

00570

4

UNAM
POSGRADO



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS QUÍMICAS

VALIDACIÓN DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA
Y CARACTERIZACIÓN DE COMPONENTES
DEL GÉNERO ARISTOLOCHIA

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRÍA EN CIENCIAS QUÍMICAS
(QUÍMICA FARMACÉUTICA)
P R E S E N T A

Q.F.B. Verónica María Rojas de la Parra

Tutor: Dra. Ofelia Espejo González

México, D.F.

2002

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO

Presidente: Dr. Leovigildo Quijano
Vocal: Dra. Rachel Mata Essayag
Secretario: Dra. Helgi Jung Cook
Primer suplente: Dr. Andrés Navarrete Castro
Segundo suplente: Dr. Ricardo Reyes Chilpa

Sitio donde se desarrolló el tema:

Laboratorio 121, Departamento de Farmacia; Conjunto "E", Facultad de Química, UNAM y Laboratorio de Farmacología, UNAM, Facultad de Química, Edificio A, Laboratorio 1/E.

SUSTENTANTE:



Q.F.B. Verónica María Rojas de la Parra

ASESOR:

Dra. Ofelia Espejo González

**TESIS CON
FALTA DE ORIGEN**

"Do not believe in anything simply because you have heard of it.

Do not believe in anything simply because it is spoken and rumored by many.

Do not believe in anything simply because it is found written in your religious books.

Do not believe in traditions because they have been handed down for many generations.

But after analysis and observation, when you find that anything agrees with

reason and is conducive to the good and benefit of one and all,

then accept it and live up to it."

—Buddha—

A mis padres y hermanos:
Gracias por todo lo que me
han dado, pues me ha permitido
llegar a ser.

"La familia es una de las obras maestras de la naturaleza"

—Edbert Hubbard—

A las familias Rojas y de la Parra:
Por ser el mejor club de admiradores
que cualquiera puede desear.

A mi abuela Guillermina:
"Aún me parecen los días demasiado cortos
para todos los pensamientos que quiero tener,
todas las caminatas que quiero dar,
todos los libros que quiero leer
y todos los amigos a los que quiero ver"

—John Burroughs—

A la Dra. Ofelia Espejo:
"A teacher affects eternity;
she can never tell where her influence stops."

—Henry Adams—

..... Muchas gracias por todo.

A Edgar, Gabby, Alejandro, Tanya, Miguel y Dulce:
"Las estadísticas de locura dicen que una de cada cuatro
personas sufre de alguna forma de enfermedad mental.
Piensa en tres de tus mejores amigos. Si ellos están bien,
entonces eres tú.

—Rita Mae Brown—

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Ofelia Espejo González, por su apoyo y la gran confianza que siempre ha depositado en mí.

A la Dra. Elia Naranjo Rodriguez, por facilitarme equipo, material, pero sobre todo, su tiempo, para llevar a cabo las pruebas biológicas.

A la Dirección General de Estudios de Posgrado, por el apoyo económico otorgado para la realización de mis estudios de Maestría.

A los miembros del H. Jurado, por sus enriquecedores comentarios y correcciones al presente trabajo.

A las pasantes de Q.F.B. Angélica Morales y Marcela Miranda, por la ayuda técnica prestada para llevar a cabo la parte experimental del presente trabajo.

A las maestras Marisela Gonzáles y Graciela Chávez, de la U.S.A.I., Facultad de Química, U.N.A.M., por la realización de los espectros de infrarrojo.

A los Q.F.B. Rosa Isela del Villar y Óscar Yáñez de la U.S.A.I., Facultad de Química, U.N.A.M., por la realización de los espectros de Resonancia Magnética Nuclear.

A la Q. Georgina Duarte y la Q.F.B. Margarita Guzmán de la U.S.A.I., Facultad de Química, U.N.A.M., por la realización de los espectros de Masas.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	
OBJETIVOS	1
1. ANTECEDENTES	
1.1 FAMILIA ARISTOLOCHIACEAE.	
1.1.1 Generalidades.	2
1.1.2 <i>Aristolochia taliscana</i> Hook et Arn.	4
1.1.3 <i>Aristolochia foetida</i> H.B.K.	6
1.2 ALACRANES.	
1.2.1 Generalidades.	7
1.2.2 Veneno.	9
1.2.3 Efectos del veneno.	10
1.2.4 Tratamiento de la picadura.	12
1.2.5 Tratamientos tradicionales.	12
1.3 SERPIENTES.	
1.3.1 Generalidades.	15
1.3.2 Veneno.	17
1.3.3 <i>Crotalus durissus</i> L.	18
1.3.4 <i>Bothrops asper</i> Garman.	19
1.3.5 Tratamiento de la mordedura.	21
1.3.6 Tratamientos tradicionales	31
2. DESARROLLO EXPERIMENTAL	
2.1 PARTE QUÍMICA.	
2.1.1 Constantes espectroscópicas.	34
2.1.2 Cromatografía.	34
2.1.3 Material vegetal.	34
2.1.4 Fraccionamiento del extracto de <i>Aristolochia taliscana</i> .	35
2.1.5 Fraccionamiento del extracto de <i>Aristolochia foetida</i> .	36
2.2 PARTE BIOLÓGICA.	
2.2.1 Animales.	39
2.2.2 Determinación de la dosis letal media (DL ₅₀) de los extractos.	39
2.2.3 Venenos.	40

2.2.4 Pruebas de eficacia antiveneno.	41
2.2.5 Ensayo de actividad neuromuscular.	42
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
3.1 PARTE QUÍMICA.	
3.1.1 Componentes de <i>Aristolochia taliscana</i> .	46
3.1.1.1 Caracterización del ácido aristolóquico IV.	46
3.1.2 Componentes de <i>Aristolochia foetida</i> .	48
3.1.2.1 Caracterización de la 9-metoxi-tariacuprona.	48
3.1.2.2 Caracterización del ácido aristolóquico I.	50
3.2 PARTE BIOLÓGICA.	
3.2.1 Determinación de la toxicidad de extractos y venenos.	52
3.2.2 Efecto de los extractos sobre la toxicidad del veneno de <i>Centruroides sp.</i>	53
3.2.3 Efecto de los extractos sobre la toxicidad del veneno de <i>Crotalus durissus</i> .	58
3.2.4 Efecto de los extractos sobre la toxicidad del veneno de <i>Bothrops asper</i> .	60
CONCLUSIONES	65
PERSPECTIVAS	66
BIBLIOGRAFÍA	67
ANEXOS	
I. ESPECTROS.	
II. GLOSARIO DE TÉRMINOS.	

INTRODUCCIÓN

Desde la antigüedad, el hombre ha empleado las plantas no sólo como fuente de alimento, ropa y cobijo, sino como el medio para obtener y conservar su salud; en el último caso, esta tendencia no ha cambiado tanto en ciertos medios sociales, entre otras razones, porque el costo de los medicamentos sintéticos queda fuera del alcance de muchas personas, mientras que las plantas están disponibles y, en algunos casos, por la tendencia actual de la sociedad de volver hacia lo natural, que supuestamente es más saludable y menos peligroso.

Por esta razón las plantas medicinales están siendo estudiadas exhaustivamente en todas partes del mundo. La riqueza florística de México y su antigua herencia cultural, dan como resultado una lista de plantas con uso etnomédico tan larga, que ofrecen prácticamente una fuente inagotable para el estudio tanto fitoquímico, como farmacológico.

La importancia de que las plantas medicinales mexicanas sean estudiadas en México se debe principalmente a que los diseños experimentales que se elaboren, tengan la capacidad de satisfacer necesidades médicas que únicamente se presentan en nuestro país y que no necesariamente son de interés en otros sitios.

A modo de ejemplo, se puede mencionar el caso de las picaduras de alacrán, pues en México, actualmente se producen 300 mil casos cada año (1000 de ellos terminan en defunciones); el único medicamento que se emplea oficialmente para su tratamiento, es el suero equino antiveneno de alacrán, que se obtiene por un procedimiento largo que lo hace caro y que además requiere de condiciones de almacenaje y transporte especiales, haciendo muy difícil su presencia en algunas zonas de la república (DGCS, UNAM, 2001). Por otro lado, su administración puede provocar reacciones alérgicas.

Tradicionalmente las plantas de la familia Aristolochiaceae han sido empleadas para curar la picadura de alacrán; el estudio de plantas con estas características constituye una fuente de gran interés en el desarrollo de nuevos productos que no sólo permitan tratar y curar este tipo de padecimientos exitosamente, sino que sean fáciles de obtener, transportar, almacenar y administrar.

En el presente trabajo, se informan los estudios sobre los extractos metanólicos de dos especies de aristoloquias mexicanas: *Aristolochia foetida* y *Aristolochia taliscana*, que resultaron en el aislamiento de cinco compuestos puros, así como en la determinación de la actividad antiveneno que poseen los extractos y algunos de sus componentes, contra venenos de serpiente y alacrán.

OBJETIVOS

OBJETIVOS GENERALES

Contribuir a los estudios fitoquímicos que se han realizado sobre las aristoloquias mexicanas.

Validar la actividad anticrotálica y alexitere de los extractos y fracciones obtenidas a partir de dos plantas de la familia Aristolochiaceae nativas de México: *Aristolochia foetida* y *A. taliscana*.

OBJETIVOS PARTICULARES

Aislar e identificar compuestos nitrogenados presentes en las aristoloquias mexicanas: *Aristolochia foetida* y *A. taliscana*, empleando técnicas de extracción ácido-base, cromatográficas y espectroscópicas convencionales.

Determinar en un modelo *in vivo*, la eficacia de los extractos metanólicos de las plantas estudiadas contra los venenos de *Bothrops asper* (nauyaca), *Crotalus durissus* (serpiente de cascabel) y *Centruroides spp* (alacrán).

Determinar, mediante pruebas *in vitro* el posible mecanismo de acción anticrotálica y alexitere de los extractos y fracciones obtenidas a partir de las plantas estudiadas.

1. ANTECEDENTES

1.1 FAMILIA ARISTOLOCHIACEAE

1.1.1 Generalidades. La familia Aristolochiaceae, pertenece al grupo de las dicotiledóneas, está constituida por aproximadamente 700 especies que se agrupan en tres géneros: *Asarum*, *Bragantia* y *Aristolochia*. Este último, está conformado por enredaderas perennes herbáceas leñosas o semileñosas (lianas) -algunas son arbustos o pequeños árboles-, que presentan en sus tallos nódulos protuberantes de los que brotan las hojas; éstas casi siempre se disponen en forma alternada y en espiral, son reniformes, ovales o palmeadas, planas y su color varía desde el verde claro hasta el verde grisáceo (Pfeifer, 1966; Watson y Dallwitz, 2000).

Las flores son axilares, hermafroditas, solitarias, de forma irregular y carecen de pétalos, algunas de ellas poseen un aroma desagradable, que atrae a los insectos polinizadores (entomófilas). Los sépalos se encuentran fusionados formando una lengüeta, por su parte, los estambres también están fusionados para formar un ginostemo, que tiene las anteras separadas. El fruto es una cápsula y alberga semillas con un contenido elevado de albumen y un embrión pequeño aclorofílico. Las raíces son aromáticas y de sabor amargo; poseen células secretoras de aceite (Martínez, 1944; Pfeifer, 1966; Watson y Dallwitz, 2000).

Existen alrededor de 500 especies de aristoloquias, que se distribuyen ampliamente en el mundo desde Norte y Sudamérica, Europa, Asia, África excluyendo Australia, en donde no se han encontrado. Predominan en clima tropical, subtropical y aún se pueden encontrar en clima templado, su abundancia disminuye conforme descende la temperatura. Las áreas geográficas más ricas en especies endémicas son Brasil y la isla de La Española (Pfeifer, 1966; Watson y Dallwitz, 2000).

Estas plantas tienen una gran importancia económica, ya que algunas son usadas como plantas de ornato (por la belleza de los colores de sus hojas y flores), y por sus propiedades medicinales. Los usos tradicionales que se les dan a las aristoloquias son casi los mismos independientemente de la región donde se empleen (tabla 1); éstos son principalmente:

- * Antitumorales.
- * Antiinfecciosas en disentería, vaginitis y enfermedades de la piel.
- * Abortivas y en otros trastornos reproductivos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

* Contra la mordedura de serpientes y la picadura de alacranes.

Tabla I. Usos medicinales de algunas Aristoloquias (Duke, 1989)

Nombre científico	Lugar de empleo	Usos medicinales
<i>Aristolochia chilensis</i>	Chile	Disminución de loquios, emenagogo
<i>Aristolochia clematitis</i>	Europa	Cáncer de pecho y de nariz, pólipos (nariz), tumores
<i>Aristolochia gigantea</i>	Brasil	Abortifaciente, anticrotálico, emenagogo, enfermedades de la piel
<i>Aristolochia indica</i>	India	Abortifaciente, antiartrítico, cáncer, cólera, dispepsia, emenagogo, estomáquico, fiebre, vermífugo
<i>Aristolochia kankauensis</i>	Taiwan	Analgesico, antiasmático, anticrotálico, expectorante
<i>Aristolochia serpentaria</i>	Estados Unidos	Amenorrea, analgesico, anticrotálico, malaria, neumonía, tifo, vermífugo
<i>Aristolochia petersiana</i>	África	Alexitere, disentería, fiebre

La palabra *Aristolochia* quiere decir "que ayuda al nacimiento", y está formada por dos términos: *aristos* óptimo, excelente y *lochía*, parto, alumbramiento, que describe uno de sus usos principales, que es el de favorecer el parto y contribuir a la expulsión de la placenta (abortifaciente). Esta propiedad tal vez haya sido descubierta en la antigüedad, por la semejanza que presenta el botón de la flor, con el feto humano, en concordancia con la teoría de la signatura, en la que el uso medicinal de la planta correspondía con la forma que ésta tiene (Gledhill, 1989).

En México, existen alrededor de 40 especies de aristoloquias, distribuidas ampliamente por todo el país, varias de ellas son endémicas. Su característica común es que la mayoría posee 5 estambres en sus flores (especies pentandras). El nombre náhuatl que reciben estas plantas es *tlacopatli* y proviene de las palabras: *tlacotl*, vara y *pathi*, medicina, lo que describe tanto el uso que se le daba a la planta, como su aspecto físico; en concordancia con el sistema de nomenclatura usado por este pueblo, en el que en una sola palabra se encuentran las propiedades esenciales del cuerpo al que se refiere. Actualmente este nombre sólo se aplica a *Aristolochia mexicana* Moc y Sees, ya que en general, se les llama raíz de guaco (Pefiffer, 1966; Martínez, M., 1944).

Prácticamente todas presentan alguna aplicación etnomédica en la región geográfica donde se localizan, entre los usos más recurrentes se pueden mencionar su empleo contra la diarrea y parasitosis, mordeduras de víbora, trastornos de la menstruación y para facilitar el parto. Pocas de estas plantas se han estudiado y los

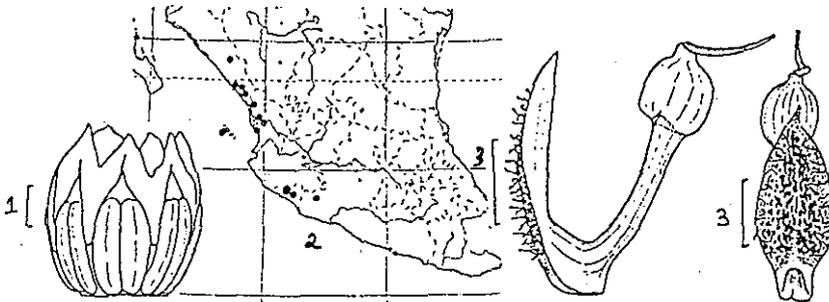
publican, casi únicamente se refieren al contenido químico, sin llegar a ninguna conclusión sobre su actividad biológica.

Las plantas constituyen la mayor parte de los tratamientos usados por los curanderos en muchas sociedades, por lo que no resulta sorprendente que muchas plantas tengan reputación como útiles contra serpientes y su mordedura (Houghton y Osibogun, 1993).

1.1.2 *Aristolochia taliscana* Hook et Arn. Es una planta trepadora glabrescente, que puede medir entre dos y tres metros de largo. Sus hojas son cordato-ovadas, redondeadas a emarginadas y su base presenta la característica de estar intensamente cordato-auriculada; miden 2.5 a 6.0 cm de ancho, por 2.5 a 7.0 cm de largo (Martínez, 1944; Pfeifer, 1966).

Las flores son solitarias, de color café a amarillo y se ubican en la axila de la hoja; su forma inicial es ligeramente arcuada, para volverse geniculada de manera abrupta; poseen un utrículo obcónico que mide unos 8 mm, unido a un tubo largo y recto de 2-3 cm. El limbo es erecto y puede encontrarse densa o ligermante fimbriado-verrugoso, las fimbrias son numerosas, carecen de apéndices y son de dos a cuatro cm de largo (figura I). Su ginostemio posee seis túbulos de 2.5 a 3.5 mm de alto por dos a cuatro milímetros de ancho, así como seis anteras equidistantes (Pfeifer, 1966).

Figura I



Ginostemio (1), distribución (2) y flores (3) de *Aristolochia taliscana* (Pfeifer, 1966).

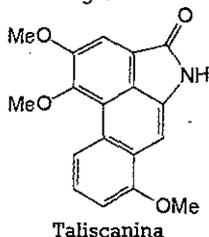
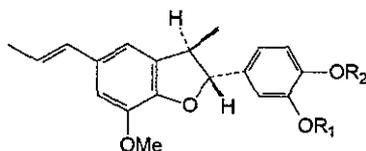
El fruto de esta planta es de forma cilíndrica y mide unos 3.5 cm de largo por 2.0 a 2.5 cm de ancho, presenta un hipanto ligeramente curvado de cuatro milímetros de largo; su dehiscencia es acrópeta y septifraga. Contiene numerosas semillas

pianas, de seis milímetros de largo, nueve milímetros de largo y 0.5 mm de espesor (Pfeifer, 1966).

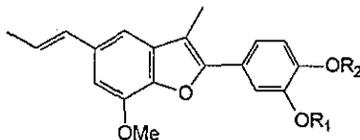
Habita tanto en regiones con maleza densa, como en áreas abiertas. Se distribuye en los estados de Colima, Jalisco, Michoacán, Nayarit y Sinaloa. Recibe el nombre de canastilla, guaco, patito, zapatito en el estado de Sinaloa y de huaco y matanene de mar en el estado de Nayarit. Se usa principalmente para tratar las mordeduras de serpiente y las picaduras de alacrán, así como por sus propiedades antiarréicas. Respecto de su nombre científico, cabe mencionar que originalmente, esta especie fue bautizada con el nombre del estado en que se descubrió (Jalisco), pero por error, el nombre publicado fue *taliscana* (Martínez, 1944; Pfeifer, 1966).

Se ha reportado el aislamiento de la aristolactama BII o taliscanina (figura II) del extracto bencénico de la raíz de esta planta, así como una serie de lignanos (eupomatenoides), de diferentes extractos de la planta (tablas II y III). La (±) licarina-A resultó inactiva como antitumoral, al ser probada contra células de leucemia linfocítica P-388 (Enriquez y Chávez, 1984; Ionescu, *et al*, 1977; Maldonado, *et al*, 1966).

Figura II.

Tabla II. Eupomatenoides aislados de *Aristolochia taliscana* (Enriquez y Chávez, 1984)

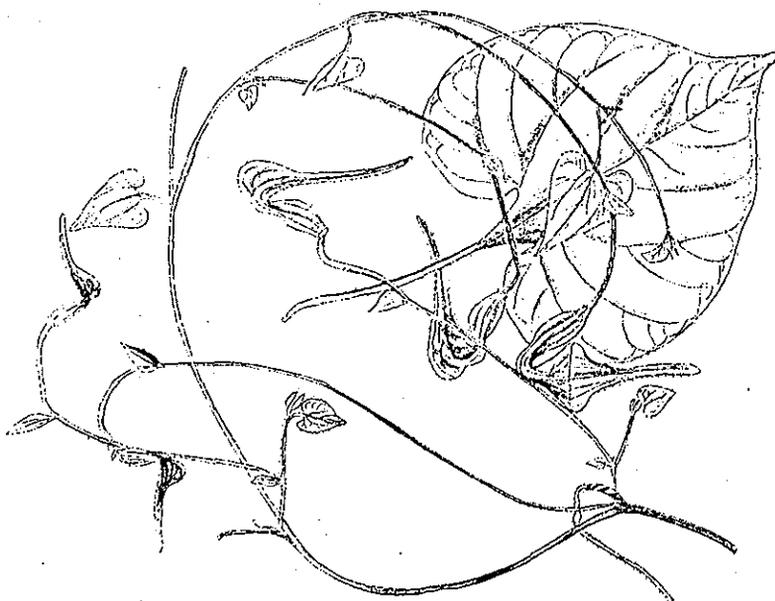
Nombre	R ₁	R ₂	Parte de la que se aisló
(±) licarina-A	Me	H	Exto. etanol-acuoso de tallos, hojas, flores y frutos Exto. hexánico de corteza y tallos
(-) licarina-B	-CH ₂ -		Exto. hexánico de corteza y tallos

Tabla III. Eupomatenoides aislados de *Aristolochia taliscana* (Enriquez y Chávez, 1984)

Nombre	R ₁	R ₂	Parte de la que se aisló
Eupomatenoide-7	Me	H	Exto. hexánico de corteza y tallos
Eupomateno	-CH ₂ -		Exto. hexánico de corteza y tallos

1.1.3 *Aristolochia foetida* H.B.K. Es una planta trepadora, aunque algunas veces se encuentra directamente sobre el suelo, con una raíz de color café que posee un fuerte olor aromático, que explica el nombre científico de esta planta. Las hojas son anchamente ovadas, agudas, cordadas en la base, presentan cinco nervaduras principales (figura III), su superficie hirsuta y miden unos 12 cm de largo por 9.5 cm de ancho (INAH, 2000; Maldonado, *et al*, 1966; Martínez, 1944).

Figura III.

*Aristolochia foetida* (Díaz, 1977)

La floración ocurre entre septiembre y octubre, que produce flores de color violeta, con el centro amarillo y presentan un pedúnculo largo. Su forma recuerda a la cresta de un gallo, lo que explica varios de los nombres comunes que recibe esta planta (INAH, 2000; Maldonado, *et al*, 1966; Martínez, 1944).

En las poblaciones de Copalillo y Temalac, Gro., recibe el nombre de chiquiliztli (del nahua chiquilitl, que significa cresta), hueyecpactli, gallito, cresta de pollo, corona de gallo y guaco, mientras que en la de Zumpango del Río, Gro., es conocida como gallinitas, garcitas ipeca y patito. Otros nombres comunes que recibe esta planta son: hierba del indio, pípilos, raíz del indio, tacopaxtle, tlacopatli y tlacopaxte (INAH, 2000; Martínez, 1944).

Para tratar la picadura de alacrán y la mordedura de serpiente, se emplean las raíces de esta planta, ya sea como infusión (té) o en forma de tintura, cualquiera de estos dos remedios se administran al momento de sufrir la picadura, administrándolos oralmente cada quince minutos durante una o dos horas. También se usa en el tratamiento del dolor de cabeza; para lo cual, la tintura de la raíz se aplica como loción en las noches; también se recomienda colocar emplastos de raíz directamente sobre las sienas del paciente (INAH, 2000).

No existen reportes científicos sobre la composición o la actividad biológica de esta planta.

1.2 ALACRANES

1.2.1 Generalidades. Los escorpiones o alacranes, como se les denomina en México, son artrópodos de ocho patas, que pertenecen a la clase Arachnida (orden Scorpinida) y cuyo tamaño varía desde los dos hasta los diez centímetros; su cola está formada por cinco segmentos; ésta, termina en una estructura bulbosa provista a su vez, de un gran aguijón curvo. Se calcula que existen unas 1400 especies de alacranes en el mundo, clasificados en las 9 familias que se observan en la tabla IV (Goddard, 1993; Hutt y Houghton, 1998; Tu, 1977).

La familia Buthidae es la única que incluye especies que pueden considerarse capaces de producir intoxicaciones clínicamente importantes; en la tabla IV se indican algunos de los géneros más tóxicos de esta familia (Hutt y Houghton, 1998).

Los alacranes se distribuyen en las regiones tropicales y templadas de todo el mundo, pudiendo ser encontrados en bosques, sabanas y desiertos; incluso, también

existen especies que habitan en regiones montañosas. Sin importar en donde habiten, todos presentan hábitos nocturnos, por lo que se esconden durante el día bajo rocas, troncos, cortezas de árboles y hasta en nidos de termitas; algunos de ellos, pueden hibernar (Goddard, 1993; Hutt y Houghton, 1998).

Tabla IV. Clasificación de los alacranes (Goddard, 1993, Tu, 1977).

Familia	Género
Buthidae	<i>Androctonus, Buthotus, Buthus, Centruroides, Leiurus, Parabuthus, Tityus</i>
Buthriuridae	
Chactidae	<i>Euscorpius</i>
Chaerilidae	
Diplocentridae	<i>Nebo</i>
Ischnuridae	
Iuridae	
Scorpionidae	<i>Scorpio, Opisthophthalmus</i>
Vaejovidae	<i>Vejovis</i>

En México pueden encontrarse siete de las 9 familias de alacranes que existen, representadas por 23 géneros, distribuidos en unas 221 especies y subespecies; sin embargo, sólo ocho de ellas resultan peligrosas para el hombre y todas ellas pertenecen al género *Centruroides*. Se dice que éstos habitan en la región de la Sierra Madre Occidental y sus colindancias, lo que involucra once estados: Colima, Durango, Guerrero, Michoacán, Morelos, Nayarit, Oaxaca, Sinaloa, Sonora y otros colindantes con las costas del Pacífico (Dehesa-Dávila y Posani, DGCS, 2001; 1994; Goddard, 1993; Mata, 1994; Osnaya-Romero, et al, 2001).

Las especies peligrosas son: *Centruroides pallidiceps*, *C. elegans* (alacrán "güero" de la costa), *C. infamatus infamatus* (alacrán de bandas), *C. limpidus limpidus*, *C. l. tecomanus* (alacrán de Tecomán), *C. Suffusus suffusus*, *C. noxius* (alacrán rojizo) y *C. sculpturatus*. Estos animales pueden inyectar, en promedio, 0.075 mg de veneno (Dehesa-Dávila y Posani, 1994; Goddard, 1993; Mata, et al 1994; Osnaya-Romero, et al, 2001).

Aunque los datos epidemiológicos sobre el número exacto de picaduras de alacrán que ocurren en México cada año son incompletos, la Organización Mundial de la Salud estima que se presentan cerca de 300 000 casos, de los cuales, entre 1000 y 2000 son fatales. Tomando como ejemplos el número de accidentes registrados entre 1981 y 1986 en el Hospital de la Cruz Roja de la ciudad de León, Gto., que fue de 38 068

(310 terminaron en decesos) y de 29 830 en el estado de Morelos durante 1996 (8 con consecuencias fatales), puede considerarse que la intoxicación por picadura de alacrán o alacranismo, constituye un problema de salud pública de importancia en nuestro país (Dehesa-Dávila y Posani, 1994; Hutt y Houghton, 1998; Osnaya-Romero, *et al*, 2001).

1.2.2 Veneno. Los alacranes producen su veneno en glándulas que se localizan en el extremo de su cola. Éste consiste en una solución de diferentes tipos de sustancias: proteínas, péptidos, aminoácidos libres, histamina, serotonina, nucleótidos, lípidos, glicosaminoglicanos y sulfato de heparina, entre otras (Hutt y Houghton, 1998; Osnaya-Romero, *et al*, 2001; Tu, 1977).

Desde el punto de vista farmacológico, las proteínas y péptidos constituyen el elemento principal de los venenos de alacrán, pues de ellas, dependen los efectos tóxicos que se observan tanto en humanos como en animales de laboratorio. La mayor parte de las proteínas son enzimas, entre las que se pueden contar: fosfolipasa A₂ (común en los venenos de alacrán), acetilcolinesterasa (*Hadrurus arizonensis* y *Heterometrus scaber*), hyaluronidasa (*Scorpio maurus palmatus* y *H. scaber*), fosfomonoesterasa y 5'-nucleotidasa (*H. scaber*), fosfodiesterasa, amilasa (*Vejoavis spinigerus*) y gelatinasa (*Scorpio marus palmatus*) (Inisan, *et al*, 1995; Tu, 1977).

Los péptidos, también denominados toxinas, están formados por unos 30-80 residuos de aminoácidos. Poseen un carácter básico; presentan puntos isoeléctricos (pI) de ocho a nueve, contienen 4 puentes disulfuro y son moderadamente estables a los tratamientos con calor. En general, los venenos de alacrán poseen un contenido de toxinas más elevado que el de serpiente y no existe cruza inmunológica entre ambos tipos de proteínas, debido a que no son muy similares unas a las otras. Por otro lado, entre más cercanos filogenéticamente hablando se encuentren dos especies de alacranes, más similares son las propiedades inmunológicas de sus venenos (Osnaya-Romero, *et al*, 2001; Tu, 1977).

En el veneno de los alacranes que pertenecen a la familia *Centruroides*, se encuentran dos tipos de péptidos similares: de cadena larga (60-70 aminoácidos) y de cadena corta (31-37 aminoácidos). Los péptidos de cadena larga pueden interactuar con los canales de sodio, lo que modifica sus mecanismos de apertura y cierre, en tanto que los de cadena corta, afectan los canales de potasio, bloqueando el poro; esta unión a canales iónicos altera la conductancia de los iones, trastornando la

excitabilidad celular, lo que constituye el mecanismo de acción del veneno (Hutt y Houghton, 1998; Inisan, *et al*, 1995; Osnaya-Romero, *et al*, 2001).

1.2.3 Efectos del veneno. Dependiendo del tipo de células excitables que afecten las toxinas del veneno, serán los síntomas clínicos que se observen. Los sistemas del organismo más afectados son (Osnaya-Romero, *et al*, 2001):

- 1) Sistema Nerviosos Central y Periférico.
- 2) Sistema Cardiovascular.
- 3) Sistema Respiratorio.
- 4) Metabolismo.
- 5) Músculo liso.

1) Sistema Nerviosos Central y Periférico. Cuando las toxinas bloquean la transmisión de impulsos nerviosos en los sitios presinápticos de los nervios colinérgicos y adrenérgicos, se liberan acetilcolina y catecolaminas respectivamente (Tu, 1977).

La liberación continua de acetilcolina en la placa neuromuscular, por las neuronas postgangliónicas y presinápticas del cerebro y otros tejidos, impide la transmisión normal de impulsos al músculo, lo que provoca un efecto tetanizante. Cuando se administra d-tubocurarina a una preparación de músculo estriado de rana estimulado por el veneno de *Androctonus australis*, el efecto tetanizante es antagonizado (Casali, *et al*, 1995; Tu, 1977).

Tanto la despolarización de la placa neuromuscular, como los cambios en el contenido de las vesículas, son dos alteraciones patológicas que normalmente acompañan al daño a los tejidos que produce, de manera típica, el veneno de alacrán. Además, se ha detectado degeneración en los axones cerca de las terminales nerviosas afectadas, lo que indica que el veneno no sólo altera las membranas celulares, sino las estructuras nerviosas (Tu, 1977).

La liberación repentina de catecolaminas es responsable de varios de los síntomas clínicos observados en casos de alacranismo, tales como hipertensión, taquicardia y edema pulmonar (Guieu, *et al*, 1998; Tu, 1977).

Algunos de los síntomas debidos a la estimulación del sistema nervioso son: hiperexcitabilidad (agitación, ansiedad y confusión), hipertermia, taquicardia, sudoración profusa, midriasis, náusea, vómito, diarrea, lagrimeo, salivación, nistagmo, secreción nasal, sensación de obstrucción de la garganta, tos, edema pulmonar,

debilidad muscular, convulsiones, ataxia; fasciculaciones y coma (Dehesa-Dávila y Posani, 1994; Tu, 1977).

2) Sistema Cardiovascular. Los efectos cardiovasculares de los venenos de alacrán se deben a la estimulación de ambas ramas del sistema nervioso autónomo, con predominancia de la estimulación simpática, producida por la liberación de catecolaminas. De hecho, existe una gran semejanza entre los cambios histológicos observados después de una intoxicación con veneno de alacrán (necrosis focales del miocardio, infiltración con monocitos y linfocitos, así como deposición de gotas de grasa) y los que producen un exceso de noradrenalina y epinefrina (Ismail, 1995; Tu, 1977).

De esta manera, es posible explicar la observación de que todos los venenos de alacrán producen hipertensión; este efecto es tan pronunciado y dura tanto tiempo, que se considera como el factor etiológico responsable del desarrollo de la falla cardíaca y el edema pulmonar característicos de la intoxicación. Sin embargo, a la falla cardíaca también contribuye un desequilibrio electrolítico, producido igualmente por el veneno; observándose hiponatremia, hiperkalemia y disminución de los niveles séricos del calcio; esta última producida por una alteración de la permeabilidad de las membranas de las células cardíacas (Ismail, 1995; Tu, 1977).

Las picaduras de alacrán producen la aparición de sangre en lágrimas y orina, hemorragia intraperitoneal y priapismo; todo lo cual, sugiere que puede ocurrir una hemorragia mayor. Además del efecto hemorrágico, algunos venenos de alacrán también son hemolíticos y anticoagulantes (Tu, 1977).

3) Sistema Respiratorio. Como ya se mencionó todos los venenos de alacrán producen edema pulmonar, sin embargo, la liberación masiva de catecolaminas (que provoca hipertensión) no es el único factor que contribuye a la aparición de este fenómeno, ya que también existe un factor humoral, debido a la liberación de sustancias vasoactivas, que aumentan la permeabilidad vascular pulmonar (Ismail, 1995).

Además, los venenos de alacrán producen arritmias respiratorias complejas, que incluyen: taquipnea, hiperpnea y respiración periódica, incluyendo respiración de Cheyne-Stokes (Ismail, 1995; Tu, 1977).

4) **Metabolismo.** El veneno de alacrán puede afectar la actividad enzimática de varios tejidos, algunas de las enzimas afectadas son: la succinato deshidrogenasa, la lactato deshidrogenasa y la acetilcolinesterasa. También se puede presentar hiperglicemia; este efecto parece deberse a la presencia de serotonina en el veneno (Tu, 1977).

5) **Músculo liso.** Los venenos de alacrán producen hiperemia visceral e hiperdistensión gástrica, que pueden producir calambres abdominales. En el fleón de cobayo, produce un aumento de su motilidad, ésta se produce por la liberación conjunta tanto de acetilcolina, como de sustancia P, lo que comprueba que la despolarización de las membranas neuronales, además de liberar acetilcolina y catecolaminas, también libera neuropéptidos (Matos, *et al*, 1999; Tu, 1977).

La contracción del útero de rata inducida por el veneno de alacrán, se debe a acciones en las terminales postganglionares del sistema nervioso autónomo, que produce la liberación de acetilcolina y la estimulación de receptores muscarínicos (Mendoza, *et al*, 1995).

1.2.4 Tratamiento de la picadura. La forma más común de tratamiento para la intoxicación con veneno de alacrán es la administración del antiveneno, acompañado, cuando así lo amerite de otros fármacos, como: vasodilatadores (hidralazina, prazosina, nifedipina y captopril), anticolinérgicos (atropina), anticonvulsivos (barbituratos y diacepam), antieméticos (metoclopramida) y antipiréticos (paracetamol). En México, se ha comercializado un antiveneno de alacrán denominado de "tercera generación", ya que contiene fragmentos $[F(ab')_2]$ puros -ver glosario- (comercialmente, Alacramin), en lugar del suero total (primera generación) o las inmunoglobulinas purificadas (segunda generación). Sin embargo, este antiveneno no ha sido estandarizado para evaluar los riesgos del uso de dosis múltiples de éste; con todo, lo que resulta aún más preocupante son los resultados de un estudio clínico realizado en Turquía, en el que no encontraron beneficios con la administración de los sueros, en el tratamiento de pacientes de intoxicación con veneno de alacrán, independientemente de la severidad de los síntomas que presentaron los pacientes (Abroug, 1999; Ismail, 1995; Osnaya-Romero, *et al*, 2001).

1.2.5 Tratamientos tradicionales. A pesar de su amplia difusión, el tratamiento con antiveneno no es el único que se aplica, ya que de acuerdo con la

tradición mexicana, la picadura de alacrán es producto del castigo de los dioses hacia aquellas personas que infringen las leyes sociales establecidas, por lo que el tratamiento proporcionado tendrá como objetivo reconciliar a los dioses con esta persona (Mata, *et al*, 1994).

En la tabla V, pueden observarse algunas de las plantas medicinales más empleadas en México para curar la mordedura de alacrán. Algunos de los tratamientos tradicionales que se emplean con este fin son: cauterización de la herida con una brasa (empleado en ciertas poblaciones de Durango), en la Huasteca potosina y Papantla, Ver., se frota la herida con ajo masticado con orégano o tabaco. En Morelos, se sugiere que comer las colas del alacrán aminora los efectos del veneno; con este fin también se recomienda tomar café cargado o jugo de limón con clara de huevo o refresco, o bien, colocar un torniquete entre la lesión y el corazón; también se recomienda tomar tequila o rociar pólvora sobre la picadura. En Huitziltepec, Gro., los curanderos aplican iodo, ocote hervido o manteca de tejón sobre la herida y acompañan la curación con música de guitarra; en otras poblaciones del mismo estado, el paciente debe comer manteca de tejón o beber un cocimiento elaborado con cascabeles de víbora y una oreja de gato negro o café amargo (Aguilar, *et al*, 1994; DGCS, 2001; Mata, *et al*, 1994).

Tabla V. Plantas medicinales usadas en México contra la picadura de alacrán (Aguilar, *et al*, 1994; INAH, 2000; Mata, *et al*, 1994).

Nombre científico	Nombre común	Parte empleada	Lugar de uso
<i>Allium sativum</i>	Ajo	Bulbo	Papantla, Ver.
<i>Aristolochia argentea</i>	Tlacopatli		Guerrero, Morelos
<i>Aristolochia asclepiadifolia</i>	Guaco, Raíz de guaco	Raíz	Veracruz
<i>Aristolochia foetida</i>	Cacalayo, guaco	Raíz	Copalillo, Temalac, Gro.
<i>Aristolochia grandiflora</i>	Flor de pato, Guaco	Partes aéreas	D.F., Chiapas, Veracruz
<i>Aristolochia littoralis</i>	Pañito		Guerrero, Veracruz
<i>Aristolochia pringlei</i>	Guaco, tlacopatli		Morelos
<i>Chenopodium ambrosioides</i>	Epazote	Ramas	Alpoyeca, Gro.
<i>Citrus limon</i>	Limón	Hojas	Temixco, Mor.
<i>Coffea arabica</i>	Café	Fruto	Alpoyeca, Gro.
<i>Ipomea wolcottiana</i>	Casahuate rasposo	Hojas	Temixco, Mor.
<i>Plumbago scandens</i>	Cola de iguana, Hierba del rayo	Planta	Tetlana, Temixco, Mor.

Aunque hasta la fecha no existen reportes científicos sobre estudios clínicos o farmacológicos que comprueben la eficiencia del empleo de plantas contra los efectos

de los venenos de alacrán, un buen indicativo de su eficiencia está dado por el uso de las mismas especies (o especies de la misma familia), en diferentes culturas y áreas geográficas; en la tabla VI se muestran algunos ejemplos (Hutt y Houghton, 1998).

Tabla VI. Plantas usadas tradicionalmente como alexitere (Hutt y Houghton, 1998).

Familia	Especie	Áreas geográficas de uso
Amaranthaceae	<i>Achyranthes aspera</i> L.	Ceilán, India, Arabia, África oriental
	<i>Aristolochia bracteata</i> Retz.	Ghana
	<i>Aristolochia cucurbitifolia</i> Sieb. et Zucc.	Sureste de Asia
Aristolochiaceae	<i>Aristolochia indica</i> L.	Ceilán, Tíbet
	<i>Aristolochia grandiflora</i> Swartz	América central, México, Trinidad
	<i>Aristolochia</i> sp.	Noroeste del Amazonas
Asclepiadaceae	<i>Calotropis gigantea</i> Dryand	Nepal, India, Ceilán
	<i>Clotropis procera</i> (Aiton) Aiton	Ghana
Caricaceae	<i>Carica papaya</i> L.	India, Ceilán, Trinidad, Indias orientales
	<i>Mikania cordata</i> (Burm.) B.L. Robinson	Ghana
Compositae	<i>Mikania cordifolia</i> Willd.	Indias orientales
	<i>Mikania micrantha</i> HBK	Trinidad, Indias orientales
Cyperaceae	<i>Cyperus rotundus</i> L.	Ceilán, India, norte de África
Liliaceae	<i>Allium cepa</i> L.	Filipinas
	<i>Allium sativum</i> L.	Malasia, Filipinas, Cuba
Solanaceae	<i>Solanum indicum</i> L.	India
	<i>Solanum pectinatum</i> Dun.	Amazonas
	<i>Solanum sessiliflorum</i> Dun.	Amazonas

A pesar de que no se han realizado estudios farmacológicos de extractos de plantas a los que se les atribuye actividad alexitere, se han propuesto algunos posibles mecanismos de acción; algunos de ellos son (Hutt y Houghton, 1998):

- ☛ El veneno de alacrán produce una fuerte reacción inflamatoria, por lo que no es sorprendente encontrar que muchas plantas que tienen uso alexitere, pertenecen a géneros que incluyen plantas que poseen propiedades antiinflamatorias. De hecho, se ha encontrado que algunos compuestos presentes comúnmente en algunas plantas empleadas en Brasil para tratar la mordedura de serpiente, como algunos flavonoides (quercetina) son los agentes antiinflamatorios responsables de aliviar los efectos de la mordedura de serpiente.
- ☛ Una actividad alexitere más directa, consiste en la formación de complejos con los diferentes componentes del veneno.

- Las catecolaminas liberadas como resultado de la interacción del veneno y los receptores, pueden ser antagonizadas por los principios activos de la planta, o inducir un metabolismo más rápido de éstas.
- La reducción de la intensidad de los efectos de la intoxicación puede también lograrse por una estimulación inespecífica del sistema inmune, que produciría fagocitosis y una consecuente neutralización de los péptidos del veneno.

1.3 SERPIENTES

1.3.1 Generalidades. Las serpientes pertenecen a la clase Reptilia y se clasifican bajo el orden Ophidia. El término serpiente se emplea normalmente para nombrar sin distinción tanto a culebras, como a víboras; en general, la palabra culebra se asocia a organismos inofensivos (aunque existen algunas especies venenosas), en tanto que las víboras son, sin excepción, venenosas y su mordedura es potencialmente tóxica para el ser humano (Pérez, *et al*, 2001; Selvanayagan, *et al*, 1994).

Las serpientes pueden encontrarse en una gran variedad de hábitats, distribuidos en las áreas tropicales y subtropicales de todo el mundo. De acuerdo con el tipo de dentición, las serpientes se clasifican en cuatro grupos (Pérez, *et al*, 2001; Selvanayagan, *et al*, 1994):

- Aglifas (sin colmillos inoculadores) géneros: Boidae, Leptotiflopidae, Tiflopidae.
- Opisthoglifas (un par de colmillos acanalados y fijos situados en la parte trasera de la maxila) su veneno es de baja toxicidad, excepto el de algunas especies africanas. Géneros: Colubridae.
- Proteroglifas (un par de colmillos fijos, acanalados o huecos, situados en la parte delantera de la maxila) su veneno es altamente peligroso. Géneros: Elapidae, Hidrofidae.
- Solenoglifas (un par de colmillos inoculadores de veneno, móviles, huecos, situados en la parte delantera de la maxila) su veneno es altamente peligroso. Viperidae y Crotalidae.

De las casi 3000 especies de serpientes que existen, unas 375 (19%) son venenosas y pertenecen primordialmente a cuatro familias: Atractaspididae (1%), Colubridae (1%), Elapidae (10%) y Viperidae (8%). En la tabla VII, se mencionan algunas serpientes venenosas reconocidas mundialmente (Houghton y Osibogun, 1993; Pérez, *et al*, 2001; Selvanayagan, *et al*, 1994).

Tabla VII. Serpientes venenosas (Houghton y Osibogun, 1993; Pérez, *et al*, 2001).

Familia	Especie	Distribución
Colubridae	<i>Dispholidus typus</i> (boomslang)	África
	<i>Thelotornis kirtlandi</i> (twig snake)	
Crotalidae	<i>Agkistrodon</i> spp. (cantil, mocasín, zolcuate)	América
	<i>Bothrops</i> spp. (nauyaca, cuatro narices, terciopelo)	
	<i>Crotalus</i> spp. (cascabel)	
	<i>Ophryacus</i> spp. (torito, cuernito, cachito)	
Elapidae	<i>Porthidium</i> spp. (hocico de puerco)	Asia
	<i>Dendroaspis</i> spp. (mamba negra)	África
	<i>Echis carinatus</i> (carpet viper)	
	<i>Naja</i> spp. (cobras)	
	<i>Oxyuranus</i> spp. (taipan)	Asia
Hidrofidae	<i>Emydocephalus</i> spp.	Océanos
	<i>Hydrophis</i> spp. (serpientes marinas)	Pacífico e
	<i>Laticauda</i> spp.	Índico
	<i>Pelamis</i> spp.	
Viperidae	<i>Bitis</i> spp. (bufadora, víbora de ariete, gabónica)	África
	<i>Cerastes</i> spp. (cornuda del desierto)	Asia
	<i>Vipera</i> spp. (víbora europea)	Europa

Las serpientes venenosas que habitan en el territorio mexicano pertenecen a una de las cuatro siguientes familias (Mata, *et al*, 1994; Pérez, *et al*, 2001):

- a) **HIDROFIDAE:** Sus fosas nasales se localizan sobre el hocico, poseen una pupila redondeada, los colmillos conductores de veneno se encuentran fijos a los lados del maxilar y son ligeramente mayores al resto de los dientes; estas víboras miden entre 15 y 70 cm de longitud; habitan en las áreas tropicales del pacífico, sobre todo, nadando en aguas poco profundas. Pertenecen al género *Pelamis*.
- b) **ELAPIDAE:** Estas víboras son de cuerpo delgado, cabeza ligeramente aplanada y ojos pequeños; miden 12 a 80 cm y tienen dos colmillos fijos, mucho más pequeños que los de la familia Crotalidae, habitan en los desiertos y selvas tropicales de todo el país; poseen hábitos nocturnos y viven bajo hojarascas o troncos podridos. Su principal representante son las serpientes de coralillo, de los géneros *Micruroides* y *Micrurus*.
- c) **CROTALIDAE:** De cuerpo robusto, cola y cuello bruscamente adelgazados, cabeza triangular y dos grandes colmillo móviles, estas víboras presentan una foseta entre el ojo y la nariz, que constituye la entrada de un órgano sensorial que les permite detectar presas de sangre caliente, por esta razón, reciben el nombre de cuatro narices. Miden de 15 cm a 1.5 m y viven en hábitats muy variados (selvas,

subdesiertos y bosques de todo el país); algunas víboras que forman parte de esta familia son: cascabeles, nauyacac, palancas, zolcuates, cantiles y sordas (tabla VII).

- d) COLUBRIDAE: Sólo pocas especies son venenosas, por lo que su mordedura, aunque puede causar grandes molestias, no ocasiona la muerte. Las chirrioneras son un ejemplo de serpientes que pertenecen a esta familia.

En México, el primer lugar de accidentes causados por animales venenosos lo ocupan las picaduras de alacrán (de hecho, es el primer lugar a nivel mundial), en tanto que el segundo lugar, corresponde a las mordeduras de serpientes, principalmente las provocadas por cascabeles, cantiles y coralillos. Aunque, al igual que en el alacranismo las estadísticas no son del todo confiables, debido a que muchos de estos accidentes no se reportan; según el registro de morbilidad del IMSS, entre 1994 y 1998, se registraron 2620 casos de mordeduras de serpiente, 23 de las cuales terminaron en defunciones (DGCS, 2001).

1.3.2 Veneno. El veneno de serpiente se produce en una glándula sero-mucosa especializada y es inoculado a la víctima por un aparato adaptado específicamente, cuyo principal componente son los dientes modificados (colmillos) que inyectan el veneno a presión en los tejidos de la víctima (Chippaux y Goyffon, 1998).

Los venenos de serpientes son de dos tipos: neurotóxico o proteolítico, el primero es un neurobloqueador que trabaja sobre el sistema nervioso central inhibiendo principalmente impulsos respiratorios y cardíacos. El segundo tiene la función de destruir tejidos, como piel, sangre, hueso, músculo y pelo. Generalmente en los miembros de las familias Viperidae y Crotalidae predomina el veneno con propiedades proteolíticas; mientras que en las Elapidae e Hidrofidae, es más común el de tipo neurotóxico (Houghton y Osibogun, 1993; Pérez, *et al*, 2001).

Al igual que el veneno de alacrán, el veneno de víbora consiste de una solución acuosa cuyo principal componente son proteínas (casi un 77% del peso seco), el resto consiste de lípidos, nucleótidos, aminas con actividad biológica y componentes inorgánicos. El veneno de una sola especie puede contener entre cinco y quince enzimas (de tipo proteolítico), así como de tres a doce proteínas y péptidos no enzimáticos (toxinas); la toxicidad del veneno depende de la presencia de estos componentes (Guieu, *et al*, 1998; Russell, *et al*, 1997; Selvanayagan, *et al*, 1994).

Ejemplos de enzimas de tipo proteolítico de los venenos de serpientes, son (Braui, *et al*, 2000; DNWUSM, 2001; Guieu, *et al*, 1998):

- * Las endo- y exo-peptidasas, que pueden transformar el fibrinógeno en fibrina y activar la coagulación sanguínea.
- * Algunos tipos de fosfolipasas A_2 pueden inducir un deterioro irreversible de las membranas de las células rojas y, por ende, hemólisis, mientras que otras atacan a las plaquetas, induciendo su lisis y la consecuente liberación del factor de agregación plaquetario, lo que acelera la coagulación.
- * Otro grupo de fosfolipasas A_2 , con $DL_{50} > 1 \text{ mg/ kg}$, son mitóticas, pues provocan lisis de las fibras musculares.
- * Muchas metaloproteinasas degradan factores de coagulación sanguíneos o proteínas de las células endoteliales, alterando la hemóstasis.

Las neurotoxinas son sustancias que actúan sobre los receptores de acetilcolina (pre y postsinápticos), por lo que no provocan cambios morfológicos a los músculos u otros tejidos. Las neurotoxinas presinápticas inhiben la liberación de la acetilcolina y normalmente, poseen actividad de fosfolipasa; entre las más estudiadas, se encuentran las dendrotoxinas, la crotoxina la arabutoxina y la β -bungarotoxina. Las toxinas que actúan en la membrana postsináptica, como la α -bungarotoxina y la toxina α de cobra, son proteínas curarizantes con gran afinidad por el receptor nicotínico de la acetilcolina; de hecho, la primera se une de manera irreversible a éste (Chippaux y Goyffon, 1998; DNWUSM, 2001; Guieu, *et al*, 1998).

Otras toxinas afectan la placa neuromuscular mediante otros mecanismos, como la crotamina, que es un poderoso agente liberador de histamina, provocando alteraciones en la concentración intracelular de calcio, probablemente por la apertura de canales iónicos (Guieu, *et al*, 1998).

La mordedura de serpiente provoca la aparición de síntomas locales y sistémicos; entre los locales están: la huella de la herida de los colmillos, la presencia de edema alrededor de la huella, dolor intenso y aparición de flictenas o pequeñas bolsas de tejido necrótico (sangre morada). Algunos de los signos sistémicos son: náuseas, vómitos, taquicardia, hipotensión, sangrado, convulsiones, coma y muerte (DGCS, 2001).

1.3.3 *Crotalus durissus* L. Conocida comúnmente como serpiente de cascabel o neotropical rattlesnake, son serpientes que miden menos de 1.6 m de longitud; existen más de 12 subespecies, distribuidas desde el sur de EEUU hasta Argentina, preferentemente a menos de 1000 m de altitud, aunque pueden encontrarse hasta los

2500 m, generalmente en áreas secas, pastizales y bosques secos a muy secos. El color de su dorso varía desde el café, hasta el oliváceo o verdoso, el vientre es blanco o color crema; sin embargo, su característica más reconocida es la estructura que presentan en el extremo de su cuerpo: el cascabel (Russell, *et al*, 1997).

La mordedura de esta serpiente prácticamente carece de síntomas localizados, por lo que el tratamiento no siempre se administra inmediatamente después de ocurrido el accidente. El veneno es sumamente neurotóxico, debido a la presencia de la crotovina, una fosfolipasa A_2 , que actúa sobre las terminales nerviosas presinápticas, lo que provoca la aparición de síntomas como diplopia y anisocoria; sin embargo, estos efectos normalmente se revierten sin presentar secuelas cuando se aplica un tratamiento adecuado. También posee actividad nefrotóxica, provocando oliguria, anuria y falla renal aguda; además presenta un efecto coagulante e induce desfibrinación *in vivo*. (DNWUSM, 2001; Russell, *et al*, 1997; Sannanaik y Verabasappa, 1987).

Otro efecto importante del veneno de *Crotalus durissus*, es la necrosis muscular, que ocurre tanto local (en el sitio de la mordedura), como sistémicamente. El primero está mediado por la acción de la crotamina, en tanto que el segundo depende de la crotovina; de hecho la acción de esta toxina es selectiva, ya que únicamente afecta a las fibras musculares de tipo I (presentan una elevada densidad de mioglobina, mitocondrias y capilares, así como una capacidad oxidativa alta) y tipo IIA, cuya capacidad oxidativa es menor a la de las de tipo I (Salvini, *et al*, 2001).

1.3.4 *Bothrops asper* Garman. Algunos de los nombres comunes que se le dan a esta víbora son nauyaca, terciopelo, barba amarilla y lancehead; generalmente miden menos de 2.6 m de longitud. Esta especie presenta gran variación en cuanto a sus colores y marcas en el cuerpo, por lo que sus manchas pueden ser verde oliva, grises o cafés, separadas entre sí por bordes de color más claro, algunas de ellas en forma de triángulos; también posee una franja de color oscuro, que corre posteriormente, desde el ojo, hasta el ángulo del hocico. El dorso de la cabeza es usualmente más oscuro que el resto del cuerpo y, generalmente, no presenta marcas, en tanto que el vientre varía del color crema al amarillo (Russell, *et al*, 1997).

Este tipo de serpiente se distribuye desde el norte de México, hasta las regiones bajas de Colombia y Ecuador, pudiendo ser encontrada en gran variedad de hábitats, especialmente los montañosos, bosques húmedos y templados, pero también

puede localizarse en áreas cultivadas, cerca de corrientes de agua o lagos e incluso cerca de asentamientos humanos. Generalmente es nocturna, y es poco activa durante el día: a pesar de su relativo gran tamaño, se mueve rápidamente y puede cambiar de dirección a gran velocidad (Borkow, *et al*, 1995; Russell, *et al*, 1997).

El veneno de esta serpiente produce efectos locales (hemorragia, mionecrosis y edema) y sistémicos (hemorragia, desórdenes de la coagulación y choque cardiovascular). La hemorragia es uno de los efectos más relevantes y se desarrolla rápidamente tras la inyección del veneno, causando grandes daños a la microvasculatura y pérdida sanguínea que culminan con degeneración muscular y de otros tejidos (Borkow, *et al*, 1995).

Dada la importancia del efecto hemorrágico de este veneno, se han estudiado profusamente tanto las toxinas que intervienen en el proceso, como su mecanismo de acción. Así, se han identificado varios factores hemorrágicos: BaH1, BH2 y BH3, que en combinación, constituyen el 55% de la actividad hemorrágica total del veneno. Las tres son proteínas con carácter ácido cuya actividad depende de la presencia de iones metálicos (Borkow, *et al*, 1993).

Respecto del mecanismo de acción, los capilares sanguíneos parecen ser el principal punto de acción de las toxinas hemorrágicas y su actividad resulta en una alteración de la permeabilidad capilar y extravasación. La principal proteína hemorrágica del veneno de *B. asper* es la BaH1, que parece actuar por la separación de las células del sustrato que las sostiene ya que no es citotóxica *per se* (Borkow, *et al*, 1995).

A pesar de que el efecto hemorrágico es el de mayor relevancia producido por el veneno de *B. asper*, otros efectos han sido estudiados, así como las sustancias responsables; algunos de ellos son:

- △ El edema producido por el veneno de esta serpiente está mediado por metaloproteinasas (como la BaP1), fosfolipasa A₂, productos de la degradación de los eicosanoides y activación de los receptores adrenérgicos α_1 y α_2 (Chaves, *et al*, 1995; Gutiérrez, *et al*, 1995).
- △ Se han identificado cuatro componentes miotóxicos en el veneno de *B. asper*, denominados miotoxinas I, II, III y IV; se ha observado que la inyección de miotoxina III al tejido muscular, produce cambios celulares degenerativos, con fibras musculares agrupadas y necrosis eventual, así como una relación dosis-

dependiente en la liberación de creatinín-cinasa del músculo gastrocnemius del ratón; por otro lado, la miotoxina IV, además de inducir daño muscular agudo, posee un leve efecto anticoagulante (Diaz, 1995; Russell, *et al*, 1997).

- ▲ El veneno también posee un potente efecto citotóxico; además de que induce alteraciones hematológicas e inmunológicas tempranas en las víctimas (Goni, *et al*, 1992; Lomonte, *et al*, 1993).

1.3.5 Tratamiento de la mordedura. Al igual que en el caso de la picadura de alacrán, el tratamiento más común para la mordedura de serpiente es la administración del antiveneno específico, terapia desarrollada en 1894 por Calmette; el producto disponible en México también contiene fragmentos $[F(ab')_2]$ puros (Alan y Gomes, 1997; DGCS, 2001).

Además de la administración del antiveneno correspondiente para tratar la mordedura de serpiente de cascabel, se recomienda suministrar solución salina por vía intravenosa, para evitar la falla renal; mientras que con el fin de inducir la diuresis, se emplea manitol al 20%, finalmente, se hace uso de bicarbonato para alcalinizar la orina y evitar los desórdenes renales que produce el pH ácido en la orina. El tratamiento adicional que se suministra a los pacientes que sufrieron una mordida por nauyaca, consiste en la administración de toxoide tetánico en caso de presentarse áreas necróticas grandes, estas zonas también deben ser lavadas con antisépticos, como permanganato de potasio, así como antibióticos y analgésicos. (DNWUSM, 2001; Russell, *et al*, 1997; Sannanaik y Verabasappa, 1987).

Se considera que al remover la porción Fc a las inmunoglobulinas del suero, el producto resultante producirá menores efectos secundarios, además de poseer un mejor perfil farmacocinético que los sueros de "segunda generación", pues como sus componentes son más pequeños su volumen de distribución es mucho mayor y alcanzan las concentraciones máximas más rápidamente que las moléculas íntegras de IgG. Considerando esto, resulta lógico suponer que el suero constituido por los fragmentos de IgG será más eficaz para neutralizar las toxinas responsables de daño local de tejidos, como mionecrosis, hemorragia y edema, síntomas característicos de la intoxicación con venenos de serpientes de la familia Crotalidae y que son muy difíciles de eliminar con los sueros de segunda generación. Sin embargo, los estudios realizados por León y cols., no encontraron diferencias en la habilidad de los antivenenos que contienen IgG íntegros o fracciones $[F(ab')_2]$, para neutralizar la

hemorragia, la mionecrosis y el edema producidos por el veneno de *Bothrops asper* (León, et al, 1997).

Por otro lado, es un hecho que la terapia con sueros resulta cara y no siempre está disponible en las áreas rurales en las que ocurren los accidentes, no sólo porque los hospitales se encuentran alejados de estas regiones, sino porque la seroterapia fuera de un hospital no es muy recomendable (Martz, 1992; Selvanayagan, et al, 1994).

Debido a esto, resulta clara la necesidad de desarrollar terapias efectivas para el tratamiento de la mordedura de serpiente, las plantas medicinales constituyen un excelente punto de partida, debido al gran uso que se les da en diversas partes del mundo, pues de acuerdo con un estudio realizado en 1991, unas 578 especies de plantas superiores, pertenecientes a unas 94 familias, han sido citadas en la literatura como activas contra la mordedura de serpiente; en la tabla VIII, se incluyen algunas de ellas. Además, aunque las preparaciones de plantas no logren la neutralización total del veneno, permiten ganar tiempo valioso para acceder al hospital más cercano (Martz, 1992).

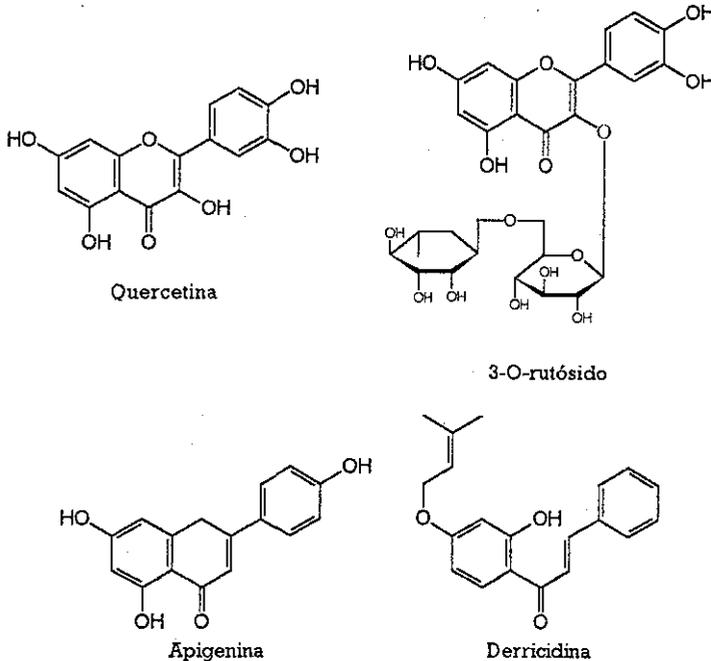
Tabla VIII. Plantas usadas tradicionalmente como anticrotálicos
(Houghton y Osibogun, 1993).

Familia	Especie	Áreas geográficas de uso
Apocynaceae	<i>Apocynum androsaemifolium</i> L.	Norteamérica
	<i>Nerium oleander</i> L.	Medio oriente
	<i>Rauwolfia tetraphylla</i> L.	América central
	<i>Tabernaemontana sralensis</i> Pierre ex Pitard	Sureste de Asia
Aristolochiaceae	<i>Aristolochia barbata</i> Jacq.	Brasil
	<i>Aristolochia maxima</i> L.	México, América central
	<i>Bragantia corymbosa</i>	Indonesia
Gentianaceae	<i>Gentiana andrewsii</i> Criseb	Norteamérica
	<i>Gentiana lutea</i> L.	Europa
	<i>Sebaea crassulaefolia</i> Schlecht.	Sur de África
Labiatae	<i>Hoslundia opposita</i> Vahl.	Este de África
	<i>Ocimum basilicum</i> L.	Europa
	<i>Scutellaria laterifolia</i> L.	México, Norteamérica
Piperaceae	<i>Piper betel</i> L.	Asia
	<i>Piper medium</i> Jacq.	Costa Rica
Rutaceae	<i>Ruta graveolens</i> L.	China, Europa

El uso de plantas contra los efectos de la mordedura de serpiente ha sido objeto de estudios científicos serios únicamente durante los últimos veinte años, razón por la cual, a pesar de la gran variedad de plantas consideradas antídoto contra las mordeduras de serpientes, el número de investigaciones farmacológicas y clínicas

todos, pues a pesar de poseer esqueletos pequeños, presentan muchos sitios para la formación de puentes de hidrógeno. La quercetina (figura VI), por ejemplo, ejerce un 40-80% de protección contra el veneno de *Bothrops jararaca* en ratones; mientras que el 3-O-rutósido (figura VI) demostró un 20-80% de protección, en un ensayo con las mismas condiciones, además de que posee la propiedad de inhibir enzimas del tipo de las fosfolipasas A_2 ; en tanto que la apigenina y la derricidina (figura VI) demostraron un 40% y un 70% de protección respectivamente, frente al veneno de *Bothrops jararaca*, en ratones; otros flavonoides, como la morina, son capaces de interactuar con iones metálicos, como el zinc y el aluminio (muchas enzimas presentes en los venenos de serpientes son metaloproteinasas que contienen zinc). Además, muchos flavonoides que carecen de actividad, cuando se ingieren, son degradados por la microflora intestinal, produciendo metabolitos activos (Houghton y Osibogun, 1993; Mors, *et al*, 2000; Selvanayagan, *et al*, 1994).

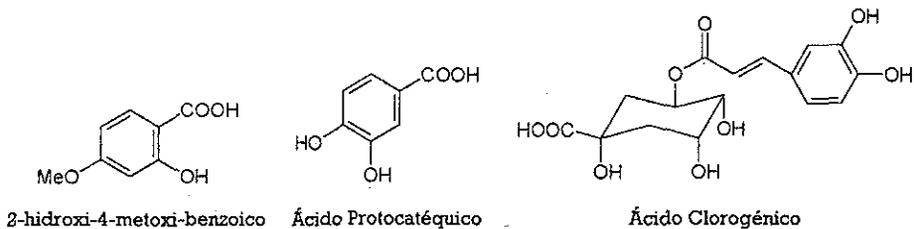
Figura VI.



* **Ácidos hidroxibenzoicos y sus éteres metílicos:** La capacidad de este tipo de compuestos de unirse a proteínas ha sido estudiada ampliamente,

por ello, se sabe que las interacciones entre unos y otras son tan fuertes, que provocan cambios conformacionales en la proteína. Entre los que han sido sujetos a estudios se pueden mencionar al: ácido 2,4-dihidroxi benzoico, con una capacidad de ofrecer un 83% de protección contra el veneno de *Bothrops jararaca* en ratones; el ácido protocatéquico y el ácido clorogénico (figura VII), que presentan un 80% y un 60% de protección respectivamente también en ratones, contra el mismo veneno, en tanto que el ácido 2-hidroxi-4-metoxi benzoico (figura VII), aislado de la corteza de la raíz de *Hemidesmus indicus*, que es capaz de neutralizar los efectos letales y hemorrágicos del veneno de *Vipera russellii*, además de que posee actividad de adyuvante en la producción de sueros anticrotálicos (Alam y Gomes, 1998; Mors, et al, 2000; Selvanayagan, et al, 1994).

Figura VII.

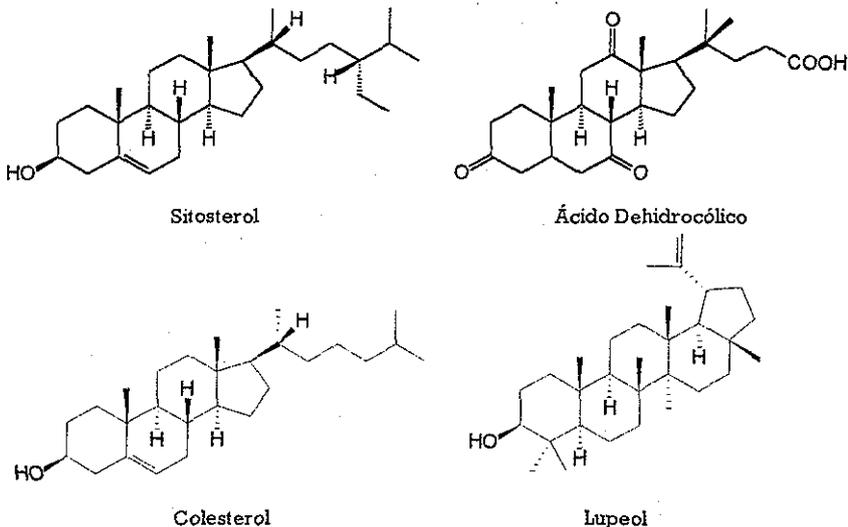


* **Taninos:** Los taninos constituyen el grupo de compuestos polifenólicos cuya capacidad para unirse a proteínas es la mejor conocida. El tanino del pèrsimo (*Diospyros virginiana*) posee un fuerte efecto detoxificante del veneno de varias serpientes, como la habu (*Trimeresurus flavoviridis*), la mamushi (*Agkistrodon halys*), la cobra taiwanesa (*Naja naja atra*), la cobra filipina (*N. n. philippinensis*), la cobra india (*N. n. naja*), la cobra siamesa (*N. n. kaouthia*) y la serpiente marina erabu (*Laticauda semifasciata*); ese compuesto también inhibe la inflamación producida por el veneno de la serpiente erabu (Houghton y Osibogun, 1993; Selvanayagan, et al, 1994).

* **Esteroles y triterpenos:** Los esteroides como el ácido cólico, son sustancias capaces de formar compuestos de adición estables con muchas moléculas orgánicas, conocidos como ácidos coléicos, que permiten convertir grasas y ácidos grasos en compuestos emulsificables, que facilitan su absorción intestinal, su hidrólisis y la absorción de las vitaminas liposolubles; esta propiedad podría

explicar la razón por la que compuestos como el sitosterol (común en casi todas las especies de plantas), poseen propiedades anticrotálicas, por ejemplo, el sitosterol (figura VIII) concede un 70% de protección contra el veneno de *Bothrops jararaca* a ratones, además de que puede unirse a la lisolecitina, compuesto hemolítico que se produce por la hidrólisis de la lecitina sérica, evitando efectos hemolíticos de ciertos venenos; el ácido dehidrocólico (figura VIII) un 80% de protección contra el mismo veneno y el colesterol (figura VIII) un 60% de protección; mientras que el estigmasterol puede neutralizar tres a cuatro DL_{50} del veneno de la serpiente de cascabel sudamericana (*Crotalus durissus terrificus*), así como inhibir el efecto mitotóxico de los venenos de serpientes del género *Bothrops*. Finalmente, el lupeol (figura VIII) es capaz de proteger en un 20% contra el veneno de *B. jararaca*, así como la friedelina y la betulina, que ejercen un 40% de protección de ratones contra este veneno (Mors, et al, 2000, Selvanayagan, et al, 1994).

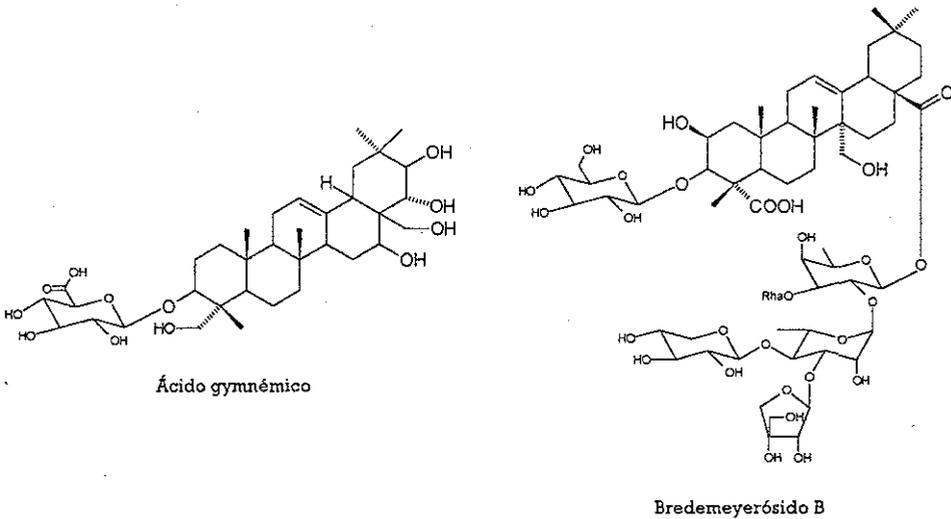
Figura VIII.



* **Glicósidos triterpenoides:** La enzima Na^+/K^+ -adenosin trifosfatasa (ATPasa) del veneno de serpiente produce un "shock" en la víctima al hidrolizar repentinamente el ATP de ésta; el ácido gymnénico (figura IX) aislado de la raíz de *Gymnema silvestre*, es capaz de inhibir, *in vitro*, a esta enzima, proveniente del veneno de *Naja naja*. Por otro lado, el bredeyemerósido B (figura IX), aislado de

la planta brasileña *Bredemeyera floribunda*, demostró ofrecer un 80% de protección contra el veneno de *Bothrops jararaca* a ratones (Daros, *et al*, 1996; Houghton y Osibogun, 1993; Mors, *et al*, 2000; Selvanayagan, *et al*, 1994).

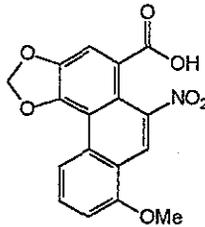
Figura IX.



* **Ácidos aristolóquicos:** La raíz de las plantas que pertenecen al género *Aristolochia* son remedios famosos contra la mordedura de serpiente, y el ácido aristolóquico I (figura X) es considerado como el agente marcador quimiotaxonomico de la familia *Aristolochiaceae*, ya que se ha aislado en diversas especies de los tres géneros que componen a esta familia. Este compuesto presenta la característica inusual de poseer un grupo nitro vecino a un átomo de hidrógeno ácido, lo que le permite formar un puente de hidrógeno intramolecular; esta clase de moléculas poseen propiedades quelantes bien conocidas. Así, se ha encontrado que el ácido aristolóquico forma, *in vitro*, un complejo 1:1 con la fosfolipasa A_2 (PLA_2) del veneno de *Vipera russelli*, mismo que provoca un cambio significativo en la estructura secundaria de la proteína, actuando como un inhibidor no competitivo de la enzima; esta inhibición anula la hemólisis directa e indirecta, así como el edema que esta enzima produce. Este compuesto también es un inhibidor competitivo de tres enzimas PLA_2 del veneno de *Trimeresurus flavoviridis*, gracias a que se une al sitio catalítico de la enzima. Adicionalmente, el ácido aristolóquico produce un incremento no-específico de

la respuesta inmune, que también puede tener influencia en el proceso de recuperación de la intoxicación. Por tanto, compuestos que se relacionan químicamente con el ácido aristolóquico, también pueden tener actividad antivieno (Houghton y Osibogun, 1993; Martz, 1992; Mors, *et al*, 2000; Sannanaik, 1987).

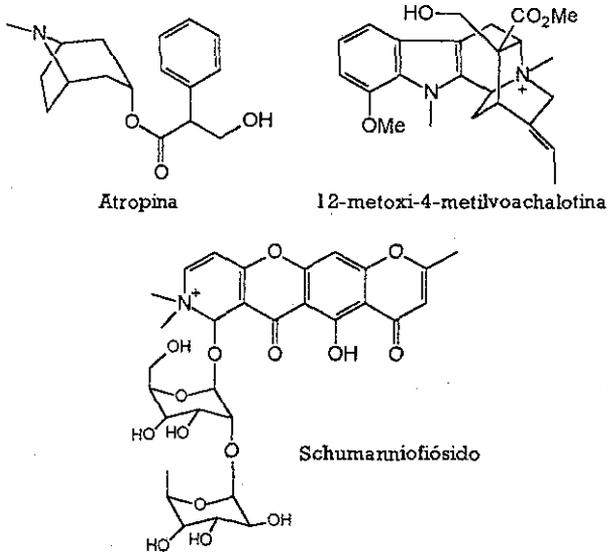
Figura X.



Ácido aristolóquico I

* **Alcaloides:** La atropina (figura XI), en experimentos *in vivo* (ratones) ha demostrado ofrecer protección contra los efectos tóxicos de la combinación de la toxina F₇, aislada del veneno de la mamba verde (*Dendroaspis angusticeps*) y la toxina I del veneno de la mamba negra (*D. polylepis polylepis*). Cabe mencionar, que los efectos individuales de estos péptidos son aditivos; además, la atropina constituye el único compuesto cuya efectividad contra los efectos letales y toxicológicos del veneno de alacrán ha sido comprobada en animales de laboratorio. Por otro lado, recientemente se aisló un alcaloide cuaternario a partir del extracto etanólico de la corteza de raíz de la planta *Tabernaemontana catharinensis*, denominado 12-metoxi-4-metilvoachalotina (figura XI); éste, es capaz de inhibir en ratones, los efectos letales y miotóxicos del veneno de la serpiente de cascabel sudamericana. Finalmente, también se pueden incluir glucósidos alcaloideos dentro de este grupo, ya que el schumanniofósido (figura XI), aislado a partir de la corteza de *Schumanniophyton magnificum* demostró poseer una fuerte actividad contra el veneno de la cobra negra (*Naja melanoleuca*) y sus toxinas (Batina, *et al*, 2000; Ismail, 1995; Houghton y Osibogun, 1993; Martz, 1992; Selvanayagan, *et al*, 1994).

Figura XI.



* **Pterocarpanos fenólicos:** Los compuestos más conocidos en este grupo son las cabenegrinas A-I y A-II (figura XII), aisladas a partir de un remedio contra el veneno de serpiente que se comercializa en Brasil con el nombre de "Específico Pessoa" que consiste del extracto acuoso de una raíz denominada *Cabeça de negro*, pero no pudo ser identificada botánicamente. Ambas resultaron ser capaces de revertir los efectos del veneno de *Bothrops atrox* en perros anestesiados; sin embargo, no son los únicos compuestos pertenecientes a este grupo que presentan esta actividad, pues el edunol (figura XII), aislado de la planta mexicana *Brongniartia podalyrioides* también puede neutralizar la acción del veneno de esa serpiente, en ratones (Houghton y Osibogun, 1993; Reyes-Chilpa, *et al*, 1994; Selvanayagan, *et al*, 1994).

Figura XII.

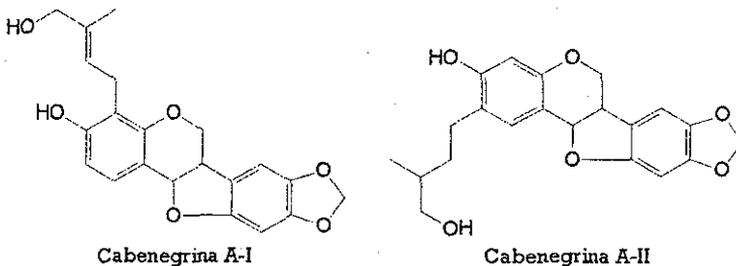
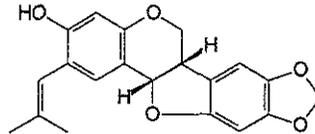


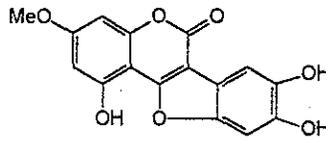
Figura XII. Continuación.



Edunol

* **Cumestanos:** Están relacionados estructuralmente con las cabenegrinas, por lo que no resulta extraño que también posean actividad anticrotálica, como la wedelolactona (figura XIII), además de sus propiedades antimiotóxicas, antihemorrágicas, antiproteolíticas y antifosfolipásicas, de inhibición de la lipooxigenasa, es capaz de neutralizar tres a cuatro DL_{50} del veneno de la serpiente de cascabel sudamericana, así como ofrecer un 40% protección contra el veneno letal del veneno de *Bothrops jararaca*, inhibiendo su efecto miotóxico. Este compuesto se aisló del extracto etanólico-acuoso de la planta *Eclipta prostata* (Mors, et al, 2000; Selvanayagan, et al, 1994).

Figura XIII.

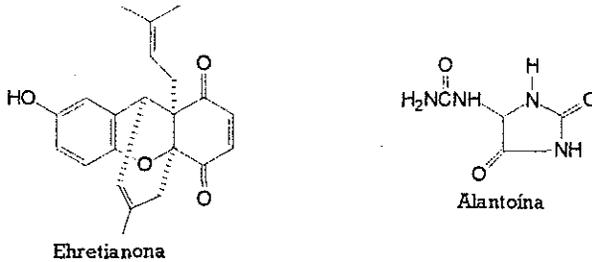


Wedelolactona

* **Péptidos:** Un compuesto responsable de parte de la actividad anticardiotóxica que posee el extracto de *Schumanniphyton magnificum* es un péptido con un peso molecular de unos 6000 daltons; este compuesto demostró poseer mayor actividad en modelos *in vitro* que *in vivo* (Houghton y Osibogun, 1993).

* **Otros:** La ehretianona (figura XIV) es una quinona aislada de la corteza de la raíz de *Ehretia buxifolia*, que posee varias propiedades antiveno: neutraliza *in vitro* la toxicidad del veneno de *Echis carinatus*; protege a ratones cuando se administra después de que se inoculó el veneno y también reduce la mortalidad de los animales de experimentación cuando se administra 30 minutos antes que el veneno. Por su parte, la alantoina ha demostrado poseer actividad contra venenos de varias especies de serpientes que pertenecen al género *Elapidae*, en ensayos *in vivo* (Selvanayagam, et al, 1994 y 1996).

Figura XIV.



1.3.6 Tratamientos tradicionales. En México, gran variedad de plantas son usadas en el tratamiento de las mordeduras de serpiente. De forma análoga que en el caso de las picaduras de alacrán, algunos grupos étnicos sostienen que el ser mordido por una serpiente constituye un castigo en caso de transgredir las normas sociales o religiosas establecidas, cuando el individuo se encuentra poseído por sentimientos negativos o "malos pensamientos en el corazón". Este castigo puede ser enviado por seres sobrenaturales como el *chaneque*, dioses diversos o santos (Mata, *et al*, 1994).

Por ejemplo, los pueblos nahuas y popolucas de Veracruz, piensan que el castigo es enviado por el *chaneque*, quien está encargado de vigilar la conducta de los humanos; para lograrlo, sus serpientes tienen diferentes jerarquías: policías, presidentes y abogados. Los kikapúes consideran que es el dios Kitzihiat el encargado de impartir los castigos, en tanto que para los habitantes de Santa Ana Tlacotenco, Santa Marta, San Bartolo o Nuestra Señora de la Concepción mandan a las víboras (Mata, *et al*, 1994).

Los tratamientos son realizados por los *culebreros* y consisten, en general, de la incisión de los orificios dejados por los colmillos de la víbora, extracción del veneno por medio de ventosas o chupando la herida, aplicar emplastos y/o ingerir cocimientos de diferentes plantas; la tabla IX muestra una relación de algunas de las más usadas. En algunos casos, se pide al paciente que permanezca recluido en un *temazcal* durante tres días. Estos tratamientos no son muy diferentes a los aplicados en otras regiones del mundo (Houghton y Osibogun, 1993; Mata, *et al*, 1994).

Tabla IX. Plantas medicinales usadas en México como anticrotálicos (Aguilar, *et al*, 1994; INAH, 2000; Mata, *et al*, 1994).

Nombre científico	Nombre común	Parte empleada	Lugar de uso
<i>Abelmoschus moschatus</i>	Hierba de la culebra, Semillas de la culebra	Semillas	Misantla, Ver., Cuahapanaloyan, Pue.
<i>Allium sativum</i>	Ajo	Bulbo	Veracruz
<i>Aristolochia asclepiadifolia</i>	Guaco	Raíz	Veracruz
<i>Aristolochia elegans</i>	Guaco	Raíz	Cuernavaca, Mor.
<i>Aristolochia foetida</i>	Cacalayo, guaco	Raíz	Copalillo, Ternalac, Gro.
<i>Aristolochia grandiflora</i>	Flor de pato, guaco grande	Raíz, tallo, hoja	Tabasco, Veracruz, Yucatán
<i>Aristolochia odoratissima</i>	Cocoba, cococoba	Raíz	Colima, Veracruz
<i>Aristolochia ovalifolia</i>	Cachananque de pastor		Guerrero
<i>Aristolochia pentandra</i>	Camotillo, guaco	Toda la planta	Veracruz, Morelos
<i>Aristolochia schippii</i>	Sa'utsai		Veracruz
<i>Asclepias curassavica</i>	Hierba de la culebra	Hojas, flores y semillas	Misantla, Ver.
<i>Bouvardia ternifolia</i>	Trompetilla	Toda la planta	Mecapalapa, Pue.
<i>Chiococca alba</i>	K'anchakche, tiunche	Raíz	Quintana Roo
<i>Cissampelos pareira</i>	Guaco	Raíz	Tenampulco, Pue.
<i>Crotalaria incana</i>	Cascabel hediondo, zoobcoy	Hojas	Reforma, Sn. Mateo del Mar, Oax.
<i>Darstenia contrajerva</i>	Contrahierba		Culiacán, Sin.
<i>Dicliptera peduncularis</i>	Hierba de la víbora	Toda la planta	Linares, N.L.
<i>Heliconia latispatha</i>	Bijagua, platanillo	Raíz	La Providencia, Chis.
<i>Ipomoea stans</i>	Camote	Raíz	Aguascalientes
<i>Manfreda brunea</i>	Guaco	Hojas	Durango
<i>Mikania micrantha</i>	Guaco		Puebla
<i>Randia petenensis</i>	Limón cruceto	Fruto	Coxquihui, Ver.
<i>Stachytarpheta jamaicensis</i>	Cola de armadillo	Toda la planta	
<i>Urechites andrieuxii</i>	Hierba mala, xiu kaan		Tankuché, Camp.

Como ejemplos de la forma en que se emplean las plantas medicinales para curar las mordeduras de víbora se puede mencionar: en Misantla, después de extraer el veneno se administra una copa del macerado en aguardiente preparado con hojas, flores y semillas de la hierba de la culebra (*Asclepias curassavica*) o bien, con semillas de la culebra (*Abelmoschus moschatus*); estas semillas también pueden administrarse directamente; por su parte, los popolucas de Veracruz, administran al paciente un preparado de coyolillo, maíz viejo, raíz de ítamo, rama de capulín y guaco (*Aristolochia* sp.), tostados, molidos y mezclados con agua tibia. En Durango, suelen raspar las hojas de guaco (*Manfreda brunea*) y colocarlas después sobre la lesión, mientras que en el Estado de México, los matlatzincas de Temascaltepec hierven ocote con una moneda de cobre y beben el cocimiento dos o tres veces (Mata, *et al*, 1994).

El tratamiento que se emplea en el estado de Aguascalientes consiste en cubrir la herida con lienzos empapados con el cocimiento del camote (*Ipomoea stans*); por otro lado, en Morelos se coloca grasa hervida de víbora o un pedazo de ajo seco sobre la mordedura o se corta y chupa ésta, después de lo cual, se aplican hojas masticadas de cinco negritos (Mata, *et al*, 1994).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2. DESARROLLO EXPERIMENTAL

2.1 PARTE QUÍMICA

Los puntos de fusión fueron obtenidos en un equipo Fisher-Johns y no están corregidos.

2.1.1 Constantes espectroscópicas. Los espectros en el infrarrojo se determinaron en un espectrofotómetro de FTIR, modelo 1605 Perkin Elmer, en pastillas de KBr.

Los espectros de resonancia magnética protónica fueron obtenidos en un equipo Varian Unity-Inova a 300 MHz; para los de ^{13}C , se empleó el mismo equipo a 75 MHz; en ambos casos se utilizó tetrametilsilano (TMS) como referencia interna.

Los espectros de masas, se determinaron en un aparato Jeol, modelo SX-102A, la muestra se introdujo de manera directa, con una velocidad de calentamiento de $16^\circ\text{C}/\text{min}$ y un voltaje de ionización de 70 eV.

2.1.2 Cromatografía. Las cromatografías en columna (C.C.) se realizaron siguiendo las técnicas convencionales, empleando gel de sílice 70-230 mesh, producida por Merck como fase estacionaria y columnas de vidrio de diferentes capacidades.

Para las cromatografías en capa fina, se emplearon placas de vidrio de 20x20 cm, recubiertas de gel de sílice Merck 60 F₂₅₄, de 0.25 mm de espesor (cromatografía analítica) y de 2.00 mm de espesor (cromatografía preparativa). Los sistemas de elución empleados se enlistan en la tabla X.

Tabla X. Sistemas de elución

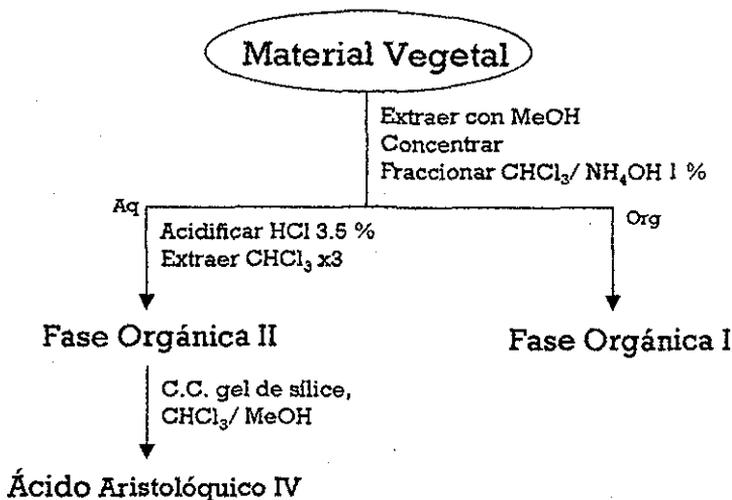
Sistema	Disolventes	Proporción
I	$\text{CHCl}_3\text{-MeOH}$	95:5
II	$\text{CHCl}_3\text{-MeOH}$	8:2
III	$\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-EtOH-benceno}$	95:5:1
IV	$\text{CHCl}_3\text{-MeOH-benceno}$	90:10:1
V	Benceno-acetona-ácido fórmico	100:10:1
VI	$\text{CHCl}_3\text{-EtOH}$	95:5
VII	$\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-MeOH}$	95:5

2.1.3 Material vegetal. Los 1461 g de raíces de *Aristolochia taliscana* con que se trabajó, se colectaron en los alrededores de Jalapa, Veracruz existe un ejemplar de herbario en el Instituto de Ecología ubicado en esta ciudad. Por otro lado, las raíces de *A. foetida* (1125.59 g) fueron colectadas en el estado de Guerrero, por el Dr. Paul Hersch Martínez; una muestra fue depositada en el Herbario Medicinal del IMSS.

Por separado, las raíces se secaron a temperatura ambiente, se molieron en un molino Willey de cuchillas, modelo 4, usando mallas de 1 mm y se maceraron en metanol (MeOH) a temperatura ambiente hasta el agotamiento. Los extractos obtenidos se concentraron al vacío y se pesaron.

2.1.4 Fraccionamiento del extracto de *Aristolochia taliscana*. Se obtuvieron 224.1 g de extracto de esta planta, mismo que se redisolvió en una mezcla de cloroformo (CHCl_3) e hidróxido de amonio (NH_4OH) al 1%, separándose dos fases: la clorofórmica, denominada Fase Orgánica I (FOI) y otra acuosa. Esta última, se acidificó con ácido clorhídrico (HCl) al 3.5% y se extrajo con cuatro porciones de CHCl_3 ; a ésta se denominó Fase Orgánica II (FOII). El método experimental puede verse esquematizado en la figura XV.

Figura XV.

Fraccionamiento del extracto de *Aristolochia taliscana*.

Tanto FOI como FOII se sometieron a cromatografía en capa fina (ccf), que reveló la presencia de compuestos con fluorescencia amarilla y verde, característicos

de los ácidos aristolóquicos y aristolactamas en ambas fracciones. Como revelador se utilizó reactivo de Dragendorff, para detectar la presencia de alcaloides, sin embargo, no se obtuvieron resultados positivos.

Fraccionamiento de la Fase Orgánica II: El residuo obtenido de la FOII, se sometió a cromatografía en columna; para lo cual, se empleó gel de sílice en una proporción de 1:50, usando cloroformo con porciones crecientes de metanol, como fase móvil. Las fracciones obtenidas se cromatografiaron con sistema I (revelando con sol. etanólica de H₂SO₄ 5%), reuniéndose las que resultaron semejantes.

De esta manera, la fracción que corresponde a una proporción de 88:12 CHCl₃/MeOH, reveló mediante ccf (sistema IV x3), la presencia de un compuesto de color anaranjado cuyas características de fluorescencia corresponden con las de los ácidos aristolóquicos. Para aislarlo, utilizaron placas cromatográficas preparativas, usando como fase móvil, el sistema ya mencionado. De esta forma, se separó una banda con un $r_f=0.21$ (9 mg), que todavía se encontraba contaminada, por lo cual se empleó una placa cromatográfica analítica, usando el sistema III (x3), logrando el aislamiento de un 8 mg de un sólido de color rojo, que se identificó como el ácido aristolóquico IV, mediante el análisis de sus propiedades espectroscópicas, mismas que se mencionan a continuación:

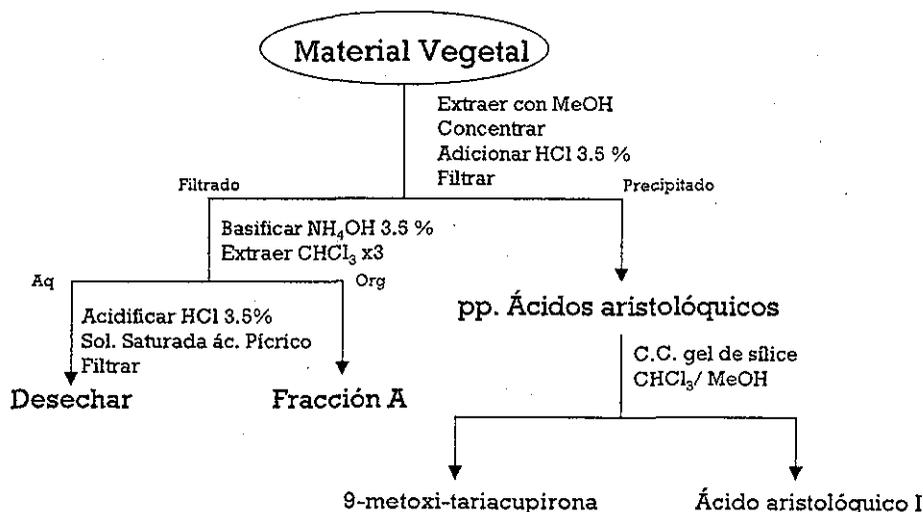
- IR (KBr) ν_{\max} cm⁻¹ (Espectro 1): 3410, que corresponde a COO-H, 2905, C-H de éteres metílicos; 1465, que corresponde a la unión C-C en un anillo aromático; 1518 y 1343, bandas del grupo nitro y 1044 que corresponde a la unión C-O-C.
- RMN¹H (DMSO-d₆) (Espectro 2) δ : 3.92, señal simple que integra para 3H (6-OMe); 4.02, señal simple que integra para 3H (8-OMe); 6.48, señal simple que integra para 2H (O-CH₂-O); 6.83, señal doble que integra para 1H (J= 2Hz; H-7); 7.76, señal simple que integra para 1H (H-2); 8.11, señal doble que integra para 1H (J= 2Hz; H-5), 8.49, señal simple que integra para 1H (H-9).
- IEMS m/z (intensidad relativa) (Espectro 3): 371 [M]⁺ (4), 357 (14), 328 (11), 312 (100), 296 (37), 281 (27), 268 (15), 253 (12), 44 (13).

2.1.5 Fraccionamiento del extracto de *Aristolochia foetida*. Se obtuvieron 155 g de extracto de esta planta, al que se adicionaron 500 mL de HCl al

3.5%, formándose 50 mg de un precipitado fino, mismo que se filtró. El filtrado se llevó a pH básico (9) con NH_4OH al 1% y se extrajo con cuatro porciones de CHCl_3 ; la fase orgánica se denominó Fracción A. El método experimental puede observarse, en forma de esquema, en la figura XVI.

Las fracciones obtenidas, se sometieron a ccf, revelando la presencia de compuestos con fluorescencia amarilla, característica de los ácidos aristolóquicos en el precipitado. Las placas correspondientes a la fracción A revelaron la presencia de un alcaloide, cuando se revelaron con reactivo de Dragendorff.

Figura XVI

Fraccionamiento del extracto de *Aristolochia foetida*.

Fraccionamiento del precipitado: El precipitado obtenido se sometió a cromatografía en columna, empleando gel de sílice en una proporción de 1:50 y cloroformo con porciones crecientes de metanol (hasta alcanzar un 30%), como fase móvil. Las fracciones se reunieron, según los perfiles cromatográficos obtenidos al realizar ccf (sistema II, revelando con una solución al 5% de H_2SO_4 en etanol).

De la fracción que se obtuvo eluyendo únicamente con cloroformo, se formaron espontáneamente cristales en forma de agujas, de color amarillo (20 mg), que se recrystalizaron de cloroformo; este compuesto presenta un punto de fusión de 220-

225°C y se identificó como la 9-metoxi-tariacupirona, mediante el análisis de sus propiedades espectroscópicas, mismas que se mencionan a continuación:

- IR (KBr) v_{\max} cm^{-1} (Espectro 4): 1748, carbonilo de lactona de seis miembros; 1624, corresponde a la unión C-C en un anillo aromático; 1519 y 1349, son bandas del grupo nitro.
- RMN¹³C (CDCl₃) (Espectro 5) δ : 56.13 (9-OMe), 101.24 (C-10), 108.58 (C-4a), 117.59 (C-3), 122.90 (C-6), 123.57 (C-8), 126.71 (C-6a), 127.16 (C-10a), 131.36 (C-7), 139.96 (C-4), 140.27 (C-5), 151.13 (C-10b), 159.01 (C-2), 161.88 (C-9).
- RMN¹H (CDCl₃) (Espectro 6) δ : 4.01, señal simple que integra para 3H (9-OMe); 6.66, señal doble que integra para 1H ($J=10$ Hz; H-3); 7.41, señal doble de dobles que integra para 1H ($J=9, 2.7$ Hz; H-8); 7.82, señal doble que integra para 1H ($J=2.7$ Hz; H-10); 7.93, señal doble que integra para 1H ($J=9$ Hz; H-7); 8.54, señal simple que integra para 1H (H-6) y 8.73, señal doble que integra para 1H ($J=10$ Hz; H-4).
- IEMS m/z (intensidad relativa) (Espectro 7): 271[M]⁺ (100), 255 (2), 243 (21), 225 (33), 213 (26), 197 (82), 182 (27), 170 (10), 154 (22), 142 (9), 126 (51), 114 (7).

A partir de la fracción que corresponde al sistema CHCl₃/MeOH 8:2, se obtuvieron por recristalización 11.1 mg de agujas amarillas con un punto de fusión de 285-286°C, que se identificó como el ácido aristolóquico I, mediante el análisis de sus propiedades espectroscópicas, mismas que se mencionan a continuación:

- IR (KBr) v_{\max} cm^{-1} (Espectro 8): 3431.18, que corresponde a COO-H; 2919.40, C-H de éteres metílicos; 2919.40, C-H de éteres metílicos; 1715.05, carbonilo de ácido en compuesto aromático; 1593.49, que corresponde a la unión C-C en un anillo aromático; 1520.82 y 1342.46, bandas del grupo nitro y 1269.36 que corresponde a la unión C-O-C.
- RMN¹H (DMSO-*d*₆) (Espectro 9) δ : 4.05, señal simple que integra para 3H (8-OMe); 6.49, señal simple que integra para 2H (O-CH₂-O); 7.36 señal doble que integra para 1H ($J=8.4$ Hz; H-7); 7.81, señal simple que integra para 1H (H-2); 7.86, señal triple que integra para 1H ($J=8.4$ Hz; H-6); 8.58,

señal simple, que integra para 1H (H-9) y 8.67 señal doble que integra para 1H (J= 8.4 Hz; H-5).

- IEMS m/z (intensidad relativa) (Espectro 10): 341 [M]⁺ (28), 325 (9), 295 (100), 293 (43), 278 (34).

2.2 PARTE BIOLÓGICA

Los extractos y fracciones obtenidas como se indica en la parte química, se probaron para demostrar su actividad como antídotos contra el veneno de alacrán (*Centruroides spp.*), serpiente de cascabel (*Crotalus durissus*) y nauyaca (*Bothrops asper*).

2.2.1 Animales. Para la evaluación de la eficacia antiveneno y la determinación de la DL₅₀ de los extractos, se utilizaron ratones macho cepa CFW de un peso de entre 18 y 25 g, con al menos una semana de adaptación a las condiciones de laboratorio; mientras que en los ensayos *in vitro* sobre nervio frénico, se emplearon ratas macho y hembra, cepa Wistar, con un peso de entre 250 y 300 g.

En general, los animales empleados se mantuvieron en cajas de acrílico transparentes, con libre acceso al agua y alimento (Purina Rat Chow).

2.2.2 Determinación de la dosis letal media (DL₅₀) de los extractos.

Se determinó la dosis letal media (DL₅₀) aguda de los extractos, de acuerdo con la metodología propuesta por Lorke (1983). La prueba se lleva a cabo en dos partes, en la primera, se determina el rango aproximado en que se ubica la DL₅₀; para ello, se administran, por la vía elegida, dosis de 10, 100 y 1000 mg/Kg del compuesto en grupos de 3 ratones. En la segunda etapa, una vez determinado el rango para la DL₅₀, de acuerdo al número de animales que murieron en la primera parte de la prueba (tabla XI), se prueban 3 o 4 dosis (un ratón por dosis) dentro de este rango, para obtener el valor de la DL₅₀, el cual corresponde a la media geométrica entre el par de dosis para las cuales el ratón no muere y sí muere, respectivamente. En ambos casos, las observaciones se llevan a cabo durante 48 hr.

Tabla XI. Dosis que se prueban en la 2ª parte de la prueba (Lorke, 1983).

Animales que murieron en la 1ª etapa			Dosis a probar			
10 mg/Kg	100 mg/Kg	1000 mg/Kg	(mg/ Kg)			
0/3	0/3	0/3		1600	2900	5000
0/3	0/3	1/3	600	1000	1600	2900
0/3	0/3	2/3	200	400	800	1600
0/3	0/3	3/3	140	225	370	600
0/3	1/3	3/3	50	100	200	400
0/3	2/3	3/3	20	40	80	160
0/3	3/3	3/3	15	25	40	60
1/3	3/3	3/3	5	10	20	40
2/3	3/3	3/3	2	4	8	16
3/3	3/3	3/3	1	2	4	8

Para administrar los extractos metanólicos de *Aristolochia taliscana* y *A. foetida*, se prepararon soluciones stock acuosas, con concentración de 5 mg/ mL y, para mejorar su solubilidad, se emplearon 5 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) como cosolvente, considerando que la DL₅₀ de este disolvente en ratones es de 12.9 mL/ Kg. Las soluciones se administraron por vía intraperitoneal (Farnsworth, 1982).

Al concluir la primera fase del experimento, ninguno de los ratones había muerto, por lo que de acuerdo con la tabla XI, se probaron las dosis de 1600, 2900 y 5000 mg/Kg de cada extracto, con los resultados obtenidos (tabla XII), se determinó que la DL₅₀ del extracto de *A. taliscana* es superior a los 5000 mg/Kg, en tanto que la de *A. foetida*, es de 3800 mg/Kg.

Tabla XII. Resultados de la determinación de la DL₅₀ de los extractos.

<i>Aristolochia taliscana</i>		<i>Aristolochia foetida</i>	
Dosis (mg/Kg)	Sobrevivientes/ administrados	Dosis (mg/Kg)	Sobrevivientes/ administrados
1600	1/1	1600	1/1
2900	1/1	2900	1/1
5000	1/1	5000	0/1

2.2.3 Venenos. Los venenos empleados fueron suministrados por Laboratorios Bioclón, la información referente a la toxicidad y al lote del que provienen los mismos que proporcionó dicho laboratorio, puede observarse en la tabla XIII. Con el fin de comprobar que los venenos poseen la misma letalidad que la reportada, se realizó una prueba confirmatoria, para ello, se procedió como en el punto 2.2.2, administrando, por vía intraperitoneal, diluciones del veneno preparadas en solución salina isotónica.

Los resultados obtenidos con dicha prueba también aparecen en la tabla XIII. Los venenos se conservaron a -4°C hasta que se emplearon en los ensayos.

Tabla XIII. DL_{50} de los venenos.

Veneno	Lote	DL_{50} reportada (mg/Kg)	DL_{50} determinada (mg/Kg)
Alacrán	B5K01	5.36	5.66
<i>Bothrops asper</i>	B6G14	1.09	1.41
<i>Crotalus durissus</i>	B5M05	2.51	2.83

2.2.4 Pruebas de eficacia antiveneno. Para evaluar la actividad alexitere de los extractos, se siguió la metodología propuesta por Mors *et al* (1989). Se formaron cinco grupos con seis ratones. A cada grupo, se les administró, vía intraperitoneal (0.1 mL por cada 10 g de peso), una mezcla preparada con 1 mL de la dilución del extracto a la dosis correspondiente (tablas XIV y XV) y 1 mL de una solución equivalente a 2 DL_{50} de veneno de alacrán, dicha mezcla se incubó previamente durante 10 minutos, a 37°C . Los ratones así tratados, se mantuvieron en observación durante 48 horas.

A los seis animales que conformaron el grupo control, se les administró también por la vía intraperitoneal (0.1 mL por cada 10 g de peso), una mezcla preparada con 1 mL de solución salina isotónica y una solución equivalente a 2 DL_{50} del veneno; al igual que en los grupos de prueba, la mezcla se había incubado durante 10 minutos a 37°C .

Tabla XIV. Dosis del extracto MeOH de *Aristolochia taliscana* empleadas en la prueba *in vivo*.

Para veneno de Alacrán (mg/Kg)	Para veneno de <i>Bothrops asper</i> (mg/Kg)	Para veneno de <i>Crotalus durissus</i> (mg/Kg)
0.50	250	0.025
1.00	500	0.050
2.50	1750	0.100
5.00	2500	0.250
10.00	3000	0.500

La evaluación de la capacidad de los extractos para neutralizar los venenos de *Crotalus durissus* y *Bothrops asper*, se llevó a cabo de manera similar a la descrita para el veneno de *Centruroides spp.*, administrando 2 DL_{50} del veneno correspondiente, y las dosis de extracto que se indican en las tablas XVI y XV.

Tabla XV. Dosis del extracto MeOH de *Aristolochia foetida* empleadas en la prueba *in vivo*.

Para veneno de Alacrán (mg/Kg)	Para veneno de <i>Bothrops asper</i> (mg/Kg)	Para veneno de <i>Crotalus durissus</i> (mg/Kg)
250	250	0.005
500	500	0.010
1750	1750	0.025
2500	2500	0.050
3000	3000	0.100

NOTA: Para seleccionar los rangos de dosis en los ensayos, se llevó a cabo una prueba preliminar que, de manera general, se describe a continuación: se formaron 3 grupos con 3 ratones cada uno; a los miembros del primer grupo, se les administró, vía intraperitoneal (0.1 mL por cada 10 g de peso), una mezcla, en proporción 1:1 del extracto a una dosis de 1000 mg/Kg y 2 DL₅₀ del veneno correspondiente; esta mezcla se incubó previamente durante 10 minutos, a 37°C. Los grupos restantes recibieron un tratamiento similar, con la única variante de que al segundo grupo se le administró una dosis de extracto de 100 mg/Kg, mientras que la dosis que recibió el tercer grupo fue de 10 mg/Kg. Los ratones así tratados, se mantuvieron en observación durante 48 horas.

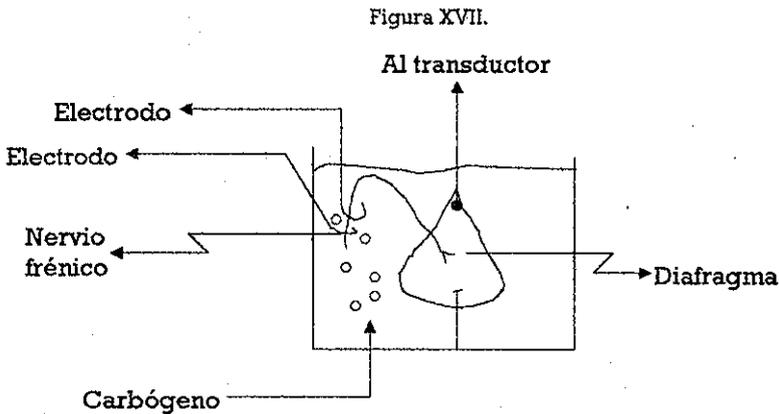
2.2.4 Ensayos de actividad neuromuscular. Para llevar a cabo esta prueba, se empleó la preparación de nervio frénico-hemidiafragma, cuya preparación y montaje se realizó como se describe a continuación (Perry, 1970).

La rata se sacrificó por decapitación y se dejó sangrar lo más posible, para después colocarla en posición supina sobre la mesa de trabajo. Se abrió el pecho cortando las costillas a lo largo del esternón, para localizar tanto el nervio frénico (ubicado entre los pulmones y el corazón), como el diafragma. Así, se cortó un segmento de este músculo, con forma de abanico y el nervio unido a él se separó de la membrana que lo rodea y se cortó hasta el timo.

A la base del músculo se ató un hilo de algodón, para fijarlo al fondo de una cámara para tejido aislado, en tanto que en el extremo opuesto del nervio, se colocó otro hilo, mismo que fue conectado al transductor de fuerza (Grass, modelo TSD 105A) de un equipo BIOPAC sistema MP100. La preparación se suspendió en el interior de la cámara y se llenó con 20 mL de solución Ringer (composición en mM: NaCl, 120; KCl, 4.6; KH₂PO₄, 1.2; MgSO₄, 1.2; NaHCO₃, 20; Glucosa, 11 y CaCl₂, 1.5) a 37°C ± 1°C y se

burbujeó carbógeno (5% CO₂ y 95% O₂) aplicando una presión suave. En la figura XVII, se muestra un esquema de la preparación.

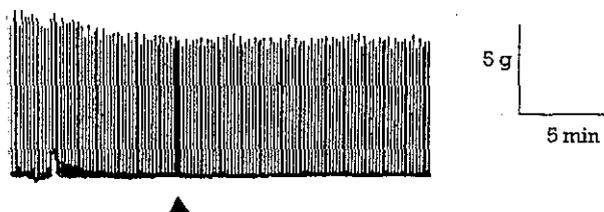
La tensión que soportó el músculo se ajustó a 2 gramos, mientras que el nervio se hizo pasar a través del aro formado por dos electrodos de plata y se estimuló con un pulso de onda cuadrada de 0.2 milisegundos de duración, a una frecuencia de 0.1 Hz, con un voltaje supramáximo, usando un estimulador marca Grass, modelo S88, con una unidad de aislamiento Grass PSIU 6. Bajo estas condiciones, se estabilizó el tejido durante media hora.



Montaje de la preparación. El tejido se sujeta a una argolla ubicada en la base de la cámara, por medio de un hilo; en su otro extremo, el hilo se amarra al transductor del equipo. El nervio se hace pasar a través del aro que forma el electrodo de plata y se estimula con un pulso de onda cuadrada de 0.2 milisegundos de duración, a una frecuencia de 0.1 Hz, con voltaje supramáximo. La cámara está llena de solución ringer a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, a la que se le burbujea carbógeno con una presión suave.

Las soluciones de los compuestos evaluados se prepararon empleando agua destilada y 0.25 μL de DMSO como cosolvente ya que se comprobó que la adición de esta cantidad de disolvente no afecta la actividad del tejido (figura XVIII).

Figura XVIII.



Actividad de la preparación de nervio frénico-hemidiafragma, tras la adición de 0.25 μ L de DMSO.

Una vez estabilizada la preparación, se procedió a realizar los ensayos de la siguiente manera:

- a) Con el fin de evaluar el efecto que produce la adición del extracto metanólico de *A. taliscana* sobre el tejido, se adicionaron a la preparación 50 μ g/mL de éste, registrando la actividad durante 45 minutos. Este ensayo se repitió tres veces. La actividad producida por la adición del extracto metanólico de *A. taliscana* sobre el tejido, se determinó midiendo la intensidad de las contracciones musculares antes y después de la adición de éste. Para determinar si existe diferencia entre las respuestas producidas antes y después de la adición del extracto, se aplicó la prueba de *t*-Student para datos pareados, con una $\alpha = 0.05$.
- b) Con el fin de evaluar el efecto que produce la adición de la fase orgánica I (FOI) sobre el tejido, se adicionaron a la preparación 20 μ g/mL de ésta, registrando la actividad durante 45 minutos. Este ensayo se repitió tres veces. La actividad producida por la adición de la FOI sobre el tejido, se determinó midiendo la intensidad de las contracciones musculares antes y después de la adición de ésta. Para determinar si existe diferencia entre las respuestas producidas antes y después de la adición de la FOI, se aplicó la prueba de *t*-Student para datos pareados, con una $\alpha = 0.05$.
- c) Para determinar el efecto del veneno de *Centruroides spp.* sobre el tejido, se adicionaron al tejido 50 μ g de dicho veneno, en solución salina isotónica, registrando la actividad durante 45 minutos. Este ensayo se repitió tres veces.
- d) En el ensayo de actividad antineurotóxica, se adicionó al tejido una mezcla de una de las sustancias de prueba (tabla XVI) y 50 μ g del veneno de *Centruroides*

spp., registrando la actividad durante 45 minutos. Este ensayo se repitió tres veces. La actividad antineurotóxica se determinó midiendo el tiempo en que se produce el bloqueo total de las contracciones musculares (Houghton y Harvey, 1989).

Con el fin de determinar si existen diferencias entre las respuestas producidas por el veneno de *Centruroides spp.* (inciso c) y los compuestos bajo estudio (inciso d), se aplicó la prueba de *t*-Student, con una $\alpha = 0.05$.

Tabla XVI. Concentraciones empleadas en la prueba de neurotoxicidad.

Sustancia de prueba	Concentración ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
Extracto metanólico de <i>A. taliscana</i>	50
Fase Orgánica I	20

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 PARTE QUÍMICA.

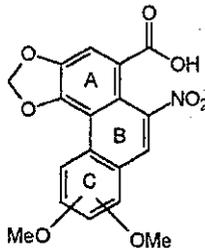
3.1.1 Componentes de *Aristolochia taliscana*.

3.1.1.1 Caracterización del ácido aristolóquico IV. Como se puede observar en los espectros de masas (espectro 3) y de RMN¹H (espectro 2) obtenidos, este compuesto, se encuentra contaminado, probablemente por otro ácido aristolóquico, sin embargo, con base en los antecedentes fitoquímicos de la especie estudiada, se presenta la siguiente elucidación estructural.

En el espectro de masas generado por este compuesto (espectro 3), se observa que el ión molecular (m/z 371), presenta una pérdida de $[M^+ - 46]$, consistente con un grupo nitro; la presencia de este grupo se confirma con las bandas de absorción a 1518 y 1343 cm^{-1} , en el espectro de infrarrojo (espectro 1). A δ_H 3.92, 4.02 y 6.48 se observan tres señales simples que pueden interpretarse como dos grupos metoxilos y un grupo metilendioxi, respectivamente. Todas estas señales son características de los ácidos aristolóquicos (Chen y Zhu, 1987; De Pascual, *et al*, 1983; Eckhardt, 1983; Mix, *et al*, 1982; Priestap, 1986).

El ión molecular del compuesto en cuestión, corresponde a una fórmula molecular $\text{C}_{19}\text{H}_{13}\text{NO}_8$, que es congruente con un ácido aristolóquico que presenta dos metoxilos en el anillo C (figura XIX).

Figura XIX.



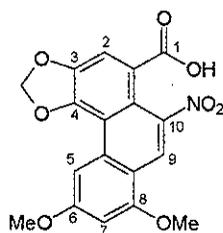
En la región aromática del espectro 2 aparecen dos señales simples: δ_H 7.76 y 8.49; considerando la estructura fenantrénica del compuesto (figura XIX), estas señales pueden ser asignadas a los protones de los anillos A y B, lógicamente, el protón más desplazado será el que se encuentra bajo la influencia del grupo más electroatractor, o

sea, el nitro, que se localiza en el anillo B, mientras que el que se ubica en un campo más alto, será el del anillo A, por el efecto protector del grupo metilendioxi.

Finalmente, en la región aromática del mismo espectro pueden observarse dos señales dobles, asignables a los dos protones del anillo C (figura XIX) y que presentan una constante de acoplamiento de 2 Hz, indicando que los protones se encuentran en posición meta, por lo tanto, los metoxilos se encuentran alternados, ya sea en las posiciones 5 y 7 ó 6 y 8.

Para determinar las posiciones de los metoxilos, se tiene como señal diagnóstica la que aparece en δ_H 8.11 ppm, congruente con la posición 5 de los compuestos aporfínicos; así, los metoxilos se encuentran en las posiciones 6 y 8, como se muestra en la figura XX.

Figura XX.



Ácido aristolóquico IV

El aristolóquico IV, constituye el primer ácido aristolóquico reportado en *Aristolochia taliscana*; sin embargo, este compuesto ha sido descrito previamente como componente de las raíces de *A. argentina*, de esta forma, en la tabla XV, pueden compararse las constantes espectroscópicas reportadas, con las obtenidas en el presente trabajo (Priestap, 1987).

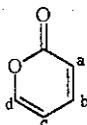
Tabla XV. Comparación de los desplazamientos químicos de los protones del Ácido aristolóquico IV observados y los reportados (Priestap, 1987).

Protón	δ observado (ppm)	δ reportado (ppm)
H-2	7.76	7.75
H-5	8.11	8.13
H-7	6.85	6.87
H-9	8.49	8.42
CH ₂ O ₂	6.48	6.43
6-OMe	3.92	3.94
8-OMe	4.02	4.03

3.1.2 Componentes de *Aristolochia foetida*.

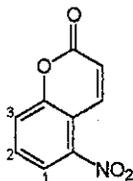
3.1.2.1 Caracterización de la 9-metoxi-tariacupirona. El espectro de masas de este compuesto (espectro 7), presenta un ión molecular de m/z 271, correspondiente a una fórmula condensada de $C_{14}H_9NO_5$ y que también es el pico base. Entre este pico y el que le sigue en abundancia (m/z 197), existe una pérdida de $[M^+ - 74]$, que sugiere la pérdida de un grupo nitro y un carbonilo; la presencia de estos grupos se confirma al examinar el espectro en el infrarrojo (espectro 4), con las bandas de absorción a 1748 (carbonilo), 1519 y 1349 cm^{-1} , del nitro. La naturaleza del carbonilo queda definida al observar la señal en δ_C 159.01 ppm en el espectro de RMN¹³C (espectro 5), que corresponde a una lactona conjugada, como se muestra en la figura XXI (Pretsch, *et al*, 1989).

Figura XXI.



A partir de la señal que aparece en δ_H 4.01 ppm del espectro de RMN¹H (espectro 6), se puede deducir la existencia de un metoxilo. También se observa una señal doble centrada en δ_H 6.66 ppm, con una constante de acoplamiento de 10 Hz, lo que corresponde a una doble ligadura, por su posición, se puede inferir que corresponde al protón a de la figura XXI. Esta señal se encuentra acoplada con la señal doble centrada en δ_H 8.73 ppm, mas no se observan otros acoplamientos con los protones c y d, lo que implica que éstos se encuentran sustituidos, considerando que en el espectro de RMN¹³C sólo se observan señales de carbonos aromáticos, estos protones han sido sustituidos por un grupo de este tipo. La señal en δ_H 8.73 ppm se encuentra desplazada a campo mucho más bajo del que cabría esperar, debido a la vecindad con el grupo nitro, quedando la estructura parcial que se muestra en la figura XXII (Pretsch, *et al*, 1989).

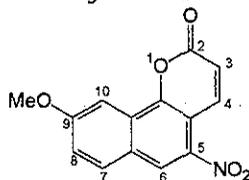
Figura XXII.



Por otro lado, en la región de protones aromáticos, se observan las siguientes señales: δ_H 7.41 doble de dobles ($J = 9, 2.7$ Hz); 7.82 doble ($J = 2.7$ Hz) y 7.93 doble ($J = 9$ Hz) congruentes con un benceno 1,2,4-trisustituído, en el que la posición 4 está ocupada por un metoxilo, tal y como lo sugiere la señal que aparece en δ_H 4.01 ppm. Este anillo se encuentra fusionado con la cumarina que se muestra en la figura XXII. Para determinar el sitio de la fusión, se considera el desplazamiento de la señal en δ_H 8.54 ppm, que indica que se encuentra en posición orto al grupo nitro, por lo que la fusión de los anillos ocurre entre los carbonos 2 y 3, de tal manera que la estructura de este compuesto queda como se muestra en la figura XXIII (Pretsch, *et al*, 1989).

La de 9-metoxi-tariacupirona ya había sido aislada con anterioridad, por lo que en las tablas XVIII y XIX pueden observarse las constantes espectroscópicas que se han reportado para este compuesto (Achenbach, *et al*, 1992).

Figura XXIII.



9-metoxi-tariacupirona

El hecho de que la 9-metoxi-tariacupirona se ha encontrado en otra aristoloquia, *A. brevipes*, planta endémica de los estados de Michoacán y Colima, resulta muy interesante, ya que por la distribución de ambas plantas, es posible pensar que este compuesto es un marcador químico de las aristoloquias que crecen en los estados de Michoacán y Colima, pues la producción de metabolitos secundarios está regulada por factores como el clima y la ubicación geográfica en la que las plantas crecen.

Tabla XVIII. Comparación de los desplazamientos químicos de los protones de la 9-metoxi-tariacupirona observados y los reportados (Achenbach, 1992).

Protón	δ observado (ppm)	δ reportado (ppm)
H-3	6.66	6.68
H-4	8.73	8.74
H-6	8.54	8.55
H-7	7.93	7.94
H-8	7.41	7.42
H-10	7.82	7.84
9-OMe	4.01	4.05

También resulta interesante que la 9-metoxi-tariacupirona sea un compuesto nitrado, ya que este tipo de sustancias son raras en la naturaleza, además de que este grupo les confiere a los compuestos que lo presentan, una actividad biológica notable, como en el caso del cloranfenicol y la azomicina (aislados de actinomicetos del género *Streptomyces*), que son antibióticos contra un amplio espectro de microorganismos, la miserotoxina (aislada del *Astragalus miser*), responsable de intoxicaciones del ganado vacuno y otros rumiantes o el propio ácido aristolóquico I (figura X), que no sólo es capaz de inactivar la los venenos de varias especies de cobras, sino también, resulta citotóxico contra células de leucemia linfocítica P-388 y NSCLN6 (carcinoma epidermoide bronquial de origen humano), es antibacteriano, produce contracción del útero aislado de ratas preñadas, estimula el íleon de cobayo, así como la fagocitosis de leucocitos (Carreras, 1973; El Tahir, 1991).

Tabla XIX. Comparación de los desplazamientos químicos de los carbonos de la 9-metoxi-tariacupirona observados y los reportados (Achenbach, et al, 1992).

Carbono	δ observado (ppm)	δ reportado (ppm)
C-2	159.01	159.03
C-3	117.59	117.62
C-4	139.96	139.99
C-4a	108.58	108.63
C-5	140.27	140.34
C-6	122.90	122.92
C-6a	126.71	126.76
C-7	131.36	131.39
C-8	123.57	123.60
C-9	161.88	161.92
C-10	101.24	101.31
C-10a	127.16	127.21
C-10b	151.13	151.20
9-OMe	56.13	56.14

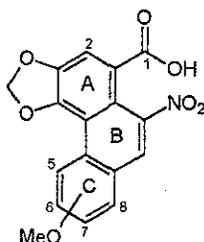
3.1.2.2 Caracterización del ácido aristolóquico I. Este compuesto también presenta señales características de los ácidos aristolóquicos, a saber: una pérdida de $[M^+ -46]$ entre el ión molecular (m/z 341) y el pico base (m/z 295), correspondiente a un grupo nitro, en el espectro de masas (espectro 10); la presencia del nitro se confirma con las bandas de absorción 1521 y 1343 cm^{-1} , del espectro en el infrarrojo (espectro 8), además de la señal de carbonilo de ácido en 1715 cm^{-1} , que se observa en el mismo espectro; así como de un par de señales simples en el espectro 9: una que aparece en δ_H 4.05 ppm y que puede interpretarse como un grupo metoxilo y

la otra, en δ_H 6.49 ppm y que puede asignarse a un grupo metilendioxi (Chen y Zhu, 1987; De Pascual, et al, 1983; Eckhardt, G.; Mix, et al, 1982; Priestap, 1986).

Cabe hacer mención que en el espectro en el infrarrojo del ácido aristolóquico IV (espectro 1) no se aprecia la señal del grupo carbonilo, debido a la presencia de una banda ancha en 1561 cm^{-1} , que parece contener varias señales más, entre ellas, muy posiblemente la del carbonilo de ácido.

El ión molecular de este compuesto, presenta una relación de masa carga (m/z) de 341, que corresponde a una fórmula molecular de $C_{17}H_{11}NO_7$, esto significa que se trata de un ácido aristolóquico con un solo metoxilo en el anillo C (figura XXIV).

Figura XXIV.

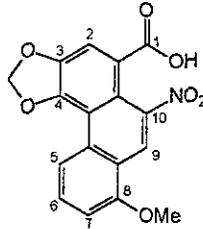


La determinación de la posición del metoxilo depende del análisis de la región aromática del espectro de RMN^1H , en la que se observan dos señales simples, una señal triple y dos señales dobles. Las dos señales simples pueden asignarse a los protones de los anillos A y B, considerando que el compuesto presenta una estructura fenantrénica. Una de las señales simples aparece en δ_H 8.58 ppm, en tanto que la otra se encuentra a un campo mucho más alto, δ_H 7.81 ppm, lógicamente, el protón más desplazado a bajo campo será el que se encuentra bajo la influencia del grupo más electroattractor, o sea, el nitro, que se localiza en el anillo B, mientras que el que se ubica en un campo más bajo, será el del anillo A, por el efecto protector del grupo metilendioxi.

La señal triple centrada en δ_H 7.86 ppm presenta una constante de acoplamiento de 8.4 Hz, lo que indica que los dos protones que interactúan con éste se encuentran en posición orto, por tanto, el metoxilo puede localizarse en posición cinco u ocho (figura XXVI); para determinarlo, es necesario tomar en cuenta el desplazamiento de las señales dobles: una a 7.36 ppm y la otra a 8.67 ppm, esta última, aparece a un campo muy bajo, congruente con la posición 5 de los compuestos aporfínicos, ya que

los protones localizados en posición 8, normalmente aparecerían entre 7.8 y 8.1 ppm (Chen y Zhu, 1987; Mix, et al, 1982; Priestap, 1986). De esta manera, la estructura del compuesto B queda definida como el ácido aristolóquico I (Mix, et al, 1982), cuya estructura se muestra a continuación:

Figura XXV.



Ácido aristolóquico I

3.2 PARTE BIOLÓGICA

3.2.1 Determinación de la toxicidad de extractos y venenos. El cálculo de las DL_{50} de los extractos no sólo permite determinar el rango de dosis que resulta seguro manejar en la prueba *in vivo* para confirmar las propiedades antiveneno de éstos, sino también proporciona información sobre los efectos producidos durante una intoxicación aguda con estas plantas.

De acuerdo con los resultados obtenidos con la prueba aplicada, el valor de la DL_{50} del extracto de *Aristolochia taliscana* es superior a los 5000 mg/Kg, lo que indica que éste es muy poco tóxico al ser administrado por la vía intraperitoneal, esto mismo puede decirse del extracto de *A. foetida*, pues su DL_{50} resultó ser de 3800 mg/Kg; adicionalmente, no se observaron efectos tóxicos en ninguno de los dos grupos de animales tratados, ya que su comportamiento tras la inyección no sufrió alteraciones, a excepción del ratón al que se administró la dosis de 5000 mg/Kg de extracto de *A. foetida*, que murió dentro de los primeros cinco minutos del periodo de observación y presentaba un leve sangrado en el sitio de la inyección.

Sin embargo, no hay que perder de vista, que estos resultados corresponden a un modelo de toxicidad aguda, congruente con la utilización terapéutica de las plantas, ya que en su calidad de antivenenos, se administran durante un periodo de dos a tres días, después de ocurrido el accidente, con la recomendación de que no se empleen durante mucho tiempo, lo cual sugiere que la administración crónica de estas plantas puede resultar tóxica (INAH, 2000; Martínez, 1944).

Respecto de los venenos, la determinación de las DL₅₀ además de confirmar el título reportado por el proveedor, permitió observar los efectos tóxicos que producen éstos en los animales de experimentación (tabla XX).

Tabla XX. Efectos tóxicos de los venenos
(% de animales que presentaron el efecto).

<i>Centruroides spp.</i>	<i>Crotalus durissus</i>	<i>Bothrops asper</i>
<ul style="list-style-type: none"> ☞ Letargia, falta de apetito (100%). ☞ Hemorragia nasal (17%). ☞ Sangre en lágrimas (25%). ☞ Disminución de la actividad motriz sin llegar a presentarse parálisis (83%). ☞ Hipersecreción de saliva (17%). ☞ Tres a cuatro ataques convulsivos (83%). ☞ Dificultad respiratoria: los flancos del animal se hundían levemente al inspirar (92%). ☞ La muerte sobreviene por un ataque convulsivo (83%). 	<ul style="list-style-type: none"> ☞ Letargia, falta de apetito (92%). ☞ Parálisis del tren trasero (67%). ☞ Respiración agitada (100%). ☞ Hipersensibilidad al tacto: cuando los animales se tocaban entre ellos o se rozaban con la caja, presentaban leves ataques convulsivos (75%). ☞ Muerte por parálisis respiratoria (83%). 	<ul style="list-style-type: none"> ☞ Letargia, falta de apetito (100%). ☞ Parálisis de una o ambas patas traseras (75%). ☞ Dificultad respiratoria intensa: los flancos del animal se hundían cuando respira y lo hace abriendo el hocico (83%). ☞ Los ratones administrados con dosis subletales del veneno, presentan necrosis en el sitio de inyección aproximadamente cuatro horas después de ésta (17%). ☞ Muerte por parálisis respiratoria (83%).

3.2.2 Efecto de los extractos sobre la toxicidad del veneno de *Centruroides spp.* De acuerdo con los resultados anotados en la tabla XXI, se observa que la administración de una dosis de 10 mg/Kg de extracto metanólico de *Aristolochia taliscana* es capaz de contrarrestar completamente (100% de sobrevivencia) la toxicidad esperada de 2 DL₅₀ de veneno de alacrán. Considerando la metodología empleada, esto es, la administración de una mezcla del extracto y el veneno que se han incubado a 37°C, es posible afirmar que una dosis de 10 mg/Kg del extracto, puede inactivar algunos o todos los componentes tóxicos del veneno.

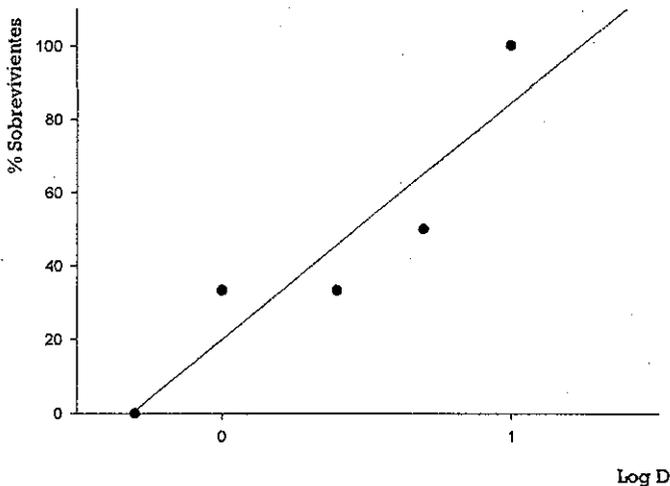
Mediante análisis PROBIT de los datos (tabla XXI), se puede determinar que la dosis efectiva media (DE₅₀) del extracto metanólico de *A. taliscana* contra la intoxicación producida por el veneno de alacrán es de 1.569 ± 0.942 mg/Kg.

Tabla XXI. Actividad alexitere del extracto metanólico de *Aristolochia taliscana*.

Dosis (mg/Kg)	Animales sobrevivientes/ animales administrados	% Sobrevivientes
0.0	0/6	0
0.5	0/6	0
1.0	2/6	33.33
2.5	2/6	33.33
5.0	3/6	50.00
10.0	6/6	100.00

Los animales que no murieron y aún los que murieron, no presentaron todos los efectos tóxicos del veneno, en tanto que los del grupo control si; entre los efectos que aparecieron puede mencionarse la letargia, con una duración aproximada de cuatro horas. Los ratones que murieron presentaron uno a dos ataques convulsivos; a excepción del ataque que provocó la muerte, los que se presentaron fueron más leves, pues duraron menos tiempo y las convulsiones fueron de menor intensidad.

Figura XXVI.



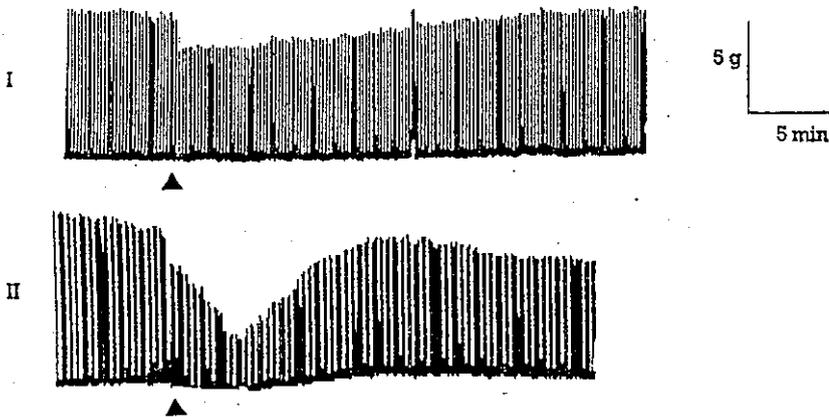
Inhibición del efecto letal del veneno de alacrán por el extracto metanólico de *Aristolochia taliscana* ($r^2 = 0.920$).

De acuerdo con la tabla XX, los principales efectos tóxicos del veneno de alacrán se producen a nivel del sistema nervioso, por tanto, para determinar si el efecto protector que ejerce el extracto metanólico de *A. taliscana* puede atribuirse a

una actividad antineurotóxica, se llevaron a cabo ensayos *in vitro*, en preparaciones de nervio frénico-hemidiafragma de rata.

Cuando se adiciona una concentración de 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de fase orgánica I a la preparación, la intensidad de la contracción muscular sufre una disminución transitoria estadísticamente significativa ($\alpha = 0.05$), mientras que la adición del extracto metanólico de *A. taliscana*, no produce cambios significativos sobre la intensidad de la contracción (figura XXVII).

Figura XXVII.



Efectos que sobre el nervio frénico-hemidiafragma estimulado con un pulso de onda cuadrada de 0.2 milisegundos de duración, a una frecuencia de 0.1 Hz, con un voltaje supramáximo, producen: I. el extracto metanólico de *A. taliscana* (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y II. Fase orgánica I (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

Como puede observarse en la figura XXVIII, la adición de 50 μg de veneno a la preparación produce bloqueo neuromuscular total aproximadamente 20 minutos después de la adición de éste (tabla XXII). Este efecto es consistente con el mecanismo de acción propuesto para el veneno de alacrán, ya que es un agente despolarizante de las membranas postsinápticas cuyo efecto prolongado lleva al bloqueo de la transmisión neuromuscular y produce parálisis flácida (Hutt y Houghton, 1998; Inisan, *et al*, 1995; Korolkovas, 1989; Osnaya-Romero, *et al*, 2001; Taylor, 1996).

Tabla XXII. Actividad antineurotóxica de los componentes del extracto metanólico de *A. taliscana*.

Sustancia de prueba	Tiempo en que se produjo el bloqueo neuromuscular total \pm S.D. (min)	n
Veneno de <i>Centruroides spp.</i>	20.55 \pm 0.654	3
Extracto metanólico de <i>A. taliscana</i>	28.15 \pm 1.861	3
Fase orgánica I	48.58 \pm 2.257	3

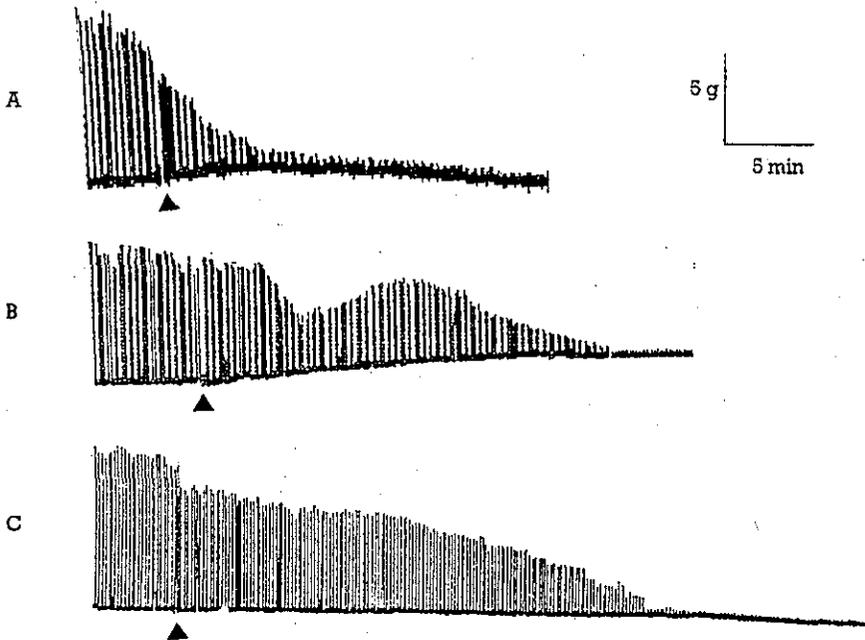
Tanto el extracto metanólico de *A. taliscana*, como la fase orgánica I poseen un efecto protector contra el veneno de alacrán, ya que ambas sustancias prolongaron significativamente ($\alpha=0.05$) el tiempo en el que se produce el efecto tóxico máximo (tabla XXII, figura XXVIII); de hecho, en el caso de la fase orgánica I el bloqueo total de las contracciones musculares se produce en el doble de tiempo que cuando se actúa únicamente el veneno.

Por otro lado, considerando que la adición de extracto no provoca cambios sobre la actividad contráctil de la preparación (figura XVII), pero sí posee actividad antineurotóxica, se puede suponer que este efecto se debe a la interacción de los componentes del extracto con alguna o algunas de las toxinas presentes en el veneno.

Tomando en consideración que en la prueba *in vivo* se observó que el extracto es capaz de contrarrestar completamente la letalidad del veneno, cabría esperar que las sustancias probadas pudieran evitar el bloqueo neuromuscular total producido por el veneno; sin embargo, ninguna de las sustancias fue capaz de revertir totalmente el bloqueo neuromuscular. Esta discrepancia puede encontrar varias explicaciones: no existía una relación equimolar entre el antídoto y el veneno, provocando la prevalencia del efecto de este último, en un tiempo mayor; por otro lado, es posible que efectivamente las sustancias probadas no antagonizan totalmente los efectos neurotóxicos del veneno (lo cual explicaría la aparición de algunos síntomas en los ratones tratados con el extracto), pero que sí resultan útiles para anular algunos otros efectos tóxicos de éste, la suma de todos estos beneficios, se traduce en la capacidad del extracto y sus derivados de servir como sustancias alexiteres.

Otra observación importante que puede hacerse respecto de los resultados obtenidos, es que la fase orgánica I retrasó más el bloqueo neuromuscular que el extracto metanólico, lo cual puede deberse al hecho de que al realizar la separación de la fase orgánica I, los componentes activos se concentran o a que algunos de los componentes del extracto antagonizan la actividad de las sustancias activas.

Figura XXVIII.



Actividad antineurotóxica de: B. Extracto metanólico de *A. taliscana* ($50 \mu\text{g}/\text{mL} + 50 \mu\text{g}$ de veneno de alacrán) y C. Fase orgánica I ($20 \mu\text{g}/\text{mL} + 50 \mu\text{g}$ de veneno de alacrán); actividad neurotóxica del veneno de *Centruroides spp.* (A, $50 \mu\text{g}$), en preparaciones de nervio frénico-hemidiafragma, estimulado con un pulso de onda cuadrada de 0.2 milisegundos de duración, a una frecuencia de 0.1 Hz, con un voltaje supramáximo.

Respecto del extracto de *A. foetida*, de acuerdo a los resultados obtenidos (tabla XXIII), éste carece de una actividad alexitere de importancia, ya que a ninguna concentración probada se observó un efecto protector 100% efectivo; con todo, sí fue posible apreciar un cierto grado de protección, ya que el extracto retrasó la muerte de los ratones aproximadamente unas seis horas con respecto al control; no se probaron dosis mayores, debido a que la dosis más alta que se administró ($3000 \text{ mg}/\text{Kg}$) se acerca mucho a la DL_{50} del extracto: $3950 \text{ mg}/\text{mL}$, con lo cual se hace muy difícil discernir si la muerte del animal ocurre por el efecto del veneno, por intoxicación con el extracto o por la acción conjunta de ambos. Por esta razón, no se realizaron experimentos *in vitro* con este extracto o sus componentes.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla XXIII. Actividad alexitere del extracto de *Aristolochia foetida*.

Dosis (mg/Kg)	Animales sobrevivientes/ animales administrados	% Sobrevivientes
0	0/6	0
250	0/6	0
500	0/6	0
1750	0/6	0
2500	0/6	0
3000	0/6	0

La búsqueda de compuestos capaces de revertir los efectos tóxicos de las toxinas del veneno de alacrán se ve justificada por múltiples razones: en México, el primer lugar de accidentes producidos por animales ponzoñosos lo ocupan las picaduras de alacrán; la producción de los sueros antialacrán sigue siendo lenta y costosa, haciendo caro al producto terapéutico y finalmente, se ha creado gran polémica respecto a la eficacia real del uso de la terapia sérica en el tratamiento de intoxicación producida por veneno de alacrán, debido a los resultados contradictorios que se reportan en varios estudios clínicos recientes (Abroug, *et al*, 1999; Osnaya-Romero, *et al*, 2001).

3.2.2 Efecto de los extractos sobre la toxicidad del veneno de *Crotalus durissus*. Como puede observarse en los resultados registrados en la tabla XXIV, una dosis de 0.5 mg/Kg de extracto metanólico de *A. taliscana*, es capaz de contrarrestar completamente (100% de sobrevivencia), la toxicidad esperada de 2 DL₅₀ de veneno de serpiente de cascabel, en tanto que para lograr el mismo efecto con extracto metanólico de *A. foetida*, es necesario administrar una dosis de 0.1 mg/Kg (tabla (XXII)).

Tabla XXIV. Actividad anticrotálica del extracto metanólico de *Aristolochia taliscana*.

Dosis (mg/Kg)	Animales sobrevivientes/ animales administrados	% Sobrevivientes
0.000	0/6	0
0.025	0/6	0
0.050	2/6	33.33
0.100	5/6	83.33
0.250	3/6	50.00
0.500	6/6	100.00

Considerando la metodología empleada, esto es, la administración de una mezcla del extracto y el veneno que se han incubado a 37°C, es posible afirmar que una dosis de 0.5 mg/Kg de extracto metanólico de *A. taliscana* o de 0.1 mg/Kg de extracto metanólico de *A. foetida*, son capaces de inactivar algunos o todos los componentes tóxicos del veneno de serpiente de cascabel. Mediante análisis PROBIT de los datos (tablas XXI y XXII), es posible determinar las DE₅₀ de los extractos: 0.367 ± 0.955 mg/Kg, para el extracto de *A. taliscana* y 0.158 ± 0.912 mg/Kg, para el extracto de *A. foetida*.

Tabla XXV. Actividad anticrotálica del extracto metanólico de *Aristolochia foetida*.

Dosis (mg/Kg)	Animales sobrevivientes/ animales administrados	% Sobrevivientes
0.000	0/6	0
0.005	0/6	0
0.010	4/6	66.66
0.025	5/6	83.33
0.050	5/6	83.33
0.100	6/6	100.00

En el análisis de la figura XXIX, se observa que el extracto de *A. foetida* es más activo que el de *A. taliscana*, la magnitud de esta diferencia queda definida al comparar las DE₅₀ de los extractos, de tal suerte que el extracto de la primera es casi tres veces más activo que el de la segunda. Considerando lo bajas que resultaron las dosis efectivas de los extractos, es posible pensar que éstos son capaces de neutralizar un número mucho mayor de DL₅₀ del veneno de *Crotalus durissus*, tal vez 10 ó 15, lo cual es un indicativo de que poseen una potencia mayor.

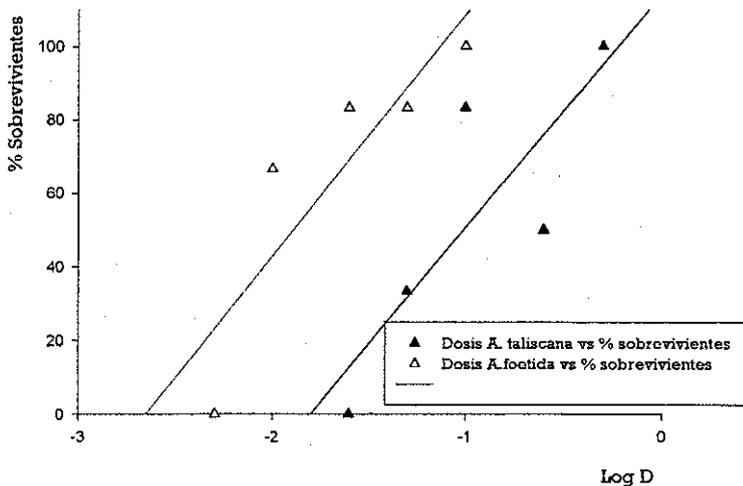
En el caso del uso de extracto de *A. taliscana* como antídoto, se observaron algunos efectos tóxicos del veneno, como letargia y ligera dificultad respiratoria; sin embargo, algunos de los animales que presentaban síntomas de intoxicación intensa (letargia, falta de apetito, dificultad respiratoria), se recuperaron totalmente al cabo de unas doce horas.

Respecto de los resultados obtenidos con el extracto de *A. foetida*, cabe mencionar que el único efecto tóxico observado fue dificultad respiratoria, misma que resultó ser la causa del fallecimiento de los animales.

Aunque la eficacia del uso de suero anticrotálico en el tratamiento de intoxicaciones por veneno de *Crotalus durissus* no ha sido cuestionada como en el caso de los sueros antialacrán, la búsqueda de compuestos que sean capaces de neutralizar

los efectos tóxicos producidos por el veneno de estas serpientes también resulta útil desde varios puntos de vista, pues se ha demostrado que aunque el suero evita la muerte del paciente, no es capaz de revertir otros efectos tóxicos del veneno, como la necrosis muscular, que puede incapacitar al paciente al hacerle perder algún miembro afectado por ésta (Batina, *et al*, 2000; León, *et al*, 1997); por otro lado, se puede mencionar que el estudio de los mecanismos de acción de muchas de las enzimas presentes en los venenos de serpiente, se ve facilitado en gran medida por el uso de antagonistas, capaces de interactuar con diferentes sitios activos de éstas.

Figura XXIX.



Inhibición del efecto letal del veneno de *Crotalus durissus*, por los extractos metanólicos de *Aristolochia taliscana* ($r^2 = 0.845$) y *A. foetida* ($r^2 = 0.889$).

3.2.2 Efecto de los extractos sobre el veneno de *Bothrops asper*. Al realizar la prueba entre este veneno y el extracto de *A. taliscana*, se obtuvieron los resultados que se anotan en la tabla XXVI. Como puede observarse, este extracto carece de actividad antibotrópica, ya que los ratones tratados con la mezcla del extracto y el veneno, presentaron los mismos síntomas de intoxicación letal que los integrantes del grupo control, este envenenamiento provocó la muerte en ambos grupos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla XXVI. Actividad antiveneno del extracto metanólico de *Aristolochia taliscana*.

Dosis (mg/Kg)	Animales sobrevivientes/ animales administrados	% Sobrevivientes
0	0/6	0
250	0/6	0
500	0/6	0
1750	0/6	0
2500	0/6	0
3000	0/6	0

Por otra parte, los resultados que esta prueba arrojó al emplear el extracto de *A. foetida* se presentan en la tabla XXVII. Al igual que en el caso de *A. taliscana*, el extracto probado no protegió a los animales contra el veneno de *Bothrops asper*, sin embargo, se observó una diferencia notable entre el grupo control y los grupos tratados: los animales que recibieron alguna dosis del extracto, presentaron síntomas de intoxicación más graves que los del grupo control, esta tendencia se conservó también en el tiempo en que ocurrió la muerte del animal, ya que los de los grupos tratados con extracto vivieron menos tiempo que los del grupo control, lo que sugiere que se produjo sinergia entre el veneno y el extracto.

Tabla XXVII. Actividad antiveneno del extracto metanólico de *Aristolochia foetida*.

Dosis (mg/Kg)	Animales sobrevivientes/ animales administrados	% Sobrevivientes
0	0/6	0
250	0/6	0
500	0/6	0
1750	0/6	0
2500	0/6	0
3000	0/6	0

Para comprobar si efectivamente existe sinergia entre el veneno de *B. asper* y el extracto de *A. foetida*, se realizó el siguiente experimento: a cinco grupos de seis ratones cada uno, se les administró, vía intraperitoneal (0.1 mL por cada 10 g de peso), una mezcla preparada con 1 mL de la dilución del extracto a la dosis correspondiente (tabla XXVIII) y 1 mL de una solución equivalente a una dosis de 0.25 mg/Kg de veneno (la DL₅₀ es de 1.41 mg/Kg), dicha mezcla se incubó previamente durante 10 minutos, a 37°C. Los ratones así tratados, se mantuvieron en observación durante 48 horas.

A los seis animales que conformaron el grupo control, se les administró también por la vía intraperitoneal (0.1 mL por cada 10 g de peso), una mezcla preparada con

1 mL de solución salina isotónica y una solución equivalente a 0.25 mg/Kg de veneno; al igual que en los grupos de prueba, la mezcla se había incubado durante 10 minutos a 37°C. Los resultados que se obtuvieron en esta prueba se encuentran en la tabla XXVIII.

Tabla XXVIII. Actividad conjunta del extracto de *Aristolochia foetida* y el veneno de *B. asper*.

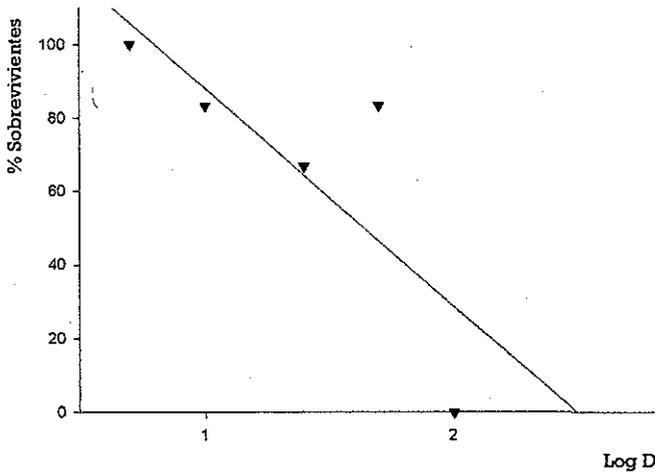
Dosis (mg/Kg)	Animales sobrevivientes/ animales administrados	% Sobrevivientes
0	6/6	100.00
5	6/6	100.00
10	5/6	83.33
25	4/6	66.67
50	5/6	83.33
100	0/6	0

De acuerdo con los datos registrados en la tabla XXVIII, existe sinergia entre el veneno y el extracto, considerando que la administración de una dosis de 0.25 mg/Kg de veneno de *B. asper* no causó la muerte en ninguno de los animales control y las dosis de extracto metanólico de *A. foetida* que se administraron, se encuentran muy por debajo de la DL₅₀ del extracto (3800 mg/Kg).

El efecto sinérgico que existe entre el veneno de nauyaca y el extracto metanólico de *A. foetida* alcanza su nivel máximo al administrar una dosis de 100 mg/Kg de este último (0% de sobrevivencia). Adicionalmente, se observó que entre mayor la concentración de extracto que se empleó, la muerte ocurría más rápidamente, esta aseveración también se cumple a la inversa, ya que tanto los ratones del grupo control, como los de los grupos a los que se les administraron dosis más bajas sobrevivieron, presentando algunos efectos tóxicos, como necrosis en el sitio de la administración y letargia.

Mediante análisis PROBIT de los datos (tabla XXVIII), es posible determinar que la dosis efectiva media (DE₅₀) para producir sinergia entre el extracto metanólico de *A. foetida* y el veneno de nauyaca, es de 4.880 ± 1.000 mg/Kg.

Figura XXX.



Actividad conjunta de los extractos de *Aristolochia foetida*
y el veneno de *Bothrops asper*.

El hecho de que el extracto de *A. foetida* sea efectivo contra el veneno de serpiente de cascabel, pero que aumente la toxicidad del de nauyaca, permite suponer que el mecanismo de acción de ambos venenos es diferente, aunque los dos ofidios pertenecen a la misma familia. Considerando la composición de los venenos, es muy posible que el aumento de la toxicidad del veneno de nauyaca por mediación del extracto se deba a una interacción con las miotoxinas que contiene el primero, ya que los componentes miotóxicos del veneno de serpiente de cascabel (crotoxina, crotamina) debieron ser neutralizados por el extracto, un ejemplo puede verse en la crotoxina, que además de sus efectos miotóxicos, también posee una potente actividad neurotóxica, misma que resultó ser revertida eficazmente por el extracto, lo cual implica la neutralización total de la enzima (Guieu, *et al*, 1998; Salvini, *et al*, 2001).

Además, aunque los dos tipos de veneno producen síntomas similares, como alteraciones en la coagulación o miotoxicidad, lo hacen por mecanismos diferentes, por lo que la sustancia que evita la hemorragia o la necrosis inducida por un veneno, no necesariamente evitará la que produce otro veneno (Borkow, *et al*, 1993; Borkow, *et al*, 1995; Chaves, *et al*, 1995; Diaz, 1995; Guieu, *et al*, 1998; Gutiérrez, *et al*, 1995; Russell, *et al*, 1997; Salvini, *et al*, 2001).

Finalmente, está el hecho de que la severidad de los efectos es diferente entre ambos venenos, así tenemos que la neurotoxicidad y la nefrotoxicidad son los dos efectos principales del veneno de serpiente de cascabel, mientras que el incremento en el tiempo de coagulación es el efecto más importante que produce el veneno de nauyaca (DNWUSM, 2001; Russell, et al, 1997; Sannanaik y Verabasappa, 1987).

La existencia de un efecto sinérgico entre el veneno de nauyaca y el extracto metanólico de *A. foetida*, resulta revelador desde varios puntos de vista, clínicamente, permite establecer contraindicaciones al uso de antídotos derivados de *A. taliscana* y *A. foetida*, esto es, que pueden usarse en el tratamiento intoxicaciones producidas por mordeduras de serpientes de cascabel, pero no de nauyaca.

Desde el punto de vista ecológico, puede indicar que una planta con propiedades alexitere, sólo será efectiva al ser empleada contra animales ponzoñosos que se encuentren en el mismo hábitat que ésta, así, resulta lógico que ninguno de los extractos resultara efectivo contra el veneno de nauyaca, ya que esta serpiente se encuentra en hábitats húmedos y templados del sureste de México, mientras que las plantas se distribuyen en regiones más templadas, localizadas en la región oeste del país (Martínez, 1944; Pfeifer, 1966; Russell, et al, 1997).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

CONCLUSIONES

El compuesto fenantrénico ácido aristolóquico IV es componente del extracto metanólico de las raíces de *Aristolochia taliscana*; no se logró el aislamiento de la taliscanina, única aristolactama reportada previamente en esta planta.

Por otro lado, se aislaron la 9-metoxi-tariacupirona y el ácido aristolóquico I, a partir del extracto metanólico de las raíces de *Aristolochia foetida*, compuestos que constituyen el primer estudio fitoquímico realizado sobre esta planta de origen mexicano.

La 9-metoxi-tariacupirona constituye un compuesto de gran interés desde el punto de vista fitoquímico, ya que sólo se había reportado previamente en otra Aristolochiaceae mexicana, *A. brevipes*.

El extracto metanólico de las raíces de *A. taliscana* presenta actividad alexitere contra el veneno de alacrán, en ratones, con una DE_{50} de 1.569 ± 0.942 mg/Kg esta actividad puede atribuirse a la inactivación de los componentes tóxicos del veneno por parte de uno o varios de los compuestos presentes en el extracto, mismos que corresponden a la fracción básica del éste.

Los extractos metanólicos de *A. taliscana* y *A. foetida*, poseen actividad anticrotálica, en ratones, frente al veneno de serpiente de cascabel, siendo casi tres veces más potente el extracto de la segunda que el de la primera; el efecto de antídoto de estas plantas es tan eficiente, que en varios casos, fueron capaces de contrarrestar los síntomas de intoxicación grave.

Respecto del veneno de nauyaca, el extracto de *A. taliscana* no posee capacidad de neutralizarlo, mientras que el de *A. foetida* ejerce un efecto sinérgico respecto de la toxicidad del veneno; este hecho resulta interesante desde el punto de vista clínico, ya que permite establecer con claridad contraindicaciones al uso de productos de origen natural, además de que desde el punto de vista ecológico, puede indicar que una planta con propiedades alexitere, sólo será efectiva al ser empleada contra animales ponzoñosos que se encuentren en el mismo hábitat que ésta.

PERSPECTIVAS

Llevar a cabo el aislamiento y elucidación estructural de otros compuestos nitrogenados y no nitrogenados, de fracciones que no fueron estudiadas en el presente trabajo.

Realizar el estudio fitoquímico de otras Aristolochiaceae nativas de la región de Michoacán y Jalisco, para determinar si éstas también contienen tariacupironas.

Determinar la actividad anticrotálica y alexitere de los extractos empleando el siguiente protocolo de investigación: administrar el veneno y, después de transcurrido cierto tiempo, el extracto, variando justamente, el tiempo al que se administra el extracto.

Realizar estudios más específicos, tanto *in vitro*, como *in vivo*, para determinar el posible mecanismo de acción de extractos, fracciones y compuestos aislados, contra el veneno de serpiente de cascabel.

BIBLIOGRAFÍA

- Abroug, F.; El Atrous, S.; Nouria, S.; *et al*: Serotherapy in scorpion envenomation: a randomised controlled trial. *The Lancet*, 354(11), 906-9 (1999).
- Achenbach, H.; Waibel, R.; Zwanzger, M.; *et al*: 9-methoxy- and 7,9-dimethoxytyriacupyrone, natural nitro-compounds with a new basic skeleton from *Aristolochia brevipes*. *J. Nat. Prod.*, 55(7), 918-22 (1992).
- Aguilar, A.; Camacho, J.R.; Chino, S.; *et al*: *Herbario Medicinal del Instituto Mexicano del Seguro Social. Información Etnobotánica*; IMSS, México, 1994.
- Alam, M.I.; Gomes, A.: Adjuvant effects and antiserum action potentiation by a (herbal) compound 2-hidroxy-4-methoxy benzoic acid isolated from the root extract of the Indian medicinal plant 'sarsaparilla' (*Hemidesmus indicus* R. Br). *Toxicon*, 36(10), 1423-31 (1998).
- Batina M.F.C.; Cintra. A.C.O.; Veronese, E.L.G.; *et al*: Inhibition of the lethal and myotoxic activities of *Crotalus durissus terrificus* venom by *Tabernaemontana catharinensis*: Identification of one of the active components. *Planta Medica*, 66, 424-428 (2000).
- Borkow, G.; Gutiérrez, J.M.; Ovadia, M.: Isolation and characterization of synergistic hemorrhagins from the venom of the snake *Bothrops asper*. *Toxicon*, 31(9), 1137-50 (1993).
- Borkow, G.; Gutiérrez, J.M.; Ovadia, M.: In vitro activity of BaH1, the main hemorrhagic toxin of *Bothrops asper* snake venom on bovine endothelial cells. *Toxicon*, 33(10), 1387-91 (1995).
- Braud, S.; Bon, C.; Wisner, A.: Snake venom proteins acting on hemostasis. *Biochimie*, 82, 851-59 (2000).
- Casali, T.A.; Gomez, R.S.; Moraes-Santos, T.; Gomez, M.V.: Differential effects of calcium channel antagonists on tityustoxin and ouabain-induced release of [3H] acetylcholine from brain cortical slices. *Neuropharmacology*, 34(6), 599-603 (1995).

- Carreras, L. M.: Bases cuaternarias y nitrofenantrenos en *Aristolochia baetica* L. *Anal. Inst. Bot. Cavanilles*, 30, 253-265 (1973).
- Chaves, F.; Barboza, M.; Gutiérrez, J.M.: Pharmacological study of edema induced by venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo) in mice. *Toxicon*, 33(1), 31-39 (1995).
- Chen, Z.L.; Zhu, D.Y.: *Aristolochia* Alkaloids (1987) in *The Alkaloids* (Brossi, A., ed.), Vol. 31, pp. 29-63, Academic Press.
- Chippaux, J.P.; Goyffon, M.: Venoms, antivenoms and immunotherapy. *Toxicon*, 36(6), 823-46 (1998).
- Daros, M.R.; de Abreu M.F.J.; Paz P.J.: A new triterpenoid Saponin, bredemeyeroside B, from the roots of *Bredemeyera floribunda*. *Planta Medica* 62, 523-27 (1996).
- De Pascual, T; Urones, J.G.; Fernández, A.: An aristolochic acid derivative from *Aristolochia longa*, *Phytochemistry*, 22(12), 2745-47 (1983).
- Dehesa-Dávila, M.; Posani, L.D.: Scorpionism and serotherapy in Mexico. *Toxicon*, 32(9), 1015-18 (1994).
- Department of Neurology at Washington University School of Medicine: *Snake Venom Toxins*, URL: <http://www.neuro.wustl.edu/neuromuscular/msys/myoglob.html#venom>, 2001.
- Díaz, C.; Lomonte, B.; Zamudio, F.; Gutiérrez, J.M.: Purification and characterization of myotoxin IV, a phospholipase A₂ variant, from *Bothrops asper* snake venom. *Nat. Toxins*, 3, 26-31 (1995).
- Díaz, J.L.: *Usos de la Plantas Medicinales de México. Monografías Científicas II*, Instituto Mexicano Para el Estudio de las Plantas Medicinales, A. C., México, 1976
- Dirección General de Comunicación Social, UNAM: Boletín UNAM-DGCS-556, México, 4/junio/01, *Picaduras de alacrán, primer lugar en accidentes causados por animales venenosos*.

- Duke, J.A.: *Handbook of Medicinal Herbs*, CRC Press Inc., U.S.A., 1989, pp. 63.
- Eckhardt, G.: Mass spectrometry of aristolochic acids. *J. Nat. Prod.*, 46(1), 92-97 (1983).
- El Tahir, K.E.H.: Pharmacological actions of magnoflorine and aristolochic acid-1 isolated from seeds of *Aristolochia bracteata*. *Int. J. Pharmacogn.*, 29(2), 101-10 (1991); CA: 115: 269858h.
- Enriquez, R.G.; Chávez, M.A.: Phytochemical investigations of plants of the genus *Aristolochia*, 1. Isolation and NMR spectral characterization of eupomatenoid derivatives. *J. Nat. Prod.*, 47(5), 896-99 (1984).
- Farnsworth, N.: Sobre la preparación de extractos de plantas para la evaluación farmacológica. *Medicina Tradicional*, 3(11), 269-77 (1982).
- Gledhill, D.: *The names of plants*, 2ª Edición, Cambridge University Press, Gran Bretaña, 1989, pp. 65.
- Goddard, J.: *Physician's Guide to Arthropods of Medical Importance*, CRC Press, U.S.A., 1993, pp. 229-35: Capítulo 26 "Scorpions".
- Goni, M.; Vaisberg, A.; Zavaleta, A.: Cytotoxicity induced by Peruvian snake venom on fibroblasts of mice. *Rev. Biol. Trop.*, 40(1), 143-45 (1992).
- Guieu, R.; Rosso, J.P.; Rochat, H.: Pathophysiology of scorpion and snake venom poisoning. *Toxicon*, 36(12), 1728-29 (1998).
- Gutiérrez, J.M.; Romero, C.; Díaz, G.; et al: Isolation and characterization of a metalloproteinase with weak hemorrhagic activity from the venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo). *Toxicon* 33(1), 19-29 (1995).
- Houghton, P.J.; Harvey, A.L.: Investigation of the anti-snake venom activity of *Schumannophyton magnificum*. *Planta Medica*, 55, 273-275 (1989).
- Houghton, P.J.; Osibogun, I.M.: Flowering plants used against snakebite. *J. Ethnopharmacol.*, 39, 1-29 (1993).

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

- Hutt, M.J.; Houghton, P.J.: A survey from the literature of plants used to treat scorpion stings. *J. Ethnopharmacol.*, 60, 97-110 (1998).
- Inisan, A.G.; Meunier, S.; Fedelli, O.; *et al*: Structure-activity relationship study of a scorpion toxin with high affinity for apamin-sensitive potassium channels by means of the solution structure of analogues. *Int. J. Pept. Protein Res.*, 45(5), 441-50 (1995).
- Instituto Nacional de Antropología e Historia: *Actores Sociales de la Flora Medicinal en México. Plantas Medicinales de Copalillo y Temalac, Guerrero*, INAH, México, 2000 pp. 5-6.
- Ionescu, F.; Jolad, S.D.; Cole, J.R.: Dehydroisoeugenol: a naturally occurring lignan from *Aristolochia taliscana* (Aristolochiaceae). *J. Pharm. Sci.*, 66(10), 1489-90 (1977).
- Ismail, M.: The scorpion envenoming syndrome. *Toxicon*, 33(7), 825-58 (1995).
- Korolkovas, A.: *Essentials of Medicinal Chemistry*, 2nd Edition, John Wiley & Sons, USA, 1998, pp. 374-88.
- León, G.; Rojas, G.; Lomonte, B.; Gutiérrez, J.M.: Immunoglobulin G and F(ab')₂ polyvalent antivenoms do not differ in their ability to neutralize hemorrhage, edema and myonecrosis induced by *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom. *Toxicon*, 35(11), 1627-37 (1997).
- Lomonte, B.; Tarkowski, A.; Hanson, L.A.: Host response to *Bothrops asper* snake venom. Analysis of edema formation, inflammatory cells, and cytokine release in a mouse model. *Inflammation*, 17(2), 93-105 (1993).
- Lorke, D.: A new approach to practical acute toxicity testing. *Arch. Tox.*, 54, 275-87 (1983).
- Maldonado, L.A.; Herrán, J.; Romo, J.: La taliscanina, un componente de *Aristolochia taliscana*. *Ciencia*, 24(5-6), 237-40 (1966).
- Martínez, M.: *Las plantas medicinales de México*, 3^a Edición, Ediciones Botas, México, 1944, pp. 234-42.

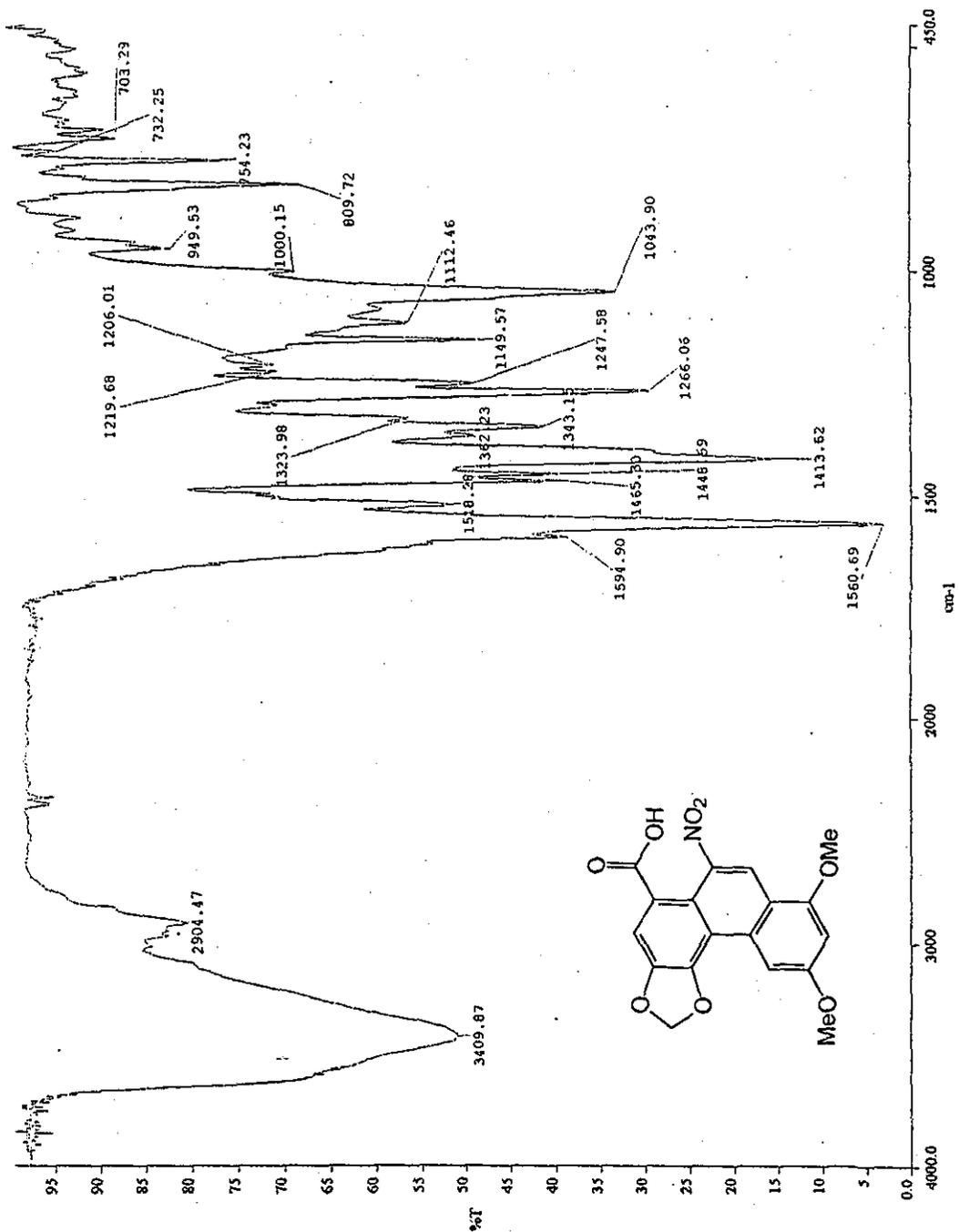
- Martz, W.: Plants with a reputation against snakebite. *Toxicon*, 30(10), 1131-42 (1992).
- Mata, P.S.; Méndez, G.D.; Marmolejo, M.M.A.; et al: *Diccionario Enciclopédico de la Medicina Tradicional Mexicana*, Instituto Nacional Indigenista, México, 1994, Vol. II, pp. 601-5, 680-81, 860-61.
- Matos, I.M.; Teixeira, M.M.; Leite, R.; Freire-Maia, L.: Pharmacological evidence that neuropeptides mediate part of the actions of scorpion venom on the guinea pig ileum. *Eur. J. of Pharm.*, 368, 231-36 (1999).
- Mendoça, M. Da Luz; Freire-Maia, L.; Cunha-Melo, J.R.: Effect of scorpion toxin from *Tityus serrulatus* on the contraction of the isolated rat uterus. *Toxicon*, 33 (3), 355-61 (1995).
- Mix, D.B.; Guinaudeau, H., Shamma, M.: The aristolochic acids and aristolactams. *J. Nat. Prod.*, 45(6), 657-666 (1982).
- Mors, W.B.; Do Nascimento, M.C.; Parente, J.P.; et al: Neutralization of lethal and myotoxic activities of South American rattlesnake venom by extracts and constituents of plant *Eclipta prostrata* (Asteraceae). *Toxicon*, 27, 1003-9 (1989).
- Mors, W.B.; Do Nascimento, M.C.; Ruppelt, P.B.M.; Alvares, P.N.: Plant natural products active against snake bite – the molecular approach. *Phytochemistry*, 55, 627-42 (2000).
- Osnaya-Romero, N.; Medina-Hernández, T.J.; Flores-Hernández, S.S.; León-Rojas, G.: Clinical symptoms observed in children envenomated by scorpion stings, at the children's hospital from the State of Morelos, Mexico. *Toxicon*, 39, 781-85 (2001).
- Pérez, R.E.; Carbajal, S.A.; Rivas, G.H.A.: Serpientes venenosas, reconocimiento y tratamiento general de su mordedura. *Revista UNAM*, 1(3), <http://www.revista.unam.mx/vol.1/num3/sabias2/>, (2001).
- Perry, W.L.M.; *Pharmacological Experiments on Isolated Preparations*, 2nd Edition, E. & S. Livingstone, London, 1970, pp. 30-33.

- Pfeifer, H.W.: Revision of the North and Central American hexandrous species of *Aristolochia* (Aristolochiaceae). *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 53(2), 115-39 (1966).
- Priestap, H.A.: Minor aristolochic acids from *Aristolochia argentina* and mass spectral analysis of aristolochic acids. *Phytochemistry*, 26(2), 519-29 (1987).
- Pretsch, E.; Seibl, J.; Clerc, T.; Simon, W.: *Tables of Spectral Data for Structure Determination of Organic Compounds*, 2nd Edition, Springer-Verlag, Berlin, 1989.
- Reyes-Chilpa, R.; Gómez-Garibay, F.; Quijano, L.; *et al*: Preliminary results on the protective efecto of (-)-edunol, a pterocarpan from *Brongniartia podalyrioides* (leguminosae) against *Bothrops atrox* venom in mice. *J. Ethnopharm.*, 42, 199-203 (1994).
- Reyes-Chilpa, R.; Jiménez, E.M.: Química de las plantas alexiteras. *Interciencia*, 20(5), 257-264 (1995).
- Russell, F.E.; Walter, F.G.; Bey, T.A.; Fernández, M.C.: Snakes and snakebite in Central America. *Toxicon*, 35(10), 1469-1522 (1997).
- Salvini, T.A.; Amaral, A.C.; Miyabara, E.H.; *et al*: Systemic skeletal muscle necrosis induced by crotoxin. *Toxicon*, 39, 1141-49 (2001).
- Sannanaik, S.B.; Verabasappa, G.T.: Interaction of aristolochic acid with *Vipera russelli* phospholipase A₂: It's effect on enzymatic and pathological activities. *Toxicon*, 25(9), 929-37 (1987).
- Selvanayagam, Z.E.; Gnanavendhan, S.G.; Chandrasekharan, P.; *et al*: Plants with antisnake venom activity - a review on pharmacological and clinical studies. *Fitoterapia*, 65(2), 99-111 (1994).
- Selvanayagam, Z.E.; Gnanavendhan, S.G.; Balakrishna, K.; *et al*: Ehretianone, a novel quinonoid xanthene from *Ehretia buxifolia* with antisnake venom activity. *J. Nat. Prod.*, 59, 664-67 (1996).

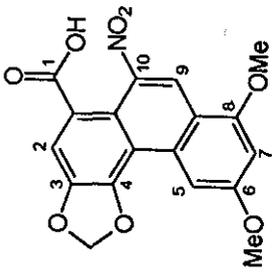
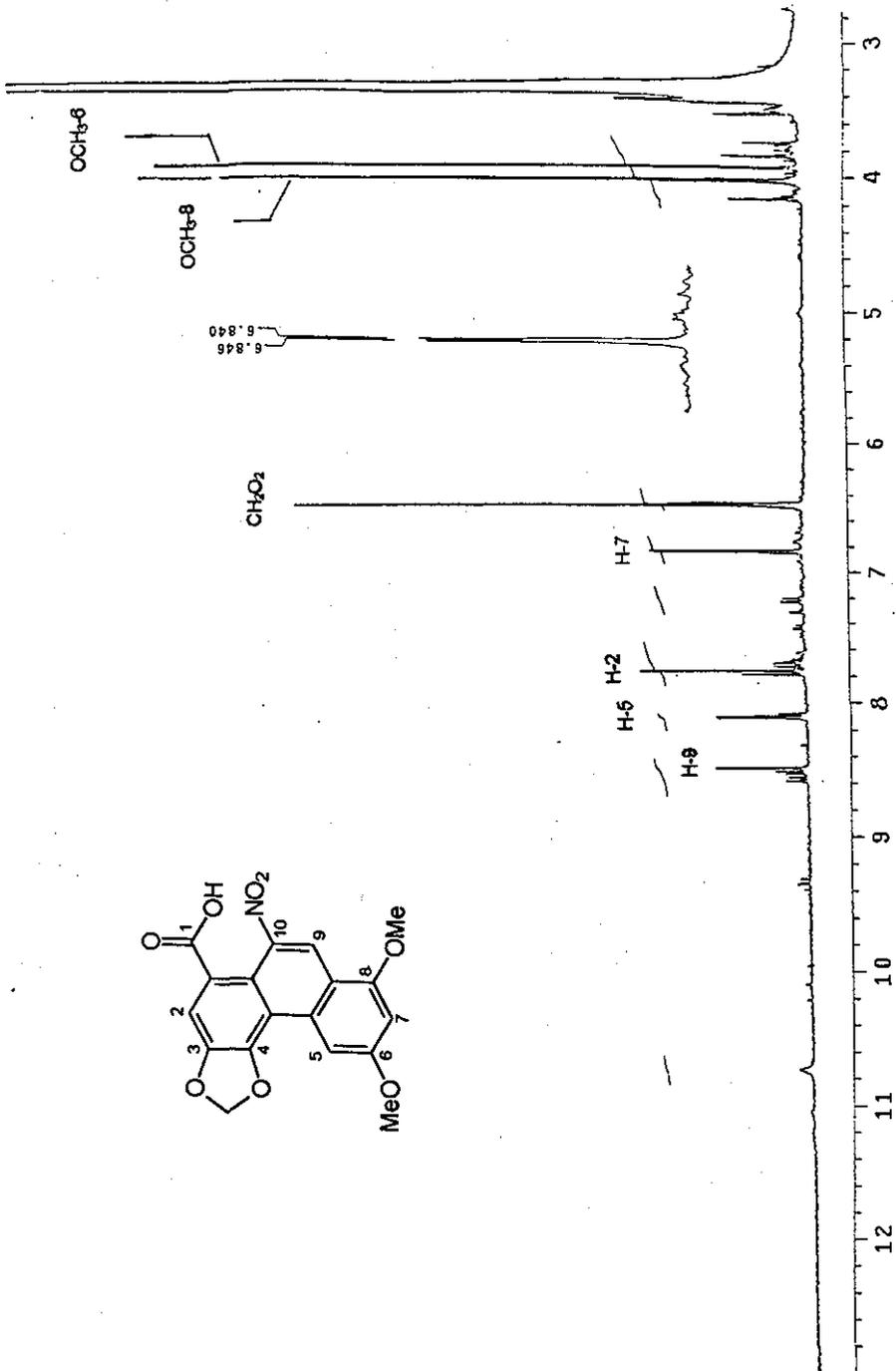
- Taylor, P.: Agentes que actúan en la unión neuromuscular y en los ganglios autonómicos (1996) en *Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica* (Hardman, J.G.; Limbird, L.E.; Moliniff, P.B.; et al; eds.), 9ª Edición, Mc Graw-Hill Interamericana, México, 1996, Vol. 1, pp. 189-209.
- Tu, A.T.: *Venoms: Chemistry and Molecular Biology*, John Wiley & Sons, U.S.A, 1977, pp. 211-33: Capítulo 14 "Venoms of Crotalidae (Crotalids, Pit Vipers)" y 459-83: Capítulo 28 "Scorpion Venoms".
- Watson, L.; Dallwitz, M.J.: The families of flowering plants: descriptions, illustrations, identification and information retrieval, Versión 14 Diciembre 2000, URL: <http://www.keil.ukans.edu/delta/>.

ESPECTROS

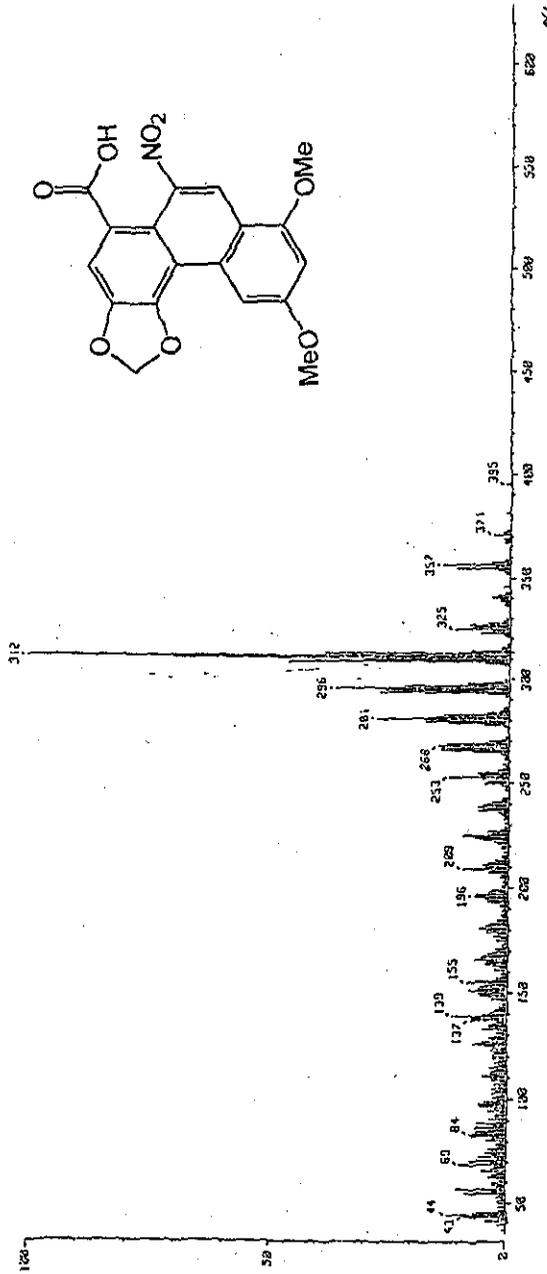
- Espectro 1: IR del Ácido aristolóquico IV.
- Espectro 2: RMN¹H del Ácido aristolóquico IV.
- Espectro 3: IEMS del Ácido aristolóquico IV.
- Espectro 4: IR de la 9-metoxi-tariacupirona.
- Espectro 5: RMN¹³C de la 9-metoxi-tariacupirona.
- Espectro 6: RMN¹H de la 9-metoxi-tariacupirona.
- Espectro 7: IEMS de la 9-metoxi-tariacupirona.
- Espectro 8: IR del Ácido aristolóquico I.
- Espectro 9: RMN¹H- del Ácido aristolóquico I.
- Espectro 10: IEMS del Ácido aristolóquico I.



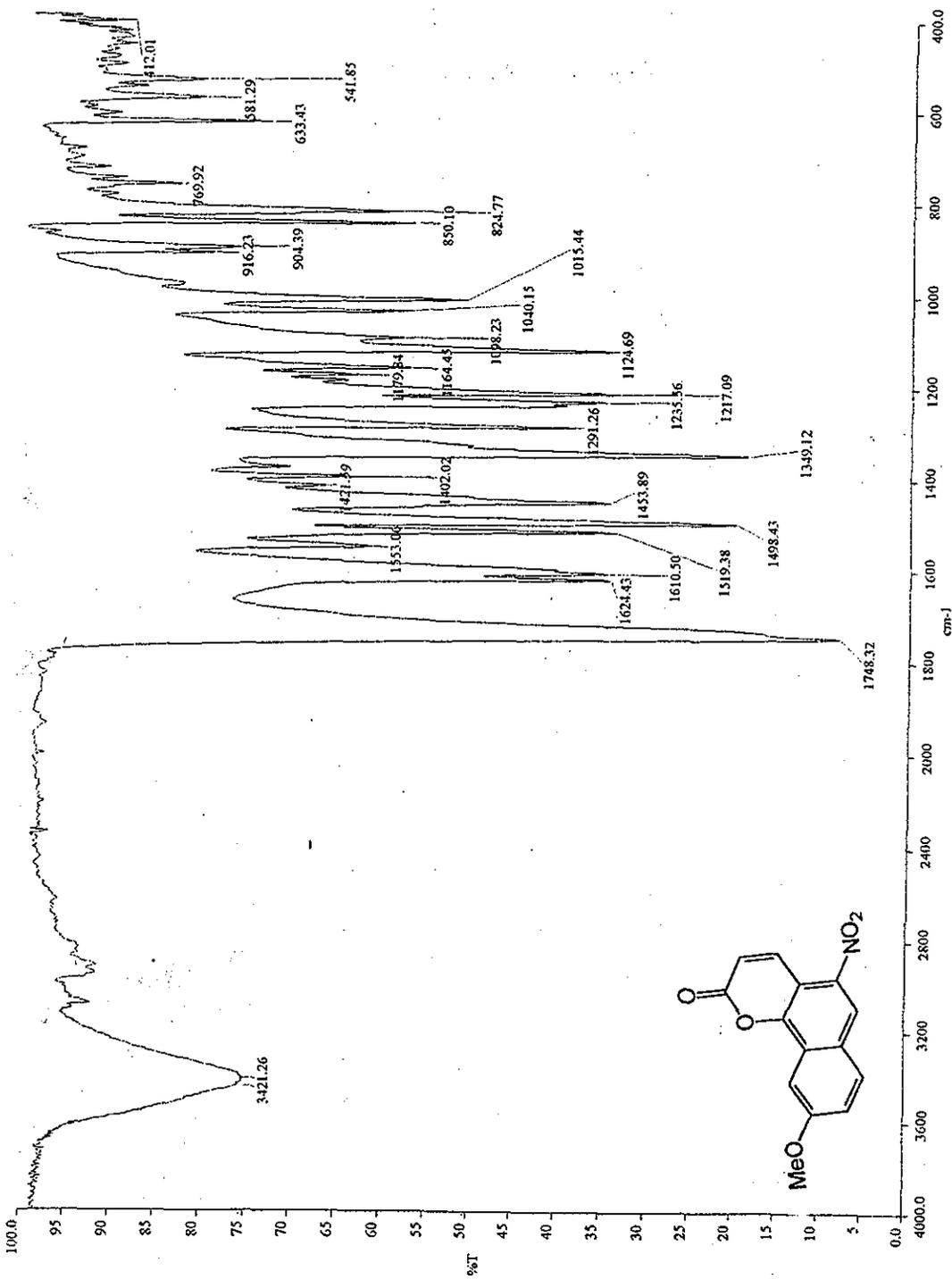
IR del Ácido aristolóquico IV.



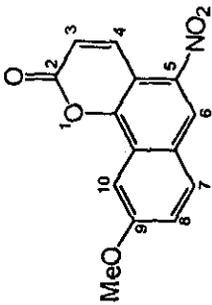
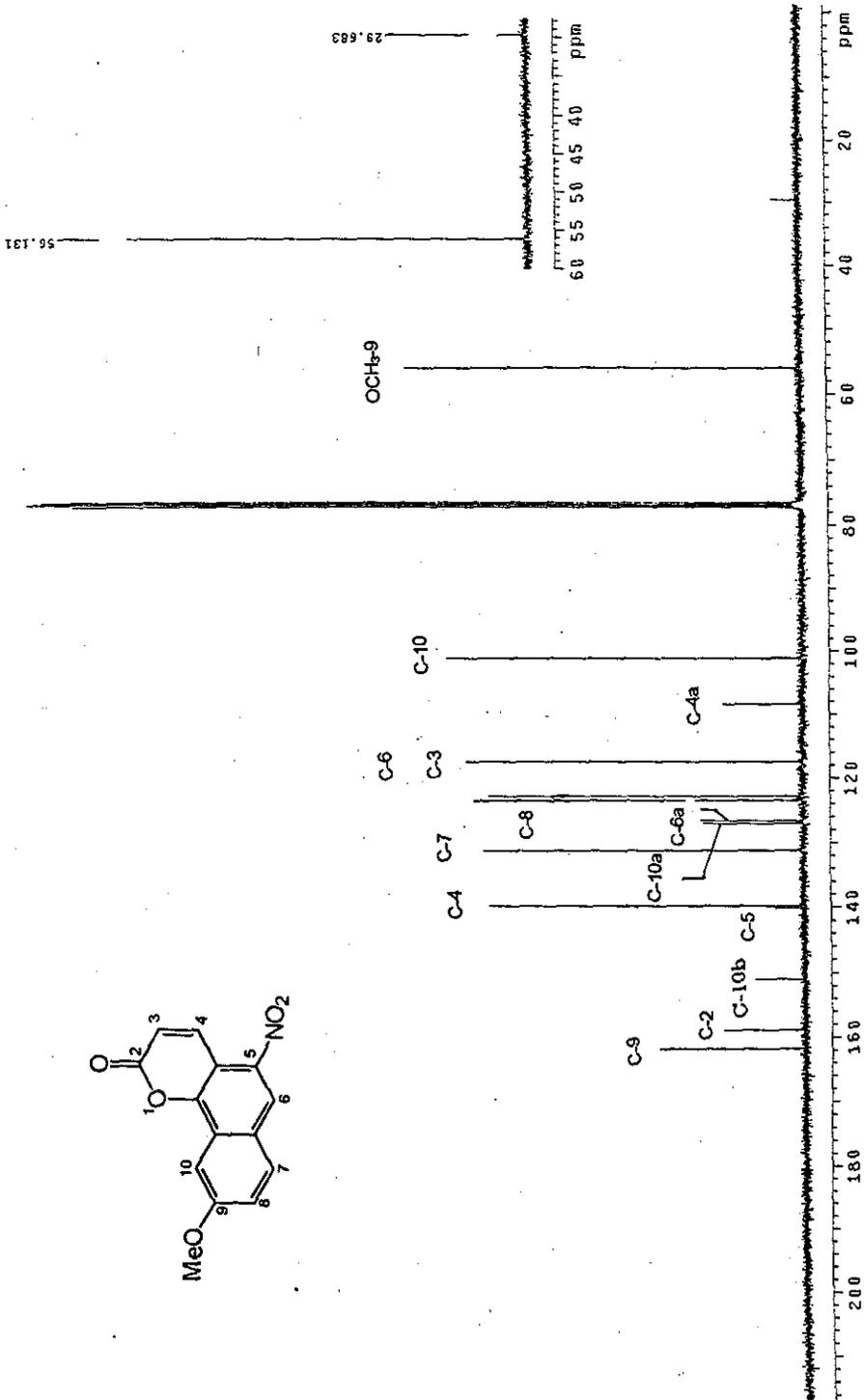
RMN ¹H del Ácido aristolóquico IV.



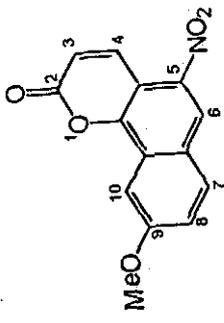
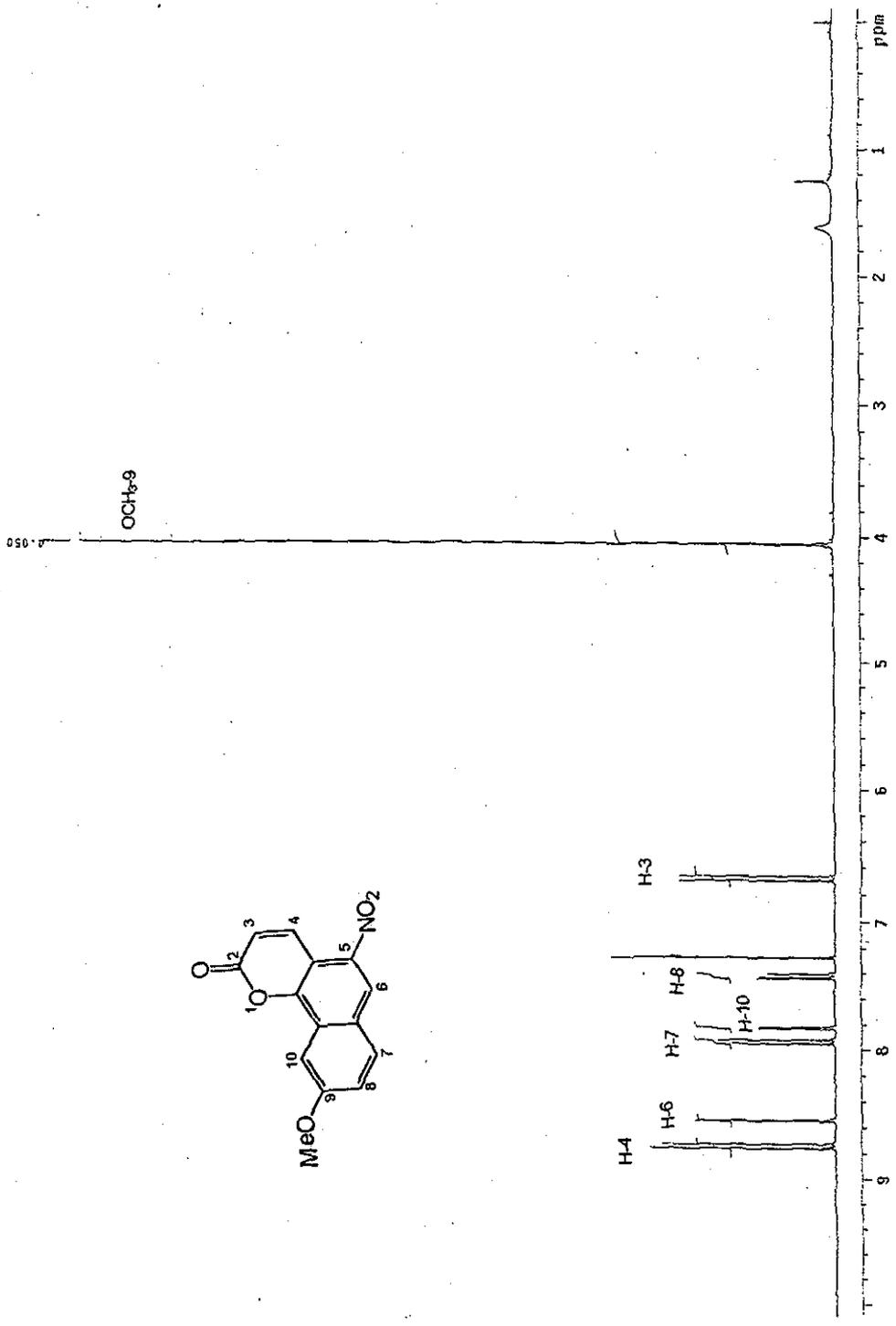
IEMS del Ácido aristolóquico IV.



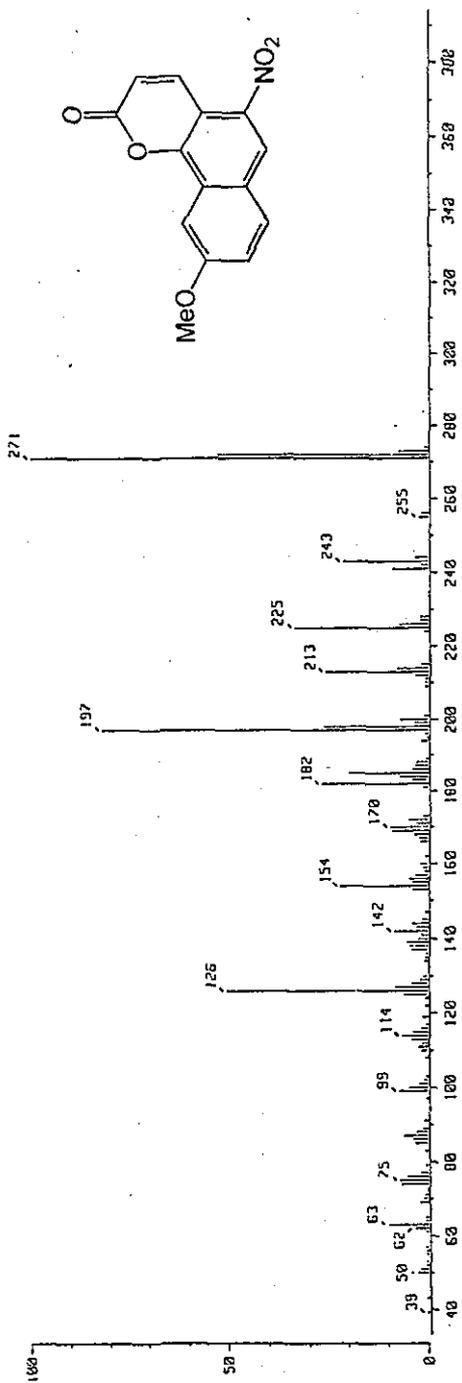
IR de la 9-metoxi-tariacupirona.



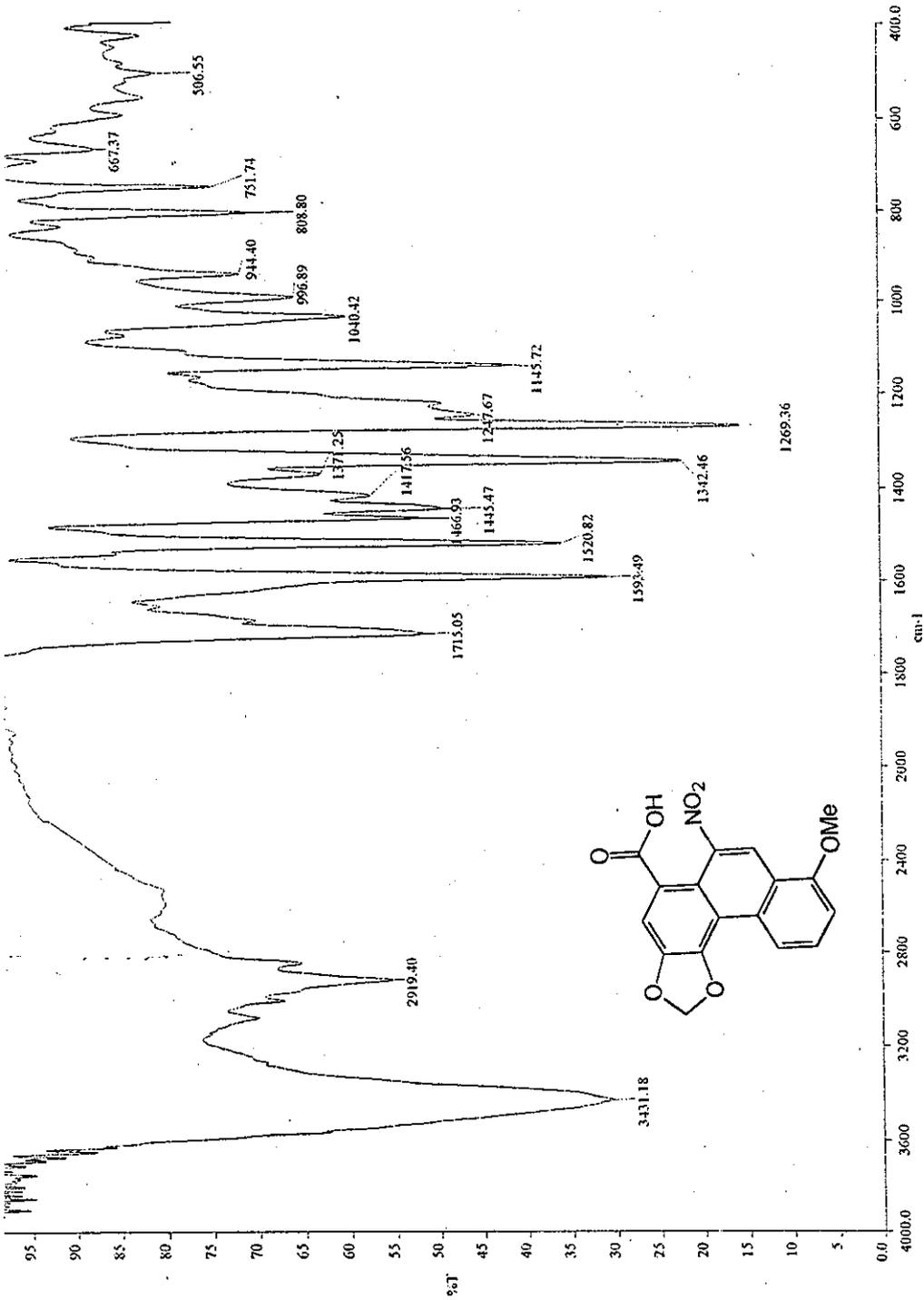
RMN ¹³C de la 9-metoxi-7-nitrocoumarina.



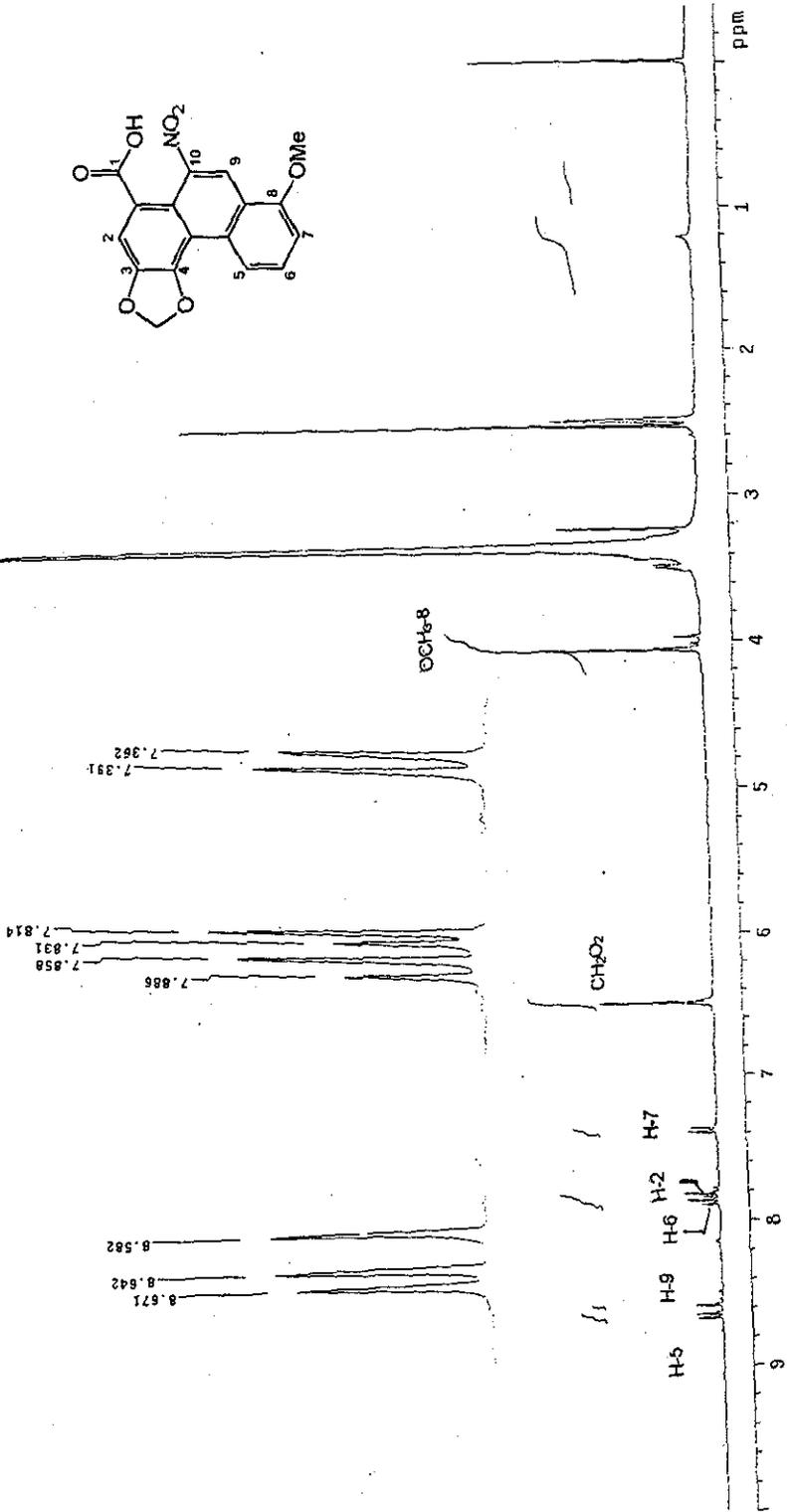
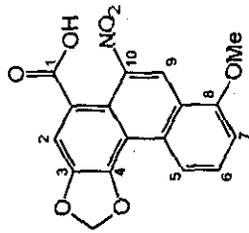
RMN ¹H de la 9-metoxi-7-nitro-2,3-dihidro-1H-indolona.



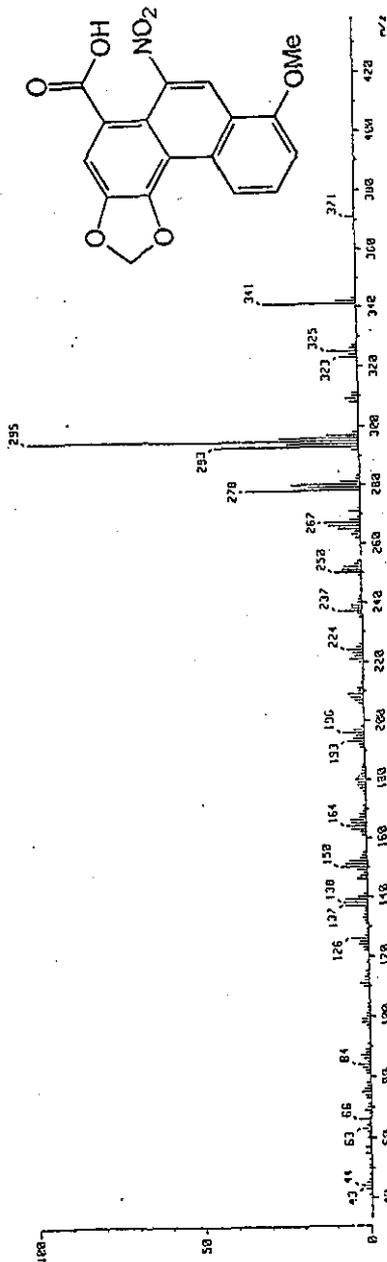
IEMS de la 9-metoxi-tariacupirona.



IR del Ácido aristolóquico I.



RMN¹H del Ácido aristolóquico I.



IEMS del Ácido aristolóquico I

GLOSARIO DE TÉRMINOS

- Acrómeta:** Dícese de lo que se desarrolla desde la base hacia el ápice.
- Adyuvante:** Cualquier sustancia que intensifica de manera inespecífica la respuesta inmunitaria frente a un antígeno.
- Alexitere:** Agente que combate los efectos de las mordeduras de animales ponzoñosos (principalmente alacranes).
- Anisocoria:** Diferencia de tamaño entre las dos pupilas.
- Arcuada:** Curvada a manera de arco.
- Ataxia:** Fallo de coordinación muscular, acción muscular irregular
- Aurícula:** Apéndice pequeño situado en El pecíolo o en la base de la lámina de las hojas; por su forma, recuerda una orejita. Suelen ser dos en cada hoja y ubicarse a cada lado de ésta.
- Cordato:** Con figura de corazón.
- Dehiscencia:** Fenómeno en el que un órgano vegetal se abre espontáneamente.
- Diplopia:** Trastorno visual en virtud del cual se percibe una imagen doble de un objeto.
- Emarginada:** Con una muesca poco profunda, generalmente en el ápice.
- Fasciculación:** Breve reacción contráctil de un músculo esquelético, desencadenada por una única descarga máxima en las neuronas motoras que lo inervan.

- Fimbria:** Porción de un órgano dividida en segmentos muy finos, angostos y de ápice agudo.
- Fragmentos [F(ab')₂]:** Cuando moléculas de IgG son tratadas con pepsina, se obtiene un gran fragmento con un peso molecular (PM) de 100 000 y muchos fragmentos pequeños. El fragmento mayor se denomina [F(ab')₂], posee la habilidad de unirse al antígeno y, como contiene ambos sitios de unión del anticuerpo, es capaz de producir una reacción serológica visible, esto es, que forma precipitados al reaccionar con el antígeno. Al degradar este fragmento, se obtienen dos fragmentos idénticos, denominados Fab', similares a los producidos cuando la molécula de IgG se trata con papaína (Fab), que, aunque poseen la capacidad de unirse al antígeno, no producen una reacción serológica visible.
- Geniculado:** Calificativo que se refiere al cambio de dirección del órgano, primero tendido y luego levantado verticalmente.
- Glabrescente:** Aplícase a los órganos casi sin vello.
- Hipanto:** Parte axial de una flor soldada al ovario de la misma.
- Hiperemia:** Exceso de sangre en una parte, congestión.
- Hiperpnea:** Aumento anormal de la profundidad y frecuencia de los movimientos respiratorios.
- Límbo:** En las corolas, es la parte libre de los pétalos, que forma como una orla en el extremo del tubo.
- Loquios:** Secreciones genitales producidas durante los primeros días después del parto.

- Nistagmo:** Movimiento rítmico, rápido, involuntario de los globos oculares, que puede ser horizontal, vertical, rotatorio o mixto.
- Obcónico:** De forma cónica invertida, o sea, con la base en la parte superior.
- Pedúnculo** Cabillo o rabillo de una flor o inflorescencia.
- Priapismo:** Erección anormal persistente del pene, por lo general sin deseo sexual y que se acompaña de dolor e hipersensibilidad.
- Respiración de Cheyne-Stokes:** Respiración caracterizada por intensificación y disminución de la profundidad respiratoria, con periodos de apnea que recurren con regularidad. Se observa especialmente en caso de coma resultante de afección de los centros nerviosos.
- Septífrago:** Dícese de la dehiscencia en que interviene la fractura de las láminas que dividen la cavidad del fruto (disepimiento) según planos paralelos al eje del mismo. De esta forma, las porciones internas de los disepimientos quedan unidas a una columna axial.
- Utrículo:** Pequeña vesícula constituida por una hoja o segmento foliar.