

**Interacción entre extractos de órganos de plantas y veneno  
de *Bothrops neuwiedi diporus* Cope (Yarará chica)**

**Torres de Sosa, Ana M.<sup>1</sup> - Camargo, Francisco J.<sup>1</sup>  
 Avanza de Temporetti, María V.<sup>1</sup> - Tressens, Sara G.<sup>2</sup> - Ricciardi, Armando I. A.<sup>1</sup>**

1. Cátedra de Toxicología y Química Legal, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura. UNNE.  
 9 de Julio 1449 (3400) Corrientes. República Argentina.  
 e-mail: aricciardi@exa.unne.edu.ar

2. Instituto de Botánica del Nordeste, IBONE. c.c.: 209-(3400) Corrientes

**Introducción:**

En la bibliografía especializada, sobre todo de la época de la colonia referida a la medicina aborigen o a la etnofarmacología, se encuentran numerosas referencias al empleo de plantas alexíteras vale decir aplicadas al tratamiento de accidentes provocados por mordeduras de víboras.

En el manuscrito **Herbario de las Misiones** de 1711 de autoría del Hno. Pedro de Montenegro que se conserva en la sección reservados de la Biblioteca Nacional en Buenos Aires y reproducido en 1945 por ésta bajo el nombre de **Materia Médica Misionera**, se citan por su nombre en guaraní, en tupí o en castellano, dieciséis especies vegetales usadas para contrarrestar los accidentes por mordeduras de víboras o de animales ponzoñosos entre las cuales se han identificado las especies botánicas siguientes: *Asclepias mellodora*; *Cissampelos pareira*, *Cyperus sesquiflorus*, *Dorstenia brasiliensis*, *Euphorbia dichotoma*, *Pilocarpus pennatifolius*, *Polianthes tuberosa* y *Sidastrum paniculatum*, algunas de ellas autóctonas, otras exóticas. (Ricciardi A.I.A. et al (1996))

El descubrimiento de la fuerte acción como antídoto oral sobre el veneno de *Bothrops atrox*, (“fer de lance”) de dos pterocarpanos prenilados denominados **cabenegrinas A-I y A-II** identificados en un preparado antifídico llamado “específico Pessoa”, fitoterápico de raíces de plantas del norte y nordeste brasileño conocidas vulgarmente como “cabeça de negro”, el aislamiento de otro pterocarpano prenilado el **(-)-edunol** de las Fabáceas *Brongniartia podalyrioides* Kunth. y *B. intermedia* con estructura y propiedades similares a las cabenegrinas, la actividad reconocida en ratones de la **ar-turmerona**, sesquiterpeno de la Zingiberacea *Curcuma longa*, como antiveneno sobre los venenos de *Bothrops jararaca* (“yararaca”) y de *Crotalus durissus terrificus* (“cascabel” de Sudamérica), la comprobación de la acción de la **wedelolactona**, un coumestano aislado de las Asteráceas *Eclipta prostrata* y *E. alba* que antagoniza el efecto de las miotoxinas de venenos de crotálicos y la información expuesta en numerosas publicaciones sobre la interacción in vitro o in vivo de extractos o componentes aislados de plantas y venenos de víboras, han motivado el examen de tal interacción entre algunas especies con propiedades alexíteras atribuidas en la etnomedicina.

En el herbario de las misiones anteriormente citado se expone de la “yerba de la víbora”, “mboy caá”, “macaguá caá” en guaraní (*Cissampelos pareira*): “comidas sus ojas verdes como una cuarta de ellas luego que pica la víbora, y asimismo mascada y aplicada a la mordedura, queda sin lesión y sin accidentes el herido. Si hubiere algunas horas que haiga mordido se toma una dragma de sus polvos, ó ojas machacadas en vino tibio y asimismo se aplica a la herida”; también así lo expone Dobrizhoffer M (1784) en su historia de Abipones.

En cuanto a las Aristoloquias con amplia tradición de alexíteras, como lo indica su nombre vulgar de “cipó de cobras”, existen también varias referencias a la actividad del ácido aristolóquico como inhibidor de los venenos, (Chandra V. et al. (2002); Vishwanath B.S. et al. (1987).

Por tanto en el presente trabajo examinamos la interacción de extractos de *Aristolochia gibertii* Hook. y *Cissampelos pareira* L. con veneno de *Bothrops neuwiedi diporus* Cope (yarará chica).

**Materiales y Métodos:**

**Material vegetal:**

Se recogieron en el camino a Puerto González (Corrientes) hojas, tallos y raíces de *Aristolochia giberti* Hook. (ARISTOLOCHIACEAE) (Tressens et al. 6832, CTES) (“ipé-mi”, “patito”, “milhombres”, “contrayerba”), y en el camino viejo a Paso de la Patria (Corrientes), hojas y tallos de *Cissampelos pareira*, L.; (MENISPERMACEAE), (Tressens et al. 6831, CTES), (“ka’apeva”, “ka’á-peva”, “ysypó-morotí”, “pareira brava”).

El material vegetal fue secado en el laboratorio por venteo y separado en sus partes componentes (hojas, tallos y raíces), que luego molidos y tamizados convenientemente fueron procesados:

**Extracto acuoso:**

Se maceraron en forma separada, durante 24 horas: hojas (A1), raíces (A3) y tallos (A5) de *A. gibertii* y hojas (C1) de *C. pareira*. Los extractos se filtraron mediante embudo de Büchner, desecándolos en rotavapor. y almacenando

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL NORDESTE**  
**Comunicaciones Científicas y Tecnológicas 2004**

---

los residuos en desecador al vacío. Para su utilización se prepararon diluciones de cada extracto con agua destilada, expresando su concentración en términos de peso seco.

Extracto alcohólico (etanol 96 GL):

Se maceraron en forma separada, durante 48 horas: hojas (A2), raíces (A4) y tallos (A6) de *A. gibertii* y hojas (C2) y tallos (C3) de *C. pareira*. Los extractos se filtraron mediante embudo de Büchner, desecándolos en rotavapor. y guardándolos en desecador al vacío. Para su utilización se prepararon diluciones de cada extracto con etanol (96 GL), la concentración se expone en términos de peso seco.

**Veneno:**

Veneno desecado de *Bothrops neuwiedi diporus* Cope, (yarára chica) y conservado a  $-20^{\circ}\text{C}$ ; se reconstituye con solución fisiológica en el momento de uso. Su concentración se expresa en términos de peso seco

**Determinaciones:**

Actividad coagulante:

Se determina el tiempo de coagulación normal (TC) de plasma humano fresco, a partir del cual se obtiene la dosis coagulante mínima (DCM: cantidad de veneno que reduce a 1' el tiempo de coagulación) incubando 0,2 ml de plasma humano fresco con 10  $\mu\text{l}$  de diluciones variables de veneno (30 segundos en baño maría a  $37^{\circ}\text{C}$ ), tomando el tiempo de formación del coagulo a partir del agregado de 0,2 ml de  $\text{CaCl}_2$  0,025 M.

Se incuban 5ml de la dilución correspondiente a la DCM durante 30 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$  con 0,1 ml de diluciones variables de los extractos vegetales y se determina la inhibición de la capacidad coagulante (ICC) del veneno por los extractos con 10 $\mu\text{l}$  del sobrenadante.

Actividad hemolítica:

Se preparan placas de Petri con agar base Columbia + 5% de sangre humana + 5% de yema de huevo (fosfatidil colina).

Con un sacabocados se practican pocillos en el agar en los cuales se siembran por duplicado 10  $\mu\text{l}$  de diluciones variables de veneno para determinar la dosis hemolítica mínima (DHM: dosis que induce un halo de hemólisis de 15 mm luego de 18 horas de incubación a  $37^{\circ}\text{C}$  en cámara húmeda).

Se incuban 5 ml de la DHM con 0,5 ml de diluciones variables de los extractos vegetales 30 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$  y se determina si existe inhibición de la actividad hemolítica sembrando 10  $\mu\text{l}$  del sobrenadante.

Perfil electroforético

- Acid-PAGE para correlacionar biológicamente la interacción entre veneno de *B. neuwiedi* y los extractos vegetales, se siembran 3  $\mu\text{l}$  de dilución de veneno, 3  $\mu\text{l}$  de dilución del extracto vegetal y 3  $\mu\text{l}$  de veneno + extracto (preincubados 30 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$ ), en diferentes calles de un gel de poliacrilamida al 7,5%. Tiempo de corrida: 2 horas 30 minutos, 15 mA (dos placas), verde de metilo 0,01% como indicador.- SDS-PAGE: se sembraron 2 $\mu\text{l}$  de patrones de PM, 5  $\mu\text{l}$  de dilución de veneno, 5  $\mu\text{l}$  de dilución de extractos y 5  $\mu\text{l}$  del veneno preincubado con el extracto vegetal, en distintas calles de un gel de poliacrilamida 12% (gel de staking 4%). Tiempo de corrida: 1 hora 15 minutos, 25 mA (dos placas), azul de bromofenol como indicador.

En ambos casos se colorean los geles con Azul de Coomassie durante 3 a 4 horas a temperatura ambiente para lograr la visualización de las bandas.

**Resultados:**

Actividad coagulante:

DCM: 23  $\mu\text{g/ml}$

-inhibición nula o despreciable de la actividad coagulante del veneno por los extractos A3, A4, A5, A6, C1, C2 y C3; positiva del 17% para el A2 al límite de solubilidad (extracto 32,5  $\mu\text{g/ml}$ ) (relación 1:3 veneno/extracto), y del 35% para extracto A1 (relación 1:7) (p:0,002).

Actividad hemolítica:

DHM: 50 $\mu\text{g/ml}$

-Inhibición nula o despreciable para los extractos A1, A2, A3, A4, A5, A6, C1 y C3. El extracto C2 (relación 1:5) inhibe completamente la hemólisis del veneno.

Perfil electroforético:

En acid-PAGE el extracto A1 incubado con el veneno muestra marcada diferencia en el perfil electroforético del último, con desaparición o atenuación de bandas; en SDS-PAGE el veneno muestra nueve bandas; por acción de A1 desaparecen dos: una a 57,5 kDa (hemorragina NHFb, metaloproteasa hemorrágica) y otra a 52,5 kDa y reducen mucho su intensidad la de 28,2 kDa (botroalternina (lectina tipo C inhibidora de trombina) y botrocetina (coaglutinina de plaquetas)); y la de 17 kDa, (fosfolipasas A<sub>2</sub> miotoxinas).

**Discusión y conclusiones:**

De la variación del tiempo de coagulación (veneno coagulante) y la disminución en la intensidad o desaparición de bandas en el perfil electroforético surge evidente que existe in vitro una acción modificadora de las enzimas y toxinas del veneno por el extracto acuoso de hojas de *A. gibertii* que avalaría su empleo en la etnofarmacología.

Característica común a varias plantas usadas popularmente como antiveno de víboras es de poseer actividad antiinflamatoria, actividad analgésica o ambas, o de modificar las enzimas y proteínas de los venenos (especialmente los polifenoles por sus propiedades astringentes), de inhibir las fosfolipasas A2 u otras enzimas (p.ej. la ATPasa) o secuestrar metales necesarios para la actividad enzimática de metaloproteinasas. Se ha comprobado que los ácidos aristolóquicos, componentes de muchas Aristoloquias, forman un complejo con la Fosfolipasa A2, inhibiendo su acción. (Chandra V. et al (2002). En el presente caso la banda correspondiente a las fosfolipasas del veneno de “yarára chica” se atenúa en la electroforesis por acción del extracto acuoso.

Además el extracto alcohólico de hojas de *Cissampelos pareira* inhibe totalmente la actividad hemolítica del veneno, a las dosis ensayadas.

**Agradecimientos:**

Agradecemos al CEPESAN (Corrientes) la provisión de venenos.

**Bibliografía:**

-Chandra V., Jasti J., Kaur P., Srinivasan A., Betzel Ch., Singh T.P., (2002) “Structural basis of phospholipase A2 inhibition for the synthesis of prostaglandins by the plant alkaloid aristolochic acid from a 1.7 Å crystal structure”. *Biochemistry*. **41**(36):10914-9.

-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.)

-Ricciardi, A.I.A., Caballero N. E y Chifa C. (1996) “Identificación botánica de plantas descriptas en Materia Médica Misionera usadas en accidentes ofídicos”, *Rojasiana* **3**(2):239-245.

-Vishwanath B.S., Appu Rao A.G., y Gowda T.V. (1987) “Interaction of phospholipase A” from *Vipera russelli* with aristolochic acid: a circular dichroism study” *Toxicon* **25**(9): 939-946

-Zuloaga, F. G. y Morrone, O. (1999)“*Catálogo de las plantas vasculares de la República Argentina II, Vol 1: Acanthaceae-Euphorbiaceae (Dicotyledoneae; Vol. 2: Fabaceae-Zygophyllaceae (Dicotyledoneae)*”, Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden, Vol. 74, Buenos Aires, 1259 pp.