

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTILETAL *in vivo* DEL EXTRACTO ACUOSO DE *Barleria lupulina* Lindl (ACANTHACEAE) SOBRE EL VENENO DE *Crotalus durissus cumanensis*

In vivo Antilethal Activity Determination of the Aqueous *Barleria lupulina* Lindl (Acanthaceae) Extract on the *Crotalus durissus cumanensis* Venom

José Angel Urdaneta R.¹ y Alejandra Páez de Salazar²

¹ Egresado del Departamento de Biología. ² Profesor jubilado, Departamento de Biología, Facultad Experimental de Ciencias, Universidad del Zulia. Maracaibo 4005-A, estado Zulia, Venezuela.

RESUMEN

La capacidad neutralizante *in vivo* del extracto acuoso de *Barleria lupulina*, fue evaluada contra el efecto letal del veneno de *Crotalus durissus cumanensis* realizando pruebas de inoculación sin mezclas previas, e inoculando ratones albinos con un peso entre 20-22 g., por vía Intraperitoneal (I.P). El veneno liofilizado se obtuvo de un lote de serpientes provenientes del municipio La Cañada de Urdaneta, Edo. Zulia, Venezuela. La dosis reto del veneno utilizada fue 10 veces la DL₅₀ determinada (DL₅₀ = 0,11 mg/kg). El extracto acuoso se obtuvo por el método de maceración y extracción por digestión en frío de un pool de hojas frescas de *B. lupulina*, en agua destilada. Se realizaron dos tipos de pruebas de neutralización: 1) Los animales se inocularon con el veneno y 30 min después se les administró 0,3 mL del extracto acuoso; 2) Los animales fueron pretratados con 0,3 mL del extracto acuoso, para posteriormente inocular el veneno a intervalos de: 0, 15, 30 y 60 min. En la primera experiencia no se obtuvo efecto neutralizante del extracto acuoso, no existiendo relación veneno-extracto, el cual ya estaría acoplado a sus sitios de acción y evitarse la mortalidad. En el segundo caso, el extracto acuoso confirió un margen de protección relativamente corto contra la acción letal que disminuye progresivamente con el tiempo, probablemente porque al pasar al plasma es susceptible de experimentar procesos metabólicos de biotransformación y luego se excreta por la orina, siendo la cantidad restante cada vez más insuficiente para actuar sobre la dosis administrada del veneno.

Palabras clave: *Barleria*, *Crotalus*, antilethal, neutralización.

ABSTRACT

The *in vivo* neutralizing capacity of the aqueous *Barleria lupulina* Lindl (Acanthaceae) extract was evaluated against the lethal effect of the *Crotalus durissus cumanensis* venom, performing non-previously mixed inoculation test, and inoculating 20-22 g albino mice by intraperitoneal via (IP). The freeze-dried venom was obtained from native snakes of La Cañada de Urdaneta, zulia state, Venezuela. The used challenge dose was 10 fold the determined DL₅₀. (that is, 0.11 mg/kg). The aqueous extract was obtained by macerating and extracting through cool digestion a pool of *Barleria lupulina* fresh leaves in distilled water. Two types of neutralization test were made: 1. The animals were inoculated with venom, and 30 minutes later, 0.3 mL of the aqueous extract were administered. 2. The animals were pre-treated with 0.3 mL of the aqueous extract to inoculated the venom afterwards in 0, 15, 30, 60 minute intervals. In the first experiment, the neutralizing effect of the aqueous extract was zero, and there was not relationship between venom-extract, which would be coupled to their action sites, and therefore, mortality could not be avoided. In the second case, the aqueous extract provided a relatively short protection against the lethal action, which progressively decreased through time, probably because, by passing through the plasma, it was susceptible to undergo biotransforming metabolic processes, and it was also excreted through the urine, until the remaining quantity was insufficient to act upon the administered venom dose.

Key words: *Barleria*, *Crotalus*, antilethal, neutralization.

INTRODUCCIÓN

En Venezuela hasta el momento, el único tratamiento terapéutico efectivo contra el accidente ofídico es el suero antiofídico, producido por el Centro de Biotecnología de la Facultad de Farmacia de la Universidad Central de Venezuela. Sin embargo, la comercialización y distribución del producto es deficiente en todo el territorio, más aún en las áreas rurales, donde la atención médica prestada depende de los Ambulatorios Rurales. El desconocimiento general sobre el producto en estas áreas poco pobladas y desarrolladas del país, ha mantenido viva la cultura de la medicina natural y de la etnobotánica, donde se utilizan aún plantas que se supone son antagonistas de la actividad biológica de los venenos de las serpientes e insectos ponzoñosos.

La forma de su uso y preparación depende fundamentalmente del órgano u órganos de la planta o plantas utilizadas, pudiendo ser las formas tradicionales de preparación: infusión, pasta, macerado, cenizas, etc. [15, 19]. En algunos casos particulares cuando se trabaja con varias especies de plantas u órganos de las mismas, puede ocurrir sinergismo entre los principios activos, repotenciándose su actividad biológica. Asimismo, la forma de administración del preparado depende de la cosmovisión* del usuario, la cual propicia el uso y tratamiento adecuado, siendo las más utilizadas: oral, cataplasma o combinadas.

Este último argumento es usualmente considerado por los científicos en aquellos casos que se desean repetir los ensayos, sobre la actividad biológica neutralizante de la(s) planta(s) en un laboratorio. Sin embargo, desde el punto de vista del Investigador, el problema en la descripción de la acción neutralizante de los principios activos de las plantas es la complejidad de los efectos ejercidos sobre los componentes del veneno. El otro problema lo representa la terapia utilizada y la forma adecuada de administración, con la cual se pueden obtener resultados confiables, aunque en muchos estudios la forma de administración de la dosis de la planta queda a juicio e ingenio del investigador, tomando en cuenta la forma tradicional de preparación [9].

La actividad inhibitoria de los principios activos de las plantas puede resultar positiva, cuando se mezclan el extracto y el veneno *in vitro* para luego ser inoculado en los animales experimentales, pero a la vez puede ser incierta cuando se realizan inoculaciones independientes de ambos, intentando de alguna forma símil repetir el evento que puede ocurrir ante un caso de emponzoñamiento ofídico, determinando la actividad biológica del preparado *in vivo*.

En estudios preliminares sobre la actividad biológica de *Barleria lupulina*, se demostró que los extractos acuosos obtenidos de las hojas de la planta eliminan la actividad letal neu-

rotóxica del veneno de *Crotalus durissus cumanensis*, cuando éstos son preincubados en mezclas antes de ser inoculados en los animales, siendo distintos los resultados cuando se inoculaban el veneno y el extracto acuoso independiente uno del otro, indiferentemente de la vía de inoculación utilizada [20].

El género *Barleria* está representado en Venezuela por dos especies de la familia Acanthaceae, introducidas en el país [1, 17] y las cuales se presume pertenecen a la flora típica de Bangkok [18]. De esta planta se sabe muy poco en el ámbito científico y popular, reseñándose que presenta un uso medicinal en la etnobotánica de los Indios Panare del estado Bolívar. La forma de empleo tradicional es la utilización de la parte aérea de la planta (hojas), colocadas en licor blanco para ser macerado, y administradas en los casos de accidentes por serpientes de Cuaima Piña (*Lachesis muta*), ingiriendo el contenido líquido del macerado y colocando las hojas en cataplasma sobre el área afectada por la mordedura, para obtener resultados satisfactorios en las situaciones antes mencionadas. Asimismo, se utiliza por vía oral, el extracto acuoso en los casos de picaduras de insectos, por las propiedades antiinflamatorias que confieren sus hojas, en la medicina natural de ciertas regiones del estado Zulia [20].

El presente estudio contempla el uso de los extractos acuosos obtenidos de las hojas de la especie *Barleria lupulina* Lindl, para determinar su capacidad neutralizante contra la acción letal del veneno de serpiente de Cascabel del Zulia (*Crotalus durissus cumanensis*), realizando pruebas de inoculación independiente (sin mezclas previas) del extracto y el veneno. En la metodología empleada, se mantienen los lineamientos básicos del método utilizado por los Indígenas para su preparación, realizando cambios en el vehículo líquido de alcohol por agua destilada, por corroborarse en ensayos previos que la actividad biológica deseada está presente en los extractos acuosos obtenidos de las hojas maceradas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales de experimentación

Se utilizaron ratones de la especie *Mus musculus*. L., de la cepa BALB/c, con un peso comprendido entre los 20-22 g., para las pruebas de la evaluación de la actividad biológica; reproducidos en el bioterio del laboratorio de Ecofisiología del Departamento de Biología, Facultad Experimental de Ciencias, Universidad del Zulia. Los ratones fueron utilizados sin distinción de sexo y en grupos de 6 para cada prueba realizada. La vía de inoculación de todas las pruebas, tanto para el extracto como para el veneno, fue la Intraperitoneal (I.P.).

Veneno utilizado

El pool de veneno usado se obtuvo de un lote de serpientes de cascabel común (*Crotalus durissus cumanensis*) provenientes del municipio La Cañada de Urdaneta y mante-

* Término utilizado para describir la manera de ver el mundo mágico y místicos por parte de las Etnias Indígenas, Curanderos y Chamanes.

nidas en el bioterio de serpientes de la Unidad de Investigaciones Ofidológicas (U.I.O), Facultad de Ciencias Veterinaria, LUZ. El veneno liofilizado (en polvo), fue rehidratado con solución salina al 0,9% cada vez que se utilizó. La DL_{50} intraperitoneal determinada para el veneno fue de 0,11 mg/kg. Para todas las pruebas el tiempo de observación establecido fue de 48 h.

Preparación del extracto acuoso de *Barleria lupulina*

Las hojas se obtuvieron de plantas cultivadas en condiciones controladas en los jardines del Bloque A-1 del Departamento de Biología, Facultad Experimental de Ciencias, L.U.Z. El extracto acuoso se preparó por el método de extracción por digestión en frío de un pool de hojas de *B. lupulina*, maceradas con agua destilada [10, 11]; dejándolo reposar por espacio de 3 h a temperatura ambiente de laboratorio ($\pm 25^{\circ}\text{C}$), elaborando al final un extracto acuoso concentrado, filtrado con una malla para retirar las partículas más grandes. El filtrado obtenido fue prefiltrado a su vez con un filtro Watman # 1, y el filtrado final con filtro Millipore (con abertura de poro $0,45\mu$) en embudo Büchner con bomba de vacío, para luego ser dispensado en viales con tapa de baquelita, y finalmente refrigerado a -4°C , y descongelado a temperatura ambiente de laboratorio cada vez que se utilizó en las pruebas.

Experiencias con inoculación independiente

Se utilizó el método de pruebas de neutralización del veneno por vías de inoculación independiente (sin mezclas previas) [5, 11], y modificado para disminuir la cantidad de líquido final a inyectar (0,2 mL). La dosis reto [3, 6] utilizada fue 10 veces la DL_{50} hallada para el veneno = 1,1 mg/kg, realizándose dos tipos de pruebas *in vivo* sin mezclas previas del veneno y el extracto:

Protocolo 1: los animales son inyectados primero con la dosis del veneno y 30 min después, se administró 0,3 mL del extracto acuoso [6, 12]. Se realizaron controles con ratones

inoculados solos, con las mismas cantidades tanto para la dosis reto del veneno como para el extracto como control. Los ensayos fueron realizados en repetidas veces (cinco grupos de seis animales) y sus resultados evaluados en porcentajes de sobrevivencia, destinando a un grupo como control positivo del efecto letal del veneno, para estimar el tiempo promedio de vida de los animales.

Protocolo 2: Se les dió un pretratamiento a cinco (5) grupos de seis (6) animales con 0,3 mL del extracto acuoso, para luego ser inoculado el veneno a intervalos de tiempo: 0, 15, 30 y 60 min [9, 13]. Un grupo se destinó como control negativo de la actividad del extracto acuoso. Los resultados se expresan en número de animales muertos / total de animales inoculados, para cada intervalo de tiempo. Para todas las pruebas, el tiempo de observación establecido fue de 48 h.

RESULTADOS

Experiencias con inoculación independiente: administración del veneno y posteriormente del extracto acuoso (Protocolo 1)

En esta primera experiencia, donde se inoculó primero el veneno y pasado 30 min se administró el extracto acuoso, se obtuvo como resultado la ineffectividad del extracto, una vez que el veneno ya estaba en el organismo, ocurriendo como consecuencia un 100% de mortalidad TABLA I. Sin embargo, el tiempo promedio de supervivencia de los animales experimentales fue ligeramente menor al tiempo obtenido para los ratones control con veneno sólo.

Experiencias con inoculación independiente: pretratamiento con el extracto acuoso antes de inocular el veneno (Protocolo 2)

En este tipo de prueba se les administró a los animales un pre-tratamiento con el extracto acuoso de *Barleria lupulina*

TABLE I
EXPERIENCIAS *in vivo* POR VÍAS DE INOCULACIÓN INDEPENDIENTE DEL VENENO DE *Crotalus durissus cumanensis* Y EL EXTRACTO ACUOSO DE *Barleria lupulina*

Tiempo de Observación (h)	Letalidad					
	Control sólo con extracto acuoso	%	Control sólo con veneno	%	Inoculados posteriormente con extracto	%
0	0 / 6	0	0 / 6	0	0 / 6	0
1	0 / 6	0	0 / 6	0	0 / 6	0
3	0 / 6	0	3 / 6	50	4 / 6	66,67
6	0 / 6	0	6 / 6	100	6 / 6	100
12	0 / 6	0	-	-	-	-
24	0 / 6	0	-	-	-	-
48	0 / 6	0	-	-	-	-

*Nº Ratones muertos / Total de Ratones inoculados.

(0,3 mL) por la vía de inoculación intraperitoneal, para luego administrar el veneno (a dosis constantes) en cuatro lapsos: a los 0, 15, 30 y 60 min después de la inoculación del extracto. Los resultados obtenidos denotan que el extracto acuoso de *Barleria lupulina*, confiere un tiempo de protección promedio de 30 min aproximadamente contra la acción letal del veneno de *Crotalus durissus cumanensis* y una vez superado este período, el margen de protección se pierde y como consecuencia la mortandad total es inevitable a la hora de haber sido inoculados, TABLA II. Sin embargo, se observó que el tiempo promedio de supervivencia de los animales, se prolongó un poco más con respecto al de los animales controles con veneno solo, es decir, entre el lapso de tiempo comprendido entre las 3 y las 6 h, los animales inoculados con veneno solo, no superaban las 4 h promedio de vida, caso contrario ocurrió con algunos animales pretratados, en los cuales se observó que se prolongó la agonia.

DISCUSIÓN

Experiencias con inoculación independiente: administración del veneno y posteriormente del extracto acuoso (Protocolo 1)

En las pruebas realizadas del Protocolo 1, se obtuvo como resultado que el efecto neutralizante del extracto acuoso, cuando éste es inyectado 30 min después de la dosis de veneno, es nulo y la mortalidad no puede ser evitada. Por el contrario, el tiempo de sobrevivencia de los animales fue ligeramente menor con respecto al grupo control de veneno solo, probablemente ocasionado por el efecto tóxico de la gran cantidad de taninos que se pueden detectar fácilmente por el sabor astringente o amargo del extracto acuoso, que pueden estar repotenciando el efecto tóxico del veneno, aun cuando en el grupo control con extracto sólo (control negativo) no hubo muertes. En este caso particular los síntomas comúnmente observados en algunos animales fueron: constreñimiento corporal, taquicardia y arritmia, los cuales desaparecían con el tiempo.

De esta forma, se infiere que el extracto acuoso no causó el efecto antiletal deseado, pudiendo ser explicado desde el punto de vista de la farmacodinámica del veneno y del extracto, en función de la posibilidad de que no existiera una relación

entre el o los principio(s) activo(s) del extracto y el veneno, el cual este último ya estaría acoplado a sus sitios de acción. Por otra parte, si se suma la acción letal del veneno: ataque neurotóxico, más la sintomatología presentada descrita para los ratones control inoculados con el extracto sólo, se podría deducir, por qué en este caso particular el tiempo de supervivencia de los animales es ligeramente menor que el de los animales control inoculados con veneno sólo.

Otra posibilidad es que la dosis del extracto utilizada sea insuficiente para neutralizar el veneno ya que una parte de ésta pasaría al torrente sanguíneo la cual puede haber sido excretada vía orina, y percibiéndose en el color oscuro y olor fuerte (muy parecido al del extracto) en la orina de los animales, minutos después de ser inoculados con el extracto. Por otra parte, farmacológicamente hablando, el riego sanguíneo a través de un tejido, guarda relación con la rapidez de absorción del medicamento desde su lugar de inyección. Así pues, conociendo el efecto neurotóxico del veneno, éste actúa a nivel del sistema nervioso central (bulbos raquídeos y centros cardiorespiratorios de la corteza cerebral), hay trastornos psicomotores, arritmia cardíaca y disfagia. Dichos síntomas aparecen al transcurrir los primeros 30 min, después de la inyección del veneno [4, 8]. Estos dos últimos síntomas se traducen en trastornos de la circulación sanguínea por lo que el animal entra en un estado de cianosis moderada, por lo que se infiere que la distribución del extracto en el organismo se dificulta.

En otro aspecto existen varios factores que contribuyen a la distribución desigual de medicamentos en el cuerpo, entre los cuales pueden citarse [7]:

1. Fijación a proteínas plasmáticas, lo que causa una concentración más elevada en la sangre que en el líquido extracelular. La fracción del medicamento unida a la proteína suele ser inactiva hasta que se libera. Una droga que se une mucho a una proteína desplaza a otra aumentando su actividad y su toxicidad, y modifica su distribución.
2. La fijación celular de los medicamentos suele depender de la afinidad por algún constituyente celular.
3. La denominada barrera hematoencefálica, representa un ejemplo único de distribución desigual de medicamen-

TABLA II
EXPERIENCIAS DE PRETRATAMIENTO CON EXTRACTO ACUOSO DE *Barleria lupulina* ANTES DE INOCULAR EL VENENO DE *Crotalus durissus cumanensis*

Tiempo de inoculación del extracto (min)	Tiempo de observación (h)*						
	0	1	3	6	12	24	48
0	0/6	1/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6
15	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6
30	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6
60	0/6	0/6	3/6	6/6	-	-	-
Control con veneno	0/6	0/6	3/6	6/6	-	-	-

*N° de Ratones muertos /N° de Ratones total inoculados.

tos. Incluso inyectadas por vía intravenosa, muchas drogas no penetran en el sistema nervioso central, el líquido cefalorraquídeo, o el humor acuoso, tan rápido como en otros tejidos. Los capilares del sistema nervioso central están rodeados de las células de glía, que representan una barrera para muchos compuestos hidrosolubles pero son permeables a sustancias liposolubles. Así, por ejemplo las aminas cuaternarias penetran poco en el sistema nervioso central.

4. Otro factor es el tiempo de vida media que posee un medicamento o su desaparición y semidesintegración biológica, la frecuencia con la cual deben administrarse los medicamentos depende muchas veces de este hecho.

En este caso pueden existir dos posibilidades íntimamente relacionadas y el extracto no está cumpliendo su función protectora: La primera, es que el (los) principio(s) o compuesto(s), sea (n) hidrosoluble(s), razón por la cual para que ocurra el efecto farmacológico de neutralización, es necesario que la droga llegue al sitio de acción. Para que esto se cumpla, cualquiera que sea la vía utilizada para administrarlo, éste debe atravesar las membranas para llegar al torrente sanguíneo y una vez en la sangre, las moléculas de origen hidrosoluble forman soluciones en el agua del plasma. Algunas pueden ser captadas por los eritrocitos, y las moléculas liposolubles se transportan unidas a las proteínas plasmáticas [2].

Sin embargo, a pesar de lo antes planteado, el sitio principal de unión de las drogas durante su permanencia en la sangre son las proteínas plasmáticas. Si no ocurre, la fracción de droga libre, que es la capaz de dar lugar a la respuesta farmacológica y que se encuentra en el plasma, es susceptible de sufrir biotransformación hepática o de ser filtrada en el glomérulo renal y posteriormente excretada, siendo ésta la segunda posibilidad, recordando que la cantidad de droga libre es la que en realidad ejerce el efecto sobre el sitio de acción [2].

Entre todas estas propuestas se puede encontrar la razón del porque el extracto acuoso haya sido inefectivo bajo las condiciones de su evaluación, ya que en otras pruebas preliminares para estandarización de la metodología de administración del extracto, éste al ser inoculado por la vía intravenosa, inmediatamente después de la dosis reto de veneno de 0,66 mg/kg de peso de los ratones (seis veces la DL₅₀ utilizada en este trabajo), por la misma vía, se logró neutralizar la acción letal *in vivo* de éste (resultados no publicados); por lo que cobra fuerza la hipótesis del compuesto hidrosoluble que no puede atravesar las membranas liposolubles de las células donde el veneno está actuando, sufriendo biodegradación y posteriormente excreción en la orina.

Otra causa a favor de esta hipótesis es que el endotelio vascular por sus características histológicas, no está capacitado para ofrecer resistencia verdadera al paso de las moléculas, afirmándose que cualquier molécula de droga es capaz de atravesar la pared de los vasos sanguíneos si reúne ciertas características esenciales, entre las cuales están fundamental-

mente: las moléculas libres de unión a las proteínas plasmáticas y de dimensiones moleculares bajas, que pueden atravesar la pared de los capilares a través de los canales acuosos [2]. Asimismo se puede pensar que él o los principio(s) activo(s) presentan estructuras moleculares que no cumplen con las dos condiciones anteriores.

Experiencias con inoculación independiente: pretratamiento con el extracto acuoso antes de inocular el veneno (Protocolo 2)

En las pruebas de pretratamiento con extractos de plantas, algunos investigadores han sido citados por sus trabajos, al demostrar la efectividad de estos. Entre estos podemos mencionar por ejemplo, Nazimudeen y col. (1978) [9, 16], los cuales estudiaron el efecto de la porción soluble en agua del extracto alcohólico de *Andrographis paniculata* (Acanthaceae), contra el veneno de cobra (*Naja naja*), donde los animales fueron pretratados con 100 mg del extracto (utilizando animales de 25 g de peso) por la vía I.P., 30 min previo a la inoculación del veneno (0,32 mg/kg de peso) por la misma vía. El resultado obtenido fue que el extracto sólo prolongó el tiempo de vida de los ratones no confiriéndoles protección. En otro caso, Martz, cita los resultados obtenidos por Onouguluchi (1989), sobre el efecto protector de *Diodia scandens* (Rubiaceae) [9], donde se evaluó el residuo obtenido de la fracción etanólica de la planta y se administró por la vía I.P. (1,5 mg/kg), 30 min antes de la inoculación del veneno de *Echis carinatus*: 3 mg/kg, por la misma vía. La mortalidad se vio reducida de 80 a 30%, sin embargo cuando la dosis de veneno era 4 mg/kg y administrada por esta vía, el residuo no daba ninguna protección, pero prolongaba el tiempo de supervivencia de los animales a 4 horas más que los 10 min de los animales controles con veneno sólo, aunque las convulsiones causadas por el veneno (acción neurotóxica) eran prevenidas.

Aunque estos resultados son en cierta forma similares a los obtenidos para el extracto acuoso de *B. lupulina*, el que más se asemeja es el reportado sobre el pretratamiento oral de ratones contra dos veces la dosis letal 50 del veneno de *Bothrops jararaca* [14], en los ensayos con 18 especies de 13 familias de plantas superiores, donde los extractos de *Phyllanthus klotzschianus* (Euphorbiaceae), *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) y *Apoleia leiocarpa* (Leguminosae), demostraron conferir el 100% de protección por un lapso de 48 horas antes de la administración del veneno, mientras que los extractos de otras especies, tales como *Periandra piyalu* y *Periandra mediterranea* (Papilionodeae), parecen ser menos efectivos, y su efecto protector decrece con el tiempo. En esto último existe mucha similitud con los resultados reportados para *B. lupulina*, donde la posible causa del corto margen de protección conferido por el extracto puede estar sujeta a las teorías de como se distribuyen las drogas en el organismo, comentadas anteriormente, siendo la más factible la biotransformación y posterior excreción del extracto del organismo, disminuyendo la protección conferida con el tiempo.

De esta forma se puede inferir que el extracto administrado permanece en el peritoneo el tiempo suficiente mientras es transportado hacia el torrente sanguíneo, ocurriendo que esta permanencia del remanente esté neutralizando la acción del veneno al momento de ser inoculado, es decir, el peritoneo sirve como sitio de mezclas de ambos, pero una vez transcurrido cierto tiempo el extracto que ya puede estar en mayor cantidad en solución en el plasma, es susceptible de experimentar biodegradación y ser excretado, siendo una pequeña parte restante la que puede actuar sobre la fosfolipasa A2 (causante de la acción letal neurotóxica del veneno de cascabel), esto último cuando ésta penetra al torrente sanguíneo. Esta propuesta lógica puede dar explicación al hecho de que decrece el margen de protección a partir de los primeros 30 min y posiblemente sea progresivo hasta alcanzar la hora donde no existe suficiente efectividad de protección.

CONCLUSIONES

El extracto acuoso de *Barleria lupulina*, confiere un margen de protección contra la actividad neurotóxica de la fosfolipasa A2 del veneno de *Crotalus durissus cumanensis*, causante de la acción letal en los animales experimentales, cuando éstos son pretratados con el extracto previo a la inoculación de la dosis del veneno. Sin embargo, transcurridos los primeros 30 min, la protección comienza a perderse hasta alcanzar la hora de haber sido inoculados los animales con el extracto, efecto evidenciado por la pérdida de la protección contra el veneno en relación al tiempo promedio de vida observado para los animales control con veneno solo (no mayor de 3 h promedio), donde la sobrevivencia de los ratones pretratados con extracto, es ligeramente mayor que el de los ratones control (no mayor de cuatro horas en promedio). Esta pérdida progresiva del efecto antiletal debe estar explicada en función de los mecanismos propios de la farmacodinámica del extracto en el organismo (desconocidos con exactitud), el cual es probable que haya sufrido procesos metabólicos de biotransformación y posterior excreción en su tiempo de residencia como droga en el torrente sanguíneo del animal.

Asimismo, existe la posibilidad de que él o los principio(s) activo(s) presentes en el extracto acuoso sea de origen hidrosoluble, cuya estructura molecular es de tamaño moderado, y por tal razón, no puede atravesar las barreras liposubles con facilidad y penetrarlas para llegar al sitio de acción de la fosfolipasa A2, en las células nerviosas donde efectúa su acción neurotóxica. Por lo tanto, no existe la relación extracto-veneno deseada para abolir la actividad de la enzima, y al ser inoculado posteriormente a la administración de la dosis del veneno, éste no presenta la actividad antiletal deseada.

Al trabajar con este tipo de investigaciones, se puede apreciar el potencial oculto que presentan los principios activos de las plantas, así como la pérdida de los valores culturales que cada vez se alejan más de la Ciencia y la Tecnología,

al descartar la valiosa información que se puede obtener de las etnias, sin considerar la enorme probabilidad de encontrar respuestas a muchos de los problemas de salud en la cosmovisión del indígena y el uso propiciado por este al entorno que lo rodea.

RECOMENDACIONES

Definir la metodología a ser implementada por el investigador, y guardar en cierto sentido la forma de uso tradicional propiciada por las comunidades o personas que utilizan las plantas para este fin. Ya que no existen ensayos estandarizados en esta área de la investigación, queda a juicio del investigador describir la metodología utilizada donde se mencionen: el número de animales utilizados, cepas, peso, vías de administración, vehículos utilizados para preparar el extracto, etc. y cualquier aspecto que se considere de interés y sirva como guía para repetir los experimentos en laboratorio.

AGRADECIMIENTO

Los autores desean expresar su gratitud al Consejo Nacional de Investigaciones, Científicas y Tecnológicas (CONICIT) y al Consejo Nacional de Desarrollo Científico y Humanístico de La Universidad del Zulia (CONDES) por subvencionar esta investigación a través del Proyecto "Estudio ecofisiológico de algunas plantas medicinales para ser utilizadas como materia prima en la obtención de medicamentos".

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] BADILLO, B.M.; SCHNEE, L.; ROJAS, C.B. **Clave de las Plantas Superiores de Venezuela**. Espasande, S.R.L. Editores. 7^{ma} Edición. Caracas-Venezuela: 6, 185. 1985.
- [2] CEDILLO, S. Destino de las drogas. **Texto de la Universidad de los Andes 2343**. Consejo de Publicaciones de la Universidad de los Andes. Mérida-Venezuela: 7-11, 13-20. 1988.
- [3] FERREIRA, L.A.F.; HENRIQUES, O.B.; ANDREONI, A. A.S.; VITAL, G.R.F.; CAMPOS, M.M.C.; HABERMEHL, G.G.; MORAES, V.L.G. Antivenom and biological effects of ar-turmerone isolated from *Curcuma longa* (Zingiberaceae). **Toxicol.** 30 (10): 1211-1218. 1992.
- [4] GRILLO, O.; SCANNONE, H.; PARRA, N.D. Enzymatic activities and others characteristics of *Crotalus durissus cumanensis* venom. **Toxicol.** Vol 12: 297-302. 1974.
- [5] GUTIÉRREZ, J.M.; LOMONTE, B.; GENÉ, J.A.; CHAVEZ, F.; ALVARADO, J.; ROJAS, E. Standardization of Assays for testing the neutralizing ability of antivenoms. **Toxicol.** 28 (10): 1127-1129. 1990.

- [6] GUTIÉRREZ, J.M.; ROJAS, G.; LOMONTE, B.; GENÉ, J.A.; CHAVEZ, F. La Evaluación de la Capacidad Neutralizante de los Antivenenos en América. **Publicaciones del Instituto Clodomiro Picado**. Universidad de Costa Rica: 3-21. 1990b.
- [7] GOTH, A. **Farmacología Médica. Principios y conceptos**. Nueva Editorial Interamericana, S. A. De C. V. Mexico. 8ª edición: 13-21 1977.
- [8] LANCINI, A.R. **Serpientes de Venezuela**. Ernesto Armitano Editor, 2ª edición: 228. 1986.
- [9] MARTZ, W. Plants with a reputation against Snakebite. **Toxicon**. 30 (10): 1131-1142. 1992.
- [10] MELO, P.A.; DO NACIMIENTO, M.C.; MORS, W.B. SUAREZ, G. Inhibition of the myotoxic and hemorrhagic activities of crotalid venoms by *Eclipta prostrata* (Asteraceae) extracts and constituents. **Toxicon**. 32 (5): 595-603. 1994.
- [11] MORS, W.B.; DO NACIMIENTO, M.C.; PARENTE, J.P.; DO SILVA, M.H.; MELO, P.A; KURTZ, G. Neutralization of lethal and myotoxic activities of South American Rattlesnake Venom by extracts and constituents of the plant *Eclipta prostrata* (Asteraceae). **Toxicon**. 27 (9): 1003-1009. 1989.
- [12] OWBNEY, CH.L. Comments on letter to the editor, Standardization of Assays for testing the neutralizing ability of antivenoms. **Toxicon**. 28 (10): 1129-1130. 1990.
- [13] PEREIRA, N.A.; PEREIRA, R. ; DO NACIMIENTO, M.C.; PARENTE, J.P.; MORS, W.B. Pharmacological screening of plants recommended by folk medicine as Snake venom antidotes; IV Protection against Jararaca venom by isolated constituents. **Planta Médica** 60: 99-100. 1994.
- [14] PEREIRA N.A., RUPPELT, B.M., DO NASCIMENTO, M.C., PARENTE, J.P.; MORS, W.B. An update on plants against snake bite. **2º Simposio Brasileiro-Alemão de Produtos Naturais**, Habermehl, G., Ed. Hannover, F. R.G. 28 July-10 August: 6, 1991.
- [15] SELVANAYAGAM, Z.E.; GNANAVENDHAN, S.G; BALAKRISHNA, K.; BHIMA RAO, R. Antisnake Venom Botanicals from Ethnomedicine. **J. of Herbs, Spices & Medicinal Plants**. 2 (4): 45-47, 87-91. 1994.
- [16] SELVANAYAGAM, Z.E.; GNANAVENDHAN, S.G; CHANDRASEKHARAN, P; BALAKRISHNA K.; BHIMA RAO, R. Plants with antisnake Venom activity - a review on pharmacological and clinical studies. **Fitoterapia**. LXV (2): 99-107. 1994b.
- [17] STECKMEYER, J.A.; BERRY, P.E.; HOLST, B.K. Flora the Venezuelan Guayana. Pteridophytes, Spermatophytes: Acanthaceae - Araceae. General Editors. Vol 2: 341-343. 1995.
- [18] SUCKSAMRAM, G. Iridoids glucosides from *Barleria lupulina*. **J. of Nat. Prod.** 49 (1): 179. 1986.
- [19] SUDARSANAM, G.; PRASAD, S.G. Medical ethnobotany of plants used as antidotes by Yanadi tribes in South India. **J. Herbs, Spices & Medical Plants**. 31(1): 57-60. 1995.
- [20] URDANETA, J.A.; PÁEZ, A. Estudio preliminar sobre la actividad biológica de *B. Lupulina* (ACANTACEA). **Memorias del XLV Convención Anual de AsoVAC**. Universidad Simón Bolívar- Caracas. 18-21 Noviembre: 329. 1995.