

EFFECTO NEUTRALIZADOR DEL EXTRACTO ACUOSO DE *Dracontium lorentense* (JERGÓN SACHA) SOBRE LA ACTIVIDAD LETAL DEL VENENO DE *Bothrops atrox*

Amanda Lovera¹, César Bonilla², Jack Hidalgo²

RESUMEN

Objetivo: Determinar la capacidad del extracto acuoso *D. lorentense* (jergón sachá) para neutralizar la actividad letal del veneno de la serpiente *B. atrox*. **Materiales y métodos:** Se realizó el *screening* fitoquímico del extracto acuoso del bulbo desecado de *D. lorentense*, se calculó la dosis letal 50 (DL50) para el extracto y el veneno de *B. atrox*. Luego se realizaron enfrentamientos de diferentes dosis de extracto y veneno inyectadas intraperitonealmente en ratones, previa incubación, para calcular la dosis eficaz 50% (DE50) del extracto para neutralizar el efecto letal del veneno por el método de Probits. **Resultados:** El análisis fitoquímico del extracto permitió identificar compuestos fenólicos, taninos, saponinas, proteínas, terpenoides y esteroides. No sobrevivió ningún ratón que recibió el veneno sin *D. lorentense*, y no falleció ninguno al que se le dio sólo el extracto acuoso de *D. lorentense*. Se determinó la DE50 en 91,15 µg/ratón del extracto para neutralizar 2DL50 del veneno. Se encontró que a mayor dosis del veneno de *B. atrox* se necesitó menores dosis del extracto acuoso de *D. lorentense*. **Conclusiones:** el extracto acuoso de *D. lorentense* neutraliza la actividad letal de veneno de *B. atrox*. Es necesario realizar estudios que permitan identificar los metabolitos del extracto que tienen esta acción.

Palabras clave: Plantas medicinales; Fitoterapia; Venenos de serpiente; Antivenenos (fuente: DeCS BIREME).

ABSTRACT

Objective: Determine the capability of *D. lorentense* (jergón sachá) watery extract to neutralize the lethal activity from *B. atrox* snake venom. **Materials and methods:** Fitochemical screening was conducted on the watery extract of the *D. lorentense* dried bulb. The lethal dose was calculated at 50 (DL50) for the extract and venom from *B. atrox*. After that, challenges with varying doses of the extract and the venom injected intraperitoneally in mice after incubation in order to calculate the efficacious dose 50% (DE50) of the extract to neutralize the lethal effect of the venom through the Probits method. **Result:** Fitochemical testing of the extract allowed for the identification of phenolic compounds, tanins, saponins, proteins, terpenoids and steroids. None of the mice which received the venom without *D. lorentense* survived and none of the mice which received the *D. lorentense* watery extract died. DE50 was determined in 91,15 µg/mouse from the extract to neutralize 2DL50 of the venom. It was noted that the larger the *B. atrox* venom, the smaller the dose of *D. lorentense* watery extract. **Conclusions:** *D. lorentense* watery extract neutralizes the lethal activity from the *B. atrox* venom. Further studies are needed to identify the extract metabolites which have this action.

Key words: Medicinal plants; Phytotherapy; Snake venoms; Antivenins (source: DeCS BIREME).

INTRODUCCIÓN

En los últimos años se ha notificado a nivel mundial alrededor de 30 000 a 40 000 muertes por la mordedura de serpientes venenosas; en el Perú, la mayor parte de accidentes ofídicos se produjo en las zonas silvestres de selva alta y baja, nicho ecológico de la serpiente *Bothrops atrox*¹.

La serpiente *B. Atrox*, de la familia *Viperidae*, conocida como *jergón*, *jergona*, *catari*, *achujergón*² es una de las que ocasiona la mayor cantidad de accidentes por ofi-

dios del género *Bothrops* (90 a 95%) registrados en el territorio peruano³.

El veneno de *B. atrox* contiene enzimas proteolíticas, fosfolipasas y miotoxinas^{4,5} que producen alteraciones fisiopatológicas locales en el sitio de la mordedura, así como efectos sistémicos. Los efectos locales más importantes son dolor intenso, edema eritematoso, equimosis, flictenas hemorrágicas y necrosis con infección secundaria; las alteraciones sistémicas incluyen toxicidad vascular, renal y hemorragias^{1,6,7}.

¹ Centro Nacional de Salud Intercultural. Instituto Nacional de Salud. Lima, Perú.

² Centro Nacional de Productos Biológicos. Instituto Nacional de Salud. Lima, Perú.

Los antivenenos producidos en caballos y ovejas son el único tratamiento científicamente validado que actualmente se aplica en los accidentes por ofidios⁸; sin embargo, la mayoría de accidentes suceden en zonas poco accesibles, y debido a la rapidez con que los efectos del veneno se desencadenan y al retardo en la aplicación del antiveneno¹, se ha recurrido a alternativas antes ya usadas como son algunas plantas medicinales con propiedades antiofídicas^{9,10}, en las que se están demostrando la presencia de sustancias inhibidoras de las toxinas de los venenos de serpientes^{11,12}.

Los nativos peruanos usan como antiofídico el bulbo de una planta herbácea llamada *Dracontium loretense Krause*¹³ que pertenece a la familia *Araceae*; mide de 1,5 a 2m de altura, es conocida comúnmente con los nombres de hierba de *jergón*, *sacha jergón*, *hurignpe* (amarakaeri), *mágoro* (machiguenga), caña X (Ecuador), *ronon rao* y *shanvi yorá* (shipiboconibo), *see* (ese eja) y *shandórao* (amahuaca)¹⁴. Crece en bosques húmedos tropicales, con temperatura promedio anual de 18 a 24 °C y precipitación pluvial de 1 200 a 3 300 mm/año. Puede sembrarse en cualquier época del año, excepto durante los meses de menor precipitación (menos de 150 mm/mes); en el Perú se encuentra distribuida en los departamentos de Loreto, Amazonas, Huánuco, Madre de Dios y San Martín¹⁴.

Siendo necesario validar el conocimiento tradicional en evidencia científica, por ello se planteó como objetivo evaluar el efecto neutralizador del extracto acuoso del *Dracontium loretense Krause* sobre la actividad letal del veneno del *B. atrox* en un modelo experimental.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIAL BIOLÓGICO

Extracto acuoso. Los especímenes de *jergón sacha* se recolectaron en la zona de Cueva de las Pavas y Cueva de las Lechuzas en Tingo María, Huánuco, luego fueron identificados como *Dracontium loretense Krause* en el Herbario Nacional del Centro Nacional de Salud Intercultural, Instituto Nacional de Salud en Lima.

Los bulbos recolectados fueron desecados y molidos; 15,2 g del polvo producido se hirvió durante cinco minutos en 150 mL de agua destilada, luego se centrifugó la solución a 5000 rpm y en el filtrado se obtuvo tres capas. Para los ensayos sólo se usaron las capas

superiores (110 mL aproximadamente). El extracto fue dispensado en varios tubos y congelado entre 2 a 8 °C.

Veneno. Se usó el veneno de *B. atrox* (Lote: 9-2-1) producido por el Centro Nacional de Productos Biológicos, Instituto Nacional de Salud (Lima, Perú).

Animales de laboratorio. Se emplearon ratones cepa Balb-c de 17 a 19g de peso, proporcionados por el Laboratorio del Instituto Nacional de Salud (Lima, Perú).

ENSAYOS FITOQUÍMICOS

Se realizó la identificación cualitativa de taninos, aminoácidos, saponinas, flavonoides y alcaloides según el método de Lock de Ugaz para determinar metabolitos secundarios¹⁵. Se usó la cromatografía en capa fina en fase móvil: cloroformo-metanol-agua con vainillina-ácido sulfúrico para detectar terpenoides y esteroides; en la fase móvil: cloroformo-acetato de etilo-agua con bencidina para compuestos fenólicos. Se determinó el contenido de proteínas por el método de Lowry y las cenizas totales según Pharmacopea Europea¹⁶.

ENSAYOS BIOLÓGICOS

Toxicidad aguda. Se determinó la dosis letal 50% (DL50) para el veneno de *B. atrox* y el extracto de *D. loretense* usando grupos de seis ratones, los cuales fueron inyectados vía intraperitoneal con dosis variables del veneno o extracto.

Neutralización del efecto letal del veneno. Se ensayaron cuatro tratamientos con diferentes dosis del extracto acuoso (169,67; 123,03; 79,80 y 51,76 uL/g) contra tres dosis distintas de veneno (2DL50, 3DL50 y 4DL50), además de grupos control (agua destilada por extracto) y blanco (agua destilada por veneno); teniendo en total 20 grupos de estudio con seis ratas cada uno (Tabla 1). Las diferentes combinaciones fueron preincubadas a 37 °C durante 30 minutos para luego ser inyectadas vía intraperitoneal. La mortalidad se registró a las 24, 48 y 72 horas; posteriormente, se sacrificó a los ratones sobrevivientes y se realizó el estudio anatomopatológico a toda la población del estudio en el Laboratorio de Patología del Instituto Nacional de Salud.

Se determinó la dosis letales (DL50) y efectivas (DE50) al 50% por el método de Probits usando el programa "BASIC"¹⁷.

Tabla 1. Relación entre la dosis aplicada del extracto de *D.lorentense* y del veneno de *B. atrox* en los grupos de estudio para el ensayo de neutralización.

Grupo según dosis de <i>D. lorentense</i>	Grupo según dosis de veneno de <i>B. atrox</i>			
	Blanco	2DL50	3DL50	4DL50
Control	0 / (0)	0 / (135,74)	0 / (203,61)	0 / (271,48)
JS1	51,76 / (0)	51,76 / (135,74)	51,76 / (203,61)	51,76 / (271,48)
JS2	79,8 / (0)	79,8 / (135,74)	79,8 / (203,61)	79,8 / (271,48)
JS3	123,03 / (0)	123,03 / (135,74)	123,03 / (203,61)	123,03 / (271,48)
JS4	169,67 / (0)	169,67 / (135,74)	169,67 / (203,61)	169,67 / (271,48)

Nota: Las dosis de *D. lorentense* están expresadas en µL/ratón y de *B. atrox* en µg/ratón.

RESULTADOS

ENSAYOS FITOQUÍMICOS

Las muestras ensayadas de tubérculo desecado, resultaron positivas para taninos, frente a reactivos de gelatina, NaCl 5% y gelatina + FeCl₃, así como a aminoácidos (ninhidrina) y saponinas (espuma). Presentaron reacción positiva a fenoles (FeCl₃), flavonoides (FeCl₃, NaOH 50 % y Shinoda) y alcaloides (Draggendorf, Bouchard, Mayer, Duquenois). Por cromatografía líquida de capa fina se presentó una mancha coloreada con un valor de Rf de 0,07 para terpenoides y esteroides, y para compuestos fenólicos se apreció dos manchas con valores de Rf de 0,81 y 0,83. El contenido de proteínas encontrado en el tubérculo sin desecar fue de 1,2 mg/100 mg y el de cenizas totales 2,54%.

ENSAYOS BIOLÓGICOS

Toxicidad aguda. Se calculó la DL50 para el veneno de *B. atrox* en 67,87 µg/ratón, para el caso del extracto acuoso del *D. lorentense* no se determinó toxicidad

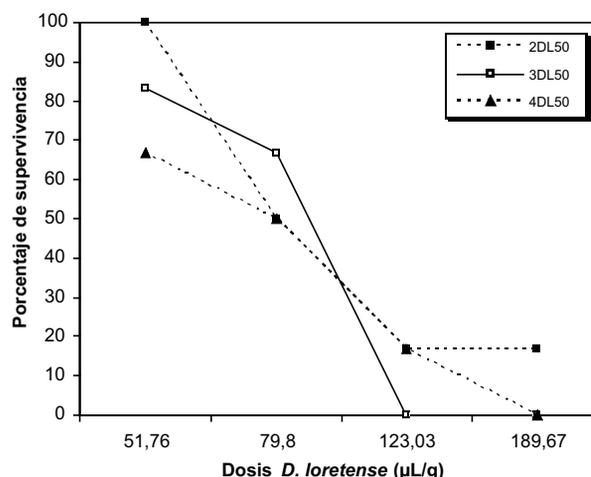
Tabla 2. Determinación de la dosis efectiva 50% del *D. lorentense* para la neutralización del efecto letal del *B. atrox*.

Dosis de veneno de <i>B. atrox</i> *	Extracto acuoso de <i>D. lorentense</i> (µg/ratón)		
	DE50**	Factor de precisión	IC 95%
2DL50	91,15	0,55	51,29 -133,97
3DL50	80,86	0,42	57,65 - 109,14
4DL50	71,12	0,56	31,35 - 99,74

* DL50: una dosis letal al 50% de *B.atrox* equivale a 67,87 µg/ratón del veneno. ** DE50: cantidad necesaria del extracto acuoso de *D.lorentense* en µL/ratón para neutralizar al 50% el efecto letal de la dosis ensayada de veneno de *B.atrox*.

a las dosis ensayadas (se ensayaron hasta dosis de 500 µg/ratón sin observar letalidad hasta 72 horas después).

Neutralización del efecto letal del veneno. No sobrevivió ningún ratón que recibió el veneno sin *D.lorentense*, y no falleció ninguno al que se le dio sólo el extracto acuoso de *D.lorentense*. Se determinó la dosis efectiva al 50% (Tabla 2), se encontró que a mayor dosis del veneno de *B.atrox* se necesitó menores dosis del extracto acuoso de *D.lorentense* (Figura 1). En el estudio histopatológico se halló congestión y dilatación vascular en todos los órganos, en aquel grupo que falleció además se encontró focos de necrosis tubular e hiperplasia de células de Kupffer; a diferencia del grupo sobreviviente en el que sólo se encontró congestión glomerular y un leve engrosamiento de la membrana basal.



* DL50: una dosis letal al 50% de *B.atrox* equivale a 67,87 µg/ratón del veneno.

Figura 1. Porcentaje de supervivencia en los grupos de ensayo según dosis de *D. lorentense* y *B. atrox*.

DISCUSIÓN

Se demostró que el extracto acuoso de *D. loretense* neutraliza la actividad letal del veneno de *B. atrox* en el modelo experimental usado, este procedimiento basado en la incubación del extracto junto al veneno previo a la inyección, facilita la interacción de las toxinas con potenciales sustancias neutralizadoras, y es mejor que los experimentos basados en la inyección independiente del veneno y los extractos^{18,19}, ya que en este caso la rapidez con que se desencadena el efecto del veneno en los tejidos hace difícil su inhibición por agentes neutralizantes²⁰.

En 1992, Martz¹² informó sobre la capacidad de algunas plantas de inhibir algunas actividades del veneno de serpientes, observaciones similares a las reportadas por Otero *et al.* que dan a conocer el uso de plantas medicinales en la atención de cuadros clínicos de ofidismo por los curanderos del noroccidente colombiano^{9,21}, que luego las evalúan experimentalmente para observar su capacidad para neutralizar el efecto letal, hemorrágico y enzimático del veneno de *B. atrox*^{22,23}, como en Costa Rica donde se ha estudiado la capacidad de plantas tropicales para neutralizar el efecto hemorrágico del veneno de *Bothrops asper*²⁴.

Al evaluar el extracto acuoso del *D. loretense Krause* frente al veneno de *B. atrox*, en base a la información etnobotánica¹³, se comprobó la capacidad neutralizante del extracto frente al veneno; el alto grado de efectividad de los extractos, abre las posibilidades de estudiar nuevos compuestos con propiedades antiofídicas en plantas medicinales peruanas.

Si bien el *screening* fitoquímico detectó la presencia de terpenoides y esteroides, compuestos fenólicos, taninos, saponinas, aminoácidos y proteínas, es necesario mejorar los procesos de extracción, purificación e identificación de los metabolitos encontrados, y enfrentarlos en forma independiente para conocer cuales de sus compuestos son los que tienen la acción neutralizante.

Así mismo, es necesario trabajar con el extracto crudo de *D. loretense* ya que presenta un perfil diferente de metabolitos con mayor predominio de compuestos fenólicos que el extracto de tubérculo desecado usado para este estudio (Lovera A, datos no publicados).

En conclusión, el extracto acuoso del *D. loretense Krause* neutraliza el veneno de *B. atrox* en experimentos donde el veneno y los extractos se incuban previo a su inyección. Es necesario profundizar en el estudio de

los metabolitos encontrados, así como continuar con el ensayo de neutralización del extracto crudo del *D. Loretense* frente al veneno de *B. atrox* y veneno de otras serpientes.

AGRADECIMIENTOS

Nuestro sincero agradecimiento al Laboratorio de Rekmec del Centro Nacional de Productos Biológicos, al Centro Nacional de Alimentación y Nutrición y al Centro Nacional de Control de Calidad del INS por facilitar el uso de sus equipos para la realización de la investigación; a la Dra. María Luz Miraval por su apoyo en el estudio anatomopatológico, y al Dr. Percy Mayta en la redacción del artículo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Manrique H.** Ofidismo. Lima: OGE/INS; 2000. Serie de módulos técnicos.
2. **Lévano J, Fernández R.** Diagnóstico y tratamiento de los accidentes por animales ponzoñosos. Lima: Instituto Nacional de Salud; 2004.
3. **Zavaleta A.** Mordedura de serpiente (ofidismo): un problema de salud en el Perú. Rev Med Hered 2004; 15(2): 61-63.
4. **Pantigoso C, Escobar E, Málaga O, Yarleque A.** Aislamiento y algunas propiedades de la atroxina, una proteínaza del veneno de la serpiente peruana *Bothrops atrox* "jergón". Acta Cient Venez 1996; 47: 67-73.
5. **Huatuco S, Escobar E, Yarleque A.** Aislamiento y caracterización parcial de una miotoxina del veneno de la serpiente *Bothrops atrox* (Ophidia: Viperidae). Rev Peru Biol 2004; 11(1): 79-86.
6. **Villanueva M, Maguiña C, Cabada M, De Marini J, Alvarez H, Gotuzzo E.** Ofidismo en la provincia de Chanchamayo, Junín: Revisión de 170 casos consecutivos en el Hospital de Apoyo de La Merced. Rev Med Hered 2004; 15(2): 82-88.
7. **Pinho FMO, Pereira ID.** Ofidismo. Rev Ass Med Brasil 2001; 47(1): 24-29.
8. **Gutiérrez JM.** Comprendiendo los venenos de serpientes: 50 años de investigaciones en América Latina. Rev Biol Trop 2002; 50(2): 377-94.
9. **Otero R, Fonnegra R, Jiménez SL, Nunez V, Evans N, Alzate SP, et al.** Snakebites and ethnobotany in the northwest region of Colombia: Part I: traditional use of plants. J Ethnopharmacol 2000; 71(3): 483-504.
10. **Mebs D.** Notes on the traditional use of plants to treat snake bite in northern Papua New Guinea. Toxicon 2000; 38(2): 299-302.
11. **Soares AM, Ticli FK, Marcussi S, Lourenco MV, Januario AH, Sampaio SV, et al.** Medicinal plants with inhibitory properties against snake venoms. Curr Med Chem 2005; 12(22): 2625-41.
12. **Martz W.** Plants with a reputation against snakebite. Toxicon 1992; 30(10): 1131-42.

13. **Desmarcheier C, Schaus FW.** Sixty medicinal plants from the Peruvian Amazon. Ecology, ethnomedicine and bioactivity. Lima: Ed. Proterra; 2000.
 14. **Perú, Ministerio de Agricultura.** Lima: Líneas de cultivos emergentes; Plantas medicinales: Jergón sachá [página de internet]; 2005. [Fecha de acceso: febrero del 2006]. Disponible en www.portalagrario.gob.pe/agricola/pro_medi_jergon.shtml.
 15. **Lock O.** Investigación fitoquímica; métodos en el estudio de productos naturales. 2^{da} ed. Lima: Fondo Editorial Pontificia Universidad Católica del Perú; 1994.
 16. **European Pharmacopoeia.** European Pharmacopea. 4th ed. Strasbourg: Council and European Parliament; 2002.
 17. **Castro de la Mata R, Zavaleta A.** Programa en "Basic" para el cálculo de DL50 por el método de Probits. Rev Med Exp 1998; 15(1-2): 45-54.
 18. **Gutiérrez JM, Gene JA, Rojas G, Cerdas L.** Neutralization of proteolytic and hemorrhagic activities of Costa Rican snake venoms by a polyvalent antivenom. Toxicon 1985; 23(6): 887-93.
 19. **Gutiérrez JM, León G, Rojas G, Lomonte B, Rucavado A, Chaves F.** Neutralization of local tissue damage induced by *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom. Toxicon 1998; 36(11): 1529-38.
 20. **Castro O, Gutierrez JM, Barrios M, Castro I, Romero M, Umaña E.** Neutralización del efecto hemorrágico inducido por veneno de *Bothrops asper* (Serpentes: Viperidae) por extractos de plantas tropicales. Rev Biol Trop 1999; 47(3): 605-16.
 21. **Otero R, Fonnegra R, Jiménez S.** Plantas utilizadas contra mordeduras de serpientes en Antioquia y Chocó, Colombia. Medellín: Editora Grandacolor/Universidad de Antioquia; 2000.
 22. **Otero R, Nuñez V, Jiménez SL, Fonnegra R, Osorio RG, García ME, et al.** Snakebites and ethnobotany in the northwest region of Colombia Part II: Neutralization of letal and enzymatic effect of *Bothrops atrox* venom. J Ethnopharmacol 2000; 73(3): 505-11.
 23. **Otero R, Nuñez V, Barona J, Fonnegra R, Jiménez JL, Osorio RG, et al.** Snakebites and ethnobotany in the northwest region of Colombia Part III: Neutralization of the haemorrhagic effect of *Bothrops atrox* venom. Journal of Ethnopharmacology 2000; 73(1-2): 233-41.
-
- Correspondencia:** Q.F. Amanda Lovera Arellano. Centro Nacional de Salud Intercultural, Instituto Nacional de Salud, Lima, Perú.
Dirección: Cápac Yupanqui 1400, Lima 11.
Teléfono (511) 471-9920
Correo electrónico: alovera@ins.gob.pe