

Validación del uso tradicional de especies de *Asclepias* contra el veneno de *Bothrops diporus* (yará chica) en el Nordeste de Argentina

[Validation of the traditional use of *Asclepias* species against *Bothrops diporus* (yará chica) venom in Northeast of Argentina]

Bárbara V. Ricciardi-Verrastro¹, Ana M. Torres¹, Francisco J. Camargo¹ & Eduardo S. Dellacassa²

¹Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura, Universidad Nacional del Nordeste, Corrientes, Argentina

²Facultad de Química, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

Contactos / Contacts: Eduardo S. DELLACASSA - E-mail address: edellac@fq.edu.uy

Abstract: The Asclepiadaceae family has been reported by its use in ethnomedicine. In the northeast of Argentina, *A. mellodora* and *A. curassavica* are traditionally used in ofidic accidents as poultices. In this work, aqueous, alcoholic and hexanoic extracts were analyzed by SDS-PAGE to determine their anti-snake activity. The *in vitro* study of the inhibitory ability of the following activities: proteolytic, indirect hemolytic activity and inhibition of the coagulant activity, allowed demonstrating that both species were active against venom, being *A. mellodora* the most active. Statistically, all extracts of *A. mellodora* were active against venom in the inhibition of the coagulant activity, without significant differences with respect to the organ used; which is consistent with the traditional use as external poultice. The alcoholic extract of *A. mellodora* roots was subjected to a bio-guided separation. The fractions obtained were enriched in compounds which could probably be responsible for the activity against venom.

Keywords: alexiteric activity, *in vitro* activity, *Asclepia mellodora*, *Asclepia curassavica*

Resumen: La familia Asclepiadaceae posee tradición en etnomedicina. En el nordeste argentino, *A. mellodora* y *A. curassavica* se utilizan como cataplasmas en accidentes de ofidios. En este trabajo, los extractos acuosos, etanólicos y hexánicos de *A. mellodora* y *A. curassavica* se evaluaron por SDS-PAGE para determinar su actividad alexitérica. El estudio *in vitro* de la capacidad inhibitoria de las actividades proteolítica, hemolítica indirecta y coagulante permitieron determinar que ambas especies manifiestan actividad, siendo *A. mellodora* más activa. Estadísticamente los extractos de *A. mellodora* fueron igualmente activos contra el veneno de *Bothrops diporus* y no mostraron diferencias significativas respecto del órgano utilizado en la inhibición de la actividad coagulante. Este resultado está en consonancia con la forma tradicional de su uso como cataplasma. Sobre el extracto etanólico de las raíces de *A. mellodora* se realizó un fraccionamiento bio guiado que permitió identificar fracciones de compuestos responsables de la actividad.

Palabras clave: actividad alexitérica, actividad *in vitro*, *Asclepia mellodora*, *Asclepia curassavica*

Recibido | Received: 29 de Junio de 2015

Aceptado | Accepted: 21 de Octubre de 2015

Aceptado en versión corregida | Accepted in revised form: 21 de Enero de 2016

Publicado en línea | Published online: 30 de Marzo de 2016

Este artículo puede ser citado como / This article must be cited as: BV Ricciardi-Verrastro, AM Torres, FJ Camargo, ES Dellacassa. 2016. Validación del uso tradicional de especies de *Asclepias* contra el veneno de *Bothrops diporus* (yará chica) en el Nordeste argentino. *Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat* 15 (2): 112 – 121.

INTRODUCTION

Las especies del género *Asclepias* se encuentran ampliamente distribuidas en América del sur, localizándose dos de ellas principalmente en el nordeste de la Argentina *A. mellodora* y *A. curassavica* (Bayon & Arambarri, 1999; McCargo et al., 2010).

A. mellodora A. St- Hill. (Asclepiadaceae) es conocida vulgarmente en Corrientes como *yerba de la víbora* o *mboycaá* (Lauge et al., 2008; Cid et al., 2011). Es utilizada en la medicina tradicional para aliviar el dolor de estómago por sus propiedades antiespasmódicas (Rondina et al., 2008); las cenizas de sus partes aéreas como vulnerario, la decocción de sus hojas se ingiere contra afecciones pulmonares (Scarpa, 2009); y también se usa en quemaduras de la piel (Arenas, 1981).

A. curassavica L. está descripta como abortiva (Arbelaez, 1975), es utilizada como purgante (Salinas & Grijalva, 1994) y en el tratamiento del cáncer nasofaríngeo, tumores o verrugas (Giordani et al., 2000; Neto et al., 2002; Roy et al., 2005; Li et al., 2009). Posee actividad antiviral contra el virus de la polio y del herpes (Ribeiro, 1996) y su extracto etanólico presenta actividad antimicrobiana (Neto et al., 2002; Kurdekar et al., 2012). Su látex ingerido por vía oral tiene actividad vermífuga, utilizándose tópicamente como antiinflamatorio, antipirético (Bernal & Correa, 1989) y en erupciones cutáneas (Balée, 1994).

Por otra parte, escritos que datan de la época de la colonia, refieren el uso de ambas especies para contrarrestar los accidentes por mordeduras de víboras (actividad alexitérica) (Montenegro, 1711). A su vez, las hojas frescas de *A. curassavica* eran aplicadas como cataplasma en accidentes ofídicos (Reyes-Chilpa & Jimenez-Estrada, 1995). La especie también es citada como ornamental y antiveneno (Liggieri et al., 2004; Roy et al., 2005; López-Sáez & Perez-Soto, 2009), en particular, como antiveneno contra *Bothrops asper* Garman (Serpentes: Viperidae) (Castro et al., 1999; Makhija & Khamar, 2010)

El 97% de los accidentes con ofidios en las Provincias de Chaco, Formosa, Misiones, Salta y Santiago del Estero (Abriata, 2008) son provocados por víboras del género *Bothrops*, lo que representa un grave problema para la Salud Pública Argentina. En particular en las zonas rurales, donde buena parte de

la población frecuentemente se encuentra alejada de centros asistenciales. En la búsqueda de tratamientos alternativos para accidentes por picaduras de víboras del género *Bothrops*, en este trabajo se presentan los resultados del estudio de la actividad antiveneno de extractos de *A. mellodora* y *A. curassavica* contra el veneno de *B. diporus*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se colectaron partes aéreas (flores, frutos, hojas y tallos) y raíces de *A. mellodora* de en tres estadios vegetativos diferentes: otoño (I), primavera (II) y verano (III) en la ciudad de Corrientes, Corrientes, Argentina (27,46° S latitud, 58,77° W longitud, 67 m altitud), de manera de realizar un análisis estacional. Un ejemplar fue depositado en el herbario de Corrientes (IBONE, CONICET-UNNE, AMTORRES 001). La presencia de *A. curassavica* es baja en la región, por lo que, para fines comparativos, se colectaron las partes aéreas en San Lorenzo, Saladas, Argentina (28,70° S latitud, 58,47° W longitud, 65 m altitud) en primavera depositando un ejemplar en el herbario de Corrientes (IBONE, CONICET-UNNE, A.M.TORRES 11).

Preparación de los extractos

El material vegetal se secó por venteo, se separó las partes aéreas de las raíces, se molió y tamizó (tamiz 12). Se tomaron 150 gramos de cada material para preparar los extractos (300 mL de cada solvente) acuoso por maceración durante 24 h con agua destilada (Melo et al., 1994), etanólico por maceración durante 48 h (Otero et al., 2000) con etanol 96% y hexánico por maceración durante 48 h con hexano. Todos los extractos fueron filtrados y desecados en rotavapor (40° C) hasta obtener un residuo sólido que fue conservado en desecador al vacío hasta su uso, reconstituyéndolos con el mismo solvente.

Veneno

Fue cedido por el serpentario de Corrientes y obtenido por expresión manual a partir de varios ejemplares de *B. diporus*. Fue desecado a presión reducida y conservado a -20° C hasta su uso, donde se reconstituyó con solución fisiológica (Otero et al., 2000).

Screening de la actividad antiveneno

Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE)

Los reactivos se prepararon según la técnica de Pilosof y Bartholomai (2000). Se utilizó gel de separación al 12% y gel de concentración al 4%. Al buffer muestra pH 6,8, se le agregó 3,36 g de urea para mejorar la visualización. El mercaptoetanol se agregó a las muestras, pero no a los buffers. En la calle 1 se sembró el patrón de bajo peso molecular (Bio-Rad, Argentina); en la calle 2 el veneno de yarará chica. Las calles impares 3, 5, 7 se sembraron con los distintos extractos preincubados con el veneno (30 minutos a 37° C) para evaluar la capacidad neutralizante del veneno que se evidencia mostrando un patrón de bandas diferente al del veneno puro. Las calles pares 4, 6, 8 se sembraron los extractos puros, para descartar la presencia de proteínas vegetales que pudieran interferir en la interpretación de los resultados.

Las corridas se realizaron utilizando un equipo Miniprotean 4 (Bio-Rad, Argentina) a 15 mA por gel y luego se coloreó con azul de Coomassie.

Inhibición de la actividad proteolítica del veneno por la técnica de SDS-PAGE

(Pardo & Natalucci, 2002; Gay *et al.*, 2004; Camargo *et al.*, 2011).

Se utilizó gel de separación al 10% y de concentración al 4%. Se sembró: calle 1, caseína pura para evaluar el patrón de bandas correspondiente a la proteína; calle 2, el veneno preincubado (1 h a 37° C) con caseína donde se observó que no presenta banda alguna debido a proteólisis del veneno. Las calles impares restantes 3, 5, 7 se sembraron con los distintos extractos preincubados con veneno (1 h a 37° C), y el sobrenadante preincubado con caseína (1 h a 37° C) para evaluar la actividad inhibitoria de los extractos sobre las proteasas del veneno, lo cual se manifiesta con un perfil de bandas igual al de la proteína pura. Las calles pares 4, 6, 8 se sembraron con los extractos vegetales puros preincubados con caseína (1 h a 37° C) para observar la posible presencia de proteasas vegetales que pudiera interferir en los resultados. En estas calles se deben observar las bandas de la caseína para que el análisis por SDS-PAGE sea posible.

Las corridas se realizaron utilizando un equipo Miniprotean 4 (Bio-Rad, Argentina) a 25 mA por gel y luego se coloreó con azul de Coomassie.

Inhibición de la actividad hemolítica indirecta del veneno por difusión radial en placas de agar sangre-fosfatidilcolina

(Gutiérrez *et al.*, 1988; Otero *et al.*, 1995).

Los extractos se reconstituyeron con los solventes correspondientes (agua, etanol 96° y hexano) al momento de su uso. Se prepararon las placas y se sembraron distintas soluciones de veneno para determinar previamente la dosis hemolítica mínima del veneno (DHM): dosis que genera un halo de hemólisis de 10 mm luego de 20 h de incubación.

Posteriormente, se sembró el sobrenadante de los distintos extractos previamente incubados con el veneno en relación 1:10 veneno/extracto (V:E), 30 minutos a 37° C, en los pocillos para evaluar la capacidad inhibitoria de los extractos sobre la fosfolipasa A2, responsable de la actividad hemolítica *in vitro* del veneno y la DHM del veneno puro como patrón.

Se incubó 20 h a 37° C en cámara húmeda y se midió el halo de hemólisis. Una reducción del halo con respecto al producido por el veneno puro, indica inhibición *in vitro* de la actividad del veneno.

Inhibición de la actividad coagulante del veneno por tiempo de recalcificación del plasma citratado

(Iovine & Selva, 1985).

La técnica se modificó añadiendo 10 µL de solución fisiológica, solución de veneno o del sobrenadante del veneno preincubado con el extracto (30 minutos a 37° C) a los 0,2 mL de plasma y 0,2 mL de CaCl₂ 0,025 M. Se obtuvo respectivamente el tiempo de coagulación normal (TC, 60-180 segundos), la dosis coagulante mínima (MCD: dosis de veneno que reduce a un minuto el tiempo de coagulación) y la capacidad del extracto para inhibir la actividad coagulante del veneno.

Inhibición de la actividad fibrinogenolítica del veneno por SDS-PAGE

(De Roodt *et al.*, 2005)

Se analizó la variación de los perfiles electroforéticos de fibrinógeno y fibrinógeno incubado con veneno, luego que el veneno ofídico fuera sometido a la acción de los extractos activos sobre la actividad coagulante, a fin de observar si los mismos ejercen su acción sobre las enzimas responsables de la degradación del fibrinógeno.

Para ello se sembraron: 1, fibrinógeno (25 mg/mL) para observar el patrón de bandas; 2,

sobrenadante de veneno más fibrinógeno (relación 1:20 veneno:fibrinógeno) incubados 1 h a 37° C para observar la actividad del veneno de *B. diporus* sobre el fibrinógeno (desaparecen las bandas α de 63 KDa y β de 56 KDa, manteniéndose la γ de 47 KDa); 3, sobrenadante de veneno más extracto más fibrinógeno (veneno + extracto activo incubados 1 h a 37° C y el sobrenadante incubado con fibrinógeno 1 h a 37° C) para observar la inhibición o no de la actividad del veneno por el extracto; 4, extracto activo más fibrinógeno incubados 1 h a 37° C de manera de controlar que ésta, por si sola, tenga la capacidad de introducir modificaciones en el perfil electroforético del fibrinógeno.

Análisis estadístico

Actividad de los extractos

Los resultados para las pruebas *in vitro* fueron evaluados estadísticamente utilizando el modelo *t* de Student, considerando conjuntos pareados de valores del veneno antes y después del tratamiento con los extractos vegetales respectivos mediante el software estadístico Infostat 2011.

La evaluación fue realizada sobre los resultados de coagulación, con la finalidad de comprobar si existen diferencias significativas entre el conjunto de valores correspondientes al tiempo de coagulación del plasma sometido directamente a la acción del veneno ofídico (tiempo coagulación veneno) y los correspondientes a los valores del tiempo de coagulación del plasma sometido a la acción del veneno ofídico, previamente tratado con los extractos vegetales considerados (tiempo coagulación veneno + extracto).

Diferencia de actividad entre los distintos extractos

Se comparó el nivel de protección brindado por los extractos acuosos, alcohólicos y hexánicos de *A. mellodora* contra la acción coagulante del veneno de *B. diporus* a través del análisis de la varianza para más de dos grupos (ANOVA).

Se tomó como variable el tiempo de restitución hacia valores normales (expresado en segundos) obteniéndose este valor a partir de la diferencia entre el tiempo de coagulación post tratamiento y el tiempo de coagulación por acción directa del veneno sin tratamiento.

Diferencia estadística entre partes aéreas y raíces

Para evaluar la conveniencia de que órgano utilizar, se recurrió a la Prueba *t* de Student para muestras independientes.

Estudio fitoquímico

Se verificó la presencia de alcaloides, fenoles, esteroides y triterpenos, taninos, flavonoides, quinonas, glucósidos cardiotónicos, saponinas y cumarinas (Wagner & Bladt, 2001; Colegate & Molyneux, 2008).

Fraccionamiento bioguiado por cromatografía flash y SDS-PAGE

El extracto alcohólico de raíces de *A. mellodora* se sembró en una columna (24 x 400 mm, sílica gel flash 60 0,04-0,063 mm, MN) conectada a una bomba de aire CX-1000. Se utilizó como solvente de corrida una serie eluotrópica de hexano-acetato de etilo-metanol en proporciones de polaridad creciente, recogiendo en tubos de 5 ml el eluido, y mediante cromatografía en capa fina (TLC) se reunieron en fracciones los tubos que dieron igual perfil cromatográfico.

Screening de actividad de las fracciones por SDS-PAGE

Se tomaron cada una de las fracciones colectadas de la columna flash y se realizó una electroforesis SDS-PAGE en iguales condiciones que las descriptas anteriormente.

TLC

La evaluación de la composición diferencial de las distintas fracciones se realizó utilizando acetato de etilo-metanol (6:4) como fase móvil. Las placas fueron observadas bajo luz UV a 254 y 365 nm, y posteriormente se revelaron con anisaldehído sulfúrico (100° C, 5 minutos).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla 1 se presentan los resultados de la interacción entre los extractos de *A. mellodora* y *A. curassavica* con el veneno de *B. diporus*. La Figura 1 muestra la actividad de los extractos de las raíces de primavera de *A. mellodora* por SDS-PAGE. La modificación del perfil de bandas del

veneno+extracto es indicativa de actividad contra veneno. La Figura 2 muestra la inhibición de la actividad proteolítica del veneno. En la Figura 3, se puede observar que los extractos activos de *A. mellodora* poseen actividad inhibitoria de las enzimas fibrinogenolíticas presentes en el veneno de *B. diporus*. Se trata de metaloproteasas que rompen

preferencialmente la cadena α de la fibrina y fibrinógeno y más lentamente la cadena β de estas proteínas, llevando a impedir la coagulación sanguínea en el accidente ofídico. A partir de este resultado, se puede inferir al menos una de las formas de acción de los extractos sobre la capacidad coagulante.

Tabla 1

Pruebas *in vitro*: SDS-PAGE, inhibición de las actividades proteolítica, hemolítica indirecta y coagulante: PA1: extracto acuoso de partes aéreas; PA2: extracto alcohólico de partes aéreas; PA3: extracto hexánico de partes aéreas - R1: extracto acuoso de raíces; R2: extracto alcohólico de raíces; R3: extracto hexánico de raíces. I: Otoño; II: Primavera; III: Verano. (*) Relación veneno/extracto.

	PA ₁	PA ₂	PA ₃	R ₁	R ₂	R ₃
SDS-PAGE						
<i>A. mellodora</i>						
I	Si	No	No	No	Si	No
II	No	No	No	Si	Si	No
III	Si	No	No	Si	Si	No
<i>A. curassavica</i>	Si	No	Si	-	-	-
Inhibición de la Actividad proteolítica						
<i>A. mellodora</i>						
I	No	Si	Si	No	Si	Si
II	Si	Si	No	Si	Si	No
III	Si	Si	No	Si	Si	No
<i>A. curassavica</i>	No	No	No	-	-	-
Inhibición de la Actividad hemolítica						
<i>A. mellodora</i>						
I	No	Si	No	No	Si	Si
II	No	Si	No	No	Si	No
III	No	Si	No	No	Si	No
<i>A. curassavica</i>	No	Si	Si	-	-	-
Inhibición de la Actividad coagulante						
<i>A. mellodora</i>						
I (1:5)*	No	Si 28%	Si 71%	Si 45%	Si 55%	No
II (1:10)*	No	No	No	Si 21%	Si 12%	No
III (1:10)*	Si 27%	Si 15%	Si 17%	Si 10%	Si 13%	Si 15%
<i>A. curassavica</i> (1:30)*	No	No	Si 28%	-	-	-

Figura 1

Screening de la actividad alexitéra por SDS-PAGE de *A. mellodora* (II): PM: patrones de peso molecular; V: veneno; R1: extracto acuoso de raíces + veneno; R1*: extracto acuoso de raíces patrón; R2: extracto alcohólico de raíces+ veneno; R2*: extracto alcohólico de raíces patrón; R3: extracto hexánico de raíces + veneno; R3*:extracto hexánico de raíces patrón. Se observa en la figura la modificación en el patrón de bandas de los extractos activos en relación al veneno patrón. Relación veneno:extracto (1:20).

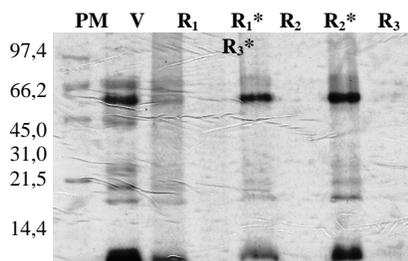


Figura 2

Inhibición de la actividad proteolítica de *A. mellodora* (II): C: caseína; V: veneno + caseína; R1: extracto acuoso de raíces + veneno + caseína; R1*: extracto acuoso de raíces + caseína; R2: extracto alcohólico de raíces + veneno + caseína; R2*: extracto alcohólico de raíces + caseína; R3: extracto hexánico de raíces + veneno + caseína; R3* extracto hexánico de raíces + caseína.

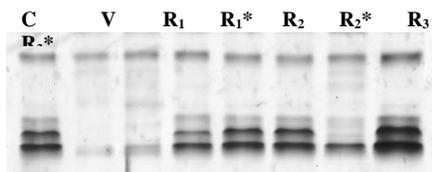


Figura 3

Inhibición de la actividad fibrinogenolítica por raíces alcohólicas de *Asclepia mellodora* en distintas estaciones: 1: patrón de fibrinógeno; 2: Veneno + fibrinógeno; 3: R2I extracto de raíz alcohólica de otoño+ veneno + fibrinógeno; 4: extracto R2I + fibrinógeno; 5: extracto R2II raíz alcohólica de primavera + veneno + fibrinógeno; 6: extracto R2II + fibrinógeno; 7: extracto R2III raíz alcohólica de verano+ veneno + fibrinógeno; 8: extracto R2III + fibrinógeno.

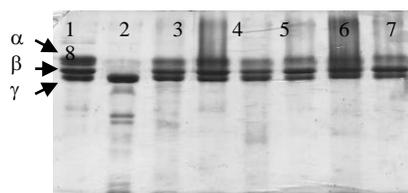
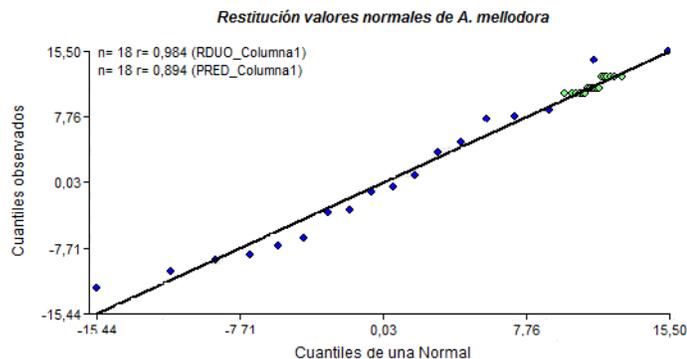


Figura 4
Q – Q plot de los diferentes extractos de *A. mellodora*



Los extractos (acuoso, alcohólico y hexánico) de *A. mellodora* obtenidos en las tres estaciones evaluadas produjeron una inhibición estadísticamente significativa ($p < 0,05$) de la actividad coagulante del veneno. Cuando se realizó la comparación estadística del nivel de protección brindado por los extractos acuoso, alcohólico y hexánico de *A. mellodora* contra la acción coagulante del veneno de *B. diporus*, se encontró que los datos analizados presentaron una distribución

normal obteniéndose homogeneidad de resultados en todos los casos, lo que indicó un alto nivel de reproducibilidad (Figura 4). Para el análisis propuesto se obtuvo un valor de $p = 0.9268$ lo que permitió validar el hecho de que no existen diferencias significativas entre los grupos de datos comparados, lo que determina que el nivel de protección brindado por cualquiera de los extractos es igualmente efectivo (Figura 5).

Figura 5
Box-Plot de los diferentes extractos de *A. mellodora*

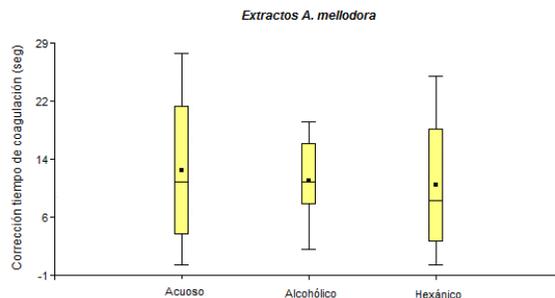
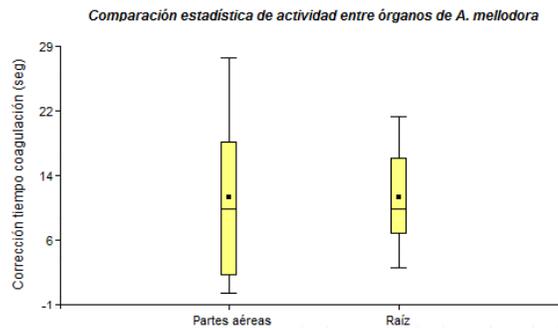


Figura 6
Gráficos Box-Plot de los extractos de las partes aéreas y la raíz



No se encontraron diferencias significativas entre los valores de corrección del tiempo de coagulación de los extractos correspondientes a las partes aéreas y raíces ($p = 0,9789$), por lo que el tratamiento con cualquiera de los órganos de la planta resultó ser igualmente efectivo (Figura 6).

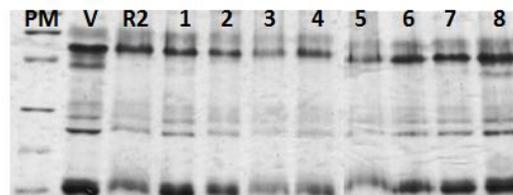
En el extracto alcohólico de raíz de *A. mellodora*, el estudio fitoquímico permitió identificar compuestos pertenecientes a los grupos de alcaloides, fenoles cardenólidos y saponinas.

Con el objetivo de obtener más información acerca de los grupos de productos naturales involucrados en las actividades detectadas, se decidió realizar un fraccionamiento bioguiado del extracto alcohólico de raíz. Se decidió trabajar con este extracto por dos razones fundamentales. En primer lugar, en general, las raíces no producen clorofila, lo que hace que sus extractos sean más fácilmente enriquecidos en sus componentes y, por lo tanto, más accesible el trabajo fitoquímico. Por otra parte, las características del material vegetal determinaron que

se dispusiera de mayor cantidad de raíces en primavera que de otras partes. Como resultado, se obtuvieron ocho fracciones las que, a excepción de la primera y de la última fracción, todas presentaron actividad. Se buscó encontrar la fracción capaz de explicar la actividad del extracto entero a fin conocer en cuál de ellos se encuentra el/los compuestos activos de la planta. Las fracciones 3, 4 y 5 resultaron ser más activas incluso que el extracto alcohólico entero (Figura 7). Se observó un grupo de componentes comunes en las fracciones más activas para un R_f de 0,96 revelado con anisaldehído ácido sulfúrico y con UV 365nm. Estos compuestos podrían ser responsables de la actividad de las mencionadas fracciones. El revelado positivo con reactivo de Kedde (Wagner & Bladt, 2001) permite suponer la presencia de glicósidos cardiotónicos tal como ha sido reportado previamente para *Asclepias curassavica* (Warashina et al., 2008; Li et al., 2009; Zhang et al., 2014).

Figura 7

Fraccionamiento bioguiado por SDS-PAGE del extracto alcohólico de *A. mellodora*: PM: marcador de peso molecular; V: veneno patrón; R2: extracto alcohólico de raíces entero más veneno; 1: fracción 1+V; 2: fracción 2+V; 3: fracción 3+V; 4: fracción 4+V; 5: fracción 5+V; 6: fracción 6+V; 7: fracción 7+V; 8: fracción 8+V.



CONCLUSIONES

Ambas especies de *Asclepias* presentes en la región presentaron actividad contra el veneno de *B. diporus*, particularmente sobre la capacidad de inhibición de la actividad coagulante. *A. mellodora* presentó mayor actividad. Esta actividad resultó ser igual en todos los estados vegetativos de la planta, como así también en los distintos órganos de la misma, lo cual coincide con la forma popular de uso: cataplasma. Asimismo se identificaron tres grupos de compuestos presentes en el extracto alcohólico: alcaloides, fenoles y saponinas, y se logró aislar ocho fracciones de las cuales tres resultaron enriquecidas en componentes alexitéricos activos. Por otra parte, en esta etapa del estudio no puede descartarse la presencia de otras estructuras con comportamiento cromatográfico similar a los descriptos, como ocurre con los glicósidos cardiotónicos y las saponinas. Por lo que, en futuros trabajos, se pretende avanzar en la elucidación estructural de los componentes mediante HPLC-MSn, sin perder de vista la realización de estudios toxicológicos que nos indiquen su inocuidad o toxicidad.

REFERENCIAS

- Arenas P. 1981. **Etnobotánica lengua maskoy**. Ed. Fundación para la Educación, la Ciencia y la Cultura, Buenos Aires, Argentina.
- Abriata G. 2008. **Envenenamiento por animales ponzoñosos**. Boletín Epidemiológico Periódico N°39. Ministerio de Salud de la Nación, Argentina.
- Arbelaez E. 1975. **Plantas medicinales y venenosas de Colombia: estudio botánico, étnico, farmacéutico, veterinario y forense**. Ed. Furugugu, Medellín, Colombia.
- Bayon ND, Arambarri AM. 1999. Anatomy and ethnobotany of the medicinal species of the pampean province: Asclepiadaceae. **Acta Farm Bonaerense** 181: 23 - 31.
- Balée W. 1994. **Footprints of the forest – Ka'apothnobotany – the historical ecology of plant utilization by an amazonian people**. Columbia University Press, New York, USA.
- Bernal H, Correa J. 1989. **Especies vegetales promisorias de los países del convenio Andrés Bello**. Série Ciência e Tecnologia, Bogotá, Colombia.
- Cid MS, Indurain C, Odriozola E, Brizuela MA, Lauge M. 2011. Diagnose of the ingestion of *Asclepias mellodora* St. Hil. by sheep through microhistological analysis of their digestive contents. **Pesq Vet Bras** 312: 111 - 116.
- Camargo F, Torres AM, Ricciardi G, Ricciardi A, Dellacassa E. 2011. SDS PAGE: a useful tool for preliminary screening of antsnake activity of plant extracts. **Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat** 10: 429 - 434.
- Castro O, Gutiérrez JM, Barrios M, Castro I, Romero M, Umaña E. 1999. Neutralización del efecto hemorrágico inducido por veneno de *Bothrops asper* Serpentes:Viperidae por extractos de plantas tropicales. **Rev Biol Trop** 473: 605 - 616.
- Colegate SM, Molyneux RJ. 2008. **Bioactive natural products. Detection, isolation, and structural determination**. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, Florida, USA.
- De Roodt A, Estévez-Ramírez J, Paniagua-Solís JF, Litwin S, Carvajal Saucedo A, Dolab JA, Robles-Ortiz LE, Alagón A. 2005. Toxicidad de venenos de serpientes de importancia médica en México. **Gac Méd Méx** 141: 13 - 21.
- Gay C, Leiva L, Ruiz R, Acosta O. 2004. Inhibición de la actividad proteolítica del veneno de *Bothrops alternatus* por quelantes de metales. **Comunicaciones Científicas y Tecnológicas UNNE** 015.
- Giordani R, Tolla D, Regli P, Buc J. 2000. Role of terpenes from *Asclepias curassavica* latex for antifungal activity. **J Mycol Med** 10: 34 - 38.
- Gutiérrez J, Avila C, Rojas E, Cerdas L. 1988. An alternative *in vitro* method for testing the potency of the polyvalent antivenom produced in Costa Rica. **Toxicon** 26: 411 - 413.
- Iovine E, Selva A. 1985. **El laboratorio en la práctica clínica**. 3° Edición. Panamericana, 168-169.
- Kurdekar RR, Hegde GR, Hebbar SS. 2012. Antimicrobial efficacy of *Bridelia retusa* Linn. Spreng. and *Asclepias curassavica* Linn. Indian **J Nat Prod Res** 3: 589 - 593.
- Lauge M, De Otazúa O, Cantón G, Moore P, Odriozola E. 2008. Intoxicación experimental con *Asclepias mellodora* St. Hilare “yerba de la víbora” en ovinos. **Vet Arg** 241: 22 - 33.
- Li JZ, Qing C, Chen CX, Hao XJ, Liu HY. 2009. Cytotoxicity of cardenolides and cardenolide

- glycosides from *Asclepias curassavica*. **Bioorg Med Chem Lett** 19: 1956 - 1959.
- Liggieri C, Arribére MC, Trejo SA, Canals F, Avilés FX, Priolo NS. 2004. Purification and biochemical characterization of asclepain c I from the latex of *Asclepias curassavica* L. **Protein J** 23: 403 - 411.
- López-Sáez JA, Pérez-Soto J. 2009. Plantas alexitéricas: antídotos vegetales contra las picaduras de serpientes venenosas. **Medicina Naturista** 31: 17 - 24.
- Makhija I, Khamar D. 2010. Anti-snake venom properties of medicinal plants. **Der Pharmacia Lettre** 25: 399 - 411.
- McCargo JC, Gattuso MA, Gattuso SJ, Cortadi A. 2010. Morphoanatomical characters for the recognition of two species of *Asclepias* in the province of Santa Fe, Argentina. **Lat Amer J Pharm** 29: 906 - 913.
- Melo P, Do Nascimento M, Mors W, Suarez Kurtz G. 1994. Inhibition of the myotoxic and hemorrhagic activities of crotalid venoms by *Eclipta prostrate* Asteraceae extracts and constituents. **Toxicon** 32: 595 - 603.
- Montenegro P. 1711, reedición 2007. **Materia Médica Misionera**. Editorial Universitaria, Universidad Nacional de Misiones, Corrientes, Argentina.
- Neto C, Owens C, Langfield R, Comeau A, Onge J, Vaisberg A, Hammond G. 2002. Antibacterial activity of some Peruvian medicinal plants from the Callejon de Huaylas. **J Ethnopharmacol** 79: 133 - 138.
- Otero R, Nuñez V, Osorio R, Gutiérrez J, Giraldo C, Posada L. 1995. Ability of six Latin American antivenoms to neutralize the venom of mapanaequis *Bothrops atrox* from Antioquia and Chocó (Colombia). **Toxicon** 33: 809 - 815.
- Otero R, Nuñez V, Jiménez S, Fonnegra R, Osorio R, García M, Díaz A. 2000. Snakebites and ethnobotany in the northwest región of Colombia Part. II Neutralization of lethal and enzymatic effects of *Bothrops atrox* venom. **J Ethnopharmacol** 71: 505 - 524.
- Pardo M, Natalucci C. 2002. Electrophoretic analysis tricine-SDS-PAGE of bovine caseins. **Acta Farm Bonaerense** 21: 57 - 60.
- Pilosof A, Bartholomai G. 2000. **Caracterización funcional y estructural de proteínas**. CYTE - Eudeba, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina.
- Reyes-Chilpa R, Jiménez-Estrada M. 1995. Química de las plantas alexitéricas. **Interciencia** 20: 257 - 264.
- Ribeiro L. 1996. **Aspectos etnobotánicos numa área rural - São João da Cristina, MG**. Dissertação Mestrado em Botânica-Universidade Federal do Rio de Janeiro, Museu Nacional, Rio de Janeiro, Brasil.
- Rondina R, Bandoni A, Coussio J. 2008. Especies medicinales argentinas con potencial actividad analgésica. **Dominguezia** 24: 47 - 69.
- Roy MC, Chang FR, Huang HC, Chiang MYN, Wu YC. 2005. Cytotoxic principles from the Formosan milkweed, *Asclepias curassavica*. **J Nat Prod** 68: 1494 - 1499.
- Salinas BE, Grijalva A. 1994. Diagnóstico de Nicaragua. In: Ocampo RA. ed. Domesticación de plantas medicinales en Centroamérica. Turrialba: CATIE/OEA, CATIE. San José. Costa Rica.
- Scarpa G. 2009. Etnobotánica médica de los indígenas chorote y su comparación con la de los criollos del Chaco semiárido. Argentina. **Darwiniana** 47: 92-107.
- Wagner H, Bladt S. 2001. **Plant Drug Analysis. A thin layer chromatography atlas**. 2° edition. Springer-Verlag, Berlin, Germany.
- Warashina T, Shikata K, Miyase T, Fujii S, Noro T. 2008. New cardenolide and acylated lignan glycosides from the aerial parts of *Asclepias curassavica*. **Chem Pharm Bull** 56: 1159 - 1163.
- Zhang RR, Tian HY, Tan YF, Chung TY, Sun XH, Xia X, Ye WC, Middleton DA, Fedosova N, Esmann M, Tzen JTC, Jiang RW. 2014. Structures, chemotaxonomic significance, cytotoxic and Na⁺,K⁺-ATPase inhibitory activities of new cardenolides from *Asclepias curassavica*. **Org Biomol Chem** 12: 8919 - 8929.