del análisis resulta de sumo interés establecer si existen diferencias estadísticamente significativas entre los niveles de protección que es posible obtener a partir de la utilización de los extractos vegetales ensayados y que han demostrado poseer actividad alexitéra comprobada.

Para este caso se planteará como hipótesis nula (H_0) que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los resultados obtenidos para los extractos activos considerados; es decir que las diferencias observadas son solo fruto del azar. Este supuesto implicaría considerar que el tratamiento aplicado al veneno ofídico con cualquiera de los extractos activos poseería una eficacia equivalente.

En contraposición, la hipótesis alternativa (H_1) para este análisis sería que existen diferencias estadísticamente significativas entre los conjuntos de valores obtenidos según el tratamiento utilizado; dicho en otras palabras, implicaría suponer que la eficacia protectora de los extractos vegetales activos no es equivalente. Habrá uno (o más) que se distinga del resto; siendo este extracto activo el que convenga utilizar para continuar las investigaciones que requieran las ulteriores etapas analíticas.

Para este tipo de evaluación resulta particularmente útil recurrir al auxilio del Análisis de la Varianza (ANOVA). La utilización de este modelo estadístico implica aceptar una serie de supuestos en los que se basa su aplicación; a saber: los resultados analíticos obtenidos poseen asociado un error aleatorio que sigue una distribución normal, ellos son independientes, con esperanza cero y varianza σ^2 . Para comprobar la validez del modelo propuesto mediante el cumplimiento de los supuestos exigidos para el análisis, se puede recurrir al auxilio que brindan la confección de gráficos tipo «Q-Q plot» y de dispersión. Comprobada la validez del modelo, se pueden extraer importantes conclusiones respecto de la conveniencia de continuar nuestra investigación mediante el empleo de un extracto vegetal activo en particular.

En todos los casos resulta sumamente conveniente realzar la contundencia de los resultados obtenidos mediante la elaboración de gráficos que permitan comparar visualmente grupos o conjuntos de datos, como por ejemplo los gráficos de caja (Box-plot).

Finalmente, el empleo de herramientas estadísticas como las propuestas no son de uso obligatorio para analizar datos obtenidos al evaluar la actividad alexítera de extractos vegetales contra las diferentes acciones del veneno ofídico. No obstante lo cual, sin lugar a dudas, el incluirlas permite alcanzar un grado de independencia y objetividad en la toma de decisiones que aportan gran realce y contundencia a las conclusiones que se extraigan a partir del trabajo de investigación realizado.

Bibliografía

- ABUBAKAR M., SULE M., PATEH E., ABDURAHMAN E., HARUNA A. Y JAHUN B. (2000). «In vitro snake venom detoxifying action of the leaf extract of Guiera senegalensis». *J. Ethnopharmacol.*, Michigan-USA, 69: 253-257.
- ABUBAKAR MS., BALOGUN E., ABDURAHMAN EM., NOK AJ., SHOK M., MOHAMMED A. Y GARBA M. (2006). «Ethnomedical treatment of poisonous snakebites: Plant extract neutralized Naja nigricollis venom», *Pharm. Biol.*, London-UK, 44: 343-348.
- ACHAVAL F. (1997). «Actualización sistemática y sinonímica de los reptiles del Uruguay con comentarios y distribución». Tesis de Maestría en Biología, opción Zoología. Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA), Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo-Uruguay.
- BURGER M., CARITAT R., GARRIDO M., MENEGHEL M., PINO A., PURTSCHER H., RUOCCO G., SALVATELLA R., SAVIO E., SILVA R., SOMMA MOREIRA R., VILA VM. Y ZANETTA E. (1993). «Accidentes ofídicos en el Uruguay. Antecedentes y situación actual». *Bol. Soc. Zool.*, 2.^a época, Uruguay, 8: 165-171.
- ACHAVAL F. Y OLMOS A. (2003). *Anfibios y reptiles del Uruguay*, 2.^a edición, Graphis Impresora, Montevideo-Uruguay.
- ACOSTA DE PEREZ O., KOSCINCZUK P., FLINTA S., MAIDANA H. Y SANCHEZ NEGRETTE M. (1997). «Bothrops alternatus envenoming in young dogs», *J. Venom. Anim. Toxins.*, São Paulo-Brasil, 3: 43-47.
- ACOSTA DE PEREZ O., ESPINOSA M., MARUÑAK S. Y ZEINSTEGER P. (2000). «Valoración de alteraciones hemostáticas inducidas por veneno de Bothrops alternatus (víbora de la cruz)», Comunicaciones Científicas y Tecnológicas UNNE, Chaco-Argentina, VE-012.
- ACOSTA J. DE (1598). «De natura Novi Orbis, Libri duo, et de promulgatione Evangelii apud barbaros, sive de procuranda Indorum salute. Libri sex», Apud Guillellmum Foquel. Salamanca.
- ADZU B., ABUBAKAR M., IZEBE K., AKUMKA D. Y GAMANIEL K. (2005). «Effect of Annona senegalensis rootbark extracts on Naja nigricollis nigricollis venom in rats», *J. Ethnopharmacol.*, London-UK, 96: 507-513.
- AGUIYI JC., GUERRANTI R., PAGANI R. Y MARINELLO E. (2001). «Blood chemistry of rats pretreated with Mucuna pruriens seed aqueous extract MPIOTUJ after Echis carinatus venom challenge», *J. Phytother. Res.*, India, 15: 712-714.
- AHMED A., RAJENDARAN K., JAISWAL D., SINGH HP. Y MISHRA A. (2010). «Anti-snake venom activity of different extracts of Pouzolzia indica against Russel Viper venom», *Int. J. Chem. Tech Res.*, India, 2: 744-751.
- AKUNYILI D. Y AKUBUE P. (1986). «Schumannioside, the antsnake venom principle from the stem bark of Schumanniohyton magnificum harms», *J. Ethnopharmacol.*, London-UK, 18: 167-172.
- ALAM MI. (1998b). «Adjuvant effects and antiserum action potentiation by a (herbal) compound 2-hydroxy-4-methoxy benzoic acid isolated from the root extract of the Indian medicinal plant sarsaparilla *Hemidesmus indicus* R. Br.», *Toxicol.*, London-UK, 36: 1423-1431.
- (2003). «Snake venom neutralization by Indian medicinal plants (*Vitex negundo* and *Embllica officinalis*) root extracts», *J. Ethnopharmacol.*, London-UK, 86: 75-80.

- ALONSO J. (2008). «Fitofármacos en la Clínica Diaria. Asociación de Fitomedicina. Argentina», Capítulos: introducción, evolución histórica, fitoterapia, aspectos botánicos; control de calidad, técnicas de comprobación de actividad biológica. Curso de posgrado a distancia, Buenos Aires-Argentina.
- AMBIKABOTHY J., IBRAHIM H., AMBU S., CHAKRAVARTHI S., AWANG K. Y VEJAYAN J. (2011). «Efficacy evaluations of *Mimosa pudica* tannin isolate (MPT) for its anti-ophidian properties», *J. Ethnopharmacol.*, London-UK, 137: 257-262.
- AMRESH G., RAO CH., MEHROTRA S. Y SHIRWAIKAR A. (2003). «Dissertation. Manipal, Academy of Higher Education», Karnataka, India, 37-40.
- AMRESH G., REDDY G., RAO CH. Y SINGH P. (2007). «Evaluation of anti-inflammatory activity of *Cissampelos pareira* root in rats», *J. Ethnopharmacol.*, London-UK, 110: 526-531.
- ARGUETA A., CANO L. Y RODARTE M. (1994.) *Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana*, 2-3, Editorial Instituto Nacional Indigenista, México, 1.ª edición.
- ASUZU I. Y HARVEY AL. (2003). «The antsnake venom activities of *Parkia biglobosa* (Mimosaceae) stem bark extract», *Toxicon*, London-UK, 42: 763-768.
- AZARA F. Y BONPLAND A. (1849) *Diario botánico*.
- BADILLA B., CHAVES F., JIMENEZ S., RODRIGUEZ G. Y POVEDA LJ. (2008). «Effects of an extract of *Cissampelos pareira* on the hemorrhagic and proteolytic activities from *Bothrops asper* venom», *Pharmacogn. Mag.*, India, 4: 27-31.
- BALTODANO B., CHAVES MORA F., POVEDA Álvarez L., JIMENEZ CASTRO S. Y RODRÍGUEZ RODRIGUEZ G. (2006). «Efecto de plantas usadas etnomedicamente sobre la actividad hemorrágica y proteolítica inducida por *Bothrops asper*», *Rev. Cubana Plant. Med.*, La Habana-Cuba, 11: S1028.
- BANDONI A. (ed.). (2000). *Los Recursos Vegetales Aromáticos en Latinoamérica*, CYTED, Editorial de la Universidad Nacional de La Plata, Buenos Aires-Argentina: 367-368.
- BASSOLS G. Y GURNI A. (1996). «Especies de género *Lippia* Utilizadas en Medicina Popular Latinoamericana», *Dominguezia*, Buenos Aires-Argentina, 13: 14-25.
- BATINA M., CINTRA AC., VERONESE EL., LAVRADOR MA., GIGLIO JR., PEREIRA PS., DIAS DA., FRANCA SC. Y SAMPAIO SV. (2000). «Inhibition of the lethal and myotoxic activities of *Crotalus durissus terrificus* venom by *Tabernaemontana catharinensis*: identification of one of the active components», *Planta Med.*, Stuttgart-Germany, 66: 424-8.
- BOLETÍN EPIDEMIOLÓGICO PERIÓDICO (BEP). (2009). *Envenenamiento por animales ponzoñosos*, Ministerio de Salud, Presidencia de la Nación Argentina.
- (2011). Dra. Araceli Pino Cheroni, Especialista Enfermedades Infectocontagiosas, Instituto de Higiene, Montevideo, Uruguay.
- BIONDO R., PEREIRA AM., MARCUSSI S., PEREIRA PS., FRANCA SC. Y SOARES AM. (2003). «Inhibition of enzymatic and pharmacological activities of some snake venoms and toxins by *Mandevilla velutina* (Apocynaceae) aqueous extract», *Biochimie*, París-Francia, 85: 1017-25.
- (2003). «Inhibition of enzymatic and pharmacological activities of some snake venoms and toxins by *Mandevilla velutina* (Apocynaceae) aqueous extract», *Biochimie*, París-Francia, 85: 1017-1025.
- BORGES MH., SOARES AM., RODRIGUES VM., ANDRILAO-ESCARSO SH., DINIZ H., HAMAGUCHI A., QUINTERO A., LIZANO S., GUTIERREZ JM., GIGLIO JR. Y HOMSI-BRANDEBURGO MI. (2000). «Effects of aqueous extract of *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) on actions of snake and bee venoms and on activity of phospholipases A₂», *Comp. Biochem. Physiol. B*, Ontario-Canadá, 127: 21-30.

- BORGES MH, ALVES DL, RASLAN DS, PILO-VELOSO D, RODRIGUES VM, HOMSI-BRANDEBURGO MI. Y DE LIMA ME. (2005). «Neutralizing properties of *Musa paradisiaca* L. (Musaceae) juice on phospholipase A₂, myotoxic, hemorrhagic and lethal activities of crotalidae venoms», *J. Ethnopharmacol.*, London-UK, 98: 21-29.
- BORGES M, SOARES A, RODRIGUES V, OLIVEIRA F, FRANSCHESCHI A, RUCAVADO A, GIGLIO J. Y HOMSI-BRADEBURGO M. (2001). «Neutralization of proteases from *Bothrops* snake venoms by aqueous extract from *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae)», *Toxicon*, London-UK, 39: 1863-1869.
- CÁCERES A. (1996). *Plantas de Uso Medicinal en Guatemala*, Editorial Universitaria, Universidad de San Carlos de Guatemala.
- CÁCERES WENZEL MI, RICCIARDI ROSSETTI GA, TORRES AM, RICCIARDI AI. Y DELLACASSA E. (2012). «Actividad antiveneno de los aceites y extractos de *Aloysia citriodora*, contra yarará chica», Comunicaciones Científicas y Tecnológicas, UNNE, Corrientes-Argentina, <<http://www.unne.edu.ar>>.
- (2012a). «Actividad antiveneno de aceites y extractos de *Aloysia citriodora* contra yarará chica». *Revista da xx Jornadas de Jovens Pesquisadores da augm*.
- CÁCERES WENZEL M, RICCIARDI ROSSETTI G, TORRES A, RICCIARDI VERRASTRO B, RICCIARDI A. Y DELLACASSA E. (2012b). «El modelo *Aloysia citriodora*: Estudio *in vitro* de la actividad alexitérica», III Jornadas Nacionales de Plantas Aromáticas Nativas y sus Aceites Esenciales, San Salvador de Jujuy-Argentina.
- CÁCERES WENZEL M, RICCIARDI ROSSETTI G, TORRES A, RICCIARDI A. Y DELLACASSA E. (2012c). «Actividad antiveneno de los aceites y extractos de *Aloysia citriodora* contra yarará chica», XVIII Comunicaciones Científicas y Tecnológicas, UNNE, Corrientes-Argentina, <<http://www.unne.edu.ar>, CE-063>.
- CALMETTE, L.C.A. (1894). «Contribution à l'étude du venin des serpents», *Ann. Inst. Pasteur*, 8: 275-91; 9: 225-51; 12: 343-47.
- CAMARGO F, TORRES A, RICCIARDI ROSSETTI G, AGRELO DE NASSIFF A, DELLACASSA E. Y RICCIARDI A. (2008). «Estudio del aceite esencial y evaluación de la actividad alexitérica de *Mikania micrantha* Kunth (guako)», XVII Simposio Italo Latinoamericano de Etnomedicina, Palermo-Italia, p. 024 y p. 114.
- CAMARGO F, TORRES A, RICCIARDI ROSSETTI G, DELLACASSA E. Y RICCIARDI A. (2010). «Fraccionamiento y caracterización fitoquímica del extracto alcohólico de partes aéreas de *Mikania coridifolia* (L.f.) Willd de la Provincia de Corrientes», Comunicaciones Científicas y Tecnológicas, UNNE, Corrientes-Argentina, <<http://www.unne.edu.ar>>.
- CAMARGO F. (2012). «Evaluación de la actividad potencial como antiveneno de extractos de especies del género *Mikania* del nordeste argentino contra *Bothrops neuwiedi diporus* (COPE) "yarará chica". Clasificación quimiotaaxonomía de las especies estudiadas», Tesis de Doctorado, Universidad Nacional del Nordeste, Especialidad Química.
- TORRES A, RICCIARDI ROSSETTI G, RICCIARDI A. Y DELLACASSA E. (2011). «SDS-PAGE, una herramienta útil para la evaluación de actividad alexitérica de extractos de plantas», *blacpma*, Universidad de Santiago de Chile-Chile, 10: 440-445.
- CAÑIGUERAL S, DELLACASSA E. Y BANDONI A. (2003). «Plantas medicinales y fitoterapia: ¿indicadores de dependencia o factores de desarrollo?», *Acta Farm. Bonaerense*, Buenos Aires-Argentina, 22: 265-78.
- CARNAT A, CARNAT AP, FRAISSE D. Y LAMAISON JL. (1999). «The aromatic and polyphenolic composition of lemon verbena tea», *Fitoterapia*, London-UK, 70: 44-49.

- CAROLLO C. (2008). «Análise fitoquímica e avaliação dos efeitos dos tipos de adubação, da radiação solar e do estresse hídrico, no acúmulo de metabólitos secundários em espécies do gênero *Mikania*», Tese de Doutorado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo-Brasil. 228p.
- CARRASCO P., MATTONI C., LEYNAUD G. Y SCROCCHI G. (2012). «Morphology, phylogeny and taxonomy of South American bothropoid pitvipers (Serpentes, Viperidae)», *Zoologica Scripta*, Suecia, 1-16.
- CARREIRA S., MENEGHEL M. Y ACHAVAL F. (2005). *Reptiles del Uruguay*. Edición DIRAC (División Relaciones y Actividades Culturales), Facultad de Ciencias, Montevideo, Uruguay.
- CAVALCANTE WLG., CAMPOS TO., PAI-SILVA MD., PEREIRA PS., OLIVEIRA CZ., SOARES AM. Y GALLACCI M. (2007). «Neutralization of snake venom phospholipase A₂ toxins by aqueous extract of *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) in mouse neuromuscular preparation», *J. Ethnopharmacol.*, London-UK, 112: 490-497.
- CHANDRASHEKARA KT., NAGARAJU S., NANDINI SU., BASAVAIH S. Y KEMPARAJU K. (2009). «Neutralization of local and systemic toxicity of *Daboia russellii* venom by *Morus alba* plant leaf extract», *Phytother. Res.*, Hoboken-USA, 23: 1082-1087.
- CHATTERJEE I., CHAKRAVARTY AK. Y GOMES A. (2006). «*Daboia russellii* and *Naja kaouthia* venom neutralization by lupeol acetate isolated from the root extract of Indian sarsaparilla *Hemidesmus indicus* R.Br.», *J. Ethnopharmacol.*, London-UK, 106: 38-43.
- CHETHANKUMAR M. Y SRINIVAS L. (2008). «New biological activity against phospholipase A₂ by Turmerin, a protein from *Curcuma longa* L.», *Biol. Chem.*, Berlín-Alemania, 389: 299-303.
- CHIFA C. Y RICCIARDI A. (2000). «Relevamiento publicado por la fundación Miguel Lillo», *Miscelánea 117*, Buenos Aires-Argentina.
- CHIPPAUX JP Y GOYFFON M. (2000). «Epidemiologie des envenimements dans le monde». En: Mion G. y Goyffon M. *Les envenimations graves*. París, Arnette.
- CHIPPAUX JP. (2002). «Morsures et envenimations ophidiennes», *Rev. Française Lab.*, Francia, 342: 55-60.
- Williams V. y White J. (1991). «Snake venom variability: methods of study, results and interpretation», *Toxicon*, London-UK, 29: 1279-1303.
- CINTRA-FRANCISCHINELLI M., SILVA M., ANDRÉO-FILHO N., GERENUTTI M., CINTRA A., GIGLIO J., LEITE G., CRUZ-HÖFLING M., RODRIGUES-SIMIONI L. Y OSHIMA-FRANCO Y. (2008). «Antibothropic action of *Casearia sylvestris* Sw. (Flacourtiaceae) extracts», *Phytother. Res.*, Hoboken-USA, 22: 784-790.
- DA SILVA G., MACHADO M., MATOS F. Y BRAZ-FILHO R. (1999). «A new isoflavone isolated from *Harpalyce brasiliensis*», *J. Braz. Chem. Soc.*, Brasil, 10: 438-442.
- DA SILVA JO., COPPEDE JS., FERNANDES VC., SANTANA CD. Y TICLI FK. (2005). «Antihemorrhagic, antinucleolytic and other antiophidian properties of the aqueous extract from *Pentaclethra macroloba*», *J. Ethnopharmacol.*, London-UK, 100: 145-152.
- DA SILVA JO., FERNANDES RS., TICLI FK., OLIVEIRA CZ., MAZZI MV. (2007). «Triterpenoid saponins, new metalloprotease snake venom inhibitors isolated from *Pentaclethra macroloba*», *Toxicon*, London-UK, 50: 283-291.
- DA SILVA SL., CALGAROTTO AK., CHAAR JS., MARANGONI, S. (2008). «Isolation and characterization of ellagic acid derivatives isolated from *Casearia sylvestris* sw aqueous extract with anti-PLA₂ activity», *Toxicon*, London-UK, 52: 655-666.

- DADUANG S., SATTAYASAI N., SATTAYASAI J., TOPFROM P., THAMMATHAWOEN A., CHAVEERACH A. Y KONKCHAIYAPHUM M. (2005). «Screening of plants containing *Naja naja siamensis* cobra venom inhibitory activity using modified ELISA technique», *Anal. Biochem.*, London-UK, 341: 316-325.
- DANIELE J., BIANCO I. Y FIDELIO G. (1995). «Kinetic and pharmacologic characterization of phospholipases A2 from *Bothrops neuwiedii* venom», *Arch. Biochem. Biophys.*, London-UK, 318: 65-70.
- DAS R., KAUSIK A., PAL TK. (2010). «Anti-inflammatory activity study of antidote *Aristolochia indica* to the venom of *Heteropneustes fossilis* in rats», *J. Chem. Pharm. Res.*, India, 2: 554-562.
- DE ALMEIDA L., CINTRA ACO, VERONESE ELG., NOMIZO A., FRANCO JJ., ARANTES EC., GIGLIO JR. Y VILELA SAMPAIO S. (2004). «Anticrotalic and antitumoral activities of gel filtration fractions of aqueous extract from *Tabernaemontana catharinensis* (Apocynaceae)», *Comp. Biochem. Phys. C*, London-UK, 137: 19-27.
- DEEPA M. Y GOWDA TV. (2002). «Purification and characterization of a glycoprotein inhibitor of toxic phospholipase from *Withania somnifera*», *Arch. Biochem. Biophys.*, London-UK, 408: 42-50.
- DELLACASSA E., RICCIARDI AIA, TORRES AM., CAMARGO FJ. Y RICCIARDI ROSSETTI G. (2008). «Fitoquímica y actividad biológica de especies vegetales aromáticas y medicinales del nordeste argentino», *II Congreso de Fitoterápico do mercosur vi Reunido da Sociedade Latinoamericana de Fitoquímica*, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte-Brasil, diciembre 2008.
- DELLACASSA E., TORRES A., RICCIARDI ROSSETTI G., CAMARGO F., TRESSSENS S. Y RICCIARDI A. (2012). «Anti-Venom activity of medicinal plants from South America», Gupta VK y Kaul A. (eds.), *Utilisation and management of Medicinal Plants*, 2, New Delhi, India Daya Publishing House, 1-61.
- DEY A., DE JN. (2011). «*Aristolochia indica* L.: A review», *Asian J. Plant Sci.*, New York-USA, 10: 108-116.
- DHANANJAYA BL., NATARAJU A., RAJESH R., GOWDA CDR., SHARATH BK., VISHWANATH BS. Y D'SOUZA CJM. (2006). «Anticoagulant effect of *Naja naja* venom 5'Nucleotidase: Demonstration through the use of novel specific inhibitor, vanillic acid», *Toxicol.*, London-UK, 48: 411-421.
- DIOGO L., FERNANDES R., MARCUSSI S., MENALDO D., ROBERTO P., MATRANGULO P., PEREIRA P., FRANÇA S., GIULLATTI S., SOARES A. Y LOURENÇO M. (2009). «Inhibition of snake venoms and phospholipases A2 by extracts from native and genetically modified *Eclipta alba*: isolation of active coumestans», *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.*, Hoboken-USA, 104: 293-299.
- DOBRIZHOFFER, M.(1784). «Historia de Abiponibus equestris bellicos aque Paraquariae natione» Viena; («Historia de los Abipones» (trad. Clara Vedoya de Guillén) UNNE, Resistencia (1968) II, 316-322.
- DUKE J., BOGENSCHUTZ-GODWIN, M. Y OTTESEN A. (eds.). (2009). *Duke's Handbook of Medicinal Plants of Latin America*, Boca Raton, FL, crc Press.
- ESTESO S. (1985). *Ofidismo en la República Argentina*, Córdoba, Argentina, Ed. Arpón.
- ESTRADA S., QUINTANA J., JIMÉNEZ S., ALARCÓN J., PEREAÑEZ J. Y VARGAS L. (2009). «Evaluación fitoquímica preliminar de *Heliconia psittacorum* y *H. rostrata* y de la potencial actividad inhibitoria de algunos de los efectos del veneno de *Bothrops asper* (Mapaná x)», *Vitae*, Universidad de Antioquia-Colombia, 16: 237-244.
- ESTRADA GS., JIMENEZ SL., ALARCON PJ. Y VARGAS LJ. (2010). «Application of ultrasound in the dissolution of potential antiophidian compounds from two ethanolics extracts of two species of Heliconias», *Ultrason. Sonochem.*, London-UK, 17: 756-759.

- FABIOLA R. (2002). Tesis UNMSM, <http://investigaciondesarrollo.blogspot.com/2010/11/unmsm-tesis-digitales-facultad-de_1891.html>.
- FAGUNDES SM. Y CARREIRA S. (2000). «Calificación del estado de conservación de la fauna de ofidios (Reptilia, Squamata, Serpentes) de Uruguay». *facena*, Argentina, 16: 45-51.
- FENWICK A., GUTBERLET R., EVANS J. Y PARKINSON C. (2009). «Morphological and molecular evidence for phylogeny and classification of South American pitvipers, genera *Bothrops*, *Bothriopsis*, and *Bothrocophias* (Serpentes: Viperidae)», *Zool. J. Linn. Soc. Lond.*, London-UK, 156: 617-640.
- FERNANDES R., COSTA T., MARCUSSI S., BERNARDES C., MENALDO S., RODRIGUÉZ GONZALÉZ I., PEREIRA P. Y SOARES A. (2011). «Neutralization of pharmacological and toxic activities of *Bothrops jararacussu* snake venom and isolated myotoxins by *Serjania erecta* methanolic extract and its fractions», *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.*, São Paulo-Brasil, 17: 85-93.
- FERNÁNDEZ M., ORTIZ W., PEREÁÑEZ J. Y MARTÍNEZ D. (2010). «Evaluación de las propiedades antiofídicas del extracto etanólico y fracciones obtenidas de *Renealmia alpinia* (Rottb) Mass (Zingiberaceae) cultivada *in vitro*», *Vitae*, Universidad de Antioquia-Colombia, 17: 75-82.
- FERREIRA LAF., HENRIQUES OB., ANDREONI AAS., VITAL GRF., CAMPOS MMC., HABERMEHL GG. Y DE MORAES VL. (1992). «Antivenom and biological effects of ar-turmerone isolated from *Curcuma longa* (Zingiberaceae)», *Toxicon*, London-UK, 30: 1211-8; errata en: *Toxicon* (1992), 30: 1637.
- FESTER G., MARTINUZZI E., RETAMAR J., Y RICCIARDI A. (1961). «Aceites esenciales de la República Argentina», *Academia Nacional de Ciencias*, Córdoba, Argentina, 73-74.
- FIERRO I., BORGES DA SILVA A., DA SILVA LOPEZ C., SOARES DE MOURA R. Y BARJA HIDALGO C. (1999). «Studies on the anti-allergic activity of *Mikania glomerata*», *J. Ethnopharm.*, London-UK, 66: 19-24.
- FLORIANO RS., NOGUEIRA RMB., SAKATE M., LAPOSY CB. Y DA MOTTA YP. (2009). «Effect of *Mikania glomerata* (Asteraceae) leaf extract combined with anti-venom serum on experimental *Crotalus durissus* (Squamata: Viperidae) envenomation in rats», *Rev. Biol. Trop.*, Universidad de Costa Rica-Costa Rica, 57: 929-937.
- FUNG SY., TAN NH., LIEW SH., SIM SM. Y AGUIYI JC. (2009). «The protective effects of *Mucuna pruriens* seed extract against histopathological changes induced by Malayan cobra (*Naja sputatrix*) venom in rats», *Trop. Biomed.*, Malaysia, 26: 80-84.
- FUNG SY., TAN NH., SIM SM. Y AGUIYI JC. (2012). «Effect of *Mucuna pruriens* seed extract pretreatment on the responses of spontaneously beating rat atria and aortic ring to *Naja sputatrix* (Javan Spitting Cobra) Venom», *Evid. Based Complement. Alternat. Med.*, Hindawi-Egipto, 12: 1-6.
- FUNG SY., TAN NH., SIM SM., MARINELLO E., GUERRANTI R., AGUIYI JC. (2011). «*Mucuna pruriens* Linn. seed extract pretreatment protects against cardiorespiratory and neuromusculardepressant effects of *Naja sputatrix* (Javan spitting cobra) venom in rats», *Indian J. Exp. Biol.*, India, 49: 254-259.
- GARCÍA DENEGRI M., ACOSTA O., HUANKAHUIRE-VEJA S., MARTINS-DE-SOUZA D., MARANGONI S., MARUÑAK S., TEIBLER G., LEIVA L. Y PONCE-SOTO L. (2010). «Isolation and functional characterization of a new acidic PLA₂ Ba SPII RP4 of the *Bothrops alternatus* snake venom from Argentina», *Toxicon*, London-UK, 56: 64-74.
- GAY C., LEIVA L., RUIZ R. Y ACOSTA O. (2004). «Inhibición de la actividad proteolítica del veneno de *Bothrops alternatus* por quelantes de metales», *Comunicaciones Científicas y Tecnológicas unne*, E-015, <<http://www.unne.edu.ar>>.

- GEOGHEGAN P., ANGULO Y., CANGELOSI A., DÍAZ M. Y LOMONTE B. (1999). «Characterization of a basic phospholipase A2-homologue myotoxin isolated from the venom of the snake *Bothrops neuwiedii* (yarára chica) from Argentina», *Toxicon*, London-UK, 37: 1735-1746.
- GINER-LARZA E., MÁÑEZ S., GINER-PONS R., RECIO M. Y RÍOS J. (2000). «On the antiinflammatory and anti-phospholipase A2 activity of extracts from lanostane-rich species», *J. Ethnopharmacol.*, London-UK, 73: 61-69.
- GIRISH KS., MOHANAKUMARI HP., NAGARAJU S., VISHWANATH BS. Y KEMPARAJU K. (2004). «Hyaluronidase and protease activities from Indian snake venoms: neutralization by *Mimosa pudica* root extracts», *Fitoterapia*, London-UK, 75: 378-380.
- GOMES A., SAHA A., CHATTERJEE I., CHAKRAVARTY AK. (2007). «Viper and cobra venom neutralization by beta-sitosterol and stigmasterol isolated from the root extract of *Pluchea indica* Less. (Asteraceae)», *Phytomedicine*, London-UK, 14: 637-644.
- GÓMEZ H. F. (1942). «La jurisdicción de la ciudad de Vera de las Siete Corrientes», en: Academia Nacional de la Historia - *Actas capitulares de Corrientes*. Vol 1, Talleres gráficos de Guillermo Kraft, Buenos Aires.
- GONZÁLEZ TORRES D. (1992). *Catálogo de plantas medicinales (y alimenticias y útiles) usadas en Paraguay*, Asunción-Paraguay, 51, 258.
- GUERRANTI R., AGUIYI JC., ERRICO E., PAGANI R. Y MARINELLO E. (2001). «Effects of *Mucuna pruriens* extract on activation of prothrombin by *Echis carinatus* venom», *J. Ethnopharmacol.*, London-UK, 75: 175-180.
- GUERRANTI R., AGUIYI JC., OGUELI IG., ONORATI G. Y NERI S. (2004). «Protection of *Mucuna pruriens* seeds against *Echis carinatus* venom is exerted through a multiform glycoprotein whose oligosaccharide chains are functional in this role», *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, London-UK, 323: 484-490.
- GUERRANTI R., OGUELI IG., BERTOCCI E., MUZZI C. Y AGUIYI JC. (2008). «Proteomic analysis of the pathophysiological process involved in the antsnake venom effect of *Mucuna pruriens* extract», *Proteomics*, Hoboken-USA, 8: 402-412.
- GUERRANTI R., AGUIYI J., NERI S., LEONCINI R., PAGANI R. Y MARINELLO E. (2002). «Proteins from *Mucuna pruriens* and enzymes from *Echis carinatus* venom. Characterization and cross-reactions», *J. Biol. Chem.*, Universidad de Harvard-USA, 277: 17072-17078.
- GUEVARA J. (1882). «Historia de la conquista del Paraguay, Río de la Plata y Tucumán», manuscrito reproducido, Buenos Aires-Argentina.
- GUPTA M. (ed.). (1995). «270 Plantas Medicinales Iberoamericanas», Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo, Subprograma de Química Fina Farmacéutica, Santafé de Bogotá, Colombia: 553-554.
- GUTIERREZ J., AVILA C., ROJAS E. Y CERDAS L. (1988). «An alternative *in vitro* method for testing the potency of the polyvalent antivenom produced in Costa Rica», *Toxicon*, London-UK, 26: 411-413.
- GUTIÉRREZ JM., THEAKSTON RDG. Y WARRELL DA. (2006). «Confronting the neglected problem of snake bite envenoming: the need for a global partnership». *plos Med.*, USA, 3: 727-731.
- HARVEY AL. (1991). *Snake toxins*. Nueva York, Pergamon.
- HASSON SS., AL-JABRI AA., SALLAM TA., AL-BALUSHI MS. Y MOTHANA RA. (2010). «Antsnake venom activity of *Hibiscus aethiopicus* L. against *Echis ocellatus* and *Naja n. nigricollis*», *J. Toxicol.*, Hindawi-Egipto, 2010, 1-9.
- HEARD K, O'MALLEY G, DART R (1999) «Antivenom therapy in the Americas». *Drugs*. 58. 5-15.

- HOGUE, A. R. E ROMANO, S. A. (1972). «Sinopse das serpentes peçonhentas do Crasil», *Mem. Inst. Butantan*, 36: 109-208.
- HOUGHTON P. (1993). «*In vitro* testing of some West African and Indian plants used to treat snakebites», *Médicament et nutrition: L'approche ethnopharmacologique*, 2.° Colloque Européen d'Ethnopharmacologie, 263-274.
- HUNG YC., SAVA V., HONG MY. Y HUANG GS. (2004). «Inhibitory effects on phospholipase A2 and antivenin activity of melanin extracted from *Thea sinensis* Linn», *Life Sci.*, London-UK, 74: 2037-2047.
- IOVINE E. Y SELVA A. (1985). *El laboratorio en la práctica clínica*. 3.ª edición, Panamericana, Buenos Aires-Argentina, 168-169.
- ITURRALDE P. (1925). *Erbe Medicinali del Chaco*, Istituto Cristóforo Colombo, Roma-Italia.
- IZIDORO L., RODRIGUES V., RODRIGUES R., FERRO E., HAMAGUCHI A., GIGLIO J. Y HOMSI-BRADEBURGO M. (2003). «Neutralization of some hematological and hemostatic alterations induced by newwiedase, a metalloproteinase isolated from *Bothrops newwiedi pauloensis* snake venom, by the aqueous extract from *Casearia mariquiensis* (Flacourtiaceae)», *Biochimie*, París-Francia, 85: 669-675.
- JANUÁRIO AH., SANTOS SL., MARCUSSIA S., MAZZIB MV., PIETRO RCLR., SATO DN., ELLENA J., SAMPAIO SV., FRANÇA SC. Y SOARES AM. (2004). «Neo-clerodane diterpenoid, a new metalloprotease snake venom inhibitor from *Baccharis trimera* (Asteraceae): anti-proteolytic and anti-hemorrhagic properties», *Chem. Biol. Inter.*, London-UK, 150: 243-251.
- JOLIS J. (1789). *Saggio sulla storia naturale della provincia del Gran Chaco e sulle pratiche, e su' costumi dei popoli che l'abitano*, Ed. Faenza. Tomo 1. Buenos Aires, Argentina, Traducida y editada con el título de Ensayo sobre la Historia natural del Gran Chaco en 1972.
- JORGE M. Y RIBEIRO L. (2000). «Envenoming by the South American pit viper *Bothrops newwiedi* Wagler», *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, London-UK, 94:731-734.
- JOZAMÍ JM. Y MUÑOZ J. DE D. (1982). *Árboles y arbustos indígenas de la Provincia de Entre Ríos*, Instituto Investigaciones de Productos Naturales, de Análisis y Síntesis Orgánicas, (IPNAYS) (CONICET-UNL), Santa Fe-Argentina.
- JURGILAS P., NEVES-FERREYRA A., DOMONT G., MOUSSATCHÉ H. Y PERALES J. (1999). «Detection of an antibothropic fraction in opossum (*Didelphis marsupialis*) milk that neutralizes *Bothrops jararaca* venom», *Toxicon*, London-UK, 37: 167-172.
- KONAREV A., ANISIMOVA I., GAVRILOVA V., VACHRUSHEVA T., KONECHNAYA G., LEWIS M. Y SHEWRY P. (2002). «Serina proteinase inhibitors in the Compositae: distribution, polymorphism and properties», *Phytochemistry*, Washington-USA, 59: 279-291.
- KVIST LP. (1986). «Gesneriads and snake bite», *The Gloxinian*, 36: 9-13.
- LEANPOLCHAREANCHAI J., PITHAYANUKUL P., BAVOVADA R. Y SAPARPAKORN P. (2009). «Molecular docking studies and anti-enzymatic activities of *Thai mango* seed kernel extract against snake venoms», *Molecules*, Suiza, 14: 1404-1422.
- LIANG W. (1987). «Antisnake bite action of *Picrasma quassioides*», *Bull. Chin. Mat. Med.*, 12: 54
- LIMBERGER RP., ABOY ALL., BASSANI VL., MORENO PRH., RITTER MR. Y HENRIQUEZ AT. (2001). «Essential oils from four *Mikania* species (Asteraceae)», *J. Essent. Oil Res.*, Allured-USA, 13: 225-228.
- LI-SHIAN S., OING-CHUNG K., YAO-LUNG T., AMOORU GANGALAH D., TIAN-DHUNG W. (2004). «The alkaloids and other constituents from the root and stem of *Aristolochia elegans*», *Bioorganic Med. Chem.*, London-UK UK, 12: 439-446.

- LOBITZ G., TAMAYO-CASTILLO G. Y MERFORT I. (1997). «Diterpenes and sesquiterpenes from *Mikania banisteria*», *Phytochemistry*, Washington-USA, 46: 161-164.
- LOBO T., PEREAÑEZ J., ZAPATA K., GUTIÉRREZ P., LONDOÑO M., NÚÑEZ V. Y ROJANO B. (2010). «Actividad inhibitoria de *Murraya paniculata* contra fosfolipasas A2 miotóxicas», *Vitae*, Universidad de Antioquia-Colombia, 17: 291-298.
- LOMONTE B., MORENO E., TARKOWSKI A., HANSON L. Y MACCARANA M. (1994). «Neutralizing interaction between heparins and myotoxin II, a lysine 49 phospholipasa A2 from *Bothrops asper* snake venom», *J. Biol. Chem.*, Universidad de Harvard-USA, 269: 29867-29873.
- LÓPEZ SÁEZ J. Y PÉREZ SOTO J. (2009). «Plantas alexitéricas: antídotos vegetales contra las picaduras de serpientes venenosas», *Medicina Naurista.*, España, 3: 17-24.
- LOZANO P. (1733). «Descripcion chorographica del Terreno Rios, arboles y animales de las dilatadissimas Provincias del Gran Chaco, Gualamba, y de los Ritos y costumbres de las inumerables naciones barbaros e infideles que le habitan. Con una cabal Relacion Historica de lo que en ellos han obrado para conquistarlas algunos Gobernadores y Ministros Reales, y los Misioneros Jesuitas para reducirlos a la fe del Verdadero Dios», Córdoba-España, reeditada en 1941 por Radames Altieri, Universidad de Tucumán-Argentina.
- MACHIAH DK. Y GOWDA TV. (2006). «Purification of a post-synaptic neurotoxic phospholipase A2 from *Naja naja* venom and its inhibition by a glycoprotein from *Withania somnifera*», *Biochimie*, Paris-Francia, 88: 701-710.
- MACHIAH DK., GIRISH KS. Y GOWDA TV. (2006). «A glycoprotein from a folk medicinal plant, *Withania somnifera*, inhibits hyaluronidase activity of snake venoms», *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.*, London-UK, 143: 158-161.
- MAHADESWARASWAMY YH., NAGARAJU S., GIRISH KS. Y KEMPARAJU K. (2008). «Local tissue destruction and procoagulation properties of *Echis carinatus* venom: Inhibition by *Vitis vinifera* seed methanol extract», *Phytother. Res.*, Hoboken-USA, 22: 963-969.
- MAHADESWARASWAMY YH., DEVARAJA S., KUMAR MS., GOUTHAM YN. Y KEMPARAJU K. (2009). «Inhibition of local effects of Indian Daboia/ *Vipera russelli* venom by the methanolic extract of grape (*Vitis vinifera* L.) seeds», *Indian J. Biochem. Biophys.*, New-Delhi-India, 46: 154-160.
- MAHANTA M. Y MUKHERJEE A. (2001). «Neutralisation of lethality, myotoxicity and toxic enzymes of *Naja kaouthia* venom by *Mimosa pudica* root extracts», *J. Ethnopharmacol.*, London-UK, 75: 55-60.
- MAIORANO V., MARCUSSI S., DAHER M., OLIVEIRA C., COUTO L., GOMES O., FRANÇA S., SOARES A. Y PEREIRA P. (2005). «Antiophidian properties of the aqueous extract of *Mikania glomerata*», *J. Ethnopharmacol.*, London-UK, 102: 364-370.
- MAKHIIJA I. Y KHAMAR D. (2010). «Anti-snake venom properties of medicinal plants», *Der Pharm. Lett.*, Gurgaon-India, 2: 399-411.
- MANFRED L. (1977). *7000 Recetas botánicas a base de plantas medicinales*, Buenos Aires-Argentina, 11.ª, Ed. Kier.
- MARTÍNEZ CROVETTO R. (1981). «Plantas Utilizadas en Medicina en el n.o. de Corrientes», Tucumán, Argentina, *Miscelánea*, Fundación Miguel Lillo, 69.
- MARUÑAK S., NÚÑEZ S., FERNÁNDEZ C., LEIVA L. Y ACOSTA DE PEREZ O. (2010). «Acción del veneno de *Bothrops diporus* (yarára chica) del nordeste argentino sobre la hemostasia en diferentes mamíferos», *Rev. Vet.*, Mexico, 21: 43-47.

- MEENATCHISUNDARAM S., PARAMESWARI G. Y MICHAEL A. (2009a). «Studies on antivenom activity of *Andrographis paniculata* and *Aristolochia indica* plant extracts against *Daboia russelli* venom by *in vivo* and *in vitro* methods», *Indian J. Sci. Technol.*, India, 2: 76-79.
- MEENATCHISUNDARAM S., PRIYAGRACE S., VIJAYARAGHAVAN R., VELMURUGAN A., PARAMESWARI G. Y MICHAEL A. (2009b). «Antitoxin activity of *Mimosa pudica* root extracts against *Naja naja* and *Bangarus caeruleus* venoms», *Bangladesh J. Pharmacol.*, Bangladesh, 4: 105-109.
- MELO P., PINHEIRO D., RICARDO H., FERNANDES F., TOMAZ M., EL-KIK C., STRAUCH M., DA FONSECA T., SIFUENTES D., CALIL-ELIAS S., BUARQUE C., BRITO F., COSTA P. Y DA SILVA A. (2010). «Ability of a synthetic coumestan to antagonize *Bothrops* snake venom activities», *Toxicon*, London-UK, 55: 488-496.
- MELO PA., MORS WB., NASCIMENTO MC. Y SUAREZ-KURTZ G. (1989). «Antagonism of the myotoxic and hemorrhagic effects of crotalide venoms by *Eclipta prostrata* extracts and constituents», *Eur. J. Pharmacol.*, London-UK, 27: 1003-1009.
- MELO P., DO NASCIMENTO M., MORS W. Y SUAREZ KURTZ G. (1994). «Inhibition of the myotoxic and hemorrhagic activities of crotalid venoms by *Eclipta prostrata* (Asteraceae) extracts and constituents», *Toxicon*, London-UK, 32: 595-603.
- MENDES MM., OLIVEIRA CF., LOPES DS., VALE LH. Y ALCANTARA TM. (2008). «Anti-snake venom properties of *Schizolobium parahyba* (Caesalpinoideae) aqueous leaves extract», *Phytother. Res.*, Hoboken-USA, 22: 859-866.
- MÉNDEZ M. Y RIET C. (1995). «Snakebite in sheep», *Vet. Human. Toxicol.*, EVISA-Europa, 37: 62-63.
- MENEGHEL M., CARREIRA S. Y ACHAVAL F. (2001). *Clave para la determinación de reptiles del Uruguay*. Universidad de la República.
- MONTENEGRO P. (1945). «*Materia Médica Misionera*», Imprenta de la Biblioteca Nacional, Buenos Aires-Argentina.
- MORAIS V. (2012). *Análisis comparativo de los venenos ofídicos de importancia clínica y estudio bioquímico del accidente ofídico en Uruguay*. Facultad de Química, Universidad de la República.
- MORENO J. (1993). «Effect of aristolochic acid on arachidonic acid cascade and *in vivo* models of inflammation», *Immunopharmacology*, London-UK, 26: 1-9.
- MORS W., DO NASCIMENTO M., RUPPELT PEREIRA B., ALVARES PEREIRA N. (2000). «Plant natural products active against snake bite- the molecular approach», *Phytochemistry*, Washington-USA, 55: 627-642.
- MORS W., DO NASCIMENTO M., PARENTE J., DA SILVA M., MELO P. Y SUAREZ-KURTZ G. (1989). «Neutralization of lethal and myotoxic actives of South American rattlesnake venom by extracts and constituents of the plants *Eclipta prostrate* (Asteraceae)», *Toxins*, Suiza, 27: 1003-1009.
- MOURA LD., SANCHEZ EF., BIANCO EM., PEREIRA RC., TEIXEIRA VL. Y FULY AL. (2010). «Antiophidian properties of a dolastane diterpene isolated from the marine brown alga *Canistrocarpus cervicornis*», *Biomed. Pharmacother.*, London-UK, 1: 61-66.
- MUKHERJEE AK., DOLEY R. Y SAIKIA D. (2008). «Isolation of a snake venom phospholipase A₂ (PLA₂) inhibitor (AIPAI) from leaves of *Azadirachta indica* (Neem): Mechanism of PLA₂ inhibition by AIPAI *in vitro* condition», *Toxicon*, London-UK, 1: 1548-1553.
- MUKHERJEE H. (2009). «Evaluation of Herbal Medicinal Products. Perspectives on quality, safety and efficacy», *Pharmaceutical Press*, Grayslake, IL.
- NAKAGAWA M., NAKANISHI K., DARKO L. Y VICK J. (1982). «Structures of cabenegrins A-I and A-II, potent anti-snake venoms», *Tetrahedron Lett.*, London-UK, 23: 3855-3858.

- NAPIMOGA MH. Y YATSUDA R. (2010). «Scientific evidence for *Mikania laevigata* and *Mikania glomerata* as a pharmacological tool», *J. Pharm. Pharmacol.*, Hoboken-USA, 62: 809-820.
- NAZATO VS., RUBEM-MAURO L., VIEIRA NAG., ROCHA DDS. Y SILVA MG. (2010). «*In vitro* anti-ophidian properties of *Dipteryx alata* vogel bark extracts», *Molecules*, Suiza, 15: 5956-5970.
- NAZIMUDDIN SK., RAMASWAMY S. Y KAMESWARAN L. (1978). «Effect of *Andrographis paniculata* on snake venom induced death and its mechanism», *Indian J. Pharmaceut. Sci.*, Benaras-India, 40: 132-133.
- NEVES-FERREIRA A., PERALES J., FOX J., SHANNON J., MAKINO D., GARRATT R. Y DOMONT G. (2002). «Structural and functional analyses of DM43, a snake venom metalloproteinase inhibitor from *Didelphis marsupialis* serum», *J. Biol. Chem.*, Universidad de Harvard-USA, 277: 13129-13137.
- NISHIJIMA C., RODRIGUES C., SILVA M., LOPES-FERREIRA M., VILEGAS W. Y HIRUMA-LIMA C. (2009). «Anti-hemorrhagic activity of four brazilian vegetable species against *Bothrops jararaca* venom», *Molecules*, Suiza, 14: 1072-1080.
- NUNEZ V., CASTRO V., MURILLO R., PONCE-SOTO LA., MERFORT I. Y LOMONTE B. (2005). «Inhibitory effects of *Piper umbellatum* and *Piper peltatum* extracts towards myotoxic phospholipases A2 from *Bothrops* snake venoms: Isolation of 4-nerolidylcatechol as active principle», *Phytochemistry*, Washington-USA, 66: 1017-1025.
- O DE OJ. Y ASUZU IU. (2006). «The anti-snake venom activities of the methanolic extract of the bulb of *Crinum jagus* (Amaryllidaceae)», *Toxicon*, London-UK, 48: 331-342.
- OHLER M., GEORGIEVA D., SEIFERT J., VON BERGEN M., ARNI R.K., GENOV N. Y BETZE C. (2010). «The venomics of *Bothrops alternatus* is a pool of acidic proteins with predominant hemorrhagic and coagulopathic activities», *J Proteome Res.*, Washington-USA, 9: 2422-37.
- OKONOGI T., HATTORI Z. Y AMAGAI E. (1970). «The emergency treatment of poisonous snake-bite with tannic acid solution», *Snake*, 2: 106-110.
- OKSAY M., USAME TAMER A., AY G., SARI D. Y AKTAS K. (2005). «Antimicrobial activity of the leaves of *Lippia triphylla* (L Her) O. Kuntze (Verbenaceae) against on bacteria and yeasts», *Int. J. Biol. Sci.*, Asian network, 5: 620-622.
- OLIVA M. DE LAS M., BELTRAMINO E., DALLUCCI N., CACERO C., ZYGADLO J. Y DEMO M. (2010). «Antimicrobial activity of essential oils of *Aloysia triphylla* (L'Her) Briton from different region of Argentine», *BLACPM*, Universidad de Santiago de Chile, Chile, 9: 29-37.
- OLIVEIRA J., MONTES DE OCA H., DUARTE M., DINIZ C. Y FORTES-DIAS C. (2002). «Toxicity of South American snake venoms measured by an *in vitro* cell culture assay», *Toxicon*, London-UK, 40: 321-325.
- OLIVEIRA, MAIORANO VA., MARCUSSI S., SANT'ANA CD. Y JANUARIO AH. (2005). «Anticoagulant and antifibrinogenolytic properties of the aqueous extract from *Bauhinia forficata* against snake venoms», *J. Ethnopharmacol.*, London-UK, 98: 213-216.
- OTERO R., FONNEGRA R., JIMÉNEZ S., NÚÑEZ V., EVANS N., ALZATE S., GARCÍA M., SILDARRIAGA M., DEL VALLE G., OSORIO R., DÍAZ A., VALDERRAMA R., DUQUE A. Y VÉLEZ H. (2000a). «Snakebites and ethnobotany in the northwest región of Colombia Part. I: Traditional use of plants», *J. Ethnopharmacol.*, London-UK, 71: 493-504.
- OTERO R., NÚÑEZ V., JIMÉNEZ S., FONNEGRA R., OSORIO R., GARCÍA M. Y DÍAZ A. (2000). «Snakebites and ethnobotany in the northwest region of Colombia Part. II. Neutralization of lethal and enzymatic effects of *Bothropsatrox* venom», *J. Ethnopharmacol.*, London-UK, 71: 505-524.

- OTERO R., NUÑEZ V., OSORIO R., GUTIÉRREZ J., GIRALDO C. Y POSADA L. (1995). «Ability of six Latin American antivenoms to neutralize the venom of mapanaequis (*Bothrops atrox*) from Antioquia and Chocó (Colombia)», *Toxicon*, London-UK, 33: 809-815.
- PARDO M. Y NATALUCCI C. (2002). «Electrophoretic analysis (tricine-SDS-PAGE) of bovine caseins», *Acta Farm. Bonaerense*, Buenos Aires-Argentina, 21: 57-60.
- PAUCKE F. (1942). *Hacia allá y para acá. Una estada entre los indios mocovíes 1749-1767*, Tucumán-Argentina, I.
- PEREAÑEZ J., JIMÉNEZ S., QUINTANA J., NUÑEZ V., FERNANDEZ M. Y RESTREPO Y. (2008). «Inhibición de las actividades proteolítica, coagulante y hemolítica indirecta inducidas por el veneno de *Bothrops asper* por extractos etanólicos de tres especies de *Heliconias*», *Vitae*, Universidad de Antioquia-Colombia, 15: 157-164.
- PEREIRA F., ARAÚJO C., BELA R., RODRIGUES R. Y OLIVEIRA F. (2005). «Estudo preliminar da propriedade de proteção gástrica do extrato hidroalcoólico evaporado de *Trixis divaricata* Sprengel», IV encontro de pós-graduação stricto sensu, Itativa, Universidade São Francisco.
- PEREIRA I., BARBOSA A., SALVADOR M., SOARES A., RIBEIRO W., COGO J. Y ZAMUNES S. (2009). «Anti-inflammatory activity of *Blutaparon portulacoides* ethanolic extract against the inflammatory reaction induced by *Bothrops jararacussu* venom and isolated myotoxins Bth TX-I and II», *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.*, San Pablo-Brasil, 15: 527-545.
- PILOSOFF A. Y BARTHOLOMAI G. (ed). (2000). *Caracterización funcional y estructural de proteínas*, Buenos Aires-Argentina, editorial CYTED-Eudeba, Universidad de Buenos Aires, 159-166.
- PINO CHERONI AI. (1994). «Producción de suero antiofídico en Uruguay». *Rev Med Uruguay*, Montevideo-Uruguay; 10: 147-154.
- PITHAYANUKUL P., LAOVACHIRASUWAN S., BAVOVADA R., PAKMANEE N. Y SUTTISRI R. (2004). «Anti-venom potential of butanolic extract of *Eclipta prostrata* against Malayan pit viper venom», *J. Ethnopharmacol.*, London-UK, 90: 347-352.
- PITHAYANUKUL P., LEANPOLCHAREANCHAI J. Y SAPARPAKORN P. (2009). «Molecular docking studies and anti-snake venom metalloproteinase activity of *Thai mango* seed kernel extract», *Molecules*, Suiza, 14: 3198-3213.
- PITHAYANUKUL P., LEANPOLCHAREANCHAI J. Y BAVOVADA R. (2010). «Inhibitory effect of tea polyphenols on local tissue damage induced by snake venoms», *Phytother. Res.*, Hoboken-USA, 1: S56-S62.
- PUEBLA P., OSHIMA-FRANCO Y., FRANCO LM., SANTOS MG., SILVA RV., RUBEM-MAURO L. Y SAN FELICIANO A. (2010). «Chemical constituents of the bark of *Dipteryx alata* Vogel, an active species against *Bothrops jararacussu* venom», *Molecules*, Suiza, 15: 8193-8204.
- RASLAN DS., JAMAL CM., DUARTE DS., BORGES MH. Y DE LIMA ME. (2002). «Anti-PLA2 action test of *Casearia sylvestris* Sw», *Boll. Chim. Farm.*, Italia, 141(6): 457-60.
- RATANABANANGKON K., CHERDCHU C. Y CHUDAPONGSE P. (1993). «Studies on the cobra neurotoxin inhibiting activity in an extract of *Curcuma* sp. (Zingiberaceae) rhizome», *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health*, Tailandia, 24: 178-185.
- RATES S. (2001). «Plants as source of drugs», *Toxicon*, London-UK, 39: 603-613.
- RAZI MT., BIN ASAD MH., KHAN T., CHAUDHARY MZ., ANSARI MT., ARSHAD MA. Y SAQIB QN. (2011). «Antihemorrhagic potentials of *Fagonia cretica* against *Naja naja karachiensis* (black Pakistan cobra) venom», *Nat. Prod. Res.*, London-UK, 25: 1902-1907.
- REYES CHILPA R. Y JIMENEZ ESTRADA M. (1995). «Química de las plantas alexitéras», *Interciencia*, Caracas-Venezuela, 20: 257-263.

- REYES-CHILPA R., GOMEZ-GARIBAY F., QUIJANO L., MAGOS-GUERRERO GA. Y RIOS T. (1994). «Preliminary results on the protective effect of (-)-edunol, a pterocarpan from *Brongniartia podalyrioides* (Leguminosae), against *Bothrops atrox* venom in mice», *J. Ethnopharmacol.*, London-UK, 42: 199-203.
- RICCIARDI ROSSETTI G., TORRES A., CAMARGO F., AGRELO DE NASSIFF A., DELLACASSA E. Y RICCIARDI A. (2008a). «Caracterización quimiotaxonómica y evaluación de la actividad contra veneno de yarará de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez.», Congreso Ítalo-Latinoamericano de Etnomedicina (SILAE), Palermo (Italia).
- RICCIARDI ROSSETTI G., TORRES AM., CAMARGO FJ., RICCIARDI AIA. Y DELLACASSA E. (2008b). «Quimiotaxonomía de *Trixis divaricata* Spreng. Especie utilizada contra venenos de víboras en el nordeste argentino», Sesiones de Comunicaciones Científicas y Tecnológicas, Corrientes-Argentina, unne, <<http://www.unne.edu.ar>>.
- RICCIARDI A., TORRES A., CAMARGO F. Y SOLER V. (2010). «Ofidismo, araneísmo, escorpionismo, intoxicación por venenos animales», Jornadas de accidente ofídico, arácnido y escorpiónico, Margarita Belén, Chaco-Argentina.
- RICCIARDI ROSSETTI G., TORRES A., BUBENIK A., RICCIARDI A., LORENZO D. Y DELLACASSA E. (2011). «Environmental effect on essential oil composition of *Aloysia citriodora* from Corrientes (Argentina)», *Nat. Prod. Comm.*, London-UK, 6: 1711-1714.
- RICCIARDI VERRASTRO B., TORRES A., CAMARGO F. Y DELLACASSA E. (2012a). «Modelo: *Asclepia mellodora*, evaluación de su actividad antiveneno», Área Química-Bioquímica, Jornadas Científicas de Estudiantes de Bioquímica, Corrientes-Argentina, UNNE, Corrientes-Argentina.
- RICCIARDI VERRASTRO B., TORRES A., CAMARGO F., RICCIARDI ROSSETTI G., RICCIARDI A. Y DELLACASSA E. (2012b). «Actividad antiveneno de especies del género *Asclepia* contra yarará chica (*Bothrops diporus*)», XIV Jornadas de la Sociedad Uruguaya de Biociencias, Piriápolis-Maldonado-Uruguay.
- RICCIARDI AIA., CABALLERO NE. Y CHIFA C. (1996). «Identificación botánica de plantas descritas en “Materia Médica Misionera” usadas en accidentes ofídicos», *Rojasiana*, Buenos Aires- Argentina, 3: 239-245.
- RICCIARDI A. (2005). «Plantas con tradición de uso como alexíteras en la medicina popular», Curso de Actualización y Perfeccionamiento para graduados *Vegetales de importancia médica y Toxicológica. Control, Legislación y Fiscalización*, Asociación Amigos del Museo de Farmacobotánica, Buenos Aires-Argentina.
- (1999). *Intoxicación por venenos animales. Ofidismo*, Cátedra de Toxicología y Química Legal UNNE, Corrientes-Argentina.
- (2000). *Toxicología de las especies vegetales utilizadas en la Medicina Popular*, Cátedra Toxicología y Química Legal, UNNE, Corrientes-Argentina.
- (2010 b). «Las plantas aromáticas en la etnomedicina del centro-norte argentino», XXVI seminario Producción de plantas aromáticas, obtención y utilización de los aceites esenciales, Jardín Botánico AE Ragonese (JBAER) del Instituto Recursos Biológicos, INTA, Castelar-Buenos Aires-Argentina.
- ROCHA S., LOMONTE B., NEVES-FERREIRA A., TRUGILHO M., JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO I., HO P., DOMONT G., GUTIÉRREZ J. Y PERALES J. (2002). «Functional analysis of DM64, an antimyotoxic protein with immunoglobulin-like structure from *Didelphis marsupialis* serum», *Eur. J. Biochem.*, Hoboken-USA, 262: 6052-6062.
- RODRIGUES V., SOARES A., MANCIN A., FONTES M., HOMSI-BRANDEBURGO M. Y GIGLIO J. (1998). «Geographic variations in the composition of myotoxins from *Bothrops neuwiedii* snake venoms: biochemical characterization and biological activity», *Comp. Biochem. Physiol. A*, London-UK, 121: 215-22.

- ROSENFELD G. (1971). «Symptomatology, pathology and treatment of snake bites in south america», BÜCHERL W., BUCKLEY EE., DEULOFEU V., (eds.), *Venomous animals and their venoms*, Academic Press, London-UK, 2: 345-383.
- SALAZAR A., PEREÑEZ J., QUINTANA J., JIMÉNEZ S. Y REY J. (2009). «Análisis fitoquímico preliminar e inhibición de los efectos hemolíticos, proteolítico y coagulante del veneno de *Bothrops asper* (mapaná) con extractos etanólicos obtenidos del aguacate (*Persea americana* Mill. var. Hass). Lauraceae», III Congreso Latinoamericano del aguacate, Medellin-Colombia, noviembre 2009.
- SALLAU AB., NJOKI GC., OLOKISI AR., WUROCHEKKE AU. Y ABDUKADIR AA. (2005). «Effects of *Guiera senegalensis* leaf extracts on some *Echis carinatus* venom enzymes», *J. Med. Sci.*, Pakistan, 5: 2880-2883.
- SAMY R., THWIN M., GOPALAKRISHNAKONE P. E IGNACIMUTHU S. (2008). «Ethnobotanical survey of folk plants for the treatment of snakebites in Southern part of Tamilnadu, India», *J. Ethnopharmacol.*, London-UK, 115: 302-312.
- SÁNCHEZ LABRADOR J. (1771). «El Paraguay Natural», Facsímil Padre Carbonell de Masy (st), Faenza-Italia.
- SARKHEL S., CHAKRAVARTY AK., DAS R., GOMES A Y GOMES A. (2011). «Snake venom neutralising factor from the root extract of *Embllica officinalis* Linn», *Orient. Pharm. Exp. Med.*, South Korea, 11: 25-33.
- SARTORATTO A., MACHADO AL., DELARMELINA C., FIGUEIRA GM., DUARTE MC. Y REHDER VL. (2004). «Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil», *Braz. J. Microbiol.*, San Pablo-Brasil, 35: 275-280.
- SHIRWAIKAR A., RAJENDRAN K., BODLA R. Y KUMAR CD. (2004). «Neutralization potential of *Viper russelli russelli* (Russell's viper) venom by ethanol leaf extract of *Acalypha indica*», *J. Ethnopharmacol.*, London-UK, 94: 267-273.
- SPEARMAN-KARBER (WHO, 1981). «Progress in the characterization of venoms and standardization of antivenoms», OMS, 58.
- SPERONI J. (1994). «Ofidismo», *Centro de Estudios e Investigaciones Herpetológicas*, <<http://ceih.org/Archives/Ofidismo.php>>, consultado en septiembre 2013.
- STASHENKO E., JARAMILLO B. Y MARTÍNEZ JR. (2003). «Comparación de la composición química y de la actividad antioxidante *in vitro* de los metabolitos secundarios volátiles de las plantas de la familia Verbenaceae», *Rev. Acad. Colomb. Cienc.*, Colombia, 27: 105.
- TAN NH., FUNG SY., SIM SM., MARINELLO E., GUERRANTI R. Y AGUIYI JC. (2009). «The protective effect of *Mucuna pruriens* seeds against snakevenom poisoning», *J. Ethnopharmacol.*, London-UK, 123: 356-358.
- TERBLANCHÉ F. Y KORNELIUS G. (1996). «Essential oil constituents of the genus *Lippia* (Verbenaceae).A Literature Review», *J. Essent. Oil Res.*, Allured-USA, 8: 471-485.
- TICLI FK., HAGE LI., CAMBRAIA RS., PEREIRA PS. Y MAGRO AJ. (2005). «Rosmarinic acid, a new snake venom phospholipase A2 inhibitor from *Cordia verbenacea* (Boraginaceae): antiserum action potentiation and molecular interaction», *Toxicon*, London-UK, 46: 318-327.
- TORRES A., CAMARGO F., RICCIARDI ROSSETTI G., DELLACASSA E. Y RICCIARDI A. (2007a) «Study of antihemolytic activity of *Cissampelos pareira* extract against poison of *Bothrops newwiedi diporus* (COPE) (yará chica)», *blacpma*, Universidad de Santiago de Chile-Chile, 6: 280-281.
- (2007 b). «Estudio de la actividad antihemolítica de extractos de *Cissampelos pareira* contra veneno de *Bothrops newwiedi diporus* (COPE) (yará chica)», IX Simposio Argentino de Farmacobotánica, XII Simposio Latinoamericano de Farmacobotánica, Tucumán-Argentina.

- TORRES A., CAMARGO F., DELLACASSA E. Y RICCIARDI A. (2007 c). «Acción antihemolítica in vitro de extractos de plantas del nordeste argentino sobre el veneno de *Bothrops neuwiedi diporus* COPE (yarára chica)», XVI Simposio Italo Latinoamericano de Etnomedicina, La Plata-Argentina.
- TORRES A., CAMARGO F., RICCIARDI ROSSETTI G., DELLACASSA E. Y RICCIARDI A. (2008). «Inhibición de la actividad procoagulante del veneno de yarára chica (*Bothrops neuwiedi diporus*), por extractos de plantas del NE argentino», Congreso Ítalo-Latinoamericano de Etnomedicina (SILAE), Palermo-Italia.
- TORRES AM., CAMARGO FJ., RICCIARDI ROSSETTI GA., RICCIARDI AIA. Y DELLACASSA E. (2010). «Inhibición de la actividad proteolítica del veneno de *Bothrops diporus* por extractos de plantas del nordeste argentino», Sesiones de Comunicaciones Cinéticas y Tecnológicas, Corrientes-Argentina UNNE, <<http://www.unne.edu.ar>>.
- (2010b). «Fraccionamiento y caracterización fitoquímica del extracto alcohólico de hojas del laurel amarillo *Nectandra angustifolia* (Schrad.) Nees & Mart. ex Nees», Comunicaciones Científicas y Tecnológicas, Corrientes-Argentina, UNNE, <<http://www.unne.edu.ar>>.
- TORRES A., CAMARGO F., RICCIARDI ROSSETTI G., DELLACASSA E. Y RICCIARDI A. (2011). «Neutralizing effects of *Nectandra angustifolia* extracts against *Bothrops neuwiedi* snake venom», *Nat. Prod. Comm.*, Ohio-USA, 6: 1393-1396.
- TORRES A. (2011b). «Caracterización quimiotaxonómica de especies pertenecientes al género *Nectandra* en el Nordeste Argentino. Evaluación de su potencial actividad antiveno en accidentes provocados por *Bothrops neuwiedi diporus* (COPE) “yarára chica”», Tesis doctoral, Universidad Nacional del Nordeste.
- (2012). Caracterización quimiotaxonómica de especies pertenecientes al género *Nectandra* en el Nordeste Argentino. Evaluación de su potencial actividad antiveno en accidentes provocados por *Bothrops neuwiedi diporus* (COPE) «yarára chica». Tesis de Doctorado. Universidad Nacional del Nordeste Especialidad Química.
- CAMARGO F., RICCIARDI ROSSETTI G., RICCIARDI A., GUERRA M. Y DELLACASSA E. (2011c). «Fitoquímica de una fracción del extracto alcohólico de *Nectandra angustifolia*, activa contra el veneno de *Bothrops diporus*», Sesiones de Comunicaciones Cinéticas y Tecnológicas, UNNE, Chaco-Argentina, <<http://www.unne.edu.ar>>.
- TORRES AM., CAMARGO FJ., RICCIARDI ROSSETTI GA., RICCIARDI AI., MARTÍNEZ N, LORENZO D. Y DELLACASSA E. (2011d). «Neutralizing effects of *Nectandra angustifolia* essential oil against *Bothrops diporus* snake venom», VI Simpósio Brasileiro de Óleos Essenciais, Campinas-Brasil.
- TORRES A., CAMARGO F., RICCIARDI ROSSETTI G., RICCIARDI A. Y DELLACASSA E. (2012a). «Actividad antiveno de dos especies del género *Aristolochia* contra veneno de *Bothrops diporus*», III Congresso Iberoamericana de Fitoterapia: tradição, ciência e cooperação (CIAF), Foz do Iguaçu-Brasil, mayo 2012 y en *Revista de fitoterapia*, España, 065 y 123.
- TORRES A., MARTÍNEZ N., CAMARGO F., RICCIARDI ROSSETTI G., RICCIARDI A., MINGUELAGA M., LORENZO D. Y DELLACASSA E. (2012b). «Neutralizing effects of two *Nectandra* species essential oils and extracts against *Bothrops neuwiedi* snake venom», 43rd International Symposium on Essential Oils, Lisboa-Portugal.
- TORRES A., CAMARGO F., RICCIARDI ROSSETTI G., RICCIARDI A., DELLACASSA E., LOZINA L., MARUÑAK S. Y ACOSTA DE PÉREZ O. (2012c). «Inhibición de la actividad letal del veneno de *Bothrops diporus* por extractos de *Nectandra angustifolia*», III Congresso Iberoamericana de Fitoterapia: tradição, ciência e cooperação (CIAF), Foz do Iguaçu-Brasil, mayo 2012 y en *Revista de fitoterapia*, España, pp 066 y 124.

- TOURSARKISSIAN M. (1980). *Plantas Medicinales de la Argentina*, Ed. Hemisferio Sur s.a., Buenos Aires.
- TSAI L., YANG L. Y CHAND C. (1980). «Inactivation of Formosan snake venom *in vivo* by aristolochic acid, the chemical component of *Aristolochia radix*», *Formosan Sci.*, Taipei-China, 34: 40-45.
- TU AT. (1977). *Venoms; Chemistry and Molecular Biology*. New York, John Wiley.
- USHANANDINI S., NAGARAJU S., KUMAR KH., VEDAVATHI M., Y MACHIAH DK. (2006). «The anti-snake venom properties of *Tamarindus indica* (leguminosae) seed extract», *Phytother. Res.*, Hoboken-USA, 20: 851-858.
- USHANANDINI S., NAGARAJU S., NAYAKA SC., KUMAR KH., KEMPARAJU K. Y GIRISH KS. (2009). «The anti-ophidian properties of *Anacardium occidentale* bark extract», *Immunopharmacol. Immunotoxicol.*, Copenhagen-Dinamarca, 31: 607-615.
- USUBILLAGA A., KHOURI N., CEDILLO-VAZ S. Y YIBIRIN E. (2005). «Anti-snake venom effect of *Aristolochia odoratissima* L. aqueous extract on mice», *iii wocmap: Perspectives in Natural Product Chemistry. Proc.*, Tailandia, 3: 85-89.
- VALE L., MENDES M., HAMAGUCHI A., SOARES A., RODRIGUES V. Y HOMSI-BRANDEBURGO M. (2008). «Neutralization of pharmacological and toxic activities of *Bothrops* snake venoms by *Schizolobium parahyba* (Fabaceae) aqueous extract and its fractions», *J. Comp. Nordic Pharmacol. Soc. Basic Clinical Pharmacol Toxicol.*, Hoboken-USA, 103: 104-107.
- VASANTHI HR., JASWANTH A., KRISHNARAJ V., RAJAMANICKAM GV. Y SARASWATHY A. (2003). «*In vitro* snake venom detoxifying action of some marine algae of Gulf of Mannar, south-east coast of India», *Phytother. Res.*, Hoboken-USA, 17: 1217-1219.
- VEJAYAN J., IBRAHIM H. Y OTHMAN I. (2007). «The potential of *Mimosa pudica* (Mimosaceae) against snake envenomation», *J. of Trop. Forest Sci.*, Malaysia, 19: 189-197.
- VERONESE EL., ESMERALDINO LE., TROMBONE APF., SANTANA AE., BECHARA GH., KETTELHUT I., CINTRA ACO., GIGLIO JR. Y SAMPAIO SV. (2005). «Inhibition of the myotoxic activity of *Bothrops jararacussu* venom and its two major myotoxins, bthTX-I and bthTX-II, by the aqueous extract of *Tabernaemontana catharinensis* A. DC. (Apocynaceae)», *Phytotherapy*, London-UK, 12: 123-130.
- VILA R., MUNDINA M., MUSCHIETTI L., PRIESTAP HA., BANDONI AL., ADZET T. Y CAÑIGUERAL S. (1997). «Volatile constituents of leaves, roots and stems from *Aristolochia elegans*», *Phytochemistry*, Washington-USA, 46: 1127-1129.
- VISHWANATH BS., APPU, RAO AG., GOWDA TV. (1987a). «Interaction of phospholipase A from *Vipera russelli* with aristolochic acid: a circular dichroism study», *Toxicon*, London-UK, 25: 939-946.
- VISHWANATH BS. Y VEERABASAPPA GOWDA T. (1987). «Interaction of aristolochic acid with *Vipera russelli* phospholipase A₂: Its effect on enzymatic and pathological activities», *Toxicon*, London-UK, :929-937.
- VISHWANATH BS., KINI RM Y GOWDA TV. (1987b). «Characterization of three edema-inducing phospholipase A₂ enzymes from habu (*Trimeresurus flavoviridis*) venom and their interaction with the alkaloid aristolochic acid», *Toxicon*, London-UK, 25: 501-515.
- (1985). «Purification of an edema inducing phospholipase A₂ from *Vipera russelli* venom and its interaction with aristolochic acid», *Toxicon*, London-UK, 23: 617.
- WAGNER H. Y BLADT S. (2001). *Plant drug analysis. A thin layer chromatography atlas*, 2.^a ed., Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York.
- WHITE J. (2005). «Snake venoms and coagulopathy», *Toxicon*, London-UK, 45: 951-967.

- WORLD HEALTH ORGANIZATION. (1981). «Progress in the Characterization of Venoms and Standardization of Antivenoms», WHO Offset Publication, Ginebra.
- WÜSTER W., SALOMÃO M., QUIJADA-MASCAREÑAS J., THORPE R. (2002). «Origins and evolution of the South American pitvipers fauna: evidence from mitochondrial DNA sequence analysis», *Biol. Vipers*, Eagle Mountain-UT, 111-129.
- ZHANG L. Y DEMAIN A. (eds.). (2005). *Natural products. Drug discovery and therapeutic medicine*, Humana Press Inc., NY.
- ZYGADLO JA., LAMARQUE AL., GUZMÁN CA. Y GROSSO NR. (1995). «Composition of the flower oils of some *Lippia* and *Aloysia* species from Argentina», *J. Essent. Oil Res.*, Allured-USA, 7: 593-595.

