

Evaluación del efecto antiviperino del extracto etanólico de *Aristolochia schippii* (Standl) contra los venenos de *Agkistrodon bilineatus* y *Bothrops asper*

Evaluation of the antiviperine effect of the ethanolic extract of *Aristolochia schippii* (Standl) against the venoms of *Agkistrodon bilineatus* and *Bothrops asper*.

Lesslie Espinosa Espinosa
Universidad de Sonsonate
biol.lespinosa@gmail.com
ORCID: 0000-0002-4548-5051

César Antonio Flores Tinajero
Escuela Nacional de Ciencias Biológicas
.cflores@ipn.mx
ORCID: 0009-0004-3413-424X

Alfredo Abisai Cisneros Cedillo
Escuela Nacional de Ciencias Biológicas
acisneroscedillo@gmail.com

Jimena Flores Cuenca
Escuela Nacional de Ciencias Biológicas
jimenaflorescuenca12@gmail.com

Natalia Belen Gallo Reyes
Escuela Nacional de Ciencias Biológicas
gallo.reyesnataliabelen@gmail.com

Resumen

El objetivo del presente trabajo fue evaluar algunas acciones antiviperinas de *A. schippii*, contra los venenos de *A. bilineatus* y *B. asper* y su caracterización fitoquímica. Se realizó una marcha fitoquímica cualitativa y caracterización fitoquímica por UPLC-MS, se evaluó la toxicidad aguda oral (OECD 423), y se realizó la evaluación antihemolítica en placas de agar sangre y antiproteolítica en caseína, a diferentes proporciones de veneno extracto p/p; asimismo se evaluó la actividad antimiotóxica a dosis de 600, 900 y

1,200 mg/kg por cuantificación de la actividad CK-MB e histología. Los resultados evidenciaron cualitativamente alcaloides, flavonoides, taninos, cumarinas, glucósidos cardiotónicos, y se detectaron por UPLC-MS, ácido aristolóquico y un compuesto bioactivo antineoplásico, 10-hidroxycamptotecina; no se evidenciaron signos de toxicidad ni letalidad a la dosis de 2,000 mg/kg. La actividad antihemolítica y antiproteolítica disminuyó considerablemente ($P < 0.05$), sin seguir una relación dosis-dependiente

de veneno extracto. La actividad antimiotóxica demostró protección parcial contra *B. asper* a dosis de 600 mg/kg y contra *A. bilineatus* a una dosis de 1,200 mg/kg ($P < 0.05$); el estudio histológico, evidenció, protección parcial, por una mejoría en organización estructural y baja evidencia de mionecrosis, así como presencia de edemas en músculo-esquelético. Se concluye que, en el extracto etanólico se evidenció la presencia de diferentes metabolitos como flavonoides, cumarinas, azúcares reductores, mientras que el UPLC-MS mostró la presencia de dos componentes bioactivos con posible actividad antiviperina, como fueron ácido aristolóquico y 10-hidroxicamptotecina; asimismo, el extracto mostró protección parcial contra las actividades hemolítica, proteolítica y miotóxica.

Palabras clave: Ofidismo, *Aristolochia schippii*, *Bothrops asper*, *Agkistrodon bilineatus*, antiviperinos, antimiotóxico, UPLC-MS, antiproteolítico.

Abstract

This work aimed to evaluate some antiviperin actions of *A. schippii* against the venoms of *A. bilineatus* and *B. asper* and their phytochemical characterization. A qualitative phytochemical march and phytochemical characterization by UPLC-MS, acute oral toxicity (OECD 423), antihemolytic evaluation in blood agar plates and antiproteolytic in casein, at different venom: extract w/w ratios, and antimyotoxic activity at doses of 600, 900 and 1,200 mg/kg by quantification of CK-MB activity and histology were performed. The results qualitatively evidenced alkaloids, flavonoids, tannins, coumarins, and cardiotoxic glycosides, and were detected by UPLC-MS, aristolochic acid, and a bioactive antheoplastic compound, 10-hydroxycamptothecin; no signs of toxicity or lethality were evidenced at the dose of 2,000 mg/kg. The results qualitatively evidenced alkaloids, flavonoids, tannins, coumarins, and cardiotoxic glycosides, and were detected by UPLC-MS, aristolochic acid, and a bioactive antheoplastic compound, 10-hydroxycamptothecin; no signs of toxicity or lethality were evidenced at the dose of 2,000 mg/kg. The antihemolytic and antiproteolytic activity decreased significantly ($P < 0.05$), without following a dose-dependent relationship of the venom-extract relationship. The antimyotoxic activity showed partial protection against *B. asper* at a dose of 600 mg/kg and against *A. bilineatus* at a dose of 1,200 mg/kg ($P < 0.05$); the histological study showed partial protection due to an improvement in structural organization and low evidence of myonecrosis, as well as the presence of edema in the musculoskeletal system.

It is concluded that the ethanolic extract showed the presence of different metabolites such as flavonoids, coumarins, and reducing sugars, while the UPLC-MS showed the presence of two bioactive components with possible antiviperine activity, such as aristolochic acid and 10-hydroxycamptothecin; also, the extract showed partial protection against hemolytic, proteolytic and myotoxic activities.

Keywords: Ophidism, *Aristolochia schippii*, *Bothrops asper*, *Agkistrodon bilineatus*, antiviperins, antimyotoxic, UPLC-MS, antiproteolytic.

Introducción

El ofidismo, es una lesión cutánea provocada por la mordedura de un reptil venenoso, siendo causa de alta mortalidad y morbilidad (Brenes-Zuñiga, 2014). Tan solo en América Latina más de 29,000 casos fueron reportados en Brasil y 27,000 en México (Gutiérrez, 2017), siendo la familia viperidae la de mayor incidencia. De acuerdo con datos de distribución geográfica, y por su relativa facilidad para adaptarse a asentamientos humanos, *Bothrops asper* y *Agkistrodon bilineatus* son las especies de mayor impacto en materia de ofidismo en América Latina (Henríquez, 2013; Saldarriaga-Córdoba et al., 2017).

Dentro de los principales síntomas por ofidismo bothrópico y agkistrodónico, destacan: edemas, hemorragias, coagulopatías, necrosis, mionecrosis (Gutiérrez, 2011; Munawar et al., 2018). El único tratamiento aceptado y reconocido por la Organización Mundial de la Salud (WHO, 2018; OMS, 2021), para casos de accidente ofídico, es la faboterapia [F(ab)²]. Sin embargo, aunque efectivos, los faboterápicos son costosos y su administración requiere de personal médico capacitado. Sin mencionar que las distancias entre zonas rurales y los hospitales que cuenten con estos biotecnológicos de manera inmediata, son significativas. Por esta razón, diferentes países de América Latina recurren a la medicina tradicional o herbolaria, a fin de encontrar coadyuvantes que retrasen o mitiguen los síntomas del envenenamiento por vipéridos, como *B. asper* y *A. bilineatus* (Pijoan, 2008; López & Pérez, 2009; Tuz-Canche et al., 2022).

Entre las plantas usadas en la medicina tradicional de México y América Latina en materia de ofidismo, destaca el género *Aristolochia*, destacando a la especie *schippii*, empleada en la medicina tradicional mexicana como té, en el estado de Veracruz

México, contra la mordedura de reptiles venenosos, dado que se sabe que retrasa –de manera empírica–, efectos toxicológicos como: hemorragias en la zona de la mordedura, formación de edemas, algunas complicaciones sistémicas como daño renal o coagulopatías, probablemente por la acción de flavonoides y alcaloides, presentes en el organismo vegetal (Torres et al., 2014; Casas & Blancas-Vázquez, 2023). Por lo cual, el objetivo del presente trabajo fue evaluar algunas propiedades antiviperinas de este organismo vegetal contra los venenos de *B. asper* y *A. bilineatus*.

Diseño experimental

Obtención del extracto etanólico de *A. schippii* y rendimiento

La recolección de la muestra vegetal completa, se realizó en la comunidad “La Margarita”, ubicada en el municipio de Catemaco, Veracruz. La materia vegetal fue llevada completa con flor y fruto para su identificación taxonómica, realizada por el M. en C. Neil Abdiel Felipe Mendoza. Posteriormente se cortó el bejuco en trozos de 10 cm y fueron secados inicialmente a temperatura ambiente por espacio de siete días. Transcurrido ese tiempo, se pusieron a secar, nuevamente, los trozos en estufa a 45 °C, por tres días. La extracción se realizó con 50 gramos de corteza triturada y 300 mL Etanol R.A. Se dejó macerar una semana y, por destilación simple, se evaporó el exceso de disolvente a fin de reutilizarse, hasta clarificar el macerado; se dejó secar a temperatura ambiente hasta la formación del extracto.

El rendimiento del extracto se calculó de la siguiente forma:

$$\frac{O}{O} R = w_i / w_0 \times 100$$

Donde:

% R= rendimiento

W_i= peso del extracto (g)

W₀= peso de la muestra vegetal (g)

Obteniéndose un rendimiento del 21 %, representando un buen dato dado que, a partir de 50 gramos de muestra se obtuvieron 10.5 gramos de extracto.

Marcha fitoquímica cualitativa

La marcha fitoquímica se realizó en tres extractos: acuoso, etanólico y ácido, para evidenciar los metabolitos, mediante reacciones de coloración y precipitación, partiendo de 10 gramos de bejuco pulverizado con ayuda de molino manual y macerando con agua y etanol, por tres días y con HCl 10 %, al momento de preparar el extracto ácido (Rengifo-Zevallos, 2018; Rodríguez-Landa et al., 2020; Sotelo-Leyva et al., 2022).

- Extracto etanólico. Flavonoides: se diluyó el extracto al 50 %.

Reacción de Shinoda: 1 mL extracto + 2 gotas H₂SO₄; al no haber un cambio, se agregó una viruta de magnesio, para las siguientes reacciones:

Reacción con NaOH 10 %: 1 mL extracto + 0.5 mL NaOH 10 %. Se observó coloraciones de amarillo a rojo, indicando positiva la prueba.

Cumarinas: 1 mL extracto + 2 gotas NH₄OH. Se observó en cámara UV. Fluorescencia azul – violeta, indicando positiva la prueba.

Glucósidos cardiotónicos: 1 gota extracto, fue colocada en una tira reactiva Kedde. Un color morado intenso indicó la presencia de glucósidos.

- Extracto acuoso. Saponinas: altura y estabilidad de la espuma. 1 mL extracto + 1 mL agua, se agitó vigorosamente, se midió la altura de la espuma. 8 – 10 mm y es estable por 30 min, indicando positiva la prueba.

Taninos: 1 mL extracto + 2 mL de agua + 3 gotas NaCl 2 %. Se dejó ebulir 1 minuto y filtrar. El filtrado se separó en 2 tubos:

Tubo 1. Reactivo gelatina. La formación de un precipitado blanco indicó positiva la prueba.

Tubo 2. Reactivo FeCl₃ 1 %. Coloración azul derivados del ácido gálico y coloración verde, derivados catecólicos, indicaron positiva la prueba.

Azúcares reductores: 2 mL extracto se ajustó el pH=11 con NaOH 5 %. El extracto se dividió en 2 tubos:

Tubo 1. Reacción de Benedict. Se añadió 0.5 mL del reactivo de Benedict y 1 mL del extracto.
Tubo 2. Blanco. Los tubos se pusieron en baño maría/15 min. La formación de un precipitado rojo ladrillo, indicó positiva la prueba.

•Extracto ácido. Se agregó 10 mL HCl 10 %, se dejó ebullición 5 min y se filtró en cuatro tubos.

Tubo 1. Blanco.

Tubo 2 - 4. Se adicionó 1 gota de los reactivos Mayer, Drangendorff, silicotúngstico y Sonneschain, Se considera positiva la prueba para Mayer un precipitado blanco, Drangendorff precipitado amarillo, silicotúngstico un precipitado blanco-amarillento, Sonneschain un precipitado amarillo tenue.

Identificación química por UPLC-MS

Se utilizó un sistema de cromatografía líquida de ultra alta resolución (UPLC) Ultimate3000 (Dionex Corp., CA, EE. UU.) con detección de arreglo de diodos (PAD), acoplado a un sistema Bruker MicrOTOF-QII mediante una interfaz de ionización por electrospray (ESI) (Bruker Daltonics, Billerica, EE. UU.).

La separación se realizó en una columna cromatográfica Hypersil C18 (3.0 μ m, 125 x 4.0 mm) (Varian). La fase móvil consistió en ácido fórmico al 0.1 % en agua (A) y acetonitrilo (B), utilizando un programa de gradiente: 5-35 % (B) de 0 a 10 min, 35-80 % (B) de 10 a 10.1 min, 80 % (B) de 10.1 a 11 min, 80-45 % (B) de 11 a 11.1 min, 45-5 % (B) de 11.1 a 12 min, y 5 % (B) de 12 a 15 min. El flujo del disolvente fue de 0.5 ml/min, la temperatura de la columna se mantuvo a 30 °C y la longitud de onda de detección fue de 254 nm.

Las condiciones del análisis MS en modo de iones negativos fueron las siguientes: gas de secado (nitrógeno) a un flujo de 8 l/min, temperatura del gas a 180 °C, intervalo de escaneo de 50–3000 m/z, voltaje de compensación de la placa final de -500 V, voltaje capilar de 4500 V y presión del nebulizador de 2.5 bar.

Los datos de masa exacta de los iones moleculares se procesaron utilizando el software DataAnalysis 4.0 (Bruker Daltonics), que proporciona una lista de posibles fórmulas mínimas mediante el Generate Molecular Formula Editor, así como una

comparación del patrón de isótopos teórico con el medido (valor σ) para una mayor confianza en la fórmula molecular sugerida (Bruker Daltonics Technical Note 008, 2004).

Toxicidad oral aguda

Para la determinación de la toxicidad aguda por vía oral se utilizaron un total de 9 ratones hembra de la cepa CD-1, con un peso de 20-25 g. Los animales fueron distribuidos aleatoriamente en tres grupos d(n=3), alojados en cajas separadas. Un grupo recibió una dosis de 2,000 mg/kg del compuesto en estudio, mientras que el grupo control recibió agua. Los ratones fueron pesados cada tercer día y monitoreados durante 14 días para observar signos de toxicidad.

Actividad antihemolítica indirecta

Esta prueba se realizó en placas de agar sangre; se determinó la dosis hemolítica indirecta mínima descrita (DmHI) por Solano-Godoy et al., (2020), empleando concentraciones crecientes del veneno: 75 – 2,000 mg de proteína, sembradas por triplicado en pozos e incubando 24h/37°C. Se midieron los halos de hemólisis con calíper digital y se determinó el diámetro. Una medida de 20mm de diámetro, corresponde a la dosis hemolítica indirecta.

Para el estudio de la actividad antihemolítica indirecta, se repitió el mismo procedimiento, empleando proporciones veneno:extracto, 1:50; 1:100; 1:200 p/p. Se pre-incubaron 30 min/37 °C, se agregaron en cada pozo, 20 mL y se dejaron 24h/37 °C para medir los halos hemolíticos.

Actividad antiproteolítica

Para el estudio de la actividad antiproteolítica, se realizó de acuerdo con el método de Saravia-Otten (2021) con ciertas modificaciones. Las proporciones veneno:extracto, 1:50; 1:100; 1:200 p/p, se pre-incubaron 30 min/37 °C, se agregaron 300 mL/tubo, veneno:extracto a 500 μ L caseína al 1 % en PBS 1X pH= 7.40. La reacción se detuvo con ácido tricloroacético 5 %, en un tiempo de 30 min/25 °C, se centrifugó 7,000 rpm/15 min. Se recuperó el sobrenadante y se leyó la absorbancia a 280 nm/15 min, registrando los cambios a intervalos de 5 min. Se procedió a calcular con la siguiente fórmula:

$$U/mg = [DAbs_{280} / mg \text{ veneno}] * 100$$

Actividad antimiotóxica

Cuantificación creatina quinasa (CK) y análisis histológico. Se utilizaron 30 ratones totales. Se agruparon en seis grupos de cinco individuos (n=5):

Grupo I: Testigo con NaCl 0.9% vía intramuscular (i.m.); Grupo II: Testigo intoxicado con Dosis Miotóxica Media (DMM) del veneno de *B. asper*, 0.6 mg/kg (Pereañez et al., 2014) y de *A. bilineatus* 0.59 mg/kg (Román-Domínguez et al., 2019) vía i.m.; Grupo III: Testigo DMM + Faboterápico [F(ab')₂] antipmyn, 4.6 mg/kg vía i.p.; Grupo IV, V y VI: Testigos DMM + extracto etanólico a dosis de 600, 900 y 1,200 mg/kg vía oral (Flores-Tinajero, 2020).

Se dejaron transcurrir 3 horas (Gutiérrez et al., 1980); se extrajo sangre para recuperar el suero 7,000 rpm/10 min. Se preparó el reactivo de trabajo (RT) de acuerdo con las indicaciones del proveedor del kit creatina quinasa (CK-MB ELITechGroup). Se tomó 80 mL de suero y 920 mL con RT a 37°C/30min. Las absorbancias fueron leídas a 340nm para cuantificar la actividad de la CK-MB mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad CK-MB (U/L)} = \text{DAbs/min} * 4,286$$

Donde:

DAbs/min= promedio de las absorbancias durante 5min a intervalos de 30 segundos.
4,286= Factor de multiplicidad para el cálculo de la actividad CK-MB.

Posteriormente, se eutanaziaron los animales y se obtuvo el músculo ciático gastrocnemio, se fijó en formaldehído al 10 % y se procesó para histología y tinción por la técnica Hematoxilina-Eosina (H-E).

Análisis estadístico

Los resultados de la actividad antihemolítica, actividad antiproteolítica y actividad antimiotóxica fueron expresados como media \pm error estándar. Los datos fueron analizados mediante un Análisis de Varianza Unifactorial (ANOVA) seguidos por una prueba post hoc Bonferroni; el valor de $p < 0.05$, fue considerado estadísticamente significativo. Todas las pruebas fueron realizadas en el software GraphPad Prism versión 8.0

Resultados

Rendimiento

El rendimiento del extracto fue del 21 %, indicando que es un buen dato dado que a partir de 50 gramos de bejuco y con un peso promedio de 10.5 gramos, se llegó a este resultado de porcentaje de extracto y, por lo tanto, el procedimiento empleado y después de 6 destilaciones realizadas, son indicativos de un buen proceso de extracción del producto.

Marcha Fitoquímica Cualitativa

Tabla 1

Metabolitos detectados en el fitoquímico preliminar

Metabolitos	Extracto acuoso	Extracto etanólico	Extracto ácido
Alcaloides	-	-	+++
Cumarinas	-	++	-
Taninos	+++	+	-
Glucósidos cardiotónicos	+	-	-
Azúcares reductores	+++	-	-
Flavonoides	-	+++	-
Saponinas	++++	-	-

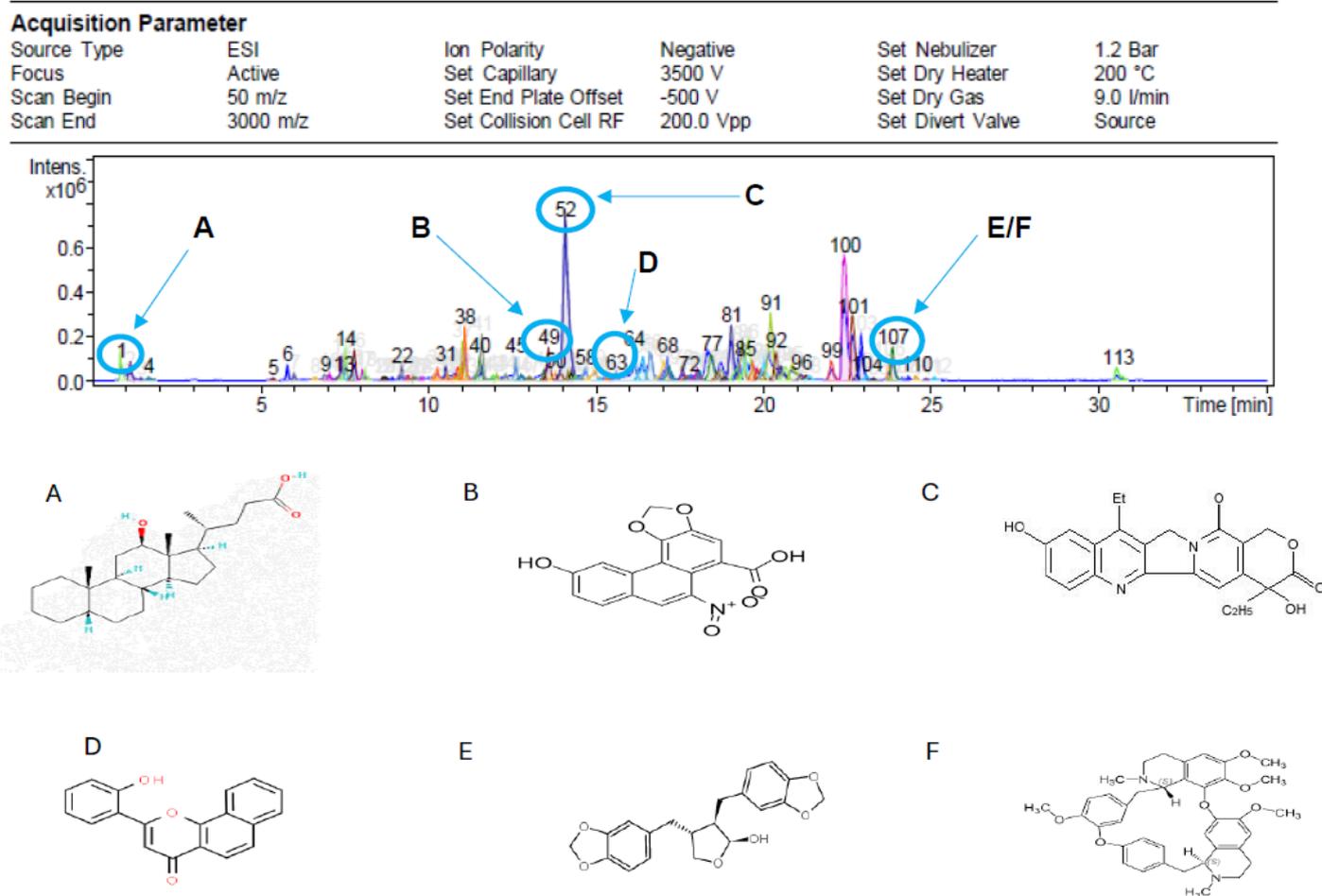
Nota. +++++ Abundancia; +++ Presencia; +++ Ligera presencia; + Trazas; - Ausencia

En los tres extractos, se evidenció la presencia de los metabolitos de forma cualitativa, de acuerdo con la Tabla 1; sin embargo, en el extracto etanólico estuvieron presentes cumarinas, taninos y flavonoides, metabolitos importantes que se han asociado de forma empírica a su capacidad de inhibición de efectos toxinológicos derivados del envenenamiento por mordeduras de ofidios venenosos; además que estos metabolitos, particularmente los flavonoides, presentan una afinidad buena hacia el Etanol, el disolvente empleado para la presencia de forma cualitativa de estos metabolitos.

Identificación química por UPLC-Ms

Figura 1

Caracterización fitoquímica del extracto de *Aristolochia schippii*



Nota. **a.** Cromatograma obtenido por HPLC-MS de *A. Schippii*. **b.** Estructuras químicas de los compuestos: **A** Ácido 12 beta-hidroxi-5-beta-colan-24-oico, **B** Ácido aristolóquico, **C** 10-Hidroxicamptotecina, D(+)-(4,6-O-Bencilideno)metil-alfa-D-glucopiránosido, **E** 2'-Hidroxi-a-naftoflavona y **F** (S,S)-(+)-Tetrandrina.

De acuerdo con el cromatograma obtenido, los principales metabolitos detectados fueron ácidos orgánicos, flavonoides y compuestos nitrofenantrénicos (Figura 1) procedentes de alcaloides. Se destaca la presencia del ácido aristolóquico, un metabolito altamente presente en la familia de *Aristolochiaceae*, al cual se le atribuyen propiedades antiviperinas, aparentemente por inhibición no competitiva de fosfolipasas A2 (PLA₂), principales componentes de los venenos animales; por otro lado, el bioactivo 10-hidroxicamptotecina, a la que se le han atribuido propiedades antineoplásicas, presenta un pico grande lo que pueda explicar su gran afinidad al Etanol y, por consiguiente, una afinidad alta para ser detectado mediante UPLC. por lo que el extracto es clasificado en la categoría 5, donde la letalidad del extracto puede ser mayor a 2,000 mg/kg.

Toxicidad oral aguda

La prueba de toxicidad aguda arrojó que el extracto a dosis de 2,000 mg/kg, no mostró signos de toxicidad en los animales de experimentación ni letalidad (Tabla 2), durante los 14 días de observación, por lo que el extracto es clasificado en la categoría 5, donde la letalidad del extracto puede ser mayor a 2,000 mg/kg.

Tabla 2

Cambios observados en el bienestar de los animales tratados con 2,000 mg/kg de extracto etanólico de *A. schippii*

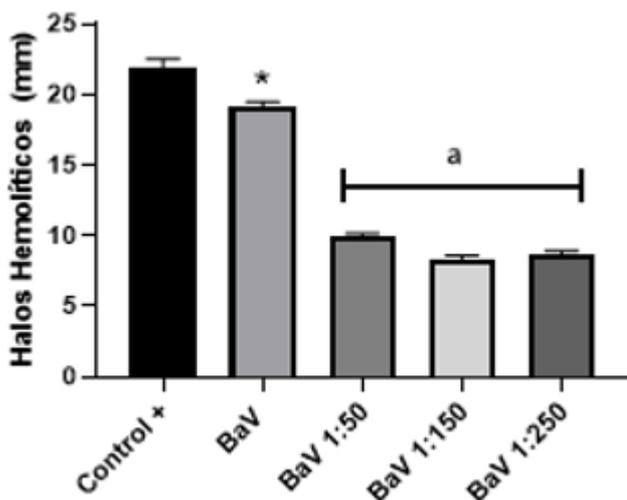
Observaciones	30 min			2 horas			4 horas			24 horas			48 horas			7 días			14 días		
	C	V	E	C	V	E	C	V	E	C	V	E	C	V	E	C	V	E	C	V	E
Letargia	N	2x1n	2x1n	N	N	2x1n	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Emesis	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Sialorrea	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Hipotermia	N	2x1n	2x1n	N	N	2x1n	N	N	2x1n	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Vértigo	N	2x1n	2x1n	N	N	2x1n	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Piloerección	N	2x1n	2x1n	N	N	2x1n	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Mortalidad	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N

Nota. C= control; V= vehículo; E= extracto etanólico de *A. schippii*; N= sin signos de toxicidad; 1x2n= 1 afectado y 2 sin signos de toxicidad; 2x1n= 2 afectados y sin signos de toxicidad. Al inicio del experimento, algunos animales al recibir el extracto evidenciaron hipotermia, vértigo y piloerección en durante las primera cuatro horas de observación. Transcurrido ese tiempo, ningún animal presentó alguno de los signos mencionados con anterioridad, durante los 14 días de observación.

Actividad antihemolítica indirecta

Figura 2

Actividad antihemolítica *A. schippii* con proporciones veneno:extracto



Nota. Se muestra la media ± error estándar. *P< 0.05 vs BaV, a P< 0.05 vs Control + (ANOVA de una vía; Post hoc Bonferroni). BaV (veneno *B. asper*); Bav 1:50, Bav 1:100; Bav 1:250 (veneno: extracto p/p)

En la evaluación antihemolítica (Figura 2), no existió relación dosis-dependiente veneno: extracto; no obstante, se observó a la proporción 1:150, una inhibición de esta actividad (P<0.05), posiblemente por la acción del compuesto 10-hidroxicamptotecina y el ácido aristolóquico. La posibilidad del bioactivo, camptotecina como posible inhibidor de la actividad

antihemorrágica, es por su semejanza estructural con los flavonoides y cumarinas, quelantes de metales bivalentes como el zinc, del cual dependen las metalproteasas hemorrágicas (SVMP), para inducción de su actividad.

Figura 3

Serie fotográfica actividad hemolítica in vitro del veneno de *B. Asper*.



Nota. se ilustra la acción del veneno hemolítica del veneno de *B. asper*

Figura 4

Serie fotográfica de la inhibición *in vitro* de la actividad antihemolítica por *A. schippii*

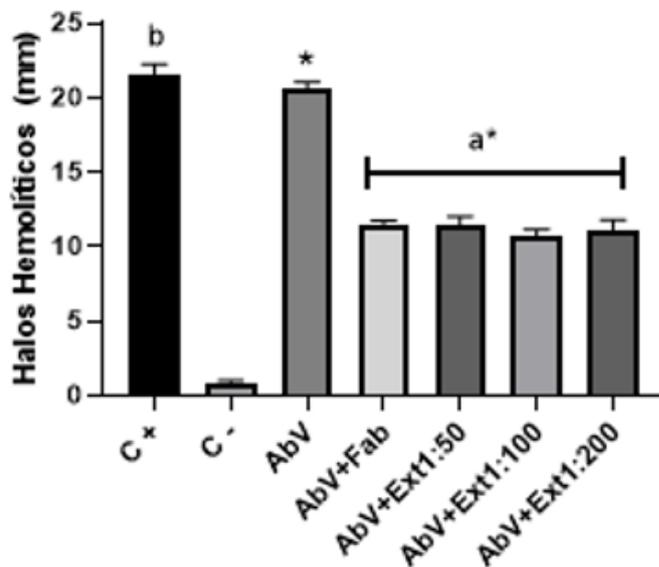


Nota. Se ilustra la inhibición de la actividad hemolítica del veneno de *B. asper* por acción del extracto etanólico de *A. schippii*

Las series fotográficas (Figuras 3 y 4), muestran el efecto hemolítico por acción del veneno de *B. asper*. El valor de la DmIH (Figura 12), fue [0.6 mg/mL] para su inducción. El extracto etanólico de *A. schippii* (Figura 4) no mostró decremento significativo en los halos hemolíticos, por lo tanto, no existiendo relación dosis-dependiente veneno:extracto. Estos resultados demuestran que la resaltante actividad hemorrágica y hemolítica causada por el veneno de *B. asper*, sugiere que al momento de emplearse el extracto etanólico, se comprueba un descenso notable en la hemólisis causada por su veneno, y causante de coagulopatías importantes, como consumo de fibrinógeno y formación de coágulos de fibribina, que inducen hemorragias sistémicas.

Figura 5

Actividad antihemolítica *A. schippii* con proporciones veneno: extracto.

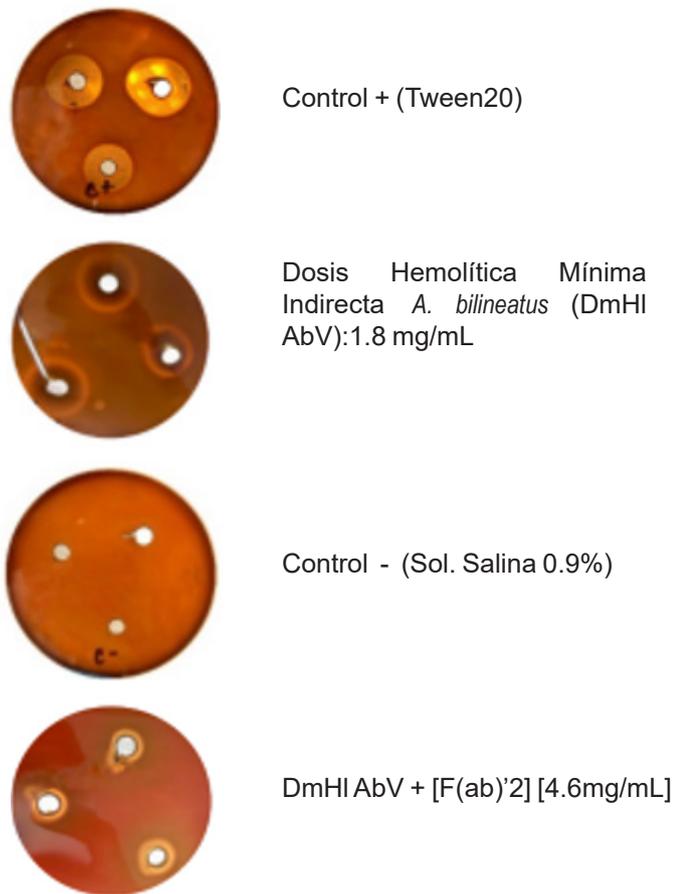


Nota. Se muestra la media \pm error estándar. *,b P < 0.05 vs Control (-), a*,b P < 0.05 vs AbV (veneno de *A. bilineatus*) (ANOVA de una vía; Post hoc Bonferroni). C+ (control positivo); C- (control negativo); AbV+Fab (veneno *A. bilineatus*+ $[F(ab')_2]$); AbV 1:50, AbV 1:100; AbV 1:250 (veneno: extracto p/p)

La actividad antihemolítica contra el veneno de *A. bilineatus* no mostró relación dosis-dependiente veneno: extracto (Figura 5); se observa que a las diferentes proporciones y junto con el faboterápico, se comportan similarmente logrando un descenso en los diámetros hemolíticos (P<0.05), comparados con la acción del veneno crudo. Sugiriendo que la acción de las SVMP, este siendo inhibida por acción de la camptotecina y posiblemente por los ácidos aristolóquicos, considerando al veneno de *A. bilineatus* más hemorrágico y hemolítico que de *B. asper*. No obstante, se señala que tuvo un valor más elevado de la actividad hemolítica, al llegar a 1.8 mg/mL como DmHI, en comparación con el veneno de *B. asper*, lo que sugiere que la actividad hemolítica sea destacable, pero más destacable aun su actividad hemorrágica al conocer que presenta mayor concentración de SVMP en comparación con desintegrinas.

Figura 6

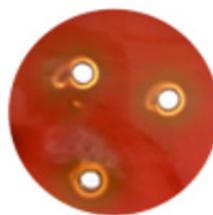
Serie fotográfica actividad hemolítica del veneno de *A. bilineatus*



Nota. Se ilustra la acción del veneno hemolítica del veneno de *A. bilineatus*

Figura 7

Serie fotográfica de la inhibición *in vitro* de la actividad antihemolítica *A. schippii*



DmHI AbV + Ext. *A. schippii*
1:200 [1.8mg/mL:360mg/mL]. No hay relación dosis-dependiente veneno:extracto.

Nota. Se ilustra la inhibición de la actividad hemolítica del veneno de *A. bilineatus* por acción del extracto etanólico de *A. schippii*

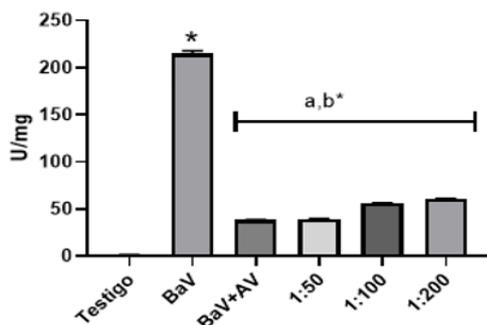
Las series fotográficas (Figuras 6 y 7), ilustran la acción hemolítica del *A. bilineatus*, y comparado con el veneno de *B. asper* es mayor, por lo tanto, no es conspicua la hemólisis entre ambas especies, con un valor de 1.8 mg/mL para *A. bilineatus*; el extracto, no disminuyó los halos hemolíticos (Figura 7), sino que pareciera que se mantienen constantes sus valores, por lo que no existe una relación dosis-dependiente veneno: extracto (Figura 5). Asimismo, es apreciable el descenso de los diámetros hemolíticos en la placa relación veneno-Fab (Figura 6).

Actividad antiproteolítica

Para el reto del veneno de *B. asper* (Figura 8), destacó una disminución en la actividad proteolítica sin relación dosis-dependiente veneno:extracto. También se aprecia el comportamiento del faboterápico, dado que presenta una acción antiproteolítica eficaz contra venenos vipéridos ($P < 0.05$). Esta acción antiproteolítica puede estar siendo inhibida al no permitir la actividad de las desintegrinas presentes en el veneno de *B. asper*, además de la asociación con PLA_2 dependientes de calcio y SVMP, probablemente por la acción de los ácidos aristolóquicos y de la camptotecina presentes en el extracto.

Figura 8

Actividad antiproteolítica *A. schippii* con proporciones veneno: extracto

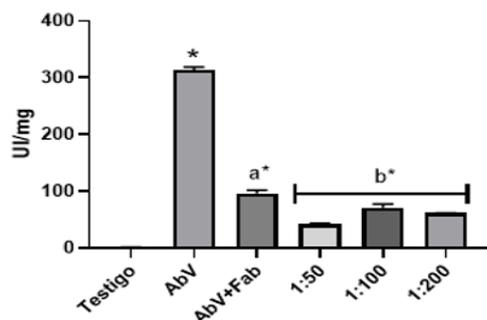


Nota. Se muestra la media \pm error estándar. *, b* $P < 0.05$ vs Testigo, a*, b* $P < 0.05$ vs BaV (veneno de *B. asper*) (ANOVA de una vía; Post hoc Bonferroni). BaV (veneno *B. asper*); BaV+AV (veneno *B. asper* + [F(ab')₂]); BaV 1:50, BaV 1:100; BaV 1:250 (veneno: extracto p/p)

El veneno de *A. bilineatus*, mostró actividad proteolítica mayor al de *B. asper*, de ahí que sus valores sean mayores por la acción desintegrina. Se aprecia una disminución en la actividad proteolítica ($P < 0.05$), sin mantener relación dosis-dependiente veneno:extracto. La eficacia del faboterápico es evidente ($P < 0.05$), salvo que, sus valores no asemejan al del grupo testigo, pudiendo ser indicativo que su acción neutralizante no es tan específica para el veneno de esta especie (Figura 9), probablemente a una concentración aun mayor de desintegrinas de PLA₂ dependientes de calcio presentes en el veneno de *A. bilineatus*.

Figura 9

Actividad antiproteolítica *A. schippii* con proporciones veneno: extracto



Nota. Se muestra la media \pm error estándar. *, b* $P < 0.05$ vs Testigo, a*, b* $P < 0.05$ vs AbV (veneno de *A. bilineatus*) (ANOVA de una vía; Post hoc Bonferroni). AbV (veneno *A. bilineatus*); AbV+AV (veneno *A. bilineatus* + [F(ab')₂]); AbV 1:50, AbV 1:100; AbV 1:250 (veneno:extracto p/p)

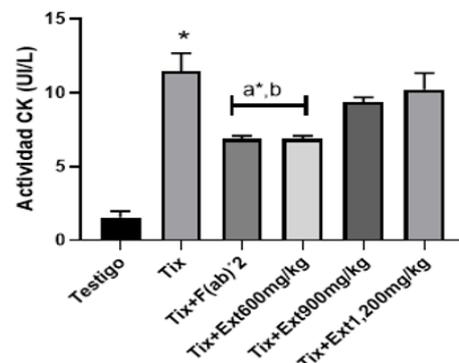
Actividad antimiotóxica

A partir de la cuantificación de la actividad creatina quinasa (CK-MB), el daño miotóxico por acción de venenos viperidos puede ser demostrable, de tal manera que se pudo observar que, para el extracto, mostró una disminución en la cuantificación de la CK-MB ($P < 0.05$) a dosis baja de 600 mg/kg (Figura 10), indicando una probable susceptibilidad de las miotoxinas por los metabolitos encontrados en el extracto, ácidos aristolóquicos, no siendo así a las dosis de 900 y 1,200 mg/kg.

Mientras que el faboterápico mostró valores conspicuos con la dosis de 600 mg/kg del extracto ($P < 0.05$), indicando que el antiveneno al contener anticuerpos contra el veneno de *B. asper* por ser el antígeno principal de su elaboración, se traduzca en un descenso notorio de la actividad de la CK-MB (Figura 10).

Figura 10

Actividad de creatina quinasa (CK-MB) del extracto etanólico de *A. schippii* en ratones CD1 25 \pm 2 g pc

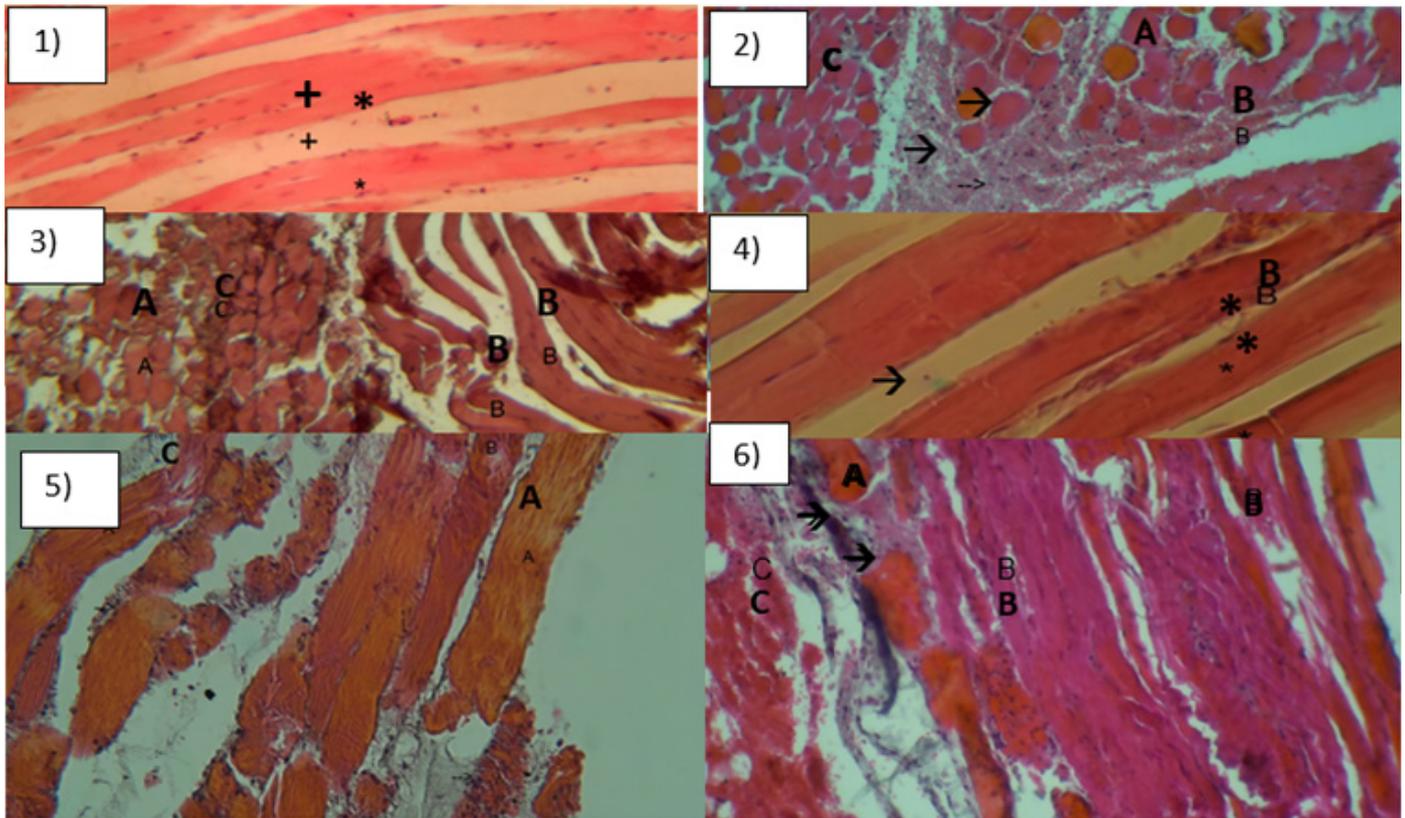


Nota. Ratones intoxicados DMM (0.6 mg/kg) de veneno de *B. asper*; ratones tratados con F(ab')₂ (4.6 mg/kg). Se representa la media \pm error estándar. Tix (testigo intoxicado), Tix+Fab (intoxicado + faboterápico), Tix+Ext 600 mg/kg, 900 mg/kg y 1,200 mg/kg (intoxicado + Exto. 600 mg/kg, 900 mg/kg y 1,200 mg/kg). *, b* $P < 0.05$ vs testigo; a*, b* $P < 0.05$ vs Tix. (ANOVA; post hoc Bonferroni). n=5.

Análisis histológico

Figura 11

Actividad antiproteolítica *A. schippii* con proporciones veneno: extracto



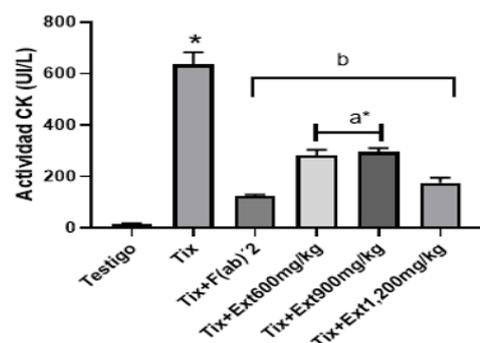
Nota. 1) Testigo, 2-6) Testigos intoxicados y con tratamientos: 3) F(ab')₂. 4), 5) y 6) Testigos intoxicados + extracto de *A. schippii* a dosis de 600, 900 y 1,200 mg/kg A. miólisis; B. Hemorragias; →. Infiltrado celular. * Miofibrillas. + Núcleos. C. necrosis tisular.

El estudio histológico reveló desorganización de la citoarquitectura del músculo-esquelético (Figura 11; Fotografías 2, 3, 5 y 6); hemorragias, infiltrado celular, miólisis y necrosis tisular (Figura 11; Fotografías 2 y 3). No obstante, el faboterápico protegió fuertemente manifestando presencia de infiltrados celulares (no observados) y disminuyendo las hemorragias y la miólisis (Figura 11; Fotografía 2), y menor desorganización de la citoarquitectura, dando respaldo a que el polivalente antiviperino es específico y diseñado a partir del veneno de *B. asper*.

A las dosis de 900 y 1,200 mg/kg continúa la presencia de hemorragias, miólisis y necrosis tisular (Figura 11; Fotografías 2, 3, 5 y 6) acción que no se vio inhibida ni por acción del extracto ni por el faboterápico, indicando que el extracto a dosis más altas no confiere mejor protección contra las miotoxinas, y no da soporte a que la presencia de los ácidos aristolóquicos inhiban la acción de PLA₂.

Figura 12

Actividad de creatina quinasa (CK-MB) del extracto etanólico de *A. schippii* en ratones CD1 25±2 g pc



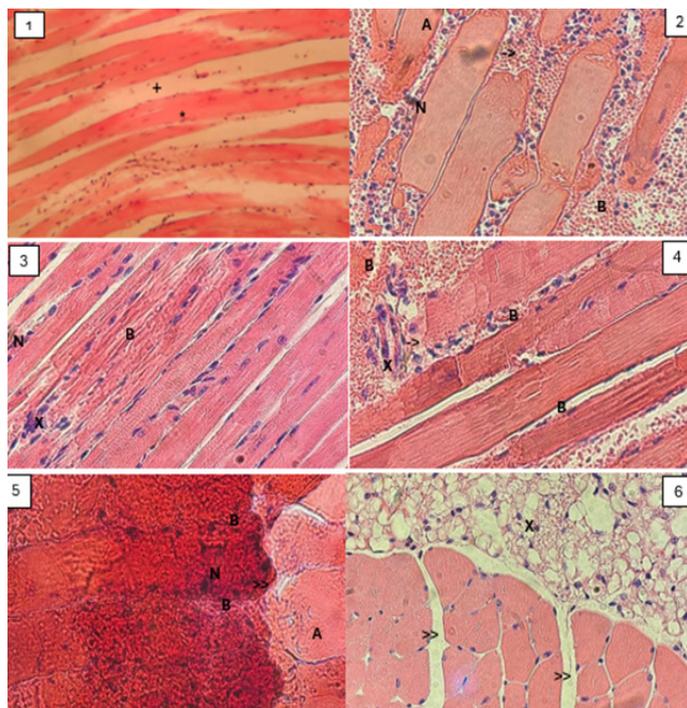
Nota. Ratones intoxicados DMM (0.6 mg/kg) de veneno de *A. bilineatus*; ratones tratados con F(ab')₂ (4.6 mg/kg). Se representa la media ± error estándar. Tix (testigo intoxicado), Tix+Fab (intoxicado + faboterápico), Tix+Ext 600 mg/kg, 900 mg/kg y 1,200 mg/kg (intoxicado + Exto. 600 mg/kg, 900 mg/kg y 1,200 mg/kg). *, bP<0.05 vs testigo; a*, bP<0.05 vs Tix. (ANOVA; post hoc Bonferroni). n=5.

La miotoxicidad por *A. bilineatus*, indicó valores elevados de CK-MB, por una concentración elevada de miotoxinas preponderantes en su veneno, contrastando con su acción hemolítica y proteolítica preponderantes, siguiendo a su perfil venómico; a pesar de ello, es apreciable a dosis de 1,200 mg/kg se dé un descenso en estos valores ($P < 0.05$), no obstante, no guarda una relación dosis-dependiente veneno y extracto (Figura 12). La dosis de 600 y 900 mg/kg (Figura 10), no se asemejan sus valores al del grupo testigo, indicativos que a medida que la dosis es menor, la acción miotóxica por la cuantificación de CK-MB, sigue estando elevada. Asimismo, el faboterápico mostró marcado descenso en los valores de CK-MB (Figura 12), lo que constituye que el polivalente es específico contra especies de vipéridos americanos.

Análisis histológico

Figura 13

Microfotografías del músculo-esquelético de ratones CD1 intoxicados con veneno de *A. bilineatus* (0.6 mg/kg).



Nota. 1) Testigo 2-5) Testigos intoxicados y con tratamientos. 3) F(ab')₂. 4), 5) y 6) Testigos intoxicados + extracto de *A. schippii* a dosis de 600, 900 y 1,200 mg/kg. A. Miólisis. Infiltrado celular. B Hemorragias. X PMN. N. Necrosis tisular. >>. Edema.

El estudio histológico reveló (Figura 13), desorganización de la citoarquitectura (Fotografías 2 y 5), hemorragias, infiltrado celular, miólisis y necrosis tisular (Fotografías 2, 3 y 5), acciones importantes manifestadas en un daño estructural muscular, por acción de PLA2 con acción miotóxica. No obstante, el

el faboterápico protegió fuertemente manifestando solo presencia de polimorfonucleares, leves hemorragias, aunque si necrosis celular (Fotografía 3), esta última probablemente por la actividad de PLA2 secretorias y dependientes de calcio, aunque aunado a ello, la presencia de desintegrinas y SVMP, favorecen la necrosis.

A dosis de 600 mg/kg y 1,200 mg/kg, son evidentes las hemorragias, infiltrado celular y edema, este último observado a dosis de 1,200 mg/kg (Fotografías 4 y 6), indicando que existió una protección parcial, sugiriendo que a dosis altas es probable la inhibición de las miotoxinas presentes. No obstante, a dosis de 900 mg/kg se aprecia marcada necrosis tisular, fuertes hemorragias y miólisis (Fotografía 5), hechos concordantes de acuerdo con la fig. 10, al incrementarse los valores séricos de CK-MB.

Discusión

El ofidismo es considerado una enfermedad subtropical (WHO, 2018). La única terapia reconocida por la OMS es la faboterapia; no obstante, sus altos costos obligan a países subdesarrollados a recurrir al uso de plantas alexitéras (López & Pérez, 2009; Lima et al., 2019). Uno de los géneros más célebres y empleados contra los efectos del ofidismo, es el *Aristolochia* (López & Pérez, 2009; Giovanni & Howes, 2017; Tuz-Canche et al., 2022). A pesar de sus atributos, no existe evidencia científica que respalde sus acciones antiviperinas, salvo conocimiento tradicional como en algunas regiones de Veracruz, México (Torres et al., 2014; Casas & Blancas-Vázquez, 2023).

El rendimiento del extracto etanólico de *A. schippii* fue del 21 %, concordante con Saravia-Otten et al., (2017), con rendimientos entre el 15 % – 69 % de diversas plantas centroamericanas contra el veneno de *B. asper*, a partir de extractos etanólicos, destacando la especie *A. máxima*, a partir de su corteza. La marcha fitoquímica cualitativa reveló la presencia de taninos, alcaloides, cumarinas, flavonoides y azúcares reductores, concordante con investigaciones de Sotelo-Leyva et al., (2022) sobre metabolitos secundarios en el extracto etanólico de *A. tentaculata*, reportando alcaloides, cumarinas, taninos y flavonoides.

La caracterización fitoquímica por UPLC-MS reveló principalmente, ácidos aristolóquicos, 10-hidroxycamptotecina, 2'-Hidroxi-a-naftoflavona. Estos hallazgos son parcialmente concordantes con la revisión de Kuo et al. (2012), quienes informaron sobre la presencia de terpenoides, lignanos, flavonoides en diversas especies de *Aristolochia*. Se resaltó la presencia de ácidos aristolóquicos y un derivado hidroxilado de quinoleínas, la 10-hidroxycamptotecina constituyente químico encontrado en las hojas *Camptotheca acuminata*. Por otro lado, un estudio de Attou et al. (2020), con HPLC, evidenció en *A. longa*, flavonoides, ácidos orgánicos y compuestos polifenólicos, datos no concordantes en este trabajo por las diferentes técnicas cromatográficas.

Asimismo, se evaluó la toxicidad aguda siguiendo el protocolo OECD 423, sin evidencia de letalidad y signos de toxicidad a dosis de 2,000 mg/kg, estudio semejante al realizado por Bhattacharjee & Bhattacharyya (2013), para *A. indica*, sin evidencia de signos de toxicidad y letalidad a la misma dosis. A su vez concordante también con Mathew et al., (2020), manifestando a dosis de hasta 8,000 mg/kg, *per os* de *A. bracteolata* Lam., ausencia de letalidad y signos de toxicidad, clasificando al extracto en la categoría 5 (OECD 423, 2001).

Dentro del cuadro clínico por ofidismo vipérido, se destacan las hemorragias y hemólisis, inducidas por desintegrinas (Rivas-Mercado & Garza-Ocañas, 2017). La DmHI para ambos venenos fue de 1.8 mg/mL y 0.6 mg/mL para *A. bilineatus* y *B. asper*, respectivamente, concordante a su proteómica. Siguiendo el trabajo de Mora-Obando et al. (2020), la cantidad de desintegrinas en la venómica de *B. asper* de la región noroeste de Sudamérica es del 6.1 %, con mayor actividad hemolítica a medida que su localización biogeográfica se aproxima a Norteamérica.

La venómica de *A. bilineatus* (Lomonte et al., 2014), indicó un 3.1 %, acorde al estudio realizado, requiriendo mayor concentración de veneno para alcanzar la DmHI (Cespedes et al., 2010). En consecuencia, la actividad antihemolítica del extracto, mostró una inhibición más favorable contra el veneno de *B. asper*, concordante al trabajo de Torres et al. (2007), al probar el extracto etanólico de *Cissampelos pareira* contra el veneno de *B. neuwiedi diporus*, inhibiendo su acción hemolítica; probablemente por las cumarinas presentes

(Saravia-Otten et al., 2017), un bioactivo en común, entre ambas especies vegetales.

El estudio con *A. bilineatus*, mostró actividad antihemolítica; sin embargo, su disminución fue menor al emplearse mayor concentración de veneno. Resultados concordantes parcialmente con lo encontrado por Torres et al. (2007), y Saffidine et al. (2023), demostraron la acción de *A. clematitis*, disminuyendo la actividad hemolítica, por acción de los ácidos aristolóquicos y la 10-hidroxycamptotecina, potente agente antineoplásico (Mélendez-Gómez & Kouznetsov, 2005), y probable inhibidor de desintegrinas.

La acción antiproteolítica de *A. schippii*, demostró mayor inhibición contra el veneno de *A. bilineatus* derivado de la baja presencia de desintegrinas en su venómica, empero mayor presencia de metaloproteasas hemorrágicas (SVMP) (Lomonte et al., 2014), con un 21 %, en comparación con las encontradas en *B. asper* por Mora-Obando et al. (2020), un total del 10.1 %. Indicado en datos de Saravia-Otten et al. (2017), el extracto etanólico de *A. máxima* no mostró actividad antiproteolítica contrario a lo reportado en este estudio, donde a una proporción 1:50, la actividad antiproteolítica, probablemente se atribuya a los ácidos aristolóquicos y la 10-hidroxycamptotecina, mediante inhibición enzimática de las SVMP. Por otro lado, el estudio de Pereañez j. et al. (2008), demostró que el género *Heliconia* inhibe acciones proteolíticas por el veneno de *B. asper*, concordante con los resultados obtenidos para *A. schippii* sin pertenecer al mismo género, probablemente por *similitus* quimiotaxonómica.

Por último, la patología más conocida por ofidismo vipérido es la miotoxicidad; preponderantemente presente en el veneno del género *Bothrops* la presencia de fosfolipasas A₂ (PLA₂) con características básicas (Ramos-Paredes & Paredes-Fernández, 2017). De acuerdo con la venómica de *B. asper*, Alape-Girón et al. (2009), reportaron para el veneno de *B. asper* diferencias en porcentajes de PLA₂ (miotoxinas): 28 % del Caribe y 45 % del Pacífico, relacionado con la biogeografía del veneno estudiado, proveniente de Veracruz, México; por consiguiente la acción inhibitoria de la miotoxicidad por *A. schippii*, fue a dosis de 600 mg/kg parecido a los hallazgos de González-Rodríguez et al. (2020), quienes demostraron que los ácidos aristolóquicos de *A. sprucei*, inhiben la actividad miotóxica del veneno de *B. asper* hasta un 60 %.

Asimismo, el estudio histológico reveló hemorragias, miólisis, mionecrosis, concordante con Hernández et al. (2011), quienes evidenciaron cambios en la microvasculatura y en la integridad de las células después de inocular veneno crudo de *B. asper*. La dosis de 600 mg/kg y el faboterápico protegieron parcialmente contra las miotoxinas, no así a dosis de 900 y 1,200 mg/kg, semejante a lo encontrado por González-Rodríguez et al. (2020), quienes encontraron en los ácidos aristolóquicos, capacidad de inhibición parcial contra miotoxinas aisladas del género *Bothrops*, en modelos *in silico*.

El perfil venómico de *A. bilineatus* (Lomonte et al., 2014) muestra un 42 % de PLA₂ de ahí una mayor actividad miotóxica en este estudio, y de acuerdo con Román-Domínguez et al. (2019), se cuantificó alta actividad de CK-MB. En consecuencia, a dosis de 1,200 mg/kg mostró un cambio significativo en la cuantificación de CK-MB, conspicuamente concordante a lo encontrado por González-Rodríguez et al. (2020), al disminuirse esta actividad en el veneno de *Bothrops*; resaltando que, los valores miotóxicos que Román-Domínguez et al. (2019) calcularon para la subespecie *A. bilineatus howardgloydi*, concluyen que son conspicuos al veneno de *B. asper*, por lo tanto la inhibición de PLA₂ por los ácidos aristolóquicos, muestran una afinidad semejante entre ambos venenos.

La histología reveló hemorragias, miólisis, desorganización estructural, de miofibrillas, necrosis, concordante a los hallazgos de Ownby et al. (1989), con biltoxina, la cual indujo hemorragias, desorganización de las miofibrillas y lesiones delta (no detectadas en este estudio). Asimismo, se apreció un cambio estructural y protección parcial a las dosis de 600 y 1,200 mg/kg lo cual podría ser concordante con hallazgos de Vasudev et al. (2021), a partir del extracto etanólico de un cocktail poliherbálico, contra diferentes vipéridos asiáticos, entre ellos *Echis carinatus* (dosis no indicada del *cocktail*) observándose únicamente necrosis e inflamación en el análisis histológico.

En conclusión, el extracto e tanólico de *A. schippii* mostró una protección parcial contra las acciones hemolítica, proteolítica y miotóxica, al disminuir los diámetros hemolíticos, la actividad proteolítica y la actividad CK-MB, asimismo el análisis histológico evidenció una mejora en la citoarquitectura, ausencia de áreas de mionecrosis y hemorragias, por acción de los componentes bioactivos caracterizados, ácidos aristolóquicos y 10-hidroxycamptotecina, posibles metabolitos inhibidores de las acciones toxinológicas de venenos vipéridos.

Referencias

- Alape-Girón, A., Flores-Díaz, M., Sanz L., Madrigal, M., Escolano, J., Sasa M. & Calvete, J.J. (2009). Studies on the venom proteome of *Bothrops asper*: Perspectives and applications. *Toxicon* 54, 938 – 948. doi: 10.1016/j.toxicon.2009.06.011
- Attou, A., Meddah, B., Meddah, T.T.A., Mokthar, M. & Sonnet, P. (2020). Phytochemical screening and antioxidant activity of Algerian *Aristolochia longa* flavonoids. *J Appl Biotechnol Rep.* 7(3), pp. 166 – 171. Doi: 10.30491/JABR.2020.109897
- Bhattacharjee, P., & Bhattacharyya, D. (2013). Characterization of the aqueous extract of the root of *Aristolochia indica*: Evaluation of its traditional use as an antidote for snake bites. *Journal of Ethnopharmacology*, 145(1), 220–226. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.10.056>
- Brenes, Z. M. (2014). Accidente ofídico. *Revista Médica de Costa Rica Centroamérica*, (611) 539 – 550.
- Casas, A. & Blancas-Vázquez J.J. (2022). *Ethnobotany of the Mountain Regions of Mexico*. Springer Nature Reference
- Flores-Tinajero, C. A. (2020). Efecto protector del extracto acuoso de *Aristolochia schippii* (Standl) en la nefrotoxicidad inducida con el veneno de *Bothrops asper* en la rata. [Tesis para obtener el grado de Maestría en Ciencias Químico-biológicas]. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas – Instituto Politécnico Nacional.
- Giovannini, P., & Howes, M.-J. R. (2017). Medicinal plants used to treat snakebite in Central America: Review and assessment of scientific evidence. *Journal of Ethnopharmacology*, 199, 240–256. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.02.011>

- González Rodríguez, I. I., Francisco, F. A., Moreira-Dill, S. L., Quintero, A., Guimarães, L. S. C., Fernandes, A. H. C., Takeda, S. A. A., Zanchi, B. F., Caldeira, S. A. C., Pereira, S. P., Fontes, M. R. M., Zuliani, P. J. & Soares, M. A. (2020). Isolation and structural characterization of bioactive compound from *Aristolochia sprucei* aqueous extract with anti-miotoxic activity. *Toxicon*: X 7(2020) 100049.
- Gutiérrez, J. M., Arroyo, A. & Bolaños, R. (1980). Mionecrosis, hemorragia y edema inducidos por el veneno de *Bothrops asper* en ratón blanco. *Toxicon*. Vol. 18, pp. 603-610.
- Gutiérrez, J. M. (2011). Envenenamientos por mordeduras de serpientes en América Latina y El Caribe: Una visión integral de carácter regional. *Bol Mal Salud Amb*, v. 51, n. 1.
- Gutiérrez, J. M., Calvete, J. J., Habib, A. G., Harrison, R. A., Williams, D. J., & Warrell, D. A. (2017). Snakebite envenoming. *Nature Reviews. Disease Primers*, 3(17063). <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.63>
- Hernández, R., Cabalceta, C., Saravia-Otten, P., Chaves, A., Gutiérrez, J. M & Rucavado, A. (2011). Poor regenerative outcome after skeletal muscle necrosis induced by *Bothrops asper* venom: Alterations in microvasculature and nerves. *Regeneration after Snake Venom-Induced Necrosis*. Volume 6 Issue 5, e1 9834. PLoS ONE
- Henríquez, V. (2013). Distribución real, potencial y características principales de las serpientes venenosas del Salvador. *BIOMALa naturaleza en tus manos*, Año 1, Número 11.
- Kuo, P.-C., Li, Y.-C., & Wu, T.-S. (2012). Chemical Constituents and Pharmacology of the *Aristolochia* (☐☐☐ mǎdōu ling) species. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 2(4), 249. [https://doi.org/10.1016/s2225-4110\(16\)30111-0](https://doi.org/10.1016/s2225-4110(16)30111-0)
- Lima, Y., Guzmán, V., López, Y. y Satchwell, R. (2019). La medicina tradicional herbolaria en los sistemas de salud convencionales. *Rev. Hum. Med.* 19(1), 201-207.
- Lima, Y., Guzmán, V., López, Y. y Satchwell, R. (2019). La medicina tradicional herbolaria en los sistemas de salud convencionales. *Rev. Hum. Med.* 19(1), 201-207.
- Lomonte, B., Wan-Chi, T., Ureña-Díaz, J. M., Sanz, L., Mora-Obando, D., Sánchez, E. E., Fry, G. B., Gutiérrez, J. M., Gibbs, L. H., Sovic, G. M. & Calvete, J. J. (2014). Venomics of New World pit vipers: Genus-wide comparisons of venom proteomes across *Agkistrodon*. *Journal of Proteomics*. 96, 103 – 116. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2013.10.036>
- López, J. A. y Pérez, J. (2009). Plantas alexitéricas: antídotos vegetales contra las picaduras de serpientes venenosas. *Medicina naturista*. 3(1), 17-24
- Mathew, S. L., Mtewa, G. A., Ajayi, O. C., Deyno, S., Weisheit, A., Tolo, U. C., Deng, L. A. & Ogwang, E. P. (2020). Ethnopharmacology, pharmacology and phytochemistry of *Aristolochia bracteolata* Lam: A review of antimalarial plant. *East Africa Science*. Volumen 2, Issue 1
- Mora-Obando, D., Salazar-Valenzuela, D., Pla, D., Lomonte, B., Guerrero-Vargas, J. A., Ayerbe, S., Gibbs, L. H. & Calvete, J. J. (2020). Venom variation in *Bothrops asper* lineages from North-Western from South America. *Journal of Proteomics*. 229, 103945. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2020.103945>
- Munawar, A., Ali, A.S., Akrem, A. & Betzel, C. (2018). Snake venom peptides: Tools of Discovery. *Toxins*: 10(11), 474.
- OECD. (2001). Test No. 423. Guideline for testing of chemicals: acute oral toxicity-acute toxic class method, pp.1-14
- Organización Mundial de la Salud (OMS). (17 de mayo de 2021). Mordeduras de serpientes venenosas. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/snakebite-envenoming>
- Ownby, C. L., Nikai T., Imai, K. & Sugihara, H. (1989). Pathogenesis of hemorrhage induced by bilitoxin, a hemorrhagic toxin isolated from the venom of the common cantil (*Agkistrodon bilineatus bilineatus*). *Toxicon* Vol. 28, No. 7, pp. 837 – 846.

- Pereañez, A. J., Jiménez, L. S., Quintana, C. J., Nuñez, V., Fernández, M. & Restrepo, Y. (2008). Inhibición de las actividades proteolítica, coagulante y hemolítica indirecta inducidas por el veneno de *Bothrops asper* por extractos etanólicos de tres especies de *Heliconias*. *VITAE, Revista de la Facultad de Química Farmacéutica*. Volumen 15 número 1.
- Pereañez A. J., Quintana J. C., Alarcón J. C. & Núñez V. (2014). Isolation and functional characterization of basic phospholipase A2 from colombian *Bothrops asper* venom. *VITAE Revista de la Facultad de Química Farmacéutica*. Volumen 21 Número 1.
- Pijoan, M. (2008). Antídotos tribales (y II). Herencia milenaria. *Ámbito farmacéutico. Etnofarmacología*. 27(10), 105-109.
- Ramos Paredes, A. R. & Paredes Fernández, W. J. (2017). Estudio comparativo de los efectos miotóxicos e inflamatorios por acción de fosfolipasas A2 nativas y modificadas químicamente procedentes de veneno de *Bothrops andianus*. *Revista Postgrado Scientiarum*. Volumen 3 – Número 1. P. 45 – 50. DOI: 10.26696/sci.epg.0046
- Rengifo-Zevallos, D. R. (2018). Estudio fitoquímico cualitativo preliminar y cuantificación de flavonoides y taninos del extracto etanólico de hoja de *Desmodium vargasianum* Schubert. *Rev Soc Quím Perú*. 84(2).
- Rivas-Mercado E. A. & Garza-Ocañas L. (2017). Disintegrins obtained from snake venom and the pharmacological potential. *Medicina Universitaria*. 2017; 19 (74): 32 – 37. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rmu.2017.02.004>
- Rodríguez-Landa, J. F., Hernández-Lozano, M. & Méndez-Ventura, L. M. (2020). Manual de prácticas de farmacognosia. Universidad Veracruzana. Facultad de Química Farmacéutica Biológica. Xalapa, Ver.
- Román-Domínguez L., Neri-Castro E., Vázquez-López H., García-Osorio B., Archundia I. G., Ortiz-Medina J. A., Petricevich V. L., Alagón A. & Bénard-Valle M. (2019). Biochemical and immunochemical characterization of venoms from snakes of the genus *Agkistrodon*. *Toxicon*: X 4 (2019) 100013. <https://doi.org/10.1016/j.toxcx.2019.100013>
- Saffidine, K., Zerargui, F., Guemmaz, T. & Baghiani, A. (2023). Evaluation of antioxidant, antihemolytic activity, analgesic and anti-inflammatory potential of *Aristolochia clematitis* extracts. *Trop J Nat Prod Res*. 7(5). 2996 – 3001.
- Saldarriaga-Cordoba, M., Parkinson, C. L., Daza, J. M., Wüster, W. & Sasa, M. (2017). Phylogeography of the Central American lancehead *Bothrops asper* (serpentes: viperidae). *Plos one* 12(11): e0187969. doi: 10.1371/journal.pone.0187969.
- Saravia-Otten, P., Hernández, R., Marroquín, N., García, G., Mérida, M., Cruz, S., Orozco, N., Cáceres, A. & Gutiérrez, J. M. (2017). Inhibición de los efectos coagulante, fosfolipasa A2 y proteolítico del veneno de *Bothrops asper* por plantas usadas tradicionalmente en Centroamérica. *Ciencia, tecnología y salud*. Vol. 4, No. 2.
- Saravia-Otten, P., Hernández, R., Marroquín, N., García, G., Nave, F., Rochac, L., Genovez, V., Mérida, M., Cruz, S. M., Cáceres, A. & Gutiérrez, J. M. (2021). Inhibición de la actividad proteolítica y fosfolipasa A2 del veneno de *Bothrops asper* por el extracto etanólico de *Neurolaena lobata* (L.) Cass. *Ciencia, tecnología y salud*. Vol. 8, Núm. 1.
- Solano-Godoy J. A., Molano-Cardona E. D., Bernal-Bautista M. H. & Murillo-Arango W. (2020). Actividad fosfolipasa, hemolítica y bactericida preliminar de la serpiente de cascabel de Tolima. *Ciencia en Desarrollo*, Vol. 11 No. 1. Doi: <https://doi.org/10.19053/01217488.v11.n1.2020.9869>
- Sotelo-Leyva, C., Tagle-Emigdio, L. J., Aniceto-Teofilo, C., Galeana-Hernández, J., Condori-Cordero, S., Flores-Blanco, G., & Salinas-Sánchez, D. O. (2022). Estudio etnofarmacológico y fitoquímico de las plantas medicinales de mayor uso en Julián Blanco, Guerrero, México. *Acta Agrícola y Pecuaria*, 8(1), Article 1. <http://aap.uaem.mx/index.php/aap/article/view/173>
- Torres, A. M., Camargo, F., Ricciardi, B. V., Ricciardi, G. y Dellacassa, E. (2014). Plantas como antiveneno: del mito al logos. Ediciones Universitarias.

- Pereañez, A. J., Jiménez, L. S., Quintana, C. J., Nuñez, V., Fernández, M. & Restrepo, Y. (2008). Inhibición de las actividades proteolítica, coagulante y hemolítica indirecta inducidas por el veneno de *Bothrops asper* por extractos etanólicos de tres especies de Heliconias. *VITAE, Revista de la Facultad de Química Farmacéutica*. Volumen 15 número 1.
- Pereañez A. J., Quintana J. C., Alarcón J. C. & Núñez V. (2014). Isolation and functional characterization of basic phospholipase A2 from colombian *Bothrops asper* venom. *VITAE Revista de la Facultad de Química Farmacéutica*. Volumen 21 Número 1.
- Pijoan, M. (2008). Antídotos tribales (y II). Herencia milenaria. *Ámbito farmacéutico. Etnofarmacología*. 27(10), 105-109.
- Ramos Paredes, A. R. & Paredes Fernández, W. J. (2017). Estudio comparativo de los efectos miotóxicos e inflamatorios por acción de fosfolipasas A2 nativas y modificadas químicamente procedentes de veneno de *Bothrops andianus*. *Revista Postgrado Scientiarum*. Volumen 3 – Número 1. P. 45 – 50. DOI: 10.26696/sci.epg.0046
- Rengifo-Zevallos, D. R. (2018). Estudio fitoquímico cualitativo preliminar y cuantificación de flavonoides y taninos del extracto etanólico de hoja de *Desmodium vargasianum* Schubert. *Rev Soc Quím Perú*. 84(2).
- Rivas-Mercado E. A. & Garza-Ocañas L. (2017). Disintegrins obtained from snake venom and the pharmacological potential. *Medicina Universitaria*. 2017; 19 (74): 32 – 37. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rmu.2017.02.004>
- Rodríguez-Landa, J. F., Hernández-Lozano, M. & Méndez-Ventura, L. M. (2020). Manual de prácticas de farmacognosia. Universidad Veracruzana. Facultad de Química Farmacéutica Biológica. Xalapa, Ver.
- Román-Domínguez L., Neri-Castro E., Vázquez-López H., García-Osorio B., Archundia I. G., Ortiz-Medina J. A., Petricevich V. L., Alagón A. & Bénard-Valle M. (2019). Biochemical and immunochemical characterization of venoms from snakes of the genus *Agkistrodon*. *Toxicon*: X 4 (2019) 100013. <https://doi.org/10.1016/j.toxcx.2019.100013>
- Saffidine, K., Zerargui, F., Guemmaz, T. & Baghiani, A. (2023). Evaluation of antioxidant, antihemolytic activity, analgesic and anti-inflammatory potential of *Aristolochia clematitis* extracts. *Trop J Nat Prod Res*. 7(5). 2996 – 3001.
- Saldarriaga-Cordoba, M., Parkinson, C. L., Daza, J. M., Wüster, W. & Sasa, M. (2017). Phylogeography of the Central American lancehead *Bothrops asper* (serpentes: viperidae). *Plos one* 12(11): e0187969. doi: 10.1371/journal.pone.0187969.
- Saravia-Otten, P., Hernández, R., Marroquín, N., García, G., Mérida, M., Cruz, S., Orozco, N., Cáceres, A. & Gutiérrez, J. M. (2017). Inhibición de los efectos coagulante, fosfolipasa A2 y proteolítico del veneno de *Bothrops asper* por plantas usadas tradicionalmente en Centroamérica. *Ciencia, tecnología y salud*. Vol. 4, No. 2.
- Saravia-Otten, P., Hernández, R., Marroquín, N., García, G., Nave, F., Rochac, L., Genovez, V., Mérida, M., Cruz, S. M., Cáceres, A. & Gutiérrez, J. M. (2021). Inhibición de la actividad proteolítica y fosfolipasa A2 del veneno de *Bothrops asper* por el extracto etanólico de *Neurolaena lobata* (L.) Cass. *Ciencia, tecnología y salud*. Vol. 8, Núm. 1.
- Solano-Godoy J. A., Molano-Cardona E. D., Bernal-Bautista M. H. & Murillo-Arango W. (2020). Actividad fosfolipasa, hemolítica y bactericida preliminar de la serpiente de cascabel de Tolima. *Ciencia en Desarrollo*, Vol. 11 No. 1. Doi: <https://doi.org/10.19053/01217488.v11.n1.2020.9869>
- Sotelo-Leyva, C., Tagle-Emigdio, L. J., Aniceto-Teofilo, C., Galeana-Hernández, J., Condori-Cordero, S., Flores-Blanco, G., & Salinas-Sánchez, D. O. (2022). Estudio etnofarmacológico y fitoquímico de las plantas medicinales de mayor uso en Julián Blanco, Guerrero, México. *Acta Agrícola y Pecuaria*, 8(1), Article 1. <http://aap.uaem.mx/index.php/aap/article/view/173>
- Torres, A. M., Camargo, F., Ricciardi, B. V., Ricciardi, G. y Dellacassa, E. (2014). Plantas como antiveneno: del mito al logos. Ediciones Universitarias.

Torres, A. M., Camargo, F., Ricciardi, G., Dellacasa, E. & Ricciardi, A. (2007). Estudio de la actividad antihemolítica in vitro de extractos de *Cissampelos parera* contra veneno de *Bothrops neuwiedi diporus* (cope) (yárrara chica). Bol. Latinoam. Caribe Plant. Med. Aromáticas. Vol. (6) 5.

Tuz-Canche, M., Aguilar-Cordero, W. & Cruz-Blanco, V. (2022). Uso de plantas alexitéricas como antídotos en un área de protección de flora y fauna en México. Revista estudios ambientales. Vol 10, N°2.

Vasudev, S., More, S.V., Ananthraju, K. S. & More, S. S. (2021). Potential of herbal cocktail of medicinal plant extracts against “big four” snake venoms from India. Journal of Ayurveda and Integrative Medicine. 12 458 – 464. <https://doi.org/10.1016/j.jaim.2021.04.006>

World Health Organization WHO. (2018). Global snakebite burden. A71/17. http://apps.who.int/gb/ebwha/pdf_files/WHA71/A71_17-en.pdf