



**Universidad Nacional del Nordeste**  
**Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y**  
**Agrimensura**



**Trabajo de Tesis para acceder al Título de**  
**Doctora de la UNNE en Química**

“Evaluación fitoquímica y biológica  
(actividades antimicrobiana y alexitérica) de  
extractos de *Cissampelos pareira*”

**Bioq. Bárbara Verónica Ricciardi Verrastro**

**Dirigida por el Dr. Eduardo Santiago Dellacassa**

**Co-Dirigida por la Dra. Ana María Torres**

Corrientes, junio 2020

*A mi familia por ser apoyo incondicional*

*A mis mentores por ser guía incansable*



## Agradecimientos

A mi director **Dr. Eduardo Dellacassa** y mi co-Directora **Dra. Ana María Torres**.

A la **Secretaría General de Ciencia y Técnica (SGCyT)** que financió los primeros años del desarrollo de este trabajo de tesis con una *Beca de Iniciación* y mediante el programa de *Subsidios de Posgrado*.

A la **Agrupación de Universidades del Grupo Montevideo (AUGM)** que a través del apoyo económico brindado con sus programas de *Movilidad de Posgrado* y *Escala Docente* facilitó mi traslado a la Facultad de Química de la Universidad de la República, Montevideo; donde se desarrolló parte de este trabajo de tesis.

A la **Prof. Lic. Sara G. Tressens** por la identificación botánica de la especie *C. pareira*.

A la **Dra. Soledad Bustillo** por su contribución al desarrollo de los estudios de citotoxicidad por cultivo celular.

A la **Dras. Pamela Teibler** y **Silvana Maruñak** por su contribución al desarrollo de las pruebas *in vivo*.

A la **Dra. Laura Lozina** por su contribución a la formulación del gel termosensible.

A la **Mgter. Susana Ferrero** y la **Bioq. Susana Scaramellini Burgos** por su contribución al desarrollo de los estudios de actividad antimicrobiana.

A la **Dra. Sonia Sgroppo** y el **Dr. Gonzalo Ojeda** por facilitar el equipamiento necesario para la caracterización química por HPLC-DAD.

A los **Dres. Chiara Barnaba, Roberto Larcher** y **Giorgio Nicolini** por su contribución a la elucidación estructural de los componentes bioactivos por UHPLC-MS.





# ÍNDICE



## Índice de contenidos

	Pág. #
<b><u>Resumen</u></b>	<b>i-vi</b>
<b><u>Capítulo 1: Introducción y Marco Teórico</u></b>	
1. Introducción	2
2. Ofidios	4
2.1 Generalidades	4
2.2 Taxonomía y clasificación de ofidios de importancia médica del país	5
2.3 Epidemiología de los accidentes ofídicos	6
2.4 Composición de los venenos ofídicos	8
3. Víboras del género <i>Bothrops sp.</i>	10
3.1 Composición y acción de su veneno	12
4. Tratamiento del accidente ofídico: suero hiperinmune	19
5. Plantas medicinales	23
5.1 Uso etnomedicinal de las plantas alexitéricas	24
5.2 Propiedades alexitéricas comprobadas contra especies del género <i>Bothrops</i>	25
6. Genero <i>Cissampelos</i>	28
6.1 Taxonomía	28
6.2 Generalidades	29
6.3 Usos etnobotánicos de la especie	31
6.4 Actividades biológicas de la especie científicamente validadas	32
7. <i>Cissampelos pareira</i> como antiveneno	33
7.1 Uso etnobotánico de la especie	33
7.2 Validación científica de la actividad	34
8. Antecedentes toxicológicos de la especie	34
9. Referencias bibliográficas	36
<b><u>Capítulo 2: Objetivos e Hipótesis</u></b>	
1. Objetivos generales	52
1.1 De formación	52
1.2 Científicos	52
1.3 Académicos	52
2. Hipótesis	53

## **Capítulo 3: Actividad Alexitérica**

### **Capítulo 3a: Ensayos *in vitro***

1. Introducción	56
2. Materiales y Métodos	57
2.1 Material Vegetal	57
2.2 Preparación de extractos	59
2.3 Pool de veneno de <i>B. diporus</i>	60
2.4 Screening de actividad alexitérica: electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)	60
2.5 Inhibición de las actividades del veneno: ensayos <i>in vitro</i>	63
2.5.1 Inhibición de la actividad proteolítica por SDS-PAGE	63
2.5.2 Inhibición de la actividad hemolítica indirecta por difusión radial en placas de agar sangre-fosfatidilcolina	64
2.5.3 Inhibición de la actividad coagulante	66
2.5.4 Inhibición de la actividad fibrinogenolítica por SDS-PAGE con fibrinógeno	66
2.6 Fraccionamiento bioguiado del extracto activo	68
2.6.1 Cromatografía flash en columna	68
2.6.2 Cromatografía en placa delgada (TLC)	69
2.6.3 Screening de actividad antiveneno de las fracciones por SDS-PAGE e inhibición de las actividades del veneno	69
3. Resultados y Discusión	69
3.1 Obtención de extractos y cálculo de su rendimiento práctico	69
3.2 Screening de actividad alexitérica por electroforesis por SDS-PAGE	70
3.3 Inhibición de las actividades del veneno: ensayos <i>in vitro</i>	72
3.3.1 Inhibición de la actividad proteolítica	72
3.3.2 Inhibición de la actividad hemolítica indirecta	74
3.3.3 Inhibición de la actividad coagulante	77
3.4 Selección del extracto activo	80
3.5 Fraccionamiento en columna flash	80
3.5.1 Rendimiento porcentual de las fracciones	81
3.5.2 Seguimiento de la actividad biológica de las fracciones	82
3.6 Inhibición de la actividad fibrinogenolítica del veneno	84

4. Conclusiones	84
5. Referencias bibliográficas	85
<b><u>Capítulo 3.b: Inhibición de citotoxicidad y ensayos <i>in vivo</i></u></b>	
1. Introducción	89
2. Materiales y Métodos	90
2.1 Análisis de la citotoxicidad del extracto A2III PP y la fracción F6.	90
Inhibición de la citotoxicidad del veneno de <i>B. diporus</i> por F6	
2.1.1 Línea celular y mantenimiento	91
2.1.2 Ensayos de citotoxicidad	91
2.2 Inhibición de las actividades del veneno: ensayos <i>in vivo</i>	92
2.2.1 Neutralización del efecto letal del veneno	93
2.2.2 Neutralización del efecto local del veneno por una formulación	94
de gel termosensible al 1% en fracción activa	
3. Resultados y Discusión	96
3.1 Citotoxicidad	96
3.1.1 Curva de citotoxicidad del etanol 96°	96
3.1.2 Evaluación de la citotoxicidad del extracto A2III PP	97
3.1.3 Evaluación de la capacidad inhibitoria del extracto A2III PP y	
su fracción polar activa F6 contra la citotoxicidad del veneno de <i>B.</i>	98
<i>diporus</i>	
3.2 Análisis de la actividad <i>in vivo</i> del extracto/fracción activa	100
3.2.1 Neutralización del efecto letal del veneno: Inhibición de la	
actividad letal 50 (DL <sub>50</sub> ) del veneno y evaluación de la toxicidad	100
aguda del extracto/fracción	
3.2.2 Neutralización del efecto local del veneno por una formulación	
de gel termosensible al 1% en fracción activa: Determinación de la	101
dosis dermonecrotizante del veneno	
3.2.3 Validación <i>in vivo</i> de la efectividad del gel termosensible sobre	101
el veneno de <i>B. diporus</i>	
4. Conclusiones	109
5. Referencias bibliográficas	110
<b><u>Capítulo 4: Actividad Antimicrobiana</u></b>	
1. Introducción	113

1.1 Principales microorganismos que producen sobreinfección bacteriana en accidentes ofídicos	115
1.2 Plantas como fuentes de antimicrobianos	118
1.3 Extractos de <i>C. pareira</i> como agente antimicrobiano	119
1.4 Veneno de <i>Bothrops</i> como antimicrobianos	120
1.5 Profilaxis antibiótica en el ofidismo	121
2. Materiales y Métodos	122
2.1 Obtención de los extractos vegetales	122
2.2 Ensayos para la evaluación de la actividad antimicrobiana	122
2.2.1 Screening por bioautografía directa	122
2.2.2 Semicuantificación de la actividad antimicrobiana	125
2.2.3 Métodos cuantitativos	127
3. Resultados y Discusión	129
3.1 Actividad antimicrobiana de los extractos de <i>C. pareira</i>	129
3.1.1 Screening por bioautografía	129
3.1.2 Semicuantificación de la actividad antimicrobiana	133
3.1.3 Métodos cuantitativos de dilución en caldo	134
4 Conclusiones	136
5 Referencias bibliográficas	137
<b><u>Capítulo 5: Química</u></b>	
1. Introducción	144
1.1 Química de las plantas alexitéricas. Principales familias de compuestos activos	147
1.1.1 Compuestos fenólicos	147
1.1.2 Alcaloides	158
1.1.3 Esteroides y triterpenos	159
1.1.4 Ácidos	161
1.1.5 Otros compuestos descritos como alexitéricos	162
1.2 Metabolitos secundarios de <i>C. pareira</i>	164
1.2.1 Volátiles	164
1.2.2 No volátiles	164
2. Materiales y Métodos	168
2.1 Química volátil de la especie	168

2.1.1 Obtención del extracto volátil por SDE	168
2.1.2 Análisis químico de la fracción volátil por cromatografía gaseosa acoplada a un espectrómetro de masas (GC-Ms): identificación y cuantificación	169
2.2 Química no volátil de los extractos	169
2.2.1 Marcha fitoquímica: Reacciones de color	170
2.2.2 Cromatografía en placa delgada (TLC)	171
2.2.3 Estudio químico de la fracción activa no volátil	171
3. Resultados y Discusión	173
3.1 Metabolitos volátiles	173
3.1.1 Obtención de los extractos volátiles	173
3.1.2 Composición de los extractos volátiles por GC-Ms	174
3.2 Química no volátil de los extractos etanólicos	177
3.2.1 TLC de los extractos etanólicos de partes aéreas de ambas zonas geográficas de recolección	177
3.2.2 Fitoquímica: reacciones de color	178
3.3 Química no volátil de las fracciones obtenidas	179
3.3.1 TLC de las fracciones	179
3.3.2 Fitoquímica: reacciones de color	179
3.4 Elucidación estructural de los componentes bioactivos	180
3.4.1 HPLC-DAD	180
3.4.2 High Resolution Mass Spectrometry (Q-Orbitrap)	183
4. Conclusiones	185
5. Referencias Bibliográficas	185
<b><u>Capítulo 6: Conclusiones Finales</u></b>	<b>192</b>





# RESUMEN



El planteamiento de este trabajo de tesis fue realizado teniendo en cuenta tres hechos relevantes: por un lado, la especie vegetal *Cissampelos pareira* L. tiene una amplia tradición de uso etnobotánico por los aborígenes de la región del noreste argentino como antiveneno en forma de cataplasmas. Por otro lado, los accidentes ofídicos en esta región tienen una casuística que se encuentra por encima de la tasa país, siendo *Bothrops diporus* (yará chica), responsable del 80% de los mismos. Por último, pero no menos importante, el tratamiento actual del accidente consistente en la aplicación del suero antibotrópico específico que, si bien neutraliza el veneno circulante, no es capaz de revertir los daños locales producidos. Teniendo en cuenta esto, se evaluó la actividad alexitérica y antimicrobiana de la especie *C. pareira*, siendo el objetivo a largo plazo disponer de la información necesaria para diseñar un medicamento herbario con aplicación local.

Se realizó la bioprospección de la especie vegetal, mediante la búsqueda de poblaciones homogéneas y estables, considerando las condiciones edafoclimáticas y las variaciones estacionales de los componentes de su metabolismo secundario relacionado con la actividad biológica. Se identificó el material vegetal y su entorno de modo de realizar un muestreo representativo, y se evaluó el método de extracción más apropiado para los componentes bioactivos de interés. Estos compuestos fueron caracterizados y se realizó la evaluación *in vitro* e *in vivo* de las actividades biológicas de interés.

La recolección del material vegetal se realizó teniendo en cuenta la accesibilidad y abundancia de la especie, encontrando dos poblaciones estables en dos regiones fitogeográficas diferentes de la provincia de Corrientes. La identificación botánica y depósito en herbario de referencia fue realizada por la Prof. Lic. Sara G. Tressens (IBONE):

✓ **Paso de la Patria (PP)**, departamento de San Cosme (Corrientes) (27° 23' 27'' S; 58° 35' 38'' W) – depósito en herbario: Torres, A.M.; Cano, B.; Ricciardi, B. y Ricciardi, G. 17 (CTES);

✓ **Lomas de Vallejos (LV)**, departamento de General Paz (27° 45' 41'' S; 57° 55' 57'' W) – depósito en herbario: Torres, A.M. & B. Ricciardi 19 (CTES).

El material seco fue separado en sus partes componentes: raíces (**R**) y partes aéreas (hojas y tallos blandos) (**A**); para evaluar la influencia del órgano en su actividad biológica. Para la preparación de los extractos se utilizaron tres solventes orgánicos de distinta polaridad: agua, etanol 96° y hexano; que permitieron extraer compuestos y/o familias diferentes con cada uno de ellos.

Se obtuvieron **treinta y seis (36) extractos vegetales** que fueron sometidos a tamizaje de su actividad antiveneno mediante SDS-PAGE. Se evaluó la capacidad de cada uno de ellos para inhibir las principales actividades del veneno: **proteolítica** por SDS-PAGE con caseína, **hemolítica indirecta** en agar sangre fosfatidilcolina y **coagulante** mediante la medición del tiempo de coagulación por recalcificación del plasma citratado. Este screening permitió determinar el sitio adecuado de recolección, además del momento óptimo para la colecta, y el tipo de extracto con mayor actividad. A partir de esta información se estableció la forma de colecta y preparación de los extractos a ser utilizados en el estudio. Todas estas variables representaron factores influyentes en la actividad evaluada:

- ✓ factor edafológico: **los extractos recolectados en PP manifestaron mayor actividad que los recolectados en LV;**
- ✓ órgano activo: **las partes aéreas resultaron más activas que las raíces;**
- ✓ estado vegetativo: **en verano y primavera los extractos fueron más activos que en otoño;**
- ✓ naturaleza del solvente: **los extractos etanólicos resultaron más activos que los acuosos y hexánicos.**

Los trabajos de investigación en materia de ofidismo se han centrado principalmente en la identificación de los componentes del veneno, sus efectos y su tratamiento. Sin embargo, existen otros factores relacionados con la ofidiotoxicosis como la inoculación, en los tejidos afectados, de microorganismos provenientes de la cavidad oral del ofidio, del propio veneno o bien del inadecuado manejo pre-hospitalario del accidente. Diversos estudios encuentran como principal complicación local del ofidismo la infección de las lesiones por patógenos (1-30%). Por ello, la actividad antimicrobiana de la totalidad de extractos obtenidos fue evaluada utilizando la técnica de bioautografía directa, contra los microorganismos descriptos como los más frecuentes agentes causales de tal complicación: *Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecalis* y *Staphylococcus aureus*; obteniéndose **actividad únicamente contra *S. aureus***. Los extractos mostraron una gran variabilidad en su actividad que, nuevamente, dependió de factores tales como sitio geográfico de recolección y estado vegetativo: **los extractos de PP fueron más activos que aquellos recolectados en LV**, observándose que, por ejemplo, **en verano ninguno de los extractos de LV resultó activo**. Además, para éste sitio de recolección, **las raíces fueron quienes presentaron actividad antimicrobiana**. Para los extractos

obtenidos del **material recolectado en PP**, además de las raíces, **las partes aéreas etanólicas de primavera y verano inhibieron el desarrollo del microorganismo**.

Con esta información se seleccionó el extracto más activo como alexitérico y antimicrobiano: **etanólico de partes aéreas obtenido a partir del material vegetal recolectado de PP en verano (A2III PP)** y se lo fraccionó, por cromatografía flash en columna, con el objetivo de enriquecerlo en componentes bioactivos.

Se obtuvieron **seis (6) fracciones** agrupadas según perfil obtenido por TLC. El estudio de cada fracción eluída fue bioguiado por SDS-PAGE y también se evaluó, para cada una de ellas, la capacidad inhibitoria de las actividades del veneno. Las fracciones más polares **4, 5 y 6** resultaron enriquecidas en fitometabolitos bioactivos; seleccionándose la fracción **6** para continuar los estudios *in vivo*. Además, tanto **A2III PP** como **F6** fueron capaces de inhibir la **actividad fibrinogenolítica** del veneno por SDS-PAGE con fibrinógeno.

El desarrollo de nuevos *medicamentos herbarios* a partir de productos naturales extraídos de plantas requiere no solo estudios *in vitro*, sino también de la validación científica de las propiedades alexitéricas por estudios *in vivo*, estrictamente regulados y que requieren modelos experimentales intermedios que avalen el testeo en animales de experimentación. En este trabajo, **A2III PP** y **F6** fueron sometidas a ensayos de citotoxicidad utilizando como herramienta cultivos celulares de la línea de mioblastos murinos C2C12, siendo ambos extractos (300 µg/mL), capaces de **inhibir el 100% de la citotoxicidad** producida por el veneno de *B. diporus* y, al mismo tiempo, no resultando citotóxicos.

Estos hallazgos permitieron avanzar hacia ensayos *in vivo* en modelos murinos. Mediante pruebas de inhibición de la actividad letal se determinó que **5 mg** de **A2III PP** protegieron en un **100%** a los ratones *Balb-c* de 4DL50 del veneno de *B. diporus*; mientras **5 mg** de **F6** los protegieron también en un **100%** y **3mg** sólo un **75%**. Mientras que a ninguna de las concentraciones ensayadas **A2III PP** y **F6** manifestaron toxicidad aguda.

Como es sabido que la sueroterapia no actúa sobre el veneno fijado en tejidos, se preparó una formulación tópica (gel termosensible) de **F6** para utilizar como complemento al suero antiveneno, con el objetivo de inhibir los efectos ocasionados por el veneno a nivel local. Se evaluó en un modelo murino, seleccionando dos vías de inyección del veneno: subcutánea (SC) e intradérmica (ID) y aplicando en cada caso la formulación tópica de **F6**. Se obtuvieron resultados muy prometedores con **mayor**

**protección al daño** cuando el veneno fue inyectado por **vía ID**. Este resultado plantea un nuevo desafío, que excede este trabajo de tesis, y consiste en diseñar a futuro estudios de farmacocinética y farmacodinamia que permitan favorecer la permeación de los principios activos de modo de lograr una mayor protección en las zonas más profundas.

La actividad antimicrobiana también fue ensayada para las fracciones obtenidas a partir de **A2III PP**, aunque **ninguna de ellas fue capaz de inhibir el desarrollo de *S. aureus***, por lo que se puede afirmar que los componentes alexitéricamente activos no son los mismos que aquellos con actividad antimicrobiana, y, que además ninguna de las fracciones fue capaz de enriquecerse en componentes con esta actividad biológica. Por lo que la actividad antimicrobiana del extracto entero podría explicarse como un sinergismo entre componentes.

Se determinó la concentración inhibitoria mínima (**CIM**) para todos los extractos etanólicos con actividad antimicrobiana frente a *S. aureus*, siendo esta igual a **50 mg/mL** y la concentración bactericida mínima (**CBM**) para el extracto etanólico de raíces recolectados en PP en verano (**R2III PP**) y para los extractos etanólicos de partes aéreas recolectados en PP en primavera y verano (**A2II PP**) y (**A2III PP**) se determinó igual a **25 mg/mL**; siendo **12,5 mg/mL** para el extracto etanólico de raíces recolectados en LV en primavera (**R2II LV**).

Debido a que la mayor actividad biológica se encontró en ejemplares recolectados en PP, se procedió a caracterizar químicamente los mismos. En primer término, se estudió la composición volátil por GC-MS de A y R de esta región fitogeográfica en la estación que manifestó mayor actividad biológica: verano; encontrándose una predominancia tanto en partes aéreas como en raíces de hidrocarburos monoterpénicos ( $\alpha$ -pineno;  $\beta$ -pineno;  $\beta$ -mirceno y limoneno), y, además en R, una gran proporción de ácidos grasos (ácido esteárico y linoleico) ausentes en A.

Asimismo, para lograr la elucidación estructural de los componentes bioactivos se realizó el estudio de la química no volátil de los extractos biológicamente activos utilizando una serie de técnicas de complejidad creciente. Se realizó una TLC de los extractos etanólicos de A de ambos sitios de recolección, observándose una **mancha roja** con revelador de sulfato de cobre 5% (p/v) **en el punto de siembra** de los extractos de **primavera y verano recolectados de PP**; y, además, mediante reacciones de color se observó la estabilidad de los fenoles en los distintos estados vegetativos. Del mismo modo, se analizaron las fracciones de **A2III PP** por TLC observándose en las

fracciones **4, 5 y 6** la **misma mancha roja en el punto de siembra** observada para el extracto entero, a la que se le podría atribuir la actividad biológica de los mismos. La marcha fitoquímica permitió una primera aproximación a la composición química de estas fracciones, identificando en las mismas la presencia de **alcaloides, fenoles y flavonoides**. Debido a que la fracción **6** tuvo la misma actividad biológica pero su perfil por TLC evidenció una menor cantidad de componentes, se asumió que sólo estaba formada por aquellos metabolitos que resultaron bioactivos, por lo que el estudio químico estructural se continuó con **F6**.

Se realizó un análisis de **F6** por **HPLC-DAD** identificándose picos que, según forma de sus espectros UV y máximos de absorbancia, resultaron compatibles con **flavonoides polihidroxilados**. Además, se verificó que el fraccionamiento produjo un enriquecimiento en área del **51,6%** de **F6** en los componentes de interés.

Finalmente, la separación cromatográfica y elucidación estructural de los compuestos bioactivos presentes en **F6** se llevó a cabo por espectrometría de masa de alta resolución, UHPLC-MS/MS (Q-Orbitrap), aislando e identificando cinco flavonoides: **quercetina 3-O-soforosido [quercetina 3-O- $\beta$ -D-glucosil-(1,2)- $\beta$ -D-glucósido]; naringenin-7-O- $\beta$ -D-glucósido; eriodictiol-7-O- $\beta$ -D-glucósido; galangin-7-glucósido y baicaleín-7-O-glucósido (oroxina A).**

Debe destacarse que este trabajo es el primero en el que fue posible relacionar la actividad antiveneno de la especie autóctona *C. pareira* con la naturaleza estructural de los compuestos involucrados. Por otra parte, y lo más importante por su proyección, este estudio resulta relevante para la zona debido a que toda la información disponible sobre esta temática se corresponde con otras regiones del mundo o bien con otras especies ofídicas.





# **CAPÍTULO 1:**

## **Introducción y Marco Teórico**

*Contra cada padecimiento crece una planta.-  
Paracelso*



## **1. Introducción**

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) casi el 80% de la población mundial depende de plantas medicinales para la atención primaria de su salud (Alonso, 2008; Duke *et al.*, 2009; Cañigüeral *et al.*, 2003) existiendo en la Argentina unas 750 especies que son utilizadas según dos realidades diferentes: en zonas rurales como única vía de asistencia primaria, por inaccesibilidad o costumbre y, en zonas urbanas, como alternativa o complemento de la medicina moderna (Cañigüeral *et al.*, 2003).

Su tradición de empleo en la Argentina para tratar las intoxicaciones por acción de venenos de víboras (acción alexitérica) se ha mantenido entre las etnias aborígenes y fue transmitida de generación en generación hasta nuestros días (Torres *et al.*, 2015). Se encuentran en bases de datos publicaciones y trabajos reconocidos internacionalmente que sustentan la interacción entre plantas y venenos referidos a especies vegetales y serpientes de otras regiones del mundo, pero no hay suficientes estudios correspondientes a la región del Nordeste Argentino (NEA). Esto representa un déficit importante, considerando que los accidentes ofídicos son un grave problema de salud pública en esta región.

En esta región, la casuística de accidentes ofídicos se encuentra por encima de la tasa país, teniendo como agente causal para el 97% de los casos, serpientes del género *Bothrops*, siendo, a su vez, el 80% de los mismos, debido a *B. diporus*, especie objeto de estudio de este trabajo (BEP, 2009). El tratamiento de primera línea frente a este tipo de accidentes es la administración de suero antiveneno heterólogo que no está exento de riesgos y tiene baja efectividad sobre las acciones locales producidas por el veneno (Haas *et al.*, 2014).

Este trabajo de tesis propone el estudio de la especie autóctona *Cissampelos pareira* (Linneo, 1753), utilizada en medicina vernácula por sus propiedades etnofarmacológicas. Su elección fue motivada debido a su extensa tradición de uso como alexitérica en otras partes del mundo (Morten, 1981; González-Torres, 1997; Chakraborty & Bhattacharjee, 2006; Ramos-Hernandez *et al.*, 2007; Jabeen *et al.*, 2009; Barranco-Pérez, 2010; Sankaranarayanan *et al.*, 2010; Butt *et al.*, 2015), así como también, en esta región (Montenegro, 1979; Jolis, 1972; Manfred, 1977; Ricciardi *et al.*, 1996; Torres *et al.*, 2015) además de poseer una amplia distribución.

Solo dos estudios científicos validan su uso como antiveneno: en Costa Rica la infusión acuosa de la planta entera (Badilla *et al.*, 2008) y en Guatemala el extracto etanólico de raíz (Saravia-Otten *et al.*, 2015), mientras que en la Argentina solo se

encuentran los trabajos iniciados por este grupo de investigación y que se plantea continuar en este trabajo de tesis (Camargo *et al.*, 2005; Torres *et al.*, 2007).

Con esta información disponible, y teniendo en cuenta la variabilidad de los resultados encontrados en la bibliografía, se propone en el *Capítulo 3: Actividad alexitérica*, ampliar la base del conocimiento, realizando una prospección y búsqueda de material vegetal y analizando la influencia de distintos factores en la manifestación de la actividad biológica de la especie: factores edafológicos (distintas regiones fitogeográficas de recolección), estacionales (distintos estadios vegetativos de la planta, particularmente, los de mayor crecimiento: otoño, primavera y verano), distinta polaridad de los extractos (hexánico, etanólico y acuoso) y diferenciación de los órganos activos (partes aéreas y raíces). Esto permitirá predecir, en el caso de validar la actividad, el mejor momento y lugar de colecta del material vegetal y la estandarización del órgano activo y tipo de extracto de mayor utilidad. El esquema de trabajo consistirá en un tamizaje por electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE), estudios de inhibición de las principales actividades del veneno de *B. diporus* (coagulante, proteolítica, hemolítica indirecta y fibrinogenolítica) e inhibición de la citotoxicidad en cultivo celular. De esta manera, será posible seleccionar el extracto más activo que servirá de base para los siguientes estudios y obtener, posteriormente, fracciones por separación cromatográfica para relacionar la actividad biológica a grupos o familias de compuestos químicos.

Se plantea, además, el estudio *in vivo* tanto de inhibición de la actividad letal del veneno como de la toxicidad aguda del extracto/fracción activa, ya que el empleo de plantas medicinales no está exento de riesgos (Mukherjee, 2009). Por último, se pretende elaborar un posible *medicamento herbario* de aplicación tópica (gel termosensible) que inhiba el daño local producido por el veneno de estas serpientes.

Se abordará, además, en el *Capítulo 4: Actividad Antimicrobiana*, la acción antimicrobiana de los extractos alexitéricamente activos, contra gérmenes que producen, comúnmente, complicaciones infecciosas en el sitio local de la mordedura.

Finalmente, en el *Capítulo 5: Química*, se estudiará el perfil químico del metabolismo secundario, tanto volátil como no volátil, de la fracción activa para caracterizar fitoquímicamente la especie autóctona.

El desarrollo de este trabajo de tesis, no pretende sustituir el tratamiento convencional (sueroterapia) actualmente utilizado, sino al contrario, encontrar un *medicamento herbario* que sea coadyuvante, previniendo los daños locales producidos

por el accidente, principal causa de morbilidad en estos casos. Además, cabe destacar que, si bien se toma como modelo el veneno de *B. diporus*, especie con distribución regional y nacional, esta investigación puede ampliarse a otras especies y géneros, tanto de ofidios como de plantas, si se lograra estandarizar un protocolo de trabajo coherente y robusto. Sin embargo, no busca ser el último trabajo sobre esta temática, ya que serán necesarios nuevos estudios farmacológicos (especialmente de farmacocinética y farmacodinamia) utilizando los principios activos aislados de manera tal de proporcionar información para el esclarecimiento de los mecanismos de acción de las toxinas correspondientes y el desarrollo de la farmacotecnia de futuros agentes terapéuticos para el tratamiento de los accidentes.

## **2. Ofidios**

### **2.1 Generalidades**

Se han descripto unas 3.709 especies de serpientes en el mundo (Uetz, 2018) caracterizadas por tener la piel cubierta de escamas o placas, la lengua bífida y un órgano sensitivo en el paladar denominado *órgano de Jacobson* con funciones olfativa y gustativa. No tienen párpados, ni orificios auditivos. Son capaces de abrir enormemente la boca debido a que su mandíbula se encuentra articulada libremente al cráneo, permitiéndoles alimentarse de presas grandes con relación a su tamaño y/o morder para defenderse cuando se sienten amenazadas. Algunas serpientes, como las pertenecientes a la familia *Viperidae*, poseen un órgano termorreceptor denominado *foseta loreal*, ubicado entre el ojo y las narinas, que les permite detectar su alimento (Bauchot, 1996) y representa una característica diferencial entre víboras venenosas y no venenosas. El termino *serpentes* o *reptilis* significa *el que se arrastra* (Giraudo *et al.*, 2008).

Con más de 1580 especies, América del Sur contiene más del 46% de la riqueza mundial de serpientes, siendo el segundo continente con mayor riqueza en el mundo después de Asia (Uetz, 2018). En la Argentina, se registran 136 especies y subespecies, la mayoría de ellas inofensivas para el hombre. Sólo 18 especies de esas 136, las que representan un 13% del total, son potencialmente peligrosas para el hombre y los animales, y por lo tanto, tienen importancia médica (Giraudo *et al.*, 2012).

El NEA, que comprende las provincias de Misiones, Corrientes, Entre Ríos, Santa Fe, Chaco y Formosa; contiene la mayor riqueza y abundancia de serpientes venenosas de la Argentina, totalizando 109 especies y subespecies, que representan un 80% de la riqueza total del país (Giraudo *et al.*, 2012).

## 2.2 Taxonomía y clasificación de ofidios de importancia médica del país

En la Argentina, se encuentran las siguientes especies de serpientes venenosas:

**-Familia Viperidae:** caracterizada por dientes **solenoglifos** (*Figura 1.2.1*) (*sole*: tubo; conducto verdadero) (Hoge & Romano, 1973).



Fuente: Torres, (2011); Soler & Rodriguez, (2006). *Figura 1.2.1:* Dentición solenoglifa

Subfamilia Crotalinae: víboras de foseta: yararáes y cascabeles.

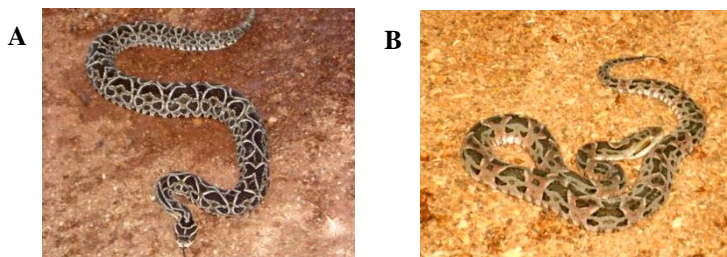
### Género y especies del NEA:

-*Bothrops alternatus* (Duméril, Bibron & Duméril), **yarará grande**, víbora de la cruz; anteriormente perteneciente al género *Rinocerothis* (Fenwick, 2009), siendo restituida al género *Bothrops* por Carrasco *et al.* (2012) (*Figura 1.2.2*).

-*B. diporus* (COPE), **yarará chica** (Carrasco *et al.*, 2012), anteriormente *Bothrops neuwiedi diporus* (Hoge & Romano, 1973) *Bothrops diporus* dentro del complejo *neuwiedi* (Wüster *et al.*, 2002) y *Bothropoides diporus* (Fenwick *et al.*, 2009) (*Figura 1.2.2*).

-Otras especies como *B. ammodytoides*, **yarará ñata**; *B. atrox*, **fer de lance**, quemadora; *B. cotiara*, **yarará de vientre negro**; *B. jararacá*, **jararacá**; *B. jararacussu*, **yarará negra**; *B. moojeni*, **caiçaca**; en la provincia de Misiones.

-*Crotalus durissus terrificus*: **cascabel** (*Figura 1.2.3*).



**A:** *Bothrops alternatus*; **B:** *Bothrops diporus*. Fuente: Cátedra de Herpetología. FaCENA – UNNE.

*Figura 1.2.2:* Víboras del género *Bothrops* (yarará)



Fuente: Cátedra de Herpetología. FaCENA – UNNE. *Figura 1.2.3:* Víbora del género *Crotalus* (cascabel)

**-Familia Elapidae:** caracterizada por dientes **proteroglifos** (*Figura 1.2.4*) (*proteros*: primeros, *glifos*: ranuras);

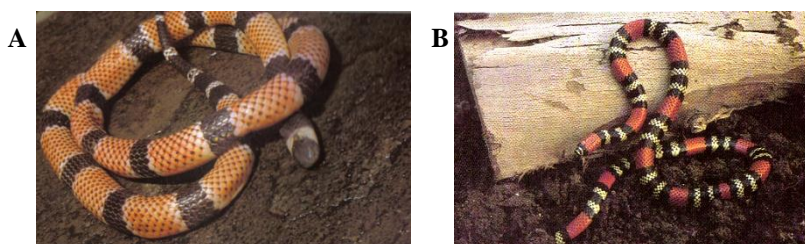


*Fuente:* Torres, (2011); Soler & Rodriguez, (2006). **Figura 1.2.4:** Dentición proteroglifa

Subfamilia Elapinae: víboras de vida reservada, subterránea, terrestre, representadas en la Argentina por las **corales**.

Género y especies de corales del NEA:

- Micrurus corallinus* (**Figura 1.2.5**);
- M. frontalis altirostris* (**Figura 1.2.5**);
- M. frontalis mesopotamicus*;
- M. pyrrhocryptus*.



**A:** *Micrurus corallinus*; **B:** *Micrurus altirostris*. *Fuente:* Cátedra de Herpetología. FaCENA – UNNE.

**Figura 1.2.5:** Víboras del género *Micrurus* (coral)

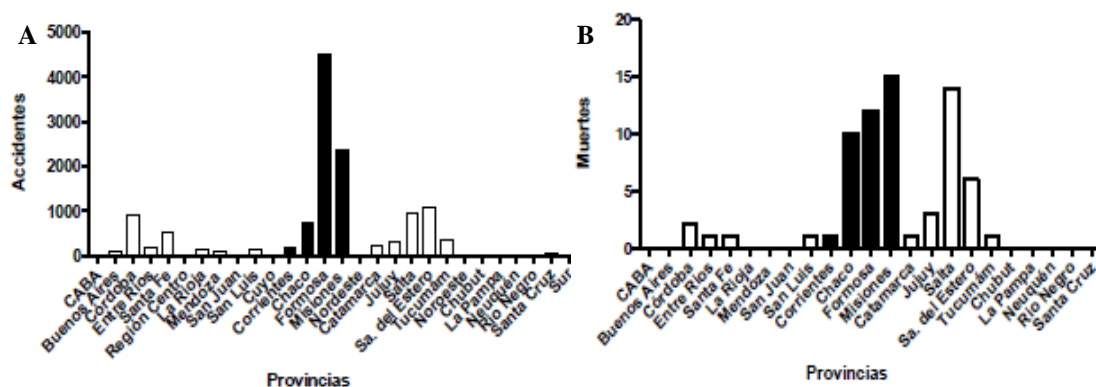
## 2.3 Epidemiología de los accidentes ofídicos

Se denomina *ofidismo* al emponzoñamiento como consecuencia de la mordedura de una serpiente con inyección de veneno, pudiendo este accidente causar la muerte de la persona o bien dejar lesiones más o menos graves.

Se denomina mordedura *blanca o seca*, a aquella que se produce *sin inyección de veneno*, y si bien no se produce emponzoñamiento, esta mordedura puede ocasionar problemas debido a una sobreinfección bacteriana (Ricciardi *et al.*, 2010).

Según datos obtenidos de la Dirección de Epidemiología del Ministerio de Salud de la Nación, las provincias del NEA son las que mayor cantidad de accidentes por serpientes venenosas comunican a las autoridades sanitarias (período 2000-2011) (**Figura 1.2.6**) y, asimismo, esta es la región que registra la mayor cantidad de óbitos debido a envenenamiento por mordedura de serpientes en (período 1994 – 2011) (**Figura 1.2.6**).

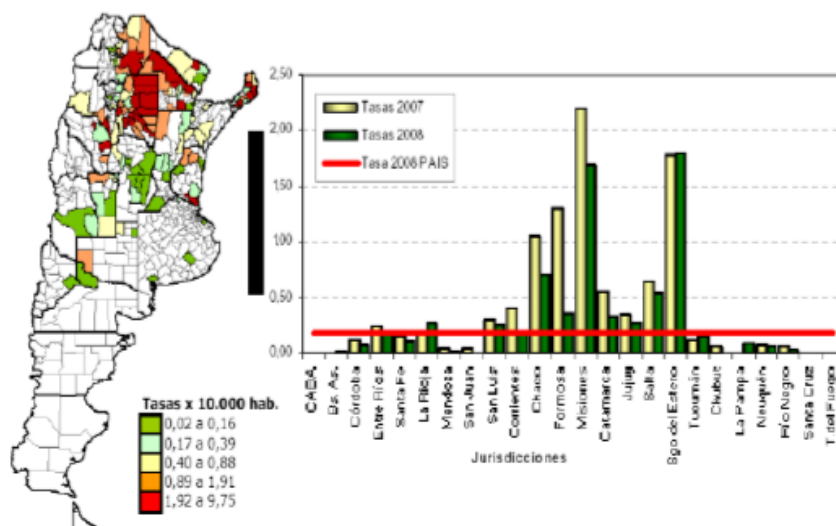




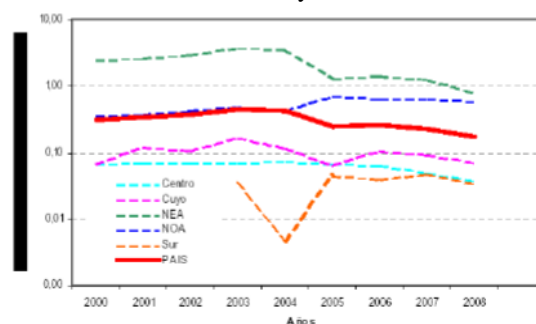
**A:** Accidentes ofídicos comunicados durante el período 2000 – 2011; **B:** Muertes por mordedura de serpientes período 1994 – 2011 *Fuente:* Min. Salud de la Nación, 2007

**Figura 1.2.6:** Accidente ofídico por provincias

Según el boletín epidemiológico periódico (BEP, 2009), tanto la región nordeste como noroeste, se encuentran por encima de la tasa país para este tipo de accidentes, y haciendo una prospección desde el año 2010 el NEA es la región que más reportes presenta (**Figuras 1.2.7 y 1.2.8**)



*Fuente:* Dirección de Epidemiología. Ministerio de Salud. **Figura 1.2.7:** Tasa de notificación de casos de Ofidismo por 10.000 habitantes por departamento – mapa 2008 – y Jurisdicciones de la Argentina en los años 2007 y 2008.



*Fuente:* Dirección de Epidemiología. Ministerio de Salud. **Figura 1.2.8:** Evolución de las tasas de notificación de casos de ofidismo según regiones por 10.000 habitantes en escala logarítmica. la Argentina, período 2000 – 2008.

Según el Boletín Integrado de Vigilancia del Ministerio de Salud de la Nación (2013), en el periodo 2007-2012, los datos recolectados del Sistema Nacional de Vigilancia de la Salud (SNVS), en el país, el 99% de los accidentes por serpientes venenosas registrados son debido a ejemplares de la familia *Viperidae*, siendo los accidentes por yarará cercanos al 97% del total y los producidos por cascabel alrededor del 2%. Menos del 1% de los accidentes por serpientes venenosas son producidos por ejemplares pertenecientes a la familia *Elapidae* del género *Micrurus* (corales). Además, el mismo boletín destaca mayor frecuencia en hombres, trabajadores rurales, de edad laboral activa (entre 15 y 24 años) con mortalidad predominante en mayores de 64 años.

Hay que tener en cuenta que los datos epidemiológicos disponibles de incidencia, incluidos el grado de mortalidad y morbilidad a largo plazo conexas, proceden mayoritariamente de los hospitales, por lo que se subestima la verdadera magnitud del problema ya que la mayoría de las víctimas recurren a tratamientos tradicionales (Min. Salud de la Nación, 2007).

#### **2.4 Composición de los venenos ofídicos**

La OMS reconoció, en el año 2009, al accidente ofídico como una *enfermedad tropical desatendida* (WHO, 2015) debido a su frecuencia y severidad, principalmente en países en vía de desarrollo de África, Asia y América. De esto se desprende la necesidad de profundizar el conocimiento de las propiedades tóxicas, inmunológicas y biológicas de los venenos, para entender los procesos fisiopatológicos que se producen en las personas que sufren estos accidentes, como así también, evaluar la potencia neutralizante de los antivenenos utilizados en el tratamiento de estos envenenamientos y la posibilidad de desarrollar tratamientos complementarios, no convencionales, como por ejemplo el uso de *medicamentos herbarios*, que contribuyan a disminuir la mortalidad/morbilidad de estos accidentes.

Los *venenos animales* son secreciones producidas para emponzoñamiento de otras especies mediante un mecanismo de transferencia activo o pasivo. Su composición es compleja y su toxicidad varía según factores como: especie, edad y tamaño del individuo; hábitat y factores ecológicos; alimentación, exposición a xenobióticos, estado de depleción de las glándulas, estado sanitario del aparato inoculador y existencia de variedades inmunológicas. Los venenos resultan vitales para la supervivencia del ofidio, ya que son utilizados para procurar su alimento, contribuyendo a la inmovilización de la presa; inicio de su digestión y, además, como elemento de defensa frente a animales superiores (Ricciardi *et al.*, 2010).

Los venenos de serpientes son en un 95% mezcla de proteínas, aunque también están constituidos por componentes no proteicos de bajo peso molecular: aminas; glucósidos; alcaloides; terpenoides; péptidos cardiotónicos y neurotóxicos; nucleósidos; iones metálicos y citratos; cuya principal función es actuar como inhibidores endógenos selectivos de sus enzimas, quelando iones metálicos bivalentes mediante la formación de complejos (Speroni, 1994).

Las proteínas son, en sí mismas, las responsables de la fisiopatología que caracteriza al emponzoñamiento ofídico, pudiendo estas ser de dos tipos: *toxinas* o *proteínas no tóxicas*. Las *toxinas* (PM menor a 30 KDa) son las responsables de la muerte inmediata de la presa. Las *proteínas no tóxicas (enzimas)*, en cambio, son activas farmacológicamente e intervienen en la digestión de la presa (Ricciardi, 1999).

Si bien las proteínas actúan generalmente como alérgenos, en el caso de los accidentes ofídicos, las reacciones alérgicas de hipersensibilidad inmediata o de tipo I (alergias) e hipersensibilidad por formación de complejo inmune o de tipo III (enfermedad del suero) que pudiesen ocurrir, son provocadas por la posterior administración de los sueros antiveneno que constituyen la línea primaria de tratamiento para este tipo de accidentes.

Además de sus componentes inherentemente tóxicos, los venenos producen en el organismo la liberación de citoquinas y mediadores de la respuesta inflamatoria capaces de producir alteraciones fisiológicas tan graves como las del mismo veneno: histamina, bradiquinina, ácidos grasos no saturados, lisolecitina, entre otros (Ricciardi, 1999).

Rosenfeld, (1971) agrupó a los venenos según su acción fisiopatológica en:

1. venenos *hemolíticos y neurotóxicos*, en los crótalos de América del Sur;
2. venenos *neurotóxicos y hemolíticos*, principalmente en hidrófidos;
3. venenos *neurotóxicos y proteolíticos*, en las najas;
4. venenos *proteolíticos y coagulantes*, en los vipéridos (yaráes y crótalos de América del Norte);
5. venenos *neurotóxicos*, en corales y búngaros.

A continuación, se describirán los venenos correspondientes a las víboras del género *Bothrops*, comúnmente conocidas como *yará* (del guaraní *soberbia*), debido a que, como se describió anteriormente, son las víboras de éste género las causantes de la mayor tasa de accidentes ofídicos del país y del NEA.

### **3. Víboras del género *Bothrops* sp.**

El género *Bothrops* incluye más de 90 especies de serpientes venenosas y agresivas, con cuerpo de complexión robusta, cubierto de pequeñas escamas lanceoladas y carenadas. Su veneno tiene acción *proteolítica*, *coagulante* y *vasculotóxica*.

Dentro de las especies de *Bothrops* citadas en la Argentina, *B. diporus* (yará chica), es la que mayor número de accidentes ofídicos produce (80%) (BEP, 2009).

En ejemplares sudamericanos, la DL50 de veneno de *B. diporus* en ratón por vía intravenosa (IV) es de **26,6 µg/20 g**; intraperitoneal (IP) **128,2 µg/20 g**; la dosis proteolítica mínima es de **0,27 µg/mL** y la dosis citotóxica es de **14,4 ± 4,26 µg/mL** (Oliveira *et al.*, 2002).

Específicamente con respecto a los ejemplares de *Bothrops* del NEA:

✓ Maruñak *et al.* (2010) determinaron para *B. diporus* la DL50: **38,18 µg/20 g ratón**;

✓ Acosta de Pérez *et al.* (1997) la DL50 para *B. alternatus*: **55,86 µg/20 g ratón**;

✓ Acosta de Pérez *et al.* (1998) compararon la acción edematizante y hemorrágica de distintas especies del género *Bothrops*, encontrando que el veneno de *B. diporus* tiene una acción que clasificaron como medianamente edematizante, sin embargo, dentro de las víboras del género *Bothrops* es la de mayor efecto hemorrágico.

**DEM** (Dosis Edematizante Mínima): **2,05 µg** y **DHM** (Dosis Hemorrágica Mínima): **1,5 µg**; definiéndose la **DEM** como la cantidad de veneno que produce un edema que representa el 30% de incremento del miembro inoculado, 1 h después de inyectado; y la **DHM** como la cantidad de veneno que produce un área hemorrágica de 10 mm, 1 hora después de inyectado;

✓ Koscinczuk *et al.* (2004) informaron **cambios en la función renal en ratas**, por la inyección intramuscular del veneno, compatibles con falla renal aguda, con lesiones degenerativas del epitelio tubular renal reveladas con técnicas histopatológicas;

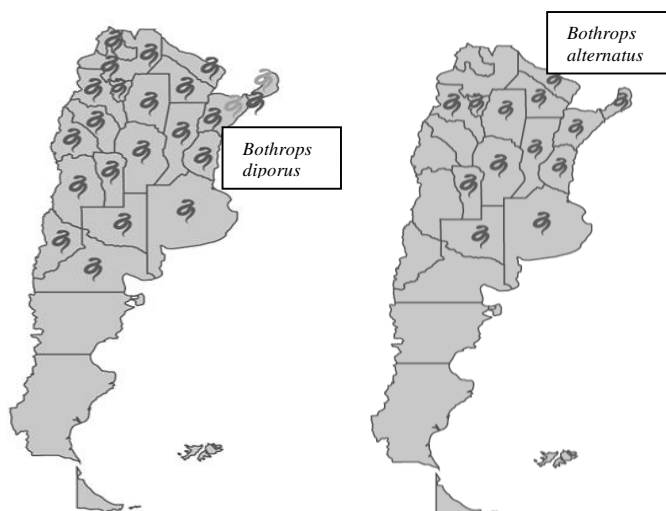
✓ Bustillo *et al.* (2009) utilizando la línea celular de músculo esquelético C2C12, han demostrado que *B. diporus* de la Argentina es significativamente más citotóxica que *B. alternatus* con una Concentración Citotóxica 50 (**CC50**) igual a **2 µg/mL** y **5,8 µg/mL**; respectivamente, estableciendo que la destrucción de esta línea celular está mediada por un mecanismo de apoptosis;

✓ Maruñak *et al.* (2010) reportaron, además, que el veneno altera la coagulación de la sangre al ejercer actividad **coagulante (0,40 mg/mL)** y **fibrinolítica (3,5 mg/mL)**,

pudiendo causar la muerte del accidentado por acción de componentes coagulantes y anticoagulantes que resultan en el agotamiento del fibrinógeno plasmático;

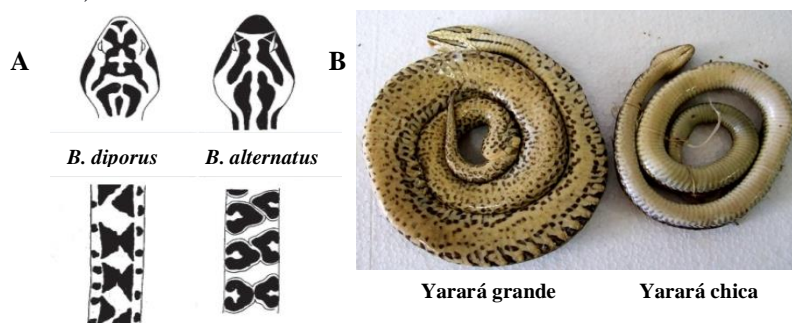
✓ Teibler *et al.* (2017) estudiaron, mediante biopsia de pie equino, la **sensibilidad del veneno** de *B. diporus* sobre la densa **red vascular que irriga el pie** identificando las alteraciones inducidas por las toxinas del veneno.

*B. diporus* es una especie ovovivípara que llega a medir hasta 0,9 m y se encuentra en las regiones centro, NEA, y parte del NOA, como puede apreciarse en la **Figura 1.3.1**.



Fuente: Haas *et al.* (2014). **Figura 1.3.1:** Distribución geográfica de *B. diporus* y *B. alternatus* en la Argentina

Habitan ambientes más secos y pedregosos que *B. alternatus*, que prefiere ambientes húmedos y cercanos a fuentes de agua. Tienen hábitos nocturnos, aunque los envenenamientos se producen casi siempre durante el día, en la jornada laboral de habitantes rurales. Su cuerpo es de color castaño grisáceo a castaño rojizo con diseño de figuras laterales más oscuras trapezoidales o triangulares, que se unen en la línea dorsal media por su base menor; su vientre es blancuzco con manchas más oscuras (Ricciardi *et al.*, 2010) (**Figura 1.3.2**).

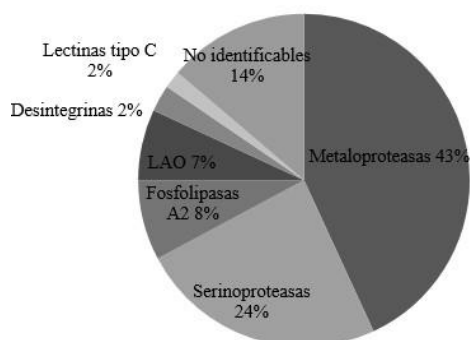


**A:** Imagen dorsal. Fuente: Haas *et al.* (2014); **B:** Imagen ventral. Fuente: Cátedra de Herpetología de FaCENA – UNNE. **Figura 1.3.2:** Diferencias entre las especies de *Bothrops* de mayor distribución de la Argentina

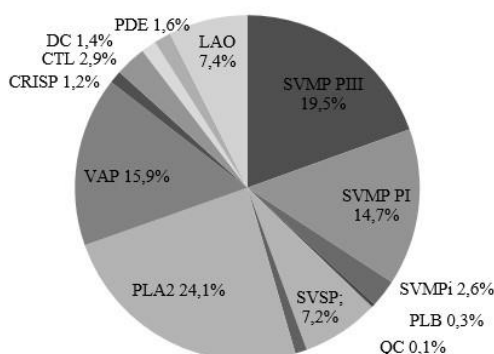
### 3.1 Composición y acción de su veneno

Los venenos de víboras del género *Bothrops* son secreciones viscosas, de color amarillo, como consecuencia de la flavoproteína L-aminoácido oxidasa (LAO). El veneno seco posee estructura cristalina, pudiendo ser restituido con solución salina para su uso. Las enzimas presentes son muy estables si se conserva liofilizado, pudiendo mantener su actividad por un lapso de hasta cuarenta años, sin embargo, en solución se deteriora rápidamente, aun cuando se lo mantenga refrigerado (Ohler *et al.*, 2010).

De acuerdo con Ohler *et al.* (2010), el veneno de *B. alternatus* se compone principalmente de tres enzimas: *metaloproteasas*, *serinoproteasas* y *fosfolipasas A2*; constituyendo éstas más del 70% de la composición proteica total del mismo (**Figura 1.3.3**). Del mismo modo, según Gay *et al.* (2016) la composición proteica del veneno de *B. diporus* tiene a las mismas enzimas como componentes mayoritarios (**Figura 1.3.4**).



Fuente: Ohler *et al.* (2010). **Figura 1.3.3:** Composición del veneno de *B. alternatus*.



**SVMP PIII:** metaloproteinasas de clase PIII; **SVMP PI:** metaloproteinasas de clase PI; **SVMPi:** inhibidor de metaloproteinasas; **PLB:** fosfolipasa B; **QC:** glutaminil ciclasa; **SVSP:** serinoproteasas;

**5'NT:** 5' nucleotidasa; **PLA2:** fosfolipasas A2; **VAP:** BPP y BPP-simil: péptidos potenciadores de bradiquinina; **CRISP:** proteína secretora rica en cisteína; **CTL:** lectina-símil de tipo C; **DC:** desintegrina-símil/dominio rico en cisteína; **PDE:** fosfodiesterasa; **LAO:** L-amino-oxidasa. Fuente: Gay *et al.* (2016).

**Figura 1.3.4:** Composición del veneno de *B. diporus*

El veneno de *B. diporus* se caracteriza por poseer las siguientes acciones:

-Acción edematizante (DEM 2,05 µg/ratón) (Acosta de Pérez, 2000): mediante la liberación de mediadores de la inflamación (histamina, serotonina, prostaglandinas y leucotrienos) produce un aumento de la permeabilidad vascular. La bradiquinina tiene acción hipotensora que se ve potenciada por péptidos inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ECA); las anafilotoxinas C3a y C5a del sistema del complemento producen activación plaquetaria (PAF), de neutrófilos, de radicales superóxido y liberación de otros péptidos vasoactivos; sustancias relajadoras del endotelio y sustancias de reacción lenta. Todos estos factores liberados tienen como resultado la **rápida aparición de edema en el sitio de la inyección**, característico de este tipo de accidente. Si el edema es considerable, puede producirse compresión favoreciendo la isquemia y, por ende, el daño tisular local. Contribuyen a esta acción las enzimas **hialuronidasas** (38 KDa) que hidrolizan los enlaces glicosídicos del ácido hialurónico del tejido conjuntivo y otros mucopolisacáridos ácidos, facilitando la difusión de las toxinas en los tejidos.

-Acción proteolítica (DPM 29,00 U/mg) (Ricciardi, 1999): se manifiesta 1 a 3 h luego de producido el accidente con dolor y edema local duro y eritematoso que se extiende de 5 a 20 cm por hora durante las primeras cinco horas. Esta proteólisis libera bradiquinina e histamina, responsables del **dolor, la hipotensión y el peligro de colapso periférico**. Esta acción local suele manifestarse con **necrosis** que puede requerir corrección quirúrgica llegando, en el peor de los casos, a provocar momificación o autoamputación del miembro afectado. Además, la actividad proteolítica destruye vasos sanguíneos produciendo hemorragias, epistaxis (goteo) y hematemesis (vómitos con sangre).

Intervienen en esta acción las siguientes enzimas:

✓ **L-amino ácido oxidasa** (100-130 KDa) produce efectos proteolíticos locales severos. Cataliza la desaminación oxidativa de los L-aminoácidos a los cetoácidos correspondientes. Podría actuar como activadora de otros componentes del veneno.

✓ **Endopeptidasas** (21,4-95 KDa) con acción similar a la tripsina (trypsin-like) capaces de producir la digestión de las proteínas tisulares. Es responsable de los efectos necróticos a nivel local y también de lesiones en los órganos internos.

-Acción hemorrágica (DHM 1,5 µg/ratón) (Acosta de Pérez, 2000): pocos minutos luego del accidente se manifiesta la hemorragia local debido a la presencia de hemorraginas, **metaloproteinasas (SVMPs)** que utilizan Zn como cofactor. *In vitro*



poseen actividad proteolítica e *in vivo* **alteran la lámina basal de la microvasculatura produciendo degradación de la matriz extracelular.**

Las SVMPs pueden ser de 3 tipos, según el dominio carboxiterminal que sigue al dominio metaloproteinasa (Markland & Swenson, 2013):

- ✓ *PI* (20-30 KDa): dominio metaloproteinasa;
- ✓ *PII* (30-60 KDa): dominio metaloproteinasa más desintegrina;
- ✓ *PIII* (60-100 KDa): dominio metaloproteinasa más desintegrina rica en cisteína.

La SVMPs de tipo PIII es la más abundante en veneno de *Bothrops* (Ohler *et al.*, 2010) lo que explicaría la intensa acción hemorrágica de estos venenos (Acosta de Pérez *et al.*, 1997).

Las enzimas  **$\alpha$ -fibrinogenasas**, también contribuyen a esta acción, siendo capaces de hidrolizar el fibrinógeno e inhibir la agregación plaquetaria, pudiendo degradar el colágeno y por lo tanto, este conjunto de alteraciones, sumado al consumo de los factores de la coagulación por otros componentes del veneno, pueden comprometer la sobrevivencia del paciente. Dentro de las especies de *Bothrops*, *B. diporus* posee mayor actividad hemorrágica, comparando ejemplares adultos (Acosta de Pérez, 2000).

Finalmente, un tercer componente del veneno contribuye con ésta acción: el **factor hemorrágico neuwiedi NHF (neuwiedi haemorrhagic factor)**, estructuralmente similar al factor hemorrágico de otras especies de *Bothrops* y de los venenos de *Lachesis* (Speroni, 1994).

-Acción coagulante (DCM 0,56  $\mu$ g con plasma ovino, 3,9  $\mu$ g plasma bovino, 4,5  $\mu$ g plasma equino y 0,4  $\mu$ g plasma humano) (Acosta de Pérez, 2000) (*Figura 1.3.5*): 1 a 3 h luego de ocurrido el accidente, las venas se vuelven equimóticas y se inflaman. Se observan petequias y flictenas (vesículas). Cuando el veneno es inyectado directamente en un vaso sanguíneo, se produce una **coagulación intravascular diseminada (CID)** debido a **hemotoxinas**, que se ha propuesto como uno de los posibles mecanismos de muerte súbita observado en envenamamientos por *Bothrops* sp. Este hecho puede provocar la muerte en pocos minutos, sin embargo, la formación del coágulo local es normal que evite la difusión rápida del veneno.

Según la acción sobre el fibrinógeno pueden diferenciarse tres grupos de enzimas:

**1. Proteasas trómbicas/serinoproteasas** (*trombin-like o similar trmbina*) (Castro *et al.*, 2001): actúan sobre el fibrinógeno para formar el coágulo de fibrina, sin entrecruzamientos, seguida de procesos fibrinolíticos. ***In vitro* son procoagulantes e in**



**vivo causan defibrinación.** Se ha demostrado que la coagulación del fibrinógeno por estas enzimas produce la liberación de fibrinopéptidos A o B en forma selectiva, mientras que la trombina lleva a la liberación de ambos. La dosis defibrinante mínima (**DDM**) para *B. diporus* es menor con respecto a la de otras especies (**25 µg/20 g ratón**) lo que contrasta con su potente efecto coagulante *in vitro*.

**2. Enzimas fibrinogenolíticas:** actúan sobre los fragmentos -COOH terminales de las cadenas  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  del fibrinógeno volviéndolo incoagulable para la trombina y los productos de degradación (PDF) son diferentes a los derivados por acción de la plasmina.

**3. Enzimas activadoras del plasminógeno:** actúan indirectamente como fibrinolisin. *B. diporus* es la especie de mayor actividad fibrinolítica (**DFM 3,5 µg/mL**).

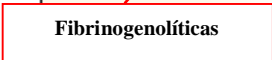
Si consideramos las distintas especies de *Bothrops*, *B. diporus* es la que mayor actividad coagulante posee sobre el plasma humano (Acosta de Pérez, 2000), y según Tans & Rosing (2001) posee principios **activantes del factor X** (78 KDa) y **activantes de protrombina** (56 KDa) ambas enzimas procoagulantes altamente específicas (metaloproteasas o serinoproteasas). También son responsables de esta acción: **arginina ester hidrolasa** (27-30 KDa) cuya actividad enzimática está relacionada con la liberación de bradiquinina y actividad coagulante; **balterobina trombin like** (28-33 KDa) proteasa con actividad similar trombina que se desempeña como anticoagulante defibrinogenante *in vivo* y como procoagulantes o coagulantes *in vitro*; **botroacetina**, coaglutinina responsable de la agregación y aglutinación de plaquetas; **botroaltermina**, lectina tipo C inhibidora de la interacción trombina-receptor, dependiente de Ca.

Rosenfeld, (1971) clasifica la gravedad del accidente ofídico considerando tres factores principales: *edema, tiempo de coagulación y estado general del paciente*, pudiendo resultar:

✓ *Benigno*: edema local discreto o ausente y tiempo de coagulación normal o no mayor a 15 minutos;

✓ *Medio*: edema local evidente y tiempo de coagulación mayor a 60 minutos con estado general conservado;

✓ *Grave*: edema local intenso, sangre incoagulable y estado general malo o con shock periférico.



## Activación de la cascada de coagulación

agregante plaquetaria y convulsivante.

posición 49, pudiendo resultar:

- ✓ Lys 49 con baja actividad catalítica.

pudiendo presentarse como monómeros de 14,2 KDa u homodímeros de 28,3 KDa.

Las PLA2 se pueden dividir en 5 tipos: sPLA2s, cPLA2s, iPLA2s, PAF-AH y PLA2s lisosomal (Acosta de Pérez, 2000).

Estas enzimas **hidrolizan fosfolípidos en la posición sn-2 de manera dependiente de calcio** (García-Denegri *et al.*, 2010) y **producen isquemia que potencia la destrucción. La necrosis de fibras musculares produce el escape de creatinfosfoquinasa (CK) y el aumento de los niveles de calcio en el músculo.**

Las PLA2 se pueden detectar *in vitro* a través de la hemólisis indirecta que producen al actuar sobre la fosfatidilcolina, liberando fosfatidilcolina y un ácido graso, la *lisofosfatidilcolina o lisolecitina* con acción detergente que induce la hemólisis de los glóbulos rojos. Se puede medir la **DHM (dosis hemolítica mínima)** de las distintas especies, siendo *B. diporus* la de menor actividad hemolítica *in vitro*, correspondiente a **25 µg**. (Lomonte & Gutierrez, 1983)

En *B. diporus* se han detectado las siguientes fosfolipasas:

✓ **Fosfolipasa básica A2** (Geoghegan *et al.*, 1999; Rodrigues *et al.*, 1998) miotoxina;

✓ **Isoenzimas P-1** (~15KDa, pI 4,8) y **P-2** (~ 16,2 KDa, pI 4,6) (Daniele *et al.*, 1995) inducen fuertemente la formación de edema (inhibido por acción de histamina), pero muestran una toxicidad relativamente baja por inyección intraperitoneal en ratones, como también baja actividad miotóxica, hemolítica, anticoagulante o de agregación plaquetaria;

✓ **Isozima P-3** (15 KDa, 14 aminoácidos) isoforma de PLA2 de letalidad relativamente alta sobre ratón (mayor a **5 µg/g**; por inyección IP) con actividad inductora de edema similar a las dos anteriores (Daniele *et al.*, 1995).

Otras enzimas que contribuyen a la acción miotóxica son: **miotoxinas o citotoxinas** (120-140 aminoácidos y 6-8 uniones S-S) responsables de los efectos locales a nivel de piel, tejido conectivo y músculo esquelético, destruyen proteínas causando necrosis local; **colagenasas**, digieren el colágeno destruyendo la matriz intracelular; y **alternagina**, metaloproteínasa que bloquea la adhesión celular.

Además, el veneno tiene enzimas que actúan sobre el ADN, ARN y sobre el NAD que podrían tener un papel importante en el desarrollo de hipotensión y shock: **fosfodiesterasas I** (11,5 KDa); **5'nucleotidasa** (100 KDa), monoestearasa específica que actúa sobre el adenosin-5'fosfato o inosin-5'fosfato, generando ribonucleósido más ortofosfato y aunque su letalidad no es alta, es una de las fosfatasa más activas; **fosfomonoesterasa** (100 KDa), hidroliza esteres fosfato con desintegración de ácidos

nucleicos y producción de nucleósidos; **deoxirribonucleasa II**, actúa sobre el DNA; **adenosintrifosfatasa**, ATPasa que hidroliza esteres fosfato con desintegración de ácidos nucleicos y producción de nucleósidos que podría tener un papel importante en la hipotensión y shock; **NAD-nucleosidasa** (100 KDa), cataliza la ruptura de uniones químicas del NAD, con producción de nicotinamida y adenosín difosfato (ADP).

El envenenamiento por *B. diporus* se manifiesta con dolor y edema local (83%), en menos casos con equimosis (50%), abscesos (5%), trastornos en la coagulación sanguínea (12%) (Jorge & Riveiro, 2000); seguido de necrosis hemorrágica con efusión abundante en el sitio de punción y escarificación de la piel (17%) (**Figura 1.3.6**). Este síndrome va acompañado de desfibrinación severa. Una vez neutralizado el veneno, los niveles de fibrinógeno aumentan lentamente a expensas de fibrinógeno hepático, alcanzando valores normales a las 36 h (Méndez & Riet, 1995).

Entre otras complicaciones que pueden presentarse en los emponzoñamientos, Martino & Orduna (1993) reportan la presencia de celulitis, erisipela y abscesos sépticos debido a *Staphylococcus epidermidis* y *S. aureus*. Otros autores describen, además, una fuerte asociación entre estas complicaciones sépticas y los microorganismos presentes en la boca de las serpientes, predominando los bacilos Gram negativos: *Morganella morganii*, *Providencia rettgeri*, *Enterobacter* sp. y *Escherichia coli*; anaerobios como *Clostridium* sp.; y menos frecuentes cocos Gram positivos (Jorge *et al.*, 1990; 1994; Ricciardi, 1999; Acosta de Pérez, 2000). Esta complicación se tratará extensamente en el **Capítulo 4: Actividad antimicrobiana**.



**A:** edema y equimosis primeras horas de evolución; **B:** gingivorrea primeras horas de evolución; **C:** extensas flictenas hemorrágicas y edematosas; **D:** úlcera 10 días de evolución. *Fuente:* Haas *et al.* (2014). **Figura 1.3.6:** Fisiopatología del accidente botrópico

Por lo general, es fácil realizar el diagnóstico de envenenamiento botrópico, dado que clínicamente es bien diferenciable de otros envenenamientos por serpientes. Este diagnóstico se basa en el antecedente de la mordedura asociado al cuadro clínico compatible y, fundamentalmente, la medida del tiempo de coagulación. Contribuyen al diagnóstico diferencial del accidente botrópico las siguientes pruebas de laboratorio (Pérez *et al.*, 2009):

✓ *Tiempo de coagulación*: valor normal: hasta 12 minutos; prolongado: mayor a 12 minutos; incoagulable: más de 30 minutos. Es necesario realizar la prueba al ingreso y cada seis horas hasta que se normalice. Resulta fundamental, en caso que no se haya podido atrapar al ofidio causal para saber si ha habido inyección de veneno; si la cantidad de suero antiveneno inyectada es suficiente y para evaluar la gravedad del accidente. Es especialmente útil en áreas rurales y sitios donde no se dispone de laboratorios de alta complejidad.

- ✓ *Fibrinógeno*: valor de referencia (VR) 200-400 mg/dL;
- ✓ *Tiempo de tromboplastina parcial activada (KPTT)*: VR: 30-40 segundos;
- ✓ *Tiempo de protrombina (PT)*: VR: 11-13 segundos;
- ✓ *Hemograma y recuento de plaquetas* para valorar anemia y trombocitopenia;
- ✓ *Examen de orina completa* en busca de hematuria;
- ✓ *Exámenes de función renal*: urea y creatinina;
- ✓ *Sangre oculta en heces*;
- ✓ *Cratínfosfoquinasa (CPK)*: para evaluar el daño tisular.

#### **4. Tratamiento del accidente ofídico: suero hiperinmune**

El tratamiento específico frente a un accidente ofídico, y frente a cualquier emponzoñamiento en general, está constituido por la aplicación de la sueroterapia. Esta fue descubierta por Calmette (1894) y su empleo reduce tanto los daños producidos por el envenenamiento como sus síntomas. En la actualidad, se prefiere utilizar el término *inmunoterapia* debido a que los sueros hiperinmunes están constituidos estrictamente por fragmentos de inmunoglobulinas purificadas (anticuerpos específicos).

La sueroterapia está regida por cuatro principios (Fan, 2009):

1. *Rápida administración*, siendo ideal aplicarlo hasta 6 horas después de haber ocurrido el accidente ofídico;
2. *Dosis única y total*, determinada por la categorización inicial del accidente;
3. *Especificidad del antiveneno*;

4. *Vía adecuada de administración*, siendo la vía de elección la endovenosa, ya que ofrece menor tiempo de neutralización del veneno y mejor biodisponibilidad del antiveneno.

El *suero hiperinmune*, también llamado *suero antiveneno*, es una preparación farmacológica que contiene anticuerpos contra uno o más antígenos específicos. Se obtiene por inmunización de equinos mediante inyección de cantidades progresivas de un pool de veneno valorado en su toxicidad, considerando de esta forma, la variabilidad natural inter-individuo que pudiera manifestar la composición de los venenos de ejemplares de una misma especie. Se eligen los equinos por su elevada respuesta inmune y además, su elevado volumen plasmático facilita la optimización del proceso de producción de suero antiofídico (Min. Salud de la Nación, 2007).

Para su obtención, el veneno es inyectado en equinos adsorbido en coadyuvante de Freund, que facilitará la liberación lenta de los toxoides mejorando notablemente la respuesta inmunológica (Freund, 1956).

Las inyecciones van aumentando paulatinamente su volumen y concentración en veneno hasta obtener en el plasma sanguíneo del equino el título necesario de anticuerpos, proceso que dura aproximadamente un año. Entonces, se da inicio al sangrado parcial periódico del animal extrayendo sangre de la yugular, colectándose en recipientes estériles con citrato sódico como anticoagulante y manteniéndose en frío a 4°C.

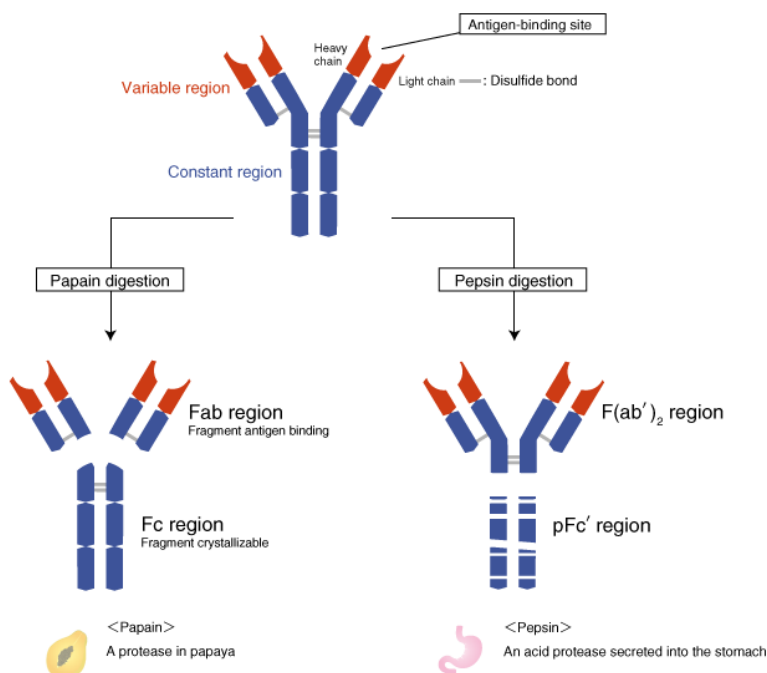
La administración de sueros heterólogos expone a los pacientes a efectos adversos, tanto locales como sistémicos de naturaleza alérgica: anafilaxia y enfermedad del suero. Para minimizarlos, los sueros antiofídicos son purificados por centrifugado, separando las proteínas inactivas (albúmina y proteínas del complemento), y precipitando las  $\gamma$  globulinas con sulfato de amonio. Los fragmentos constituyentes Fab o  $F(ab')_2$  se obtienen mediante clivaje enzimático utilizando enzimas proteolíticas (**Figura 1.4.1**):

✓ *pepsina*: produce el clivaje por debajo de las dos uniones interdisulfuro, en las terminales carboxílicas de la cadena pesada generando así, un dímero  $F(ab')_2$  de 100 KDa, con mejor coeficiente de difusión y tolerancia; y dos fragmentos pequeños (pFc');

✓ *papaína*: produce el clivaje sobre las uniones disulfuro, en la parte del grupo amino terminal de la cadena pesada, separando dos fragmentos Fab menores que son bien tolerados y cuya eficacia neutralizadora está bien establecida (45 KDa cada una) y un tercero cristizable el fragmento Fc (50 KDa).

Además, al suero se le agregan antisépticos, como timerosal y/o mertorgán; y se ajusta el pH a 6,7. Se esteriliza por filtración y previo a su distribución, es sometido a

controles bacteriológicos, toxicológicos y de valoración de su título, capacidad inmunológica y especificidad *in vivo* e *in vitro*.



Fuente: <http://ruo.mbl.co.jp/bio/e/support/method/images/antibody-fab.png>. **Figura 1.4.1:** Clivaje enzimático de los anticuerpos

La función del antiveneno es la de redistribuir los antígenos de los sitios periféricos al compartimiento plasmático donde son acomplejados por los anticuerpos; esto explicaría la supresión de la respuesta del organismo al veneno. Las inmunoglobulinas (IgG) poseen un volumen aparente de distribución similar al volumen plasmático, alcanzando su máxima concentración en tejido superficial en aproximadamente 6 h y en el profundo en unas 30 h. El fragmento  $F(ab')_2$  muestra un volumen de distribución plasmático de aproximadamente el doble al presentado por las IgG, aunque pobre en tejidos, pero se redistribuye más rápidamente que las IgG y su máxima concentración en tejido superficial se produce en alrededor de 1 h y en 6 h en los tejidos profundos, con vida media de 50 h. Esto sugiere que, si el veneno se distribuye principalmente en los tejidos y en cambio las inmunoglobulinas y fragmentos lo hacen mayormente en el plasma, **es el veneno en circulación el que será neutralizado** por las últimas.

Por el alto peso molecular de las proteínas del veneno unidas al antígeno, aun si se trata de los fragmentos  $F(ab)$  o  $F(ab')_2$ , se dificulta su filtración renal, lo que hace que los antígenos desaparezcan de la orina y el complejo permanezca circulando en sangre, y su



posible disociación es la que condiciona el riesgo de toxicidad hasta tanto sean metabolizados o eliminados.

Los fragmentos F(ab) de menor peso molecular son eliminados por filtración renal, libres o ligados a un hapteno, pero no combinados a las proteínas del veneno, lo primero reduce su vida media en el organismo y la duración de su acción; por su amplia distribución en tejidos profundos mantienen allí al complejo inmune. En cambio, los fragmentos F(ab')<sub>2</sub> son eliminados mucho más lentamente y más aún las IgG.

El antiveneno en presentación líquida, conservado entre 2 y 8°C y al abrigo de la luz, mantiene su actividad durante tres años, lapso en el cual su capacidad neutralizadora disminuye al límite. Por tanto, no es necesario desechar los sueros vencidos, que se podrán utilizar en casos de emergencia, teniendo en cuenta la disminución de su actividad. Los antivenenos liofilizados presentan un mayor lapso de duración.

En la Argentina, se dispone de los siguientes sueros antiofídicos:

✓ *Suero antiveneno botrópico bivalente*: Presentación: frasco-ampolla de 10 mL. Neutraliza 25 mg de veneno de *B. alternatus* y 15 mg de veneno de *B. diporus*. Sirve para todo el país excepto Misiones (Lab. Central de Salud Pública, La Plata, Provincia de Bs As).

✓ *Suero antiveneno Bothrops bivalente* (suero antiyará): Presentación: frasco-ampolla de 10 mL. Neutraliza 41 mg de veneno de *B. alternatus* y 33 mg de veneno de *B. diporus*. Se puede utilizar en cualquier parte del país excepto Misiones (Instituto Nacional de Microbiología Dr. Carlos G. Malbrán).

✓ *Suero antiveneno Bothrops tetravalente* (suero antiyará Misiones): Presentación: frasco-ampolla de 10 mL. Neutraliza 25 mg de veneno de *B. alternatus*; 25 mg de veneno de *B. diporus*; 25 mg de veneno de *B. jararacá* y 20 mg de veneno de *B. jararacussu*. Uso preferente en Misiones. (Instituto Nacional de Microbiología Dr. Carlos G. Malbrán).

✓ *Suero antiofídico trivalente* (Botrópico - Crotálico): Presentación: frasco-ampolla de 10 mL. Neutraliza 4 mg de veneno de *Crotalus durissus terrificus*; 12,5 mg de veneno de *B. alternatus* y *B. diporus*. Necesita mayor número de ampollas según gravedad del cuadro es el de última elección, sólo en casos de emergencias (Instituto Biológico Argentino Biol - SAIC).



Cualquiera sea el caso, la administración de antivenenos puede ir precedida por el uso de antihistamínicos, corticoides y adrenalina para prevenir reacciones alérgicas a los antivenenos heterólogos (Fan, 2009).

La producción de antisueros en los países industrializados está disminuyendo debido a su escasa rentabilidad, que se suma a la dificultad de prever las cantidades que se necesitan. En los países en desarrollo, el problema es la asequibilidad, y la producción limitada (Min. Salud de la Nación, 2007).

## 5. Plantas medicinales

Sudamérica, cuenta con una extensa tradición en el empleo de plantas medicinales, que se remonta a la época de la colonia (Ricciardi, 2005; Ricciardi *et al.* 2010). La base de los *medicamentos herbarios* son las *drogas vegetales* y los diferentes tipos de productos que se obtienen a partir de ellas. El término *droga vegetal* no debe confundirse con el de *planta medicinal*. La OMS definió, en 1978, algunos conceptos que se indican a continuación:

- ✓ *Droga vegetal*: parte de la planta que contiene los principios activos y que se utiliza en terapéutica;
- ✓ *Planta medicinal*: es cualquier planta que, en uno o más de sus órganos, contiene sustancias que pueden ser utilizadas con finalidad terapéutica o que son precursores para la semi-síntesis químico - farmacéutica;
- ✓ *Principio activo*: compuesto químico responsable de la actividad farmacológica y del uso terapéutico;
- ✓ *Medicamento*: sustancia medicinal, natural o sintética, con propiedades para prevenir, diagnosticar y curar una enfermedad. Se prescribe a una dosis y se elabora de una forma correcta para su administración.

La *fitoterapia* utiliza *drogas vegetales* y preparaciones de dichas drogas en la forma farmacéutica más adecuada para su administración. En algunos países también involucran dentro del concepto de *fitoterapia* a los *medicamentos* conteniendo compuestos de origen vegetal químicamente puros, siempre que éstos posean un margen terapéutico amplio (Cañigueral *et al.*, 2003).

Asimismo, ANMAT a través de la disposición N° 5418/2015 definió a los *medicamentos herbarios* como aquellos que contienen como ingrediente activo una o más

drogas vegetales o uno o más preparados de drogas vegetales, o una o más drogas vegetales en combinación con uno o más preparados de drogas vegetales.

### **5.1 Uso etnomedicinal de las plantas alexitéricas**

El uso de plantas como antiveneno (alexitéricas) ha sido ampliamente estudiado por diferentes autores, que han realizado un exhaustivo relevamiento de estas plantas (Reyes-Chilpa & Jiménez-Estrada, 1995; Mors *et al.*, 2000; Ricciardi, 2005; López-Sáez & Pérez-Soto, 2009; Makhija & Khamar, 2010).

Se definen como *plantas alexitéricas* a aquellas que tienen la capacidad de aliviar uno o varios síntomas complejos como ser dolor, sangrado, inflamación, infección o incluso el mismo envenenamiento.

El conocimiento y uso de estas plantas es de larga data: en tratados de medicina ayurvédica de la India (siglos antes de la era cristiana) aparecen 211 plantas; en México se utilizan desde la época prehispánica; en el siglo XVI Francisco Hernández en su obra *Historia de las plantas de la nueva España* cita 119 plantas con este fin; en el siglo XVI Fray Bernardino de Sahagún cita el uso del *picietl* o *tabaco*. Algunos grupos étnicos como los Colorados, Cayapa y Coaquier del norte del Ecuador utilizan 40 especies de *Gesneriáceas*; los Colorados y Cayapa además emplean 11 especies de *Polypodiales* y 7 especies de *Piperáceas* (Torres *et al.*, 2015).

Las plantas se aplican maceradas y frecuentemente cocidas sobre las heridas, también en forma de decocciones para ser ingeridas o lavar el área afectada (Torres *et al.*, 2015).

Samy *et al.* (2008) en un estudio realizado en India, reportan que a los accidentados se les da a beber la decocción acuosa de las plantas; otros grupos creen que cepillándose los dientes diariamente con *Tephrosia purpurea* (L.) Pers. y *Azadirachta indica* A. Juss. se vuelven resistentes al veneno o, similarmente, aplicado en forma externa el aceite de hojas de *Aristolochia tagala* Cham. durante la noche para prevenir las mordeduras.

Reyes-Chilpa & Jiménez-Estrada, (1995) informan sobre los tepehuanos de Chihuahua «*los indios rara vez abren las heridas causadas por mordeduras de serpientes y para curarlas dependen de la aplicación de cataplasmas preparadas con varias plantas*».

Otero *et al.* (2000), describen el uso de más de 77 plantas en Colombia en forma de bebidas preparadas por infusión, decocción o maceración en 2 litros de agua; en forma de

aplicaciones locales; como extractos etanólicos (30-38% p/v) o mezclando varias plantas con aguardiente de caña.

Makhija & Khamar, (2010) describen el uso de más de 70 plantas en la India en forma de pasta (externa) jugo o decocción (oral) para tratar accidentes ofídicos por serpientes de los géneros *Bothrops*, *Naja*, *Echis*, *Viper*, *Bitis*, *Laticauda* y *Daboia*.

Esteso, (1985) en su obra *Ofidismo en la República Argentina*, cita entre las plantas usadas y sus acciones: la caña tacuara, ajo (*Allium sativum* L.), el jugo de quimil (*Opuntia quimilo* K. Schum.), jugo amargo de ayapana (*Eupatorium ayapana* (M. Vahl) R. M. King & H. Rob.), té de raíz de bejuco (*Ipomoea acuminata* (Burm.) Merr.), jugo de cardo santo (*Cnicus benedictus* L.), hojas y raíces de contra yerba machacada (*Dorstenia contrajerva* L.), hojas secas y tallos verdes de guaco (*Mikania guaco* Willd.), mostaza negra (*Sinapis nigra* (L.) W. D. J. Koch), semillas de mandiroba (*Fevillea cordifolia* L.), hojas de la sanguinaria (*Euphorbia pilulifera* L.) y **el jugo de las hojas de pareira brava (*Cissampelos pareira*) aplicado sobre la picadura para inhibir la acción del veneno.**

Dentro de las plantas alexíteras cuya primera revisión realizaran Mors *et al.* (1989), las familias más importantes fueron dicotiledóneas: *Asteraceae*, *Fabaceae*, *Euphorbiaceae*, *Apocynaceae*, *Rubiaceae* y *Lamiaceae*; y monocotiledóneas: *Araceae* y *Zingiberaceae*. Una revisión posterior de Houghton, (1993) incrementó este número registrando 781 especies de las familias *Fabaceae*, *Asteraceae*, *Euphorbiaceae*, *Apocynaceae*, *Rubiaceae*, *Aristolochiaceae* y *Araceae*.

Otros géneros citados como alexíteros en la Argentina son *Cyperus*, *Euphorbia*, *Aloysia*, *Araujia*, *Anthemis*, *Boerhavia*, *Chiococca*, *Echium*, *Erythrina*, *Eupatorium*, *Fevillea*, *Flaveria*, *Ipomoea*, *Macfadyena*, *Morrenia*, *Nicotiana*, etc. (Ricciardi *et al.*, 1996; Ricciardi, 2005).

## 5.2 Propiedades alexitéricas comprobadas contra especies del género *Bothrops*

Existen diversos trabajos que han estudiado la actividad de especies vegetales contra el veneno de *Bothrops* sp., los resultados se exponen en la **Tabla 1.5.1** excepto para *C. pareira* que se desarrollará más extensamente en el apartado siguiente.

**Tabla 1.5.1:** Actividad antiveneno validada científicamente contra *Bothrops* sp.

Especie vegetal	Serpiente	Cita
<i>Aristolochia odoratissima</i> L.	<i>B. atrox</i>	Usubillaga <i>et al.</i> (2005)
<i>Baccharis trimera</i> (Less.) DC.	<i>B. neuwiedi</i> ; <i>B. jararacussu</i>	Januario <i>et al.</i> (2004)

**Capítulo 1**  
Introducción y Marco Teórico

<i>Bauhinia forficata</i> Link		Oliveira <i>et al.</i> (2005)
<i>Blutaparon portulacoides</i> Raf.	<i>B. jararacussu</i>	Pereira <i>et al.</i> (2009)
<i>Brongniartia podalyrioides</i> Kunth	<i>B. atrox</i>	Reyes-Chilpa & Jimenez-Estrada, (1995)
<i>Buddleja americana</i> L.; <i>Mikania guaco</i> Willd.; <i>Piper darienense</i> C. DC.; <i>Vernonia patens</i> Schreb.; <i>Echinacea purpurea</i> (L.) Moench	<i>B. asper</i>	Baltodano <i>et al.</i> (2006)
<i>Bellucia dichotoma</i> Cogn	<i>B. atrox</i>	Mourão de Moura <i>et al.</i> (2013); (2014)
<i>Bellucia dichotoma</i> ; <i>Connarus favosus</i> Planch.; <i>Plathymenia reticulata</i> Benth.; <i>Philodendron megalophyllum</i> Schott	<i>B. jararaca</i>	Mourão de Moura <i>et al.</i> (2015)
<i>Casearia mariquitensis</i> Kunth.	<i>B. neuwiedi pauloensis</i>	Izidoro <i>et al.</i> (2003)
	<i>B. jararacussu</i>	Cintra-Francischinelli, (2008); Da Silva <i>et al.</i> (2008); Oshima-Franco <i>et al.</i> (2005)
<i>Casearia sylvestris</i> Sw.	<i>B. asper</i> , <i>B. pirajai</i> , <i>B. moojeni</i> , <i>B. neuwiedi</i> , <i>B. jararacussu</i>	Borges <i>et al.</i> (2001)
	<i>Bothrops</i> sp.	Borges <i>et al.</i> (2000); Raslan <i>et al.</i> (2002); Cavalcante <i>et al.</i> (2007)
<i>Cordia verbenacea</i> (Jacq.) Roem. & Schult.	<i>B. jararacussu</i>	Ticli <i>et al.</i> (2005)
<i>Connarus favosus</i> Planc; <i>Aniba fragrans</i> Ducke; <i>Plathymenia reticulata</i> Benth; <i>Philodendron megalophyllum</i> Schott	<i>B. atrox</i>	Mourao de Moura <i>et al.</i> (2013)
<i>Dipteryx alata</i> Vogel	<i>B. jararacussu</i>	Nazato <i>et al.</i> (2010); Puebla <i>et al.</i> (2010)
<i>Eclipta alba</i> L.		Diogo <i>et al.</i> (2009)
<i>Eclipta prostrata</i> L.	<i>B. jararacá</i> ; <i>B. jararacussu</i> ;	Mors <i>et al.</i> (1989); Melo <i>et al.</i> (1989); (1994); Pithayanukul <i>et al.</i> (2004)
<i>Hedychium coronarium</i> J. Koenig	<i>B. atrox</i> y <i>B. moojeni</i>	Miranda <i>et al.</i> (2014)
<i>Heliconia latispatha</i> Benth;		
<i>Hemidesmus indicus</i> Petersen;	<i>B. asper</i>	Pereañez <i>et al.</i> (2008)
<i>Hemidesmus curtispatha</i> Petersen		

Evaluación fitoquímica y biológica (actividades antimicrobiana y alexitérica)  
de extractos de *Cissampelos pareira*

<i>Heliconia psittacorum</i> L.; <i>Heliconia rostrata</i> L.		Estrada <i>et al.</i> (2009); (2010)
<i>Mandevilla velutina</i> K. Schum.	<i>B. jararacussu</i> ; <i>B. alternatus</i> ; <i>B. moojeni</i> ; <i>B. pirajai</i>	Biondo <i>et al.</i> (2003)
<i>Mangifera indica</i> (L.) (Blume) & Wall.; <i>Vitis vinífera</i> L.	<i>B. asper</i>	Estrada <i>et al.</i> (2009)
<i>Marsypianthes chamaedrys</i> Vahl Kuntze	<i>B. atrox</i> <i>Bothrops</i> sp.	Magalhães <i>et al.</i> (2011) Castro <i>et al.</i> (2003)
<i>Mikania glomerata</i> Spreng.	<i>B. alternatus</i> ; <i>B. moojeni</i> ; <i>B. neuwiedi</i> ; <i>B. jararacussu</i>	Maiorano <i>et al.</i> (2005); Napimoga & Yatsuda, (2010);
<i>Mouriri pusa</i> Gardner; <i>Byrsonima crassa</i> Nied; <i>Davilla elliptica</i> Vand.	<i>B. jararaca</i>	Nishijima <i>et al.</i> (2009)
<i>Murraya paniculata</i> (L.) Jack	<i>B. asper</i>	Lobo <i>et al.</i> (2010)
<i>Pentaclethra macroloba</i> (Willd.) Kuntze	<i>B. neuwiedi</i> <i>B. jararacussu</i>	Da Silva <i>et al.</i> (2005) Da Silva <i>et al.</i> (2007)
<i>Persea americana</i> Mill.	<i>B. asper</i>	Salazar <i>et al.</i> (2009)
<i>Piper</i> sp.; <i>Piper umbellatum</i> L.; <i>Piper peltatum</i> L.	<i>Bothrops</i> sp.	Nunez <i>et al.</i> (2005)
<i>Renealmia alpinia</i> (Rottb.) Maas	<i>B. asper</i>	Fernández <i>et al.</i> (2010)
<i>Sapindus saponaria</i> L.	<i>B. jararacussu</i> , <i>B. moojeni</i> y <i>B. alternatus</i>	Da Silva <i>et al.</i> (2012)
<i>Schizolobium parahyba</i> (Vell) S.F.Blake	<i>B. alternatus</i> ; <i>B. moojeni</i> ; <i>B. pauloensis</i>	Vale <i>et al.</i> (2008); Mendes <i>et al.</i> (2008)
<i>Serjania erecta</i> Radlk.	<i>B. jararacussu</i>	Fernandes <i>et al.</i> (2011)
<i>Tabernaemontana catharinensis</i> A. DC.	<i>Bothrops jararacussu</i>	De Almeida <i>et al.</i> (2004); Veronese <i>et al.</i> (2005)

En la Argentina, no existen estudios científicos relacionados con plantas con actividad antiveneno, excepto los realizados por este grupo de investigación dirigido por el Dr. Dellacassa (UDELAR) y la Dra. Torres (UNNE), quienes han detectado actividad alexitérica *in vitro* en plantas del género *Mikania*, *Aristolochia*, *Asclepias*, *Brunfelsia*, *Casearia*, *Cissampelos*, *Dorstenia*, *Eclipta*, *Iresine*, *Nectandra*, *Ocotea*, *Plantago*, *Sapium* y *Trixis*.

Los preparados antiofídicos que incluyen especies vegetales utilizan para ello la *planta entera*, aunque en algunos casos, separan sus órganos constituyentes utilizando

*hojas, raíces o rizomas*. Menos comunes son los usos derivados de la *corteza, bulbos, flores, resinas, látex, semillas, tallos y troncos* (Samy *et al.*, 2008).

El uso de antídotos vegetales contra veneno se aplica con dos objetivos: por un lado, neutralizar el veneno; y por el otro, aliviar los síntomas que éste produce o la respuesta del organismo a los mismos.

El pánico que conlleva ser atacado por una víbora venenosa hace que muchos pueblos indígenas utilicen vegetales calmantes sin que en realidad estos sean antídotos verdaderos. Como ejemplo, puede citarse el uso de *solenáceas* en general, ricas en *alcaloides del tropano*, y de la adormidera en particular. También está descrito el uso de plantas que estimulan el sistema inmunitario activando la respuesta antiinflamatoria que, en última instancia, alivia los síntomas del veneno, como ocurre con muchas especies de *Aristolochia*, ricas en *ácido aristolóquico*, con propiedades antiinflamatorias (Lopez-Sáes & Pérez-Soto, 2009). Es así que, en el proceso de validación de plantas utilizadas como antiveneno, resulta importante poder discriminar aquellas especies que poseen principios activos contra veneno, de aquellas que son útiles para aplacar los síntomas producidos por la mordedura, ya que son las primeras las que podrían ser interesantes para la formulación de un *fitofármaco* como complemento a la terapia antiofídica.

Tomando como referencia la información expuesta, se considera de suma importancia la caracterización química de la especie vegetal autóctona objeto de este trabajo de tesis, *C. pareira*, su posible variabilidad y el estudio de su actividad biológica como antiveneno contra la especie *B. diporus* del NEA. De este modo, se pretende validar si esta actividad estudiada, en otras regiones geográficas diferentes, puede extrapolarse a esta realidad y ser una alternativa complementaria del tratamiento específico.

## **6. Genero *Cissampelos***

### **6.1 Taxonomía**

**Reino:** *Plantae*

**División:** *Magnoliophyta*

**Clase:** *Magnoliopsida*

**Orden:** *Ranunculales*

**Familia:** *Menispermaceae*

**Género:** *Cissampelos*

**Especie:** *pareira* L.

## 6.2 Generalidades

*Cissampelos* es uno de los 70 géneros pertenecientes a la familia de las Menispermaceae establecido por Linneo en 1753 en la primera edición del *Species Plantarum* (Granda-Lorenzo & Fuentes-Fiallo, 1991). Tiene distribución global a lo largo de los cinco continentes, en regiones de selvas tropicales de baja altitud (hasta 2100 m), donde son trepadoras, aunque algunos géneros y especies se han adaptado a regiones templadas cálidas, matorrales semidesérticos y bosques monzónicos (Stevens, 2001). El nombre del género deriva del griego *Kissos* que significa hiedra y *ampelos*, vid, haciendo referencia a sus frutos dispuestos en forma de racimos.

En la Argentina se encuentran 3 géneros pertenecientes esta familia: *Cissampelos*, *Hyperbaena* y *Odontocarya*. En la **Tabla 1.6.1** se detallan las especies más reconocidas y su distribución en la Argentina (Zuloaga *et al.*, 2008; Zuloaga & Belgrano, 2014; Peña-Chocarro & De Egea, 2015).

**Tabla 1.6.1:** Distribución de las especies de la familia Menispermaceae en la Argentina

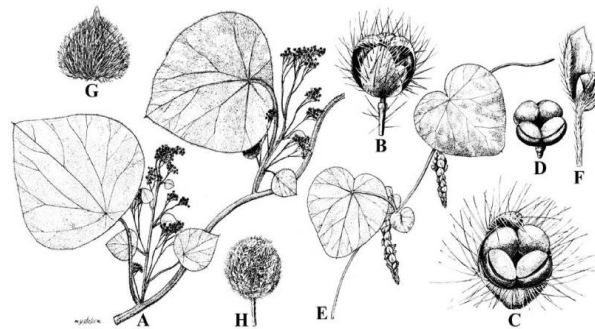
Género	Especie	Distribución
<i>Cissampelos</i>	<i>pareira</i>	Catamarca Chaco, Corrientes, Formosa, Jujuy, Misiones, Salta, Santa Fe, Tucumán y Santiago del Estero
	<i>ovalifolia</i>	Misiones
<i>Hyperbaena</i>	<i>oblongifolia</i>	Misiones
	<i>hassleri</i>	Chaco y Formosa
<i>Odontocarya</i>	<i>acuparata</i>	Corrientes y Misiones
	<i>asarifolia</i>	Chaco, Formosa, Misiones, Salta y Tucumán

El género *Cissampelos* comprende aproximadamente 21 especies diferentes (Mabberley, 2008; Ortiz & Nee, 2014) convirtiéndose en el más importante de la familia. Rhodes, (1975) menciona 20 especies: 9 para América, 9 para África, 1 especie asiática y otra, *C. pareira* L., pantropical, esto es, que se encuentra presente en las regiones tropicales de los tres continentes principales: África, Asia y América (**Figura 1.6.1**) (Semwal *et al.*, 2014).



Fuente: Semwal *et al.* (2014). **Figura 1.6.1:** Distribución geográfica pantropical de *C. pareira*.

*C. pareira* es un arbusto trepador, herbáceo y leñoso. Sus tallos son delgados, flexibles, profundamente estriados y cubiertos de pelillos. Sus hojas son cordadas o reniformes, peltadas y alternas. Son plantas dioicas, por lo que las flores femeninas (pistiladas) y masculinas (estaminadas) se encuentran separadas. Las flores se disponen en racimos y son de color verde, blanquecino o amarillo; las estaminadas (masculinas) tienen 4 sépalos libres y 4 pétalos fusionados; las flores pistiladas (femeninas) tienen 1 sépalo, 1 pétalo y un carpelo solitario. Los frutos son drupas pequeñas de color rojo o amarillo (Don, 1831; Rhodes, 1975; Tamaio *et al.*, 2010; Stevens, 2001) (**Figuras 1.6.2 y 1.6.3**)



**A:** planta masculina; **B:** flor masculina; **C:** flor masculina con sépalo, corola y estambres; **D:** estambres; **E:** planta femenina; **F:** flor femenina; **G:** bráctea; **H:** fruto. *Fuente:* eFloras.org - M.Y. Saleem eFlores.

**Figura 1.6.2:** *C. pareira*



**Figura 1.6.3:** Ejemplares de *C. pareira*



Debido a su distribución pantrópica, *C. pareira* recibe diferentes denominaciones según su localización geográfica, los que se listan a continuación (**Tabla 1.6.2**):

**Tabla 1.6.2:** Nombres vulgares de la especie *C. pareira*

Nombre vulgar	Región geográfica	Referencia bibliográfica
monoi	Tailandia	Vardhanabhuti & Ikeda, (2006)
laghupatha; patha; krueo ma noy; akanabindi; bhatindupat; ekladi; poa	India	Anupa <i>et al.</i> (2014) Singh <i>et al.</i> (2013) Gupta <i>et al.</i> (2011) Singthong <i>et al.</i> (2005) Choudhury & Jadhav, (2013) Jhuma <i>et al.</i> (2014) Dey & De, (2011)
curanina; xpetektuun; redondilla	Mexico	Sánchez-Medina <i>et al.</i> (2001) Ramos-Hernandez <i>et al.</i> (2007)
abuta; ysyco cobra, parreira brava, abutúa	Brasil	Surendran <i>et al.</i> (2011)
mullein; chiric sanago	Perú	
patacón, masquiaunsabe	Colombia	
venadero, bejuco azul, oreja de ratón	Costa Rica	
bejuco pitilla	Cuba	
mocrí, cudruma	Panamá	
bejuco de ratón, pat chawal	República Dominicana	Dellacassa <i>et al.</i> (2014)
alcotán	Honduras, Nicaragua, El Salvador	
alcotán, tamagás, curarina, ixcatú-can, cuxoguí, cuxba; guaco; bejuco de la preñada	Guatemala	
ka'apeva; ka'á-peva; ysyó-morotí; caá pebá; zarza; pareira brava; mil hombres	Argentina	Ricciardi <i>et al.</i> (1996)

### 6.3 Usos etnobotánicos de la especie

La *etnobotánica* estudia la relación existente entre el hombre y las plantas, revalorizando el saber popular buscando obtener un cuerpo de conocimientos básicos a partir del cual se inicien nuevas líneas de investigación farmacológica, farmacobotánica, fitoquímica, con la finalidad de encontrar principios activos a partir de recursos naturales no convencionales (Chiffa & Ricciardi, 2011)

La especie *C. pareira* tiene una amplia tradición de uso en la medicina vernácula para diversas dolencias o afecciones (Mendes & Carlini, 2007; Giorgetti *et al.*, 2011; Samanta & Bhattacharya, 2011; Leonti *et al.*, 2001; Heinrich *et al.*, 2014; Sharma *et al.*, 2004; Basha & Sudarsanam, 2012; Sharma *et al.*, 2012; Jain *et al.*, 2005; Namsa *et al.*, 2011; Ramasubramanilaraja & Badu, 2010; Kakrani & Saluja, 2002; Rajan *et al.*, 2002, 2003; Kufer *et al.*, 2005; Kumar *et al.*, 2006; Gupta *et al.*, 2011; Nagarajan *et al.*, 2011; Kaur *et al.*, 2012; Abbasi *et al.*, 2010; Haq *et al.*, 2011; Galicia *et al.*, 2002; Chhetri *et al.*, 2005; Bora *et al.*, 2007; Pattanaik *et al.*, 2008; Rukunga *et al.*, 2009; Dey & De, 2012).

#### 6.4 Actividades biológicas de la especie científicamente validadas

En la **Tabla 1.6.3** se resumen las actividades biológicas de la especie en distintos órganos y extractos que han sido científicamente validadas:

**Tabla 1.6.3:** Actividades biológicas de *C. pareira* científicamente validadas

Actividad biológica	Extracto / componente bioactivo responsable	Referencia bibliográfica
anti-diarreica	hidroalcohólico de raíces	Amresh <i>et al.</i> (2004)
anti-inflamatoria	hidroalcohólico 50% de raíces; etanólico entero	Amresh <i>et al.</i> (2007a) y (2007b)
analgésica y anti-pirética	etanólico entero	Reza <i>et al.</i> (2014)
anti-fertilidad	metanólico de hojas; acuoso de hojas	Ganguly <i>et al.</i> (2007); (2018); Ampa <i>et al.</i> (2010)
anti-helmíntica	acuoso de partes aéreas	Padmani <i>et al.</i> (2012)
anti-oxidante	hidroalcohólico 50% de raíces; alcohólico y acetato de etilo entero	Amresh <i>et al.</i> (2007c); Gul <i>et al.</i> (2016)
hepatoprotectora	hidroalcohólico 50% de raíces	Surendran <i>et al.</i> (2011)
sobre la memoria y el aprendizaje	hidroalcohólico 50% de raíces	Pramodinee <i>et al.</i> (2011)
ansiolítica	hidroetanólico 70% de hojas / alcaloides ( <i>berbeerina</i> ), terpenoides y compuestos fenólicos	Priyanka, (2013)
cardioprotector	etanólico de raíz / alcaloides ( <i>bebeerina</i> ); flavonoides	Singh <i>et al.</i> (2013); Patnaik <i>et al.</i> (1973); De Freitas <i>et al.</i> (1996); Amresh <i>et al.</i> (2007a)
inmunomoduladora	metanólico de raíces / alcaloides de la <i>bis-bencil-isoquinolina</i> y <i>berberina</i>	Mishra & Bafna, (2010)

anti-tumoral	extracto de proteínas y polisacáridos; metanólico entero	Meng <i>et al.</i> (2002); Thavamani <i>et al.</i> (2014)
anti-leucémico	Pareirubrininas A y B; grandirubrininas e isoimeribrina: alcaloides	Morita <i>et al.</i> (1993)
anti-cancer	hexánico entero / ácidos oleanólico y oleico	Bala <i>et al.</i> (2014)
protector contra el cáncer gástrico	hidroalcohólico 50% de raíces	Amresh <i>et al.</i> (2007d)
anti-hiperglucemiente	acuoso de hojas	Kuldeep <i>et al.</i> (2013); Piero <i>et al.</i> (2015)
anti-dengue	Etanólico entero	Sood <i>et al.</i> (2015)
simil curare	hayatinina metilclorhidrica	Basu, (1970); Bhatnagar & Popli, (1967)
nefroprotectora	hidroalcohólico de la planta entera	Danduga <i>et al.</i> (2015)
anti-urolítica	etanólico de raíces	Babu <i>et al.</i> (2014)
diurética	etanólico de hojas	Sayana <i>et al.</i> (2011)

## 7. *Cissampelos pareira* como antiveneno

### 7.1 Uso etnobotánico de la especie

*C. pareira* ha sido ampliamente utilizada como antiveneno por las distintas poblaciones indígenas del NEA en forma de cocimiento de raíces, así como también su polvo o sus semillas en cataplasma contra picaduras de víboras (Ricciardi *et al.*, 1996).

En la medicina tradicional de la India se utiliza como antiveneno la decocción de sus raíces o la planta entera (Chakraborty & Bhattacharjee, 2006; Jabeen *et al.*, 2009). En Pakistán también utilizan las hojas o la planta entera en cataplasmas aplicadas sobre el sitio de la mordedura Butt *et al.* (2015).

En México, se utiliza la planta completa contra veneno de serpientes (Ramos-Hernandez *et al.*, 2007). La decocción de la raíz en agua es empleada en muchos países tropicales para tratar mordeduras de serpientes y otros animales ponzoñosos (Morten, 1981).

Es interesante la coincidencia de uso como antiofídica en diferentes pueblos de Amazonía (Ecuador y Perú) y de Centroamérica (México y Guatemala) (Barranco-Pérez, 2010).

## **7.2 Validación científica de la actividad**

Hasta el momento, sólo existen unas pocas citas respecto de esta actividad científicamente validada para *C. pareira*:

Badilla *et al.* (2008) en Costa Rica reportan un **10% de actividad antihemorrágica y antiproteolítica** a partir de una **infusión acuosa de toda la planta** contra el veneno de *B. asper*.

Saravia-Otten *et al.* (2015) estudiaron los **extractos etanólicos de raíces** de material vegetal recolectado en Guatemala contra *B. asper*; encontrando **actividad antiproteolítica**, pero este extracto no logró inhibir las actividades hemolíticas ni coagulantes del veneno.

Este grupo de investigación ha realizado estudios previos en los que Camargo *et al.* (2005) informaron **inhibición de la actividad hemolítica indirecta *in vitro***, mientras que Torres *et al.* (2007) reportaron que los **extractos etanólicos** de *C. pareira* son activos contra *B. diporus* para una relación 1:7 veneno-extracto. También se han publicado resultados preliminares de este trabajo de tesis (Ricciardi-Verrastro *et al.*, 2018).

## **8. Antecedentes toxicológicos de la especie**

El extracto **hidroalcohólico 50%** de raíces (2 g/Kg) administrados vía oral no presentó toxicidad aguda ni subaguda en ratones (Amresh *et al.*, 2008).

Wipawee & Jintanaporn, (2012) estudiaron la toxicidad aguda del **extracto hidroalcohólico 50%** de una mezcla comercial de *C. pareira* y *Anethum graveolens* L. a una relación 1:5 (PM52). Hasta 5000 mg/Kg de peso corporal no provocaron muerte ni síntomas tóxicos ratas. Según las directrices de la Organización de Cooperación y Desarrollo Económicos (OCDE) para toxicidad oral aguda, una DL50 de 2000 mg/Kg por peso corporal se clasifica como no clasificado y, por lo tanto, el producto se considera seguro. Por lo tanto, PM52 es seguro especialmente para aplicaciones de corta duración.

Piero *et al.* (2015) realizaron un análisis histopatológico de hígado, riñón, corazón, bazo, cerebro, pulmones, ojos y testículos de ratones albinos Swiss White luego de la administración del **extracto acuoso de hojas** de *C. pareira* (1g/Kg de peso corporal) durante 28 días. Cuando la administración fue oral, no se evidenciaron cambios histopatológicos en ninguno de los órganos analizados. Sin embargo, cuando la administración fue intraperitoneal se observaron cambios en el hígado, con proliferación de tejido fibroso en la capa serosa y presencia de células inflamatorias mixtas, que serían

indicativas de peritonitis; y en el bazo, una reducción de la densidad celular de folículos linfoides.

### **En resumen**

Los accidentes ofídicos constituyen un grave problema que no es debidamente reportado por quienes lo sufren en todo el mundo. Esto ocurre particularmente en países agrícolas debido a que esta es una de las ocupaciones más afectadas por las mordeduras de serpientes. Además, los estudios muestran no solo una mayor incidencia en los hombres que trabajan la tierra, sino también una incidencia razonablemente alta en los niños. Esto puede estar relacionado con el hecho que, en las zonas rurales de muchos países subdesarrollados, los niños participan en estas actividades agrícolas o son atacados debido a su curiosidad innata (Chippaux, 1998).

Generalmente, y como se detalló en la primera parte de este capítulo, los efectos locales de una mordedura de serpiente se producen en los primeros 10 a 30 minutos posteriores a su ocurrencia; pudiendo haber entumecimiento alrededor de la mordedura con sangrado, o una erupción purpúrica, y/o necrosis o gangrena (Cavazos *et al.*, 2012). Estas reacciones locales no se neutralizan de manera efectiva con la terapia de suero antiveneno convencional, como lo han demostrado los modelos animales y los estudios clínicos (Avila-Aguero *et al.*, 2001; Lomonte & Gutierrez, 1983). En casos severos, los efectos locales del envenenamiento pueden conducir a pérdida permanente de tejido, discapacidad o amputación (Gutierrez, 2002).

Como consecuencia de esta situación, y dado el contexto del uso de *C. pareira* para el tratamiento de mordeduras de serpiente en la medicina tradicional, este trabajo de tesis busca validar la actividad antiveneno de esta especie establecida para otras regiones contra el veneno de *B. diporus* del NEA.

Para comprender los límites de variabilidad asociados a un producto bioactivo natural, como los extractos de plantas preparados en este trabajo, se estudiarán de manera bioguiada distintos extractos de manera tal de cubrir la mayoría de los factores de variación como ser las diferencias edafológicas, diferencias estacionales o de estado vegetativo de la especie, polaridad de los distintos extractos y diferencias de órganos activos principalmente partes aéreas y raíces.

## 9. Referencias bibliográficas

- Abbasi, A.; Khan, M.; Ahmad, M.; Zafar, M.; Jahan, S.; Sultana, S. (2010). Ethnopharmacological application of medicinal plants to cures kin diseases and in folk cosmetics among the tribal communities of North-West Frontier Province, Pakistan. *Journal of Ethnopharmacology*, 128, 322-335.
- Acosta de Pérez, O. (2000). Intoxicación por venenos de ofidios del género *Bothrops* (yarará) tratamiento. Curso de posgrado Teórico-Práctico. Cátedra de Patología. Médica Facultad de Ciencias Veterinarias, UNNE.
- Acosta de Pérez, O.; Koscinczuk P.; Flinta S.; Maidana H.; Sanchez Negrette, M. (1997). *Bothrops alternatus* envenoming in young dogs. *Journal of Venomous Animals and Toxins*, 3, 43-47.
- Acosta de Pérez, O.; Koscinczuk, P.; Teibler, P.; Sánchez Negrette, M.; Ruiz, R.; Maruñak, S.; Bogarín, G. (1998). Actividades hemorrágica y edematizante y alteraciones histológicas en almohadilla plantar del ratón inducidas por venenos de serpientes de los géneros *Bothrops* y *Crotalus* de Argentina. *Toxicon*, 36(8), 1165-1172.
- Alonso, J. (2008). Fitofármacos en la Clínica Diaria. Asociación de Fitomedicina. Argentina. Capítulos: introducción, evolución histórica, fitoterapia, aspectos botánicos; control de calidad, técnicas de comprobación de actividad biológica. *Curso de posgrado a distancia*. Buenos Aires, Argentina.
- Ampa, L.; Wanchat, S.; Jatupon, P. (2010). Antifertility activity of the aqueous leaf extract of *Cissampelos pareira* in male albino mice. *Animal Biology & Animal Husbandry-Bioflux*, 2(2), 59-64.
- Amresh, G.; Rao, C.; Shirwaikar, A. (2004). Ethnomedical value of *Cissampelos pareira* extract in experimentally induced diarrhoea. *Acta Pharmaceutica*, 54(1), 27-35.
- Amresh, G.; Rao, C.; Singh, P. (2007c). Antioxidant activity of *Cissampelos pareira* on benzo (a) pyrene-induced mucosal injury in mice. *Nutrition Research*, 27, 625-632.
- Amresh, G.; Rao, C.; Singh, P. (2007d). Evaluation of *Cissampelos pareira* against gastric cancer and enzymes associated with carcinogen metabolism. *Pharmaceutical Biology*, 45(8), 595-603.
- Amresh, G.; Rao, C.; Singh, P. (2008). Toxicological screening of traditional medicine Laghupatha (*Cissampelos pareira*) in experimental animals. *Journal of Ethnopharmacology*, 116, 454-460.
- Amresh, G.; Reddy, G.; Rao, C.; Singh, P. (2007a). Evaluation of anti-inflammatory activity of *Cissampelos pareira* root in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 110, 526-531.
- Amresh, G.; Zeashan, H.; Rao C.; Singh, P. (2007b). Prostaglandin mediated anti-inflammatory and analgesic activity of *Cissampelos pareira*. *Acta Pharmaceutica Scientia*, 49, 153-160.
- Anupa, P.; Vasanthakumari, B.; Citarasu, T. (2014). Qualitative phytochemical screening of leaf extracts of *Cissampelos pareira* L. in different solvent system. *International Journal of Bioassays*, 3, 399-403.
- Avila-Aguero, M.; Valverde, K.; Gutierrez, J.; Paris, M.; Faingezicht, I. (2001). Venomous snake bites in children and adolescents: A 12-year retrospective review. *Journal of Venomous Animals and Toxins*, 7, 69-84.
- Babu, S.; Chitra C.; Rao, N.; Vasant, R.; Ramesh, B.; Naveen, S. (2014). Evaluation of antiurolithic activity of alcoholic extract of roots of *Cissampelos pareira* in albino rats. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 8(7), 1-4.

- Badilla, B.; Chaves, F.; Jimenez, S.; Rodriguez, G.; Poveda, L. (2008). Effects of an extract of *Cissampelos pareira* on the hemorrhagic and proteolytic activities from *Bothrops asper* venom. *Pharmacognosy Magazine*, 4, 27-31.
- Bala, M.; Pratap, K.; Verma, P.; Padwad, Y.; Singh B. (2014): Cytotoxic agents for KB and SiHa cells from n-hexane fraction of *Cissampelos pareira* and its chemical composition. *Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters*. DOI: 10.1080/14786419.2014.984183
- Baltodano, B.; Chaves Mora, F.; Poveda Álvarez, L.; Jimenez Castro, S.; Rodríguez Rodríguez, G. (2006). Efecto de plantas usadas etnomédicamente sobre la actividad hemorrágica y proteolítica inducida por *Bothrops asper*. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 11, 1028.
- Barranco-Pérez, W. (2010). Tesis de Magister en Bosques y conservación ambiental: Especies vegetales de uso antiofidico en las estribaciones de la Sierra Nevada de Santa Marta: inventario, etnobotánica y evaluación biológica. *Universidad Nacional de Colombia. Sede Medellín. Facultad de Ciencias Agropecuarias*.
- Basha, S.; Sudarsanam, G. (2012). Traditional use of plants against snake bite in Sugali tribes of Yerramalais of Kurnool district, Andhra Pradesh, India. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2, 575-579.
- Basu, D. (1970). Studies on curariform activity of hayatinin methochloride, an alkaloid of *Cissampelos pareira*. *Japanese Journal of Pharmacology*, 20(2), 246-252.
- Bauchot, R. (1996). Retrato de las serpientes. *Tusquets editores*. Barcelona. 14-25.
- BEP. Boletín Epidemiológico Periódico. (2009). Envenenamiento por animales ponzoñosos. Ministerio de Salud. Presidencia de la Nación Argentina.
- Bhatnagar, A.; Popli, S. (1967). Chemical examination of the roots of *Cissampelos pareira* Linn. Structure and stereochemistry of hayatidin. *Experientia*, 23(4), 242-243.
- Biondo, R.; Pereira, A.; Marcussi, S.; Pereira, P.; Franca, S.; Soares, A. (2003). Inhibition of enzymatic and pharmacological activities of some snake venoms and toxins by *Mandevilla velutina* (Apocynaceae) aqueous extract. *Biochimie*, 85, 1017-1025.
- Boletín Integrado de Vigilancia del Ministerio de Salud de la Nación. (2013). Situación epidemiológica de accidentes por animales ponzoñosos.
- Bora, U.; Sahu, A.; Saikia, A.; Ryakala, V.; Goswami, P. (2007). Medicinal plants used by the people of North east India for curing malaria. *Phytotherapy Research*, 21, 800-804.
- Borges, M.; Soares, A.; Rodrigues, V.; Andriao-Escarso, S.; Diniz, H.; Hamaguchi, A.; Quintero, A.; Lizano, S.; Gutierrez, J.; Giglio, J.; Homsí-Brandeburgo, M. (2000). Effects of aqueous extract of *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) on actions of snake and bee venoms and on activity of phospholipases A2. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 127, 21-30.
- Borges, M.; Soares, A.; Rodrigues, V.; Oliveira, F.; Fransheschi, A.; Rucavado, A.; Giglio, J.; Homsí-Bradeburgo, M. (2001). Neutralization of proteases from *Bothrops* snake venoms by aqueous extract from *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae). *Toxicon*, 39, 1863-1869

- Bustillo, S.; Lucero, H.; Leiva, L.; Acosta, O.; Kier Joffé, E.; Gorodner, J.O. (2009). Cytotoxicity and morphological analysis of cell death induced by Bothrops venoms from the northeast of Argentina. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, 15(1), 28-42.
- Butt, M.; Ahmad, M.; Fatima, A.; Sultana, S.; Zafar, M.; Yaseen, G.; Ashraf, M.; Shinwari, Z.; Kayani, S. (2015). Ethnomedicinal uses of plants for the treatment of snake and scorpion bite in Northern Pakistan. *Journal of Ethnopharmacology*, 168, 164-81.
- Calmette, L. (1894). Contribution à l'étude du venin des serpents. *Annales de l'Institut Pasteur*, 8, 275-91; 9, 225-51; 12, 343-47.
- Camargo, F.; Torres, A.; Ricciardi, A.; Tressens, S.; Dellacassa, E. (2005). Inhibición de la actividad hemolítica del veneno de *Bothrops neuwiedi diporus* Cope (yarára chica) por extractos de plantas del nordeste argentino. *Comunicaciones Científicas y Tecnológicas UNNE*. E-009
- Cañigueral, S.; Dellacassa, E.; Bandoni, A. (2003). Plantas medicinales y fitoterapia: ¿Indicadores de dependencia o factores de desarrollo? *Acta Farmacéutica Bonaerense*, 22(3), 265-278
- Carrasco, P.; Mattoni, C.; Leynaud, G.; Scrocchi, G. (2012). Morphology, phylogeny and taxonomy of South American *bothropoid pitvipers* (Serpentes, *Viperidae*). *Zoologica Scripta*, 1-16.
- Castro, H.; Silva, D.; Craik, C.; Zingali, R. (2001) Structural features of a snake venom trombin-like enzyme: thrombin and trypsin on a single catalytic platform? *Biochemica et Biophysica Acta (BBA)- Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1547(2), 183-195.
- Castro, K.; Carvalho, A.; Almeida, A.; Oliveira, D.; Borba, H.; Costa, S.; Zingalia, R. (2003). Preliminary in vitro studies on the *Marsypianthes chamaedrys* (boia-caá) extracts at fibrinoclotting induced by snake venoms. *Toxicon*, 41(7), 929-932.
- Cavalcante, W.; Campos, T.; Dal Pai-Silva, M.; Pereira, P.; Oliveira, C.; Soares, A.; Gallacci, M. (2007). Neutralization of snake venom phospholipase A2 toxins by aqueous extract of *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) in mouse neuromuscular preparation. *Journal of Ethnopharmacology*, 112(3), 490-497.
- Cavazos, M.; Treviño Garza, C.; Guajardo-Rodríguez, G.; Hernández-Montelongo, B.; Montes-Tapia, F. (2012). Snake bites in pediatric patients, a current view, in: Öner Özdemir (Ed.), *Complementary Pediatrics. InTech Rijeka*, 123-136.
- Chakraborty, M.; Bhattacharjee, A. (2006). Some common ethnomedicinal uses of various diseases in Purulia district, West Bengal. *Indian Journal of Traditional Knowledge*, 5(4), 554-558.
- Chhetri, D.; Parajuli, P.; Subba, G. (2005). Antidiabetic plants used by Sikkim and Darjeeling Himalayan tribes, India. *Journal of Ethnopharmacology*, 99, 199-202.
- Chiffa, C.; Ricciardi, A. (2011). Plantas medicinales usadas por las comunidades aborígenes del Chaco Argentino. *Ediciones Elemento*, Buenos Aires.
- Chippaux, J. (1998) Snake-Bites: Appraisal of the Global Situation. *Bulletin of the World Health Organization*, 76, 515-524.
- Choudhury, K.; Jadhav, S. (2013). Pharmacological Action of Plant Alkaloids in female Reproductive System of Test Animals and/or Human Beings: A Review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 23(2), 98-107.



- Cintra-Francischinelli, M.; Silva, M.; Andréo-Filho, N.; Gerenutti, M.; Cintra, A.; Giglio, J.; Leite, G.; Cruz-Höfling, M.; Rodrigues-Simioni, L.; Oshima-Franco, Y. (2008). Antibothropic action of *Casearia sylvestris* Sw. (Flacourtiaceae) extracts. *Phytotherapy Research*, 22, 784-790.
- Da Silva, J.; Coppede, J.; Fernandes, V.; Santana, C.; Ticli, F. (2005). Antihemorrhagic, antinucleolytic and other antiophidian properties of the aqueous extract from *Pentaclethra macroloba*. *Journal of Ethnopharmacology*, 100, 145-152.
- Da Silva, J.; Fernandes, R.; Ticli, F.; Oliveira, C.; Mazzi, M. (2007). Triterpenoid saponins, new metalloprotease snake venom inhibitors isolated from *Pentaclethra macroloba*. *Toxicon*, 50; 283-291.
- Da Silva, M.; Marcuss, S.; Fernandes, R.; Pereira, P.; Januário, A.; França, S.; Da Silva, S.; Soares, A.; Lourenço, M. (2012). Anti-snake venom activities of extracts and fractions from callus cultures of *Sapindus saponaria*. *Pharmaceutical Biology*, 50(3); 366-375
- Da Silva, S.; Calgarotto, A.; Chaar, J.; Marangoni, S. (2008). Isolation and characterization of ellagic acid derivatives isolated from *Casearia sylvestris* sw aqueous extract with anti-pla2 activity. *Toxicon*, 52, 655-666.
- Danduga, R.; Siva, K.; Kumar, K.; Vrushabendra, S.; Vijaya, K. (2015). Nephroprotective Activity of *Cissampelos Pareira* Linn. Extract Against Cisplatin Induced Nephrotoxic Rats. *American Journal of Pharmtech Research*, 5(3), 480-488.
- Daniele, J.; Bianco I.; Fidelio, G. (1995). Kinetic and pharmacologic characterization of phospholipases A2 from *Bothrops neuwiedii* venom. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 318, 65-70.
- De Almeida, L.; Cintra, A.; Veronese, E.; Nomizo, A.; Franco, J.; Arantes, E.; Giglio, J.; Vilela Sampaio, S. (2004). Anticrotalic and antitumoral activities of gel filtration fractions of aqueous extract from *Tabernaemontana catharinensis* (Apocynaceae). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 137, 19-27.
- De Freitas M.; Cortes, S.; Thomas, G.; Barbosa Filho, J. (1996) Modification of Ca<sup>2+</sup> metabolism in the rabbit aorta as a mechanism of spasmolytic action of warifteine, a bisbenzylisoquinoline alkaloid isolated from the leaves of *Cissampelos sympodialis* Eichl. (Menispermaceae). *Journal of Pharmacy Pharmacology*, 48, 332-336.
- Dellacassa, E.; Torres, A.; Ricciardi, G.; Camargo, F.; Tressens, S.; Ricciardi, A. (2014). Anti-venom activity of medicinal plants from south America. Chapter 1 in Utilisation and management of medicinal plants Vol. 2. *Daya Publishing House, New Delhi*.
- Dey A. & De J. (2012). Traditional use of plants against snakebite in Indian Subcontinent: a review of the recent literatura. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicine*, 9 (1), 153-174.
- Dey, A.; De, J. (2011). *Aristolochia indica* L.: A review. *Asian Journal of Plant Science*, 10, 108-116.
- Diogo, L.; Fernandes, R.; Marcussi, S.; Menaldo, D.; Roberto, P.; Matrangulo, P.; Pereira, P.; França, S.; Giuliatti, S.; Soares, A.; Lourenço, M. (2009). Inhibition of snake venoms and phospholipases A2 by extracts from native and genetically modified *Eclipta alba*: isolation of active coumestans. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 104, 293-299.

- Don, G. (1831). A General System of Gardening and Botany. Vol.1. *Ed. Longman and Co, London*, 109–112.
- Duke, J.; Bogenschutz-Godwin, M.; Ottesen A. (2009). Duke's Handbook of Medicinal Plants of Latin America. *Ed. Boca Raton, Florida*.
- Esteso, S. (1985) Ofidismo en la República Argentina. *Ed. Arpón. Córdoba, Argentina*.
- Estrada, S.; Jimenez, S.; Alarcon, P.; Vargas, L. (2010). Application of ultrasound in the dissolution of potential antiophidian compounds from two ethanolics extracts of two species of *Heliconias*. *Ultrasonics Sonochemistry*. 17, 756-759.
- Estrada, S.; Quintana, J.; Jiménez, S.; Alarcón, J.; Pereáñez, J.; Vargas, L. (2009). Evaluación fitoquímica preliminar de *Heliconia psittacorum* y *H. rostrata* y de la potencial actividad inhibitoria de algunos de los efectos del veneno de *Bothrops asper* (Mapaná X). *Vitae*, 16, 237-244.
- Fan, H. (2009). Soroterapia. En: Animais Peçonhentos no Brasil. Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes. *Sarvier*. 2º ed. São Paulo. 432-445.
- Fenwick, A.; Gutberlet, R.; Evans, J.; Parkinson, C. (2009). Morphological and molecular evidence for phylogeny and classification of South American pitvipers, genera *Bothrops*, *Bothriopsis*, and *Bothrocophias* (Serpentes: Viperidae). *Zoological Journal of the Linnean Society*, 156, 617-640.
- Fernandes, R.; Costa, T.; Marcussi, S.; Bernardes, C.; Menaldo, D.; Rodríguez Gonzaléz, I.; Pereira, P.; Soares, A. (2011). Neutralization of pharmacological and toxic activities of *Bothrops jararacussu* snake venom and isolated myotoxins by *Serjania erecta* methanolic extract and its fractions. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 17(1), 85-93.
- Fernández, M.; Ortiz, W.; Pereáñez, J.; Martínez, D. (2010). Evaluación de las propiedades antiofídicas del extracto etanólico y fracciones obtenidas de *Renealmia alpinia* (Rottb) Mass (*Zingiberaceae*) cultivada *in vitro*. *Vitae*, 17, 75-82.
- Freund, J. (1956). The mode of action of immunological adjuvants. *Recent Advances in Epidemiological Research in Tuberculosis*, 7:130-48.
- Galicia, E.; Aguilar-Contreras, A.; Aguilar-Santamaria, L.; Roman-Ramos, R.; Chavez-Miranda, A.; Garcia-Vega, L.; Flores-Saenz, J.; Alarcon-Aguilar, F. (2002). Studies on hypoglycemic activity of Mexican medicinal plants. *Proceedings of the Western Pharmacology Society*, 45, 118-124.
- Ganguly, M.; Borthakur, M.; Devi, N.; Mahanta, R. (2007). Antifertility activity of the methanolic leaf extract of *Cissampelos pareira* in female albino rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 111, 688-691.
- Ganguly, M.; Mahanta, R.; Hazarika, J.; Pai, K. (2018). Study of the effect of *Cissampelos pareira* leaf extract on estrous cycle of Albino mice. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 9(2), 64-69.
- García-Denegri, M.; Acosta, O.; Huankahuire-Veja, S.; Martins-de-Souza, D.; Marangoni, S.; Maruñak, S.; Teibler, G.; Leiva, L.; Ponce-Soto, L. (2010). Isolation and functional characterization of a new acidic PLA2 Ba SPII RP4 of the *Bothrops alternatus* snake venom from Argentina. *Toxicon*, 56, 64-74.
- Gay, C.; Sanz, L.; Calvete, J.; Pla, D. (2016) Snake venomomics and antivenomics of *Bothrops diporus*, a medically important pitviper in northeastern Argentina. *Toxins*, 8 (9), 1-13.

- Geoghegan, P.; Angulo, Y.; Cangelosi, A.; Díaz, M.; Lomonte B. (1999). Characterization of a basic phospholipase A2-homologue myotoxin isolated from the venom of the snake *Bothrops neuwiedii* (yarára chica) from Argentina. *Toxicon*, 37; 1735-1746.
- Giorgetti, M.; Rossi, L.; Rodrigues, E. (2011). Brazilian plants with possible action on the central nervous system-a study of historical sources from the 16<sup>th</sup> to 19<sup>th</sup> century. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 21, 537-555.
- Giraud, A.; Arzamendia, V.; Bellini, G.; Bessa, C.; Calamante, C.; Cardozo, G.; Chiaraviglio, M.; Costanzo, B.; Etchepare, E.; Di Cola, V.; Di Pietro, D.; Kretzschmar, S.; Nenda, S.; Rivera, P.; Rodríguez, M.; Scrocchi, G.; Williams, J. (2012). Categorización del estado de conservación de las Serpientes de la República Argentina. *Cuadernos de Herpetología*, 26, 303-326.
- Giraud, A.; Arzamendia, V.; Lopez, S.; Quaini, R.; Prieto, Y.; Leiva, L.; Regner, S.; Urban, J. (2008). Serpientes venenosas de Santa Fe. La problemática del ofidismo en la región Nordeste de Argentina: conocimientos sobre su historia natural aplicados para la prevención de ofidismo. *Revista de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas*, 12, 69-89.
- González Torres, D. (1997). Catálogo de Plantas Medicinales (y alimenticias y útiles) Usadas en Paraguay. Asunción.
- Granda-Lorenzo, M.; Fuentes-Fiallo V. (1991) El género *Cissampelos* L. en Cuba. *Revista del Jardín Botánico Nacional*, 12, 35-42.
- Gul, M.; Chandrasekaran, S.; Bhat, M.; Maurya, B.; Qureshi, I.; Ghazi, I. (2016). Antioxidant and enzyme inhibitory activities of *Cissampelos pareira* L. leaf extracts. *Annals of Phytomedicine*, 5(1), 91-98.
- Gupta, A.; Pandey, S.; Shah, D.; Seth, N.; Yadav, J. (2011). Pharmacognostical and phytochemical evaluation of leaves of *Cissampelos pareira*. *Pharmacognosy Journal*, 3, 25-28.
- Gutierrez, J. (2002). Comprendiendo los venenos de serpientes: 50 años de investigaciones en América Latina. *Revista de Biología Tropical*, 50, 377-394.
- Haas, A.; De Roodt, A.; Orduna, T. (2014). Guía de Prevención, Diagnóstico, Tratamiento y Vigilancia Epidemiológica de los Envenenamientos Ofídicos. 1ra ed. Ministerio de Salud de la Nación. Programa Nacional de Prevención y Control de las Intoxicaciones. Buenos Aires.
- Haq, F.; Ahmad, H.; Alam, M. (2011). Traditional uses of medicinal plants of Nandiar Khuwarrcatchment (District Battagram), Pakistan. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5, 39-48.
- Heinrich, M.; Haller, B.; Leonti, M. (2014). A perspective on natural products research and ethnopharmacology in Mexico: the eagle and the serpent on the pricklypear *Cactus*. *Journal of Natural Products*, 77, 678-689.
- Hoge, A. & Romano, S. (1973) (dated 1972). Sinopse das serpentes peçonhentas do Brasil. Serpentes, Elapidae e Viperidae. *Memorias do. Instituto Butantan*, 36, 109-207.
- Houghton P. (1993). *In vitro* testing of some West African and Indian plants used to treat snakebites. *Médicament et nutrition: L'approche ethnopharmacologique 2. Colloque Européen d'Ethnopharmacologie*. 263-274.
- Izidoro, L.; Rodrigues, V.; Rodrigues, R.; Ferro, R.; Hamaguchi, A.; Giglio, J.; Homsí-Bradeburgo, M. (2003). Neutralization of some hematological and hemostatic alterations induced by neuwiedase, a

- metalloproteinase isolated from *Bothrops neuwiedi pauloensis* snake venom, by the aqueous extract from *Casearia mariquitensis* (Flacourtiaceae). *Biochimie*, 85, 669-675.
- Jabeen, A.; Khan, M.; Ahmad, M.; Zafar, M.; Ahmad, F. (2009). Indigenous uses of economically important flora of Margallah Hills National Park, Islamabad, Pakistan. *African Journal of Biotechnology*, 8(5), 763-784.
- Jain, A.; Katewa, S.; Galav, P.; Sharma, P. (2005). Medicinal plant diversity of Sitamata wild life sanctuary, Rajasthan, India. *Journal of Ethnopharmacology*, 102, 143-157.
- Januario, A.; Santos, S.; Marcussia, S.; Mazzib, M.; Pietro, R.; Sato, D.; Ellena, J.; Sampaio, S.; França, S.; Soares, A. (2004). Neo-clerodane diterpenoid, a new metalloprotease snake venom inhibitor from *Baccharis trimera* (Asteraceae): anti-proteolytic and anti-hemorrhagic properties. *Chemico-Biological Interactions*, 150, 243-251.
- Jhuma, S.; Snehendu B.; Chand, R.; Navis, S. (2014). Stem of *Cissampelos pareira*: A noble herbal resource of antifertility agents. *Journal of Pharmacy Research*, 8(3), 352-58.
- Jolis, J. (1972). Ensayo sobre la historia natural del Gran Chaco. *Faenza 1789*, Traducción de Ma. L. Acuña, edición UNNE (Resistencia).
- Jorge, M.; Ribeiro, L. (2000). Envenoming by the South American pit viper *Bothrops neuwiedi* Wagler. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 94, 731-734.
- Jorge, M.; Ribeiro, L.; Ribeiro Da Silva, M.; Kusano, E.; Mendonça, J. (1994). Microbiological studies of abscesses complicating *Bothrops* snakebite in humans: a prospective study. *Toxicon*, 32, 743-748.
- Jorge, M.; Silva de Mendonça, J.; Ribeiro L.; Ribeiro Da Silva, M.; Rusano, E.; Cordeiro, C. (1990). Flora bacteriana da cavidade oral, presas e veneno de *Bothrops jararaca*: possível fonte de infecção no local da picada. *Revista del Instituto de Medicina Tropical*, 32, 6-10.
- Kakrani, H.; Saluja, A. (2002). Traditional treatment of gastrointestinal tract disorders in Kutch district, Gujaratstate, India. *Journal of Natural Remedies*, 2, 71-75.
- Kaur, A.; Nain, P.; Nain, J. (2012). Herbal plants used in treatment of rheumatoid arthritis: a review. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 4, 44-57.
- Kohler, H.; Grant, P. (2000). Plasminogen activator inhibitor type 1 and coronary artery disease. Review article. *The New England Journal of Medicine*, 342(24), 1792-1801.
- Koscinczuk, P.; Borda, J.; Maruñak, S.; Acosta de Pérez, O.; Mussart de Coppo, N. (2004). Daño renal en ratas inducido por veneno de *Bothrops neuwiedii diporus* de Argentina. *Medicina*, 64, 320-324.
- Kufer, J.; Forther, H.; Poll, E.; Heinrich, M. (2005). Historical and modern medicinal plant uses – the example of the Ch'orti' Maya and Ladinosin Eastern Guatemala. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 57, 1127-1152.
- Kuldeep, S.; Narayan, P.; Karuna, S.; Shiny, C.; Nidhi, M.; Priyam, Sinha. (2013). Assessment of antidiabetic potential of *Cissampelos pareira* leaf extract in streptozotocin-nicotinamide induced diabetic mice. *Journal of Pharmacy Reserch*, 6, 874-878.
- Kumar, V.; Chauhan, N.; Padh, H.; Rajani, M. (2006). Search for antibacterial and antifungal agents from selected Indian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 107, 182-188.
- Leonti, M.; Vibrans, H.; Sticher, O.; Heinrich, M. (2001). Ethnopharmacology of the Popoluca, Mexico: an evaluation. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 53, 1653-1669.

- Lobo, T.; Pereañez, J.; Zapata, K.; Gutiérrez, P.; Londoño, M.; Núñez, V.; Rojano, B. (2010). Actividad inhibitoria de *Murraya paniculata* contra fosfolipasas A2 miotóxicas. *Vitae*, 17, 291-298.
- Lomonte, B. & Gutiérrez, J. (1983). La actividad proteolítica de los venenos de serpientes de Costa Rica sobre la caseína. *Revista de Biología Tropical*, 31, 37-40.
- López-Sáez, J.; Pérez-Soto, J. (2009). Plantas alexitéricas: antídotos vegetales contra las picaduras de serpientes venenosas. *Nature Medicine*, 3, 17-24.
- Mabberley, D. (2008). Mabberley's Plant Book: a portable dictionary of plants, their classification and uses. 3rd ed. *Cambridge University Press*. 1021.
- Magalhães, A.; Barbosa dos Santos, G.; Dos Santos Verdam, M.; Fraport, L.; Malheiroa, A.; Silva Lima, E.; Dos-Santos, M. (2011). Inhibition of the inflammatory and coagulant action of *Bothrops atrox* venom by the plant species *Marsypianthes chamaedrys*. *Journal of Ethnopharmacology*, 134, 82-88.
- Maiorano, V.; Marcussi, S.; Daher, M.; Oliveira, C.; Couto, I.; Gomes, O.; França, S.; Soares, A.; Pereira, P. (2005). Antiophidian properties of the aqueous extract of *Mikania glomerata*. *Journal of Ethnopharmacology*, 102, 364-370.
- Makhija, I.; Khamar, D. (2010). Anti-snake venom properties of medicinal plants. *Der Pharmacia Lettre*, 2, 399-411.
- Manfred, L. (1977). 7000 Recetas botánicas a base de plantas medicinales. 11a ed. *Editorial Kier*, Buenos Aires.
- Markland, F.; Swenson, S. (2013). Snake venom metalloproteinases. *Toxicon*, 62, 3-18.
- Martino, O.; Orduna, T. (1993). Patología cutánea ponzoñosa e infecciosa provocada por agresiones de animales. Centro Municipal de Patología Regional Argentina y Medicina Tropical. Hospital F.J. Muñiz. Premio Humberto R. Rugiero. Asociación Médica Argentina. *Edición de los Autores*, Buenos Aires.
- Maruñak, S.; Núñez S.; Fernández, C.; Leiva L.; Acosta de Pérez, O. (2010). Acción del veneno de *Bothrops diporus* (yarára chica) del nordeste argentino sobre la hemostasia en diferentes mamíferos. *Revista Veterinaria*, 21, 43-47.
- Melo, P.; Do Nascimento, M.; Mors, W.; Suarez Kurtz, G. (1994). Inhibition of the myotoxic and hemorrhagic activities of crotalid venoms by *Eclipta prostrata* (Asteraceae) extracts and constituents. *Toxicon*, 32, 595-603.
- Melo, P.; Mors, W.; Nascimento, M.; Suarez-Kurtz, G. (1989). Antagonism of the myotoxic and hemorrhagic effects of crotalide venoms by *Eclipta prostrata* extracts and constituents. *European Journal of Pharmacology*, 27, 1003-1009.
- Mendes, F.; Carlini, E. (2007). Brazilian plants as possible adaptogens: an ethnopharmacological survey of books edited in Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*, 109, 493-500.
- Mendes, M.; Oliveira, C.; Lopes, D.; Vale, L.; Alcantara, T. (2008). Anti-snake venom properties of *Schizolobium parahyba* (Caesalpinoideae) aqueous leaves extract. *Phytotherapy Research*, 22, 859-866.
- Méndez M.; Riet C. (1995). Snakebite in sheep. *Veterinary and Human Toxicology*, 37, 62-63.

- Meng, X.; Riordan, N.; Casciari, J.; Zhu, Y.; Zhong, J.; González, M. (2002). Effects of a high molecular mass *Convolvulus arvensis* extract on tumor growth and angiogenesis. *Puerto Rico Health Sciences Journal*, 21, 323-328.
- Ministerio de Salud de la Nación. (2007). Prevención, diagnóstico, tratamiento y vigilancia epidemiológica de envenenamiento ofídico.
- Miranda, C.; Gomes, M.; Marcussi, S.; Cardoso M.; Mansanares, M. (2014) Preliminary assessment of *Hedychium coronarium* essential oil on fibrinogenolytic and coagulant activity induced by *Bothrops* and *Lachesis* snake venoms. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, 20(1), 39. DOI: 10.1186/1678-9199-20-39.
- Mishra, S. & Bafna, A. (2010). Antioxidant and immunomodulatory activity of the alkaloidal fraction of *Cissampelos pareira* Linn. *Scientia Pharmaceutica*, 78(1), 21-31.
- Montenegro P. (1979 - Reedición 2007). *Materia Médica Misionera*. Editorial Universitaria, Universidad Nacional de Misiones.
- Morita, H.; Matsumoto, K.; Takeya, K.; Itokawa, H.; Iitaka, Y. (1993). Structures and solid state tautomeric forms of two novel antileukemic tropoloisoquinoline alkaloids, pareirubrines A and B, from *Cissampelos pareira*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 41(8), 1418-1422.
- Mors, W.; Do Nascimento, M.; Parente, J.; Da Silva, M.; Melo, P.; Suarez-Kurtz, G. (1989). Neutralization of lethal and myotoxic actives of South American rattlesnake venom by extracts and constituents of the plants *Eclipta prostrata* (Asteraceae). *Toxin*, 27, 1003-1009.
- Mors, W.; Do Nascimento, M.; Ruppelt Pereira, B.; Alvares Pereira, N. (2000). Plant natural products active against snake bite- the molecular approach. *Phytochemistry*, 55, 627-642.
- Morten, J. (1981). *Atlas of medicinal plants of Middle America*. Charles C. Ed. Thomas publishers. Springfield, IL.
- Mourão de Moura, V.; Freitas de Sousa, L.; Almeida Raposo, J.; Evangelista Lima A.; Oliveira Bezerra de Oliveira, R.; Veras Mourao, R.; Dos-Santos, M.; Da Silva Nascimento, M. (2015). Plants used to treat snakebites in Santarem, western Para, Brazil: an assessment of their effectiveness in inhibiting hemorrhagic activity induced by *Bothrops jararaca* venom. *Journal of Ethnopharmacology*, 16(1), 224-232.
- Mourão de Moura, V.; Serra Bezerra, A.; Veras Mourão, R.; Varjão Lameiras, J.; Almeida Raposo, J.; Luckwu de Sousa, R.; Boechat, A.; Bezerra de Oliveira, R.; Menezes Chalkidis, H.; Dos-Santos, M. (2014). A comparison of the ability of *Bellucia dichotoma* Cogn. (Melastomataceae) extract to inhibit the local effects of *Bothrops atrox* venom when pre-incubated and when used according to traditional methods. *Toxicon*, 85, 59-68
- Mourão de Moura, V.; Sousa, L.; Bezerra de Oliveira, R.; Moura Da Silva, A.; Menezes Chalkidis, H.; Nascimento; Da Silva, M.; Pacheco, S.; Veras Mourão, R. (2013). Inhibition of the principal enzymatic and biological effects of the crude venom of *Bothrops atrox* by plant extracts. *Journal of Medicinal Plants Research*, 7(31), 2330-2337.
- Mukherjee, H. (2009). *Evaluation of Herbal Medicinal Products. Perspectives on quality, safety and efficacy*. Pharmaceutical Press, Grayslake.

- Nagarajan, K.; Chauhan, N.; Mittal, A.; Singh, V.; Bodla, R.; Tiwari, R. (2011). Phytochemical extraction, optimization and physicochemical characterization of two bioactive isolates from the leaves and stem of *Cissampelos pareira*. *Der Pharma Chemica*, 3, 327-337.
- Namsa, N.; Mandal, M.; Tangjang, S. (2011). Anti-malarial herbal remedies of northeast India, Assam: an ethnobotanical survey. *Journal of Ethnopharmacology*, 133, 565-572.
- Napimoga, M.; Yatsuda, R. (2010). Scientific evidence for *Mikania laevigata* and *Mikania glomerata* as a pharmacological tool. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 62, 809-820.
- Nazato, V.; Rubem-Mauro, L.; Vieira N.; Rocha, D.; Silva, M. (2010). *In vitro* antiophidian properties of *Dipteryx alata vogel* bark extracts. *Molecules*, 15, 5956-5970.
- Nishijima, C.; Rodrigues, C.; Silva, M.; Lopes-Ferreira, M.; Vilegas, W.; Hiruma-Lima, C. (2009). Anti-hemorrhagic activity of four brazilian vegetable species against *Bothrops jararaca* venom. *Molecules*, 14, 1072-1080.
- Nunez, V.; Castro, V.; Murillo, R.; Ponce-Soto, L.; Merfort, I.; Lomonte, B. (2005). Inhibitory effects of *Piper umbellatum* and *Piper peltatum* extracts towards myotoxic phospholipases A2 from *Bothrops* snake venoms: Isolation of 4-nerolidylcatechol as active principle. *Phytochemistry*, 66, 1017-1025.
- Ohler, M.; Georgieva, D.; Seifert, J.; Von Bergen, M.; Arni, R.; Genov N.; Betzel, C. (2010). The venomics of *Bothrops alternatus* is a pool of acidic proteins with predominant hemorrhagic and coagulopathic activities. *Proteome*, 9, 2422-2437.
- Oliveira, C.; Maiorano, V.; Marcussi, S.; Sant'Ana, C.; Januário, A.; Lourenço, M.; Sampaio, S.; França, S.; Pereira, P.; Soares, A. (2005). Anticoagulant and antifibrinogenolytic properties of the aqueous extract from *Bauhinia forficata* against snake venoms. *Journal of Ethnopharmacology*, 98(1-2), 213-216.
- Oliveira, J.; Montes de Oca, H.; Duarte, M.; Diniz, C.; Fortes-Dias, C. (2002). Toxicity of South American snake venoms measured by an in vitro cell culture assay. *Toxicon*, 40: 321-325.
- Ortiz, R. & Nee, M. (2014). A new species of *Cissampelos* (Menispermaceae) from Bolivia and Paraguay. *Phytokeys*, 38, 89-99.
- Oshima-Franco, Y.; Alves, C.; Andréo Filho N.; Gerenutti, M.; Cintra A.; Leite, G.; Rodrigues-Simioni, L.; Silva M. (2005). Neutralization of the neuromuscular activity of bothropstoxin-I, a myotoxin from *Bothrops jararacussu* snake venom, by a hydroalcoholic extract of *Casearia sylvestris* Sw. (guaçatonga). *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 11, 465-478.
- Otero, R.; Fonnegra, R.; Jiménez, S.; Núñez, V.; Evans, N.; Alzate, S.; García M.; Saldarriaga, M.; Del Valle, G.; Osorio, R.; Díaz, A.; Valderrama, R.; Duque, A.; Vélez, H. (2000). Snakebites and ethnobotany in the northwest región of Colombia Part. I: Traditional use of plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 71, 493-504.
- Padmani, S.; Prabodh, S.; Gopalakrishna, B. (2012). Investigation of *in vitro* anthelmintic activity of *Cissampelos pareira* Linn against *pheretima posthuma*. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 3(1), 265-267.
- Patnaik, G.; Pradhan, S.; Vohra, M. (1973) Effects of hayatin methochloride and (+)-tubocurarine chloride on autonomic ganglia of cats. *Indian Journal of Experimental Biology*, 11, 89-94.

- Pattanaik, C.; Sudhakar Reddy, C.; Murthy, M. (2008). An ethnobotanical survey of medicinal plants used by the Didayi tribe of Malkangiri district of Orissa, India. *Fitoterapia*, 79, 67-71.
- Peña-Chocarro, M. & De Egea J. (2015). New records of the genus *Cissampelos* (Menispermaceae) for the flora of Argentina. *Bonplandia*, 24(1): 37-42.
- Pereañez, J.; Jiménez, S.; Quintana, J.; Nuñez, V.; Fernandez, 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*. 15, 157-164.
- Pereira, I.; Barbosa, A.; Salvador, M.; Soares, A.; Ribeiro, W.; Cogo, J.; Zamunes, S. (2009). Anti-inflammatory activity of *Blutaparon portulacoides* ethanolic extract against the inflammatory reaction induced by *Bothrops jararacussu* venom and isolated myotoxins Bth tx-i and ii. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 15, 527-545.
- Pérez, E.; Carbajal, A.; Rivas, H. (2009) Serpientes venenosas, reconocimiento y tratamiento general de su mordedura. *Revista Mexicana de Investigación Educativa*, 1(3), 8-18.
- Piero, N.; Eliud, N.; Susan, K.; George, O.; Murugi, N.; David, M.; Sakyi, A.; Peter, G.; Stanley K.; Joseph, N. (2015). *In vivo* antidiabetic activity and safety in rats of *Cissampelos pareira* traditionally used in the management of Diabetes Mellitus in Embu country, Kenya. *Drug Metabolism & Toxicology*, 6(3), 1-11.
- Pithayanukul, P.; Laovachirasuwan, S.; Bavovada, R.; Pakmanee, N.; Suttisri, R. (2004). Anti-venom potential of butanolic extract of *Eclipta prostrata* against Malayan pit viper venom. *Journal of Ethnopharmacology*, 90, 347-352.
- Pramodinee, D.; Mahesh, M.; Niranjana, D.; Poornima, S. (2011). Memory enhancing activity of *Cissampelos pareira* in mice. *International journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 3(2), 206-2011.
- Priyanka, T. (2013) Effect of *Cissampelos pareira* leaves on anxiety-like behavior in experimental animals. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 3(3), 188-193.
- Puebla, P.; Oshima-Franco, Y.; Franco, L.; Santos, M.; Silva, R.; Rubem-Mauro, L.; San Feliciano, A. (2010). Chemical constituents of the bark of *Dipteryx alata* Vogel, an active species against *Bothrops jararacussu* venom. *Molecules*, 15, 8193-8204.
- Rajan, S.; Jayendran, M.; Sethuraman, M. (2003). Medico-ethnobotany: a study on the Kattunayakatribe of Nilgiri hills, Tamil Nadu. *Journal of Natural Remedies*, 3, 68-72.
- Rajan, S.; Sethuraman, M.; Mukherjee, P. (2002). Ethnobiology of the Nilgiri Hills, India. *Phytotherapy Research*, 16, 98-116.
- Ramasubramaniam, R.; Badu, N. (2010). Anti helminthic studies and medicinal herbs-an overview. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 5, 39-47.
- Ramos-Hernandez, M., Avila-Bello, C., Morales-Mávil, J. (2007). Etnobotánica y ecología de plantas utilizadas por tres curanderos contra la mordedura de serpientes en la región de Acayucan, Veracruz, México. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, 81, 91-102.
- Raslan, D.; Jamal, C.; Duarte, D.; Borges, M.; De Lima, M. (2002). Anti-PLA2 action test of *Casearia sylvestris* Sw. *Bollettino chimico farmaceutico*, 141(6), 457-460.



- Reyes-Chilpa, R.; Jiménez-Estrada, M. (1995). Química de las plantas alexíteras. *Interciencia*, 20, 257-263.
- Reza, H.; Shohel, M.; Aziz, S.; Pinaz, F.; Uddin, M.; Amin, M.; Khan, I.; Jain, P. (2014). Phytochemical and pharmacological investigation of ethanol extract of *Cissampelos pareira*. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 76(5), 455-458.
- Rhodes, D. (1975). A revision of the genus *Cissampelos*. *Phytologia*, 30, 415-483.
- Ricciardi A., Caballero E., Chifa C. (1996). Identificación botánica de plantas descriptas en “Materia Médica Misionera” usadas en accidentes ofídicos. *Rojasiana*, 3(2), 239-245.
- Ricciardi, A. (1999). Intoxicación por venenos animales. Ofidismo. Apuntes teóricos de la Cátedra de Toxicología y Química Legal UNNE. Corrientes, Argentina.
- Ricciardi, A. (2005). Plantas con tradición de uso como alexíteras en la medicina popular. Conferencia del Curso de Actualización y Perfeccionamiento para graduados *Vegetales de importancia médica y Toxicológica. Control, Legislación y Fiscalización*. Confederación Farmacéutica Argentina y Asociación Amigos del Museo de Farmacobotánica; Buenos Aires, Argentina.
- Ricciardi, A.; Torres, A.; Camargo, F.; Soler, V. (2010). Ofidismo, araneísmo, escorpionismo, intoxicación por venenos animales. *Jornadas de accidente ofídico, arácnido y escorpiónico* Organizada por el Centro de Salud de Margarita Belén (Pcia. del Chaco).
- Ricciardi-Verrastro, B.; Torres, A.; Ricciardi, G.; Teibler, P.; Maruñak, S.; Barnaba, C.; Larcher, R.; Nicolini, G.; Dellacassa, E. (2018). The effects of *Cissampelos pareira* extract on envenomation induced by *Bothrops diporus* snake venom. *Journal of Ethnopharmacology*, 212, 36-42.
- Rodrigues, V.; Soares, A.; Mancin, A.; Fontes, M.; Homsí-Brandeburgo, M.; Giglio, J. (1998). Geographic variations in the composition of myotoxins from *Bothrops neuwiedii* snake venoms: biochemical characterization and biological activity. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 121, 215-22.
- Rosenfeld, G. (1971). Symptomatology, pathology and treatment of snake bites in South America. En Bücherl, W., Buckley E. y Deulofeu, V. (eds.). *Venomous animals and their venoms. Academic Press*, 2, 345-383.
- Rukunga, G.; Gathirwa, J.; Omar, S.; Muregi, F.; Muthaura, C.; Kirira, P.; Mungai, G. ; Kofi-Tsekpo, W. (2009). Anti-plasmodial activity of the extracts of some Kenyan medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 121, 282-285.
- Salazar, A.; Pereañez, J.; Quintana, J.; Jiménez, S.; Rey, J. (2009). Análisis fitoquímico preliminar e inhibición de los efectos hemolíticos, proteolítico y coagulante del veneno de *Bothrops asper* (mapaná) con extractos etanólicos obtenidos del aguacate (*Persea americana* Mill. var. Hass). Lauraceae, *III Congreso Latinoamericano del aguacate*.
- Samanta, J.; Bhattacharya, S. (2011). *Cissampelos pareira*: a promising antifertility agent. *International Journal of Research in Ayurveda and Pharmacy*, 2, 439-442.
- Samy, R.; Thwin, M.; Gopalakrishnakone, P.; Ignacimuthu, S. (2008). Ethnobotanical survey of folk plants for the treatment of snakebites in Southern part of Tamilnadu, India. *Journal of Ethnopharmacology*, 115, 302-312.

- Sánchez-Medina, A.; García-Sosa, F.; May-Pat L.; Peña-Rodríguez, M. (2001). Evaluation of biological activity of crude extracts from plants used in Yucatecan Traditional Medicine Part I. Antioxidant, antimicrobial and  $\beta$ -glucosidase inhibition activities. *Phytomedicin*, 8(2), 144-151.
- Sankaranarayanan, S.; Bama, P.; Ramachandran, J.; Kalaichelvan, P.; Deccaraman, M.; Vijayalakshimi, M.; Dhamotharan, R.; Dananjeyan, B.; SathyaBama S. (2010). Ethnobotanical study of medicinal plants used by traditional users in Villupuram district of Tamil Nadu, India. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(12), 1089-1101.
- Saravia-Otten, P.; Hernández, R.; Gutiérrez, J.; Mérida, M.; Cáceres, A. (2015). Evaluación de la capacidad neutralizante de extractos de plantas de uso popular en Guatemala como antídotos para el envenenamiento por la mordedura de *Bothrops asper*. *Ciencia, Tecnología y Salud*, 2 (1), 25-37.
- Sayana, S.; Tambi, C.; Medabala, T.; Praveen, S. (2011). Study of diuretic activity of ethonolic extract of leaves of *Cissampelos pareira* in rats. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 7(4), 157-159.
- Semwal, D.; Semwal, R.; Vermaak I.; Viljoen, A. (2014) From arrow poison to herbal medicinal – The ethnobotanical, phytochemical and pharmacological significance of *Cissampelos* (Menispermaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 155, 1011-1028.
- Sharma, J.; Gairola, S.; Gaur, R.; Painuli, R. (2012). The treatment of jaundice with medicinal plants in indigenous communities of the sub-Himalayan region of Uttarakhand, India. *Journal of Ethnopharmacology*, 143, 262-291.
- Sharma, P.; Chauhan, N.; Lal, B. (2004). Observations on the traditional phytotherapy among the inhabitants of Parvatalley in western Himalaya, India. *Journal of Ethnopharmacology*, 92, 167-176.
- Singh, B.; Pillai, K.; Kohli, K.; Haque, S. (2013). Effect of *C. pareira* root on isoproterenol-induced cardiac dysfunction. *Journal of Natural Medicines*, 67, 51-60.
- Singthong, J.; Ningsanond, S.; Cui, S.; Douglas Goff, H. (2005). Extraction and physicochemical characterization of Kureo Ma Noy pectin. *Food Hydrocolloids*, 19, 793-801.
- Soler, D.; Rodriguez, D. (2006). Aspectos toxicológicos y clínicos de la mordedura por serpientes venenosas en animales domésticos. *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia*, 53, 105-115.
- Sood, R.; Raut, R.; Tyagi, P.; Pareek, P.; Barman, T.; Singhal, S.; Shirumalla, R.; Kanoje, V.; Subbarayan, R.; Rajerethinam, R.; Sharma, N.; Kanaujia, A.; Shukla, G.; Gupta, Y.; Katiyar, C.; Bhatnagar, P.; Upadhyay, D.; Swaminathan, S.; Khanna, N. (2015). *Cissampelos pareira* Linn: Natural Source of Potent Antiviral Activity against All Four Dengue Virus Serotypes. *Public Library of Science - Neglected Tropical Diseases*, 9(12), DOI: 10.1371/journal.pntd.0004255
- Speroni, J. (1994). Ofidismo. Centro de Estudios e Investigaciones Herpetológicas. Consultado en <http://ceih.org/Archives/Ofidismo.php>
- Stevens, P. (2001 onwards). Angiosperm Phylogeny Website. Version 9, June 2008 <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>. Acceso: junio 2009.

- Surendran, S.; Eswaran, M.; Vijayakumar, M.; Rao, C. (2011). In vitro and in vivo hepatoprotective activity of *Cissampelos pareira* against carbon-tetrachloride induced hepatic damage. *Indian Journal of Experimental Biology*, 49(12), 939-45.
- Tamaio, N.; Joffily, A.; Braga, J.; Rajput, K. (2010). Stem anatomy and pattern of secondary growth in some herbaceous vine species of Menispermaceae. *Journal of the Torrey Botanical Society*, 137, 157-165.
- Tans, G. & Rosing, J. (2001). Snake venom activators of factor X: an overview. *Haemostasis*, 31, 225-233.
- Teibler, P.; Bustillo, S.; Dubiel, C.; Bogado, E.; Maruñak, S. (2017). Daño vascular inducido en el pie equino por veneno de la serpiente *Bothrops diporus*. *Revista Veterinaria*, 28(1), 41-46.
- Thavamani, S.; Mathew, M.; Dhanabal, S. (2014). Anticancer activity of *Cissampelos pareira* against Dalton's lymphoma ascites bearing mice. *Pharmacognosy magazine*, 10(39), 200-206.
- Ticli, F.; Hage, L.; Cambraia, R.; Pereira, P.; Magro, A. (2005). Rosmarinic acid, a new snake venom phospholipase A2 inhibitor from *Cordia verbenacea* (Boraginaceae): antiserum action potentiation and molecular interaction. *Toxicon*, 46, 318-327.
- Torres, A. (2011). Caracterización quimiotaxonómica de especies pertenecientes al género *Nectandra* en el Nordeste Argentino. Evaluación de su potencial actividad antiveneno en accidentes provocados por *Bothrops neuwiedi diporus* (cope) "yará chica". Tesis doctoral. *Universidad Nacional del Nordeste*.
- Torres, A.; Camargo, F.; Ricciardi, G.; Dellacasa, E.; Ricciardi, A. (2007). Study of antihemolytic activity of *Cissampelos pareira* extract against poison of *Bothrops neuwiedi diporus* (COPE) (yará chica). *Boletín Latinoamericano de plantas Medicinales y Aromáticas*, 6 (5), 280-284.
- Torres, A.; Camargo, F.; Ricciardi Verrastro, B.; Ricciardi, G.; Dellacassa, E. (2015) Plantas como antiveneno: del mito al logos. *Ediciones Universitarias. Unidad de Comunicación de la Universidad de la República (UCUR)*, Montevideo, Uruguay.
- Uetz, P. (2018). The Reptile Database. <http://www.reptile-database.org>, consultado en diciembre de 2018.
- Usubillaga, A.; Khouri, N.; Cedillo-Vaz, S.; Yibirin, E. (2005). Anti-snake venom effect of *Aristolochia odoratissima* L. aqueous extract on mice, III wocmap: *Perspectives in Natural Product Chemistry*, 3, 85-89.
- Vale, L.; Mendes, M.; Hamaguchi, A.; Soares, A.; Rodrigues, V.; Homs-Brandeburgo, M. (2008). Neutralization of pharmacological and toxic activities of *Bothrops* snake venoms by *Schizolobium parahyba* (Fabaceae) aqueous extract and its fractions. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 103, 104-107.
- Vardhanabhuti, B.; Ikeda, S. (2006). Isolation and characterization of hydrocolloids from monoi (*Cissampelos pareira*) leaves. *Food Hydrocolloids*, 20, 885-891.
- Veronese, E.; Esmeraldino, L.; Trombone, A.; Santana, A.; Bechara, G.; Kettelhut, I.; Cintra, A.; Giglio, J.; Sampaio, S. (2005). Inhibition of the myotoxic activity of *Bothrops jararacussu* venom and its two major myotoxins, bthtx-i and bthtx-ii, by the aqueous extract of *Tabernaemontana catharinensis* a. dc. (Apocynaceae). *Phytomedicine*. 12, 123-130.

- Wipawee, T.; Jintanaporn, W. (2012). Evaluation of safety and protective effect of combined extract of *Cissampelos pareira* and *Anethum graveolens* (PM52) against age-related cognitive impairment. *Evidence Based Complementary and Alternative Medicine*, 1-10.
- World Health Organization (WHO). (2015). Investing to Overcome the Global Impact of Neglected Tropical Diseases: 3rd WHO Report on Neglected Tropical Diseases.
- Wüster, W.; Salomão, M.; Quijada-Mascareñas, J.; Thorpe, R. (2002). Origins and evolution of the South American pitvipers fauna: evidence from mitochondrial DNA sequence analysis. *Biology of Vipers*. 111-129.
- Zuloaga, F.; Belgrano M. (2014). Catálogo de las Plantas Vasculares del Cono Sur. Disponible en <http://www.darwin.edu.ar/Proyectos/FloraArgentina/FA.htm>. [Acceso: 10-octubre-2014]
- Zuloaga, F.; Morrone O.; Belgrano M. (2008). Catálogo de las Plantas Vasculares del Cono Sur (Argentina, Sur de Brasil, Chile, Paraguay, y Uruguay). Volumen III. *Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden*. 107, 2413-2424.



# **CAPÍTULO 2:**

## **Objetivos e Hipótesis**

*El científico no es quien da las respuestas correctas,  
sino quien hace las preguntas correctas.-  
Claude Lévi-Strauss*



## **1. Objetivos generales**

### **1.1 De formación**

✓ Perfeccionar mi formación académica, completándola tanto en conocimientos específicos, como en aquellos culturales, epistemológicos y metodológicos que tiendan a integrar mi formación.

### **1.2 Científicos**

✓ Desarrollar el conocimiento y aplicación de los metabolitos secundarios presentes, sus estructuras y su evolución en relación con factores intrínsecos y extrínsecos;

✓ Contribuir al conocimiento fitoquímico y quimiotaxonómico de especies autóctonas regionales, específicamente del género *Cissampelos*, dada su importancia etnofarmacológica, mediante el estudio de la expresión de su metabolismo secundario;

✓ Investigar la interacción de extractos de la especie *Cissampelos pareira*, y sus constituyentes, con venenos animales;

✓ Comprobar, por medio de técnicas de validez reconocida, la actividad neutralizante que la medicina tradicional le atribuye a la especie *C. pareira*;

✓ Investigar la interacción de extractos de la especie *C. pareira*, y sus constituyentes, con microorganismos patógenos (actividad antimicrobiana);

✓ Establecer la base de conocimiento necesario para el desarrollo de nuevos fitofármacos con actividad comprobada.

### **1.3 Académicos**

✓ Incorporar nuevos conocimientos y metodologías a mi formación que permitan, a la vez, fortalecer el grupo de investigación al que pertenezco;

✓ Desarrollar las técnicas instrumentales que se requieran para el mejor desarrollo y adecuación al tema del trabajo;

✓ Volcar a la docencia e investigación los conocimientos adquiridos.

Para alcanzar los objetivos expuestos se pretende estudiar:

✓ La evolución del metabolismo secundario en los distintos estados de crecimiento vegetativo y las variaciones estacionales o ecológicas existentes;

✓ La interacción de diferentes extractos obtenidos con el veneno de *Bothrops diporus* (yarára chica).



✓ La interacción de los diferentes extractos obtenidos con microorganismos patógenos (bacterias).

## 2. Hipótesis

Mediante el desarrollo del plan de tesis se pretenden validar las siguientes hipótesis de trabajo:

✓ La tradición de uso de *Cissampelos pareira* como planta alexitérica data de la época de la colonia, fue transmitida ancestralmente en forma oral y escrita por primera vez por los Padres Jesuitas, sin embargo, se carece de fundamentación científica que valide este uso;

✓ Popularmente el uso de estas especies se hace en forma de polvos, cataplasmas o dadas en vino o licor, por lo que debería esperarse que la mayor actividad alexitérica la presente el extracto alcohólico;

✓ En nuestra región son importantes los accidentes por víboras del género *Bothrops* “yará” y *Crotalus* “cascabel”, por lo que se espera que este género vegetal tenga actividad contra el veneno de alguna de ellas;

✓ La actividad alexitérica y antimicrobiana depende de la metabolómica de la especie vegetal, por lo cual dependerán del estado vegetativo de la misma.

# **CAPÍTULO 3:**

## **Actividad Alexítera**

*Hay un libro abierto para todos los ojos: la naturaleza.-  
Jacques Rousseau*



**3a:**  
**Ensayos *in vitro***



## **1. Introducción**

Desde tiempos inmemoriales las plantas han sido la mayor fuente de medicamentos naturales. El estudio de la tradición de su empleo, y particularmente como alexitéricas, se ha mantenido entre las distintas etnias aborígenes y ha llegado hasta nuestros días, con un fuerte componente académico y de aplicaciones registrado en publicaciones y trabajos reconocidos internacionalmente. Esta información, que sustenta la interacción entre plantas, sus extractos o componentes y venenos animales, valida las propiedades atribuidas en la tradición vernácula.

Los extractos de plantas representan una fuente extremadamente rica en compuestos farmacológicamente activos, y los metabolitos secundarios aislados podrían ser importantes en el desarrollo de nuevas terapéuticas y drogas sintéticas. Desde el punto de vista de la actividad antiveneno, se requiere evidencia para establecer las bases científicas de la práctica etnofarmacológica.

Son numerosos los reportes de especies vegetales que han sido estudiadas y cuya actividad alexitérica ha sido científicamente validada, pero todas, o la gran mayoría de estas publicaciones, están referidas a plantas y serpientes de otras regiones o países y no se encuentran referencias científicas, excepto las publicadas por este grupo de investigación, acerca de la inhibición o neutralización de la toxicidad de venenos de serpientes de esta región por plantas autóctonas.

El presente capítulo tiene por objetivo realizar un tamizaje, aplicando técnicas validadas, de la posible actividad antiveneno de la especie autóctona *C. pareira* contra uno de los ofidios de mayor índice de accidentes reporta en la Argentina: *Bothrops diporus*.

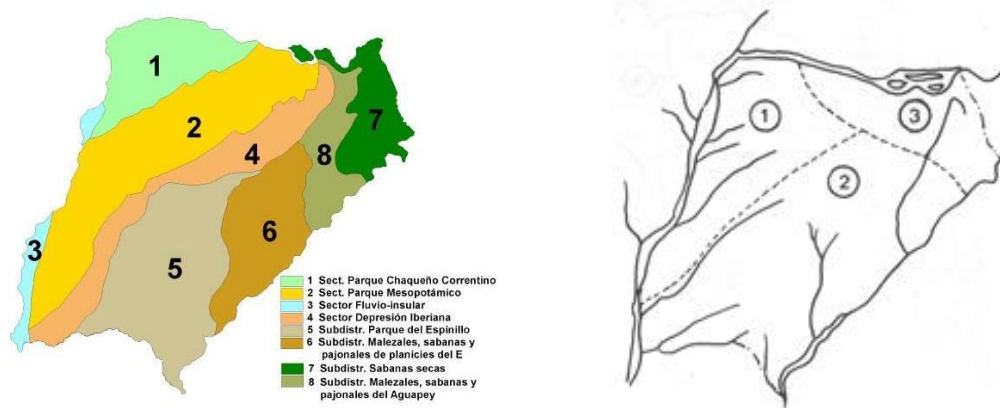
Una vez evaluados los extractos vegetales obtenidos por SDS-PAGE como técnica de tamizaje, se evaluará la capacidad inhibitoria de las principales actividades del veneno (coagulante; hemolítica indirecta, proteolítica y fibrinogenolítica) con la finalidad de seleccionar el extracto más activo, que posteriormente será utilizado para separar y purificar, mediante fraccionamiento bioguiado, los componentes responsables de dicha actividad.

## 2 Materiales y Métodos

### 2.1 Material Vegetal

La especie vegetal en estudio fue seleccionada teniendo en cuenta sus antecedentes etnobotánicos como alexitérica y su abundancia de crecimiento en la región para lograr una colecta sustentable.

Se realizaron viajes de prospección y búsqueda de poblaciones estables de *C. pareira* y de acuerdo con las diferencias edafológicas, se evaluaron las regiones fitogeográficas de la provincia de Corrientes, de modo tal de encontrar al menos dos muestras de regiones diferentes. La Provincia está representada por dos grandes territorios fitogeográficos: el Dominio Chaqueño y el Dominio Amazónico. La mayor parte de la superficie corresponde al Dominio Chaqueño, subdividido a su vez en dos distritos: el Oriental, de la provincia Chaqueña y el del Ñandubay, de la provincia de Esquel. El Dominio Amazónico se encuentra en el ángulo noreste, limitando con Misiones, y en él se reconoce el distrito de los Campos de la provincia Paranaense (**Figura 3.2.1**). En la confluencia de las tres regiones fitogeográficas se observan zonas de transición, de caracteres diferenciados (Carnevali, 1994).

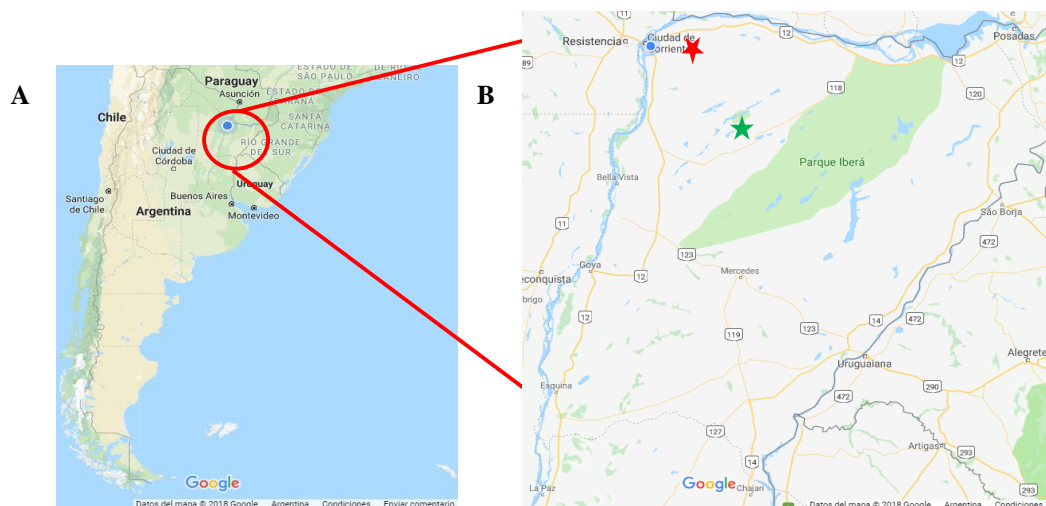


**Izq: 1; 2 y 3; Dcha: 1:** Distrito de la provincia Chaqueña (Dominio Chaqueño); **Izq: 4; 5 y 6: Dcha: 2:** Distrito del Ñandubay de la provincia de Esquel (Dominio Chaqueño); **Izq: 8; 7 y norte de 1; 2 y 4 Dcha: 3:** Distrito de los Campos de la provincia Paranaense (Dominio Amazónico). *Fuente:* Carnevali, (1994)

**Figura 3.2.1:** Mapa de las zonas fitogeográficas de la provincia de Corrientes

Se han encontrado dos poblaciones estables ubicadas a 35 km y 100 km, respectivamente de la Capital correntina: **Paso de la Patria (PP)**, departamento de San Cosme (27° 23' 27'' S; 58° 35' 38'' W) correspondiente a la región Oriental de la provincia Chaqueña (Dominio Chaqueño) y **Lomas de Vallejos (LV)**, departamento de General Paz (27° 45' 41'' S; 57° 55' 57'' W) en la zona de transición entre la región

Oriental de la provincia Chaqueña y Ñandubay de la provincia de Esquel (**Figuras 3.2.1 y 3.2.2**). Una vez individualizadas las poblaciones, se recolectaron ejemplares de *C. pareira*, separándolos en sus partes constituyentes: **partes aéreas** consistentes en flores, frutos, hojas y tallos (**A**); y **raíces (R)** (**Figura 3.2.3**). Asimismo, se recolectaron ejemplares en tres estadios vegetativos diferentes: otoño (**I**), primavera (**II**) y verano (**III**); para realizar un análisis estacional con el fin de analizar la variabilidad (metabolómica) de las poblaciones.



**A:** República Argentina, ubicación de la provincia de Corrientes. **B:** provincia de Corrientes, señalando ambos sitios de toma de muestras. ★ Paso de la Patria y ★ Lomas de Vallejos. *Fuente:* Google maps 2018. **Figura 3.2.2:** Sitios de colecta del material vegetal



Ejemplares florados de *C. pareira* en sitio de recolección Paso de la Patria. **Figura 3.2.3:** Población de *C. pareira*

La identificación botánica y el correspondiente depósito en herbario (IBONE-CORRIENTES) de los ejemplares en floración de cada una de las regiones geográficas fue realizado por la Prof. Lic. Sara G. Tressens, siendo los mismos los que se detallan a continuación:

- ✓ **Paso de la Patria:** Torres, A.M.; Cano, B.; Ricciardi, B. y Ricciardi, G. 17 (CTES);
- ✓ **Lomas de Vallejos:** Torres, A.M. & B. Ricciardi 19 (CTES).



El material vegetal fue colectado en bolsas de arpillera, debidamente rotulado y llevado al laboratorio donde fue extendido a la sombra para su secado por venteo sobre papeles de diario en condiciones controladas de temperatura y humedad ambiente, para evitar que ocurran procesos que pudieran provocar modificaciones en su composición química, volteándose periódicamente para favorecer un secado homogéneo.

Se seleccionó para la preparación de los extractos aquel material libre de ataque por hongos o insectos y sin presencia de especies parásitas o contaminantes, eliminándose todo material alterado.

## 2.2 Preparación de extractos

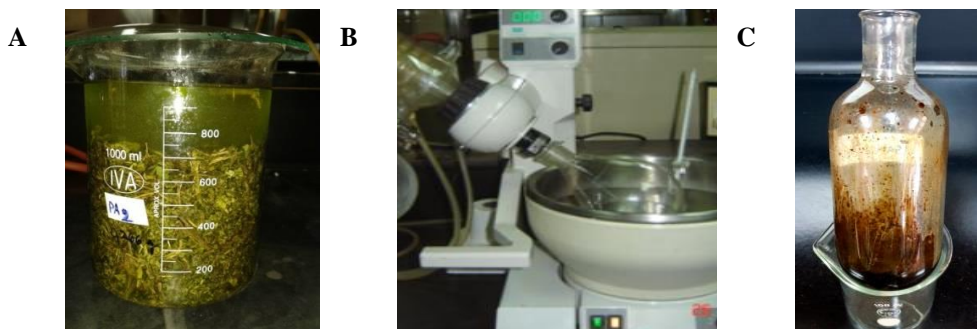
El material vegetal secado por venteo, separado en sus partes componentes partes aéreas (**A**) y raíces (**R**), molido y tamizado (tamiz N° 12) fue utilizado para la preparación de los siguientes extractos:

✓ **Extracto acuoso (I):** obtenido por maceración 24 h con agua destilada (Melo *et al.*, 1994);

✓ **Extracto etanólico (II):** obtenido por maceración 48 h con etanol 96° de calidad pro-análisis (Otero *et al.*, 2000) (**Figura 3.2.4**).

✓ **Extracto hexánico (III):** obtenido por maceración 48 h con hexano de calidad pro-análisis (Otero *et al.*, 2000).

Los extractos obtenidos fueron filtrados y desecados a presión reducida hasta residuo sólido en rotavapor Büchi R 124/waterbath B 480 (**Figura 3.2.4**) y conservados en desecador al vacío hasta su uso. Se calculó el rendimiento práctico de cada extracto en % p/p.



**A:** material vegetal en etanol 96°; **B:** rotavapor; **C:** extracto etanólico seco. **Figura 3.2.4:** Preparación del extracto etanólico de partes aéreas

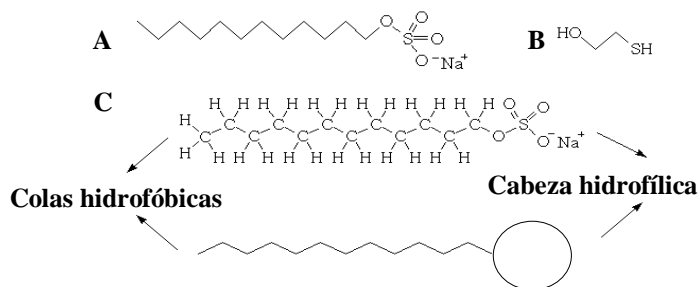
### 2.3 Pool de veneno de *B. diporus*

El veneno fue obtenido por personal del serpentario Corrientes mediante expresión manual (método del ordeño) a partir de ejemplares de *B. diporus*, constituyendo así un pool de veneno. Una vez obtenido, fue desecado a presión reducida y conservado a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso, donde se reconstituyó con solución fisiológica o buffer fosfato salino (PBS pH=7), expresando su concentración en términos de peso seco (Otero *et al.*, 2000).

### 2.4 Screening de actividad alexitérica: electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)

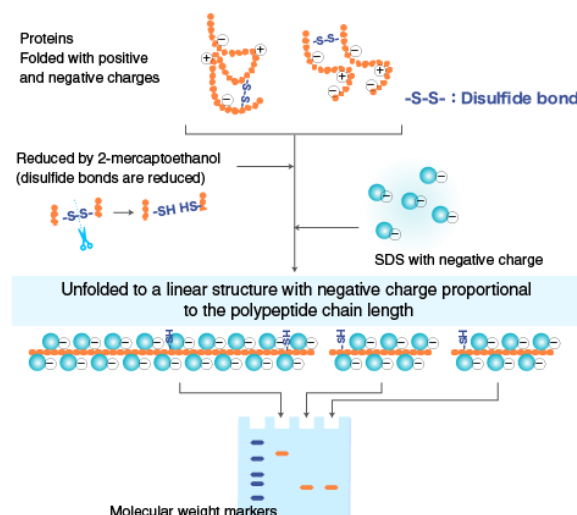
Camargo *et al.* (2011) proponen la SDS-PAGE como método de screening para evaluar la actividad de extractos vegetales sobre proteínas de veneno.

El detergente dodecilsulfato de sodio (SDS) y el agente reductor  $\beta$ -mercaptoetanol (*Figura 3.2.5*), solubilizan las proteínas en los análisis por SDS-PAGE. El SDS se une a las proteínas (1,4 g por cada g de polipéptido) creando una densidad de carga igual por unidad de superficie y, por lo tanto, cuando éstas son sometidas a una corriente eléctrica en cuba electroforética, migran de acuerdo únicamente a su tamaño (peso molecular) (*Figura 3.2.6*). Las moléculas de SDS forman micelas y cada polipéptido se incorpora a las micelas por atracción hidrofóbica con las cadenas carbonadas del detergente (*Figura 3.2.5*). La variabilidad en la forma del polipéptido, así como en la relación carga/masa son eliminados como consecuencia del tamaño uniforme de las micelas y por la relación constante de 3 moléculas de SDS por residuo amionoacídico. El gran número de iones sulfato en la micela supera ampliamente el efecto de cargas sobre el propio polipéptido. La tasa de polimerización y las propiedades del gel dependen de la concentración de los catalizadores: TEMED (tetrametiletilendiamina) y persulfato de amonio (*Figura 3.2.7*). Se debe utilizar la menor concentración posible de catalizadores que permitan la polimerización en un tiempo óptimo.



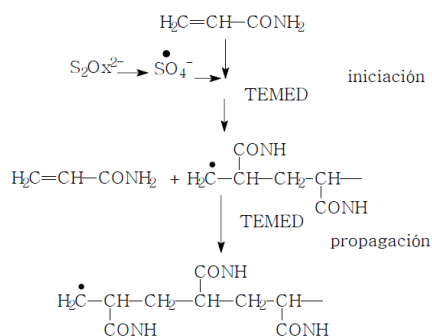
A: SDS; B:  $\beta$ -mercaptoetanol; C: estructura desarrollada del SDS indicando la polaridad de sus partes.

*Figura 3.2.5:* Estructuras químicas SDS y  $\beta$ -mercaptoetanol



Fuente: <https://www.mblbio.com/bio/g/support/method/sds-page.html>. **Figura 3.2.6:** SDS-PAGE.

Proceso de ruptura de puentes disulfuro y migración en función del tamaño de la cadena polipeptídica.



**Figura 3.2.7:** Acción del TEMED y persulfato de amonio en la polimerización de la acrilamida.

**Preparación de reactivos.** Según la técnica de Pilosof & Bartholomai, (2000). Buffer electrodo TRIS-glicina pH 8,3; buffer gel stacking pH 6,8; buffer gel de separación pH 8,8. Se introdujeron modificaciones: gel de separación al 12% y gel de concentración (stacking) al 4%; agregado de urea al buffer muestra pH 6,8 para mejorar la visualización; el  $\beta$ -mercaptoetanol se agregó a las muestras. Se utilizaron patrones de peso molecular bajo (*Bio-rad*) 94 KDa, 67 KDa, 43 KDa, 30 KDa, 20,1 KDa y 14,4 KDa preparados según indicaciones del fabricante. Esquema de preparación de geles (**Tabla 3.2.1**)

**Tabla 3.2.1:** Esquema de preparación de geles para SDS-PAGE

	Gel de separación 12%	Gel de concentración 4%
<b>Acrilamida</b>	2 mL	0,26 mL
<b>Buffer gel/stacking</b>	1,25 mL	0,5 mL
<b>Agua</b>	1,75 mL	1,2 mL
<b>TEMED</b>	5 $\mu$ L	2 $\mu$ L
<b>Persulfato de amonio</b>	18 $\mu$ L	30 $\mu$ L

**Preparación de las muestras.** Se previó que en cada calle se siembren 15  $\mu\text{g}$  de proteínas de veneno para lograr una correcta visualización de las bandas. Se sembraron, además, los extractos vegetales como patrones para verificar que no existieran proteínas vegetales que pudieran modificar el perfil electroforético e interferir con la interpretación de los resultados. **La relación veneno-extracto fue de 1:10.**

✓ **Solución de veneno patrón:** 1 mg veneno + 300  $\mu\text{L}$  buffer muestra + 15  $\mu\text{L}$   $\beta$ -mercaptoetanol. 5 minutos a ebullición para desnaturalización.

✓ **Extracto vegetal patrón:** 1,2 mg extracto + 50  $\mu\text{L}$  buffer muestra + 2,5  $\mu\text{L}$   $\beta$ -mercaptoetanol. 5 minutos a ebullición para desnaturalización.

✓ **Veneno + extracto:** 1 mg veneno disuelto en 40  $\mu\text{L}$  de solución fisiológica + 7 mg de extracto disuelto en 60  $\mu\text{L}$  de agua/etanol 96°/hexano según su naturaleza. 30 minutos de incubación a 37°C. Se agregaron luego 100  $\mu\text{L}$  de buffer muestra y 10  $\mu\text{L}$   $\beta$ -mercaptoetanol. 5 minutos a ebullición para desnaturalización.

Esquema de siembra

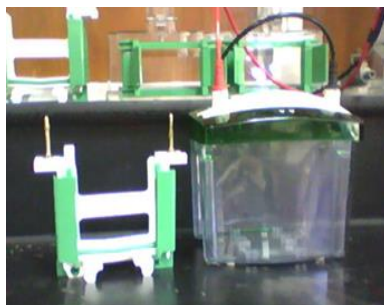
✓ **Calle 1:** 5  $\mu\text{L}$  de solución de **patrón de peso molecular**;

✓ **Calle 2:** 5  $\mu\text{L}$  de solución de **veneno**;

✓ **Calles 3, 5 y 7:** 3,5  $\mu\text{L}$  de solución de **veneno + extracto** para evaluar la capacidad neutralizante del veneno que se evidencia con un patrón de bandas diferente al del veneno patrón;

✓ **Calles 4, 6, 8:** 5  $\mu\text{L}$  de solución de **extracto** como patrón.

Los geles se colorearon durante 3-4 h a temperatura ambiente con azul brillante de Coomassie R 0,25% (p/v) en ácido acético 9,2% (v/v) y metanol 55,4% (v/v). La decoloración se llevó a cabo con ácido acético 7% (v/v) y metanol 30% (v/v). Las corridas se realizaron en el equipo *Miniprotean 4* (**Figura 3.2.8**) a 25 mA por cada gel. Se escanearon los geles en formato TIF con scanner *HP deskjet F4280*.



**Figura 3.2.8:** Equipo Miniprotean 4. Cuba para desarrollo electroforético.

## 2.5 Inhibición de las actividades del veneno: ensayos *in vitro*

### 2.5.1 Inhibición de la actividad proteolítica por SDS-PAGE

Se evaluó mediante adaptaciones a las técnicas descriptas por Pardo & Natalucci, (2002) y Gay *et al.* (2004):

**Preparación de reactivos.** Buffer electrodo TRIS-glicina pH 8,3; buffer gel de concentración (stacking) pH 6,8; buffer gel de separación pH 8,8. Geles de separación al 10% y stacking al 4 % preparados como se indica en las **Tablas 3.2.1** y **3.2.2**; respectivamente.

**Tabla 3.2.2:** Esquema de preparación de geles para el ensayo de inhibición de la actividad proteolítica

Gel de separación 10%	
<b>Acrilamida</b>	1,65 mL
<b>Buffer gel</b>	1,25 mL
<b>Agua</b>	2,05 mL
<b>TEMED</b>	5 µL
<b>Persulfato de amonio</b>	30 µL

✓ **Solución madre de caseína (10 mg/mL):** 1 g de caseína en 100 mL de buffer Tris-HCl 100 mM pH 8 y calentando 20 minutos a reflujo. Se filtró en caliente y se guardó a 4°C hasta su uso (vida útil: 2 días).

✓ **Solución buffer muestra doblemente concentrado:** 125 mM Tris-HCl pH 6,8 (10 mL buffer stacking), + 4% SDS (0,4 g) + 10%  $\beta$ -mercaptoetanol (1mL) + 0,4% azul de bromofenol + 20% glicerol (2mL). Se agregaron 4 g de urea para mejorar la corrida.

✓ **Solución madre veneno (0,25 mg/mL):** 0,25 mg/mL en buffer Tris-HCl pH 8.

✓ **Extractos:** 1 mg de extracto en 50 µL de buffer Tris-HCl pH 8.

✓ **Preparación de las muestras:** se previó que en cada calle se siembren de 12 a 15 µg de caseína para una correcta visualización de las bandas. Se sembraron, además, los extractos incubados con caseína, para comprobar que no existieran proteasas vegetales que pudieran modificar el perfil electroforético e interferir con la interpretación de los resultados. **La relación veneno-extracto fue de 1:30.**

✓ **Caseína:** 50 µL solución de caseína 5 mg/mL (solución madre de caseína diluida al medio con buffer tris-HCl) + 50 µL buffer muestra doblemente concentrado. 5 minutos a ebullición para desnaturalización.

✓ **Veneno + caseína:** 50 µL de solución de caseína 10 mg/mL + 50 µL veneno 0,125 mg/mL (solución patrón de veneno 0,25 mg/mL diluida al medio con buffer Tris-

HCl pH 8). 60 minutos de incubación a 37°C considerando que en este período de tiempo se produce la proteólisis completa de la caseína por acción del veneno (Gay *et al.*, 2004). Luego 50 µL de la solución anterior + 50 µL buffer muestra se desnaturalizaron 5 minutos a ebullición.

✓ **Veneno + extracto + caseína:** se prepararon las soluciones de los extractos teniendo como base la preparación de quelantes de metales de Gay *et al.* (2004) pero colocando los extractos vegetales en su lugar: 50 µL de veneno 0,25 mg/mL + 50 µL de extracto 20 mg/mL se incubaron 60 minutos a 37°C. Luego se agregaron a 50 µL de la solución anterior a 50 µL de solución de caseína 10 mg/mL y se incubaron 1 h a 37°C. Se tomaron 50 µL de la solución anterior y se agregaron 50 µL de buffer muestra llevando a ebullición 5 minutos para desnaturalizar.

✓ **Extracto + caseína:** 50 µL de solución de extracto 10 µg/mL (diluido al medio con buffer Tris-HCl pH 8) + 50 µL caseína 10 mg/mL se incubaron 60 minutos a 37°C. Luego 50 µL de la solución anterior se agregaron a 50 µL buffer muestra llevando 5 minutos a ebullición para desnaturalizar.

Esquema de siembra:

✓ **Calle 1:** 5 µL de solución de **caseína**;

✓ **Calle 2:** 5 µL de solución de **veneno + caseína**;

✓ **Calles 3, 5 y 7:** 5 µL de solución de **veneno + extracto + caseína** para evaluar la capacidad inhibitoria de la actividad proteolítica del veneno que se manifiesta a partir de un patrón de bandas igual al de la caseína pura, ya que el extracto al neutralizar el veneno no estará disponible para actuar sobre la caseína;

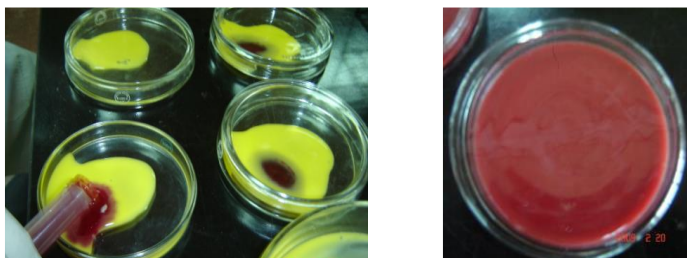
✓ **Calles 4, 6 y 8:** 5 µL de solución de **extracto + caseína** como patrón.

Los geles se colorearon durante 3-4 h a temperatura ambiente con azul brillante de Coomassie R 0,25% (p/v) en ácido acético 9,2% (v/v) y metanol 55,4% (v/v). La decoloración se llevó a cabo con ácido acético 7% (v/v) y metanol 30% (v/v). Las corridas se realizaron en el equipo *Miniprotean 4* (**Figura 3.2.8**) a 25 mA por cada gel. Se escanearon los geles en formato TIF con scanner *HP deskjet F4280*.

## **2.5.2 Inhibición de la actividad hemolítica indirecta por difusión radial en placas de agar sangre-fosfatidilcolina** (Gutiérrez *et al.*, 1988; Otero *et al.*, 1995)

### **Preparación de reactivos**

**Agar base Columbia + sangre + yema de huevo (Figura 3.2.9):** las placas de Petri (25 cm diámetro interno) se esterilizaron por calor seco en estufa (60 minutos a 120°C). Se agregó agar base Columbia 4,2 % (p/v) esterilizado por calor húmedo (15 minutos en olla a presión) + 2 mL de sangre entera humana anticoagulada con EDTA y obtenida por punción venosa del pliegue del codo + 2 mL de yema de huevo. Se homogeneizó, dejando solidificar a temperatura ambiente y se realizaron pocillos para la siembra.



**Figura 3.2.9:** Preparación de placas de Petri con agar sangre-fosfatidilcolina.

✓ **Solución de veneno:** 5 mg de veneno en 100 mL de solución fisiológica (250 µg veneno seco).

✓ **Solución de extractos:** 2,5 mg de extracto seco en 0,5 mL de agua/etanol 96°/hexano según naturaleza del extracto.

✓ **Determinación de la dosis hemolítica mínima (DHM):** se sembraron 10 µl de cada dilución de veneno por duplicado (50 µg/mL, 25 µg/mL, 12,5 µg/mL) en agar sangre-fosfatidilcolina. Se incubaron las placas de Petri 20 h a 37°C en cámara húmeda y se midieron los halos de hemólisis. Se determinó la DHM como aquella dosis que induce un halo de hemólisis de 10 mm luego de 20 h de incubación.

✓ **Determinación de la capacidad neutralizante de los extractos:** se pre-incubaron las soluciones de extractos vegetales durante 30 minutos a 37°C con 5 mL de la DHM. Luego, se sembraron por duplicado 10 µL de la solución anterior en los pocillos del agar sangre-fosfatidilcolina. Se incubaron las placas de Petri 20 h a 37°C en cámara húmeda y se midieron los halos de hemólisis. **La relación veneno-extracto fue de 1:30.** Una reducción de los halos de hemólisis comparados con la hemólisis producida por la DHM indicó inhibición *in vitro* de la actividad de la fosfolipasa A2 (PLA2) del veneno.

Para aquellos extractos que manifestaron actividad se ensayaron diluciones de 1:5; 1:10; 1:20; 1:40 y 1:50.

Los resultados se expresaron como % de restitución de la actividad inhibida:

mm del halo producido por el veneno → 100% (total)

mm del halo producido por extracto + veneno → X%

% de restitución de la actividad inhibida: (100 – X) %

### 2.5.3 Inhibición de la actividad coagulante

Esta inhibición de actividad se realizó mediante la técnica del tiempo de recalcificación del plasma citratado (Iovine & Selva, 1985) ligeramente modificada añadiendo 10  $\mu\text{L}$  de solución fisiológica /solución de veneno /solución de extracto /solución del veneno pre-incubado con el extracto (30 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$ ) a 0,2 mL de un pool de plasma obtenido a partir de sangre entera humana anticoagulada con citrato (1+9) y 0,2 mL de  $\text{CaCl}_2$  0,025 M. Se obtuvieron así el tiempo de coagulación normal (**TCN**), la dosis coagulante mínima (**TCM**), tiempo de coagulación del extracto como patrón (**TC<sub>E</sub>**) y la capacidad del extracto para inhibir la actividad coagulante del veneno (**TC<sub>E+V</sub>**); respectivamente. **La relación veneno-extracto utilizada fue de 1:15.**

La dosis coagulante mínima (**DCM**) se definió como la cantidad de veneno que lleva el tiempo de coagulación a 60 segundos para una temperatura de  $37^{\circ}\text{C}$  (Theakston & Reid, 1983 modificada por Gené *et al.*, 1989) y se representó como **TCV**.

#### Preparación de reactivos

✓ **Solución de extractos:** 1 mg de extracto disuelto en 0,4 mL de agua/etanol 96°/hexano según naturaleza del extracto;

✓ **Solución de veneno:** 1 mg de veneno disuelto en 100 mL de solución fisiológica;

✓ **Solución de veneno + extracto:** la solución del extracto se incubó 30 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$  con 5 ml de solución del veneno.

Los resultados se expresaron como % de restitución de la actividad inhibida (%X):

$$\begin{array}{ll} (\text{seg}) \text{TCN} - (\text{seg}) \text{TCV} & \rightarrow 100\% \text{ (total)} \\ (\text{seg}) \text{TC}_{\text{E+V}} - (\text{seg}) \text{TCV} & \rightarrow \text{X\%} \end{array}$$

### 2.5.4 Inhibición de la actividad fibrinogenolítica por SDS-PAGE con fibrinógeno

Se evaluó mediante adaptaciones a las técnicas descriptas por Pardo & Natalucci, (2002) y Peichoto *et al.* (2003) y (2007).

**Preparación de los reactivos:** Buffer electrodo TRIS 0,1 mM; 0,5 mM  $\text{CaCl}_2$ ;  $\text{NaN}_2$  0,02% pH 8. Se utilizaron geles de separación al 12 % y stacking al 4 %.

✓ **Solución madre de fibrinógeno (5 mg/mL):** Se preparó disolviendo 5 mg de fibrinógeno en 1 mL de buffer Tris-HCl 100 mM pH 8.

✓ **Solución buffer muestra doblemente concentrado:** 125 mM Tris-HCl pH 6,8 (10 mL buffer stacking), + 4% SDS (0,4g) + 10%  $\beta$ -mercaptoetanol (1mL) + 0,4% azul de bromofenol + 20% glicerol (2mL). Se agregaron 4 g de urea para mejorar la corrida.

✓ **Solución madre de veneno (0,5mg/mL):** 0,5 mg/mL en buffer Tris-HCl pH 8.



✓ **Extractos:** 2,5 mg de extracto en 100  $\mu$ L de buffer Tris-HCl pH 8.

✓ **Preparación de las muestras:** se previó que en cada calle se siembren de 12 a 15  $\mu$ g de fibrinógeno para lograr una correcta visualización de las bandas. Además, la siembra de extracto como patrón se realizó para comprobar que no existieran proteasas vegetales que pudieran modificar el perfil electroforético y así interferir con la interpretación de los resultados. **La relación veneno-extracto fue de 1:50.**

✓ **Fibrinógeno:** 100  $\mu$ L solución de fibrinógeno 2,5 mg/mL (solución madre de fibrinógeno diluida al medio con buffer tris-HCl) + 100  $\mu$ L +  $\beta$ -mercaptoetanol 1%. 5 minutos a ebullición para desnaturalización.

✓ **Veneno + fibrinógeno:** 100  $\mu$ L de solución de fibrinógeno 5 mg/mL + 100  $\mu$ L veneno 0,25 mg/mL (solución patrón de veneno 0,5 mg/mL diluida al medio con buffer Tris-HCl pH 8). 60 minutos de incubación a 37°C considerando que en este período de tiempo se produce la proteólisis del fibrinógeno por acción del veneno (Peichoto *et al.*, 2007). Luego 30  $\mu$ L de la solución anterior + 30  $\mu$ L buffer muestra +  $\beta$ -mercaptoetanol 1% se desnaturalizaron 5 minutos a ebullición.

✓ **Veneno + extracto + fibrinógeno:** 2,5 mg de extracto en 100  $\mu$ L de etanol 96° + 100  $\mu$ L veneno 0,5 mg/ se incubaron 60 minutos a 37°C. Luego se agregaron 100  $\mu$ L de esta solución a 100  $\mu$ L de solución de fibrinógeno 5 mg/mL y se incubaron 60 minutos a 37°C. Se tomaron 30  $\mu$ L y se agregaron 30  $\mu$ L de buffer muestra +  $\beta$ -mercaptoetanol 1% llevando a ebullición 5 minutos para desnaturalizar.

✓ **Extracto + fibrinógeno:** 1,3 mg de extracto en 100  $\mu$ L de etanol 96° + 100  $\mu$ L fibrinógeno 5 mg/mL se incubaron 60 minutos a 37°C. Luego 30  $\mu$ L se agregaron a 30  $\mu$ L buffer muestra +  $\beta$ -mercaptoetanol 1% llevando 5 minutos a ebullición para desnaturalizar.

Esquema de siembra:

✓ **Calle 1:** 5  $\mu$ L de solución de **fibrinógeno**;

✓ **Calle 2:** 5  $\mu$ L de solución de **veneno + fibrinógeno**;

✓ **Calles 3, 5 y 7:** 5  $\mu$ L de solución de **veneno + extracto + fibrinógeno** para evaluar la capacidad inhibitoria de la actividad fibrinogenolítica del veneno que se manifiesta a partir de un patrón de bandas igual al del fibrinógeno puro, ya que el extracto al neutralizar el veneno no estará disponible para actuar sobre el fibrinógeno.

✓ **Calles 4, 6 y 8:** 5  $\mu$ L de solución de **extracto + fibrinógeno** como patrón.

Los geles se colorearon durante 3-4 h a temperatura ambiente con azul brillante de Coomassie R 0,25% (p/v) en ácido acético 9,2% (v/v) y metanol 55,4% (v/v). La decoloración se llevó a cabo con ácido acético 7% (v/v) y metanol 30% (v/v). Las corridas se realizaron en el equipo *Miniprotean 4* (**Figura 3.2.8**) a 25 mA por cada gel. Se escanearon los geles en formato TIF con scanner *HP deskjet F4280*.

## 2.6 Fraccionamiento bioguiado del extracto activo

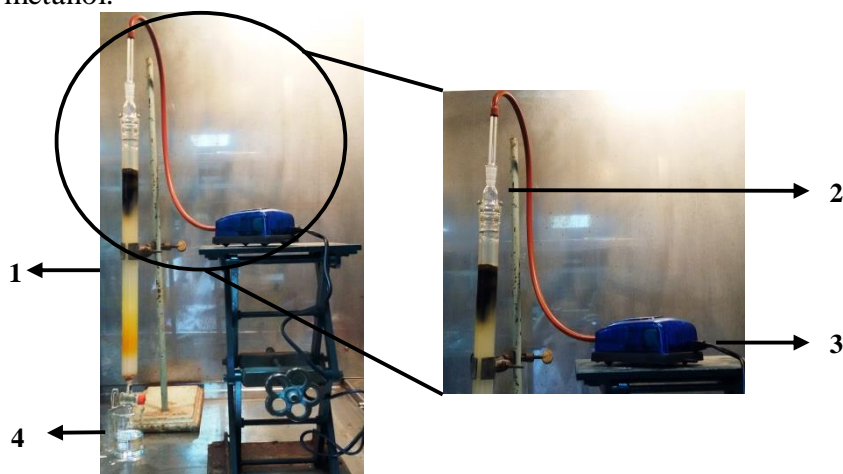
Por cromatografía flash en columna, agrupando las fracciones según perfil cromatográfico por TLC y siguiendo la actividad biológica con SDS-PAGE.

**Preparación de la muestra.** Para cada separación 500 mg del extracto activo disuelto en etanol 96° preparando una mezcla con sílica gel. Se evaporó a presión reducida hasta sequedad, obteniéndose un polvo granulado embebido en el extracto activo.

### 2.6.1 Cromatografía flash en columna

Se utilizó una columna de 24 x 400 mm conectada a una bomba de aire de pecera CX-1000 (sílica gel flash 60 0,04-0,063 mm, MN) (**Figura 3.2.10**). Se utilizó un programa de polaridad creciente para eluir la columna:

- 100 mL de tolueno;
- 100 mL de tolueno-acetato de etilo (50:50);
- 100 mL de acetato de etilo;
- 100 mL de acetato de etilo-metanol (60:40);
- 100 mL de acetato de etilo-metanol (40:60);
- 100 mL metanol.



**1:** columna de 24 x 400 mm rellena con sílica gel flash 60 0,04-0,063 mm, MN; **2:** cabezal conectado a bomba de pecera; **3:** bomba de aire de pecera CX-1000; **4:** colector del eluido. **Figura 3.2.10:** Equipo de fraccionamiento por cromatografía flash en columna.

## 2.6.2 Cromatografía en placa delgada (TLC)

Los tubos colectados fueron sembrados en cromatofolios de sílica gel GF<sub>254</sub> (Merck); utilizando tolueno-acetato de etilo (90:10) como fase móvil y revelando las placas con UV a 254/365 nm y reactivo universal de anisaldehído-sulfúrico. Los tubos con igual perfil cromatográfico se reunieron en una misma fracción, evaporándolas a presión reducida y conservándolas en desecador.

**Preparación del reactivo universal anisaldehído sulfúrico.** Anisaldehído-sulfúrico 0,5% v/v; ácido acético glacial 10% v/v; metanol 85% v/v; ácido sulfúrico concentrado 5%. Luego de aspersion, 100°C 5 a 10 minutos para mejorar la observación.

## 2.6.3 Screening de actividad antiveneno de las fracciones por SDS-PAGE

Por SDS-PAGE en las condiciones descriptas en el apartado **2.4 Screening de actividad alexitérica: electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)**; del presente capítulo, para cada fracción obtenida.

Las capacidades neutralizantes de las actividades *in vitro* del veneno se realizaron como se describió en los apartados **2.5.1 Inhibición de la actividad proteolítica por SDS-PAGE**; **2.5.2 Inhibición de la actividad hemolítica indirecta por difusión radial en placas de agar sangre-fosfatidilcolina**; **2.5.3 Inhibición de la actividad coagulante** y **2.5.4 Inhibición de la actividad fibrinogenolítica por SDS-PAGE con fibrinógeno**; del presente capítulo.

## 3. Resultados y Discusión

### 3.1 Obtención de extractos y cálculo de su rendimiento práctico

Se obtuvieron en total **treinta y seis (36)** extractos vegetales cuya evaluación biológica y química fue materia de este trabajo de tesis (**Tabla 3.3.1**).

**Tabla 3.3.1:** Extractos de *C. pareira* obtenidos y sus abreviaciones

	OTOÑO		PRIMAVERA		VERANO	
Paso de la Patria	Partes aéreas	Raíces	Partes aéreas	Raíces	Partes aéreas	Raíces
acuoso	A1I PP	R1I PP	A1II PP	R1II PP	A1III PP	R1III PP
etanólico	A2I PP	R2I PP	A2II PP	R2II PP	A2III PP	R2III PP
hexánico	A3I PP	R3I PP	A3II PP	R3II PP	A3III PP	R3III PP
<b>Lomas de Vallejos</b>						
acuoso	A1I LV	R1I LV	A1II LV	R1II LV	A1III LV	R1III LV
etanólico	A2I LV	R2I LV	A2II LV	R2II LV	A2III LV	R2III LV
hexánico	A3I LV	R3I LV	A3II LV	R3II LV	A3III LV	R2III LV

Una vez obtenidos los extractos secos, se calculó su rendimiento práctico para determinar la cantidad de extracto que se obtuvo por cada 100 g de material vegetal seco. El rendimiento práctico porcentual que se expone en la **Tabla 3.3.2** fue calculado como se indica a continuación:

$$\begin{array}{ll} \text{gramos de material vegetal seco} & \rightarrow \text{gramos de extracto seco obtenido} \\ 100 \text{ g de material vegetal seco} & \rightarrow \text{X g de extracto seco obtenido} \end{array}$$

Como ejemplo, se desarrolla el cálculo del rendimiento para el extracto acuoso de primavera del material recolectado en PP:

$$\begin{array}{ll} 17,6 \text{ g de material vegetal seco} & \rightarrow 9,9730 \text{ g de extracto seco obtenido} \\ 100 \text{ g de material vegetal seco} & \rightarrow 54,9 \text{ g de extracto seco obtenido} \end{array}$$

**Tabla 3.3.2:** Rendimiento práctico porcentual de los extractos obtenidos

	OTOÑO		PRIMAVERA		VERANO	
Paso de la Patria	Partes aéreas	Raíces	Partes aéreas	Raíces	Partes aéreas	Raíces
acuoso	11,5%	9,8%	54,9%	9,5%	49,5%	11,2%
etanólico	7,2%	6,2%	7,7%	6,2%	11,0%	9,6%
hexánico	0,8%	5,2%	1,7%	1,9%	3,6%	7,9%
<b>Lomas de Vallejos</b>						
acuoso	23,6%	11,7%	13,6%	19,98%	17,8%	9,4%
etanólico	6,2%	5,0%	7,7%	7,87%	8,6%	6,9%
hexánico	0,8%	0,7%	5,9%	4,05%	6,4%	0,8%

### 3.2 Screening de actividad alexitérica por electroforesis por SDS-PAGE

En la **Tabla 3.3.3** se exponen los resultados obtenidos por observación visual directa de los geles de poliacrilamida para este análisis preliminar, considerando el patrón de modificación de bandas proteicas del veneno de yarará chica previamente incubado con el extracto y las bandas correspondientes al veneno patrón. Esto quedó de manifiesto en los geles de poliacrilamida (**Figura 3.3.1**) como alguna de las situaciones siguientes:

✓ disminución en la intensidad de bandas por clivaje de las cadenas polipeptídicas del veneno posiblemente debido a componentes activos de los extractos que dieron origen a bandas de menor peso molecular;

✓ aparición de nuevas bandas de mayor peso molecular generalmente por formación de complejos entre proteínas del veneno y componentes activos del material vegetal;

✓ borramiento total de bandas del veneno interpretado como gran actividad alexitérica y considerando estos extractos como los más activos.

Asimismo, el análisis de las calles sembradas con los extractos, como patrones, sin previa incubación con veneno, permitieron observar la presencia de proteínas vegetales que pudieran interferir con la posterior interpretación de los resultados.

**Tabla 3.3.3:** Screening de actividad alexitérica por SDS PAGE

	OTOÑO		PRIMAVERA		VERANO	
<b>Paso de la Patria</b>	Partes aéreas	Raíces	Partes aéreas	Raíces	Partes aéreas	Raíces
Extracto acuoso	-	-*	++	+	-	-
Extracto etanólico	+	+	+++	+	++++	++
Extracto hexánico	+	-	+	+	+	-
<b>Lomas de Vallejos</b>						
Extracto acuoso	-	+++	-	-	-	++
Extracto etanólico	-	+++	+	+++	-	+++
Extracto hexánico	-	++	+	-	++	+++

Relación veneno-extracto 1:10: (-) Sin actividad; (+) poco activo; (++) moderadamente activo; (+++) muy activo; (++++) sumamente activo. \*Se observaron bandas correspondientes a proteínas vegetales.

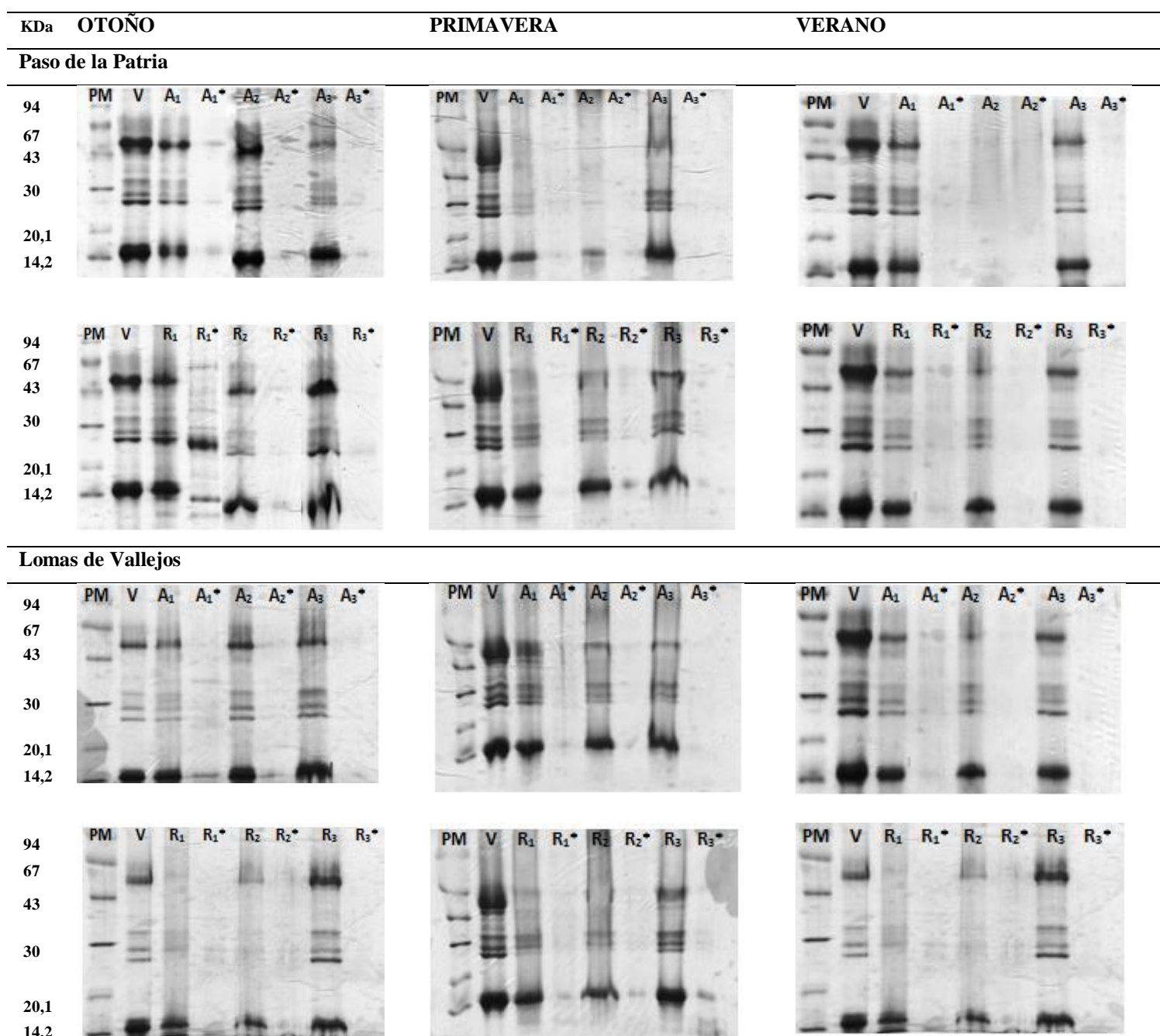
Los extractos analizados manifestaron diferencias significativas en la modificación del patrón de bandas del veneno de *B. diporus*, por lo tanto, presentaron diferencias en su actividad contra veneno que dependieron tanto de su estado vegetativo (estación del año en la que fueron colectados) como de factores edafológicos (región geográfica de recolección) y también del órgano constituyente de la planta (raíces/partes aéreas).

En líneas generales, **las partes aéreas recolectadas en PP** resultaron más activas que las recolectadas en LV. Sin embargo, en ésta última localidad, las raíces fueron más activas.

Con relación al estado vegetativo de la especie, **en verano**, cuando los ejemplares se encontraron en etapa de floración, **los extractos de partes aéreas fueron más activos que en primavera y otoño**.

En cuanto a la **naturaleza (polaridad) de los extractos**, en general, los etanólicos manifestaron una mayor actividad que los acuosos y hexánicos.

Cabe destacar que, el extracto de raíces acuosas recolectadas de PP en otoño, presentó proteínas vegetales que pudieron observarse con claridad en la calle correspondiente al extracto patrón (**Figura 3.3.1**), aunque particularmente este hecho no interfirió en la interpretación de los resultados debido a que éste extracto no manifestó actividad alexitérica (no produjo modificación en el patrón de bandas del veneno).



**PM:** patrón de peso molecular; **V:** veneno de *B. diporus*; **A:** extracto de partes aéreas + veneno; **A\*:** extracto de partes aéreas; **R:** extracto de raíces + veneno; **R\*:** extracto de raíces; **1; 2 y 3:** extracto acuoso, etanólico y hexánico. Relación veneno-extracto 1:10.

*Figura 3.3.1:* Electroforesis SDS-PAGE de extractos de *C. pareira*

### 3.3 Inhibición de las actividades del veneno: ensayos *in vitro*

#### 3.3.1 Inhibición de la actividad proteolítica

Se llevó a cabo mediante SDS-PAGE a partir del análisis, por observación visual directa de los geles de poliacrilamida, de la presencia o ausencia de las bandas  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\kappa$  de la caseína.

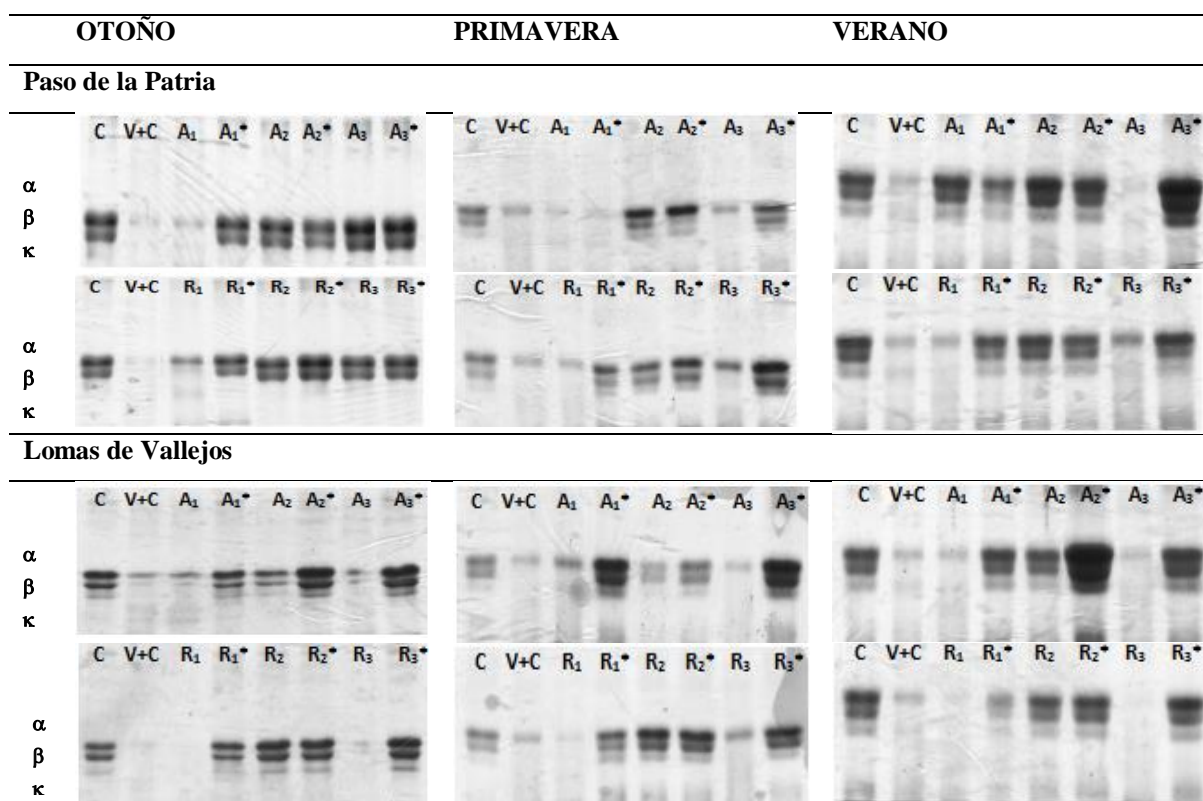
Cuando el veneno se incubó con caseína, se produjo la proteólisis de la misma, por lo tanto, se observó un borramiento de las bandas.

Cuando los extractos (activos) se incubaron con el veneno, los componentes activos del mismo inactivaron las proteasas del veneno, impidiendo que éste se encuentre disponible para actuar sobre la caseína. Como resultado, en las calles donde se sembraron extractos activos, se observaron las tres bandas correspondientes a la caseína:  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\kappa$ .

En las calles donde se sembraron extractos sin actividad, el veneno actuó sobre las cadenas polipeptídicas de la caseína produciendo su borramiento total/parcial.

En las calles donde se sembraron extractos previamente incubados con caseína, pero sin veneno, como patrones para analizar la presencia de proteasas vegetales que pudieran interferir con la interpretación de resultados, se observaron con claridad las bandas de la caseína, descartando así la presencia de proteasas vegetales.

Los resultados se exponen en la **Tabla 3.3.4** y las imágenes correspondientes a las corridas electroforéticas realizadas en la **Figura 3.3.2**.



**C:** caseína;  **$\alpha$ ,  $\beta$  y  $\kappa$ :** bandas correspondientes a la caseína; **V+C:** veneno + caseína; **A:** extracto de partes aéreas + veneno + caseína; **A\*:** extracto de partes aéreas + caseína; **R:** extracto de raíces + veneno + caseína; **R\*:** extracto de raíces + caseína; **1; 2 y 3:** extracto acuoso, etanólico y hexánico, Relación veneno-extracto 1:30. **Figura 3.3.2:** Electroforesis SDS-PAGE con caseína

**Tabla 3.3.4:** Inhibición de la actividad proteolítica del veneno de *B. diporus* por extractos de *C. pareira*

	OTOÑO		PRIMAVERA		VERANO	
<b>Paso de la Patria</b>	Partes Aéreas	Raíces	Partes Aéreas	Raíces	Partes Aéreas	Raíces
Extracto acuoso	-	-	-	-	++	-
Extracto etanólico	++	++	+	+	+++	+++
Extracto hexánico	+++	+++	+	+	-	-
<b>Lomas de Vallejos</b>						
Extracto acuoso	-	-	-	-	-	-
Extracto etanólico	++	++	++	++	++	++
Extracto hexánico	-	-	-	-	-	-

(-) Sin actividad; (+) poco activo; (++) moderadamente activo; (+++) muy activo. Relación veneno-extracto 1:30.

Los **extractos etanólicos, de partes aéreas y raíces**, resultaron activos en ambas zonas geográficas de recolección y en todos los estados vegetativos, aunque es evidente que **los extractos de verano recolectados en PP fueron más activos**. Saravia-Otten *et al.* (2015) verificaron que los extractos etanólicos de raíces provenientes de material vegetal recolectado en Guatemala inhiben la actividad proteolítica del veneno de *B. asper*, no ensayando esta actividad para los extractos de partes aéreas.

Excepto el extracto A1III PP, ningún extracto acuoso presentó actividad inhibitoria de la proteólisis de caseína y, se hace notar que, A1II PP\* manifestó la presencia de proteasas vegetales, aunque este hecho no resultó de interés para la interpretación de los resultados dado que el extracto no presentó capacidad de inhibición de esta actividad.

Con relación a la actividad proteolítica de los extractos acuosos, Badilla *et al.* (2008) en Costa Rica, encontraron actividad anti-proteolítica y antihemorrágica a partir de una infusión acuosa de toda la planta contra el veneno de *B. asper*.

Respecto de los extractos hexánicos, sólo mostraron actividad significativa aquellos provenientes del material vegetal recolectado en otoño de PP, disminuyendo su intensidad en primavera, sin distinción de órgano.

### 3.3.2 Inhibición de la actividad hemolítica indirecta

En el veneno de *B. diporus*, la PLA2 es la responsable de la hemólisis indirecta *in vitro*. Esta enzima actúa sobre la fosfatidilcolina de la yema del huevo, liberando lisofosfatidilcolina y un ácido graso. La lisofosfatidilcolina o lisolecitina tiene acción detergente induciendo la lisis de los glóbulos rojos del agar sangre. El halo hemolítico producido es directamente proporcional a la actividad enzimática de la PLA2.



Se determinó la DHM (cantidad de veneno que produce un halo de hemólisis igual a 10 mm), que resultó ser de **50 µg/mL**. Cada uno de los extractos vegetales obtenidos (5 mg/mL) fueron sembrados para evaluar su actividad *per se* y, además, se incubaron con la DHM. Aquellos extractos con componentes bioactivos capaces de inhibir la actividad hemolítica indirecta del veneno, produjeron una reducción del halo de hemólisis (**Figura 3.3.3**). Los resultados se obtuvieron por triplicado para cada extracto (**Tabla 3.3.5**).

**Tabla 3.3.5:** Diámetro en mm del halo de hemólisis indirecta

PP						LV			
		X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>p</sub>	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>p</sub>
OTOÑO									
E+V	1	10	10	10	10	10	9	10	9,6
	A 2	10	10	10	10	10	8	10	9,3
	3	10	10	10	10	9	9	7	9,3
	1	10	10	10	10	9	9	8	8,6
	R 2	10	10	10	10	8	8	8	8
	3	10	10	10	10	8	9	9	8,6
	PRIMAVERA								
	1	10	10	10	10	9	10	9	9,6
	A 2	0	0	0	0	8	9	8	8,3
	3	10	10	10	10	8	8	8	8
	1	10	10	10	10	10	10	10	10
	R 2	8	9	8	8,3	10	10	10	10
	3	10	10	9	9,6	9	9	9	9
	VERANO								
	1	10	10	10	10	10	10	10	10
	A 2	6	7	6	6,3	10	10	10	10
	3	10	10	10	10	10	10	10	10
	1	10	10	10	10	8	9	9	8,6
R 2	10	10	10	10	10	10	10	10	
3	10	10	10	10	10	10	10	10	
V	DHM	10	10	10	10	10	10	10	10

**E+V:** extractos + DHM; **V:** DHM; **A:** partes aéreas; **R:** raíces; **1; 2; 3:** extracto acuoso, etanólico, hexánico; **X<sub>1</sub>; X<sub>2</sub>; X<sub>3</sub>:** diámetro (mm); **X<sub>p</sub>:** diámetro (mm) promedio.

Los diámetros de los halos de hemólisis medidos se expresaron como **% de restitución de la actividad inhibida** y se resumen en la **Tabla 3.3.6**. Se consideraron activos aquellos que produjeron una restitución de la actividad hemolítica indirecta **mayor o igual al 30%**.

**Capítulo 3**  
Actividad Alexitérica

**Tabla 3.3.6:** % Inhibición de la actividad hemolítica del veneno

	OTOÑO		PRIMAVERA		VERANO	
<b>Paso de la Patria</b>	Partes Aéreas	Raíces	Partes Aéreas	Raíces	Partes Aéreas	Raíces
Acuoso	-	-	-	-	-	-
Etanólico	-	-	<b>100%</b>	-	<b>37%</b>	-
Hexánico	-	-	-	-	-	-
<b>Lomas de Vallejos</b>						
Acuoso	-	-	-	-	-	-
Etanólico	-	-	-	-	-	-
Hexánico	-	-	-	-	-	-

Relación veneno-extracto 1:30. (-) Sin actividad. Los extractos patrones no mostraron actividad hemolítica indirecta.

Sólo los **extractos etanólicos de partes aéreas recolectados de PP en primavera y verano** resultaron ser capaces de inhibir significativamente la actividad hemolítica indirecta del veneno de *B. diporus* (más activos en primavera) (**Tabla 3.3.6**).

Estos extractos, **A2II PP** y **A2III PP**, fueron ensayados a distintas relaciones veneno-extracto para evaluar el comportamiento de la capacidad inhibitoria en función de esta relación (**Tablas 3.3.7 y 3.3.8**).

**Tabla 3.3.7:** Diámetro en mm del halo de hemólisis indirecta

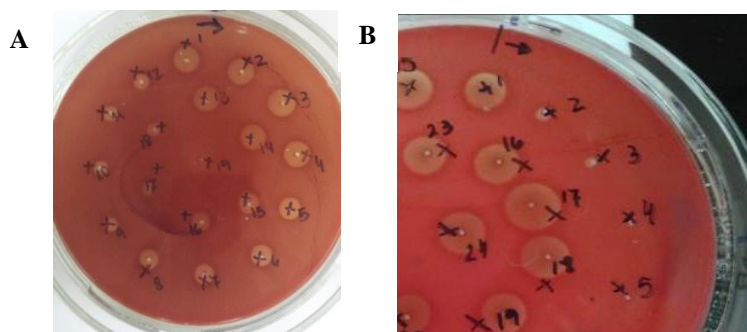
		A2II PP				A2III PP			
		X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>p</sub>	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>p</sub>
<b>E+V</b>	<b>1:5</b>	3	3	3	3	8	7	7	7,3
	<b>1:10</b>	2	2	2	2	7	6	6	6,3
	<b>1:20</b>	0	0	0	0	6	6	6	6
	<b>1:30</b>	0	0	0	0	6	7	6	6,3
	<b>1:40</b>	0	0	0	0	4	4	4	4
	<b>1:50</b>	0	0	0	0	4	4	4	4
<b>V</b>	<b>DHM</b>	10	10	10	10	10	10	10	10

**A2II PP:** extracto etanólico de partes aéreas recolectado en primavera de PP; **A2III PP:** extracto etanólico de partes aéreas recolectado en verano de PP. **E+V:** extractos + DHM; **V:** DHM; **1:5; 1:10; 1:20; 1:30; 1:40; 1:50:** relaciones veneno-extracto; **X<sub>1</sub>; X<sub>2</sub>; X<sub>3</sub>:** diámetro (mm); **X<sub>p</sub>:** diámetro (mm) promedio.

**Tabla 3.3.8:** % Inhibición de la actividad hemolítica a distintas relaciones veneno-extracto

<b>Relación V-E</b>	1:5	1:10	1:20	1:30	1:40	1:50
<b>Extracto etanólico de Partes Aéreas de Paso de la Patria Primavera</b>						
<b>%Inhibición</b>	74	83	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>
<b>Extracto etanólico de Partes Aéreas de Paso de la Patria Verano</b>						
<b>%Inhibición</b>	25	35	35	35	<b>60</b>	<b>60</b>

Esta capacidad inhibitoria de los extractos resultó ser dependiente directamente de la relación veneno-extracto utilizada. Al aumentar la relación veneno-extracto, aumenta la capacidad inhibitoria del extracto sobre el veneno (**Figura 3.3.3**).



**A: 13 y 14:** veneno; **5:** A2III PP. Relación veneno-extracto 1:30; **19:** A2II PP. Relación veneno-extracto 1:30. **B: 23 y 24:** veneno; **1:** A2II PP. Relación veneno-extracto 1:5; **2:** A2II PP. Relación veneno-extracto 1:10; **3:** A2II PP. Relación veneno-extracto 1:20; **4:** A2IIPP. Relación veneno-extracto 1:40; **5:** A2II PP. Relación veneno-extracto 1:50. **Figura 3.3.3:** Inhibición de la actividad hemolítica indirecta

Los resultados obtenidos para los ejemplares de PP completan la información obtenida por Torres *et al.* (2007) quienes también hallaron actividad hemolítica indirecta en los extractos etanólicos; y amplían respecto a otro origen edafológico no contemplado para los ejemplares de LV. Existe una gran variación edafológica y estacionaria en la actividad hemolítica indirecta de los extractos de la especie en estudio.

Respecto a *C. pareira* de otras regiones del mundo, estos resultados son coincidentes con los obtenidos por Saravia-Otten *et al.* (2015) en Guatemala, quienes tampoco hallaron actividad en los extractos etanólicos de raíces para el veneno de *B. asper*, en este caso, aunque no determinaron esta actividad para las partes aéreas de la especie, por lo cual no es posible determinar si la especie es activa o no en esta región.

### 3.3.3 Inhibición de la actividad coagulante

El veneno de yarará chica posee actividad pro-coagulante, provocando el acortamiento del tiempo de coagulación del plasma citratado (**TCV**), por lo que la inhibición de ésta actividad biológica por los extractos se analizó en función de la capacidad que tuvieron los mismos de restituir el tiempo de coagulación (**TC<sub>E+v</sub>**) hacia valores similares a los correspondientes al obtenido para un pool de plasma citratado (**TCN**).

Se obtuvo la dosis coagulante mínima del veneno (**DCM**) como aquella capaz de producir un acortamiento del tiempo de coagulación normal del pool de plasma a 60 segundos, resultando esta igual a **40 µg/mL**. Se incubaron los extractos con la **DCM** para

**Capítulo 3**  
Actividad Alexitérica

obtener el  $TC_{E+V}$  (*Tabla 3.3.9*); y también se obtuvo el tiempo de coagulación del pool de plasma utilizado (TCN).

*Tabla 3.3.9:* Tiempos de coagulación en segundos

		PP				LV			
		X <sub>1</sub> (s)	X <sub>2</sub> (s)	X <sub>3</sub> (s)	X <sub>p</sub> (s)	X <sub>1</sub> (s)	X <sub>2</sub> (s)	X <sub>3</sub> (s)	X <sub>p</sub> (s)
<b>OTOÑO</b>									
	<b>1</b>	64	67	61	64	78	75	76	76
<b>A</b>	<b>2</b>	<b>84</b>	<b>94</b>	<b>100</b>	<b>93</b>	<b>129</b>	<b>123</b>	<b>129</b>	<b>127</b>
	<b>3</b>	<b>111</b>	<b>112</b>	<b>121</b>	<b>115</b>	78	81	76	78
	<b>1</b>	56	60	59	58	79	80	82	80
<b>R</b>	<b>2</b>	61	62	66	63	77	79	76	77
	<b>3</b>	118	125	129	124	80	73	71	75
	<b>TCV</b>	54	61	62	<b>58</b>	69	66	68	<b>68</b>
	<b>TCN</b>	133	157	136	<b>140</b>	211	211	211	<b>211</b>
<b>PRIMAVERA</b>									
	<b>1</b>	84	83	79	82	76	83	85	81
<b>A</b>	<b>2</b>	<b>113</b>	<b>126</b>	<b>107</b>	<b>115</b>	<b>116</b>	<b>111</b>	<b>108</b>	<b>112</b>
	<b>3</b>	87	86	81	85	72	67	73	79
	<b>1</b>	84	87	80	84	91	86	80	86
<b>R</b>	<b>2</b>	93	88	96	92	94	94	87	92
	<b>3</b>	102	103	96	100	78	80	80	79
	<b>TCV</b>	67	68	66	<b>67</b>	67	68	66	<b>67</b>
	<b>TCN</b>	179	178	180	<b>179</b>	179	178	180	<b>179</b>
<b>VERANO</b>									
	<b>1</b>	94	94	87	92	98	104	102	101
<b>A</b>	<b>2</b>	<b>145</b>	<b>148</b>	<b>140</b>	<b>144</b>	<b>118</b>	<b>121</b>	<b>115</b>	<b>118</b>
	<b>3</b>	64	72	78	71	98	94	92	95
	<b>1</b>	91	100	93	95	95	84	87	87
<b>R</b>	<b>2</b>	98	88	86	91	74	73	77	75
	<b>3</b>	76	81	83	80	88	77	73	79
	<b>TCN</b>	48	56	54	<b>53</b>	48	56	54	<b>53</b>
	<b>TCV</b>	144	154	156	<b>151</b>	144	154	156	<b>151</b>

**E+V:** extracto + DCM; **A:** partes aéreas; **R:** raíces; **1; 2; 3:** extracto acuoso, etanólico, hexánico; **X<sub>1</sub>; X<sub>2</sub>; X<sub>3</sub>:** tiempo de coagulación (s); **X<sub>p</sub>:** tiempo de coagulación promedio (s). Relación veneno-extracto 1:15.

**TCV:** tiempo de coagulación del veneno (s); **TCN:** tiempo de coagulación del pool de plasma (s).

Con los tiempos de coagulación obtenidos (*Tabla 3.3.9*) se expresó la capacidad inhibitoria de la actividad coagulante del veneno como **% de restitución de la actividad coagulante** hacia valores normales (*Tabla 3.3.10*). Se consideraron activos aquellos

extractos que produjeron una inhibición mayor o igual al 30% de la actividad coagulante del veneno.

**Tabla 3.3.10:** % de Inhibición de la actividad coagulante del veneno

	OTOÑO		PRIMAVERA		VERANO	
<b>Paso de la Patria</b>	Partes Aéreas	Raíces	Partes Aéreas	Raíces	Partes Aéreas	Raíces
Extracto acuoso	-	-	-	-	40%	43%
Extracto etanólico	43%	-	<b>43%</b>	-	<b>93%</b>	-
Extracto hexánico	70%	80%	-	-	-	-
<b>Lomas de Vallejos</b>						
Extracto acuoso	-	-	60%	-	49%	-
Extracto etanólico	41%	-	40%	-	66%	-
Extracto hexánico	-	-	-	-	43%	-

Relación veneno-extracto 1:15. (-) Sin actividad. Ninguno de los extractos patrones mostró actividad coagulante.

Como ocurrió con las otras actividades del veneno, **los extractos etanólicos de partes aéreas** fueron los más activos, y particularmente aquellos obtenidos a partir del **material vegetal recolectado en PP en verano**. También se observó inhibición de esta actividad para los extractos hexánicos tanto de raíces como de partes aéreas recolectados en otoño del mismo sitio geográfico (**Tabla 3.3.10**).

Al igual que Saravia-Otten *et al.* (2017) quienes estudiaron la capacidad inhibitoria de la actividad coagulante de extractos etanólicos de raíces contra *B. asper*, tampoco los encontramos activos contra esta actividad en ninguno de los sitios geográficos de recolección, aunque es importante resaltar la relevancia de estudiar los distintos órganos activos de las plantas, dado que sí se detectó actividad en las partes aéreas.

Analizando los resultados obtenidos en el screening de las actividades *in vitro* sobre los distintos extractos de *C. pareira*, en líneas generales se pudo establecer que los mismos presentaron una variación edafológica: **los extractos recolectados en PP manifestaron una mayor actividad que los recolectados en LV**. Asimismo, se encontraron diferencias en la actividad alexitérica respecto a los órganos ensayados: **las partes aéreas resultaron más activas que las raíces** y también presentaron diferencias debidas al estado vegetativo de la especie: **en verano y primavera los extractos fueron más activos que en otoño**. Finalmente, la naturaleza del extracto también representó un factor de variabilidad en la actividad: **los extractos etanólicos resultaron ser más activos** que los acuosos y hexánicos.

### 3.4 Selección del extracto activo

Se seleccionaron los **extractos etanólicos** de partes aéreas recolectados en **PP**, más específicamente los recolectados en **primavera (A2II PP)** y **verano (A2III PP)** como los más activos. Teniendo en cuenta todas las actividades evaluadas (*Tabla 3.3.11*) se continuó el trabajo con el extracto **A2III PP** fraccionándolo por cromatografía en columna flash para enriquecer las fracciones en compuestos activos y permitir su caracterización química de los mismos.

*Tabla 3.3.11:* Resumen de actividades para los extractos seleccionados

Propiedad evaluada	PRIMAVERA	VERANO
Screening por SDS-PAGE	+++	<b>Borramiento total de bandas</b>
Rendimiento porcentual	7,69 %	<b>10,97 %</b>
Inhibición de actividad proteolítica	+++	++++
Inhibición de actividad hemolítica indirecta	<b>100 %</b>	37 %
Inhibición de actividad coagulante	43 %	<b>93 %</b>

### 3.5 Fraccionamiento en columna flash

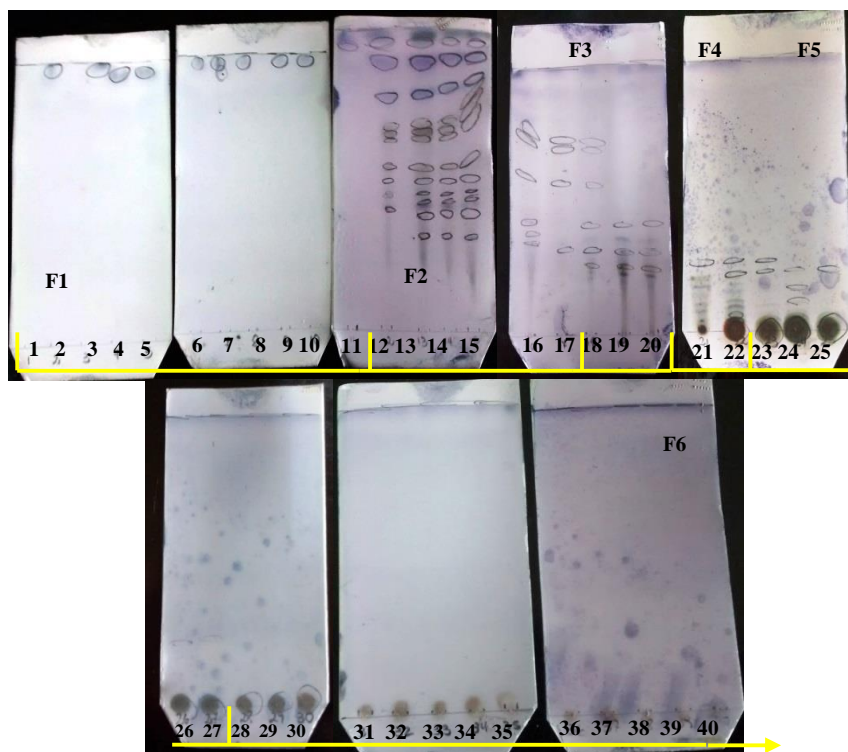
Se fraccionó por cromatografía flash en columna el extracto **A2III PP**. El eluido se recolectó en cincuenta y tres (53) tubos (*Figura 3.3.4*) que se agruparon según el perfil obtenido por TLC en seis (6) fracciones (*Figura 3.3.5*) (*Tabla 3.3.12*).

*Tabla 3.3.12:* Agrupación del eluido en fracciones según perfil por TLC

Fracción	Tubo	Observaciones
<b>1</b>	<b>1-11</b>	<b>365nm:</b> fluorescencia azul en frente de corrida; <b>Anisaldehído sulfúrico:</b> mancha azul en frente de corrida.
<b>2</b>	<b>12-17</b>	<b>365nm:</b> fluorescencia roja en mitad superior de la placa coincidente con manchas verdes a simple vista. Fluorescencia azul en frente de corrida; <b>Anisaldehído sulfúrico:</b> múltiples manchas violetas, marrones y azules.
<b>3</b>	<b>18-20</b>	<b>365nm:</b> fluorescencia roja en mitad de placa coincidente con mancha amarilla a simple vista; <b>Anisaldehído sulfúrico:</b> sin manchas violetas cercanas al frente de corrida.
<b>4</b>	<b>21-22</b>	<b>365nm:</b> fluorescencia roja en mitad inferior de la placa; <b>Anisaldehído sulfúrico:</b> múltiples manchas en mitad inferior de la placa. Mancha roja en el punto de siembra.
<b>5</b>	<b>23-27</b>	<b>Anisaldehído sulfúrico:</b> mancha roja en centro y verde en borde, en punto de siembra.
<b>6</b>	<b>28-53</b>	<b>Anisaldehído sulfúrico:</b> mancha roja en punto de siembra. (mancha de interés)



**Figura 3.3.4:** Tubos eluidos de la cromatografía flash en columna



**Fase móvil:** tolueno-acetato de etilo 90 + 10; **revelador:** anisaldehído sulfúrico. Los tubos N° 41 al 53 tuvieron el mismo perfil cromatográfico que los tubos N° 28 a 40 y se reunieron en F6. **Figura 3.3.5:** TLC de los tubos eluidos de la cromatografía flash.

### 3.5.1 Rendimiento porcentual de las fracciones

Una vez agrupadas las fracciones como se indicó en la **Tabla 3.3.12** se evaporó a presión reducida el solvente y, con los extractos secos, se realizó el cálculo del rendimiento práctico porcentual para determinar la cantidad de fracción que se obtuvo por cada 100 g de **A2III PP** (extracto entero fraccionado). Los valores del rendimiento práctico porcentual que se exponen en la **Tabla 3.3.13** se calcularon como sigue:

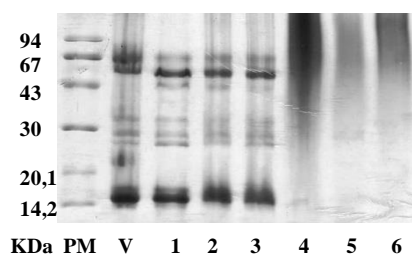
gramos de A2III PP	→	gramos de fracción obtenida
100 g de A2III PP	→	X g % de fracción obtenida

**Tabla 3.3.13:** Rendimiento porcentual de las fracciones obtenidas

Fracción	1	2	3	4	5	6
Rendimiento porcentual (%)	21,48	11,26	6,6	6,1	18,32	45,62

### 3.5.2 Seguimiento de la actividad biológica de las fracciones

La actividad biológica de las fracciones se siguió por SDS-PAGE (*Figura 3.3.6*).

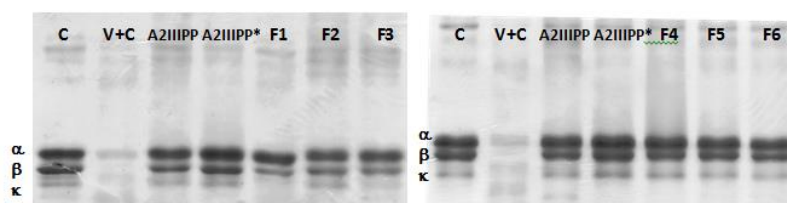


**PM:** patrón de peso molecular; **V:** veneno; **1; 2; 3; 4; 5 y 6:** fracciones de A2III PP. *Figura 3.3.6:* SDS-PAGE de las fracciones obtenidas

Las fracciones polares **4, 5 y 6** resultaron ser las más activas produciendo un borramiento total de las bandas del veneno. Se realizaron las pruebas de inhibición de las actividades del veneno por las fracciones obtenidas para verificar si alguna de ellas fue enriquecida en los componentes bioactivos como es de prever según los resultados de la SDS-PAGE. Los geles de electroforesis SDS-PAGE correspondientes a la inhibición de la actividad proteolítica de las fracciones se exponen en la *Figura 3.3.7*. Los halos de hemólisis para la inhibición de la actividad hemolítica indirecta se exponen en la *Tabla 3.3.14* y los tiempos de coagulación de la inhibición de la actividad coagulante en la *Tabla 3.3.15*.

Las inhibiciones de las actividades se expresaron como **% de restitución de la actividad inhibida**, tal como se explicó en los apartados **3.3.2 Inhibición de la actividad hemolítica indirecta** y **3.3.3 Inhibición de la actividad coagulante** del presente capítulo.

En la *Tabla 3.3.16* se expone un resumen de las actividades *in vitro* de las fracciones.



**C:** caseína;  **$\alpha$ ;  $\beta$  y  $\kappa$ :** bandas de caseína; **V+C:** veneno + caseína; **A2III PP:** extracto entero fraccionado + veneno + caseína; **A2III PP\*:** extracto entero fraccionado + caseína; **F:** fracción + veneno + caseína; **1; 2; 3; 4; 5 y 6:** fracciones 1, 2, 3, 4, 5 y 6 respectivamente. Relación veneno-extracto 1:30. *Figura 3.3.7:*

Electroforesis SDS-PAGE con caseína



**Tabla 3.3.14:** Diámetro en mm del halo de hemólisis indirecta producida por el veneno de *B. diporus*

		<b>X<sub>1</sub></b>	<b>X<sub>2</sub></b>	<b>X<sub>3</sub></b>	<b>X<sub>p</sub></b>
<b>E+V</b>	<b>F1</b>	11	10	11	10,3
	<b>F2</b>	11	8	9	9,3
	<b>F3</b>	<b>9</b>	<b>8</b>	<b>8</b>	<b>8,3</b>
	<b>F4</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
	<b>F5</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
	<b>F6</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>V</b>	<b>DHM</b>	11	11	11	11

**E+V:** extracto + DHM; **V:** DHM; **F1; F2; F3; F4; F5; F6:** fracciones de A2III PP; **X<sub>1</sub>; X<sub>2</sub>; X<sub>3</sub>:** diámetro (mm); **X<sub>p</sub>:** diámetro (mm) promedio. Relación veneno-extracto 1:20

**Tabla 3.3.15:** Tiempo de coagulación en segundos

		<b>X<sub>1</sub></b>	<b>X<sub>2</sub></b>	<b>X<sub>3</sub></b>	<b>X<sub>p</sub></b>
<b>E+V</b>	<b>F1</b>	89	90	94	91
	<b>F2</b>	77	75	70	74
	<b>F3</b>	76	74	77	76
	<b>F4</b>	<b>152</b>	<b>148</b>	<b>145</b>	<b>148</b>
	<b>F5</b>	<b>160</b>	<b>163</b>	<b>162</b>	<b>162</b>
	<b>F6</b>	<b>158</b>	<b>160</b>	<b>162</b>	<b>160</b>
	<b>TCV</b>	62	64	63	<b>63</b>
	<b>TCN</b>	133	149	162	<b>148</b>

**E+V:** extractos + DCM; **F1; F2; F3; F4; F5; F6:** fracciones de A2III PP; **X<sub>1</sub>; X<sub>2</sub>; X<sub>3</sub>:** tiempo de coagulación (s); **X<sub>p</sub>:** tiempo de coagulación promedio (s); **TCV:** tiempo de coagulación del veneno (s); **TCN:** tiempo de coagulación del pool de plasma (s). Relación veneno-extracto 1:15.

**Tabla 3.3.16:** Resumen de las inhibiciones de las actividades *in vitro* del veneno

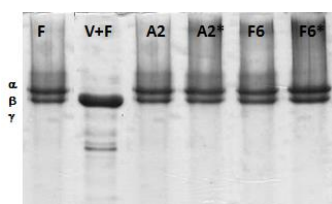
<b>Actividad Inhibida</b>	<b>F1</b>	<b>F2</b>	<b>F3</b>	<b>F4</b>	<b>F5</b>	<b>F6</b>
<b>Proteólisis</b>	++	+++	++	++++	++++	++++
<b>Hemólisis</b>	-	-	-	100%	100%	100%
<b>Coagulación</b>	34%	-	-	100%	100%	100%

**F1; F2; F3; F4; F5; F6:** fracciones de A2III PP. (-) Sin inhibición de la actividad; (++) moderada inhibición de la actividad; (+++) fuerte inhibición de la actividad; (++++ total inhibición de la actividad.

Las fracciones polares **4, 5 y 6** presentaron la máxima capacidad inhibitoria de las actividades del veneno (**Tabla 3.3.16**). Como se desarrollará extensamente en el **Capítulo 5: Química**, la composición química de estas fracciones es diferente y, dada su actividad biológica, se seleccionará aquella que tenga menor cantidad de componentes, asumiendo que éstos serían los de interés biológico, dada su actividad.

### 3.6 Inhibición de la actividad fibrinogenolítica del veneno

La actividad fibrinogenolítica se evaluó por SDS-PAGE con fibrinógeno permitiendo observar las bandas  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  correspondientes al fibrinógeno. Cuando el fibrinógeno se incubó con el veneno se produjo la degradación de las cadenas polipeptídicas del mismo, observándose en el gel bandas de menor peso molecular. Cuando se incubó el extracto/fracción activa con el veneno, se produjo la inhibición de esta actividad y, por lo tanto, la observación de las bandas del fibrinógeno. Además, se sembraron calles con extracto/fracción sin veneno, como patrones, para el análisis de proteínas vegetales que pudieran interferir con la interpretación del resultado (**Figura 3.3.8**).



**F:** fibrinógeno;  **$\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ :** bandas correspondientes al fibrinógeno; **V+F:** veneno + fibrinógeno; **A2:** extracto etanólico de partes aéreas + veneno + fibrinógeno; **A2\*:** extracto etanólico de partes aéreas + fibrinógeno; **F6:** Fracción 6 + veneno + fibrinógeno; **F6\*:** Fracción 6 + fibrinógeno. Relación veneno-extracto 1:30. **Figura 3.3.8:** Inhibición de la actividad fibrinogenolítica del veneno por SDS-PAGE + fibrinógeno

Tanto el extracto etanólico de partes aéreas recolectado en PP en verano (**A2III PP**) como la fracción polar (**F6**) inhibieron totalmente la actividad fibrinogenolítica del veneno, y ninguno de los extractos patrones ensayados presentó proteínas que pudieran dificultar la interpretación del resultado.

## 4. Conclusiones

Se encontró actividad alexitérica en la especie autóctona *C. pareira* contra veneno de *B. diporus*, confirmando de esta manera la tradición de uso etnofarmacológico de la misma (Ricciardi *et al.*, 1996; Montenegro, (1970 – reeditado 2007); Manfred, 1977; Jolís, 1972; González-Torres, 1997; Chakraborty & Bhattacharjee, 2006; Sankaranarayanan *et al.*, 2010; Jabeen *et al.*, 2009; Ramos-Hernandez *et al.*, 2007; Morten, 1981).

Esta actividad resultó ser variable frente a factores tanto edafológicos como estacionales, además de la variabilidad inherente a la polaridad de cada extracto y órgano activo de la especie ensayado.

Los extractos de Paso de la Patria fueron más activos que los de Lomas de Vallejos y a su vez, las partes aéreas más activas que las raíces, observándose en los extractos etanólicos de partes aéreas recolectados de Paso de la Patria en verano **A2 III PP** un borramiento total de bandas del veneno en el screening de actividad alexitérica por SDS-PAGE.

A través del fraccionamiento bio guiado por SDS-PAGE se obtuvieron 6 fracciones, enriqueciéndose 3 de ellas en componentes bioactivos, logrando el máximo de actividad contra veneno. Para continuar el estudio fue seleccionada la fracción polar F6, los motivos se detallan en el **Capítulo 5: Química**.

Cabe destacar que es la primera vez que se valida objetivamente la actividad de la especie *C. pareira* frente a *B. diporus*, encontrándose únicamente documentos respecto a su actividad sobre *B. asper* (Badilla *et al.*, 2008; Saravia-Otten *et al.*, 2015 y 2017).

A partir de estos resultados, se consideró completa la etapa de screening y ensayos *in vitro*. Tomando como referencia los datos obtenidos, el trabajo se continuó a través de ensayos *in vivo* con las fracciones aquí seleccionadas.

## 5. Referencias bibliográficas

- Badilla, B.; Chaves, F.; Jimenez, S.; Rodriguez, G.; Poveda, L. (2008). Effects of an extract of *Cissampelos pareira* on the hemorrhagic and proteolytic activities from *Bothrops asper* venom. *Pharmacognosy Magazine*, 4, 27-31.
- Camargo, F.; Torres, A.; Ricciardi, G.; Ricciardi, A.; Dellacassa, E. (2011). SDS-PAGE: una herramienta útil en la evaluación preliminar de la actividad alexitérica de extractos vegetales. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 10, 429-434.
- Carnevali, R. (1994). Fitogeografía de la provincia de Corrientes. Gobierno de la Provincia de Corrientes. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. *Ed. del Autor*.
- Chakraborty, M.; Bhattacharjee, A. (2006). Some common ethnomedicinal uses of various diseases in Purulia district, West Bengal. *Indian Journal of Traditional Knowledge*, 5, 554-558.
- 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*, E-015.
- Gené, J.; Roy, A.; Rojas, G.; Gutiérrez, J.; Cerdas, L. (1989). Comparative study on coagulant, defibrinating, fibrinolytic and fibrinogenolytic activities of Costa Rican crotaline snake venoms and their neutralization by a polyvalent antivenom. *Toxicon*, 27, 841-848.
- González Torres, D. (1997). Catálogo de Plantas Medicinales (y alimenticias y útiles) Usadas en Paraguay. Asunción, 51, 258.

- Gutiérrez, J.; Ávila, 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.
- Jabeen, A.; Khan, M.; Ahmad, M.; Zafar, M.; Ahmad, F. (2009). Indigenous uses of economically important flora of Margallah Hills National Park, Islamabad, Pakistan. *African Journal of Biotechnology*, 8, 763-784.
- Jolí, J. (1972). Ensayo sobre la historia natural del Gran Chaco. Faenza 1789, Traducción de Ma. L. Acuña, edición UNNE (Resistencia).
- Manfred L. (1977). 7000 Recetas botánicas a base de plantas medicinales. 11a Ed. Kier, Buenos Aires.
- Melo, P.; Do Nascimento, M.; Mors, W.; Suarez Kurtz, G. (1994). Inhibition of the myotoxic and hemorrhagic activities of crotalid venoms by *Eclipta prostrata* (Asteraceae) extracts and constituents. *Toxicon*, 32, 595-603.
- Montenegro P. (1979 - Reedición 2007). Materia médica misionera. Editorial Universitaria, Universidad Nacional de Misiones.
- Morten, J. (1981). Atlas of medicinal plants of Middle America. Charles C. (Ed.). Thomas publishers. Springfield, IL.
- Otero, R.; Nuñez, V.; Jimenez, S.; Fonnegra, R.; Osorio, R.; García M.; Díaz, A. (2000). Snakebites and ethnobotany in the northwest region of Colombia Part II. Neutralization of lethal and enzymatic effects of *Bothrops atrox* venom. *Journal of Ethnopharmacology*, 71, 505-524.
- Otero, R.; Nuñez, V.; Osorio, R.; Gutiérrez, J.; Giraldo, C.; Posada, L. (1995). Ability of six Latin American antivenoms to neutralize the venom of mapana equis (*Bothrops atrox*) from Antioquia and Chocó (Colombia). *Toxicon*, 33, 809-815.
- Pardo, M.; Natalucci, C. (2002). Electrophoretic analysis (tricine-SDS-PAGE) of bovine caseins. *Acta Farmacéutica Bonaerense*, 21, 57-60.
- Peichoto, M., Mackessy, S., Teibler, P., Tavares, F., Burckhardt, P., Breno, M., Acosta, O., Santoro, M. (2007). Purification and characterization of a cysteine-rich secretory protein from *Philodryas patagoniensis* snake venom. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 150, 79-84.
- Peichoto, M.; Leiva, L.; Acosta, O.; Maruñak, S.; Ruíz, R.; Teibler, P. (2003). Caracterización del veneno de *Philodryas patagoniensis* del Nordeste de Argentina. *Comunicaciones Científicas y Tecnológicas*. E-068.
- Pilosof, A.; Bartholomai, G. (2000). Caracterización funcional y estructural de proteínas. CYTED- Eudeba, Buenos Aires. 159-166.
- Ramos-Hernandez M., Avila-Bello C., Morales-Mávil J. (2007). Etnobotánica y ecología de plantas utilizadas por tres curanderos contra la mordedura de serpientes en la región de Acayucan, Veracruz, México. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, 81, 91-102.
- Ricciardi A., Caballero E., Chifa C. (1996). Identificación botánica de plantas descritas en “Materia Médica Misionera” usadas en accidentes ofídicos. *Rojasiana*, 3, 239-245.
- Sankaranarayanan, S.; Bama, P.; Ramachandran, J.; Kalaichelvan, P.; Deccaraman, M.; Vijayalakshimi, M.; Dhamotharan, R.; Dananjeyan, B.; SathyaBama S. (2010). Ethnobotanical study of medicinal

- plants used by traditional users in Villupuram district of Tamil Nadu, India. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4, 1089-1101.
- Saravia-Otten, P.; Hernández, R.; Gutiérrez, J.; Mérida, M.; Cáceres, A. (2015). Evaluación de la capacidad neutralizante de extractos de plantas de uso popular en Guatemala como antídotos para el envenenamiento por la mordedura de *Bothrops asper*. *Ciencia, Tecnología y Salud*, 2, 25-37.
- Saravia-Otten, P.; Hernández, R.; Marroquín, N.; García, G.; Mérida, M.; Cruz, S.; Orozco, N.; Cáceres, A.; Gutiérrez, J. (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*, 4, 203-216.
- Theakston, R.; Reid, H. (1983). Development of simple standard assay procedures for the characterization of snake venom. *Bulletin WHO*, 61, 949-956.
- Torres, A.; Camargo, F.; Ricciardi, G.; Dellacasa, E.; Ricciardi, A. (2007). Study of antihemolytic activity of *Cissampelos pareira* extract against poison of *Bothrops neuwiedi diporus* (COPE) (yarará chica). *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 6, 280-284.

**3b:**  
**Inhibición de citotoxicidad**  
**y ensayos *in vivo***



## 1. Introducción

El desarrollo de nuevos *medicamentos herbarios* a partir de productos naturales extraídos de plantas medicinales requiere no solo de un exhaustivo estudio *in vitro*, sino también de la validación científica de las propiedades alexitéricas *in vivo*. En este sentido, en la actualidad, los estudios *in vivo* se encuentran estrictamente regulados y se requieren modelos experimentales intermedios para avalar el testeo de nuevos *fitofármacos* en animales de experimentación.

En 1959, Russell & Burch publicaron el libro *The Principles of Humane Experimental Technique* e introdujeron el concepto de **las tres R** en el que hacen alusión al **reemplazo** de los animales de experimentación por otros métodos alternativos que no impliquen su uso, la **reducción** de su número cuando sea necesario utilizarlos y la **refinación** de técnicas para aminorar su sufrimiento. Dentro de la batería de ensayos *in vitro* como métodos de toxicología alternativa útiles y necesarios para el registro y solicitud de ensayos *in vivo*, se encuentran los llamados ensayos de citotoxicidad (Huggins, 2003).

Como antecedentes de citotoxicidad relacionados a *C. pareira* puede mencionarse a la *cissampareina*, alcaloide citotóxico contra células tumorales (Kupchan *et al.*, 1965). Otro estudio demuestra citotoxicidad sobre células KB SiHa de los ácidos oleanólico y oleico extraídos del extracto hexánico de raíces (Bala *et al.*, 2014). En este sentido, estos compuestos no interfirieron en las determinaciones realizadas, dado que, como se verificó en el **Capítulo 5: Química**, la fracción con actividad alexitérica **F6** no posee alcaloides ni ácidos grasos.

Respecto de los venenos del género *Bothrops* sp., éstos son tóxicos para una gran variedad de células tanto *in vivo* como *in vitro*, sin embargo, los estudios sobre las acciones citotóxicas de los venenos de *Bothrops* de la Argentina son relativamente escasos. El estado de situación de la acción directa de los venenos sobre cultivos celulares se expone a continuación:

✓ Bustillo *et al.* (2009) evaluaron la acción citotóxica de los venenos de *B. alternatus* y *B. diporus* sobre mioblastos murinos, C2C12. Ambos venenos indujeron una disminución rápida y temprana de la viabilidad celular con una concentración citotóxica 50 (CC50) para *B. diporus* de **2 µg/mL** y **5,8µg/mL** para *B. alternatus*, por un mecanismo de apoptosis;

✓ Echeverría *et al.* (2009) evaluaron la acción del veneno de *B. alternatus* sobre los macrófagos murinos Raw 264.7 y encontraron que el veneno produjo una disminución



de la viabilidad celular proporcional a las concentraciones ensayadas, determinando una CC50 de **28,53 µg/mL**, mediante un mecanismo de apoptosis;

✓ García-Denegri *et al.* (2010) no encontraron citotoxicidad sobre la fosfolipasa ácida A2 del veneno de *B. alternatus* y, en concordancia con este resultado, otra fosfolipasa ácida aislada de *B. asper* por Fernández *et al.* (2010) fue incapaz de lisar los mioblastos C2C12;

✓ Posteriormente, Bustillo *et al.* (2012) también determinaron que *baltergina*, metaloproteasa aislada de *B. alternatus* fue capaz de desencadenar la apoptosis de células normales o cancerígenas de la línea celular tumoral mamaria murina LM3 y, además, actuar de forma sinérgica con las fosfolipasas ácidas del veneno para inducir citotoxicidad en células C2C12.

Lo anteriormente expuesto demuestra, para el extracto seleccionado y en el marco de las actividades en estudio, la necesidad de evaluar varios aspectos relacionados con la problemática de la citotoxicidad:

✓ en primer lugar, se debe evaluar si la fracción activa investigada como posible *fitofármaco* es citotóxica *per se*;

✓ por otro lado, es necesario conocer la capacidad de esta fracción activa para inhibir la citotoxicidad propia del veneno.

Para poder cumplir con estos objetivos se utilizó como herramienta el cultivo celular de la línea de mioblastos murinos C2C12.

Una vez completada la etapa de estudios *in vitro*, se realizaron estudios *in vivo* para evaluar no solo la capacidad inhibitoria del veneno, sino también la toxicidad aguda de la fracción activa **F6** mediante ensayos de inhibición de la actividad letal.

Además, se consideró necesario buscar alternativas e investigar acerca de inhibidores de los efectos ocasionados a nivel local por el veneno de yarará chica, como necrosis y pérdida de tejidos afectados, los cuales no son revertidos por la sueroterapia actualmente en uso. Este aspecto se encarará mediante la preparación y administración de una formulación tópica (gel termosensible) de la fracción activa **F6** en un modelo murino.

## **2. Materiales y Métodos**

### **2.1 Análisis de la citotoxicidad del extracto A2III PP y la fracción F6. Inhibición de la citotoxicidad del veneno de *B. diporus* por F6**

Los ensayos de citotoxicidad sobre líneas celulares son capaces de detectar, los efectos adversos de interferencia con la estructura y/o propiedades esenciales para la

supervivencia celular, proliferación y desarrollo de sus funciones. Dentro de estos se encuentran la integridad de la membrana y del citoesqueleto, metabolismo, síntesis y degradación, liberación de constituyentes celulares o productos, regulación iónica y división celular (Repetto, 2002).

La aplicación de este tipo de ensayos al estudio de plantas alexitéricas, presenta una doble utilidad ya que permiten cumplir dos fines diferentes: en primer lugar, el de evaluar la citotoxicidad del extracto vegetal/fracción que posee el/los compuestos alexitéricamente activos; y, por otro lado, evaluar la capacidad que tienen estos mismos extractos/fracciones de inhibir la actividad citotóxica del veneno ofídico.

### 2.1.1 Línea celular y mantenimiento

Se utilizaron células miogénicas de la línea C2C12 (ATCC®: CRL-1772™), subclon de la línea celular de ratón establecida por Yaffe & Saxel, (1977).

La línea celular se mantuvo a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> en Dulbecco's Minimum Essential Medium (DMEM) (GIBCO-Invitrogen) con el agregado de 5% de suero fetal bovino (SFB) inactivado por calor (Natocor®), L-glutamina (29,2 mg/mL), penicilina (10.000 unidades/mL) y estreptomycin (10.000 µg/mL) (GIBCO-Invitrogen) como antibióticos.

### 2.1.2 Ensayos de citotoxicidad

Se realizaron según la técnica descrita por Bustillo *et al.* (2012). Tanto **A2III PP** como su fracción activa **F6** son solubles en etanol, por lo que fue necesario analizar previamente la cantidad máxima de etanol 96° en la que podían disolverse los extractos sin causar citotoxicidad sobre las células de la línea C2C12 (**Tabla 3.2.3**).

**Tabla 3.2.3:** Esquema de trabajo: curva de citotoxicidad de etanol 96° sobre células C2C12

% Etanol	Etanol 96° (µL)	DMEM (µL)	% Etanol	Etanol 96° (µL)	DMEM (µL)
<b>0,00</b>	-	200	<b>2,50</b>	5	195
<b>0,25</b>	0,5	199,5	<b>5,00</b>	10	190
<b>0,50</b>	1	199	<b>7,50</b>	15	185
<b>1,00</b>	2	198	<b>10,00</b>	20	180
<b>1,50</b>	3	197	<b>12,50</b>	25	175
<b>2,00</b>	4	196	-	-	-

Para los ensayos de citotoxicidad/inhibición de la citotoxicidad se utilizaron las células obtenidas de monocapas subconfluentes. Las células resuspendidas fueron sembradas en microplacas de 96 pocillos, a una densidad inicial de 1,5-2,5 x 10<sup>4</sup> células

por pocillo, en medio de crecimiento DMEM-5% SFB. Cuando las monocapas alcanzaron 80-90% de confluencia, se retiró el medio de cultivo y se sembraron las muestras según el esquema de la **Tabla 3.2.4**.

**Tabla 3.2.4:** Esquema de trabajo para determinación de citotoxicidad de A2III PP y de la capacidad inhibitoria de la citotoxicidad del veneno por A2III PP y F6

		<b>A2III PP</b>	<b>F6</b>	<b>V</b>	<b>DMEM -</b>
		<b>50-600 µg/mL</b>	<b>50-600 µg/mL</b>	<b>8 µg/mL</b>	<b>SFB 5%</b>
		<b>DMEM-1,5%</b>	<b>DMEM-1,5%</b>	<b>DMEM</b>	
		<b>etanol 96°</b>	<b>etanol 96°</b>		
<b>Citotoxicidad</b>	A2III PP	100 µL	-	-	100 µL
	F6	-	100 µL	-	100 µL
	V	-	-	100 µL	100 µL
<b>Inhibición de citotoxicidad</b>	A2III PP + V (pre-incubación 30 min 37°C)	100 µL	-	100 µL	-
	F6 + V (pre-incubación 30 min 37°C)	-	100 µL	100 µL	-
<b>Control</b>	DMEM	-	-	-	200 µL

Luego de 3 h de incubación, la viabilidad celular se cuantificó por tinción con cristal violeta. Las células no adherentes se eliminaron lavando dos veces con solución salina tamponada con buffer fosfato (PBS) y las células adherentes se fijaron con metanol-ácido acético glacial (3:1) y, posteriormente se tiñeron con cristal violeta 0,5% en metanol al 20% (v/v). El colorante se liberó de las células mediante la adición de etanol-ácido acético glacial (3:1). La densidad óptica de la solución liberada se determinó a 620 nm. El porcentaje de viabilidad celular se calculó comparando las absorbancias resultantes de los pocillos con muestras con la absorbancia media de los pocillos utilizados como control (Yamamoto *et al.*, 2001). Se realizaron tres ensayos independientes y cada determinación por triplicado.

## 2.2 Inhibición de las actividades del veneno: ensayos *in vivo*

Los ensayos *in vivo* se llevaron a cabo en el Laboratorio de Toxicología anexo a la cátedra de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Ciencias Veterinaria de la UNNE (FaCV-UNNE). En todos los casos, se trabajó bajo los principios internacionalmente aceptados para el uso de animales de experimentación de la European Community guidelines (EEC-Directive of 1986; 86/609/EEC) y la guía de USA (NIH

publication #85-23-1985). Además, el protocolo aplicado fue aprobado por el Comité de Bioética de la Facultad de Cs. Veterinarias (FCV-UNNE Expte. N° 14-2012-00503).

### 2.2.1 Neutralización del efecto letal del veneno

Se trabajó con ratones de 18-20 g cepa *CF1*, utilizando el protocolo de la WHO, 1981 con grupos de cuatro ratones inyectados por vía intraperitoneal (IP) (*Figura 3.2.11*), registrando el número de ratones muertos a las 48 h, tomando como valor de DL50 para *B. diporus*: **38,18 µg/ratón** (Maruñak *et al.*, 2010). Las condiciones estériles de trabajo se lograron con filtros de 0,2 µm y preparando soluciones bajo campana de flujo laminar.

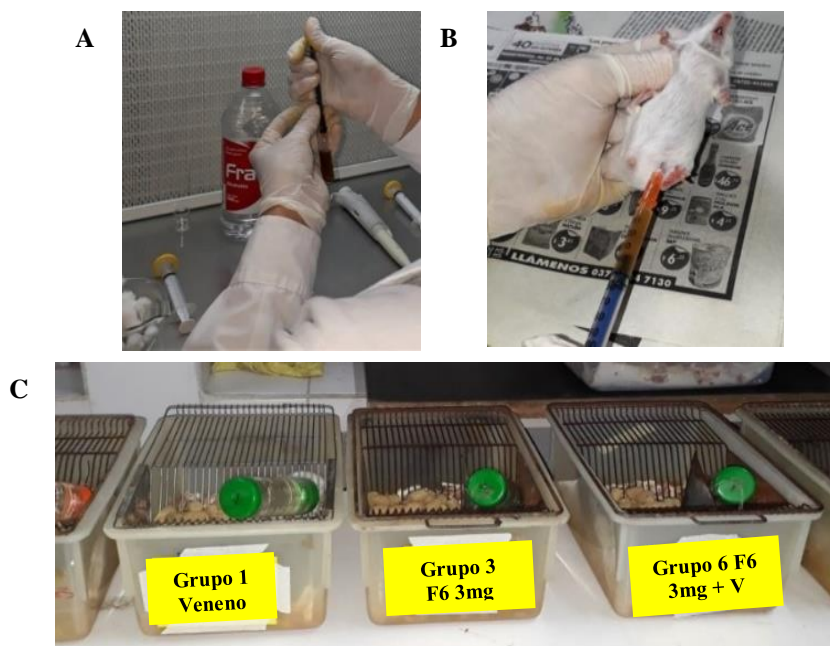
#### Preparación de soluciones

✓ **Solución de veneno:** dosis de reto 4DL50 (1530 µg/mL) en buffer PBS;

✓ **Solución extracto/fracción:** 5 mg de extracto activo **A2III PP** y 3 mg/5 mg de fracción activa **F6**;

✓ **Solución veneno + extracto/fracción:** 20 mg de **A2III PP** y/o 10 mg de **F6** disueltos en PEG400-etanol 96°-PBS (10:10:80) e incubados con 0,1 mL de la solución veneno 30 minutos a 37°C. Las diluciones fueron calculadas de acuerdo a las cantidades que mostraron actividad *in vitro* (relación veneno-extracto 1:30). Volumen de inyección IP para todos los casos: 0,5 mL.

El esquema de trabajo utilizado se detalla en la *Tabla 3.2.5*.



**A:** preparación de las soluciones para inyección; **B:** inyección IP; **C:** ratones en bioterio durante el ensayo. *Figura 3.2.11:* Ensayo de neutralización del efecto letal del veneno

**Tabla 3.2.5:** Esquema de trabajo para inyección IP en ensayo de neutralización del efecto letal del veneno.

Grupo (n=4)	V 4DL50	A2III PP*	F6*
1	153 µg	-	-
2	-	5 mg	-
3	-	-	3 mg
4	-	-	5 mg
5	153 µg	5 mg	-
6	153 µg	-	3 mg
7	153 µg	-	5 mg

V: veneno de *B. diporus*; F6: fracción activa de A2III PP, A2III PP: extracto etanólico de partes aéreas recolectado en verano de PP; \*mg utilizados por ratón de 18-20 q.

## 2.2.2 Neutralización del efecto local del veneno por una formulación de gel termosensible al 1% en fracción activa

### Formulación del gel termosensible de aplicación tópica

Se utilizó un 1% de la fracción polar activa F6, 10% de etanol 96° como disolvente, 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) y 80% de una combinación de poloxámero 407 y 188. El preparado con propiedades termo-reversibles, se presentó en estado líquido a temperatura ambiente, lo que facilitó su administración y gelificó a 37°C permitiendo mayor permanencia y liberación prolongada en el sitio de aplicación (**Figura 3.2.12**).



**Figura 3.2.12:** Gel termosensible al 1% en F6

### Determinación de la dosis dermonecrotizante

Se determinó la dosis dermonecrotizante del veneno (DDV), es decir, la cantidad de veneno que, inyectada por vía intradérmica (ID), produce un halo de necrosis del tejido epitelial mayor a 5 mm (lesiones evidentes) a las 48 h, sin provocar la muerte del ratón (Theakston & Reid, 1983). Esta dosis fue utilizada para la validación de la efectividad de la formulación de gel termosensible y para determinarla se trabajó con ratones de la cepa *Balb-c* de 18-20 g de peso corporal, distribuidos en grupos de cuatro animales cada uno (n=4), que se inyectaron ID con distintas dosis de veneno de *B. diporus* disuelto en buffer PBS (pH 7,2). El volumen inyectado fue de 0,1 mL y los ratones controles recibieron 0,1

mL de buffer PBS libre de veneno. Se observaron y registraron las lesiones macroscópicas a las 48 h de realizada la inoculación del veneno.

### **Validación *in vivo* de la efectividad de la formulación**

La DDV de *B. diporus* se administró por dos vías diferentes: ID y subcutánea (SC). El gel se aplicó sobre la piel afeitada del lomo 15 minutos después de producida la inoculación en ratones de cepa *Balb-c* (n=4) y luego, cada 12 h, durante 72 h; continuando su aplicación hasta completar los 7 días cada 24 h, como se detalla en la **Tabla 3.2.6**. La mitad de los ratones de cada grupo fue sacrificada a las 72 horas y el resto a los 7 días post inoculación. El sacrificio de los animales se realizó aplicando una combinación de clorhidrato de ketamina (100 mg/kg) y clorhidrato de xilacina (30 mg/kg).

**Tabla 3.2.6:** Esquema de trabajo utilizado para la validación de la efectividad del gel termosensible

Grupo	Descripción
<b>Control: C</b> (n=4)	Aplicación tópica del gel.
<b>V (ID)</b> (n=4)	200 µg veneno en 0,1 mL buffer PBS inoculado por vía ID
<b>V+C (ID)</b> (n=4)	200 µg veneno en 0,1 mL buffer PBS inoculado por vía ID
(veneno ID + crema)	Aplicación de crema según esquema detallado anteriormente
<b>V (SC)</b> (n=4)	200 µg veneno en 0,1 mL buffer PBS inoculado por vía SC
<b>V+C (SC)</b> (n=4)	200 µg veneno en 0,1 mL buffer PBS inoculado por vía SC
(veneno SD + crema)	Aplicación de crema según esquema detallado anteriormente

Los resultados fueron registrados observando las características macroscópicas y microscópicas de las lesiones producidas 3 y 7 días posteriores a la inoculación del veneno. El análisis microscópico se realizó utilizando un microscopio binocular *Zeiss Primo Star* con cámara fotográfica *AixonCam ERc 5s* para el registro de las imágenes. De este modo, se observó cómo afectó la aplicación del gel en la aparición de necrosis al día 3 y si su aplicación fue capaz de mejorar la regeneración de los tejidos observada al día 7. Cada fragmento fue fijado en formaldehído bufferado 10% (p/v) durante 24 h para luego ser procesados con técnicas histológicas clásicas y coloreados con hematoxilina-eosina (Prophet, 1995).

✓ **Procesamiento.** En tres etapas: 1) deshidratación: colocando las muestras en baños sucesivos de soluciones de etanol de concentración creciente (70°, 80°, 96° y 100°); 2) aclaración: en baños sucesivos de etanol absoluto (100), etanol-xilol (50:50) y xilol (100); y 3) formación del bloque de parafina: en tres baños sucesivos de parafina.

✓ **Obtención de los cortes.** Con un micrótopo de cuchilla fija, tipo Minot (5µm), procediéndose al montaje en portaobjetos con una fina capa de albúmina de Mayer.

✓ **Coloración con hematoxilina-eosina.** La *hematoxilina* es un colorante básico que se deposita en los grupos fosfatos del ADN y ARN, coloreando los núcleos de violeta. Es incolora y debe oxidarse a *hemateína* mediante un mordiente, el *hemalumbre de Mayer* (*hemateína*, *alumbre de potasio* y *ácido cítrico*). La *eosina* es un colorante débilmente ácido (fluoresceína) que colorea el citoplasma, tejido conjuntivo y fibras colágenas de rosado intenso. Químicamente es un *eosinato de potasio*, siendo el *ácido eosínico* el que actúa en la coloración.

Para realizar la coloración se requirieron dos etapas: 1) desparafinización e hidratación del corte: la parafina fue disuelta con xilol para facilitar el ingreso de los colorantes acuosos al tejido, y luego se hidrataron los cortes con una serie de soluciones de etanol de concentración decreciente (100°, 96°, 80°, 70°) finalizando con agua destilada; y 2) coloración propiamente dicha: con *hematoxilina*, virando con agua débilmente alcalina, y luego *eosina alcohólica*.

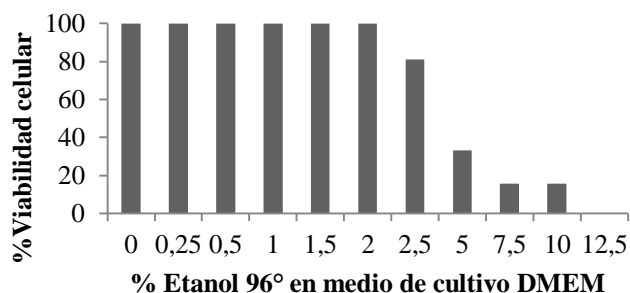
✓ **Montaje final.** En tres pasos: 1) deshidratación: a través de una serie de soluciones de etanol de concentración creciente (70°, 80°, 96° y 100°); 2) aclaración: con xilol; y finalmente 3) colocación del cubreobjetos: utilizando *Bálsamo de Canadá* para proteger la preparación y adherir el cubreobjetos al portaobjeto.

### 3. Resultados y Discusión

#### 3.1 Citotoxicidad

##### 3.1.1 Curva de citotoxicidad del etanol 96°

Se ensayaron distintas concentraciones de etanol 96° para evaluar la proporción del mismo que no afecta la viabilidad celular para la preparación (disolución) de la fracción activa **F6**. Los resultados obtenidos se exponen en la **Figura 3.3.9**.



**Figura 3.3.9:** Curva de citotoxicidad del etanol 96°

Teniendo en cuenta estos resultados, y considerando que hasta una concentración de etanol al 2 % se obtuvo una viabilidad celular del 100%, se utilizó como solvente de dilución el medio **DMEM con 1,5% en etanol** evitando así que el vehículo (etanol 96°) produzca citotoxicidad y trabajando con un margen de seguridad del 0,5%.

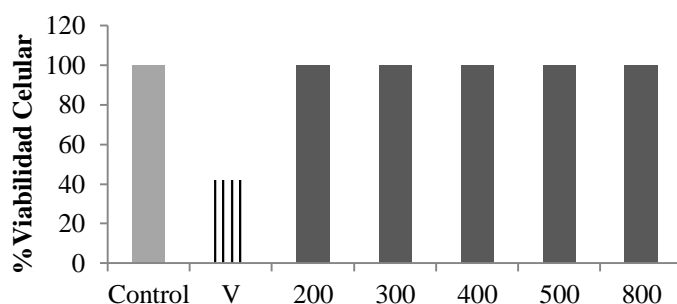
### 3.1.2 Evaluación de la citotoxicidad del extracto A2III PP

Los resultados correspondientes a la evaluación de la citotoxicidad de **A2III PP** se resumen en la *Tabla 3.3.17; Figuras 3.3.10 y 3.3.13*. Los resultados se expresaron como **% de viabilidad celular (%VC)** y se calcularon como se indica a continuación, siendo **D.O** la densidad óptica de las células a 620 nm:

$$\%VC = \frac{\text{D.O. de las células tratadas} \times 100}{\text{D.O. de las células control}}$$

*Tabla 3.3.17:* Citotoxicidad de A2III PP

	%VC
Control (DMEM-1,5% en etanol)	100
V (4 µg/mL)	42
A2III PP 200 µg/mL	100
A2III PP 300 µg/mL	100
A2III PP 400 µg/mL	100
A2III PP 500 µg/mL	100
A2III PP 800 µg/mL	100



**200, 300, 400 500 y 800:** concentración en µg/mL de A2III PP; **V:** veneno: 4 µg/mL; **Control:** DMEM con 1,5% en etanol 96. *Figura 3.3.10:* Citotoxicidad del extracto entero A2III PP

De este ensayo se desprende que, aún a altas dosis ensayadas (500 y 800 µg/mL), **A2III PP** no resultó citotóxico para las células C2C12, manteniendo el 100% de viabilidad celular.



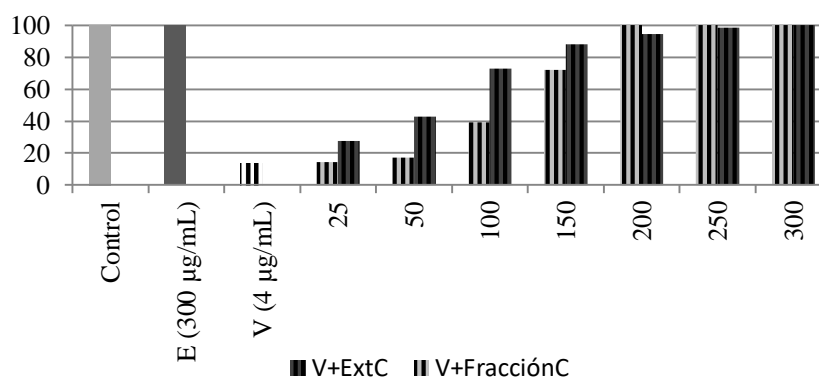
### 3.1.3 Evaluación de la capacidad inhibitoria del extracto A2III PP y su fracción polar activa F6 contra la citotoxicidad del veneno de *B. diporus*

Los resultados se resumen en la **Tabla 3.3.18** y **Figura 3.3.11**. A partir de los mismos, se graficaron las curvas dosis-respuesta tanto para **A2III PP** como para **F6** (**Figura 3.3.12**).

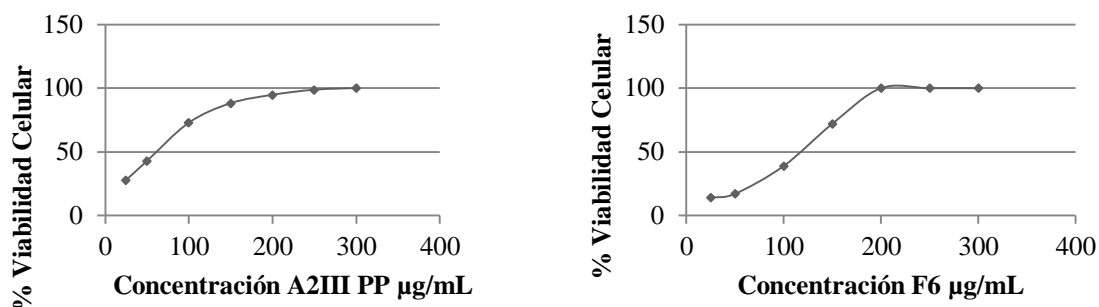
**Tabla 3.3.18:** Inhibición de la citotoxicidad del veneno por A2III PP/F6.

Extracto/Fracción + V	Abs. 620 nm			Abs Prom.	Prom-Bco	%VC
A2III PP 300 + V	0,283	0,298	0,276	0,29	0,24	<b>100</b>
A2III PP 250 + V	0,278	0,288	0,274	0,28	0,23	99
A2III PP 200 + V	0,253	0,279	0,28	0,27	0,22	95
A2III PP 150 + V	0,25	0,261	0,255	0,26	0,21	88
A2III PP 100 + V	0,227	0,21	0,222	0,22	0,17	73
A2III PP 50 + V	0,158	0,154	0,137	0,15	0,10	43
A2III PP 25 + V	0,122	0,102	0,12	0,11	0,06	28
F6 300 + V	0,327	0,359	0,324	0,34	0,29	<b>100</b>
F6 250 + V	0,326	0,279	0,246	0,28	0,23	<b>100</b>
F6 200 + V	0,284	0,268	0,301	0,28	0,23	<b>100</b>
F6 150 + V	0,233	0,233	0,188	0,22	0,17	72
F6 100 + V	0,147	0,133	0,143	0,14	0,09	39
F6 50 + V	0,093	0,091	0,087	0,09	0,04	17
F6 25 + V	0,086	0,084	0,08	0,08	0,03	14
V (4 µg/mL)	0,073	0,085	0,09	0,08	0,03	13
E (300 µg/mL)	0,272	0,288	0,299	0,29	0,24	<b>101</b>
Control	0,342	0,237	0,272	0,28	0,23	<b>100</b>

**300, 250; 200; 150; 100; 50 y 25:** concentración en µg/mL de A2III PP/F6; **E:** A2III PP; **Control:** DMEM-1,5% en etanol 96; **Abs Prom:** promedio de la abs a 620 nm; **Prom-Bco:** diferencia entre Abs prom. y Abs 620 nm; **%VC:** porcentaje de viabilidad celular



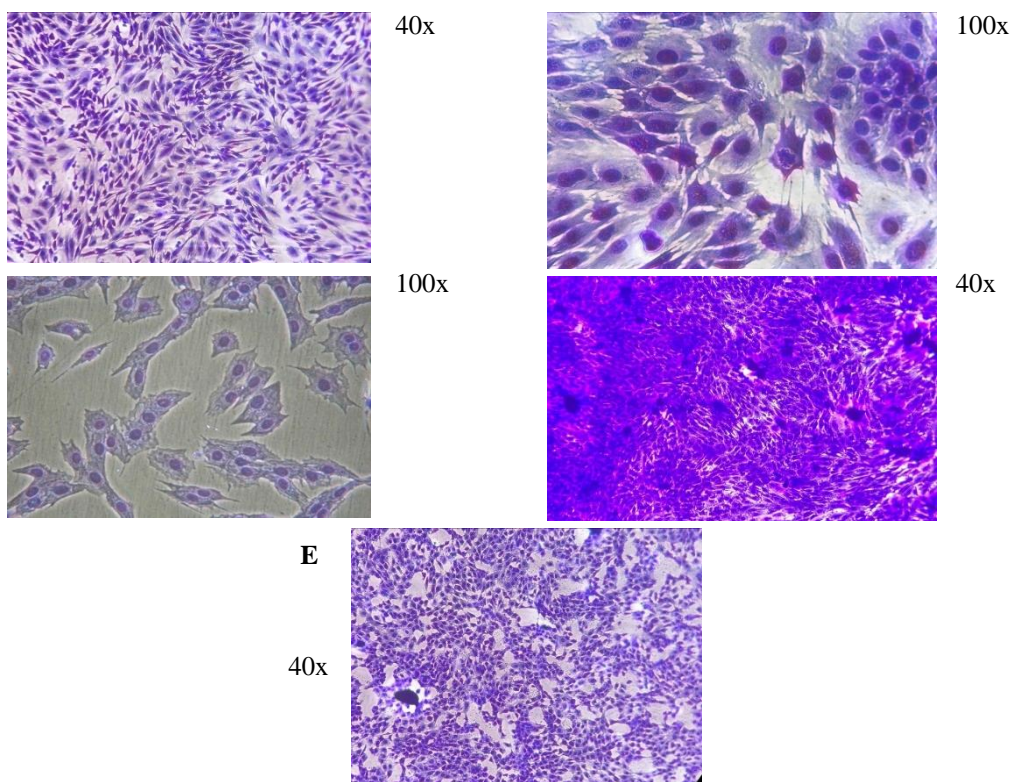
**25; 50; 100; 150; 200; 250 y 300:** concentración en µg/mL de A2III PP/F6 pre-incubados 30 min 37°C con veneno; **E:** A2III PP; **V:** veneno: 4 µg/mL; **Control:** DMEM con 1,5% en etanol 96. **Figura 3.3.11:** Inhibición de la citotoxicidad del veneno



**Figura 3.3.12:** Curva dosis respuesta para A2III PP + V y F6 + V

Se ensayaron **A2III PP** y **F6** a bajas dosis, considerando que, si el extracto entero no resultó citotóxico a altas dosis, tampoco lo será a bajas dosis, así como tampoco su fracción polar activa.

Tanto **A2III PP** como **F6** fueron capaces de inhibir la citotoxicidad del veneno de *B. diporus*, observándose que el extracto entero y su fracción presentaron un comportamiento diferencial a bajas y altas dosis. Así, a bajas dosis (hasta 150  $\mu\text{g/mL}$ ) el extracto entero fue más eficiente en la inhibición que la fracción, aunque a dosis más altas (entre 200 y 250  $\mu\text{g/mL}$ ) lo es la fracción, logrado ambos alcanzar el máximo de inhibición a 300  $\mu\text{g/mL}$  (*Tabla 3.3.19*) (*Figuras 3.3.11; 3.3.12; 3.3.13*).



**A y B:** Control: DMEM con 1,5% de etanol 96°: 100% VC; **C:** Veneno: 4  $\mu\text{g/mL}$ : 44% VC; **D:** citotoxicidad de A2III PP 500  $\mu\text{g/mL}$ : 100% VC; **E:** inhibición de la citotoxicidad A2III PP 300  $\mu\text{g/mL}$  + V: 100% VC. **Figura 3.3.13:** Células C2C12 al microscopio óptico

Estos resultados fueron muy importantes ya que fue la primera vez que se ensayó la inhibición de la citotoxicidad de veneno de *B. diporus* por extractos de plantas y, a la vez, fue posible poner a punto la técnica para realizarlo.

### 3.2 Análisis de la actividad *in vivo* del extracto A2III PP/fracción activa F6

#### 3.2.1 Neutralización del efecto letal del veneno: Inhibición de la dosis letal 50 (DL50) del veneno y evaluación de la toxicidad aguda del extracto/fracción

Se registró la supervivencia de los ratones a las 48 h de inoculado el veneno (*Tabla 3.3.19*) y se obtuvo el **% de letalidad** como se indica a continuación:

$$\frac{4 (n)}{N^{\circ} \text{ total de ratones muertos}} \rightarrow \frac{100\%}{X \%}$$

*Tabla 3.3.19:* Neutralización del efecto letal del veneno y evaluación de la toxicidad del extracto/fracción

Grupo #	Inyección intraperitoneal	Ratones muertos 48 h	%Letalidad
1	4DL50	4	100
2	5 mg A2III PP	0	0
3	3 mg F6	0	0
4	5 mg F6	0	0
5	5 mg A2III PP + V	0	0
6	3 mg F6 + V	1	25
7	5 mg F6 + V	0	0

Los resultados se expresaron como **% de protección** del extracto/fracción contra el veneno (*Tabla 3.3.20*). El **% de protección** se obtuvo como se indica a continuación:

$$\% \text{ inhibición} + \% \text{ protección} = 100$$

$$\% \text{ protección} = 100\% - \% \text{ inhibición}$$

*Tabla 3.3.20:* Inhibición de la actividad letal 50 del veneno por el extracto/fracción activa de *C. pareira*

% Protección contra el veneno	
A <sub>2</sub> III PP 5 mg	100
F <sub>6</sub> 5 mg	100
F <sub>6</sub> 3mg	75

A partir de los resultados de las *Tablas 3.3.19* y *3.3.20* se pudo concluir que:

✓ **5 mg** del extracto entero **A2III PP** protegieron en un **100%** a los ratones de 4DL50 del veneno de *B. diporus*;

✓ **5 mg** de fracción activa **F6** protegieron en un **100%** a los ratones de 4DL50 del veneno de *B. diporus*, mientras que **3 mg** protegieron sólo un **75%**;

✓ ni el extracto entero **A2III PP** ni la fracción activa **F6** manifestaron toxicidad aguda a ninguna de las dosis ensayadas.

Estos resultados son completamente originales tanto respecto de la especie vegetal como de la especie ofídica ensayada, ya que no se ha encontrado en la bibliografía disponible y consultada, ningún estudio al respecto. Es decir, los resultados obtenidos permiten sentar las bases del conocimiento para continuar con la investigación respecto de la posibilidad de elaborar un *medicamento herbario* con la fracción **F6** de *C. pareira*.

### 3.2.2 Neutralización del efecto local del veneno por una formulación de gel termosensible al 1% en fracción activa: Determinación de la dosis dermonecrotizante del veneno

Los resultados obtenidos se exponen en la **Tabla 3.3.21**.

**Tabla 3.3.21:** Determinación de la dosis dermonecrotizante del veneno

Grupo	µg veneno inyectado	Observación 72 h
1	0	sin lesión
2	50	lesión (+)
3	100	lesión (+)
4	150	lesión (++)

**Lesión (+):** diámetro menor a 5 mm; **Lesión (++):** diámetro mayor a 5 mm

Se determinó la dosis dermonecrotizante del veneno de *B. diporus* igual a **150 µg**.

### 3.2.3 Validación *in vivo* de la efectividad del gel termosensible sobre el veneno de *B. diporus*

Se observaron y registraron las características macroscópicas de las lesiones y las características microscópicas de los cortes histológicos obtenidos a los 3 y 7 días posteriores a la inoculación del veneno y siempre antes de la aplicación tópica del gel.

#### -Resultados macroscópicos

✓ **Día 3:** Se observó dermonecrosis en todos los grupos tratados con veneno (**Grupos V; V+C; R y R+C**), independientemente de la vía de inoculación y de la aplicación o no de gel termosensible. Esta dermonecrosis se manifestó como un área predominantemente circular, de bordes irregulares y color negro, con presencia de edema que produjo una deformación del cuello de los ratones en el área de la lesión. No se evidenciaron diferencias significativas entre ambos sitios de inoculación del veneno (**Grupos V y R**), aunque fue evidente que los ratones que fueron tratados con gel termosensible tuvieron menor edema (**Grupos V+C y R+C**) (**Figuras 3.3.15; 3.3.16;**



3.3.17 y 3.3.18). No se observaron cambios en el grupo control tratado con gel sin veneno (**Grupo C**) (*Figura 3.3.14*).

✓ **Día 7:** No se evidenciaron diferencias en los grupos inoculados con veneno, sin crema (**Grupos V y R**); tampoco se observó edema en ninguno de ellos. Los ratones tratados con gel (**Grupo V+C y R+C**) evidenciaron menor superficie de afección que quedó manifiesta por una coloración oscura menos extensa; la lesión impresionó más seca y recubierta por una costra que favoreció el desprendimiento del tejido necrótico, observándose por debajo la presencia de tejido revitalizado (hemorrágico) (*Figuras 3.3.15; 3.3.16; 3.3.17 y 3.3.18*). No se observaron cambios en el grupo control (**Grupo C**) (*Figura 3.3.14*).

Día 3



Día 7



*Figura 3.3.14: Grupo C: control de gel. No se observó dermonecrosis*

Día 3



Día 7



*Figura 3.3.15: Grupo V: veneno ID. Se observó dermonecrosis*

Día 3



Día 7



*Figura 3.3.16: Grupo V+C: veneno ID + gel: Se observó una mejor evolución de la lesión dérmica*

Día 3



Día 7

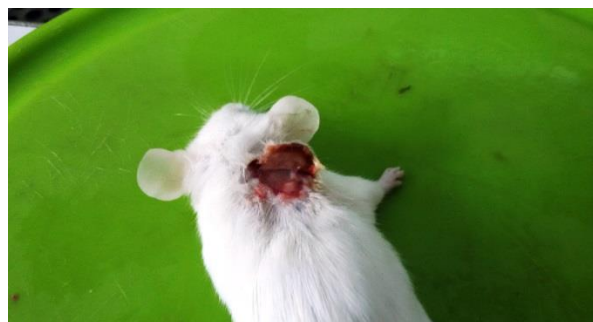


**Figura 3.3.17: Grupo R: veneno SC:** Se observó dermonecrosis

Día 3

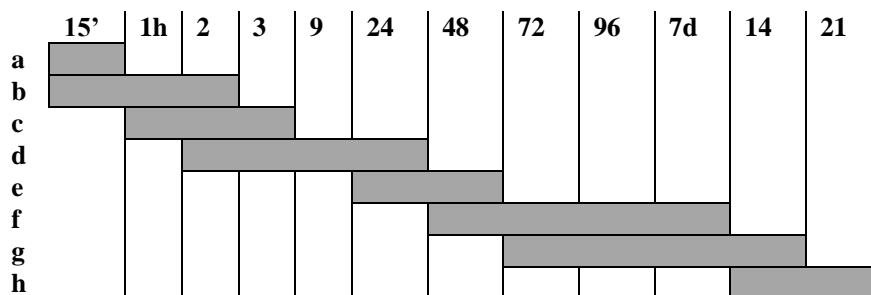


Día 7



**Figura 3.3.18: Grupo R+C: veneno SC + gel:** Se observó una mejor evolución de la lesión dérmica

Como reporta Lagens, (1992) se observa en la **Figura 3.3.19** la reparación de un tejido dañado se inicia a los 15 minutos de producida la lesión y se extiende por 21 días, dependiendo del tipo de injuria sufrida. Esto es importante debido a que la remoción de neutrófilos y macrófagos y el inicio de la reparación ocurren **4 días después de haberse producido la lesión**. Sin embargo, en los grupos de control de veneno (**Grupos V y R**), esto no ocurrió y no se observó reparación aún **7 días después**. Para que ocurra la cicatrización debe producirse la eliminación del tejido necrótico que, en cambio, sí ocurrió en los grupos tratados con gel (**Grupos V+C y R+C**).



**a:** dilatación y aumento de la permeabilidad con/sin extravasación de sangre; **b:** edema intersticial; **c:** migración de neutrófilos hacia lesión a través de la pared vascular; **d:** acumulación de leucocitos en tejido dañado; **e:** muerte de leucocitos; **f:** remoción de leucocitos por macrófagos; **g:** reparación y **h:** cicatrización. Fuente: Lagens, (1992). **Figura 3.3.19:** Proceso normal de evolución de un tejido dañado

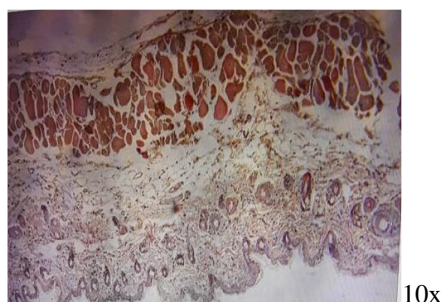


En consecuencia, la aplicación tópica del gel aceleró los procesos de reparación y cicatrización eliminando el tejido necrótico por desprendimiento, observándose por debajo del mismo tejido revitalizado con bordes hemorrágicos. La formulación tópica, por si misma (**Grupo C**) no produjo efectos adversos macroscópicos en estos ratones.

### -Resultados microscópicos

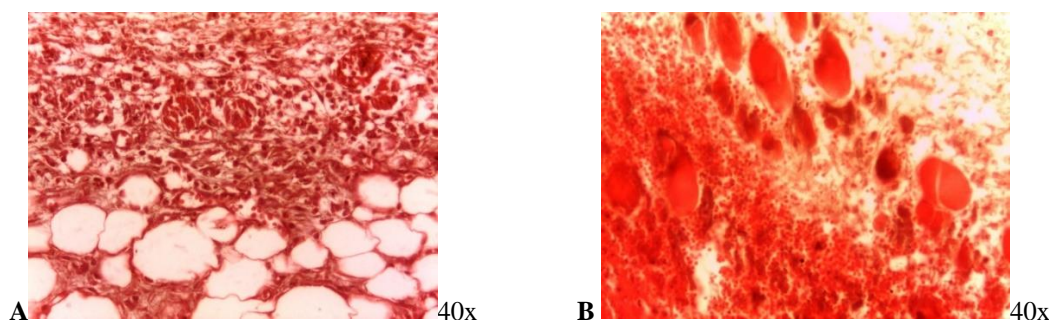
✓ **Día 3**

**Grupo C: control:** estructuras epiteliales conservadas (**Figura 3.3.20**).



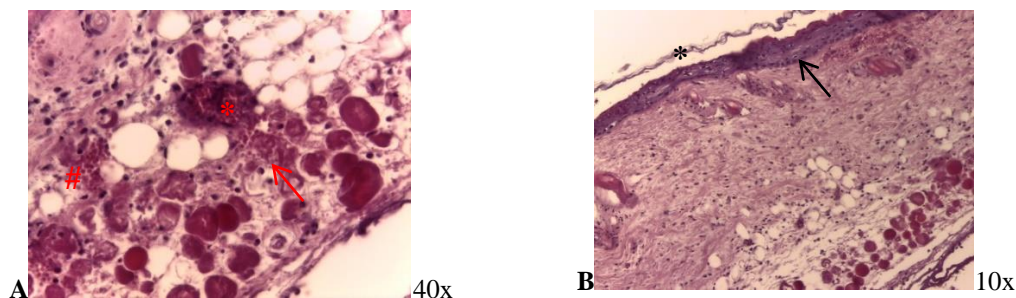
**Figura 3.3.20: Grupo C: control:** estructuras epiteliales conservadas.

**Grupo V: veneno ID:** mionecrosis (+++), intensa hemorragia (++++), y congestión con infiltrado neutrofílico (++++). Presencia de edema (**Figura 3.3.21**).



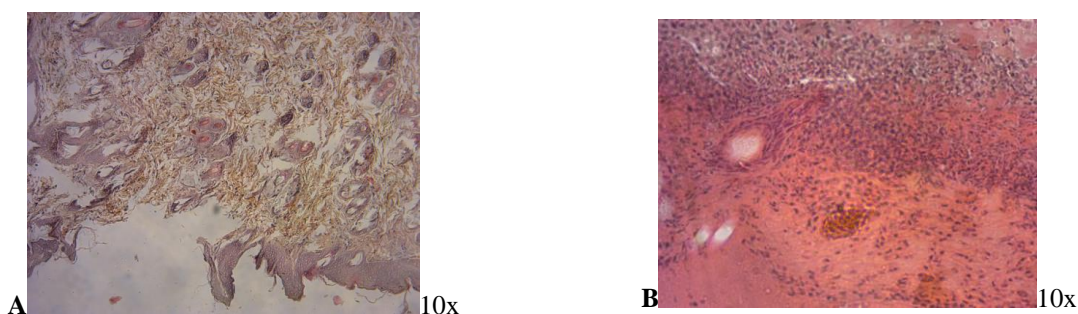
**Figura 3.3.21: Grupo V: veneno ID: A:** necrosis, infiltrado inflamatorio y edema; **B:** hemorragia

**Grupo V+C: veneno ID + gel:** mionecrosis (++), infiltrado neutrofílico (+++), hemorragia (++) y congestión vascular; hiperplasia epidérmica cercana a la lesión y desprendimiento del estrato córneo (**Figura 3.3.22**).



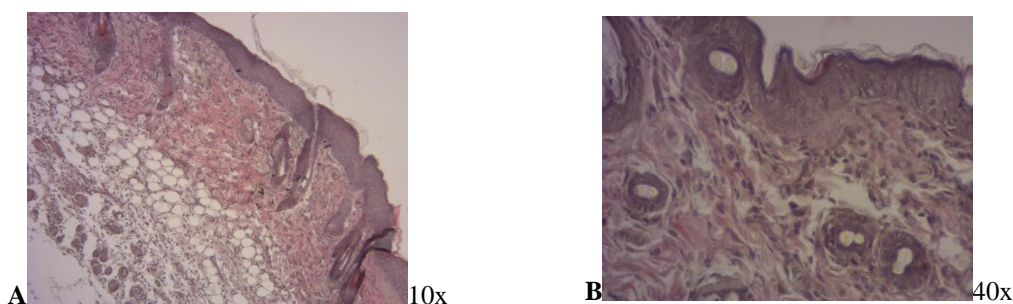
**Figura 3.3.22: Grupo V+C: veneno ID + gel: A:** (\*): congestión vascular; (#): hemorragia; **flecha roja:** necrosis. **B: flecha negra:** hiperplasia epidérmica; (\*): desprendimiento estrato corneo.

**Grupo R: veneno SC:** mionecrosis (+++), intensa hemorragia (++++), y congestión vascular con infiltrado inflamatorio (++++). Desprendimiento e hiperplasia de la epidermis (*Figura 3.3.23*).



*Figura 3.3.23: Grupo R: veneno SC: A: necrosis y desorganización; B: congestión hemática*

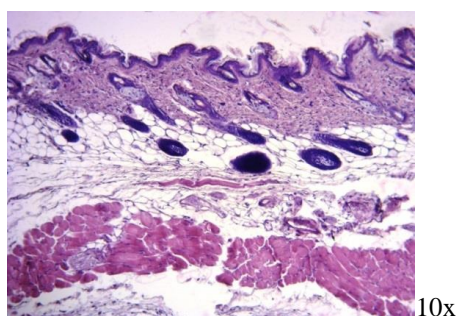
**Grupo R+C: veneno SC + gel:** infiltrado neutrofílico (+++), hemorragia (++) y mionecrosis (+++) (*Figura 3.3.24*).



*Figura 3.3.24: Grupo R+C: veneno SC + gel: A: hiperplasia epidérmica; B: infiltrado inflamatorio*

✓ Día 7

**Grupo C: control:** estructuras del tejido conservadas (*Figura 3.3.25*).



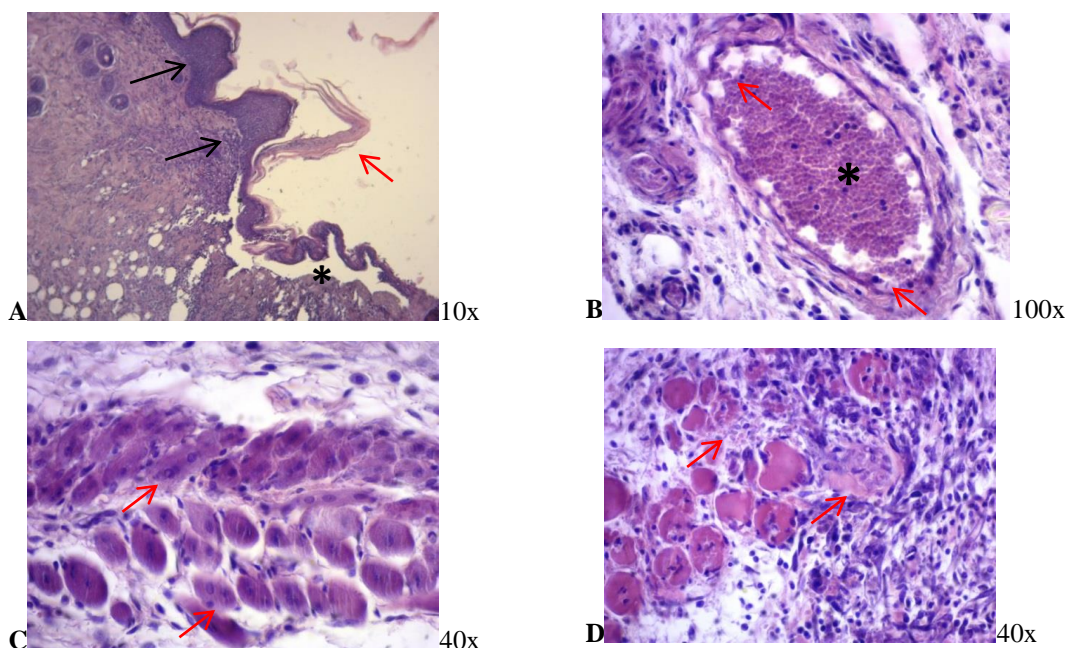
*Figura 3.3.25: Grupo control: C: estructuras epiteliales conservadas*

**Grupo V: veneno intradérmico**

En epidermis, se observó hiperplasia epidérmica con zonas de desprendimiento del estrato córneo (*Figura 3.3.26 A*). En la dermis, se observó congestión vascular con lesión y pérdida de continuidad de la pared vascular (*Figura 3.3.26 B*), infiltrado inflamatorio mononuclear y desorganización del tejido reticular. En el tejido subcutáneo, la desorganización estructural fue evidente, con infiltrado inflamatorio mononuclear (+++). En la capa muscular, se observaron dos zonas bien diferenciadas: una extensa de



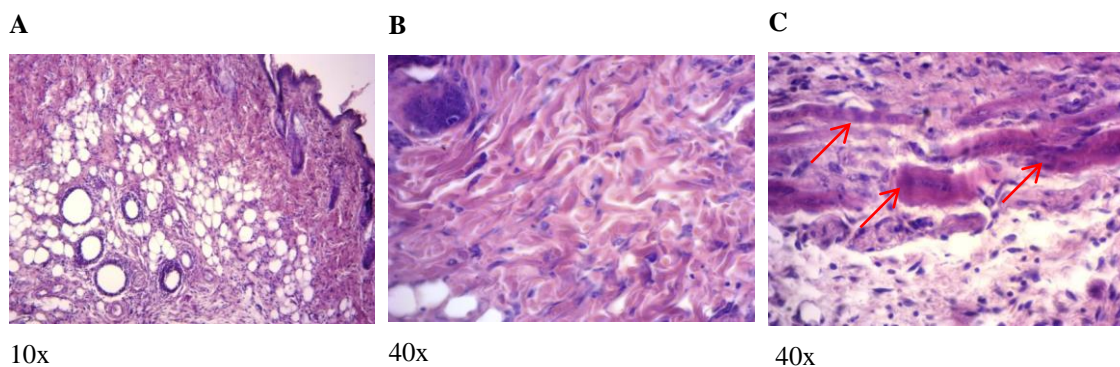
fibras de regeneración muscular (menor diámetro y núcleo en posición central) (**Figura 3.3.26 C**) y, otra zona, con necrosis muscular predominantemente lítica acompañada de infiltrado inflamatorio (+++) (**Figura 3.3.26 D**).



**A: flecha negra:** hiperplasia epidérmica; **flecha roja:** desprendimiento del estrato córneo; (\*): desprendimiento de epidermis. **B: flechas rojas:** pérdida de continuidad de la pared vascular; (\*): congestión vascular. **C:** fibras musculares de regeneración. **D:** necrosis muscular. **Figura 3.3.26: Grupo V: veneno ID.**

#### **Grupo V + C: veneno ID + gel termosensible**

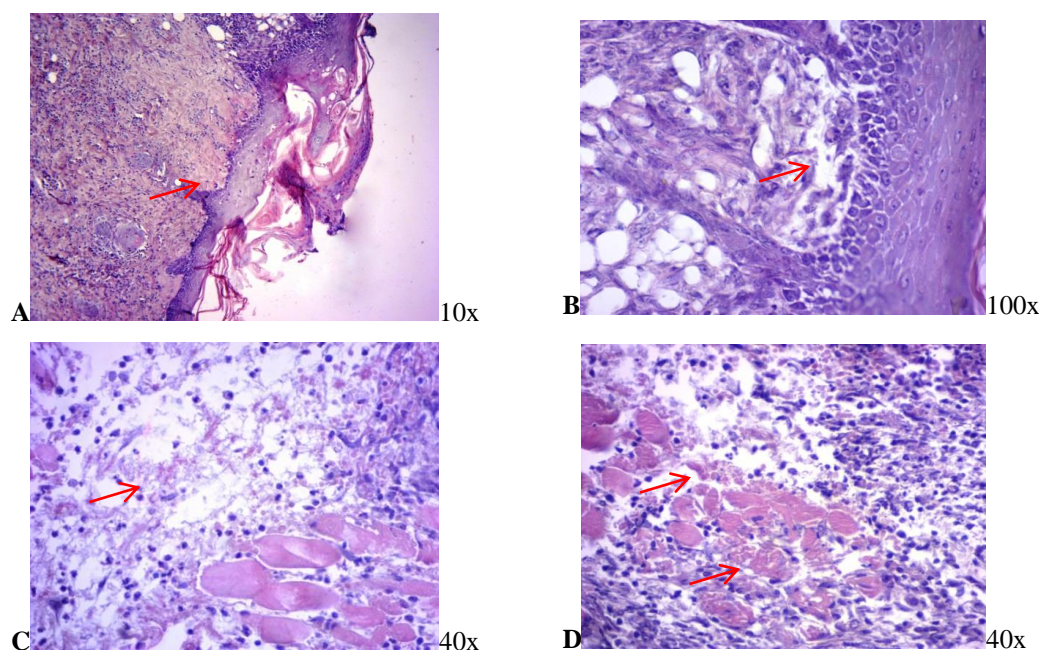
La estructura epidérmica se observó conservada (**Figura 3.3.27 A**). La dermis no presentó infiltrado inflamatorio y, sin embargo, manifestó una menor desorganización de las fibras reticulares de la dermis superficial (**Figura 3.3.27 B**). En el tejido subcutáneo, se observó menor infiltrado inflamatorio (++) y a nivel muscular sólo se evidenciaron zonas de regeneración muscular, sin necrosis (**Figura 3.3.27 C**).



**A:** estructura epidérmica conservada. **B:** leve desorganización del tejido reticular. **C:** fibras musculares de regeneración. **Figura 3.3.27: Grupo V+C: veneno ID + gel.**

### Grupo R: veneno subcutáneo

En la epidermis, se observaron zonas de hiperplasia epidérmica y separación del estrato corneo (*Figura 3.3.28 A*). A nivel de la dermis, el infiltrado inflamatorio fue intenso (+++), tanto en dermis superficial como profunda; acompañado de desorganización del tejido reticular y con gran separación intercelular de las células basales (*Figura 3.3.28 B*). En el tejido muscular se observó necrosis lítica, hemorragia (*Figura 3.3.28 C*) y abundante infiltrado inflamatorio (*Figura 3.3.28 D*) con presencia de neutrófilos tóxicos y macrófagos.



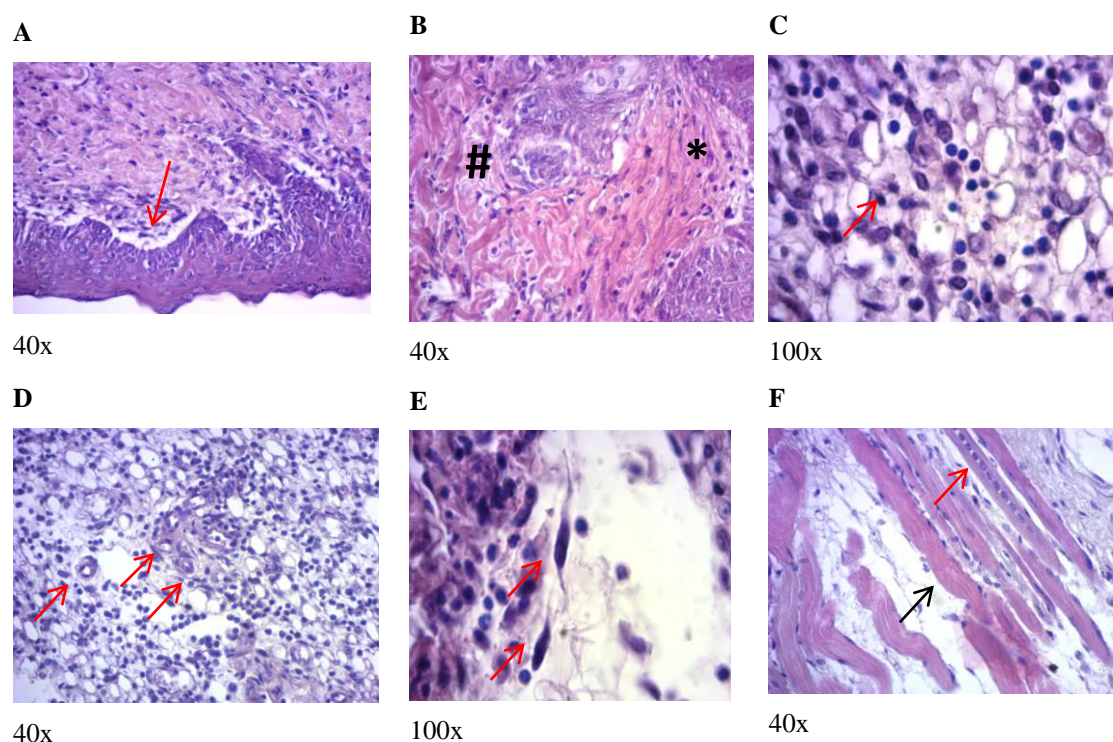
**A:** hiperplasia epidérmica; **B:** separación intercelular de las células basales; **C:** hemorragia; **D:** necrosis de fibras musculares. *Figura 3.3.28: Grupo R: veneno SC*

### Grupo R + C: veneno SC + gel termosensible

La epidermis se observó conservada, con zonas de desprendimiento de la dermis e hiperplasia sectorial en las regiones cercanas a la lesión (*Figura 3.3.29 A*). A nivel de la dermis superficial la estructura se encontró conservada, en cambio, la dermis profunda se presentó desordenada y desorganizada (*Figura 3.3.29 B*), con infiltrado intenso inflamatorio (+++), neutrofílico (++) y mononuclear (+++) (*Figura 3.3.29 C*). Presencia de vasos de neoformación (*Figura 3.3.29 D*) y fibroblastos (*Figura 3.3.29 E*).

El tejido subcutáneo evidenció importante infiltrado inflamatorio (+++) (*Figura 4.3.29 F*). En la capa muscular se encontraron fibras de regeneración (++) y fibras musculares sin daño (+++) (*Figura 3.3.29 H*). No se observó necrosis.





**A:** hiperplasia epidérmica. **B: (#):** dermis profunda desorganizada; **(\*):** dermis superficial organizada. **C:** infiltrado inflamatorio mononuclear. **D:** vasos de neoformación; **E:** fibroblastos. **F: flecha roja:** fibra muscular de regeneración; **flecha negra:** fibra muscular sin daño. **Figura 3.3.29: Grupo R+C: veneno SC+ gel**

Respecto de los resultados obtenidos para la inoculación del veneno **ID:**

✓ **Epidermis:** la aplicación del gel demostró capacidad de inhibición de los daños producidos por el veneno en la epidermis, ya que luego de 7 días, las estructuras se mantuvieron conservadas en este grupo (**Grupo V+C**) respecto al control del veneno (**Grupo V**), donde existieron zonas de desprendimiento del estrato corneo y de la epidermis con hiperplasia epidérmica. El grupo control del gel (**Grupo C**) no presentó variaciones.

✓ **Dermis:** el gel inhibió la aparición de infiltrado inflamatorio observado en el grupo control del veneno (**Grupo V**), respecto al grosor en ambos grupos se observó un aspecto similar, pero se manifestó un ordenamiento de la capa reticular en el grupo tratado con el gel (**Grupo V+C**) mientras que existió desorganización en el grupo del veneno (**Grupo V**). Además, en el grupo control del veneno (**Grupo V**) se observó congestión vascular con lesión vascular y pérdida de la continuidad de la pared en vasos sanguíneos, manifestación que fue inhibida por la aplicación del gel (**Grupo V+C**).

✓ **Tejido subcutáneo:** si bien se observó infiltrado inflamatorio en ambos grupos (**Grupo V** y **Grupo V+C**), este fue menor en el segundo grupo, manteniendo un mejor ordenamiento celular.

✓ **Músculo:** se observaron menos zonas de regeneración muscular en el grupo tratado con gel (**Grupo V+C**) lo que pudo deberse al menor daño producido por el veneno con su aplicación. En el grupo control del veneno (**Grupo V**), se observó un extenso infiltrado inflamatorio y necrosis muscular, mientras que la aplicación del gel (**Grupo V+C**) protegió respecto de estos daños que no fueron observados en el corte histológico.

Respecto de los resultados de la inoculación del veneno SC:

✓ **Epidermis:** la aplicación del gel mantuvo la organización celular conservada (**Grupo R+C**) aunque se observaron algunas zonas de hiperplasia sectorial en las regiones cercanas a la lesión.

✓ **Dermis:** La aplicación del gel conservó la organización de la dermis superficial, pero respecto a la profunda se observó desorganización. No pudo inhibir el infiltrado inflamatorio producido por el veneno. En este grupo pudieron observarse vasos de neoformación y fibroblastos.

✓ **Músculo:** la aparición de necrosis e infiltrado inflamatorio fueron inhibidas por la aplicación del gel. La observación de zonas de regeneración muscular y zonas en las que no hubo regeneración es un indicio positivo respecto a la protección que ha dado el gel contra la acción del veneno de *B. diporus*.

#### **4. Conclusiones**

El estudio de la citotoxicidad del extracto entero **A2III PP** demostró que aún a altas dosis ensayadas (500 y 800 µg/mL), no resultó ser citotóxico en ensayos de cultivos celulares con células de mioblastos murinos C2C12, pero sin embargo, demostró tener capacidad inhibitoria de la citotoxicidad del veneno de *B. diporus*. Su purificación por fraccionamiento bioquímico permitió obtener una fracción polar **F6** que también fue capaz de inhibir la citotoxicidad del veneno de *B. diporus* sin presentar signos de citotoxicidad inherentes al extracto vegetal a altas dosis. El comportamiento de **A2III PP** y **F6** fue variable a altas y bajas dosis: a bajas dosis (hasta 150 µg/mL) el extracto entero fue más eficiente en la inhibición que la fracción, aunque a dosis más altas (entre 200 y 250 µg/mL) lo fue la fracción, logrado ambos alcanzar el máximo de inhibición a 300 µg/mL.

La fracción polar **F6** inhibió el 100% de la letalidad producida por 4DL50 del veneno de *B. diporus* sin presentar toxicidad aguda por vía intraperitoneal en modelo animal de ratones *Balb-c* a dosis de 5mg/ratón. A su vez **F6**, en dosis de 3 mg, protegió un 75% de la letalidad.

Respecto de la formulación del gel termosensible diseñada con **F6** y su aplicación, se obtuvieron resultados muy prometedores, presentando mayor protección cuando el veneno fue inyectado por vía intradérmica. Este resultado estimula a seguir los estudios tratando de mejorar la permeación de los principios activos de modo de lograr una protección mayor en las zonas profundas.

Es importante destacar que este estudio es el primero realizado con aplicación tópica de un producto natural en modelo animal con el objetivo de inhibir la acción del veneno de yarará.

## 5. Referencias Bibliográficas

- Bala, M.; Pratap, K.; Verma, P.; Padwad, Y.; Singh, B. (2014). Cytotoxic agents for KB and SiHa cells from n-hexane fraction of *Cissampelos pareira* and its chemical composition. *Natural Product Research*, 29, 686-691.
- Bustillo, S.; Gay, C.; Garcia Denegri, M.; Ponce, L.; Kier-Joffé, E.; Acosta, O.; Leiva, L. (2012). Synergism between baltergin metalloproteinase and Ba SPII RP4 PLA2 from *Bothrops alternatus* venom on skeletal muscle (C2C12) cells. *Toxicon*, 59, 338-343.
- Bustillo, S.; Lucero, H.; Leiva, L.; Acosta, O.; Kier Joffé, E.; Gorodner J. (2009). Cytotoxicity and morphological analysis of cell death induced by *Bothrops* venoms from the northeast of Argentina. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 15, 28-42.
- Echeverría, S.; Bustillo, S.; Rodriguez, J.; Acosta, O.; Leiva, L. (2009). Citotoxicidad del veneno de *Bothrops alternatus* sobre línea de macrófagos murinos Raw 264.7. *Comunicaciones Científicas y Tecnológicas SGCyT*, CE-033
- Fernández, J.; Gutiérrez, J.; Angulo, Y.; Sanz, L.; Juárez, P.; Calvete, J.; Lomonte, B. (2010). Isolation of an acidic phospholipase A2 from the venom of the snake *Bothrops asper* of Costa Rica: Biochemical and toxicological characterization. *Biochimie*, 92, 273-283.
- Garcia-Denegri, M.; Acosta, O.; Huancahuire-Vega, S.; Martins-de-Souza, D.; Marangoni, S.; Marunak, S.; Teibler, P.; Leiva, L.; Ponce-Soto, L. (2010). Isolation and functional characterization of a new acidic PLA (2) Ba SpII RP4 of the *Bothrops alternatus* snake venom from Argentina. *Toxicon*, 56, 64-74.
- Huggins, J. (2003). Alternatives to animal testing: research, trends, validation, regulatory acceptance. *Alternatives to Animal Experimentation*, 20, 3-61.
- Kupchan, S.; Patel, A.; Fujita, E. (1965). Tumor inhibitors VI. Cissamperine, new cytotoxic alkaloid from *Cissampelos pareira*. Cytotoxicity of bisbencylisoquinoline alkaloids. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 54, 580-583.
- Lagens, M. (1992). Patología forense para el hombre de derecho. *Poder Judicial de la Provincia de Buenos Aires*.

- Maruñak, S.; Núñez S.; Fernández, C.; Leiva L.; Acosta de Perez, O. (2010). Acción del veneno de *Bothrops diporus* (yarára chica) del nordeste argentino sobre la hemostasia en diferentes mamíferos. *Revista Veterinaria*, 21, 43-47.
- Prophet, E. (1995). Métodos Histotecnológicos. *Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas*, Washington.
- Repetto, M. (2002). Toxicología Fundamental. Métodos alternativos, Toxicidad *in vitro*. 3ra Ed. Díaz de Santos, Sevilla, España.
- Russell, W.; Burch, R. (1995). The Principles of Humane Experimental Technique. *Johns Hopkins University*, Baltimore.
- Theakston, R; Reid, H. (1983). Development of simple standard assay procedures for the characterization of snake venoms. *Bulletin of the World Health Organization*, 61: 949-956.
- World Health Organization (WHO). (1981). Progress in the characterization of venoms and standardization of antivenoms. 58, *Geneva*.
- Yaffe, D.; Saxel, O. (1977). Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle. *Nature*, 270, 725-727.
- Yamamoto, Y.; Nakajima, M.; Yamazaki, H.; Yokoi, T. (2001). Cytotoxicity and apoptosis produced by troglitazone in human hepatoma cells. *Life Sciences*, 70, 471-482.



# **CAPÍTULO 4:**

## **Actividad antimicrobiana**

*Equipado con sus cinco sentidos, el hombre explora el universo que lo rodea  
y a sus aventuras las llama ciencia.-  
Edwin Hubble*





## **1. Introducción**

Los trabajos de investigación en materia de ofidismo se han centrado principalmente en la identificación de los componentes del veneno, los efectos en el organismo de los individuos afectados, y la producción y evaluación de sueros antiofídicos y/o tratamientos alternativos (Mackessy, 2010). Sin embargo, se considera que existen otros factores relacionados con la ofidiotoxicosis como la inoculación en los tejidos de microorganismos provenientes de la cavidad oral y del propio veneno de las serpientes y cuyos efectos han sido subestimados (Nishioka *et al.*, 2000).

Si bien la mordedura de serpiente tiene una tasa de mortalidad relativamente baja, la mayor consecuencia de la misma viene dada por las secuelas permanentes que deja en los miembros que afecta, en muchos casos, inhabilitando a las personas que la han sufrido, para realizar sus actividades cotidianas y laborales con normalidad. Diversos estudios encuentran como principal complicación local del ofidismo, y sobre todo de aquellos accidentes producidos por ejemplares del género *Bothrops*, la infección de las flictenas y lesiones necróticas producidas, con formación de abscesos (Zavaleta Martínez-Vargas, 2004; Manrique-Chicoma, 2000). Estas infecciones podrían ser originadas por los diferentes patógenos presentes en la mucosa oral de las serpientes o bien por el inadecuado manejo pre-hospitalario que pueden recibir sus víctimas (Pineda *et al.*, 2002). Por otra parte, Grisolia *et al.* (1996) sostienen que las infecciones producidas por mordeduras de serpientes no se deben a la contaminación de la herida por bacterias presentes en la boca de ofidio sino a los métodos utilizados para extraer el veneno del paciente.

El Instituto Clodomiro Picado de la Universidad de Costa Rica, centro de referencia Latinoamericana sobre ofidismo, en su manual “*El envenenamiento por mordedura de serpiente en Centroamérica*” (2009) refiere que los venenos de serpientes son fluidos biológicos muy contaminados con enterobacterias, bacilos anaerobios del género *Clostridium* y cocos Gram positivos, los cuales pueden originar infección local e incluso, en el peor de los casos, sepsis, teniendo la herida producida por la mordedura como puerta de entrada (Zúñiga-Carrasco & Lozano, 2013).

El porcentaje de pacientes que desarrollan infección a causa de la mordedura es variable (1-30%), hallándose fuerte asociación entre las bacterias aisladas de la cavidad oral y veneno de las serpientes, y aquellas halladas en heridas de pacientes (Jorge *et al.*, 1990; Costa & De Siqueierra, 2002, Otero *et al.*, 2002). La infección de tejidos blandos es una complicación bien conocida, debido al fuerte efecto citotóxico del veneno que

puede favorecer el crecimiento de las bacterias inoculadas en el área lesionada (Jorge *et al.*, 1990; Ávila-Agüero, 1999; Otero *et al.*, 2002; Costa & De Siqueierrra, 2002).

Estudios colombianos publicados en el año 2002, que involucraron pacientes con mordedura de serpientes del género *Bothrops*, reportaron complicaciones infecciosas entre 16% y 30% informando que los bacilos Gram negativos fueron la principal causa de infección en estos pacientes (Pineda *et al.*, 2002).

La flora bacteriana encontrada en la cavidad oral y veneno de las serpientes en diversas regiones del mundo es variada. Jorge *et al.* (1990), señalan como factores sugeridos para explicar estas diferencias aquellos relacionados con la serpiente como la especie, su origen (hábitat natural o cautiverio), su estado de salud y tipo de alimento.

Goldstein *et al.* (1978) encontraron en cultivos del veneno de 15 serpientes de cascabel de Norte América, predominantemente *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus* sp., *Staphylococcus* coagulasa-negativos y *Clostridium* sp. Los mismos autores (Goldstein *et al.*, 1981) determinaron en otro estudio que la flora bucal de las serpientes refleja en gran parte la flora fecal de su presa.

Theakston *et al.* (1990) realizaron cultivos del veneno e hisopado de orofaringe de serpientes de la especie *Calloselasma rhodostoma* del sur de Tailandia, concluyendo que la cavidad oral contiene una mayor variedad de microorganismos en comparación al veneno, con predominio de *Enterobacter* sp., *Pseudomonas* sp., algunos *Staphylococcus* y *Clostridium* sp.

Para Brasil, Jorge *et al.* (1990) reportan la flora bacteriana de cavidad oral y veneno de quince individuos de la especie *Bothrops jararaca*, encontrando: *Streptococcus* sp. del grupo D, *Enterobacter* sp., *Providencia* sp., *Escherichia coli*, *Morganella morganii*, *Pseudomonas paucimobilis*, *Proteus mirabilis*, *Citrobacter* sp., *Streptococcus* sp. beta hemolítico, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* y *Clostridium* sp.

Costa & De Siqueierrra, (2002) reportan *M. morganii*, *E. coli*, *Providencia rettgeri* y *Enterobacter* sp. como microorganismos encontrados en la boca de serpientes del género *Bothrops*.

Henao *et al.* (2005) reportan a *M. morganii*, *Aeromonas hydrophila*, *Staphylococcus saprophyticus*, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Peptostreptococcus* sp., *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter koseri*, *S. aureus* y *Bacillus* sp., presentes en la cavidad oral de serpientes bajo condiciones de cautiverio.

La información precedente indica claramente la importancia que tiene encontrar actividad antibiótica frente a las especies *Acinetobacter*, *Pseudomonas* y *Staphylococcus*

*aureus*, ya que estos microorganismos suelen generar fácilmente resistencia contra los antibióticos comúnmente utilizados (Gatti *et al.*, 1999).

Por lo tanto, resultó relevante no desatender esta complicación infecciosa y, en consecuencia, incluir en este trabajo de tesis el estudio de la actividad antimicrobiana de los extractos de *C. pareira*, propuestos como tratamiento alternativo a la mordedura de serpientes de género *Bothrops*, particularmente de *B. diporus*. Los resultados obtenidos podrían contribuir al desarrollo de un *fitofármaco* que, además de tener actividad contra veneno, sean capaces de evitar el desarrollo de sobreinfecciones bacterianas en la zona de la mordedura.

### **1.1 Principales microorganismos que producen sobreinfección bacteriana en accidentes ofídicos**

A continuación, se describen algunos de los microorganismos identificados como posibles agentes causales de infecciones secundarias a mordedura de serpientes venenosas (Zúñiga-Carrasco & Lozano, 2013; Henao *et al.*, 2005):

#### **-Microorganismos anaerobios:**

Son aquellos que no utilizan oxígeno en su metabolismo. Si el aceptor final de electrones es una molécula orgánica (piruvato o acetaldehído) se trata de un metabolismo fermentativo; si el aceptor final es una molécula inorgánica distinta del oxígeno (sulfato o carbonato) se trata de respiración anaeróbica (Brooks *et al.*, 2007).

**-Clostridium:** este género está definido principalmente por cuatro características (Murray *et al.*, 2009): son bacilos Gram positivos; anaerobios estrictos; poseen endosporas y movilidad por flagelos peritricos. Toman forma de fósforo, palillo de tambor o huso de hilar, de ahí su nombre griego *Klostro*. Las especies más importantes son: *Clostridium botulinum* productor del botulismo; *Clostridium difficile* productor de la diarrea pseudo-membranosa, *Clostridium septicum*, *Clostridium perfringens* productor de la gangrena gaseosa y *Clostridium tetani* productor del tétanos. Este último es frecuentemente encontrado en la cavidad oral de las serpientes venenosas y aislado de infecciones post ofidismo. Por este motivo, se recomienda la profilaxis con penicilina y/o aplicación de la vacuna antitetánica en casos de ofidismo, ya que no se han reportado casos de infecciones asociadas al agente productor de tétanos en pacientes que hayan recibido estas medidas profilácticas (Ayerbe, 2001).

**-*Peptostreptococcus*:** bacteria de morfología cocoide, Gram positiva, pudiendo encontrarse en cadenas cortas, en parejas o individuales, anaerobias y no formadoras de esporas. Son de lento crecimiento con resistencia creciente a antimicrobianos.

Son organismos comensales en humanos habitando la boca, la piel, el aparato digestivo y el excretor, componiendo una parte de la flora intestinal bacteriana. Bajo enfermedades inmunosupresoras o traumáticas (accidente ofídico) pueden convertirse en patogénicos, así como septicémicos, causando daño a su hospedero. Puede causar abscesos cerebrales, hepáticos, mamarios y pulmonares, así como infecciones generalizadas necrotizantes de tejido blando (Mader & Calhoun, 1996).

**-*Microorganismos aerobios (anaerobios facultativos)***

Son organismos que pueden vivir o desarrollarse en presencia de oxígeno. Un ambiente aerobio es aquel rico en oxígeno, a diferencia del anaerobio donde el oxígeno está ausente, o uno microaerófilo donde el oxígeno se encuentra en muy bajos niveles (Brooks *et al.*, 2007).

**-*Enterobacterias* (familia *Enterobacteriaceae*):** los miembros de esta familia forman parte de la microbiota del intestino, llamados coliformes, y de otros órganos del ser humano y de otras especies animales.

**-*Morganella morganii*:** bacilo Gram negativo que comúnmente habita el medio ambiente y el tracto intestinal de humanos, mamíferos y reptiles como flora saprófita, y ocasionalmente, es causante de infecciones urinarias y otras infecciones nosocomiales. Son sensibles a terapias antibióticas con la excepción de los betalactámicos. *M. morganii* es un agente etiológico de infección secundaria al ofidismo y fue aislado de la cavidad bucal de *B. asper* (Henao *et al.*, 2005)

**-*Citrobacter* sp:** bacilo Gram negativo, aerobio, móvil, que se encuentra frecuentemente en el agua, suelo, comida, vegetación y como flora saprófita en el tracto intestinal de muchos animales, además del hombre. Se trata de un microorganismo ubicuo que es causa frecuente de infecciones importantes, especialmente en huéspedes inmunodeprimidos. Es uno de los patógenos más importantes en unidades de cuidados neonatales hospitalarios, causan infecciones respiratorias y urinarias.

**-*Escherichia coli*:** bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo, móvil por flagelos peritricos que rodean su cuerpo e incapaz de formar esporas. Es la bacteria comensal más abundante de la microbiota. Asimismo, es uno de los organismos patógenos más relevantes en el humano, tanto en la producción de infecciones gastrointestinales como de otros sistemas (urinario, sanguíneo, nervioso).

**-*Enterobacter* sp:** bacilo Gram negativo, facultativamente anaeróbico. Muchas de estas bacterias son patógenas y causa de infecciones oportunistas, otras son descomponedoras que viven en la materia orgánica muerta o en el ser humano como parte de una población microbiana normal. Causan principalmente infección del tracto urinario y respiratorio.

**-*Klebsiella pneumoniae*:** bacilo inmóvil, Gram negativo, anaerobio facultativo y con una prominente cápsula de polisacáridos. Es un frecuente patógeno humano, agente etiológico de neumonía asociado también a cuadros respiratorios menos severos como bronquitis. Se aísla frecuentemente en infecciones nosocomiales como infección urinaria y bacteriemia. Se asocia también a infecciones de tejidos blandos. Fue aislado de cavidad oral de serpientes y está asociada a la producción de shock séptico y coagulación intravascular diseminada (CID) (Podschun & Ullmann, 1998).

**-*Proteus rettgeri*:** bacilo Gram negativo, aerobio, que muestra una resistencia marcada contra la mayoría de los antibióticos actualmente disponibles. Causa infecciones generalmente confinadas al tracto urinario de pacientes inmunocomprometidos. Ocasionalmente, se recupera de los abscesos de los tejidos blandos y, rara vez, de la sangre y el tracto respiratorio.

*-No enterobacterias*

**-*Pseudomona aeruginosa* (Ryan & Ray, 2004):** bacilo Gram negativo, aerobio, con motilidad unipolar. Es un patógeno oportunista en humanos. Secreta una variedad de pigmentos como piocianina (azul verdoso), fluoresceína (amarillo verdoso fluorescente) y piorrubina (rojo pardo). El nombre *Pseudomonas* viene del griego *pseudo*, que significa falso, y *monas*, que significa unidad simple. El nombre fue usado inicialmente en la historia de la microbiología como sinónimo de gérmenes. *Aeruginosa*, es el nombre latino para el cardenillo u óxido de cobre, que describe el pigmento azul verdoso visto en los cultivos de laboratorio de este microorganismo. Produce infecciones en heridas y si penetra al organismo en cantidad suficiente, puede provocar bacteriemia. Esta bacteria se adhiere al epitelio intacto normal y no lo vulnera, pero es un microorganismo oportunista en presencia de heridas y laceraciones (Henao *et al.*, 2005).

**-*Aeromonas hydrophila*:** bacilo Gram negativo, que habita principalmente zonas con clima cálido. Esta bacteria también puede vivir en aguas dulces, saladas, estuarianas, cloradas y no cloradas. Puede sobrevivir en medios aerobios y anaerobios (anaerobio facultativo). Es muy resistente a medicamentos y bajas temperaturas. No forma

endosporas. Presentan desplazamiento por medio de flagelos polares. Producen bacteriemias, mionecrosis y celulitis (Henaó *et al.*, 2005).

**-*Staphylococcus aureus*:** bacteria anaerobia facultativa, Gram positiva, inmóvil y no esporulada que se encuentra ampliamente distribuida por todo el mundo. Puede producir una amplia gama de enfermedades, que van desde infecciones cutáneas y de las mucosas relativamente benignas, tales como foliculitis, forunculosis o conjuntivitis, hasta enfermedades de riesgo vital, como celulitis, abscesos profundos, osteomielitis, meningitis, sepsis, endocarditis o neumonía. Además, también puede afectar al aparato gastrointestinal, ya sea por presencia física de *Staphylococcus aureus* o por la ingesta de la enterotoxina estafilocócica secretada por la bacteria. Esta situación se ve favorecida por el hecho de que esta especie habita tanto las mucosas como la piel de los seres humanos, lo que permite que a través de las heridas (accidenten ofídico) pueda penetrar en el torrente sanguíneo del paciente por medio del contacto directo, produce mastitis e infecciones de heridas y quemaduras, además de piodermatitis. Este microorganismo fue aislado de la cavidad bucal de serpientes y también de abscesos post ofidismo y en ocasiones como agente etiológico de infecciones secundarias (Henaó *et al.*, 2005).

## 1.2 Plantas como fuente de antimicrobianos

Los productos naturales derivados de plantas proporcionan metabolitos bioactivos como alternativa de tratamiento o prevención a las infecciones por microorganismos, ya que muchas de estas plantas son conocidas empíricamente por sus propiedades médico-farmacológicas (Alzamora *et al.*, 2001; Huamaní-Achata & Ruiz-Quiroz, 2005; Soares *et al.*, 2005; Ávila *et al.*, 2006; Añanca, 2009; Rodríguez *et al.*, 2010; Wen *et al.*, 2011).

Aproximadamente un 25-50% de los fármacos son derivados de plantas, a pesar de que los avances en la industria farmacéutica han permitido la síntesis de compuestos químicos. Las plantas son ricas en una gran variedad de metabolitos con propiedades antimicrobianas *in vitro* (Cowan, 1999; Christen & Cuendet, 2012; Mathur & Hoskins, 2017).

La OMS reconoce la importancia de las plantas medicinales en el tratamiento y prevención de enfermedades, así como también a nivel económico, al ser una fuente de descubrimiento de nuevas drogas que, en algunos casos, tienen un costo muy inferior a la síntesis de nuevos fármacos. El regreso del interés científico sobre las plantas medicinales, investigando su riqueza y variabilidad química, ha impulsado una revalorización de su empleo en muchas partes del mundo, representando una forma

complementaria de curar, en la que el empirismo de la terapia queda atrás en función de la evidencia científica, armonizando la medicina tradicional con las terapias oficiales de cada país (OMS, 2000).

A nivel mundial se viene explorando y valorando el uso de los productos naturales como fuente de nuevos y variados agentes antimicrobianos. Aproximadamente el 80 % de la población mundial utiliza productos naturales con fines medicinales. La OMS apoya el uso de las medicinas tradicionales y alternativas cuando éstas han demostrado su utilidad y representan un riesgo mínimo (OMS, 2007).

La *medicina tradicional* incluye la medicación a base de hierbas, materiales elaborados con hierbas, preparados con base de hierbas y productos acabados a base de hierbas que contienen ingredientes activos de plantas u otros materiales vegetales o combinaciones de las mismas (OMS, 2002). Además, por utilización tradicional de los *medicamentos herbarios* se entiende un empleo prolongado en el tiempo, bien establecido y ampliamente reconocido como inocuo y eficaz (OMS, 2000).

### **1.3 Extractos de *Cissampelos pareira* como agente antimicrobiano**

Existen diversos estudios científicos que validan la utilización de extractos de distintos órganos de *C. pareira* como agentes antimicrobianos (antibacteriano y/o antiparasitarios) en otras regiones del mundo:

✓ En India, el **extracto etanólico de hojas y tallos** mostró actividad inhibitoria *in vitro* frente a *E. coli*, *Ps. aeruginosa*, *B. subtilis* y *S. aureus* (George & Pandalai, 1949; Valsaraj *et al.*, 1997). Además, los **extractos de raíces** (200 y 400 µg) **obtenidos con DMSO** (dimetilsulfóxido) a partir de ejemplares recolectados en ese país manifestaron actividad antimicrobiana contra *E. coli*; *S. aureus*; *P. aeruginosa* y *B. subtilis* por el método de difusión en agar (Kumar & Sachin, 2013). Además, por este mismo método Muthuselvam, (2016) encontró actividad contra *K. pneumoniae*, *P. vulgaris* y *S. typh*;

✓ En Guatemala, la **tintura** elaborada a partir de **hojas, corteza y raíz** no mostró actividad *in vitro* frente a *E. coli* y *S. aureus* (Cáceres, 1991);

✓ Tanto el **extracto acuoso** como el **clorofórmico de la raíz**, demostraron actividad antimalárica *in vitro* frente a *Plasmodium gallinaceum*. Frente a *P. cathemerium* fue solo activo el extracto clorofórmico (Spencer *et al.*, 1947); además estudios realizados por Singh & Banyal, (2011) demostraron que el **extracto etanólico de raíz** resultó activo contra *Plasmodium berghei*;



✓ En México, el **extracto alcohólico de la planta total** demostró su ineficacia *in vitro* frente a *Entamoeba histolytica* (Heinrich *et al.*, 1992). Además, El **extracto metanólico de hojas y tallos** manifestó actividad antimicrobiana contra *S. aureus* (Sánchez-Medina *et al.*, 2001);

✓ La chalcona **cisampeloflavona**, por su parte, posee actividad inhibitoria *in vitro* contra *Trypanosoma cruzi* y *T. brucei* (Ramírez *et al.*, 2003);

✓ En Kenya, el **extracto metanólico de raíces** manifestó actividad antimicrobiana contra *S. aureus*; *S. typhimurum*; *K. pneumoniae* y *E. coli* por el método de difusión en disco, identificándose además la presencia de las siguientes familias de compuestos químicos: alcaloides, fenoles, flavonoides y terpenoides; pudiendo ser todas, o al menos alguna de ellas responsable de esta actividad antimicrobiana (Njeru *et al.*, 2014). En estudios posteriores Njeru *et al.* (2015) encontraron actividad del **extracto metanólico** contra *Mycobacterium tuberculosis*.

✓ En la Argentina, Anesi & Perez, 1993 no encontraron actividad antimicrobiana en **extractos acuosos de raíces y ramas** (62,5 mg/mL) de *C. pareira* recolectados en provincia de Buenos Aires contra *S. aureus*, *E. coli* y *Aspergillus niger* por el método de difusión en disco.

#### 1.4 Veneno de *Bothrops* como antimicrobiano

Así como existe una rama de estudio de la antibioticoterapia como método de profilaxis frente a una posible infección posterior a la ocurrencia de la mordedura de una serpiente, existe una rama de estudio de los venenos como fuentes de antimicrobianos. Esta rama de estudios no es nueva. Croce & Barrero, (1973) encontraron actividad antimicrobiana en el veneno de sapos y Wade, (1992) la encontró en veneno de abejas. Por su parte, Gatti *et al.* (1999) demostraron que los venenos de todas las especies de *Bothrops* de la Argentina muestran actividad antibiótica contra distintos microorganismos en diferentes proporciones, aunque *B. alternatus* resultó menos activa que *B. diporus* frente a los microorganismos ensayados. Además, Bustillo *et al.* (2005) han demostrado que los venenos ofídicos exhiben actividad citotóxica sobre una amplia gama de bacterias Gram negativas como *E. coli* y Gram positivas como *S. aureus*, por lo que se evidencia que sus componentes son capaces de afectar, no solo células eucariotas, sino también procariotas. Posteriormente, los mismos autores (Bustillo *et al.*, 2008) demostraron la actividad antimicrobiana del veneno de *B. alternatus* contra los mismos microorganismos.

Lazo *et al.* (2007) han investigado la actividad antimicrobiana del veneno crudo de *B. atrox* y de la enzima purificada **L-aminoácido oxidasa (LAO)** sobre cepas bacterianas Gram positivas y Gram negativas. El efecto antibacteriano fue demostrado para ambos productos ensayados observándose que las bacterias Gram positivas son más susceptibles que las Gram negativas. También Stabeli *et al.* (2004) han evaluado la actividad antimicrobiana de la enzima **LAO** de *B. alternatus* e Izidoro *et al.* (2006) lo han hecho con la misma enzima, pero proveniente de *B. pirajai*.

Es bien conocida la actividad antimicrobiana de otros componentes del veneno de *Bothrops* como las enzimas **PLA2** de *B. asper* (Páramo *et al.*, 1998; Lomonte *et al.*, 1999; Santamaría *et al.*, 2004); *B. neuwiedi pauloensis* (Soares *et al.*, 2000; Rodríguez *et al.*, 2004); *B. jararacussu* (Roberto *et al.*, 2004); *B. pirajai* (Soares *et al.*, 2001); *B. moojeni* (Stabeli *et al.*, 2004) y las **metaloproteasas** de *B. jararacussu* (Mazzi *et al.*, 2004).

### **1.5 Profilaxis antibiótica en el ofidismo**

Existe controversia con relación a la aplicación de profilaxis antibiótica frente a un accidente ofídico. En este sentido, un estudio realizado en Costa Rica por Muñoz-Porras & Ovarés-Arroyo, (2010) dejó en evidencia que si bien existe un consenso a favor del uso de antibióticos profilácticos de manera rutinaria en los casos de accidentes ofídicos (Ávila-Agüero, 1999; Bolaños, 1983 y 1984; Rojas *et al.*, 2001) se carece de estudios clínicos que justifiquen esta práctica (Tagwireyi *et al.*, 2001).

Tampoco puede afirmarse que existan estudios de calidad que favorezcan una u otra conducta al respecto. Se ha demostrado que la mordedura de serpiente por sí misma no es justificación razonable para el uso de antibióticos profilácticos. En este sentido, algunas investigaciones experimentales en ratones realizadas en el Instituto Clodomiro Picado (Costa Rica) demuestran que las toxinas de acción local del veneno de *B. asper* contribuyen y facilitan la infección por *S. aureus* (Saravia-Otten, 2004). Sin embargo, casi la mitad (44%) de los accidentes ofídicos en Costa Rica se clasifican como leves mientras que el 51% como moderados, los cuales generalmente no involucran necrosis tisular (Arroyo, 1999), por lo que no representarían casos con mayor susceptibilidad al progreso de complicaciones infecciosas.

Se considera posible que, en los casos de envenenamiento severo y moderado, asociado a patología local importante o con retraso en el inicio del tratamiento, se presente mayor fragilidad hacia el avance de complicaciones infecciosas de tejidos blandos en el sitio de la mordedura y consecuentemente, desde un punto de vista teórico, este grupo

obtendría beneficio si se administran medidas de antibioticoterapia preventiva (Gutiérrez, 2007).

Por todo lo expuesto y dada la importancia de la sobreinfección bacteriana luego del accidente botrópico, en este capítulo se evaluará cualitativa y cuantitativamente, la actividad antimicrobiana de los extractos preparados y las fracciones obtenidas a partir del extracto **A2III PP**, alexitéricamente activo, de manera tal de evaluar la opción de que los componentes alexitéricos resulten también antimicrobianos y de ser así, si ambas actividades biológicas guardan algún tipo de relación.

## **2. Materiales y Métodos**

### **2.1 Obtención de los extractos vegetales**

Se obtuvieron extractos acuosos, etanólicos (etanol 96°) y hexánicos tanto de raíces como de partes aéreas, de ambos sitios geográficos de recolección del material vegetal de estudio: ejemplares de la especie *C. pareira* de PP y LV, tal y como se describió en el apartado **2.2 Preparación de extractos del Capítulo 3a: Actividad alexitérica: Ensayos *in vitro*.**

### **2.2 Ensayos para la evaluación de la actividad antimicrobiana**

No existe reglamentación y/o estandarización de la metodología para evaluar la capacidad inhibitoria del desarrollo microbiano por extractos vegetales, aunque las técnicas que actualmente se utilizan son similares a las empleadas en la evaluación de la sensibilidad de los microorganismos a los antibióticos (Cowan, 1999). Así, las técnicas comúnmente utilizadas, por su sencillez y rapidez, son las de difusión por discos y bioautografía para la obtención de resultados cualitativos y, para resultados cuantitativos, la determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (**CIM**) y Concentración Bactericida Mínima (**CBM**) utilizando métodos de macrodilución en caldo y/o microdilución en placa (Ramayoni, 2007).

#### **2.2.1 Screening por bioautografía directa**

Los métodos bioautográficos permiten combinar la capacidad separativa de la TLC con la determinación de actividad antimicrobiana *in situ* de componentes de una mezcla de compuestos mediante la formación de halos de inhibición de crecimiento de los microorganismos a ensayar. Los compuestos antimicrobianos de los extractos de plantas poseen la capacidad de difundir desde la sílica, que actúa como soporte, hacia el medio

de cultivo que ha sido inoculado con el microorganismo en estudio (Zacchino & Gupta, 2007).

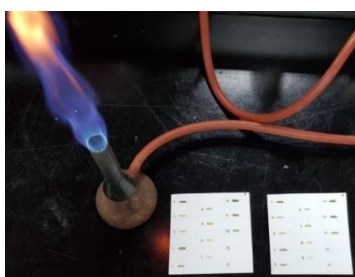
El screening de la actividad antimicrobiana de los extractos acuosos, etanólicos y hexánicos obtenidos a partir del material vegetal recolectado en ambos sitios de prospección, se evaluó mediante la técnica de bioautografía según lo descrito por Horváth *et al.* (2004) y Cleidson *et al.* (2007) utilizando para ello cepas ATCC de microorganismos en fase de crecimiento exponencial: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; *Escherichia coli* ATCC 25922; *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27853; *Enterococcus faecalis* ATCC 29212; *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603.

El ensayo se llevó a cabo en tres etapas que se desarrollaron durante tres días consecutivos:

#### *Etapas 1: Día 1*

**Preparación de los microorganismos en fase exponencial de crecimiento.** Las cepas ATCC de los microorganismos a ensayar, que se conservaron en agar cepa en heladera a 4°C o caldo glicerinado, fueron repicadas en medio Tripteína Soya Agar (TSA) e incubadas 24 h a 37°C para alcanzar su fase exponencial de crecimiento.

**Preparación de extractos vegetales.** 5 µl de los distintos extractos (200 mg/mL) de *C. pareira* fueron sembrados en forma de banana en cromatofolios de sílica gel GF<sup>254</sup> (Merck) (**Figura 4.2.1**). La concentración de extractos fue determinada de manera tal que se siembre, en µg, una cantidad al menos 50 veces superior a la del antibiótico utilizado como control de inhibición del desarrollo bacteriano: 1000 µg. Además, se sembraron como controles negativos de inhibición del desarrollo los solventes utilizados (5 µL de etanol 96°/hexano) y antibióticos, como controles positivos de inhibición del desarrollo: gentamicina 4mg/mL para *S. aureus*, *E. coli*; *Ps. Aeruginosa* y *K. pneumoniae*; ampicilina 100 mg/mL para *E. faecalis*.



**Figura 4.2.1:** Siembra de los extractos de *C. pareira* en placas de sílica gel

**Preparación del medio de cultivo (Agar Müller Hinton-MH).** Se preparó según especificaciones del fabricante (*Britania*) a una concentración de 38 g/L calentando a

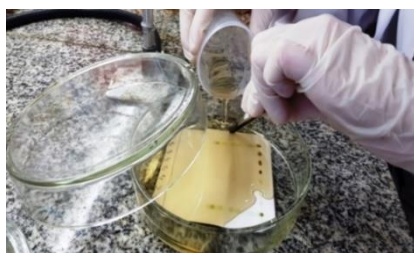
ebullición y agitando para su disolución. Se esterilizó por calor húmedo en autoclave a 121°C durante 15 minutos y se mantuvo a temperatura ambiente hasta su uso.

#### *Etapas 2: Día 2:*

**Preparación del inóculo.** Con cepas ATCC en fase de crecimiento exponencial se preparó la suspensión en solución fisiológica hasta turbidez equivalente a 0,5 de McFarland ( $1.5 \times 10^8$  UFC/mL).

**Acondicionamiento del medio de cultivo.** El agar MH fue fundido en microondas a 70°C y fraccionado en frascos. Luego, a 37°C fue puesto en contacto con el inóculo (0,5 de Mc Farland) recientemente preparado (1%) y agitado en vórtex para lograr la homogenización de los mismos.

**Siembra.** Los cromatofolios sembrados con los distintos extractos y controles de inhibición/ desarrollo se colocaron en el interior de las placas de Petri estériles. Se vertió el medio de cultivo homogeneizado con la cepa ATCC sobre los cromatofolios, cuidando que el medio inoculado quede por encima de los mismos, hasta lograr un espesor de 4 mm de agar (*Figura 4.2.2*).

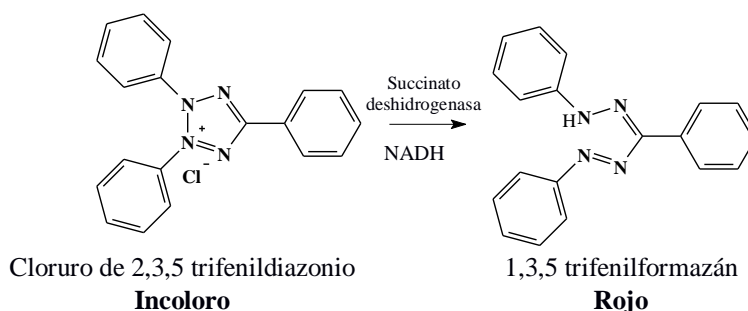


*Figura 4.2.2:* Puesta en contacto de la placa con extractos y medio de cultivo con microorganismo

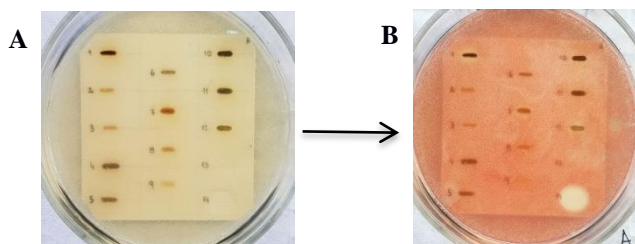
**Etapas de desarrollo del microorganismo en el medio.** Las placas de Petri se incubaron 24 h a 37°C.

#### *Etapas 3: Día 3*

**Evaluación del crecimiento/inhibición del crecimiento de los microorganismos por los extractos (actividad antimicrobiana).** Las placas se observaron a simple vista y luego se colorearon con solución 1% (p/v) de cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio (TTZ) de reciente preparación, ya que las sales de tetrazolio son inestables térmica y lumínicamente. Este colorante es un indicador redox utilizado para diferenciar tejidos metabólicamente activos, indicando la viabilidad de los microorganismos al adquirir color rojo debido a su reducción enzimática a 1,3,5-trifenilformazán (*Figuras 4.2.3 y 4.2.4*).



**Figura 4.2.3:** Reacción REDOX de conversión del cloruro de 2, 3, 5-trifeniltetrazolio (TTZ) a 1, 3, 5-trifenilformazán (TPF) catalizada por una enzima deshidrogenasa



**A:** sin TTZ; **B:** con TTZ. **Figura 4.2.4:** Coloración con TTZ

Aquellos extractos que manifestaron actividad antimicrobiana fueron ensayados a distintas concentraciones para evaluar su comportamiento según la dosis. Se utilizaron técnicas de difusión en discos y bioautografía semicuantitativa.

### 2.2.2 Semicuantificación de la actividad antimicrobiana

#### Por difusión en agar (Abadie *et al.*, 2014)

Este método implicó la aplicación de una cantidad determinada del extracto vegetal sobre un soporte de discos de papel que, a su vez, colocado sobre la superficie del agar, que posee distribuido de manera uniforme el inóculo del microorganismo a estudiar. Se forma por difusión un gradiente de concentración del supuesto antimicrobiano alrededor del soporte, generando un halo de inhibición de crecimiento indicativo de sensibilidad del microorganismo al extracto vegetal en estudio. El diámetro obtenido dependerá de diversos factores como la sensibilidad del microorganismo, la carga del disco, el espesor del agar, el pH y la composición del medio de cultivo, la capacidad de difusión del compuesto, temperatura, atmósfera de incubación, velocidad de duplicación bacteriana, tamaño del inóculo y fase de crecimiento del microorganismo en estudio (Bauer *et al.*, 1966).

Para realizar esta técnica, se prepararon soluciones stock 200 mg/mL de extractos a ensayar. Posteriormente, utilizando papel filtro Whatman N°3 y un perforador convencional, se confeccionaron los discos de 6 mm de diámetro, que fueron esterilizados en autoclave. Se prepararon diluciones al medio de las soluciones stock de los extractos



y se cargaron los discos con un volumen tal que la cantidad de extracto contenida en cada disco fuera de 1000 µg; 500 µg y 250 µg; respectivamente. Los discos se dejaron secar durante 24 h.

Las cepas fueron repicadas en TSA e incubadas a 37°C por 24 h para obtener microorganismos en fase de crecimiento exponencial. Luego, se prepararon suspensiones bacterianas en solución fisiológica estéril hasta alcanzar 0,5 de McFarland ( $1.5 \times 10^8$  UFC/mL).

Se prepararon placas de Petri con agar MH de 4 mm de espesor y se sembró el inóculo sumergiendo un hisopo estéril en la suspensión bacteriana y rotándolo varias veces presionando firmemente sobre la pared interior del tubo por encima del nivel del líquido para remover el exceso de inóculo. Se inoculó toda la superficie del agar MH, realizando estrías con el hisopo, en tres direcciones, para asegurar su distribución uniforme (**Figura 4.2.5**).



**Figura 4.2.5:** Siembra del inóculo

Los discos impregnados con las distintas diluciones de los extractos se colocaron con la ayuda de una pinza estéril sobre la superficie del agar, presionando suavemente sobre cada disco para asegurar un contacto completo con la superficie del mismo (**Figura 4.2.6**). Dentro de los 15 minutos posteriores a la disposición de los discos, se incubaron las placas en posición invertida a 37 °C durante 24 h.



**Figura 4.2.6:** Placas de Petri + discos con extractos a distintas concentraciones + inóculo del microorganismo

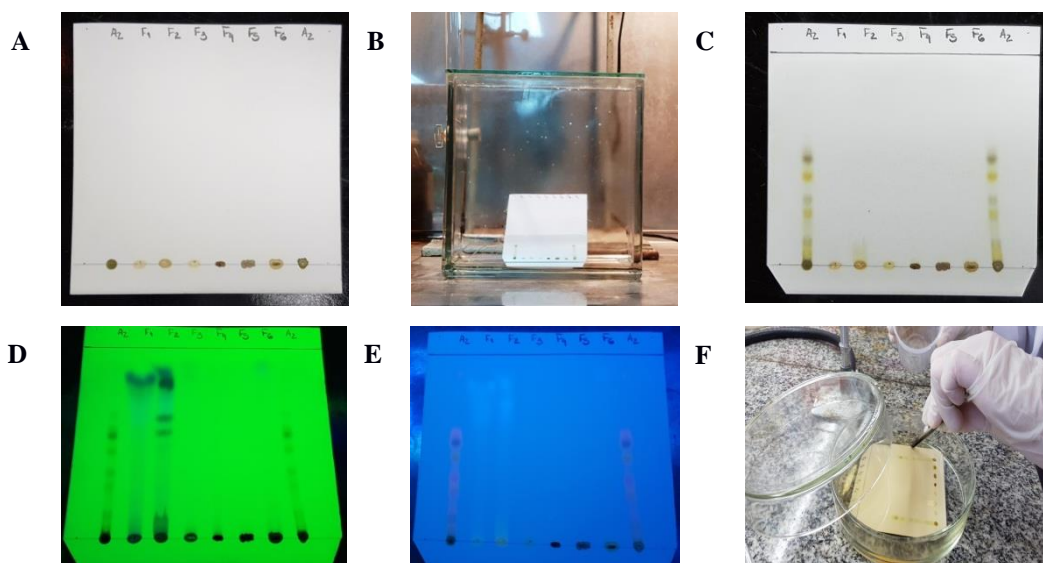
Al cabo de ese tiempo, se procedió a observar las zonas de inhibición generadas por cada extracto. El criterio utilizado para determinar la actividad antimicrobiana fue la presencia o ausencia de halos de inhibición producidos por los extractos frente a los

microorganismos, sin considerar el tamaño de los mismos, como indicador de grado de sensibilidad. El ensayo se realizó por duplicado.

### Por bioautografía

La técnica utilizada se desarrolló como se describió en el apartado **2.2.1 Screening por bioautografía directa** del presente Capítulo, utilizando soluciones stock de los extractos con actividad antimicrobiana de 200 mg/mL, realizando diluciones seriadas al medio, sembrando en bananas los extractos de manera tal de que cada siembra contenga una cantidad igual a 1000 µg; 500 µg y 250 µg, respectivamente.

También se realizó un screening de la actividad antimicrobiana de las fracciones obtenidas a partir de **A2 III PP**, para comprobar si la actividad alexitérica del extracto, comparte también actividad antimicrobiana y, de ser así, si estas fracciones se encuentran enriquecidas en los componentes activos. Los extractos/fracciones se sembraron en banana y se realizó una TLC utilizando fase móvil tolueno-acetato de etilo 90:10 (**Figura 4.2.7**).



**A:** placa con siembra; **B:** corrida cromatográfica; **C:** placa post corrida luz natural; **D:** placa post corrida UV 254 nm; **E:** placa post corrida UV 365 nm; **F:** placa con medio de cultivo e inóculo. **Figura 4.2.7:**

Bioautografía directa de A2III PP y sus fracciones

### 2.2.3 Métodos cuantitativos de dilución en caldo (Ramayoni, 2007)

El método de dilución en caldo se basa en enfrentar distintas concentraciones del compuesto de interés con un microorganismo, de modo tal de obtener una valoración cuantitativa de la capacidad de inhibición del compuesto frente al microorganismo



prueba. Con esta metodología se obtuvo la **CIM**. Este método tiene la ventaja de no depender de la difusión de los compuestos hacia el medio, como ocurre con los métodos de difusión.

Los métodos de dilución pueden ser de macrodilución en tubo, trabajando con volúmenes en el orden de los mililitros, o bien, la variante de microdilución en microplaca, trabajando con volúmenes del orden de los microlitros y realizando la lectura del desarrollo con un lector de microplacas (nefelómetro).

**-Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM): Método de macrodilución en caldo (Abadie *et al.*, 2014)**

**CIM:** se define como la mínima concentración de antimicrobiano ( $\mu\text{g/mL}$ ) que inhibe el crecimiento visible de un microorganismo después de 20 h de incubación a  $37^\circ\text{C}$ . La determinación de la **CIM** se ha establecido como método *gold standard* frente a otros métodos que evalúan susceptibilidad antimicrobiana (Andrews, 2001) para preparar una

suspensión bacteriana en solución salina estéril a una turbidez equivalente al 0,5 de McFarland ( $1,5 \times 10^8$  UFC/mL). A continuación, se hizo una dilución 1/100 ( $1,5 \times 10^6$  UFC/mL) transfiriendo 100  $\mu\text{L}$  de la suspensión bacteriana a 9,9 mL de caldo MH. Se prepararon 5 tubos con 1 mL de caldo MH para cada dilución (tubos del 1 al 5).

Simultáneamente, se preparó la solución madre de los extractos vegetales a una concentración 400 mg/mL utilizando como disolvente una mezcla de etanol-PBS 10:90, siendo esa la máxima concentración de etanol que no inhibió el desarrollo microbiano. Se añadió 1 mL de la solución madre del extracto vegetal al tubo N° 1 que contenía 1 mL de caldo MH (concentración del extracto 200 mg/mL). A partir de este tubo, se prepararon diluciones dobles seriadas, tomando 1 mL de la solución del tubo N° 1 y transfiriéndola al tubo N° 2 (concentración del extracto 100 mg/mL), después de mezclar bien el contenido, se transfirió 1 mL al tubo N° 3 (concentración del extracto 50 mg/mL) y así sucesivamente hasta el tubo N° 5, del que se tomó 1 mL y se descartó.

A cada tubo con extracto vegetal se añadió 1 mL del inóculo de la cepa ( $1,5 \times 10^6$  UFC/mL), suponiendo un inóculo final de  $7,5 \times 10^5$  UFC/mL y las concentraciones finales de los extractos desde 200 mg/mL a 12,5 mg/mL (**Tabla 4.2.1**). Los tubos fueron incubados 20 h a  $37^\circ\text{C}$  y luego se observó la presencia de turbidez, que fue indicativo de crecimiento bacteriano y, por lo tanto, falta de actividad antimicrobiana del extracto. Se calculó la **CIM** considerándola como la concentración correspondiente al tubo con menor

concentración de extracto que no produjo desarrollo bacteriano, demostrado por la ausencia de turbidez.

**Tabla 4.2.1:** Esquema para determinación de CIM

<b>Tubo</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
<b>Caldo MH</b>	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL
<b>Solución madre del extracto</b>	1 mL	-	-	-	-
<b>Diluciones respectivas</b>	-	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL
<b>Inóculo (<math>1 \times 10^6</math> UFC/mL)</b>	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL
<b>Concentración final de extracto</b>	<b>200 mg/mL</b>	<b>100 mg/mL</b>	<b>50 mg/mL</b>	<b>25 mg/mL</b>	<b>12,5 mg/mL</b>
<b>Concentración final del inóculo</b>	$7,5 \times 10^5$ UFC/mL	$7,5 \times 10^5$ UFC/mL	$7,5 \times 10^5$ UFC/mL	$7,5 \times 10^5$ UFC/mL	$7,5 \times 10^5$ UFC/mL

**-Determinación de la Concentración Bactericida Mínima (CBM)** (Abadie *et al.*, 2014)

**CBM:** se define como la mínima concentración de antimicrobiano que elimina a más del 99,9% de los microorganismos viables después de 24 h de incubación (Isenberg, 1999; CLSI, 1999)

A partir de cada uno de los tubos sin desarrollo bacteriano, se inoculó 0,1 mL en placas con TSA y con un ansa bacteriológica se estrió su superficie. Las placas se incubaron 20 h a 37 °C. Finalmente, para determinar la **CBM** se contó el número de colonias por placa, considerándose dicha **CBM** como la menor concentración del extracto cuyo sub-cultivo produjo un número de colonias menor al 0,1% del inóculo original ( $7,5 \times 10^5$  UFC/mL), es decir, un número menor a 750 UFC/mL, y como se inoculó la décima parte de 1 mL (0,1 mL), entonces se consideró la **CBM** al sub-cultivo que produjo menos de 75 colonias.

### 3. Resultados y Discusión

#### 3.1 Actividad antimicrobiana de los extractos de *C. pareira*

##### 3.1.1 Screening por bioautografía directa

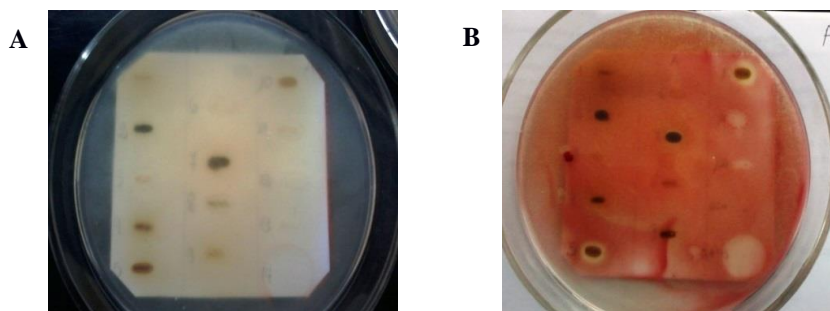
Se llevó a cabo sobre la totalidad de los extractos obtenidos (36 extractos), con el objeto de realizar un análisis comparativo de la especie según factores edafológicos, estacionales y considerando la naturaleza de los metabolitos extraídos con cada solvente (agua, etanol 96°, hexano) Los resultados se exponen en la **Tabla 4.3.1.**

**Tabla 4.3.1:** Inhibición de la actividad antimicrobiana de extractos de *C. pareira* por bioautografía

Microorganismo		<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
ATCC		25923	25922	29212	27853	700603
Control de inhibición		Gentamicina	Gentamicina	Ampicilina	Gentamicina	Gentamicina
Paso de la Patria						
Otoño						
Partes aéreas	acuoso	-	-	-	-	-
	etanólico	-	-	-	-	-
	hexánico	-	-	-	-	-
Raíces	acuoso	-	-	-	-	-
	etanólico	(++)	-	-	-	-
	hexánico	(++)	-	-	-	-
Primavera						
Partes aéreas	acuoso	-	-	-	-	-
	etanólico	(++)	-	-	-	-
	hexánico	-	-	-	-	-
Raíces	acuoso	-	-	-	-	-
	etanólico	(++)	-	-	-	-
	hexánico	(++)	-	-	-	-
Verano						
Partes aéreas	acuoso	-	-	-	-	-
	etanólico	(+)	-	-	-	-
	hexánico	-	-	-	-	-
Raíces	acuoso	-	-	-	-	-
	etanólico	(++)	-	-	-	-
	hexánico	-	-	-	-	-
Lomas de Vallejos						
Otoño						
Partes aéreas	acuoso	-	-	-	-	-
	etanólico	-	-	-	-	-
	hexánico	-	-	-	-	-
Raíces	acuoso	-	-	-	-	-
	etanólico	(+)	-	-	-	-
	hexánico	(+)	-	-	-	-
Primavera						
Partes aéreas	acuoso	-	-	-	-	-
	etanólico	-	-	-	-	-
	hexánico	-	-	-	-	-
Raíces	acuoso	-	-	-	-	-
	etanólico	(++)	-	-	-	-
	hexánico	-	-	-	-	-
Verano						
Partes aéreas	acuoso	-	-	-	-	-
	etanólico	-	-	-	-	-
	hexánico	-	-	-	-	-
Raíces	acuoso	-	-	-	-	-
	etanólico	-	-	-	-	-
	hexánico	-	-	-	-	-

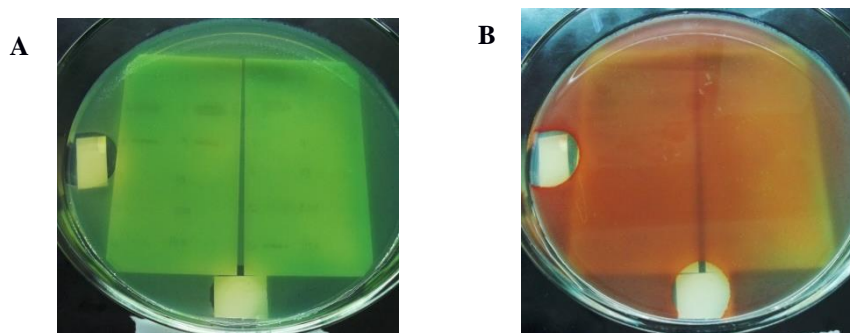
(+) y (++) : inhibición en menor o mayor medida. Indicativo de actividad antimicrobiana; (-) sin inhibición. Indicativo de inactividad.

En las **Figuras 4.3.1 y 4.3.2** se observa el revelado de las placas de Petri con sales de tetrazolio (TTZ) y los halos de inhibición producidos por extractos y controles de inhibición.



**A:** placa sin colorear. **B:** placa coloreada con TTZ. **Zonas sin color:** inhibición de crecimiento del microorganismo por el extracto ensayado. **Control de inhibición:** gentamicina. **Figura 4.3.1:**

Bioautografía directa de extractos de *C. pareira* para *S. aureus*



**A:** placa sin colorear. **B:** placa coloreada con TTZ. **Zonas sin color:** inhibición de crecimiento del microorganismo por el extracto ensayado. **Control de inhibición:** gentamicina. **Figura 4.3.2:**

Bioautografía directa de extractos de *C. pareira* para *Ps. Aeruginosa*

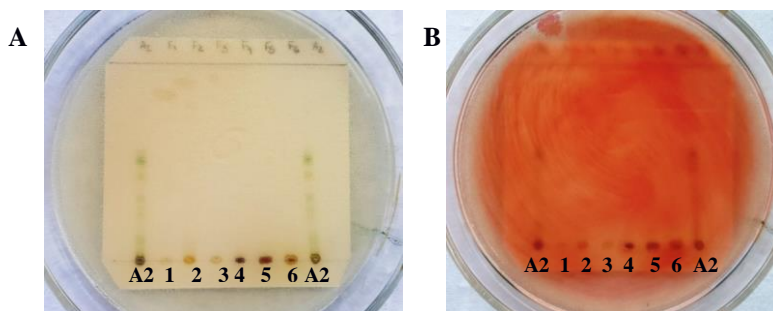
La diferencia en la actividad antimicrobiana manifestada por los extractos de *C. pareira* ensayados puede deberse a la diversidad de factores que afectan el desarrollo de esta actividad biológica: características genéticas propias de la especie en estudio, factores medioambientales de tipo climáticos (temperatura y humedad ambiente), de altitud y tipo de suelo, período de vida en el que la planta es recolectada (joven o adulta), tratamiento posterior a su recolección y existencia o no de fenotipos particulares de la especie (Houghton & Raman, 1998). Los extractos de *C. pareira* **sólo manifestaron actividad antimicrobiana contra *S. aureus* ATCC 25923** y ésta actividad mostró una variación según sitio geográfico de recolección: **los extractos de PP fueron más activos que aquellos recolectados en LV**, observándose que, por ejemplo, en verano ninguno de los extractos de LV resultó activo. Además, para este sitio de recolección, las raíces presentaron actividad antimicrobiana. Para los extractos obtenidos del material recolectado en PP, además de las raíces, las partes aéreas etanólicas de primavera y verano inhibieron el desarrollo del microorganismo por el método de bioautografía.

Estos resultados coinciden en actividad contra *S. aureus* con los obtenidos por Njeru *et al.* (2014) para extractos metanólicos de raíces de material vegetal de Kenya, y lo obtenidos por George & Pandalai (1949) y Valsaraj *et al.* (1997) para extractos etanólicos

de hojas y tallos, aunque estos mostraron, además, actividad contra microorganismos Gram negativos. Los autores de estos trabajos no hacen referencia a la época del año en la que fue recolectado el material vegetal, por lo tanto, no resulta posible discutir acerca de la influencia de la variación estacional, pero es evidente que el sitio geográfico de recolección es una fuente de variabilidad en el metabolismo secundario de la especie.

Respecto del material vegetal estudiado en México, los resultados de este trabajo de tesis son consistentes con los obtenidos por Sánchez-Medina *et al.* (2001) para la actividad contra *S. aureus* únicamente, aunque los extractos ensayados fueron los metanólicos de hojas y tallos, mientras que, la mayor actividad encontrada por esta investigación resultó en las raíces. Se difiere completamente de los resultados de Cáceres *et al.* (1991) respecto de la tintura elaborada a partir de hojas, corteza y raíces de material de Guatemala, dado que estos no manifestaron actividad *in vitro* frente a *S. aureus*.

Debido a que el extracto **A2III PP** manifestó actividad antimicrobiana frente a *S. aureus* ATCC 25923 y además es alexitéricamente activo produciendo por SDS-PAGE un borramiento total de bandas de veneno, se realizó el screening de la actividad antimicrobiana de sus fracciones. El objetivo fue evaluar si son los mismos componentes alexitéricamente activos aquellos que manifestaron actividad antimicrobiana, y si alguna de las fracciones fue capaz de enriquecerse en componentes con esta actividad biológica. Los resultados obtenidos se exponen en la **Figura 4.3.3** y **Tabla 4.3.2**



**A:** sin colorear. **B:** coloreado con TTZ; **Microorganismo:** *S. aureus* ATCC 25923. **A2:** A2III PP. **1; 2; 3; 4; 5 y 6:** fracciones de A2III PP. **Figura 4.3.3:** Bioautografía directa de las fracciones de *C. pareira* posterior a TLC

Como puede observarse en la **Figura 4.3.3**, ninguna de las fracciones fue capaz de inhibir el desarrollo del microorganismo ensayado (*S. aureus*), por lo que puede afirmarse que las fracciones no fueron enriquecidas en los componentes con actividad antimicrobiana. Además, la actividad del extracto entero podría explicarse como un sinergismo entre componentes que, al separarse en las fracciones, ya no son capaces de manifestar esa actividad.

### 3.1.2 Semicuantificación de la actividad antimicrobiana

#### Por difusión en agar

Se ensayaron los extractos que manifestaron actividad antimicrobiana a distintas concentraciones, y que además manifestaron la mayor actividad alexitérica: **A2II PP** y **A2III PP**. Los resultados se exponen en la *Tabla 4.3.3*.

**Tabla 4.3.3:** Inhibición de la actividad antimicrobiana de extractos de *C. pareira* por difusión en agar

	1000 µg	500 µg	250 µg
<b>A2II PP</b>	Sin inhibición	Sin inhibición	Sin inhibición
<b>A2III PP</b>	Sin inhibición	Sin inhibición	Sin inhibición

**Microorganismo:** *S. aureus* ATCC 25923. **A2II PP y A2III PP:** extracto etanólico de partes aéreas recolectado de la localidad de PP en primavera y verano, respectivamente.

No se observaron zonas de inhibición del desarrollo bacteriano en los extractos ensayados (*Figura 4.3.4*). Este método **no resultó útil** para evaluar la actividad antimicrobiana de los extractos vegetales, debido a que los componentes que podrían resultar activos, no fueron capaces de difundir al medio de cultivo desde los discos y por lo tanto no manifestaron actividad, que si fue verificada utilizando técnicas bioautográficas.



**I:** A2III PP 1000 µg; **II:** A2III PP 500 µg; **III:** A2III PP 250 µg; **IV:** A2II PP 1000 µg; **V:** A2II PP 500 µg; **VI:** A2II PP 250 µg; **Microorganismo:** *S. aureus* ATCC 25923. **Figura 4.3.4:** Inhibición de la actividad antimicrobiana por difusión en agar

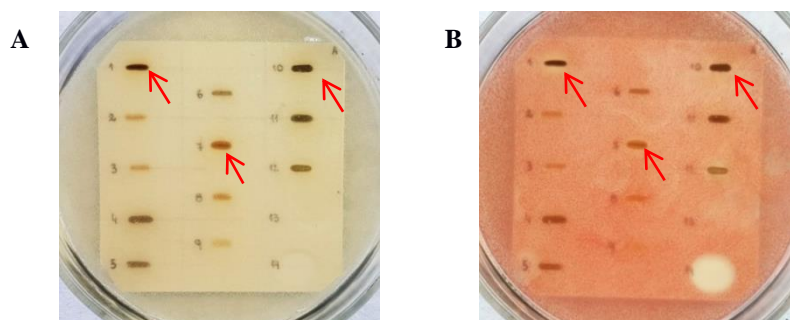
Este resultado se contrapone a los obtenidos por Kumar & Sachin, (2013); quienes identificaron actividad antimicrobiana de extractos de raíces (200 y 400 µg) de ejemplares de India, obtenidos con dimetilsulfóxido (DMSO) contra *E. coli*; *S. aureus*; *P. aeruginosa* y *B. subtilis* por este método. Sin embargo, es concordante con los hallazgos de Anesi & Perez, (1993) quienes no encontraron actividad antimicrobiana por éste método.

#### Por bioautografía

Se ensayaron por esta técnica, a distintas concentraciones, aquellos extractos que manifestaron actividad antimicrobiana y, además, resultaron activos alexitéricamente. Se



descartaron los extractos recolectados en otoño de ambos sitios de recolección debido a que los mismos no resultaron ser capaces de inhibir de forma significativa las actividades *in vitro* del veneno. El mismo criterio se utilizó para descartar los extractos de raíces recolectados de PP en primavera. Los resultados obtenidos se exponen en la **Figura 4.3.5** y **Tabla 4.3.4**.



**Microorganismo:** *S. aureus* ATCC 25923. **(1):** R2II LV 1000; **(2):** R2II LV 500; **(3):** R2II LV 250; **(4):** A2II PP 1000; **(5):** A2II PP 500; **(6):** A2II PP 250; **(7):** R2III PP 1000; **(8):** R2III PP 500; **(9):** R2III PP 250; **(10):** A2III PP 1000; **(11):** A2III PP 500; **(12):** A2III PP 250; **(13):** etanol 96°; **(14):** gentamicina. **A:** sin colorear. **B:** coloreado con TTZ. **Fechas rojas:** extractos activos. **Figura 4.3.5:** Inhibición de la actividad antimicrobiana por bioautografía.

**Tabla 4.3.4:** Inhibición de la actividad antimicrobiana por bioautografía directa.

	R2II LV	A2II PP	R2III PP	A2III PP
<b>100</b>	+++	Sin inhibición	++	+
<b>500</b>	Sin inhibición	Sin inhibición	Sin inhibición	Sin inhibición
<b>250</b>	Sin inhibición	Sin inhibición	Sin inhibición	Sin inhibición

**Microorganismo:** *S. aureus* ATCC 25923. (+); (++) y (+++): Indicativo de actividad antimicrobiana. **1000; 500 y 250** µg de extracto.

Este método brindó una aproximación de las concentraciones que resultaron activas contra el microorganismo ensayado (*S. aureus*). Asimismo, se verificaron los controles de inhibición del desarrollo bacteriano (gentamicina) y de crecimiento (etanol 96°).

### 3.1.3 Métodos cuantitativos de dilución en caldo

#### Determinación de la CIM por macrodilución en caldo

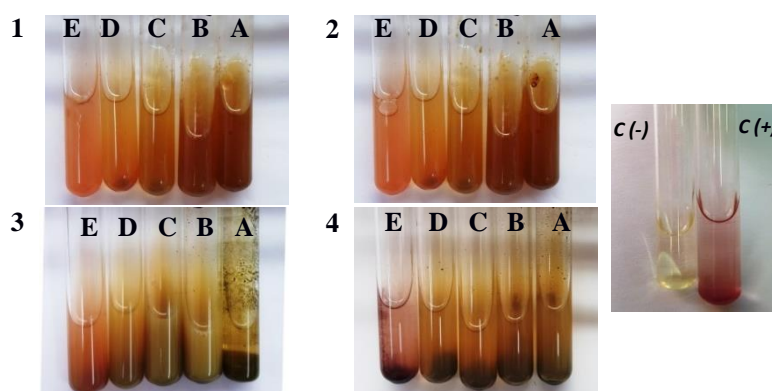
Los extractos ensayados semicuantitativamente por bioautografía frente a *S. aureus* ATCC 25923 fueron ensayados por dilución en caldo para hallar la **CIM**. Los resultados se exponen en la **Tabla 4.3.5** y **Figura 4.3.6**.

**Tabla 4.3.5:** Determinación de CIM por macrodilución en caldo.

	200 mg/mL (A)	100 mg/mL (B)	50 mg/mL (C)	25 mg/mL (D)	12,5 mg/mL (E)
<b>R2II LV (1)</b>	Inhibió	Inhibió	Inhibió	Sin inhibición	Sin inhibición
<b>R2III PP (2)</b>	Inhibió	Inhibió	Inhibió	Sin inhibición	Sin inhibición
<b>A2II PP (3)</b>	Inhibió	Inhibió	Inhibió	Sin inhibición	Sin inhibición
<b>A2III PP (4)</b>	Inhibió	Inhibió	Inhibió	Sin inhibición	Sin inhibición
<b>Gentamicina</b>	Inhibió				
<b>Solvente</b>	Sin inhibición				

**Microorganismo:** *S. aureus* ATCC 25923. **Control inhibición:** gentamicina; **Control crecimiento:**

etanol:PBS 10:90. (1); (2); (3); (4); (A); (B); (C); (D) y (E): referencia **Figura 4.3.6.**

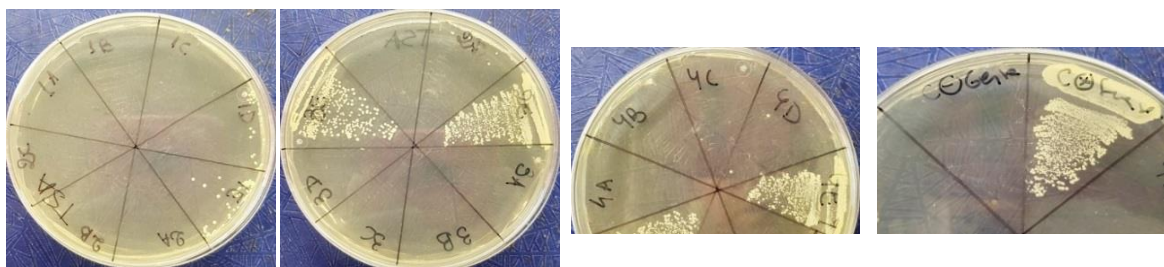


**1:** R2II LV; **2:** R2III PP; **3:** A2II PP; **4:** A2III PP; **A:** 200 mg/mL; **B:** 100 mg/mL; **C:** 50 mg/mL; **D:** 25 mg/mL; **Microorganismo:** *S. aureus* ATCC 25923. **C (-):** control inhibición: Gentamicina; **C (+):** control crecimiento: etanol:PBS 10:90. **Figura 4.3.6:** CIM por macrodilución en caldo

La **CIM** para los extractos frente a *S. aureus* ATCC 25923 fue de **50 mg/mL**.

### Determinación de la Concentración Bactericida Mínima (CBM)

Los resultados se exponen en la **Tabla 4.3.6** y **Figura 4.3.7**. Todos los ensayos se realizaron por duplicado, consignándose como **CBM** el valor promedio del obtenido.



**1:** R2II LV **A:** 200 mg/mL; **B:** 100 mg/mL; **C:** 50 mg/mL; **D:** 25 mg/mL **E** 12,5 mg/mL; **2:** R2III PP; **3:** A2II PP; **4:** A2III PP. **Microorganismo:** *S. aureus* ATCC 25923. **C (-):** control inhibición: gentamicina; **C (+):** control crecimiento (solvente): etanol:PBS 10:90. **Figura 4.3.7:** CBM de extractos de *C. pareira*



**Tabla 4.3.6:** Determinación de CBM.

	200 mg/mL (A)	100 mg/mL (B)	50 mg/mL (C)	25 mg/mL (D)	12,5 mg/mL (E)
<b>R2II LV (1)</b>	Inhibió	Inhibió	Inhibió	41 colonias	60 colonias
<b>R2III PP (2)</b>	Inhibió	Inhibió	Inhibió	32 colonias	>10 <sup>5</sup> UFC
<b>A2II PP (3)</b>	Inhibió	Inhibió	Inhibió	Inhibió	>10 <sup>5</sup> UFC
<b>A2III PP (4)</b>	Inhibió	Inhibió	Inhibió	2 colonias	>10 <sup>5</sup> UFC
<b>Gentamicina</b>	Inhibió				
<b>Solvente</b>	>10 <sup>5</sup> UFC				

**Microorganismo:** *S. aureus* ATCC 25923. **Control inhibición:** gentamicina; **Control crecimiento:** etanol:PBS 10:90. (1); (2); (3); (4); (A); (B); (C); (D) y (E): referencia **Figura 4.3.7.**

Por lo tanto, la **CBM** para los extractos **R2III PP; A2II PP y A2III PP** resultó **25 mg/mL**; y para el extracto **R2II LV 12,5 mg/mL**.

#### 4. Conclusiones

La importancia de los resultados obtenidos radica en el hecho que, además de la sintomatología local del accidente por serpientes del genero *Bothrops* y en particular de *B. diporus*, una de las complicaciones más frecuentes asociadas a esta afección es la sobreinfección microbiana por distintos microorganismos, entre los que se encuentra *S. aureus* (Zúñiga-Carrasco & Lozano, 2013; Henao *et al.*, 2005). Por este motivo, y debido a la creciente resistencia que adquieren los microorganismos a los antibióticos comúnmente utilizados para tratar este tipo de infecciones, es de suma importancia hallar compuestos que permitan el eventual desarrollo de nuevos *medicamentos herbarios* que constituyan un tratamiento alternativo y efectivo para estas complicaciones locales.

No hay que descartar el hecho que, el mismo veneno de *B. diporus* posee actividad citotóxica contra *S. aureus* (Bustillo *et al.*, 2005) y si bien se ha encontrado a esta bacteria como uno de los principales agentes responsables de sobreinfecciones locales, esto podría deberse a que el veneno circulante no tendría actividad local en las complicaciones por infección.

Por otra parte, es muy importante la caracterización de la actividad antimicrobiana de los distintos extractos de *C. pareira* autóctonos, ya que esta actividad biológica no resultó coincidente con la descrita en otras regiones del mundo en especificidad respecto

a microorganismos (solo activos contra *S. aureus*), en órgano activo (extracto etanólico de hojas y raíces), en sitio de colecta (PP/LV) y estado vegetativo (primavera/verano).

Teniendo en cuenta que el extracto más activo como alexitérico fue **A2III PP** y que se podría utilizar como tratamiento local en forma de gel según se ha demostrado en el **Capítulo IIIb: Actividad Alexitérica. Citotoxicidad y ensayos *in vivo***, puede afirmarse que, si se utiliza el extracto entero y no la fracción F6 en su preparación, también podría resultar útil como inhibidor de la sobreinfección por *S. aureus* en la zona de la herida. Aun cuando se haya detectado mayor actividad antimicrobiana en el extracto **R2II LV**, la actividad alexitérica de este último no tiene nivel de comparación con la obtenida para **A2III PP**.

## 5. Referencias Bibliográficas

- Abadie, R.; Medina, R.; Ruiz, L., Tresierra-Ayala, A. (2014). Actividad antibacteriana de extractos vegetales frente a cepas intrahospitalarias, Iquitos-Perú-. *Revista ECI Perú*, 11, 31-38.
- Alzamora, L.; Morales, L.; Armas, L.; Fernández, G. (2001). Medicina Tradicional en el Perú: actividad antimicrobiana *in vitro* de los aceites esenciales extraídos de algunas plantas aromáticas. *Revista Peruana de Biología*, 62, 156-161.
- Andrews, J. (2001). Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48, 5-16.
- Anesi, C.; Pérez, C. (1993). Screening of plants used in Argentine folk medicine for antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 39, 119-128.
- Añanca, E. (2009). TESIS: Efecto antibacteriano *in vitro* del extracto acuoso de vainas de *Caesalpinia spinosa* (tara) en cepas de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes*. Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann. Facultad de Farmacia y Bioquímica, Perú.
- Arroyo, O.; Rojas, G.; Gutiérrez J. (1999) Envenenamiento por mordeduras de serpiente en Costa Rica en 1996: epidemiología y consideraciones clínicas. *Acta Médica Costarricense*, 41, 23-29.
- Ávila, L.; Baquero, E.; Viña, A.; Murillo, E. (2006). Actividad antibacteriana de *Diplostegium Tolimense Cuatrec.* (Asteraceae) frente a *Staphylococcus aureus*. *Vitae* [en línea], 13, 2- 93
- Ávila-Agüero, M. (1999). Nuevos conceptos en el manejo de los pacientes pediátricos mordidos por serpientes venenosas. *Acta Pediátrica Costarricense*, 13, 107-109.
- Ayerbe, S. (2001). Tratamiento del Ofidismo en el Departamento de Cauca, Colombia. *Revista de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad de Cauca*, 3, 20-26.
- Bauer, A.; Kirby, W.; Sherris, J.; Turck, M. (1966) Antibiotic susceptibility by standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*, 45, 493-496.
- Bolaños R. (1983). Las serpientes venenosas de Centroamérica y el problema del ofidismo. Segunda parte. Recursos terapéuticos y tratamiento. *Revista Costarricense de Ciencias Médicas*, 4,17-26.
- Bolaños R. (1984) Serpientes venenos y ofidismo en Centroamérica. San José. Editorial Universidad de Costa Rica.

- Brooks, G.; Carroll, K.; Butel, J.; Morse, S. (2007). Jawetz, Melnick & Adelberg's Medical Microbiology. 24th ed. McGraw Hill. 307-312.
- Bustillo, S.; Leiva, L.; Merino, L.; Acosta, O.; Bal de Kier Joffé, E.; Gorodner, J. (2008). Antimicrobial activity of *Bothrops alternatus* venom from the Northeast of Argentina. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 50, 79-82.
- Bustillo, S.; Merino, L.; Leiva, L.; Bal de Kier Joffé, E.; Gorodner, J. (2005). Actividad Bactericida del veneno de *Bothrops alternatus* del Nordeste de Argentina. *Comunicaciones Científicas y Tecnológicas*. Resumen M-009
- Cáceres, A. (1991). Plants used in Guatemala for the treatment of dermatophytic infections. Screening for antimicotic activity of 44 plant extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, 31, 263-276.
- Christen, P.; Cuendet, M. (2012). Plants as a source of therapeutic and health products. *Chimia*, 66, 320-323.
- Cleidson, V.; Machado de Souza, S.; Smânia, E.; Smânia, A. (2007). Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38, 369-380.
- CLSI (1999). Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents; Approved Guideline. CLSI document M26-A. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Costa, J.; De Siqueira, F. (2002). Animais Peçonhentos No Brasil. *Biología, Clínica y Terapéutica del Accidente*. Ed. Sarvier FASPEP, Sao Paulo.
- Cowan, M. (1999) Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(4), 564-582.
- Croce, G.; Barrero, C. (1973). Antimicrobial activity in the skin secretions of *Bombina variegata pachypus*. *Toxicon*, 11, 99-105.
- Gatti, E.; Stanchi, G.; Arias, R.; Grisolia, C.; Martino, G. (1999). Estudio de la actividad antibiótica del veneno de serpiente *Bothrops* (Ophidia: Viperidae: Crotalinae). *Avances en Ciencias Veterinarias*, 13, 25-29.
- George, M.; Pandalai, K. (1949). Investigation of plants antibiotics. *Indian Journal of Medical Research*, 37, 169-181.
- Goldstein, E.; Citron, D.; González, H.; Russell, F.; Finglod, S. (1981). Bacteriology of rattle snake venom and implication in therapy. *Journal of Infectious Diseases*, 140, 818-821.
- Goldstein, E.; Citron, D.; Wield, B.; Blachmant, U.; Sutter, V.; Miller, T.; Finegold, S. (1978). Bacteriology of Human and Animal Bite Wounds. *Journal of Clinical Microbiology*, 8, 667-672.
- Grisolia C., Stanchi N.O., Francini F., Castro E. (1996) Actividad de los Centros Antiponzoñosos. Primeros 20 años: 1975 - 1995. *Ministerio de Salud*, Provincia de Buenos Aires.
- Gutiérrez J. (2007). Comunicación personal.
- Heinrich, M.; Rimpler, H.; Barrera, N. (1992). Parasitological and microbiological evaluation of Mixe Indian Medicinal Plants (Mexico). *Journal of Ethnopharmacology*, 36, 66-80.
- Henao, E.; Latorre, J.; Muñoz, C.; Caldas, L.; Delgado, S.; Ayerbe, S. (2005). Caracterización de la flora bacteriana patógena, presente en la cavidad bucal de víboras en el serpentario del Museo de Historia Natural de la Universidad del Cauca. *Revista de la Facultad de Ciencias de la Salud Universidad del Cauca*, 7, 23-29.

- Horváth, G.; Szabó, L.; Lemberkovics, E.; Botz, L.; Kocsis, B. (2004). Characterization and TLC–Bioautographic Detection of Essential Oils from Some Thymus Taxa. Determination of the activity of the oils and their components against plant pathogenic bacteria. *Journal of Planar Chromatography*, 17, 300-304.
- Houghton, P.; Raman, A. (1998). Laboratory Handbook for the Fractionation of Natural Extracts. *Springer*, US.
- Huamaní-Achata, M.; Ruiz Quiroz, J. (2005). Tesis: Determinación de la actividad antifúngica contra *Candida albicans* y *Aspergillus niger* de 10 plantas medicinales de 3 departamentos del Perú. UNMSM. *Escuela Académica Profesional de Farmacia y Bioquímica*, Perú.
- Instituto Clodomiro Picado. (2009). El envenenamiento por mordedura de serpiente en Centroamérica. Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica. *Servicios de Información, Vicerrectoría de Acción Social*.
- Isenberg, D. (1999) Tests to Assess Bactericidal Activity. Antimicrobial Susceptibility Testing Clinical Microbiology Procedures Handbook. *ASM*, 5, 1-14.
- Izidoro, L.; Ribeiro, M.; Souza, G.; Sant’Ana, C.; Hamaguchi, A.; Homsí-Brandeburgo, M.; Goulart, L.; Beleboni, R.; Nomizo, A.; Sampaio, S.; Soares, A.; Rodrigues, V. (2006). Biochemical and functional characterization of an L-aminoacid oxidase isolated from *Bothrops pirajai* snake venom. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 14, 7034-7043.
- Jorge, M.; Mendoca, J.; Ribero, L.; Silva, M.; Kusano, E.; Santos, C. (1990). Flora bacteriana de cavidade oral, presas e veneno de *Bothrops jararaca*: possível fonte de infecção no local da picada. *Revista do Instituto de Medicina Tropical*, 32, 6-10.
- Kumar, C.; Sachin, J. (2013). Extraction and isolation of bioactive compounds from *Ficus racemose* Bark and *Cissampelos pareira* root by chromatographic techniques. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 20, 101-106.
- Lazo, F.; Málaga, O.; Yarlequé, A.; Severino, R.; Gutiérrez, S. (2007). Actividad antimicrobiana de una flavoproteína aislada del veneno de la serpiente peruana *Bothrops atrox* (“jergón”). *Revista de la Sociedad Química de Perú*, 73, 197-207.
- Lomonte, B.; Angulo, Y.; Rufini, S.; Cho, W.; Giglio, J.; Ohno, M.; Daniele, J.; Geoghegan, P.; Gutierrez, J. (1999). Comparative study of the cytolytic activity of myotoxic phospholipases A2 on mouse endothelial (tEnd) and skeletal muscle (C2C12) cells *in vitro*. *Toxicon*, 37, 145-158.
- Mader, J.; Calhoun, J. (1996). Bone, joint, and necrotizing soft tissue infections. In: Baron's Medical Microbiology. 4th Ed. *University of Texas Medical Branch*.
- Manrique-Chicoma, H. (2000) Ofidismo: Módulo Técnico. Serie Documentos Monográficos. *Ministerio de Salud*, Lima, Perú.
- Mathur, S.; Hoskins, C. (2017). Drug development: Lessons from nature (Review). *Biomedical Reports*, 6, 612-614.
- Mazzi, M.; Marcussi, S.; Carlos, G.; Stabeli, R.; Franco, J.; Ticli, F.; Cintra, A.; Franca, S.; Soares, A.; Sampaio S. (2004). A new hemorrhagic metalloprotease from *Bothrops jararacussu* snake venom: isolation and biochemical characterization. *Toxicon*, 44, 215-223.

- Mackessy, S. (2010). Handbook of venoms and toxins of reptiles. *Taylor & Francis Group, LLC, Boca Raton, Florida*.
- Muñoz-Porras, A.; Ovarés-Arroyos, C. (2010) Antibioticoterapia en el accidente ofídico: evidencia actual. *Revista Médica de Costa Rica y Centroamerica*, 593, 251-254.
- Murray, P.; Rosenthal, K.; Pfaller M. (2009). Clostridium. Microbiología Médica. *Elsevier-Mosby 6ta Ed.* España.377-389.
- Muthuselvam, D. (2016). Antibacterial activity of *Cissampelos pareira* Linn against certain bacterial strains. *World Journal of Pharmaceutical Research*, 5, 1439-1444.
- Nishioka, S.; Jorge, M.; Silveira, P.; Ribeiro, L. (2000). South American rattlesnake bite and soft-tissue infection: report of a case. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 33(4), 401-402.
- Njeru S.; Obonyo, M.; Onsarigo, S.; Ngari, S. (2015). Bioactivity of *Cissampelos pareira* medicinal plant against *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 3,167-173.
- Njeru, S.; Musa, R.; Mwaniki, S.; Oduor, P. (2014). Screening for antimicrobial activity of *Cissampelos pareira* L. methanol root extract. *European Journal of Medicinal Plants*. 4, 45-51.
- OMS. (2000) Pautas generales para las metodologías de investigación y evaluación de la medicina tradicional. *WHO/EDM/TRM 2000.1*.
- OMS. (2002) Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2002-2005. Ginebra. *Programa de Medicina Tradicional*. Disponible en: *WHO/EDM/TRM/2002.1*.
- OMS. (2007) Informe del taller interregional de la OMS sobre el uso de medicina tradicional en la atención primaria de salud. Disponible en: <http://apps.who.int/medicinedocs/documents/s16202s/s16202s.pdf>
- Otero, R.; Gutiérrez, J.; Mesa, M.; Duque, E.; Rodríguez, O.; Arango, J.; Gómez, F.; Toro, A.; Cano, F.; Rodríguez, L.; Caro, E.; Martínez, J.; Cornejo, W.; Gómez, L.; Uribe, F.; Cárdenas, L.; Nuñez, V.; Díaz, A. (2002) Complication of *Bothrops*, *Porthidium* and *Bothriechis* Snakebites in Colombia. A Clinical and Epidemiology estudy of 39 cases attended in a University hospital. *Toxicon*, 40, 1107-114.
- Páramo, L.; Lomonte, B.; Pizarro-Cerda, J.; Bengoechea, J.; Gorvel, J.; Moreno, E. (1998). Bactericidal activity of Lys49 and Asp49 myotoxic phospholipases A2 from *Bothrops asper* snake venom. Synthetic Lys49 myotoxin II-(115-129)-peptide identifies its bactericidal region. *European Journal of Biochemistry*, 253, 452-461.
- Pineda, D.; Ghotme, K.; Aldeco, M.; Montoya, P. (2002). Accidentes ofídicos en Yopal y Leticia, Colombia, 1996-1997. *Biomedica*, 22, 14-21.
- Podschun, R.; Ullmann, U. (1998). *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clinical Microbiology Reviews*, 11, 589-603.
- Ramayoni, C. (2007). Estudio de la actividad antimicrobiana de extractos naturales y ácidos orgánicos. Posible alternativa a los antibióticos promotores de crecimiento. Tesis Doctoral. *Universidad Autónoma de Barcelona*.
- Ramírez, I.; Carabot, A.; Meléndez, P.; Carmona, J. (2003) Cissampeloflavone, a chalcone-flavone dimer from *Cissampelos pareira* L. *Phytochemistry*, 64, 1421-1428.

- Roberto, P.; Kashima, S.; Marcussi, S.; Pereira, J.; Astol-Filho, S.; Nomizo, A.; Giglio, J.; Fontes, M.; Soares, A.; França, S. (2004). Cloning and Identification of a complete cDNA coding for a bactericidal and antitumoral acidic phospholipase A2 from *Bothrops jararacussu* venom. *Protein Journal*, 23, 273-285.
- Rodríguez, R.; Morales, M.; Verde, M.; Oranday, A.; Rivas, C.; Núñez, M.; González, G.; Treviño, J. (2010) Actividad antibacteriana y antifúngica de las especies *Ariocarpus kotschoubeyanus* (Lemaire) y *Ariocarpus retusus* (Scheidweiler) (Cactaceae). *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 41, 55-59.
- Rodríguez, V.; Marcussi, S.; Cambraiab, R.; Araújo, A.; Malta-Netob, N.; Hamaguchia, A.; Ferroc, E.; Homs-Brandeburgoa, M.; Gigliod, J.; Soares, A. (2004). Bactericidal and neurotoxic activities of two myotoxic phospholipases A2 from *Bothrops neuwiedi pauloensis* snake venom. *Toxicon*, 44, 305-314.
- Rojas, G.; Gutiérrez, J.; Aymerich, R. (2001). El envenenamiento ofídico en Centroamérica: Fisiopatología y tratamiento. *Instituto Clodomiro Picado*, San José. Costa Rica.
- Ryan, K.; Ray C. (2004). *Sherris Medical Microbiology. 4th Ed. McGraw Hill*. New York, United States.
- Sánchez-Medina, A.; García-Sosa, K.; May-Pat, F.; Peña-Rodríguez, M. (2001). Evaluation of biological activity of crude extracts from plants used in Yucatecan traditional medicine Part I. antioxidant, antimicrobial and  $\beta$ -glucosidase inhibition activities. *Phytomedicine*, 8, 144-151.
- Santamaría, C.; Larios, S.; Quiro's, S.; Pizarro-Cerda, J.; Gorvel, J. (2004). Bactericidal and antiendotoxic properties of short cationic peptides derived from a snake venom Lys49 Phospholipase A2. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49, 1340-1345.
- Saravia-Otten, P. (2004). Studies on fibrinectin binding proteins, proteases, and virulence in *Staphylococcus aureus*. Tesis de Doctorado. *Instituto Karolinska*. Estocolmo, Suecia.
- Singh, V.; Banyal, H. (2011). Antimalarial effect of *Tinospora cordifolia* (Willd.) Hook.f. & Thoms and *Cissampelos pareira* L. on *Plasmodium berghei*, 101, 1356-1358.
- Soares, A.; Guerra-Sa, R.; Borja-Oliveira, C.; Rodrigues, V.; Rodrigues-Simioni, L.; Rodrigues, V.; Fontes, M.; Lomonte, B. (2000). Structural and functional characterization of BnSP-7, a Lys49 myotoxic phospholipase A2 homologue from *Bothrops neuwiedi pauloensis* venom. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 378, 201-209.
- Soares, A.; Mancin, A.; Cecchini, A.; Arantes, E.; França, S.; Gutiérrez, J.; Giglio, J. (2001). Effects of chemical modifications of crotoxin B, the phospholipase A2 subunit of crotoxin from *Crotalus durissus terrificus* snake venom, on its enzymatic and pharmacological activities. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 33, 877-888.
- Soares, A.; Ticli, F.; Marcussia, S.; Lourenço, M.; Januário, A.; Sampaio, S.; Giglio, J.; Lomonte, B.; Pereira, P.S. (2005). Medicinal plants with inhibitory properties against snake venoms. *Current Medicinal Chemistry*, 12, 2625-2641.
- Spencer, C.; Koniuszy, F.; Rogers, E.; Shavel J. (1947). Survey of plants for antimalarial activity. *Lloydia*, 10, 145-174.



- Stabeli, R.; Marcussi, S.; Guilherme, B.; Rosemeire, C.; Pietro, H. (2004). Platelet aggregation and antibacterial effects of an L-amino acid oxidase purified from *Bothrops alternatus* snake venom. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 12, 2881-2886.
- Tagwireyi, D.; Ball, D.; Nhachi, C. (2001) Routine prophylactic antibiotic use in the management of snakebite. *BMC Clinical Pharmacology*, 1, 4-10.
- Theakston, R.; Phillips, R.; Looareesuwan, S.; Echeverria P.; Makin, T.; Warrell, D. (1990). Bacteriological studies of the venom and mouth cavities of wild Malayan pit vipers. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 84, 875-879.
- Valsaraj, R.; Pushpangadan, P.; Smitt, U.; Adersen, A.; Nyman, U. (1997). Antimicrobial screening of selected medicinal plants from India. *Journal of Ethnopharmacology*, 58, 75-83.
- Wade, D. (1992). Antibacterial peptides designed as analogs or hybrids of cecropins and mellitin. *International Journal of Peptide and Protein Research*, 40, 429-436.
- Wen, L.; Haddad, M.; Fernández, I.; Espinoza, G.; Ruiz, C.; Neyra, E.; Bustamante, B.; Rojas, R. (2011) Actividad antifúngica de cuatro plantas usadas en la medicina tradicional peruana: aislamiento de 3'-formil-2',4',6'-trihidroxi-dihidrochalcona, principio activo de *Psidium acutangulum*. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 77, 199-204.
- Zacchino, S; Gupta, M. (2007). Manual de técnicas *in vitro* para la detección de compuestos antifúngicos. *Ed. Corpus*, Buenos Aires.
- Zavaleta Martínez-Vargas, A. (2004). Mordedura de serpiente (Ofidismo): un problema de salud en el Perú. *Revista Médica Herediana*, 15, 61-63.
- Zúñiga-Carrasco, I.; Lozano, J. (2013). Aspectos clínicos y epidemiológicos de la mordedura de serpientes en México. *Evidencia Médica e Investigación en Salud*, 6, 125-136.

# CAPÍTULO 5:

## Química

*Después de todo ¿qué es un científico entonces? Es un Hombre curioso que mira a través del ojo de una cerradura, la cerradura de la naturaleza, tratando de saber qué es lo que sucede.-*

*Jacques Yves Cousteau*





## 1. Introducción

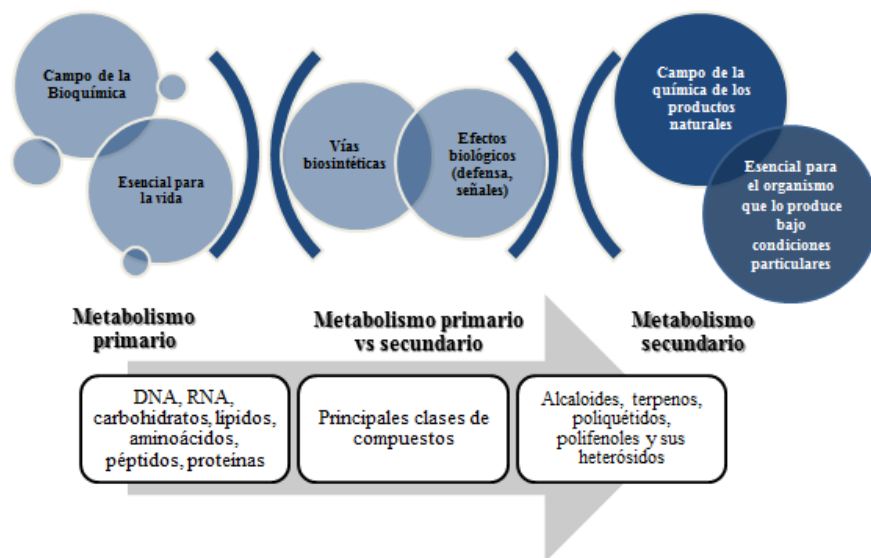
En los últimos años, se ha observado a nivel mundial un renovado interés por la obtención de compuestos biológicamente activos de origen natural debido a su baja o nula toxicidad; su bio-degradabilidad; su disponibilidad a partir de fuentes renovables y su bajo costo (Yuan *et al.*, 2016). Se define como *metabolismo* a la totalidad de los cambios químicos que ocurren en las células vivas y que involucran construcción y degradación de compuestos químicos.

Los *metabolitos* de las plantas son compuestos químicos sintetizados por las mismas que le permiten realizar sus diferentes funciones. Según la importancia que tengan en el metabolismo celular pueden ser *primarios* o *secundarios* (Guy *et al.*, 2008).

Los *metabolitos primarios* están universalmente distribuidos, son esenciales para el funcionamiento de las plantas e intervienen en forma directa en su supervivencia, crecimiento y reproducción. Son lípidos; ácidos carboxílicos del ciclo del ácido cítrico; aminoácidos que forman proteínas; hidratos de carbono simples y polímeros como celulosa y almidón. Los materiales de partida son siempre CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O y NH<sub>3</sub>.

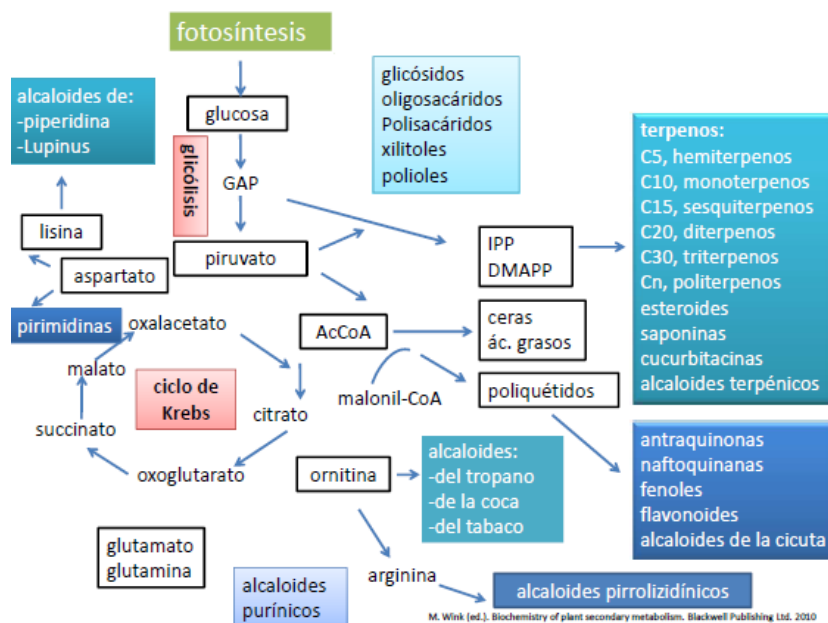
Los *metabolitos secundarios* son, en cambio, de estructura relativamente compleja y distribución más restringida, característica de cada planta. No son indispensables para el funcionamiento celular, pero cumplen otras funciones específicas: actúan como mecanismo de defensa, agentes polinizadores, sustancias de reserva, cicatrizantes para sus propias heridas y son éstos, generalmente, los responsables de la acción terapéutica de las mismas. Su presencia está determinada por factores como suelo, condiciones climáticas, estación del año, momento del día, presencia de microorganismos, entre otros. Algunos de los *metabolitos secundarios* con reconocida acción terapéutica son: *alcaloides*, *taninos*, *esteroides*, *terpenos*, *saponinas*, *quinonas* y *compuestos fenólicos* (Lock, 1988; Valencia-Ortíz, 1995; Keurentjes, 2009)

Esto determina que los procesos y productos del *metabolismo primario* sean similares en la mayoría de los organismos, mientras que los correspondientes al *metabolismo secundario* sean más específicos (**Figura 5.1.1**). Los pasos biosintéticos, sustratos y productos finales son característicos de las familias, géneros y especies. Las especies que son cercanas taxonómicamente presentan mayores semejanzas (y metabolitos), mientras que las distantes presentan mayores diferencias.



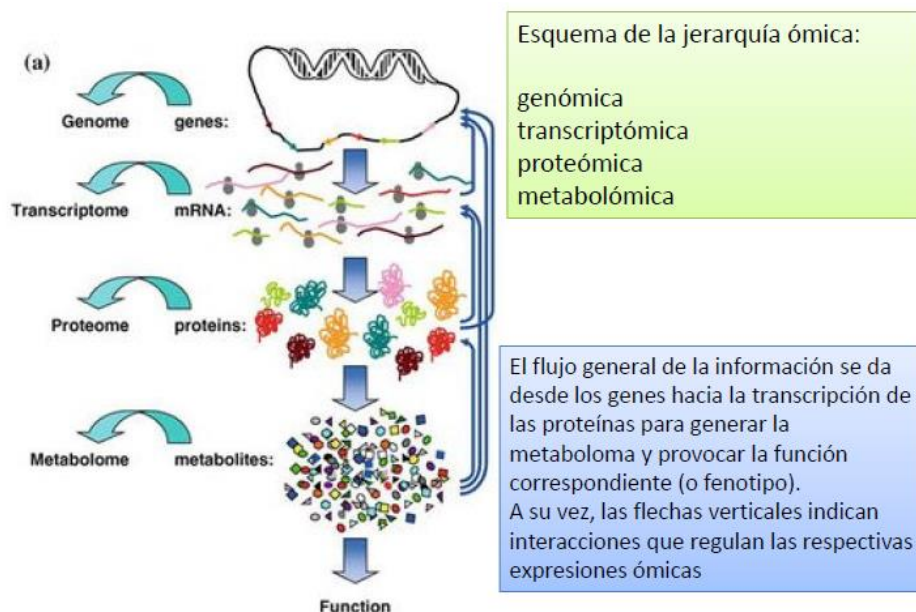
**Figura 5.1.1:** Metabolismo primario vs secundario

Como se observa en la **Figura 5.1.2**, la biosíntesis de los productos naturales ocurre por rutas y pasos químicamente razonables a partir de los *metabolitos primarios*. Conocer estas secuencias biosintéticas permite comprender las relaciones entre los diferentes organismos (simbiosis, interacciones planta-insecto, entre otras): un mayor entendimiento de la biología vegetal, la ecología y la biodiversidad.



**Cuadros claros:** metabolitos primarios; **Cuadros oscuros:** metabolitos secundarios. *Fuente:* Wink, (2010). **Figura 5.1.2:** Vías metabólicas

En definitiva, la importancia de conocer las rutas biosintéticas permite relacionar que: *Genómica + Proteómica + Biosíntesis = Metabolómica* (**Figura 5.1.3**).



**Figura 5.1.3:** Relación entre las “ómicas”. Fuente: CISN - The OMICS Revolution and Beyond – Metabolomics. (ciscancer.org). Consultado marzo 2019

Globalmente las plantas producen más de 100.000 *metabolitos secundarios* que pueden dividirse en dos grandes grupos (Dixon, 2001):

- fitoanticipinas*: presentes en forma constitutiva en las plantas, y
- fitoalexinas*: se producen como respuesta a la invasión microbiana.

Aun así, la diferencia entre unas y otras no se encuentra bien definida ya que existen compuestos que son *fitoanticipinas* en unas plantas y *fitoalexinas* en otras. En el caso de que un metabolito constitutivo se produzca en grandes cantidades luego del ataque microbiano, su condición de *fitoalexina* dependerá de si sus concentraciones constitutivas resultan suficientes para combatir a dicho agente infeccioso.

Ya se ha desarrollado en capítulos anteriores la importancia de las plantas medicinales, particularmente las alexitéricas y su sistemática de estudio. En este sentido, siendo el objetivo de este trabajo lograr una aproximación al desarrollo de un posible *fitofármaco*, es necesario conocer la química de los compuestos alexitéricos y su mecanismo de acción.

Con este fin, a continuación, se describen los *metabolitos secundarios* presentes en especies vegetales reconocidas como alexitéricas, y que son capaces de interactuar con los target macromoleculares de manera tal de inhibir los venenos. Estos compuestos se pueden agrupar en familias químicas que se exponen en la **Tabla 5.1.1** (Zografos, 2016).

**Tabla 5.1.1:** Metabolitos secundarios. Familias químicas. *Fuente:* Zografos, 2016

Biogénesis	Intermediario	Estructuras representativas
Acetogeninas (nC <sub>2</sub> )	acetil CoA	lípidos, macrólidos, fenoles
Terpenoides (nC <sub>5</sub> )	ácido mevalónico, fosfato de metil eritritol	monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos, esteroides, carotenoides
Shikimatos	ácido shikímico, ácido prefénico	fenilpropanoides, fenoles, flavonoides
Alcaloides alifáticos	lisina, ornitina	alcaloides alifáticos
Alcaloides aromáticos	fenilalanina, tirosina, triptofano	alcaloides aromáticos

## 1.1 Química de las plantas alexitéricas. Principales familias de compuestos activos

### 1.1.1 Compuestos fenólicos

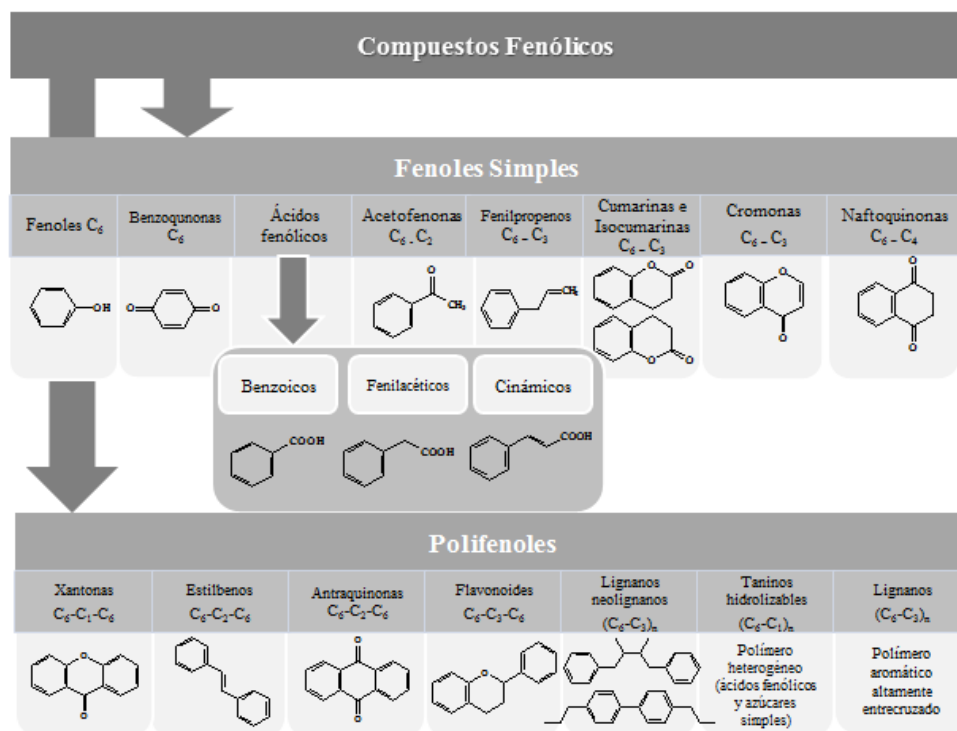
Con el término de compuestos fenólicos se define un grupo grande y diverso de compuestos químicos que se pueden clasificar de diferentes formas. Por ejemplo, Harborne & Simmonds (1964) los clasificaron en grupos según el número de carbonos presentes en la molécula como se muestra a continuación (**Tabla 5.1.2**).

**Tabla 5.1.2:** Clasificación de compuestos fenólicos

Estructura	Grupo de fenoles	Estructura	Grupo de fenoles
C6	Fenoles simples	C15	Antocianidinas
C6-C1	Ácidos fenólicos y compuestos relacionados		Antocianinas
C6-C2	Acetofenonas y ácidos fenilacéticos	C30	Biflavonilos
C6-C3	Ácidos cinámicos, aldehídos cinámicos, cinamil alcoholes	C6-C1-C6, C6-C2-C6	Benzofenons, xantonas, estilbenos
	Cumarinas, isocumarinas y cromonas	C6, C10, C14	Quinonas
C15	Chalconas, auronas, dihidrochalconas	C18	Betacianinas
	Flavanos	Lignanós, neolignanós	Dímeros u oligómeros
	Flavonas	Lignina	Polímeros
	Flavanonas	Taninos	Oligómeros o polímeros
	Flavanonols	Flobafenos	Polímeros

Los compuestos *fenólicos* comprenden aproximadamente 8.000 compuestos, con uno o más grupos hidróxidos, incluyendo derivados funcionales (entre ellos ésteres, metil ésteres y glicósidos). Su origen es el mundo vegetal y están presentes en el reino animal por ingestión de éstos (Tsimidou, 1998). La naturaleza de los *polifenoles* varía desde

moléculas simples, como los **ácidos fenólicos**, hasta compuestos altamente polimerizados, como los **taninos**. La forma más común de encontrarlo en la naturaleza es en forma de glicósidos, siendo solubles en agua y solventes orgánicos. También pueden encontrarse unidos a ácidos carboxílicos, aminas, lípidos y a otros compuestos fenólicos (Bravo, 1998) (*Figura 5.1.13*)

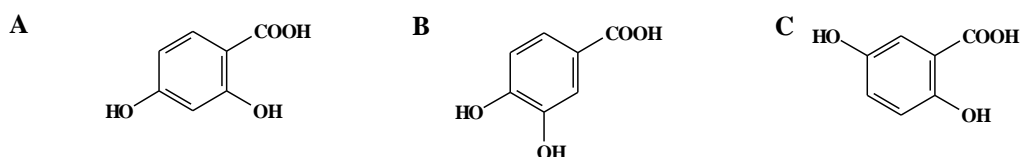


*Figura 5.1.13:* Compuestos Fenólicos

Los **fenoles simples** pueden unirse a proteínas por uniones puente hidrógeno o uniones covalentes mucho más fuertes, ocupando sitios de unión críticos. En plantas, están prácticamente siempre en forma conjugada. Por otra parte, los *fenoles* son sustratos de las fenolasas, transformándose en **quinonas** que pueden unirse a proteínas con uniones covalentes. Estructuras como el **catecol** son particularmente propensas a formar **quinonas** que condensan con proteínas resultando una co-polimerización. Son importantes constituyentes de las plantas alexitéras y se pueden dividir para el estudio en:

✓ **Ácidos hidroxibenzoicos y sus éteres metílicos:** muy activos, el **ácido 2,4-dihidroxibenzoico** (*Figura 5.1.4*) con 83% de protección; el **ácido 3,4-dihidroxibenzoico** o **ácido protocatecuico** (*Figura 5.1.4*) presentes en *Cryptolepis sinensis* (Lour.) Mer., *Fagopyrum cymosum* (Trevir.) Meisn., *Allium cepa* L. y *Polygonum bistorta* L.; con un 80% (López-Sáez & Pérez-Soto, 2009; Mors *et al.*, 2000). El derivado **4-O-metil éster**, es un factor neutralizante de *Hemidesmus indicus* (L.) R.Br. ex Schult., especie utilizada como contrayerba. Se ha aislado también un factor del extracto metanólico de la raíz

denominado HI-RVIF (HI de *Hemidesmus indicus*, RVIF de factor inhibidor de veneno de *V. russelli*) que *in vitro* (**50 mg**) inhibe 10 DL50, 5 dosis hemorrágicas mínimas, 20 dosis coagulantes, y 10 dosis anticoagulantes; *in vivo* inhibe significativamente 3 DL50, 2 dosis hemorrágicas y 2 dosis anticoagulantes en ratones (Alam, 1998). El **éster metílico** correspondiente de algunas especies de *Primula* L: (glicósido primverósido) es un conocido antiveneno en la India con considerable actividad antiinflamatoria, el **2-hidroxi-4-metoxi benzaldehído** es un **potente inhibidor de la tirosinasa (polifenol oxidasa) con gran poder quelante** (Mors *et al.*, 2000).



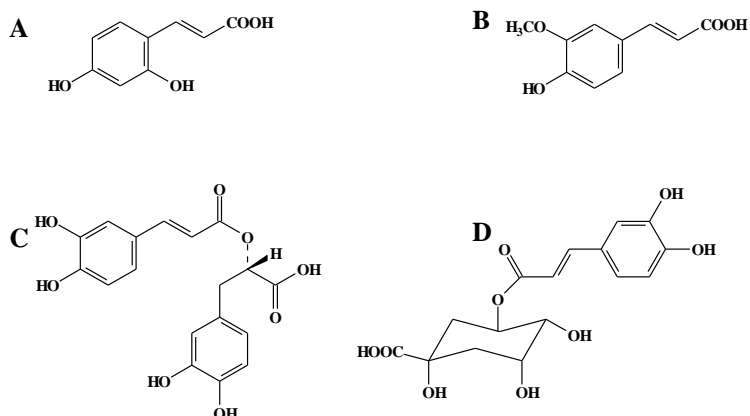
**Figura 5.1.4:** A: ácido 2,4 dihidroxibenzoico; B: ácido protocatecuico; C: ácido gentísico

Otros como **vainillina** (*Marsdenia condurango* Rchb. F.) y su **dimetil éter** (*Eryngium* L: *sp.*) son utilizados como antiveneno (Dhananjaya *et al.*, 2006). Lo mismo ocurre con el **ácido gentísico** (**Figura 5.1.4**) (*Gentiana lutea* L.), el aldehído correspondiente al **ácido protocatecuico** (*Perilla ternata* L.), el monometil éter del **ácido 2,6-dihidroxibenzoico** (*Gloriosa superba* L.) y el **ácido anísico** (*Ruta montana* (L.) L.). Sin embargo, el **ácido p-hidroxibenzoico** es inactivo (Mors *et al.*, 2000).

✓ **Ácidos cinámicos y derivados:** los **ácidos cafeico** y **clorogénico** (Torres *et al.*, 2014) (**Figura 5.1.5**) **se unen a proteínas**, provocando un cambio conformacional. El ácido **cafeico** es muy activo dada su propiedad de ser **quelante** (derivado de catecol) y su fácil oxidación a **quinona** por fenolasas. Entre sus actividades es un **fuerte inhibidor de la lipoxigenasa** y antihepatotóxico. Se encuentra en especies como *Polygonum* L., *Prestonia coalita* R. Br., *Strychnos nux-vomica* L., *Taraxacum officinale* (L.) Weber ex F. H. Wigg. Prim. Fl. Holsat., entre otras; también se encuentra junto al **ácido ferúlico** (**Figura 5.1.5**) en especies de pinos como *Pinus sylvestris* L. utilizados en forma externa como antiveneno. El **ácido isoferúlico** también está presente en plantas alexitéras (*Cimicifuga racemosa* (Nutt.) L.), **verbascósido** (*Buddleja* Franch. y *Forsythia* Vahl), **ácido rosmarínico** (**Figura 5.1.5**) (especies de *Perilla* L.); **ésteres del ácido cafeico** se identificaron en especies de *Merremia* Dennst. ex Endl. y son utilizados como antidotos. El **cafeato de miricerona** (ácido cafeico esterificado con triterpeno) en *Myrica cerífera* L. muestra un antagonismo selectivo por el receptor de endotelina, causando la ruptura de la unión endotelina-membrana; algunos **oligómeros del ácido cafeico** (*Berkley spekeana* y *Echinops amplexicaulis* L.) son antidotos por vía oral y parenteral. Se ha

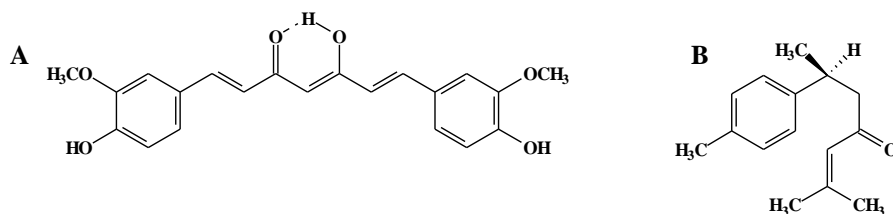
demostrado que el **éster etílico del ácido cafeico** es un ligando competitivo de los receptores de benzodiazepinas.

El **ácido clorogénico** es **inhibidor de la lipoxigenasa** lo que confiere su actividad antiinflamatoria y antihepatotóxica. Se encuentra en muchas plantas alexíteras: *Achillea millefolium* L., *Arctium lappa* L., *Citrullus colocynthis* L. Schrad., *Coffea arabica* L. Sp. Pl., *Fagopyrum cymosum* (Trevir.) Meisn., *Heliantus annuus* L., *Marsdenia condurango* Rchb. F., *Nicotiana tabacum* L. y especies de *Strychnos* L., *Polygonum bistorta* L.



**Figura 5.1.5:** A: ácido cafeico; B: ácido ferúlico; C: ácido rosmarínico; D: ácido clorogénico

✓ **Curcuminoides:** di-arilheptanoides como **curcumina** (**Figura 5.1.6**), **demetoxi curcumina** y **bis demetoxicurcumina**, colorantes amarillos de *Curcuma longa* L. (Chattopadhyay *et al.*, 2004). La **curcumina** es una dicetona que, en solución a través de un tautomerismo ceto-enólico, produce un **fuerte centro quelante**. Inhibe totalmente la neurotoxina de *Naja naja siamensis* (Daduang *et al.*, 2005). Además, los **curcuminoides** poseen actividad antiinflamatoria, hepatoprotectora, antimutagénica, anticarcinogénica, inhibidora de la lipoxigenasa y prostaglandin-endoperóxido sintetasa. Otras cetonas insaturadas como la **ar-turmerona** (**Figura 5.1.6**) de los rizomas de *Curcuma longa* L. inhiben la actividad de las víboras de cascabel (Ferreira *et al.*, 1992).



**Figura 5.1.6:** A: curcumina; B: ar-turmerona

✓ **Cumarinas:** son inhibidoras de enzimas. La **cumarina** (**Figura 5.1.7**) con un 40% de protección se puede encontrar en plantas alexíteras como *Dipteryx odorata* (Aubl.) Willd., *D. punctata* Schreb., *Liatris squarrosa* (L.) Michx., *Mikania* Willd. sp. y *Torresea cearensis* (Allemão) A. C. Sm. (López-Sáez & Pérez-Soto, 2009; Mors *et al.*,



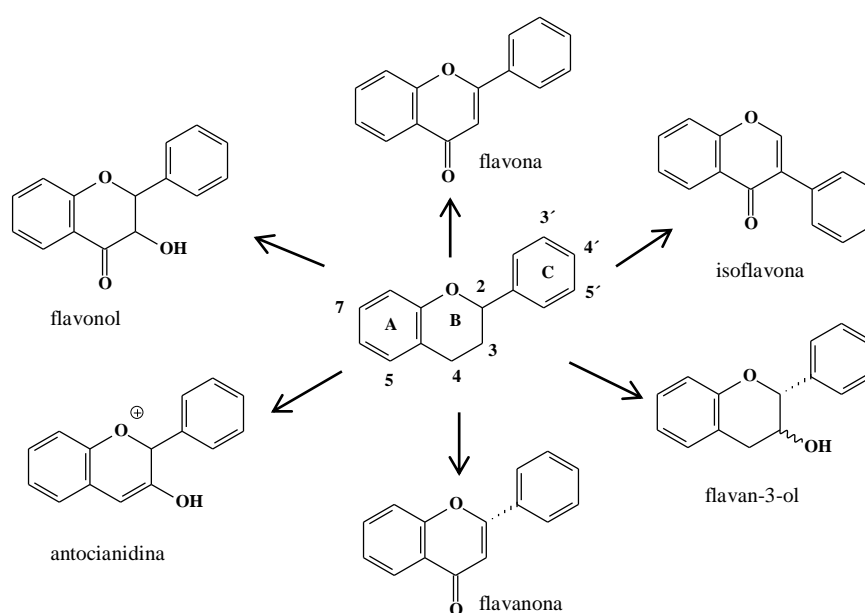
2000); los derivados oxigenados como **umbelliferona** (*Figura 5.1.7*) se encuentran en *Aegle marmelos* (L.) Corrêa, *Daphne mezereum* L. e *Ipomoea batatas* (L.) Lam., como así también **escopoletina**, la cual es, además, abundante en *Brunfelsia* Plum. ex L. y *Heterothalamus psiadioides* Less. acompañada por su éter dimetílico, **escoparona**. **Herniarina** y **ayapina** se encuentran en *Eupatorium triplinerve* (M.Vahl) R. M. King & H. Rob. con actividad hemostática; **dafnina** (**7-O-glicósido de la dafnetina**) en *Daphne odora* Thunb.; **suberenona** en *Ruta graveolens* L.; **marmina** en *Aegle marmelos* (L.) Corrêa, *Dorstenia brasiliensis* Lam. y *Feronia limonia* con **bergapteno** de 20% de protección (**furanocumarina**), **dorstenina** y **fermolina** (Kuster, 1994; Agrawal *et al.*, 1989; Mors *et al.*, 2000).



*Figura 5.1.7:* A: coumarina B: umbelliferona

✓ **Flavonoides** (Liang, 1987; Grotebold, 2006): Son compuestos de naturaleza fenólica que se caracterizan por poseer dos anillos aromáticos, unidos por un puente de tres átomos de carbono C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> (Cartaya & Reynaldo, 2001). Por su origen biosintético, presentan patrones característicos de hidroxilos y se encuentran en la naturaleza combinados con azúcares formando glicósidos, aunque también se presentan con relativa frecuencia como agliconas libres (Anderson & Markham, 2006).

### Clasificación de los flavonoides (*Figura 5.1.8*)



*Figura 5.1.8:* Clasificación de flavonoides

-*Flavonas y flavonoles*: poseen un grupo hidroxilo en la posición C3 que puede estar metilado o glicosilado, los más comunes son los derivados de la *quercetina*;

-*Flavanonas y flavanonoles*: existen en muy pequeñas cantidades y son incoloros. Sus glicósidos, como *hesperidina* y *naringina*, están presentes en la corteza de cítricos y son bien conocidos;

-*Antocianos*: se encuentran como glicósidos y, después de la clorofila, son el grupo más importante de pigmentos en las plantas. Son visibles al ojo humano y tienen el grupo OH en C3, pero además poseen un doble enlace entre los C3 y C4 del anillo C;

-*Isoflavonoides*: tienen el anillo B en la posición 3 a diferencia de los flavonoides que lo tienen en la posición 2;

-*Isoflavonas*: son coloreadas y están mucho menos distribuidas en las plantas; de hecho, están prácticamente restringidas a las leguminosas y se destacan por su papel como *fitoalexinas*;

-*Chalconas y dihidrochalconas*: son poco abundantes, ya que se convierten en *flavanonas* en medio ácido y la reacción es fácilmente observable *in vitro*. Las *chalconas* son mucho más coloreadas que las *flavanonas*, particularmente en medio básico donde son anaranjadas-rojizas;

-*Sulfato de flavonoides*: son bisulfatos, aunque pueden aparecer como sales;

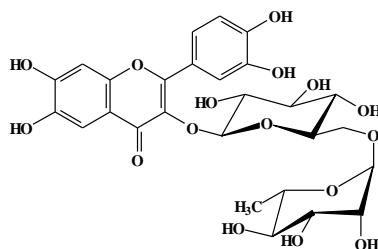
-*Biflavonoides*: son dímeros de flavonoides, raramente encontrados como glicósidos y con una distribución muy restringida. Aparecen predominantemente en las gimnospermas.

Los *flavonoides* ejercen su actividad biológica mediante la **formación de complejos** y por **uniones puente hidrógeno** entre grupos fenólicos y amidas de cadenas proteicas. Poseen actividad antiinflamatoria, antihepatotóxica, antiarrítmica, hipocolesterolemica, antialérgica y antitumoral. La actividad más importante desde el punto de vista alexitérico es la **inhibición enzimática** por alguno de los mecanismos antes mencionados.

#### **Flavonoides citados como alexitéricos**

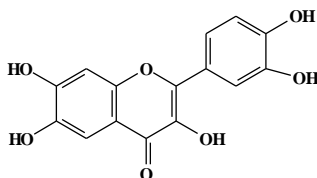
✓ **Rutina** (Liang, 1987) (*Figura 5.1.9*): **inhibe la fosfolipasa A2** y, administrada en forma conjunta con antihistamínicos, protege contra los efectos vasculares de *Bothrops atrox*. Está presente en *Achillea millefolium* L., *Euphorbia hirta* L., *Forsythia suspensa*

(Thunb.) Vahl, *Marsypianthes chamaedrys* Mart. ex Benth., *Nerium oleander* L. y *Ruta graveolens* L., entre otras.



**Figura 5.1.9:** Rutina

✓ **Quercetina** (Liang, 1987) (**Figura 5.1.10**): **inhibe la lipoxigenasa**. Está presente en *Albizia lebeck* (L.) Benth.; *Allium cepa* L. y como glicósido en *Foeniculum vulgare* Mill., *Helianthus annuus* L., *Nerium oleander* L., *Polygonum bistorta* L. y *Rheum palmatum* L.



**Figura 5.1.10:** Quercetina

✓ **Morina:** se une a metales como Zn y Al, por lo tanto, **actúa sobre las metaloproteinasas** que los contienen. Está presente en *Morus alba* L. y en *Artocarpus integrifolia* J. R. Forst. & G. Forst. (planta antiescorpiónica); **primetina**, presente en *Primula denticulata* Sm.; **hesperitina y naringenina**, presente en *Prunus pérsica* (L.) Stokes.; **pinostrobin y galangina**, se encuentra en *Heterothalamus psiadioides* Less.; **Apigenina** en *Boehmeria nivea* (L.) Gaudich.; **Kaempferol** en *Cassia tora* (L.) Roxb., *Impatiens capensis* Meerb., *Nerium oleander* L., *Paeonia albiflora* Pall. y *Prunus pérsica* (L.) Stokes.; **Luteolina** en *Ajuga decumbens* Thunb. y *Merremia tridentata* (L.) Hallier F.; **Diosmetina**, en *Merrenia tridentata* (L.) Hallier F.; **Isoramnetina**, en *Argemone mexicana* L.; **Miricetina**, en *Myrica rubra* Siebold & Zucc.. Las especies *Phyllanthus niruri* L. y *P. urinaria* L. contienen **quercetina, rutina, quercitrina e isoquercitrina** (Mors *et al.*, 2000).

Los **flavonoides** también pueden encontrarse en flores que se utilizan como antiveneno: **isoramnetina** en *Calendula officinalis* Hort.; **quercitina** en *Hibiscus mutabilis* L.; **miricetina** en *Impatiens balsamina* L. y **luteolina** en *Lonicera japónica* Thunb. (Mors *et al.*, 2000).

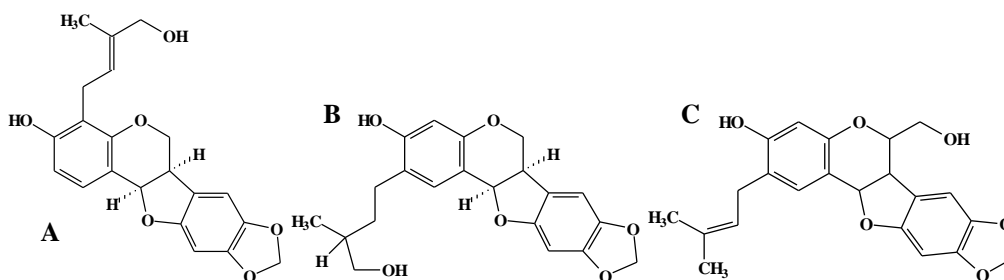
Todos los *flavonoides* poseen similitud estructural: proximidad y coplanaridad del grupo hidroxilo fenólico sobre el C5 y el grupo carbonilo pirónico. Las mismas características la poseen las **cromonas** por ejemplo, en *Schummanniophyton magnificum*.

✓ Los *flavonoides*, al ser ingeridos, son metabolizados por la microflora intestinal a metabolitos activos (Fraga, 2010). La primera etapa es **la hidrólisis de los glicósidos** para posteriormente producirse la **ruptura del anillo pirónico** produciéndose pequeñas moléculas, *ácidos fenólicos*, que son activos contra los venenos. Por ejemplo, en suero y orina humanos se puede detectar **ácido protocatéquico** luego de la administración oral de **quercitina**. **Isoflavonoides**: poseen propiedades biodinámicas, pero no son muy frecuentes en plantas alexitéras. Algunos ejemplos son: **tectoridina**, **iridina** y sus **7-O-glicósidos** en rizomas y raíces de *Belamcanda chinensis* (L.) Goldblatt & Mabb., con actividad antihepatotóxicas y antiinflamatorias, muy utilizada como antiveneno en China; **derricidina** en *Derris sericea* (Poir.) Ducke; entre otras (Mors *et al.*, 2000);

✓ **Pterocarpanos prenilados: cabenegrinas a-I; a-II y edunol** (Nakagawa *et al.*, 1982) (*Figura 5.1.11*) mostraron efecto protector en ratones inyectados con veneno de *B. atrox*. Son compuestos con distribución quimiotaxonómica muy precisa ya que solo son sintetizados por ciertas tribus de *Fabaceae* (*Desmodiae*, *Dalbergiae*, *Sophoreae*, *Phaseoleae* y *Brongniartiae*) circunscriptos incluso a la subfamilia *Papilionoideae*.

Las **cabenegrinas** (Nakagawa *et al.*, 1982) se han aislado mediante fraccionamiento del extracto hidroalcohólico de la raíz de una planta denominada *cabeça de negro*. El *Específico Pessoa*, producido y elaborado en el nordeste de Brasil por el Laboratorio Frota (Sobral, <https://www.xapuri.info/dica-ecologica/especifico-pessoa-picada-de-cobras/>), demostró el 100% de actividad en los ensayos. En la Cuenca Amazónica, los trabajadores de las plantaciones lo utilizaron como antídoto oral contra el veneno de serpientes y arañas.

Curiosamente, la identidad botánica de las plantas con las que se preparaba el *Específico Pessoa* no se conoce; hay aproximadamente 10 plantas denominadas *cabeça de negro* en Sud América, y dos son reputadas como antiveneno en la región Ibiapaba del noreste brasileiro: *Bredemeyera floribunda* Willd (Polygalaceae) llamada *pacari* y *Harpalyce brasiliiana* Sessé & Moc. (Fabaceae-Papilionoideae), la cual posee **pterocarpanos** muy similares lo que marca un posible parentesco (Reyes-Chilpa *et al.*, 1994; Mors *et al.*, 2000) .



**Figura 5.1.11:** Flavonoides. **A:** cabenequina a-I; **B:** cabenequina a-II; **C:** edunol

La DEM (dosis efectiva mínima) es de **2,8 mg/Kg** para **a-I** y **2 mg/kg** para **a-II** en ratones inyectados con 2,5 DL50 del veneno de *B. atrox*. **1 mg/kg** por vía intravenosa de **cabenequina a-1** 15 minutos antes de inyectar el veneno contrarresta la hipotensión y el paro cardíaco respiratorio después de 30-60 minutos. También en corazón aislado de perro las **cabenequinas** revierten los efectos cardiovasculares del veneno (Mors *et al.*, 2000).

Un compuesto estructuralmente similar, el **edunol**, fue aislado de raíces de la *hierba de la víbora*, *Brongniartia podalyrioides* Kunth. y *B. intermedia* Moric. (Fabaceae) siendo activo también contra *B. atrox*. **3,1 mg/kg** vía intraperitoneal en ratones anula totalmente la mortalidad causada por la DL50 y es efectivo disminuyendo la mortalidad de 100 a 70% para 2 DL50. Sin embargo, una dosis de **10 mg/Kg** mostró un efecto protector bajo para la DL50 y nulo para 2 DL50, esto puede ser debido a que algunos **pterocarpanos** como una mezcla de **gliceolinas I, II y III** pueden bloquear el transporte de electrones y presentar toxicidad a altas concentraciones. Se conocen otros **pterocarpanos prenilados** en plantas del género *Erythrina* como *E. berteroana* L. (Reyes-Chilpa *et al.*, 1994; Mors *et al.*, 2000).

Da Silva *et al.* (1999) reportaron el aislamiento desde el extracto etanólico de hojas de *Harpalyce brasiliiana* Sessé & Moc., raíz de *cobra*, utilizada como alexitérica, una *isoflavona* nueva, **harpalicina**, y el *flavonol* **quercitina** y de las raíces **3-hidroxi-4-isopentenil- 8,9-metilene-dioxipterocarpano** y el *triterpeno pentacíclico ácido betulínico*.

✓ **Cumestanos:** la **wedelolactona** (Mors *et al.*, 1989) (**Figura 5.1.12**), fue aislada de partes aéreas de *Eclipta prostrata* (L.) L. (Asteraceae), junto a otros componentes activos como *flavonoides* y *fitoesteroles*. **Inhibe la lipoxigenasa y la liberación de creatin-kinasa (CK)** involucrada en los procesos inflamatorios. Es activa contra veneno de *Crotalus durissus terrificus*, neutralizando su letalidad en ratones. También posee actividades antimiotóxica, antihemorrágica, antiproteolítica,

antifosfolipásica, antihepatotóxica. Es usada en Brasil y China en el tratamiento de picaduras de serpientes. En dosis de **0,54 mg/animal** anula la mortalidad de 3 DL50 del veneno. Con respecto a *B. jararaca*, la **wedelolactona** inhibe la actividad miotóxica *in vitro* y tiene un efecto antihemorrágico (**5mg/kg**), además, el extracto etanólico posee un efecto protector contra la miotoxicidad del veneno. **Wedelolactona**, **estigmasterol** y **sitosterol** actúan sinérgicamente neutralizando *in vivo* la miotoxicidad y el efecto hemorrágico de venenos de Crotálidos (*B. jararaca*, *B. yararacussu* y *Lachesis muta*) con acción antiproteolítica y antifosfolipasa A2 y, por lo tanto, antiinflamatoria.

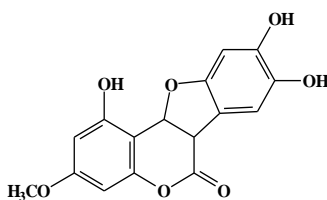


Figura 5.1.12: Wedelolactona

La **dimetilwedelolactona** fue aislada por Pithayanukul *et al.* (2004) como componente mayoritario del extracto butanólico de *Eclipta prostrata* (L.) L., el cual inhibe en un 100% la actividad letal de 2 DL50 del veneno de *Calloselasma rhodostoma*, también inhibe parcialmente la actividad hemorrágica, posee muy poca actividad sobre la fosfolipasa A2 y no inhibe la actividad proteolítica. Su posible mecanismo de inhibición sería su naturaleza polifenólica.

Konarev *et al.* (2002) detectaron cumestanos como inhibidores de la tripsina, subtilisina y quimotripsina en semillas de *E. prostrata* (L.) L.

Un estudio realizado por Diogo *et al.* (2009) en extractos de partes aéreas (**wedelolactona**) y raíces (**demetilwedelolactona**) de *E. alba* (L.) silvestre, y modificada genéticamente con *Agrobacterium rhizogenes* (Riker.) Conn. para aumentar la producción de los **cumestanos**, demostró que el clon 19 posee mayor actividad que la planta silvestre con respecto a la inhibición de la actividad miotóxica inducida por la fosfolipasa A2 extraída del veneno de *Crotalus durissus terrificus* y *B. jararacussu*, lo cual demuestra la importancia del conocimiento de los compuestos activo presentes en los extractos.

**Cumestanos** sintéticos preparados por Melo *et al.* (2010) han demostrado actividad *in vitro*, inhibiendo completamente la liberación de Creatin Kinasas (CK) (actividad miotóxica) e *in vivo* con efecto antimiotóxico (**ID50 0,17 mg/kg**), antiedematogénico (**ID50 0,14 mg/kg**), inhibe la fosfolipasa A2 y el efecto cardiotóxico de *B. jararacussu*.

También inhibe la actividad hemorrágica en forma similar a la **wedelolactona**, y la actividad proteolítica de *B. jararaca*.

En resumen, para que estos compuestos muestren efecto protector contra venenos de crotálidos, deben poseer un esqueleto **isoflavonoide**, **funcionalidad dioxigenada** y **naturaleza ácida**. Las **cabenegrinas a-I y a-II** y el **edunol** poseen rotación óptica negativa, configuración (*S*) en los carbonos quirales 6<sup>a</sup> y 11<sup>a</sup>, diferenciándose por la hidroxilación del sustituyente isoprenilo y la posición de este con respecto al esqueleto principal. La magnitud del efecto protector podría deberse al grado de oxidación del grupo isoprenilo, dado que el **edunol** es el menos potente, aunque la **wedelolactona** que no posee este grupo, es activa (Reyes-Chilpa & Jiménez-Estrada, 1995).

✓ **Polifenoles: Taninos:** son compuestos fenólicos secundarios de elevado peso molecular (500 a más de 20.000 Da). Pueden ser **taninos condensados o pro-antocianidínicos**, polímeros de flavonoles que liberan una **antocianidina** por hidrólisis ácida; o **taninos hidrolizables** que son más pequeños (300 a 3.000 Da) y son hidrolizados liberando **ácido gálico (galotaninos)** o **ácido elágico (elagitaninos)**. Los **elagitaninos** están formados por moléculas lineales de glucosa enlazadas a las funciones carboxilo de los grupos hexahidroxidifénicos del **ácido elágico**, mientras que los **galotaninos** están constituidos por núcleos de glucosa en forma cíclica que forman enlaces con la función ácida del **ácido gálico**. En ambos casos se trata de estructuras de una complejidad relativa (Álvarez & Lock de Ugaz, 2007; Quideau *et al.*, 2011).

El **ácido tánico** (Okonogi *et al.*, 1970) podría deber su actividad a su **capacidad de formar complejos con las proteínas de los venenos**. Por ejemplo, taninos condensados del fruto inmaduro de *Diospyros kaki* Lf. Thunb. (Ebenaceae), neutralizan venenos neurotóxicos y hemorrágicos; el tanino del fruto del *Persimmon* es activo contra la serpiente marina *Eraburu* (Reyes-Chilpa & Jiménez-Estrada, 1995). La presencia de concentraciones elevadas de **taninos** en el extracto metanólico 95% de hojas de *Guiera senegalensis* es responsable de la actividad inhibitoria del efecto letal de los venenos de *Echis carinatus* y *Naja nigricollis* (Abubakar *et al.*, 2000).

Los géneros mejor conocidos utilizados como plantas antivenenos con **taninos** son: *Paeonia* L., *Agrimonia* L. y *Rubius*. También *Euphorbia hirta* L. con dos **elagitaninos** (**euforbina A y B**), especies de *Acacia* como *A. catechu* L., *A. hindsii* Benth., *A. leucophaea* Willd., *A. nubica* Benth., *A. polyacantha* Willd. y *A. sinuata* (Lour.) Merr.; hojas de *Rhus semialata* Mill., raíces de *Rheum palmatum* L. y *Musa paradisiaca* L., entre otras (Torres *et al.*, 2014).



### 1.1.2 Alcaloides

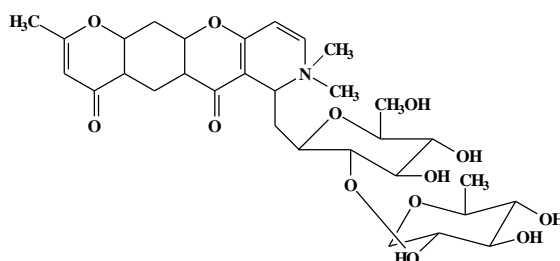
Son compuestos heterocíclicos que contienen nitrógeno básico, muchos de ellos son insolubles o poco solubles en agua que reaccionan con los ácidos para formar sales.

Las plantas producen alcaloides mediante procesos metabólicos y constituyen sustancias de reserva capaces de proveer nitrógeno (Salinas & Bermúdez, 1996). Se pueden clasificar en:

- Alcaloides derivados de la ornitina y la lisina;
- Alcaloides derivados de la tirosina y la fenilalanina;
- Alcaloides derivados del triptófano;
- Alcaloides derivados del ácido nicotínico;
- Alcaloides derivados de la histidina.

Li-Shian *et al.* (2004) han aislado de las raíces y tallos de *Aristolochia elegans* alcaloides **N-oxido benzoil benciltetrahidro isoquinolin éter** y **aristoloquinolinas A, B y C**. También se han aislado otros alcaloides **bisbenciltetrahydroisoquinolínicos** como (-) - (R, R) - **metilcuspidalina** y (-) - **temuconina; pericampilinona A; isoquinolina; coridalina; thalifolina; northalifolina** y **N-metil caridalina**. Aunque, la actividad alexítera de esta especie se considera debida a los **ácidos aristolóquicos**.

El **schumaniofósido** (Akunyili & Akubue, 1986) (**Figura 5.1.13**) del jugo de la corteza de *Schumanniphyton magnificum* (K. Schum.) H. G. A. Engler & K. A. E. Prantl (Rubiaceae) es utilizado por los trabajadores nigerianos al ser mordidos por serpientes o escorpiones. Este jugo resulta activo disminuyendo la mortalidad en un 16% en ratones pretratados (**2,06 mg/kg** de extracto de corteza) y envenenados con una DL de veneno de *Naja melanoleuca*. Es ineficaz cuando se administra 10 minutos antes o una hora después debido quizás a la termolabilidad del compuesto. Estudios posteriores no adjudican actividad a este alcaloide, pero no han podido aislar el compuesto activo.

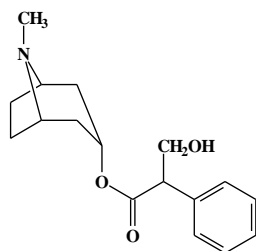


**Figura 5.1.13:** Schumaniofósido

La **atropina** (**Figura 5.1.14**) reduce la actividad del veneno de las mambas *Dendroaspis angusticeps* y *D. polylepis* **bloqueando el receptor colinérgico** (López-Sáez & Pérez-Soto, 2009). Se encuentra en especies de Solanáceas como *Cyphomandra*



*betacea* Cav. y *C. hartwegii* (Miers) Dunal cuyo tallo subterráneo es utilizado por los Guaymíes de Panamá (Torres *et al.*, 2014).

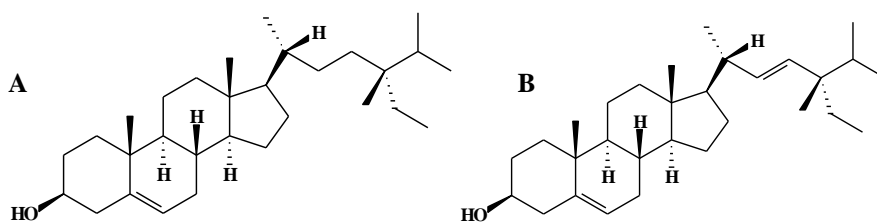


**Figura 5.1.14:** Atropina

### 1.1.3 Esteroides y triterpenoides

Los **esteroides** tienen la capacidad de **formar compuestos de adición molecular estable mediante fuerzas de Van der Waals e hidrofóbicas**. Por ejemplo, los **ácidos coleicos** formados por los **ácidos biliares** y el **colesterol**, pueden combinarse con la **lisolecitina** hemolítica en forma equimolecular, inhibiéndola. Asimismo, la hemólisis provocada por la cobra india *Naja repudians* en animales es inversamente proporcional al contenido de colesterol en sangre (Mors *et al.*, 2000).

Además de la mencionada **wedelolactona**, los esteroides **sitosterol** y **estigmasterol** (**Figura 5.1.15**) (aislados de partes aéreas de *E. prostrata* L.) en dosis de **2,3 mg/animal** son activos contra el veneno de *Crotalus durissus terrificus* en ratones. El **sitosterol**, con acción antiinflamatoria, da una protección del 70% y puede encontrarse como tal o como glicósido (**sitosterolina**). El **sitosterol** pueden asociarse con otro grupo hidrofóbico rodeándolo, formando un complejo con el grupo hidrofílico hacia afuera por sus propiedades fisicoquímicas. El glicósido del **estigmasterol** está demostrado se une al receptor de serotonina. También es activo el  *$\alpha$ -spinasterol* de *Polygala senega* L.



**Figura 5.1.15:** A:  $\beta$ -sitosterol; B: estigmasterol

Pueden encontrarse además en otras plantas alexitéricas como: *Achillea millefolium* L., *Aegle marmelos* (L.) Corrêa, *Aristolochia serpentaria* L., *Caesalpinia bonduc* (L.) Roxb., *Calendula officinalis* Hort., *Cissampelos glaberrima* A. St.-Hil., *Cocculus hirsutus* (L.) Diels, *Cynanchum paniculatum* (Bunge) Kitag, *Euphorbia hirta* L., *Gloriosa superba* L., *Marsypianthes chamaedrys* Mart. ex Benth., *Ocimum basilicum* L.,

*Ophiorrhiza mungos* L., *Oldenlandia diffusa* Roxb., *Pluchea indica* (L.) Less., *Pothomorphe umbellata* L., *Prestonia coalita* R. Br., *Serenoa repens* (Bartram) Small., *Sophora subprostrata* Gagnep., *Taraxacum officinale* (L.) Weber ex F. H. Wigg.

Un compuesto no natural pero muy utilizado es el **ácido colerético**, obtenido por oxidación del ácido cólico, que brinda un 80% de protección contra la acción del veneno de *B. jararaca*.

Los **glucurónidos** de la **gimnemagenina** aislados de *Gymnema sylvestre* (Asclepiadaceae) son activos contra *Naja* y *Vípera ruselli* (Reyes-Chilpa & Jiménez-Estrada, 1995). Por ejemplo, el **gimnemato potásico** inhibe la ATPasa.

**Triterpenos tetracíclicos** como los **lanostanos**, presentes en *Pistacia terebinthus* L. y *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst., poseen actividad antiinflamatoria y antifosfolipasa A2 (Giner-Larza *et al.*, 2000), sin embargo, según Mors *et al.* (2000), no tienen actividad alexítera.

**Triterpenos pentacíclicos**, la estructura y conformación triterpénica de cinco anillos es necesaria para la actividad antiinflamatoria o antiveneno (Mors *et al.*, 2000):

✓ **Ácido oleanólico** (Figura 5.1.16), presente en *Achyranthes aspera* L., *Albizia lebbek* (L.) Benth., *Allium cepa* L., *Calendula officinalis* Hort., *Chiococca alba* (L.) Hitchc., *Forsythia suspense* (Thunb.) Vahl, *Marsypianthes chamaedrys* (Vahl) Kuntze, *Ocimum basilicum* L., *Plantago major* L. y *Thymus vulgaris* L.;

✓ **Lupeol y ácido ursólico** (Figura 5.1.16), presentes en *Chiococca alba* (L.) Hitchc., *Ehretia buxifolia* Lam., *Marsypianthes chamaedrys* (Vahl) Kuntze, *Nerium oleander* L., *Oldenlandia diffusa* Willd., *Rabdosia amethystoides* (Benth.) H. Hara y *Thymus vulgaris* L.;

✓ **Taraxerol; taraxasterol;  $\alpha$ -amirina;  $\beta$ -amirina** (se une directamente a receptores); **friedelina; epifriedelinol; alnusenona; ácido betulínico** (con actividad *n*-aminopeptidasa); **betulina; bredemeyerósido; ácido echinocístico; cicloartenol; ácido quinóvico; presenegenina; gymnemagenina; gypsogenina**.

Los más activos son los **ácidos oleanólico y ursólico**.

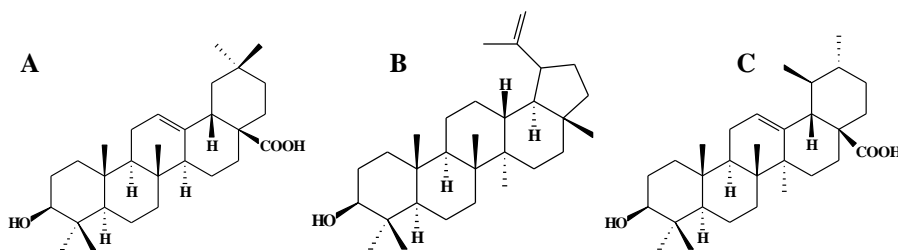


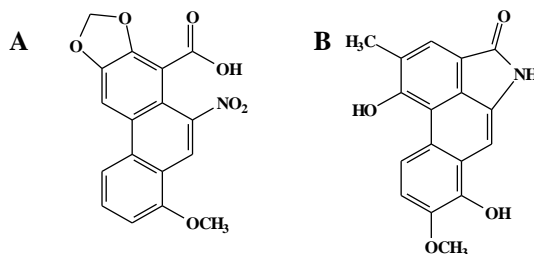
Figura 5.1.16: A: ácido oleanólico; B: lupeol; C: ácido ursólico

#### 1.1.4 Ácidos

✓ **Ácidos aristolóquicos** (Tsai *et al.*, 1980) (**Figura 5.1.17**): en raíces de especies de *Aristolochia* como *A. radix* L., activo contra *Naja naja* y *Bungarus multicinctus*. Disminuye la mortalidad en un 26% para *Naja naja* y 34% para *Bungarus multicinctus*; en ratones pre-tratados con **1251,38 mg/kg** intramuscular. El **ácido aristolóquico** inhibe la inflamación inducida por agentes inmunológicos, complejos inmunes y agentes no inmunológicos como **carragenina** o **aceite de crotón**. Moreno, (1993) sugiere que el mecanismo es el **bloqueo directo de la PLA2** que cataliza la liberación del **ácido araquidónico**, como también otros pasos que involucran la liberación de eicosanoides, como las vías de la ciclooxygenasa y lipoxigenasa.

Se ha demostrado que el **ácido aristolóquico** forma un **complejo 1:1 con la PLA2 de los venenos**, actuando como un inhibidor no competitivo de la enzima y provocando un cambio significativo de la estructura secundaria de la proteína caracterizado por un incremento aparente de la  $\alpha$ -hélice, sin modificación detectable de su estructura terciaria. Inhibe por lo tanto la inflamación y el dolor (Ricciardi, 2005).

Inhibe, además, la actividad lítica de 3 PLA2 del veneno de *Trimeresurus flavoviridis*, sobre todo en fosfolipasas básicas y la actividad lítica y edematosa de la fosfolipasa del veneno de *Vipera russelli*. Se encuentran generalmente acompañados por **aristolactamas: E** (**Figura 5.1.17**) y **AIIIA-6-O- $\beta$ -d-glucósido**.



**Figura 5.1.17:** A: ácido aristolóquico; B: aristolactama E.

El **ácido aristolóquico** es altamente tóxico e irritante de las mucosas y a altas dosis emetocatórico, pudiendo conducir a parálisis respiratoria. Es nefrotóxico y carcinógeno. Los **ácidos aristolóquicos I y II** son mutagénicos y carcinógenos con elevado riesgo de cáncer uretral, por lo cual el Ministerio de Salud de la República Federal de Alemania ha eliminado del mercado todas las drogas que contienen **ácido aristolóquico** aun en concentraciones homeopáticas. Es muy poco soluble en agua, lo que explicaría que no se hayan informado casos de toxicidad por ingestión de decocciones, pero sí casos de consumo de hierbas como suplemento dietario. Es soluble

en etanol. Pasa a la leche materna. Solo se admite su uso tópico en casos de acné, fístulas cutáneas, ulceraciones dérmicas, heridas, forúnculos y herpes (Ricciardi, 2000).

✓ **Ácidos grasos:** el éster *cis*-octadeca-9-enoato de etilo y otros ésteres presentes en la fracción 3 de *Murraya paniculata* L. Jack **bloquean el canal hidrofóbico de la PLA2**, inhibiendo su acción (Lobo *et al.*, 2010).

### 1.1.5 Otros compuestos descriptos como alexitéricos

También los **polisacáridos** pueden exhibir actividades antiinflamatorias e inmunomoduladoras, utilizándose como alexíteras por ejemplo *Casearia sylvestris* Sw. con una mezcla de polisacáridos, *Calendula officinalis* Hort. con **heteroglicanos** (Mors *et al.*, 2000).

En el mar, se ha aislado un **sesterterpeno** de la esponja *Luffariella variabilis* Polejaeff., activo contra *Bungarus multicinctus* por neutralización de la  $\beta$ -bungarotoxina; y contra cobras por inhibición de la PLA2 (Xiao *et al.*, 2017).

Algunos animales, en cambio, tienen **proteínas en el suero** que los protegen contra el veneno de serpientes. Como ejemplo, las zarihueyas *D. marsupialis* son resistentes al veneno de *Bothrops* debido a la presencia de la **proteína antimiotóxica DM64** que neutraliza *in vitro* la citotoxicidad e *in vivo* la miotoxicidad de las miotoxinas I (MT-I/asp49) y II (MT-II/lys49) del veneno de *B. asper* (Rocha *et al.*, 2002). La misma fracción neutralizante se ha encontrado en la leche de *D. marsupialis*, lo cual representa una protección adicional de los neonatos contra el veneno de *B. jararaca* (Jurgilas *et al.*, 1999). **DM43 inhibe la actividad fibrinogenolítica de la botrolisina y jararagina y forma un complejo estable con ambas metaloproteinasas**. Sin embargo, no es efectiva contra **atrilisina A o C**; tampoco se observa formación de complejos con **jararagina C** lo cual es indicativo del rol esencial que tiene el dominio de la metaloproteinasa para que exista interacción (Neves-Ferreira *et al.*, 2002).

En conclusión, descartando las mordeduras blancas o secas, en las que el ofidio no inyecta veneno (30-35% de los casos) y el peligro se encuentra en la posibilidad de sobreinfección bacteriana, es evidente que los constituyentes de algunas especies vegetales presentan interacciones con los venenos que pueden alterar su toxicidad (Ricciardi, 2005). En general, el efecto protector se da debido a la interacción de las toxinas y enzimas del veneno con las sustancias alexitéricas. Los sitios vulnerables podrían ser, por lo tanto:

✓ el bloqueo de el/los sitios receptores;

✓ el secuestro de metales necesarios para el funcionamiento de las metaloproteinasas como, Zn. Por ejemplo, la acción de la heparina neutraliza la miotoxina II del veneno de *B. asper* (PLA2) por formación de un complejo macromolecular. La heparina se une al sitio catiónico de la PLA2, sitio responsable de la acción citotóxica (Lomonte *et al.*, 1994);

✓ la actividad antiinflamatoria como en *Anacardium occidentale* L., *Argemone mexicana* L., *Boswellia serrata* Roxb., *Brunfelsia uniflora* Plum., *Capparis* L. sp., *Casearia sylvestris* Sw., *Cyperus rotundus* L., *Dolichos lablab* L., *Ficus carica* L., *Morus alba* L., *Prosopis spicigera* (L.) Druce, *Santolina chamaecyparissus* L., *Securidaca longepedunculata* Fresen., *Stachytarpheta dichotoma* (Rich.) Vahl, *Terminalia* L. sp., *Withania somnifera* (L.) Dunal, *Zanthoxylum* L. sp (Houghton, 1993) e inmunoestimulantes como *Aristolochia* L. sp. (ácido aristolóquico), *Stephania tetrandra* S. Moore. (cefarantina), *Tylophora ovata* R. Br. (tiloforina), algunas *Asteraceae* Bercht. & J. Presl (lactonas sesquiterpénicas), *Echinacea angustifolia* DC. (polisacáridos) (Houghton, 1993), existiendo un paralelismo entre la capacidad de las plantas y sus componentes químicos para neutralizar las acciones de los venenos y las propiedades antiinflamatorias y antihepatotóxicas, lo cual sugiere cierta analogía entre los mecanismos que gobiernan estas actividades;

✓ la actuación sobre síntomas como el dolor (*Papaver somniferum* L.), hemorragia e infección como, por ejemplo, los **pterocarpanos prenilados erithrabyssina-II** que tienen actividad antimicrobiana (evitando la septicemia), algunos **coumestanos** con acción antihepatotóxicas y regenerativas del hígado, tranquilizante como la **reserpina** de *Rawolfia* (L.) Benth. spp. (Reyes-Chilpa & Jiménez-Estrada, 1995).

✓ la interacción antígeno-anticuerpo como proteínas del extracto acuoso de semillas de *Mucuna pruriens* (L.) DC. y enzimas del veneno de *Echis carinatus* (Guerranti *et al.*, 2002).

✓ el gran número de componentes activos que poseen, por ejemplo, *Citrullus colocynthis* L. Schard. contiene sitosterol, espinasterol, ácidos cafeico, ferúlico y clorogénico, quercitina y rutina; *Eclipta prostrata* L. con sitosterol, estigmasterol,  $\beta$ -amirina, apigenina, luteolina, wedelolactona, ácido wedelico y desmetilwedelolactona; *Euphorbia hirta* L. con sitosterol, estigmasterol, camfesterol, cicloartenol, friedelina,  $\alpha$ -

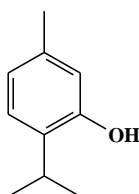
amirina,  $\beta$ -amirina, taraxerol, taraxenona, ellagitaninos y glicósidos flavonoides rhamnetina y quercetina, entre otras (Reyes-Chilpa & Jiménez-Estrada, 1995).

### 1.2 Metabolitos secundarios de *C. pareira*

La composición química de raíces y partes aéreas de la especie en estudio ha sido ampliamente estudiada en sus componentes no volátiles; no así su fracción volátil. A continuación, se describen los principales compuestos hallados.

#### 1.2.1 Volátiles

No se han encontrado citas bibliográficas respecto de la composición química de los extractos volátiles de *C. pareira*, salvo la presencia de timol (**Figura 5.1.18**) descrita por Semwal *et al.*, 2014 por lo cual resulta innovador en este trabajo, la caracterización química de la fracción volátil de esta especie.



**Figura 5.1.18:** Timol

#### 1.2.2 No volátiles

La composición química de extractos de *C. pareira* ha sido ampliamente estudiada pudiendo dividirse sus componentes en dos grandes grupos: alcaloides y no alcaloides (Semwal *et al.*, 2014).

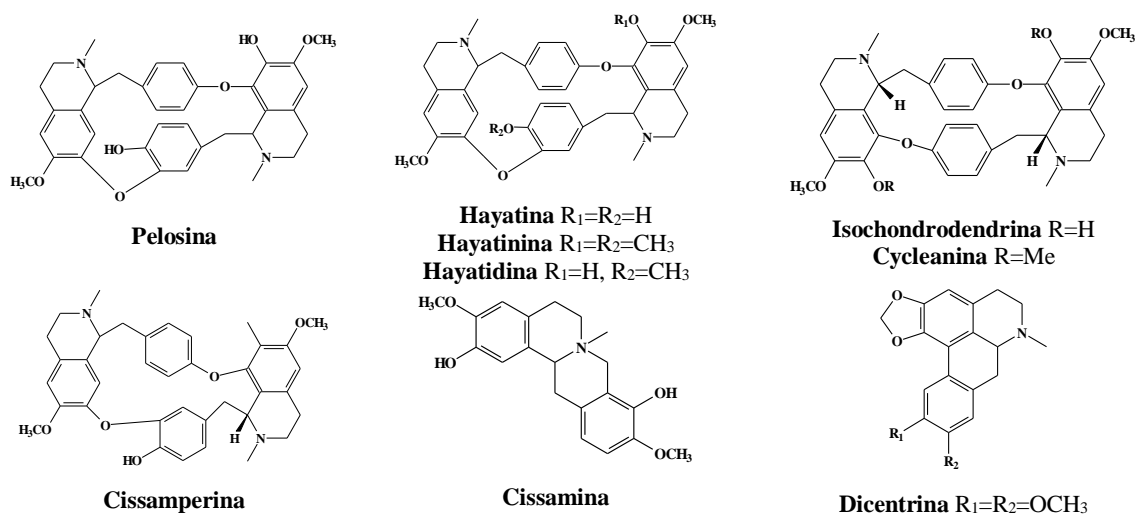
#### Componentes alcaloides (**Tabla 5.1.3**) (**Figura 5.1.19**)

**Tabla 5.1.3:** Componentes alcaloides de *C. pareira*

Alcaloide	Órgano	Referencia
pelosina (bisbenzilisquinolina)	raíces	Wiggers, (1840)
hayatina o <i>l</i> -curina		Scholtz, (1896);
hayatinina		Bhattacharji <i>et al.</i> (1952); (1956); (1962);
hayatidina o	planta entera	Bhatnagar <i>et al.</i> (1967);
4- <i>O</i> -metilbebeerina o		Bhatnagar & Popli, (1967);
<i>O</i> -metilcurina		Haynes <i>et al.</i> (1966)
isochondodendrina; hayatina o curina	raíces y frutos	Kupchan <i>et al.</i> (1960); (1965); (1966)
cissamperina	planta entera	
hayatina o berberina o curina	raíces	Boissier <i>et al.</i> (1965)
isochondodendrina		

**Tabla 5.1.3:** Componentes alcaloides de *C. pareira* (continuación)

clorhidrato de cissamina o ciclanolina	raíces	Anwer <i>et al.</i> (1968)
isochondodendrina; dicentrina;		
dehidrodicentrina;	raíces	Dwuma-Badu <i>et al.</i> (1975)
cicleanina;		
insularine		
berberina;		
hayatidina;		
isochondodendrina;	planta entera	Bhakuni <i>et al.</i> (1987)
cicleanina;		
sepeerine		
Warifteína, metil-warifteína	hojas	Aguirre-Galvis, (1988)
laudanosina;nuciferina; bulbocarpina;		
corituberina;	hojas y tallos	Ahmad <i>et al.</i> (1992)
clorhidrato de magniflorina		
pareirubrin A y B; grandirubrina;	planta entera	Morita <i>et al.</i> (1993a); (1993b)
isoimerubtina		
azafluoranthene; norimeluteine	planta entera	Morita <i>et al.</i> (1993c);
norruffscine		
pareitropone	raíces	Morita <i>et al.</i> (1995)
berberina		
reserpina	raíces	Sharma <i>et al.</i> (2004); Stepp, (2004); Bafna & Mishra, (2010)
cissampelina o pelosina		
magnoflorine	raíces	Manju <i>et al.</i> (2017)
magnocurarine		



**Figura 5.1.19:** Estructuras químicas de los alcaloides de *C. pareira*

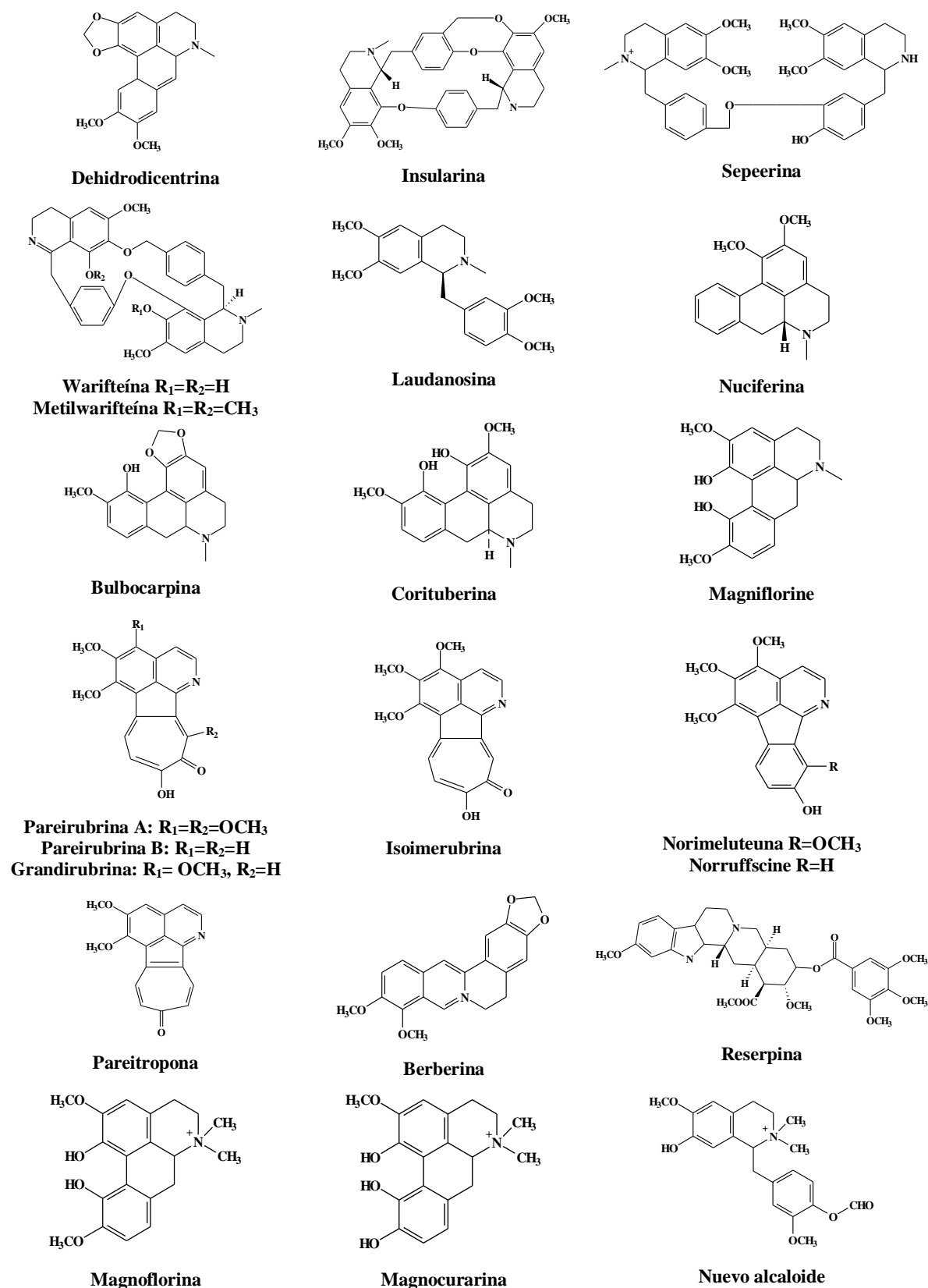


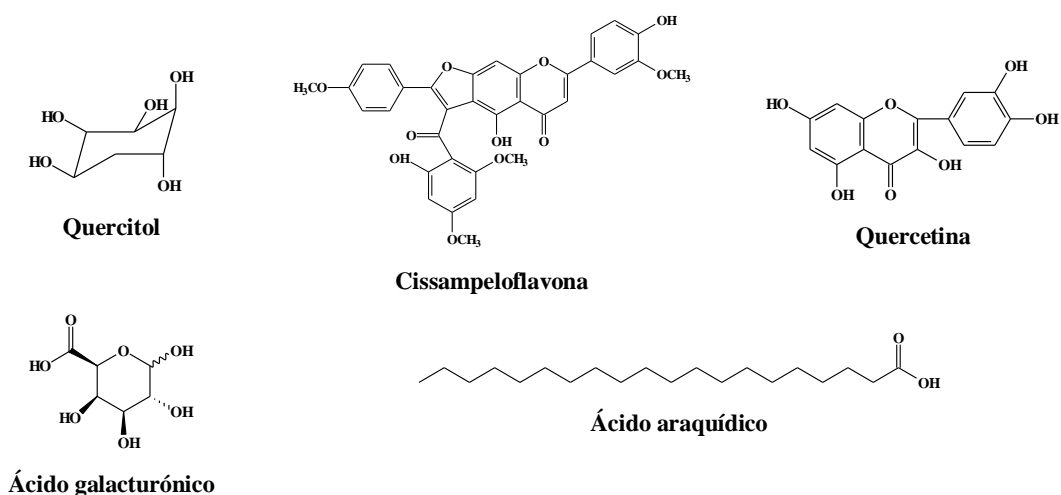
Figura 5.1.19: Estructuras químicas de los alcaloides de *C. pareira* (continuación)



### Componentes no alcaloides (Tabla 5.1.4) (Figura 5.1.20)

**Tabla 5.1.4:** Componentes no alcaloides de *C. pareira*.

Componente no alcaloide	Órgano	Referencia bibliográfica
quercitol	raíces	Srivastava, (1956); Chowdury, (1972); Dwuma-Badu <i>et al.</i> (1975)
esteroles		
cissampeloflavone	partes	Ramirez <i>et al.</i> (2003)
dimero de chalcona flavona	aéreas	
pectinas		
(ácido galacturónico (70-75%) y azúcares neutros)	hojas	Singthong <i>et al.</i> (2004); (2005)
quercetina	planta	Amresh <i>et al.</i> (2007)
ácidos grasos saturados: araquídico y eicosanoico	planta	Ramasubramaniaraja & Badu, (2010)
polisacáridos (hidrocoloides)	hojas	Vardhanabhuti & Ikeda, (2006)



**Figura 5.1.20:** Estructuras químicas de los componentes no alcaloides de *C. paereira*

En este capítulo se caracterizará la química volátil de la especie autóctona y su variación estacionaria, así como también, se observará si existen diferencias entre la composición volátil de sus órganos: raíces y partes aéreas; para una estación dada.

Por otra parte, se analizará la química no volátil de la fracción alexitéricamente activa **F6**, de manera tal de lograr identificar la naturaleza de sus componentes y la elucidación estructural de los mismos, en vistas de la posible utilidad de ellos en la fabricación de un *medicamento herbario* útil para aliviar la sintomatología local generada por el accidente botrópico.

## 2. Materiales y Métodos

### 2.1 Química volátil de la especie

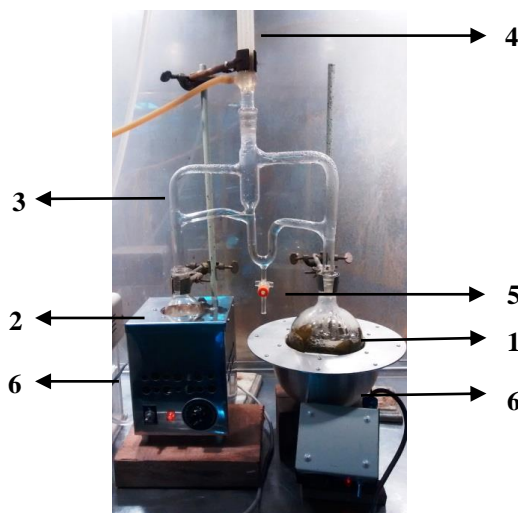
#### 2.1.1 Obtención del extracto volátil por destilación extracción simultáneas (SDE)

Dado que este trabajo de tesis tiene por objetivo principal estudiar la actividad biológica (alexitérica y antimicrobiana) de los extractos de *C. pareira*, solo se caracterizaron químicamente los extractos volátiles de los ejemplares procedentes de PP recolectados en verano (lugar de recolección y estación que resultó con mayor actividad).

La extracción destilación simultánea (SDE: simultaneous distillation extraction) se realizó utilizando un equipo tipo Lickens Nickerson modificado (**Figura 5.2.1**) (Ormeño *et al.*, 2011). Este método fue introducido por Likens y Nickerson en 1964 (Rijks *et al.*, 1983). Consiste en que los componentes volátiles de la muestra sumergida en agua y el solvente orgánico de extracción (hexano), destilen de forma separada y condensen en la misma zona produciéndose en ella la extracción, para que luego las dos fases se separen al condensar y continúen el proceso.

Se obtuvieron extractos volátiles de material vegetal correspondiente a partes aéreas (**A**) y raíces (**R**) de *C. pareira* recolectados en Paso de la Patria (**PP**) verano (**III**).

Con este objetivo, 25 g de material vegetal **A** fueron colocados en un balón de destilación de 1000 mL termostatzado a 80-90°C con manta eléctrica, mientras que, en otro balón termostatzado a 40°C, se colocó el solvente de extracción. El tiempo de extracción fue optimizado en 2 h a partir del comienzo del reflujo. El extracto volátil en hexano se almacenó en atmósfera inerte de CO<sub>2</sub> y a 4°C hasta su análisis.



1: balón contenedor de material vegetal + agua; 2: balón contenedor de solvente para extracción (hexano); 3: Lickens Nickerson donde ocurre la extracción; 4: tubo refrigerante que evita pérdidas por volatilización; 5: tubo por el que se recolecta el extracto volátil; 6: mantas eléctricas calefactoras. **Figura**

**5.2.1:** Equipo de extracción destilación simultánea (SDE) Lickens Nickerson

### 2.1.2 Estudio de la fracción volátil por cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masa (GC-MS): identificación y cuantificación

Se utilizó un equipo GC-MS *Shimadzu QP 2010* (*Figura 5.2.2*), equipado con una columna capilar SE 52 (*Mega, Legnano, Italia*) (25 m × 0,25 mm de diámetro interno), con 5% de fenil-polimetilsiloxano como fase estacionaria (0,25 µm de espesor de fase). Las condiciones experimentales fueron las siguientes: programa de temperatura, 60°C (8 min), 60-180°C a 3°C/min, 180-230°C a 20°C/min. Temperatura del inyector, 250°C, inyector split-splitless; relación de split, 1:40. Volumen de inyección, 0,2 µL de extracto. Fase móvil: He, 122,2 kPa (51,6 cm/seg). Temperatura de la interfase, 250°C. Rango de adquisición de masa, 40-400 u.m.a.

Los patrones de fragmentación obtenidos para cada componente se compararon con los almacenados en las bases de datos (Adams, 2007; Mc Lafferty & Stauffer, 1991). La cuantificación de cada componente se llevó a cabo en base al área de los picos, considerando todos los factores de respuesta como igual a 1. Las proporciones relativas de los constituyentes en la fracción volátil fueron expresadas como porcentajes obtenidos por normalización del área de los picos.



*Figura 5.2.2:* Equipo GC-MS Shimadzu QP 2010

## 2.2 Química no volátil de los extractos

Para caracterizar los compuestos no volátiles presentes en *C. pareira*, se consideraron aquellos extractos que resultaron más activos respecto de la actividad alexitérica. Para ello, todos los **extractos etanólicos de partes aéreas y las fracciones obtenidas de A2III PP** se analizaron mediante marcha fitoquímica en placa de toque y TLC según se indicó en los apartados **2.2 Preparación de extractos** y **2.6 Fraccionamiento bioguiado del extracto activo del Capítulo 3a: Actividad Alexitérica: Ensayos *in vitro*.**

### 2.2.1 Marcha fitoquímica: Reacciones de color (Wagner & Bladt, 2001)

**-Alcaloides: test de Dragendorff (ioduro de bismuto y potasio).** Al momento de uso, se mezclaron 10 mL de la solución A + 10 mL de la solución B + 20 mL de ácido acético + 10 mL de agua (duración de la mezcla: 2 días). Se consideró reactivo cuando se observó la aparición de precipitado amorfo de color rojo ladrillo, identificando sales de alcaloides.

Solución A: 2 g de subnitrato de bismuto en 25 mL de ácido acético y 100 mL de agua; Solución B: 40 g de ioduro de potasio en 100 mL de agua.

**-Fenoles: reacción con  $\text{FeCl}_3$ .**  $\text{FeCl}_3$  al 10% en agua. Característico de compuestos fenólicos. Coloración verde a marrón para derivados del catecol y coloración azulada para derivados del pirogalol.

**-Esteroides o triterpenos: reacción de Liebermann-Burchard.** Se mezclaron gotas del reactivo + gotas de solución de extracto y se calentó 10 minutos a  $100^\circ\text{C}$ . Coloración verde o azul verdoso indicó la presencia del núcleo esteroideal.

Reactivo de Liebermann-Burchard: 5 mL de anhídrido acético + 5 mL  $\text{H}_2\text{SO}_4$ cc + 50 mL de etanol absoluto.

**-Taninos: reacción con gelatina/ $\text{NaCl}$ .** Gotas de solución de extracto + gotas de reactivo. Abundante precipitado indicó la presencia de taninos.

Reactivo: 1 g de gelatina + 100 mL de agua + 10 g de  $\text{NaCl}$ .

**-Flavonoides: reacción de Shinoda.** En placa de toque gotas del extracto + pequeños trozos de Mg metálico + gotas de  $\text{HCl}$ cc. Coloración naranja: reactivo para flavonas; coloración roja: reactivo para flavonoles; coloración violeta: reactivo para flavanonas.

**-Aminoácidos: reacción con ninhidrina.** Ninhidrina al 0,1% (p/v) en solución etanólica. Coloración violeta indicó la presencia de aminoácidos

**-Antranoides y Quinonas: reacción de Bornträger.** Gotas de solución de extracto + gotas de reactivo de Bornträger. Observación UV a 365nm. Luego gotas de benceno. Las soluciones amarillas en benceno, que viraron a rojo en medio alcalino y con fluorescencia roja a 365 nm se consideraron reactivas para antranoides y quinonas. Sin tratamiento químico, todas las antraquinonas dan fluorescencia amarilla o rojo-marrón a 365nm.

Reactivo de Bornträger: solución de  $\text{KOH}$  al 20% (p/v) en metanol.

**-Glucósidos cardiotónicos: reactivo de Raymond- Marthoud.** 1 g de *m*-dinitrobenceno en 100 mL de etanol. Coloración roja, naranja rojiza o violeta son indicativas de cardenólidos.

**-Saponinas: reactivo vainillina- ácido sulfúrico.** Gotas de solución de extracto + gota de solución I + gota de solución II. Baño maría 5 minutos. Coloración azul o azul violeta con saponinas, aunque algunas pueden dar amarillo. En forma general, se observó la formación de espuma persistente sobre la superficie de las soluciones (método afrosimétrico).

Solución I: H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 5% (v/v) en etanol; Solución II: vainillina al 1% (v/v) en etanol.

**-Cumarinas.** Fluorescencia azul, marrón o azul verdosa a 365nm para cumarinas simples; fluorescencia amarilla, marrón, azul o azul verdosa para furano y piranocumarinas. Las cumarinas no sustituidas fluorescen amarillo-verde luego de tratamiento con KOH y vapores de NH<sub>3</sub>. Las cromonas poseen fluorescencia azul débil con KOH al 5% (p/v) en etanol a 365nm.

### 2.2.2 Cromatografía en capa delgada (TLC)

Los extractos etanólicos de partes aéreas de ambos sitios de recolección se sembraron en cromatofolios de sílica gel GF<sub>254</sub> (*Merck*) utilizando como fase móvil cloroformo-metanol (95:5), radiación UV 254/365nm y sulfato cúprico 5% (p/v) y/o anisaldehído sulfúrico como reactivo revelador universal (Wagner & Bladt, 2001).

### 2.2.3 Estudio químico de la fracción activa no volátil

**Cromatografía líquida de alta performance (HPLC) acoplada a un detector de arreglo de diodos (DAD)**

Una vez identificada la fracción alexitéricamente activa, se analizó por HPLC-DAD para observar el número de componentes/familias de compuestos, mediante el análisis de los espectros UV obtenidos.

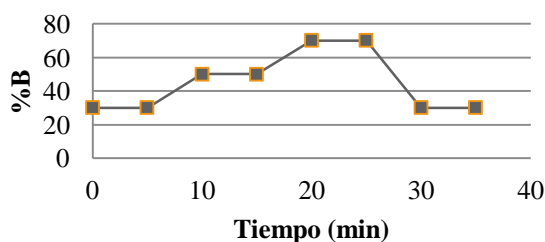
Equipo utilizado: Shimadzu LC-10A (Tokyo, Japan); detector: Shimadzu, SPD-M20A (Tokyo, Japan); detección a longitud de onda fija 254nm; columna, Hypersil<sup>TM</sup> ODS C18 (250 mm × 4,6 mm, tamaño de partícula 5 mm, Thermo Scientific, Whatman, MA, USA).

**Condiciones de corrida:** **A:** buffer fosfato monobásico 50 mM pH 2,8; **B:** metanol 90%; flujo: 0,7 mL/min; gradiente lineal/escalonado como se indica en la **Tabla 5.2.1** y **Figura 5.2.3**. Tiempo total de corrida: 35 minutos. Detector UV a 280nm.

**Muestra:** 3 mg de fracción activa en 300 µL de metanol (grado HPLC). Volumen de inyección: 20 µL.

**Tabla 5.2.1:** Esquema de combinación de fase móvil para corrida en HPLC-DAD

Tiempo (min)	0,01 - 5,00	10,01 - 15,00	20,01 - 25,00	30,01 - 35,00
% A	70	50	30	70
% B	30	50	70	30



**Figura 5.2.3:** Gradiente de fase móvil: %B vs tiempo

### Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masa (UHPLC-MS/Orbitrap)

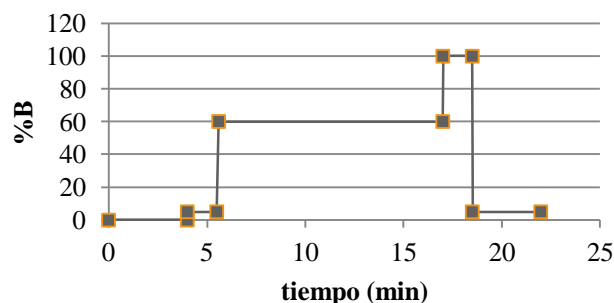
La separación cromatográfica y elucidación estructural de los compuestos posiblemente bioactivos presentes en la fracción activa se llevó a cabo utilizando un sistema cromatográfico Thermo Ultimate R3000 UHPLC (Thermo Scientific, Sunnyvale, CA, USA) acoplado a un analizador de masa de alta resolución (Q-Orbitrap) utilizando un sistema de “clean-up” con válvula de conmutación automática, Rheodyne, de 6 puertos adaptando el método propuesto por Barnaba *et al.* (2015).

**Condiciones de corrida:** **A:** agua deionizada; **B:** acetonitrilo (ACN); combinados como se indica en la **Tabla 5.2.2** y **Figura 5.2.4**. Se cargaron 2 µL de muestra en un cartucho HyperSep™ Retain PEP spe (3.0 mm × 10 mm, 40-60 µL, Thermo Scientific, Sunnyvale, CA, EE. UU.) con agua deionizada a una velocidad de flujo de 0,25 mL/min. Después de 4 minutos, la fase móvil (95% H<sub>2</sub>O y 5% ACN, velocidad de flujo de 0,40 mL/min) fluyó a través del cartucho SPE, transfiriendo los analitos retenidos a la columna analítica (Acquity UPLC BEH C18, 2,1 mm × 100 mm; tamaño de partícula; 1,7 µm) (Waters, Milford, MA, EE. UU.).

**Muestra:** 1 mg/mL en metanol. Volumen de inyección: 2 µL.

**Tabla 5.2.2:** Esquema de combinación de fase móvil para corrida en UHPLC

Tiempo (min)	0,01 - 4,00	4,01 - 5,50	5,60 - 17,00	17,01 – 18,50	18,51 - 22,00
% A	100	95	40	0	95
% B	0	5	60	100	5



**Figura 5.2.4:** Gradiente de fase móvil: %B vs tiempo

La fuente de ionización fue un electrospray calentado (HESI-II). Los espectros de masa se obtuvieron en modo de ionización negativa por análisis completo de MS/MS dependiente de datos MS (full MS-dd MS/MS) con una resolución de 140.000 FWHM (full width at half-maximum) en full scan y de 17.500 FWHM para dd-MS2. Condiciones experimentales de la fuente de ESI: voltaje de spray, 2,80 kV; flujo de nebulización, 30 unidades arbitrarias; flujo de gas auxiliar, 20 unidades arbitrarias; temperatura del capilar, 310°C; temperatura del gas de secado, 280°C (Barnaba *et al.*, 2016).

Se utilizaron datos espectrales de todas las masas para la identificación y cuantificación de analitos que se identificaron a través de resultados espectrales de masas dependientes de datos, al hacer coincidir los espectros MS / MS con los obtenidos de experimentos previos realizados con soluciones estándar y reunidos como una biblioteca espectral con la aplicación Thermo Library Manager Application (Thermo Scientific, San Jose, CA, USA). A diferencia de los métodos dirigidos (*targeted*), en los que se ignora la mayoría de los metabolitos presentes en la matriz, en nuestro caso el objetivo fue lograr la cobertura metabólica más amplia posible de manera no dirigida (*untargeted*), incluyendo los compuestos desconocidos. En consecuencia, los metabolitos que se buscaron, por definición, no estaban predefinidos.

### 3. Resultados y discusión

#### 3.1 Metabolitos volátiles

##### 3.1.1 Obtención de los extractos volátiles

Se obtuvieron por SDE los extractos volátiles de partes aéreas (A) y raíces (R) del material vegetal recolectado en Paso de la Patria en verano: **AIII PP** y **RIII PP**

### 3.1.2 Composición de los extractos volátiles por GC-MS (Tabla 5.3.1)

**Tabla 5.3.1:** Composición volátil de AIII PP. **LRI:** índice de retención lineal; **A:** partes aéreas; **R:** raíces.

LRI	Compuesto	A %	R %	LRI	Compuesto	A %	R %
926	Triciclono	0,01	0,00	1200	(E)-Dihidrocarvona	0,00	0,03
926	Cumeno	0,01	0,00	1201	Decanal	0,00	0,02
930	2-Metil-2-pentanetiol	0,00	0,33	1201	Safranál	0,03	0,00
938	$\alpha$ -Tuyeno	0,20	0,45	1204	Verbenone	0,00	0,04
939	$\alpha$ -Pino	8,80	3,31	1213	(E)-Ocimenona	0,04	0,00
953	$\alpha$ -Fencheno	0,02	0,00	1228	Citronelol	0,14	0,00
956	Canfeno	0,25	0,00	1229	Nerol	0,00	0,25
962	Propilbenceno	0,05	0,00	1233	Pulegona	0,00	1,79
970	p-Etiltolueno	0,14	0,00	1239	Carvona	0,00	3,44
972	Sabineno	1,33	1,81	1247	Neral	0,74	0,00
981	$\beta$ -Pino	23,25	2,48	1249	Piperitona	0,00	0,10
982	1-Octen-3-ol	0,00	0,02	1253	Carvona	0,06	0,00
985	6-Metil-5-hepten-2-ona	0,08	0,18	1277	Geranial	0,88	0,22
986	3-Menteno	0,00	0,05	1285	Acetato de bornilo	0,40	0,00
1004	Mirceno	6,35	4,94	1285	2-Metilnaftaleno	0,02	0,00
1009	Octanal	0,01	0,00	1292	Indol	0,04	0,00
1012	$\delta$ -3-Careno	0,01	0,18	1325	$\gamma$ -Nonalactona	0,03	0,00
1017	$\alpha$ -Terpineno	0,02	0,33	1331	Oxido de piperitenona	0,15	0,06
1023	1,2,4-Trimetilbenceno	0,03	0,02	1366	$\alpha$ -Cubebeno	0,01	0,11
1027	p-Cimeno	2,60	4,09	1377	$\alpha$ -Copaeno	0,17	0,00
1030	Limoneno	22,58	34,76	1386	(E)- $\beta$ -Damascenona	0,58	0,00
1033	1,8-Cineol	0,09	2,16	1390	$\beta$ -Elemeno	0,00	0,05
1038	(E)- $\beta$ -Ocimen	6,34	0,12	1422	$\alpha$ -Ionona	0,23	0,00
1043	Benzeneacetaldehído	0,03	0,00	1453	$\alpha$ -Humuleno	0,00	0,10
1043	(Z)- $\beta$ -Ocimen	1,67	0,27	1454	$\beta$ -Cariofileno	1,28	0,23
1047	Dihidrotagetona	0,00	0,26	1456	$\alpha$ -Patchouleno	0,14	0,00
1054	$\gamma$ -Terpineno	0,00	0,55	1481	Germacreno D	0,00	0,16
1072	1-Octanol	0,07	0,00	1493	(E)- $\beta$ -Ionona	0,92	0,00
1089	p-Cimeneno	0,03	0,17	1517	Biciclogermacreno	0,31	0,00
1093	4-Etil-o-xileno	0,00	0,01	1519	$\delta$ -Cadineno	0,08	0,00
1089	Oxido de $\alpha$ -pino	0,00	0,23	1538	$\alpha$ -Cadineno	0,11	0,00
1090	$\alpha$ -Terpinoleno	0,07	0,52	1539	Dihidroactinidiol	0,20	0,00
1093	p-Cimeneno	0,00	0,52	1539	(E)-Nerolidol	0,13	0,00
1100	Linalol	0,00	0,20	1543	$\gamma$ -Cadineno	0,08	0,00

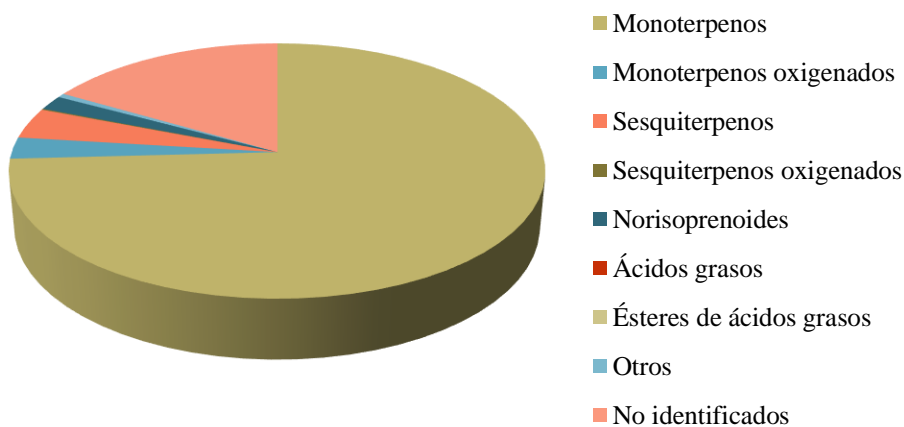


**Tabla 5.3.1:** Composición volátil de AIII PP. (continuación)

1103	Nonanal	0,01	0,00	1650	Dihidrojasmonato de metilo	0,00	0,08
1123	$\beta$ -Tuyona	0,00	0,06	1827	Miristato de isopropilo	0,00	0,10
1124	Crisantenona	0,00	0,07	1845	Fitona	0,00	0,08
1128	(Z)-epoxi-Ocimeno	0,07	0,20	1862	Ácido pentadecanoico	0,00	0,14
1137	(E)-Oxido de Limoneno	0,01	0,00	1874	1-Hexadecanol	0,00	0,07
1142	Mircenona	0,00	1,18	1908	Palmitato de metilo	0,00	0,04
1145	Mentona	0,00	1,25	1968	Ácido palmítico	0,00	9,59
1153	Citronelal	0,01	0,00	2133	Ácido oleico	0,00	0,38
1155	neo-Isopulegol	0,00	0,17	2159	Linoleato de etilo	0,00	0,77
1160	Pinocarvona	0,00	0,01	2161	Ácido estárico	0,00	0,33
1174	4-Terpineol	0,00	0,06	2179	Ácido linoleico	0,00	14,24
1190	$\alpha$ -Terpineol	0,00	0,09	2185	Oleato de etilo	0,00	2,78
1191	(Z)-Dihidrocarvona	0,00	0,06	2192	Estearato de etilo	0,00	0,35
1195	Mirtenal	0,00	0,02				
1196	$\beta$ -Ciclocitral	0,19	0,00	<b>Total identificado y cuantificado</b>		<b>81,07</b>	<b>96,66</b>

**Tabla 5.3.2:** (%) de familias de compuestos volátil en partes aéreas (A) y raíces (R).

Familia de compuestos	% A	% R
Monoterpenos	76,35	66,5
Monoterpenos oxigenados	2,81	11,95
Sesquiterpenos	4,04	0,65
Sesquiterpenos oxigenados	0,13	0
Norisoprenoides	1,93	0,08
Ácidos grasos	0	24,68
Ésteres de ácidos grasos	0	4,04
Otros	0,54	0,33
<b>No identificados</b>	<b>17,14</b>	<b>3,72</b>



**Figura 5.3.1:** Grupos de volátiles en partes aéreas (A)

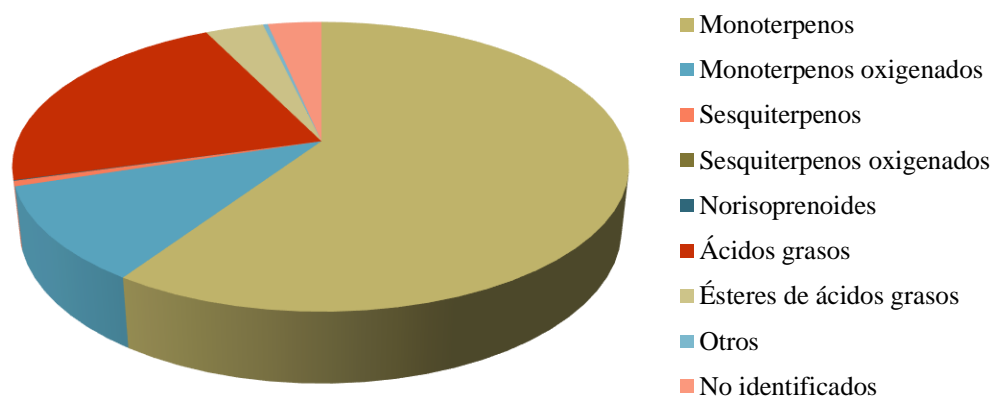


Figura 5.3.2: Grupo de volátiles en raíces (R)

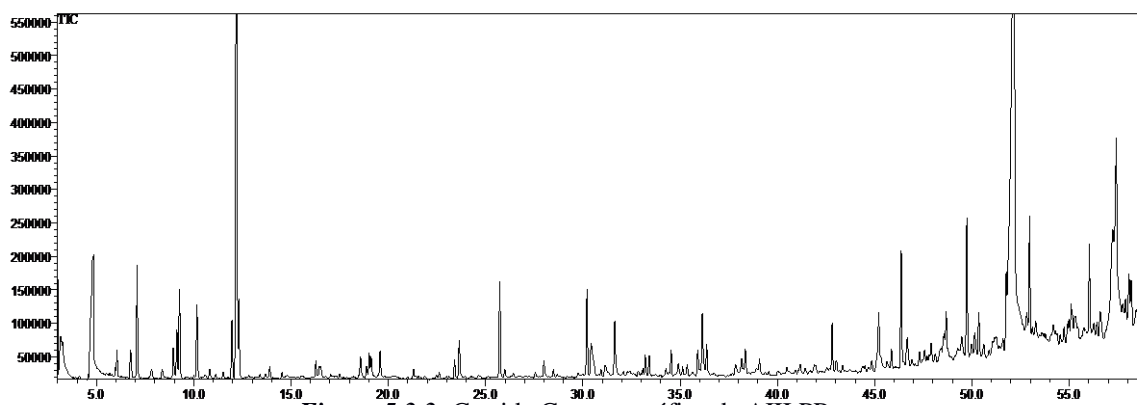


Figura 5.3.3: Corrida Cromatográfica de AIII PP.

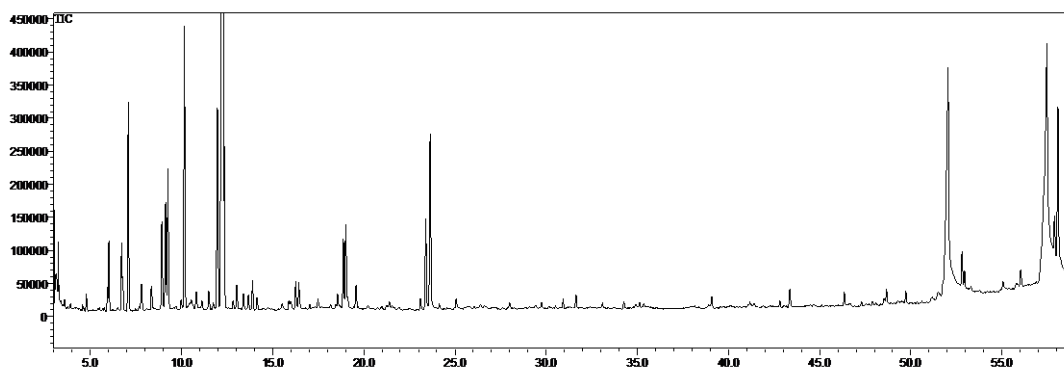


Figura 5.3.4: Corrida Cromatográfica de RIHI PP.

Los componentes identificados obtenidos de las partes aéreas (A) y raíces (R) de la población de *C. pareira* en estudio, sus índices de retención y porcentajes se encuentran listados en la **Tabla 5.3.1** donde los compuestos se han ordenado de acuerdo a su orden de elución creciente de una columna cromatográfica con fase estacionaria poco polar (5% fenilmetilsilicona).

Los principales componentes del extracto volátil obtenidos de las partes aéreas fueron  $\beta$ -pineno (23,25%), limoneno (22,58%),  $\alpha$ -pineno (8,80%), mirceno (6,35%) y (*E*)- $\beta$ -ocimeno (6,34%). Mientras que los principales volátiles presentes en raíces en las condiciones experimentales utilizadas fueron limoneno (34,76%), ácido esteárico (14,24%), mirceno (4,94%), palmitato de mertilo (4,09%),  $\alpha$ -pineno (3,31%) y carvona (3,44%) (*Tabla 5.3.1*).

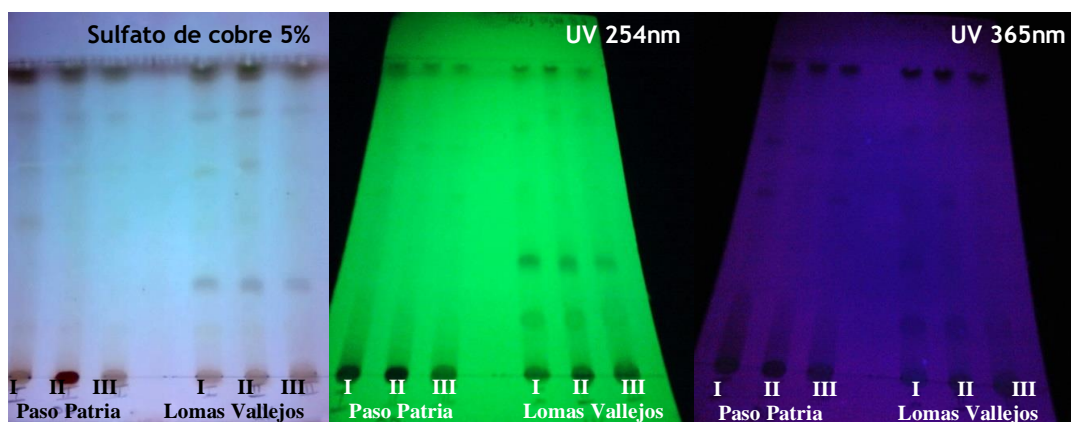
Por otra parte, es destacable la presencia de **monoterpenos oxigenados** y **ácidos grasos** en la fracción volátil de las raíces.

A través del perfil volátil de las partes aéreas y raíces de la población de *Cissampelos pareira* en estudio, es posible caracterizar en forma inequívoca el estado vegetativo donde el material resultó más activo como alexitérico. Por otra parte, los resultados muestran que las diferentes partes de la planta son capaces de expresar respuestas metabólicas diferentes. En este sentido, el estudio de los componentes volátiles de las partes aéreas y raíces para los estados vegetativos de otoño y primavera dieron rendimientos muy bajos y una composición mucho más pobre en lo que refiere a los componentes presentes (datos no mostrados).

### 3.2 Química de los extractos etanólicos no volátiles

#### 3.2.1 TLC de los extractos etanólicos de partes aéreas de ambas zonas geográficas de recolección

Se analizaron por cromatografía en placa delgada los **extractos etanólicos de partes aéreas de ambas regiones fitogeográficas (A2 PP y A2 LV)** para observar las diferencias y/o similitudes en sus componentes químicos (*Figura 5.3.5*).



**I:** otoño; **II:** primavera; **III:** verano. **Fase móvil:** cloroformo:metanol (95:5). **Reactivo revelador:** Sulfato de Cobre 5% (p/v); UV 254nm y UV 365nm. *Figura 5.3.5:* TLC de extractos etanólicos de partes aéreas de PP y LV

Pudo observarse una mancha roja con revelador de sulfato de cobre 5% (p/v) en el punto de siembra de los extractos de primavera, con mayor intensidad, y también en los de verano, recolectados en Paso de la Patria. Sin embargo, esta mancha no se encontró en los extractos de otoño y en aquellos recolectados en Lomas de Vallejos. De esto podría deducirse que son estos compuestos/familia de compuestos los responsables de la actividad biológica de tales extractos (*Figura 5.3.5*).

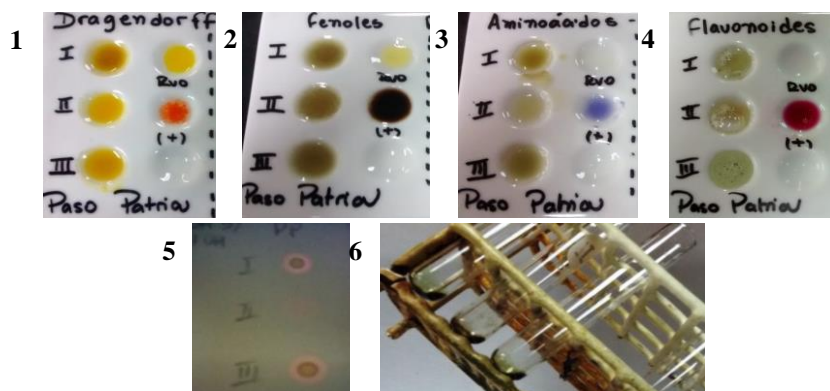
### 3.2.2 Fitoquímica: reacciones de color

Se consideraron las reacciones de color como reacciones de screening primario, a partir de las que se obtuvo información sobre la presencia o ausencia de familias de compuestos en los distintos extractos etanólicos de partes aéreas recolectados en Paso de la Patria. Los resultados se exponen en la *Tabla 5.3.3* y se ilustran en la *Figura 5.3.6*.

**Tabla 5.3.3:** Marcha fitoquímica de extractos etanólicos de partes aéreas recolectados de PP.

Extracto alcohólico de partes aéreas	I	II	III	Observaciones
Test de Dragendorff	+	-	±	Precipitado rojo ladrillo
Reacción de FeCl <sub>3</sub>	+	+	+	Precipitado verde-marrón
Reacción de Liebermann-Burchard	-	-	±	Cambio leve a verde azulado
Ninhidrina	-	-	-	Sin cambio de color
Reacción de Shinoda	-	±	±	Cambio leve a color rojizo.
Antraquinoides: Quinonas	+	+	+	Fluorescencia rojo-naranja a 365nm. En medio alcalino fluorescencia roja.
Reactivo vainillina-ácido sulfúrico	-	+	+	Violeta a baño maría
Raymond- Marthoud	-	-	-	Sin cambio de color
Gelatina/NaCl	-	±	±	Precipitado blanco
Cumarinas	-	-	-	No se observó fluorescencia a 365 nm

I: otoño; II: primavera; III: verano. (-) Ausencia; (±) presencia dudosa; (+) presencia familia de compuestos.



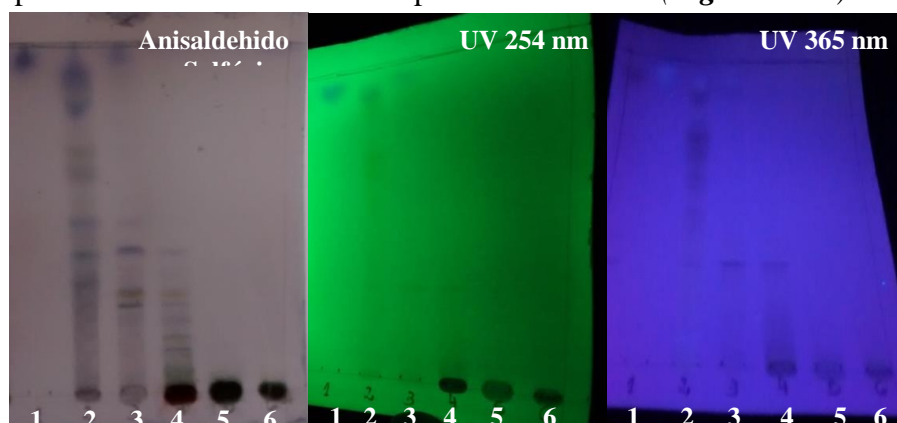
I: otoño; II: primavera; III: verano. 1: Alcaloides; 2: Fenoles; 3: Aminoácidos; 4: Flavonoides; 5: Antraquinoides; 6: Saponinas. *Figura 5.3.6:* Reacciones de color de extractos A2 de PP y LV.

De este modo, se pudo observar la **estabilidad de los fenoles y antraquinonas** en los distintos estados vegetativos de la especie, mientras que los alcaloides sólo se encontraron en los extractos provenientes del material vegetal de otoño y las saponinas en los extractos obtenidos del material de primavera y verano.

### 3.3 Química no volátil de las fracciones obtenidas

#### 3.3.1 TLC de las fracciones

Del mismo modo que se realizó una TLC para los extractos etanólicos enteros, se realizó una para las fracciones obtenidas a partir de **A2III PP** (*Figura 5.3.7*)



1; 2; 3; 4; 5 y 6: fracciones de A2III PP. Fase móvil: cloroformo:metanol 95:5. Revelado: Anisaldehido sulfúrico/UV 254 nm/UV 365 nm. *Figura 5.3.7: TLC de las fracciones de A2III PP*

En las fracciones **4**, **5** y **6** se observó la misma mancha roja en el punto de siembra observada para el extracto entero (*Figuras 5.3.5*) a la que se le podría atribuir la actividad biológica del mismo. **F6** tuvo la misma actividad biológica que **F4** y **F5** (apartado **3.5.2 Seguimiento de la actividad biológica de las fracciones**) pero su perfil cromatográfico por TLC (*Figura 5.3.7*) evidenció una menor cantidad de componentes, razón por la cual se asumió que sólo está formada por componentes bioactivos. Este hecho motivó que el estudio químico estructural se continúe con **F6**, descartando las fracciones restantes.

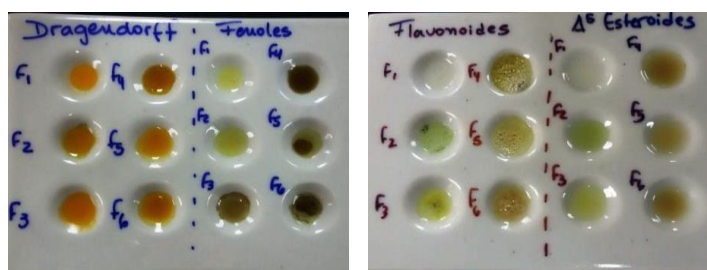
#### 3.3.2 Fitoquímica: reacciones de color

Aquellas familias de compuestos que resultaron reactivas para **A2III PP**, fueron ensayadas en cada una de las fracciones obtenidas, de manera tal de determinar cuáles de ellas se enriquecieron en componentes bioactivos. Los resultados obtenidos se detallan en la *Tabla 5.3.4* y se ilustran en la *Figura 5.3.8* los resultados de las reacciones en placa de toque.

**Tabla 5.3.4:** Reacciones de color para las fracciones.

Ensayos	F1	F2	F3	F4	F5	F6	Observaciones
<b>Test de Dragendorff</b>	-	+/-	-	+	+/-	+/-	Precipitado pardo
<b>Reacción de FeCl<sub>3</sub></b>	-	-	+	+++	++	++++	Precipitado verde-marrón
<b>Reacción de Shinoda</b>	-	-		+/-	+/-	+	Cambio a rojo-marrón
<b>Reacción de Liebermann-Burchard</b>	+	+	+	-	-	-	Cambio a verde-azulado
<b>Gelatina/NaCl</b>	-	-	-	-	+/-	+/-	Precipitado blanco
<b>Antraboides:</b>							Fluorescencia rojo-naranja a 365nm. En medio alcalino fluorescencia roja.
<b>Quinonas</b>	+	-	-	-	-	-	
<b>Reactivo vainillina-ácido sulfúrico</b>	+	+/-	+/-	-	-	-	Violeta a baño mar

F1; F2; F3; F4; F5; F6: fracciones de A2III PP. (-) Ausencia; (±) dudoso; (+) presencia de familia de compuestos.



1: Alcaloides: Dragendorff; 2: Fenoles: FeCl<sub>3</sub>; 3: Flavonoides: Shinoda; 4: Esteroides: Liebermann-Burchard. **Figura 5.3.8:** Marcha Fitoquímica. Reacciones de color de las fracciones

En las fracciones más activas **4**, **5** y **6** se identificó la presencia de **alcaloides**, **fenoles** y **flavonoides**. Posiblemente los **alcaloides** y **flavonoides** no hayan sido identificados en el extracto entero debido a un fenómeno de dilución. Al ser fraccionado el extracto, los componentes bioactivos resultaron presentes en mayor proporción respecto del resto de los componentes. Además, de éste análisis puede deducirse que los **esteroides**, las **quinonas** y las **saponinas** no estarían relacionados con la actividad biológica de los extractos, debido a su presencia en las fracciones menos activas.

### 3.4 Elucidación estructural de los componentes bioactivos

#### 3.4.1 HPLC-DAD

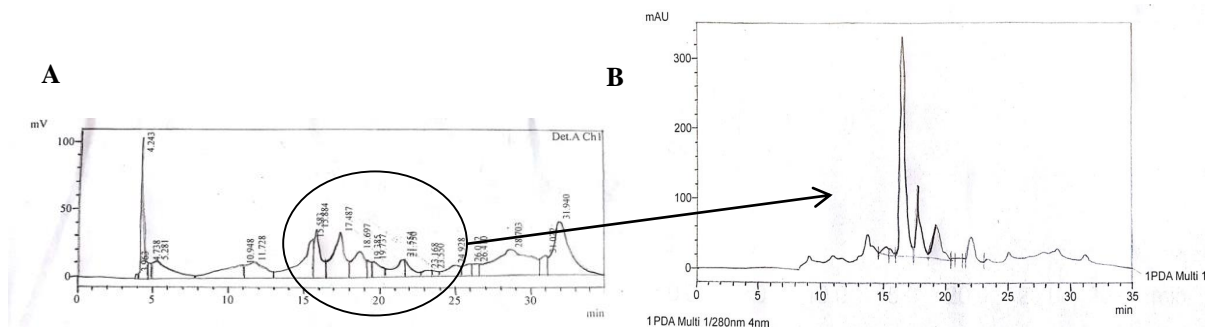
Se analizó por HPLC-DAD la fracción activa **F6** con el fin de obtener una aproximación de la identidad de sus componentes. Asimismo, se analizó el extracto entero **A2III PP** de manera tal de evaluar el enriquecimiento de la fracción en los componentes activos. Los cromatogramas correspondientes a las corridas realizadas se observan en la

**Figura 5.3.9;** los espectros UV de los principales picos de **F6** en la **Figura 5.3.10**. Los resultados se exponen en las **Tablas 5.3.5 y 5.3.6**.

**Tabla 5.3.5:** Tabla de picos cromatográficos de A2III PP

Pico	T <sub>R</sub>	Area	Peso	%Area	%Peso	Pico	T <sub>R</sub>	Area	Peso	%Area	%Peso
1	3,963	31121	3635	0,157	0,866	12	19,737	446348	11172	2,252	2,661
2	4,243	1055467	104379	5,326	24,857	<b>13</b>	<b>21,554</b>	<b>684109</b>	<b>13112</b>	<b>3,452</b>	<b>3,122</b>
3	4,738	159463	11530	0,805	2,746	<b>14</b>	<b>21,750</b>	<b>417002</b>	<b>12878</b>	<b>2,104</b>	<b>3,067</b>
4	5,281	1050791	12014	5,303	2,861	15	23,168	195898	4710	0,989	1,122
5	10,948	989049	8646	4,991	2,059	16	23,550	95539	4143	0,482	0,987
6	11,728	920137	10807	4,643	2,574	17	24,982	528317	8224	2,666	1,958
7	15,583	1648797	27376	8,321	6,519	18	26,012	379026	8978	1,913	2,138
<b>8</b>	<b>15,884</b>	<b>978386</b>	<b>34464</b>	<b>4,937</b>	<b>8,207</b>	19	26,410	262714	9215	1,326	2,194
<b>9</b>	<b>17,487</b>	<b>1582190</b>	<b>31621</b>	<b>7,985</b>	<b>7,530</b>	20	28,703	3366952	19047	16,991	4,536
<b>10</b>	<b>18,697</b>	<b>1010538</b>	<b>18909</b>	<b>5,100</b>	<b>4,503</b>	21	31,022	436724	14813	2,204	3,527
11	19,385	186333	10780	0,940	2,567	22	31,940	3390772	39470	17,113	9,399
<b>Total</b>								<b>19815673</b>	<b>419923</b>	<b>100</b>	<b>100</b>

\*Los picos resaltados en negrita se corresponden con los picos de F6 dentro de A2III PP.

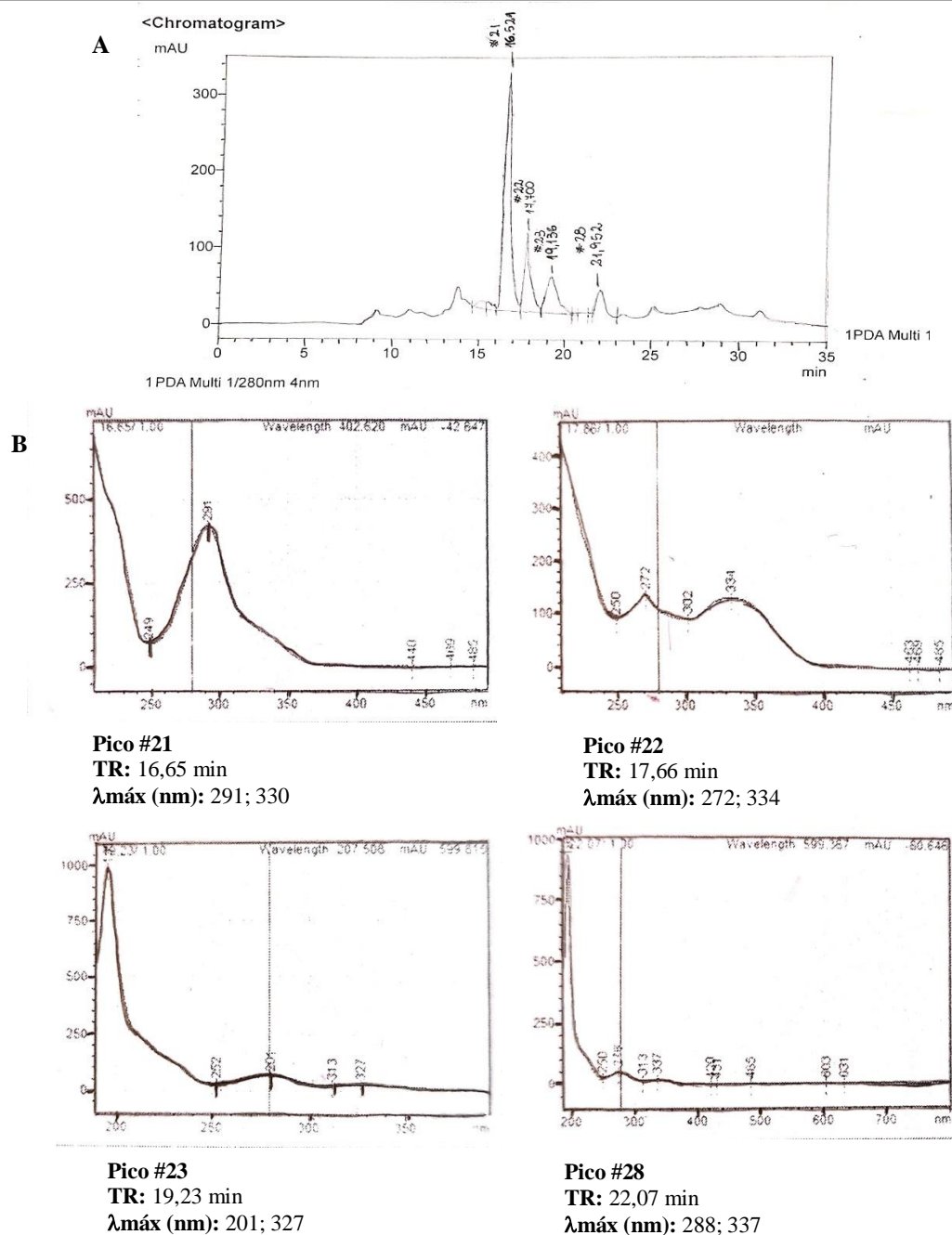


**A:** A2III PP; **B:** F6. Cromatograma HPLC,  $\lambda$  detector: 280 nm. **Figura 5.3.9:** HPLC-DAD

**Tabla 5.3.6:** Tabla de picos cromatográficos de F6.

Pico #	T <sub>R</sub>	Area	Peso	%Area	%Peso
<b>21</b>	16,523	8418202	331412	22,185	29,31
<b>22</b>	17,700	3637281	132151	9,586	11,687
<b>23</b>	19,136	3142130	66748	8,281	5,903
<b>28</b>	21,952	2108893	49695	5,558	4,395





**A:** Cromatograma HPLC F6,  $\lambda$  detector: 280 nm; **B:** Barrido espectral UV de los picos de interés (mayoritarios): TR: tiempo de retención;  $\lambda_{\text{máx}}$ : longitud de onda del máximo de absorbancia. **Figura**

### 5.3.10: HPLC-DAD F6

Considerando los % de área de los picos mayoritarios de **F6** (picos N° 21, 22, 23 y 28) (sumatoria de los % de área) y los % de área que se corresponden con éstos picos en la corrida del extracto entero **A2III PP** (picos N° 8, 9, 10, 13 y 14); y realizando el cálculo que se expone a continuación pudo verificarse el enriquecimiento de F6 en los componentes bioactivos:

sumatoria de % de área de picos mayoritarios de F6 → 100%

sumatoria de % de área de picos correspondientes en A2III PP → X %



45,6 % de área de picos mayoritarios de F<sub>6</sub> → 100%

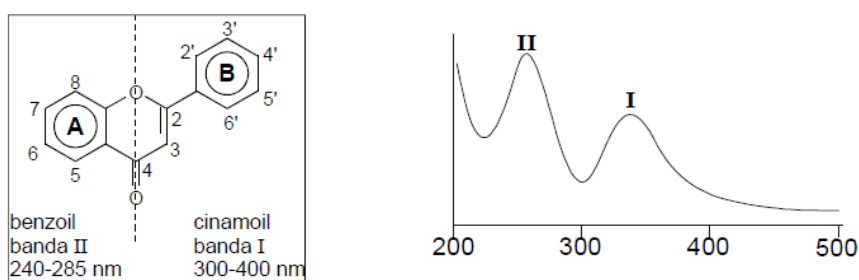
23,5 % de área de picos correspondientes en A2III PP → X = 51,56 %

Esto demuestra que, con el fraccionamiento, se produjo un enriquecimiento en área del **51,56%** de la fracción en los componentes de interés.

Además, se caracterizaron en la fracción polar **F6** picos que, debido a sus máximos de absorbancia y a la forma de sus espectros UV, con dos bandas definidas, resultaron compatibles con **flavonoides** (*Figura 5.3.11*):

-una banda de mayor longitud de onda en el rango 300-390 nm (cinamoílo)

-una de menor longitud de onda en el rango de 250-280 nm (benzoílo)



**Figura 5.3.11:** Patrón de fragmentación de flavonoides

### 3.4.2 High Resolution Mass Spectrometry (Q-Orbitrap)

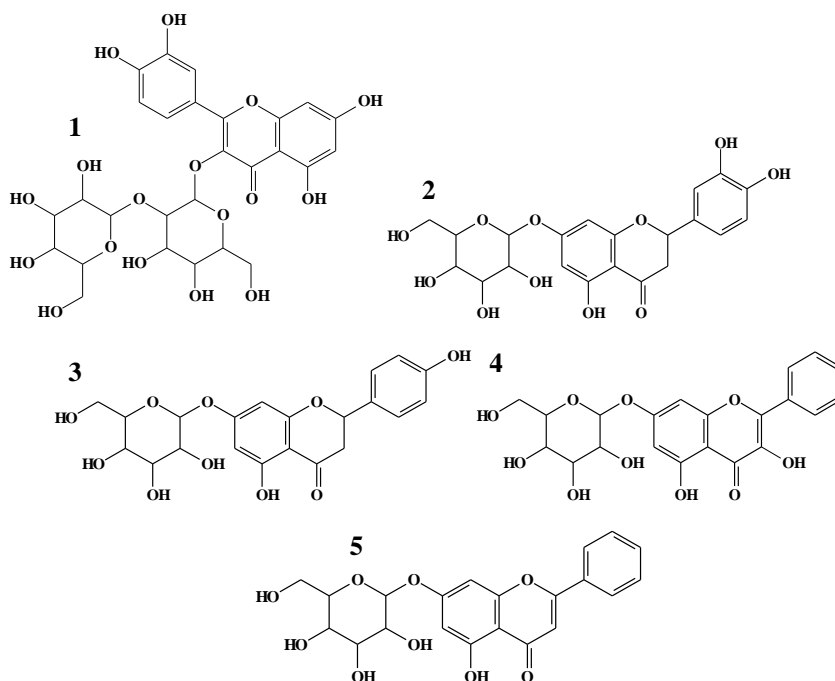
El enfoque utilizado para estudiar los componentes presentes en la fracción activa obtenida se sustenta en el concepto de la metabolómica, tal como se definió en la década de 1990 para describir técnicas destinadas a medir los metabolitos presentes dentro de una célula, tejido u organismo (Nicholson *et al.*, 1998). Las estrategias de la metabolómica se han dividido en dos enfoques distintos, la metabolómica no dirigida (*untargeted*) y la dirigida (*targeted*), cada una con sus propias ventajas y desventajas inherentes. (Roberts *et al.*, 2012).

La metabolómica no dirigida (*untargeted*) implica el análisis exhaustivo de todos los analitos medibles en una muestra, incluidos los compuestos desconocidos. Debido a su naturaleza integral, la metabolómica no dirigida debe combinarse con técnicas quimiométricas avanzadas, como el análisis multivariado, para reducir los conjuntos de datos generados en un conjunto más pequeño de señales manejables. Estas señales requieren una anotación utilizando bibliotecas *in silico* o investigación experimental e identificación posterior utilizando química analítica. El análisis no dirigido (*untargeted*) ofrece la oportunidad de descubrir nuevos objetivos, ya que la cobertura del metaboloma solo está restringida por las metodologías de preparación de muestras y la sensibilidad y

especificidad inherentes a la técnica analítica empleada. A su vez, la metabolómica dirigida (*targeted*) implica la medición de grupos definidos de metabolitos químicamente caracterizados y bioquímicamente anotados. Mediante el uso de estándares internos, en este caso el análisis puede realizarse de manera cuantitativa o semicuantitativa.

El objetivo de este trabajo fue utilizar un enfoque analítico no dirigido (*untargeted*) para la identificación de flavonoides, utilizando un sistema de clean-up por SPE on-line para reducir la interferencia de la matriz, combinada con la detección cromatográfica rápida proporcionada por la capacidad de la UHPLC acoplada a espectrometría de masas cuadrupolo/alta resolución (Q-Orbitrap) (Barnaba, 2018). Como bases de datos para la identificación de los compuestos presentes se utilizaron la base de datos on-line Compound Discoverer 3.1 (mzCloud library, Advanced Mass Spectral Database, <https://www.mzcloud.org>). Si bien es posible disponer de una cuantificación tentativa de los diferentes componentes a través de la normalización de sus áreas a partir de las áreas obtenidas en la corriente iónica total (TIC, área compuesto/área TIC), la información obtenida no es confiable por lo que esta etapa formará parte de un trabajo futuro.

En resumen, la elucidación estructural de los componentes de la fracción activa F6 permitió identificar cinco (5) derivados glicosilados de flavonoles (**Figura 5.3.12**): **1.** quercetina 3-O-soforosida [quercetina 3-O-β-D-glucosil-(1,2)-β-D-glucósido]; **2.** naringenina 7-O-β-D-glucósido; **3.** eriodictiol-7-O-β-D-glucósido; **4.** galangina-7-glucósido y **5.** baicaleína-7-O-glucósido (oroxina A).



**Figura 5.3.12:** Flavonoides polihidroxilados identificados por UHPLC-MS

Teniendo en cuenta los trabajos encontrados en la bibliografía para la especie *C. pareira* de otras regiones del mundo, nuestros resultados no están de acuerdo con los reportados por Amresh *et al.* (2007) que solo detectaron *quercetina* con actividad antioxidante en raíces. Tampoco lo están con el trabajo de Ramirez *et al.* (2003) que informan la presencia de *cissampeloflavona* y un *dimero de chalcona flavona* en partes aéreas a las cuales relacionan la actividad contra *Tripnozoma cruzi* y *T. brucei*.

#### 4. Conclusiones

Se ha caracterizado por primera vez la composición química de los extractos volátiles de esta especie, particularmente, material vegetal recolectado del sitio geográfico y en la estación del año en la que manifestó mayor actividad biológica la especie, encontrándose una predominancia tanto en partes aéreas como en raíces de hidrocarburos terpénicos ( $\alpha$ -pineno;  $\beta$ -pineno;  $\beta$ -mirceno y limoneno), y además, en raíces gran proporción de ácidos grasos (ácido esteárico y linoleico) ausentes en partes aéreas.

Respecto de los componentes no volátiles, dada la complejidad del extracto activo **A2III PP**, se obtuvo por fraccionamiento bioguiado, una fracción polar **F6** rica en compuestos bioactivos. Sobre esta fracción activa se determinó la composición química presuntiva por HPLC-DAD lo que orientó su composición hacia la familia de los flavonoides. A partir de esta información, se trabajó con espectrometría de masa de alta resolución para dilucidar la identidad de los componentes mayoritarios de por UHPLC-MS.

Debe destacarse que esta es la primera vez que fue posible relacionar la actividad antiveneno de la especie *C. pareira* con la naturaleza estructural de los compuestos involucrados, logrando dilucidar en esta fracción activa la presencia de quercetina 3-*O*-soforosido [quercetina 3-*O*- $\beta$ -D-glucosil-(1,2)- $\beta$ -D-glucósido], naringenina 7-*O*- $\beta$ -D-glucósido, eriodictyol-7-*O*- $\beta$ -D-glucósido; galangina-7-glucósido y baicaleína-7-*O*-glucósido (oroxina A) (Ricciardi *et al.*, 2018).

#### 5. Referencias bibliográficas

Abubakar, M.; Sule, M.; Pateh, E.; Abdurahman, E.; Haruna, A.; Jahun, B. (2000). *In vitro* snake venom detoxifying action of the leaf extract of *Guiera senegalensis*. *Journal of Ethnopharmacology*, 69, 253-257.

- Adams, R. (2001). Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography / Quadrupole Mass Spectroscopy. *Allured: Carol Stream, IL*.
- Agrawal, A., Siddiqui, I.R., Singh, J. (1989). Coumarins from the roots of *Feronia limonia*. *Phytochemistry*, 28, 1229-1231.
- Aguirre-Galvis, L. (1988) Mass spectra of alkaloids from *Cissampelos pareira* L. *Acta Biológica Colombiana*, 1, 17-23.
- Ahmad, R.; Arif Malik, M.; Zia-UI-Haq, M. (1992). Alkaloids of *Cissampelos pareira*. *Fitoterapia*, 63, 682.
- Akunyili, D; Akubue, P. (1986). *Schumanniofoside*, the antisnake venom principle from the stem bark of *Schumanniophyton magnificum* harms. *Journal of Ethnopharmacology*, 18, 167-172.
- Alam, M. (1998). Adjuvant effects and antiserum action potentiation by a (herbal) compound 2-hydroxy-4-methoxy benzoic acid isolated from the root extract of the Indian medicinal plant sarsaparilla *Hemidesmus indicus* R. Br. *Toxicon*, 36, 1423-1431.
- Álvarez, C.; Lock de Ugaz, O. (1992). Taninos. *Revista de Química*, 1, 47-63.
- Amresh, G., Kant, R.; Rao, C. Singh, P. (2007). Chemomodulatory influence of *Cissampelos pareira* (L.) Hirsuta on gastric cancer and antioxidant system in experimental animal. *Acta Pharmaceutica Scientia*, 49, 71-83.
- Andersen, M.; Markham, K. (2006). Flavonoids. Chemistry, biochemistry and applications. Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL.
- Anwer, F.; Popli, S.; Srivastava, R.; Khare, M. (1968). Studies in medicinal plants. Part III. Protoberberine alkaloids from the roots of *Cissampelos pareira* Linn. *Experientia*, 24, 999.
- Bafna, A.; Mishra, S. (2010). Antioxidant and immunomodulatory activity of the alkaloidal fraction of *Cissampelos pareira* Linn. *Scientia Pharmaceutica*, 78, 21-31.
- Bala, M.; Kumar, S.; Pratap, K.; Verma, P.K.; Padwad, Y.; Singh, B. (2019). Bioactive isoquinoline alkaloids from *Cissampelos pareira*. *Natural Product Research*, 33, 622-627.
- Barnaba, C. (2018). Desarrollo de metodologías por UPLC-MS/Orbitrap para la caracterización de compuestos a nivel traza responsables del aroma en uvas y vinos. Tesis Doctoral. UdelaR, Uruguay.
- Barnaba, C.; Dellacassa, E.; Nicolini, G.; Nardin, T.; Malacarne, M.; Larcher, R. (2015). Identification and quantification of 56 targeted phenols in wines, spirits, and vinegars by online solid phase extraction ultrahigh performance liquid chromatography quadrupole orbitrap mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1423, 124-135.
- Barnaba, C.; Dellacassa, E.; Nicolini, G.; Nardin, T.; Malacarne, M.; Larcher, R. (2016). Free and glycosylated simple phenol profiling in Apulian Italian wines. *Food Chemistry*, 206, 260-266.
- Bhakuni, D.; Jain, S.; Chaturvedi, R. (1987). The biosynthesis of the alkaloids of *Cissampelos pareira* Linn. *Tetrahedron*, 43, 3975-3982.
- Bhatnagar, A.; Bhattacharji, S.; Roy, A.; Popli, S.; Dhar, M. (1967). Chemical examination of the roots of *Cissampelos pareira*. IV. Structure and stereochemistry of hayatin. *Journal of Organic Chemistry*, 32, 819-820.
- Bhatnagar, A.; Popli, S. (1967). Chemical examination of the roots of *Cissampelos pareira*. Part V. Structure and stereochemistry of hayatidin. *Experientia*, 23, 242-243.

- Bhattacharji, S.; Roy, A.; Dhar, M. (1962). Chemical examination of the roots of *Cissampelos pareira*. Part II – isolation & structure of hayatinin. *Journal of Scientific and Industrial Research-B*, 21, 428-433.
- Bhattacharji, S.; Sharma, V.; Dhar, M. (1952). Chemical examination of the roots of *Cissampelos pareira* Linn. *Journal of Scientific and Industrial Research-B*, 11, 81-82.
- Bhattacharji, S.; Sharma, V.; Dhar, M. (1956). Chemical examination of the roots of *Cissampelos pareira* Linn. *Journal of Scientific and Industrial Research-B*, 15, 363-368.
- Boissier, J.; Combes, G.; Pernet, R.; Dumont, C. (1965). Contributio a letude des alcaloides de quelques Menisoermacees de Madagascar: *Cissampelos pareira*, *Cyclea madagascariensis*, *Anisocyclea grandidieri* et *Spirospermum penduliflorum*. *Journal of Natural Products - Lloydia*, 28, 191-198.
- Bravo L. (1998). Polyphenol: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. *Nutrition Reviews*, 56, 317-333.
- Cartaya, O.; Reynaldo, I. (2001). Flavonoides: características químicas y aplicaciones. *Cultivos Tropicales*, 22, 5-14.
- Chattopadhyay, I.; Biswas, K.; Bandyopadhyay, U.; Banerjee, R. (2004) Turmeric and curcumin: Biological actions and medicinal applications. *Current Science*, 87, 44-53.
- Chowdury, A. (1972) Chemical investigation on *Cissampelos pareira* Linn. *Science and Culture*, 38, 358-359.
- CISN - The OMICS Revolution and Beyond – Metabolomics ([cisncancer.org](http://cisncancer.org)). Consultado marzo 2017
- Da Silva, G.; Machado, M.; Matos, F.; Braz-Filho, R. (1999). A new isoflavone isolated from *Harpalyce brasiliensis*. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 10, 438-442.
- Daduang, S.; Sattayasai, N.; Sattayasai, J.; Tophrom, P.; Thammathaworn, A.; Chaveerach, A.; Konkchaiyaphum, M. (2005) Screening of plants containing *Naja naja siamensis* cobra venom inhibitory activity using modiWed ELISA technique. *Analytical Biochemistry*, 341, 316–325.
- Dhananjaya, B.; Nataraju, A.; Rajesh, R.; Gowda, C.; Sharath, B.; Vishwanath, B.; D’Souza, C. (2006). Anticoagulant effect on *Naja naja* venom 5’ Nucleotidase: Demonstration through the use of novel specific inhibitor, vanillic acid. *Toxicon*. 48, 411-421.
- Diogo, L.; Fernandez, R.; Marcussi, S.; Menaldo, D.; Roberto, P.; Matrangulo, P.; Pereira, P.; França, S.; Giuliatti, S.; Soares, A.; Lourenço, M. (2009). Inhibition of snake venoms and phospholipases A2 by extracts from native and genetically modified *Eclipta alba*: isolation of active coumestans. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 104, 293-299.
- Dixon, R. (2001). Natural products and plant disease resistant. *Nature*, 411, 843-847.
- Dwuma-Badu, D.; Ayim, J.; Mingle, C.; Tackie, A.; Slatkin, D.; Knapp, J.; Schiff, Jr. P. (1975). Alkaloids of *Cissampelos pareira*. *Phytochemistry*, 14, 2250-2251.
- Ferreira, L.; Henriques, O.; Andreoni, A.; Vital, G.; Campos, M.; Habermehl, G.; De Moraes, V. (1992). Antivenom and biological effects of artrumerone isolated from *Curcuma longa* (Zingiberaceae). *Toxicon* 30, 1211-1218.
- Fraga, C. (2010). Plant phenolics and human health: biochemistry, nutrition, and pharmacology. *John Wiley & Sons, Inc., Hoboken*, New Jersey.

- Giner-Larza, E.; Máñez, S.; Giner-Pons, R.; Recio, M. Ríos, J. (2000). On the anti-inflammatory and anti-phospholipase A2 activity of extracts from lanostane-rich species. *Journal of Ethnopharmacology*, 73, 61-69.
- Grotewold, E. (2006). The science of flavonoids. *Springer*.
- Guerranti, R.; Aguiyi, J.; Neri, S.; Leoncini, R.; Pagani, R.; Marinello, E. (2002). Proteins from *Mucuna pruriens* and enzymes from *Echis carinatus* venom. Characterization and cross-reactions. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 17072-17078.
- Guy, C.; Kopka, J.; Moritz, T. (2008). Plant metabolomics coming of age. *Physiologia Plantarum*, 132, 113-116.
- Harborne, J.B.; Simmonds, N.W. (1964), Biochemistry of phenolic compounds, Academic Press, London.
- Haynes, L.; Hebert, E., Plimmer, J. (1966). 4"-O-methylcurine from *Cissampelos áreira* L. *Journal of the Chemical Society C: Organic*, 615-617.
- Houghton, P. (1993). *In vitro* testing of some West African and Indian plants used to treat snakebites. Médicament et nutrition: L'approche ethnopharmacologique, 2° Colloque Européen d'Ethnopharmacologie, 263-274.
- Jurgilas, P.; Neves-Ferreira, A.; Domont, G.; Moussatché, H.; Perales, J. (1999). Detection of an antithrombotic fraction in opossum (*Didelphis marsupialis*) milk that neutralizes *Bothrops jararaca* venom. *Toxicon*, 37, 167-172.
- Keurentjes, J. (2009). Genetical metabolomics: closing in on phenotypes. *Current Opinion in Plant Biology*, 12, 223-230.
- Konarev, A.; Anisimova, I.; Gavrilova, V.; Vachrusheva, T.; Konechnaya, G.; Lewis, M.; Shewry, P. (2002). Serine proteinase inhibitors in the *Compositae*: distribution, polymorphism and properties. *Phytochemistry*, 59, 279 - 291.
- Kupchan, S.; Kubota, S.; Fujita, E.; Kobayashi, S.; Block, J.; Telang, S. (1966). Tumor inhibitors. XV. The structure and configuration of cissampersine, a novel bisbenzylisoquinoline alkaloid. *Journal of the American Chemical Society*, 88, 4212-4218.
- Kupchan, S.; Patel, A.; Fujita, E. (1965). Tumor inhibitors VI. Cissampersine, new cytotoxic alkaloid from *Cissampelos pareira*. Cytotoxicity of bisbenzylisoquinoline alkaloids. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 54, 580-583.
- Kupchan, S.; Yokoyama, N.; Beal, J. (1960). Menispermaceae alkaloids. I. The alkaloids of *Cissampelos pareira* Linn and the origin of radix pareirae. *Journal of the American Pharmaceutical Association*, 49, 727-731.
- Kuster, R. (1994). Constituintes hidrofílicos de *Phyllanthus klotzschianus*. Doctoral thesis, Federal University of Rio de Janeiro.
- Liang, W. (1987). Antisnake bite action of *Picrasma quassioides*. *Bulletin of Chinese Materia Medica*, 12, 54.
- Li-Shian, S.; Oing-Chung, K.; Yao-Lung, T.; Amooru Gangaiah, D.; Tian-Dhung, W. (2004). The alkaloids and other constituents from the root and stem of *Aristolochia elegans*. *Bioorganic Medicinal Chemistry*, 12, 439-446.

- Lobo, T.; Pereañez, J.; Zapata, K.; Gutiérrez, P.; Londoño, M.; Núñez, V.; Rojano, B. (2010). Actividad inhibitoria de *Murraya paniculata* contra fosfolipasas A2 miotóxicas. *Vitae*, 17, 291-298.
- Lock, O. (1988) Investigación fitoquímica. Métodos en el estudio de productos Naturales. 1ra Edición. Pontificia Universidad Católica del Perú. *Fondo Editorial*. Lima, Perú
- Lomonte, B.; Moreno, E.; Tarkowski, A.; Hanson, L.; Maccarana, M. (1994). Neutralizing interaction between heparins and myotoxin II, a lysine 49 phospholipase A2 from *Bothrops asper* snake venom. *Journal of Biological Chemistry*, 269, 29867-29873.
- López-Sáez, J.; Pérez-Soto, J. (2009). Plantas alexitéricas: antídotos vegetales contra las picaduras de serpientes venenosas. *Nature Medicine*, 3, 17-24.
- Mc Lafferty, F.; Stauffer, D. (1991). The Wiley/NBS Registry of Mass Spectral Data. 5th Ed. Wiley, New York.
- Melo, P.; Pinheiro, D.; Ricardo, H.; Fernandes, F.; Tomaz, M.; El-Kik, C.; Strauch, M.; Da Fonseca, T.; Sifuentes, D.; Calil-Elias, S.; Buarque, C.; Brito, F.; Costa, P.; Da Silva, A. (2010). Ability of a synthetic coumestan to antagonize *Bothrops* snake venom activities. *Toxicon*, 55, 488-496.
- Moreno, J. (1993). Effect of aristolochic acid on arachidonic acid cascade and *in vivo* models of inflammation. *Immunopharmacology*, 26, 1-9.
- Morita, H.; Matsumoto, K.; Takeya, K.; Itokawa, H. (1993b). Conformation of tropolone ring in antileukemic tropoisquinoline alkaloids. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 41, 1478-1480.
- Morita, H.; Matsumoto, K.; Takeya, K.; Itokawa, H. (1993c). Azafluoranthene alkaloids from *Cissampelos pareira*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 41, 1307-1308.
- Morita, H.; Matsumoto, K.; Takeya, K.; Itokawa, H.; Iitaka, Y. (1993a). Structures and solid state tautomeric forms of two novel antileukemic tropoisquinoline alkaloids. Pareirubines A and B from *Cissampelos pareira*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 41, 1418-1422.
- Morita, H.; Takeya, K.; Itokawa, H. (1995). A novel condensed tropone-isoquinoline alkaloid, pareitropone, from *Cissampelos pareira*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 5, 597-598.
- Mors, W.; Do Nascimento, M.; Ruppelt Pereira, B.; Alvares Pereira, N. (2000). Plant natural products active against snake bite- the molecular approach. *Phytochemistry*, 55, 627-642.
- Mors, X.; Do Nascimento, M.; Parente, J.; Da Silva, M.; Melo, P.; Suarez-Kurtz, G. (1989). Neutralization of lethal and myotoxic actives of South American rattlesnake venom by extracts and constituents of the plants *Eclipta prostrata* (Asteraceae). *Toxins*, 27, 1003-1009.
- Nakagawa, M.; Nakanishi, K.; Darko, L.; Vick, J. (1982). Structures of cabenegrins A-1 and A-2, potent anti-snake venoms, *Tetrahedron Letters*, 23, 3855-3858.
- Neves-Ferreira, A.; Perales, J.; Fox, J.; Shannon, J.; Makino, D.; Garratt, R.; Domont, G. (2002). Structural and functional analyses of dm43, a snake venom metalloproteinase inhibitor from *Didelphis marsupialis* serum. *The Journal of Biological Chemistry*, 277, 13129-13137.
- Nicholson, J.K.; Lindon, J.C.; Holmes, E. (1998). Metabonomics: understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. *Xenobiotica*, 29, 1181-1189.
- Okonogi, T.; Hattori, Z.; Amagai, E. (1970). The emergency treatment of poisonous snake-bite with tannic acid solution. *Snake*, 2, 106-110.

- Ormeño, E.; Goldstein, A.; Niinemets, Ü. (2011). Extracting and trapping biogenic volatile organic compounds stored in plant species. *Trends in Analytical Chemistry*, 30, 978–989.
- Pithayanukul, P.; Laovachirasuwan, S.; Bavovada, R.; Pakmanee, N.; Suttisri, R. (2004). Anti-venom potential of butanolic extract of *Eclipta prostrata* against Malayan pit viper venom. *Journal of Ethnopharmacology*, 90, 347-352.
- Quideau, S.; Deffieux, D.; Douat-Casassus, C.; Pouységu, L. (2011). Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis *Angewandte Chemie International Edition*, 50, 586-621.
- Ramasubramanilaraja, R.; Badu, N. (2010). Antihelminthic studies and medicinal herbs – an overview. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 5, 39-47.
- Ramirez I.; Carabot, A.; Medez, P.; Carmona, J.; Jimenez, M.; Patel, A.; Crab, T.; Blunden, G.; Cary, P.; Croft, S.; Costa, M. (2003). Cissamepoflavone, a chalcone-flavone dimer from *Cissampelos pareira*. *Phytochemistry*, 64, 645-647.
- Reyes-Chilpa, R.; Jimenez-Estrada, M. (1995). Química de las plantas alexíteras. *Interciencia*, 20, 257-263.
- Ricciardi Verrastro, B.; Torres, A.; Ricciardi, G.; Teibler, P.; Maruñak, S.; Barnaba, C.; Larcher, R.; Nicolini, G.; Dellacassa, E. (2018). The effects of *Cissampelos pareira* extract on envenomation induced by *Bothrops diporus* snake venom. *J. Ethnopharmacol.*, 212, 36-42.
- Ricciardi, A. (2000). Toxicología de las especies vegetales utilizadas en la Medicina Popular. Cátedra Toxicología y Química Legal. UNNE, Corrientes-Argentina.
- Ricciardi, A. (2005). Plantas con tradición de uso como alexíteras en la medicina popular. Curso de Actualización y Perfeccionamiento para graduados. *Vegetales de importancia médica y Toxicológica. Control, Legislación y Fiscalización*, Asociación Amigos del Museo de Farmacobotánica, Buenos Aires, Argentina.
- Rijks, J.; Curvers, J.; Noy, T.; y Cramers, C. (1983). Possibilities and limitations of steam distillation-extraction as a pre-concentration technique for trace analysis of organics by capillary gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, 279, 395-407.
- Roberts, L.D.; Souza, A.L.; Gerszten, R.E.; Clish, C.B. (2012). Targeted metabolomics. *Current Protocols in Molecular Biology*. <http://dx.doi.org/10.1002/0471142727.mb3002s98>.
- Rocha, S.; Lomonte, B.; Neves-Ferreira, A.; Trugilho, M.; Junqueira-de-Azevedo, I.; Domont, G.; Gutiérrez, J.; Perales, J. (2002). Functional analysis of Dm64, an antimyotoxic protein with immunoglobulin-like structure from *Didelphis marsupialis* serum. *European Journal of Biochemistry*, 262, 6052-6062.
- Salinas, P.; Bermúdez, M. (1996). Principios activos y utilización terapéutica de las plantas tóxicas del género *Datura*. *Revista de la Facultad de Medicina, Universidad de Los Andes*, 5, 5-10.
- Scholtz, M. (1896). Ueber Bebirin. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*, 29, 2054-2058.
- Semwal, D.; Semwal, R.; Vermaak I.; Viljoen, A. (2014). From arrow poison to herbal medicinal – The ethnobotanical, phytochemical and pharmacological significance of *Cissampelos* (Menispermaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 155, 1011-1028.



- Sharma, P.; Chauhan, N.; Lal, B. (2004). Observations on the traditional phytotherapy among the inhabitants of Parvati valley in western Himalaya. India. *Journal of Ethnopharmacology*, 92, 167-176.
- Singthong, J.; Cui, S.; Ningsanond, S.; Douglas Goff, H. (2004). Structural characterization, degree of esterification and some gelling properties of Kureo Ma Noy (*Cissampelos pareira*) pectin. *Carbohydrate Polymers*, 58, 391-400.
- Singthong, J.; Ningsanond, S.; Cui, S.; Douglas Goff, H. (2005). Extraction and physicochemical characterization of Kureo Ma Noy pectin. *Food Hydrocolloids*, 19, 793-801.
- Srivastava, G. (1965). Propagation of *Cissampelos pareira* L. by root cuttings. *Science and Culture*, 21, 601-603.
- Stepp, J. (2004). The role of weeds as sources of pharmaceuticals. *Journal of ethnopharmacology*, 92, 163-166.
- Torres, A; Camargo, F; Ricciardi Verrastro, B; Ricciardi, G; Dellacassa, E. (2014) Plantas como antiveneno:  
del mito al logos. *Ediciones Universitarias. Unidad de Comunicación de la Universidad de la República (UCUR)*, Montevideo, Uruguay.
- Tsai, L.; Yang, L.; Chand, C. (1980). Inactivation of Formosan snake venom *in vivo* by aristolochic acid, the chemical component of *Aristolochia radix*. *Formosan Science*, 34, 40-45.
- Tsimidou, M. (1998) Polyphenols and quality of virgin olive oil in retrospect. *Italian Journal of Food Science*, 2, 99-116.
- Valencia-Ortiz, C. (1995). Fundamentos de Fitoquímica. *Ed. Trillas*. Distrito Federal, México.
- Vardhanabhuti, B.; Ikeda, S. (2006). Isolation and characterization of hydrocolloids from monoi (*Cissampelos pareira*) leaves. *Food Hydrocolloids*, 20, 885-891.
- Wagner, H.; Bladt, S. (2001). Plant Drug Analysis. A thin layer chromatography atlas. 2° edition. *Springer-Verlag Berlin Heidelberg*. New York.
- Wiggers, A. (1840). Ueber das Pelosin. *Justus Liebigs Annalen der Chemie*, 33, 81-92.
- Wink, M. (2010). Biochemistry of plant secondary metabolism. *Blackwell Publishing Ltd*.
- Xiao, H.; Pan, H.; Liao, K.; Yang, M.; Huang, C. (2017). Snake Venom PLA2, a Promising Target for Broad-Spectrum Antivenom Drug Development. *Hindawi BioMed Research International*. 1-10.
- Yuan, H.; Quianquian, M.; Ye, L.; Piao, G. (2016). The traditional medicine and modern medicine from natural products. *Molecules*, 21, 1-18.
- Zografos, A. (2016). From biosynthesis to total synthesis. *John Wiley & Sons, Inc.*, New Jersey.

# **CAPÍTULO 6:**

## **Conclusiones Finales**

*La ciencia nunca resuelve un problema sin crear otros 10 más.-  
George Bernard Shaw*



Los resultados obtenidos a partir del estudio de la expresión de los metabolitos secundarios de la especie autóctona *C. pareira* y la capacidad de interacción de los mismos con los componentes del veneno de *B. diporus*, permitieron contribuir al conocimiento fitoquímico, quimiotaxonómico y biológico de la especie vegetal, con importancia etnofarmacológica en la región.

Se obtuvieron **treinta y seis (36)** extractos vegetales a partir de material vegetal recolectado en dos regiones fitogeográficas diferentes: PP y LV; en los estados vegetativos de mayor actividad metabólica: otoño, primavera y verano; de los dos órganos constituyentes de la especie: raíces (R) y partes aéreas (A), y con solventes de distinta polaridad: agua, etanol 96° y hexano; de manera tal de lograr una extracción diferenciada de los posibles compuestos/familias de compuestos bioactivos presentes.

Se trabajaron dos ejes principales: **actividad biológica**, que comprendió el estudio de la actividad contra veneno (alexitérica) y la actividad antimicrobiana contra los principales agentes causales de sobreinfección de las lesiones producidas como consecuencia del accidente ofídico; y la **elucidación química estructural** de los componentes responsables de la actividad biológica; en vistas de contribuir con las bases del conocimiento necesarias para elaborar, en un futuro, un *medicamento herbario* que pueda utilizarse como coadyuvante en el tratamiento del accidente ofídico, previniendo fundamentalmente los daños locales producidos por el veneno, principal causa de morbilidad; sin pretender sustituir la suero antiofídico actualmente utilizado.

La totalidad de extractos vegetales obtenidos que fueron analizados por SDS-PAGE como técnica de tamizaje, manifestaron diferencias significativas en su actividad antiveneno que se encontró influenciada por factores edafológicos (sitio geográfico de recolección), estacionales (estado vegetativo de la especie vegetal), órgano constituyente (raíces/partes aéreas) y naturaleza del extracto preparado (polaridad del solvente de extracción utilizado).

De los resultados de la evaluación de la capacidad inhibitoria de las principales actividades del veneno, se desprenden las siguientes conclusiones:

✓ Actividad proteolítica: los **extractos etanólicos, tanto de partes aéreas como de raíces**, inhibieron esta actividad para ambas zonas geográficas de recolección, y en todos los estados vegetativos, aunque fue evidente que **los extractos de verano recolectados en PP lo fueron más**. Además, excepto el extracto acuoso de partes aéreas recolectado en verano de PP (**A1III PP**), ningún otro extracto acuoso fue capaz de inhibir la proteólisis de caseína. Respecto de los extractos hexánicos, sólo mostraron actividad

significativa aquellos provenientes del material vegetal recolectado en otoño de PP, disminuyendo su intensidad en primavera, sin distinción de órgano.

✓ Actividad hemolítica indirecta: sólo los **extractos etanólicos de partes aéreas recolectados de PP en primavera y verano** resultaron ser capaces de inhibir significativamente esta actividad (más activos en primavera), resultando esta inhibición dependiente de la relación veneno-extracto utilizada.

✓ Actividad coagulante: **los extractos etanólicos de partes aéreas** fueron los más activos, y particularmente aquellos obtenidos a partir del material vegetal recolectado en **PP en verano**.

En resumen, la actividad alexitérica de la especie fue ampliamente influenciada por los factores considerados, por lo que resultaría particularmente interesante estandarizar el sitio y el momento más apropiado de recolección, así como también el tipo de extracto a preparar para maximizar el rendimiento y optimizar la extracción de los componentes bioactivos. Así, las **partes aéreas recolectadas en PP** resultaron más activas que las recolectadas en LV. Sin embargo, las raíces fueron más activas en ésta última localidad. Con relación al estado vegetativo de la especie, cuando los ejemplares fueron encontrados en etapa de floración (**verano**), **los extractos de partes aéreas fueron más activos que en primavera y otoño**; siendo, en general, y para todas las variables ensayadas, los extractos **etanólicos** más activos que los acuosos y hexánicos.

Por otra parte, se evaluó la actividad antimicrobiana de la totalidad de los extractos vegetales obtenidos utilizando la bioautografía directa como herramienta, manifestándose **actividad únicamente contra *S. aureus* ATCC 25923**, siendo además, esta actividad influenciada por el sitio geográfico de recolección: **los extractos de PP fueron más activos que los de LV**, observándose que, por ejemplo, en verano ninguno de los extractos de LV resultó activo. Además, las raíces presentaron actividad antimicrobiana para éste sitio. Con relación a los extractos obtenidos del material recolectado en PP, además de las raíces, **las partes aéreas etanólicas de primavera y verano** inhibieron el desarrollo del microorganismo. La diferencia en la actividad antimicrobiana manifestada por los extractos ensayados puede deberse a la gran diversidad de factores que afectan el desarrollo de esta actividad biológica: características genéticas de la especie, factores medioambientales de tipo climáticos (temperatura y humedad), características del suelo, edad y desarrollo de la planta. La importancia de este hallazgo radica en el hecho que en la actualidad existe una creciente resistencia de los microorganismos a los antibióticos comúnmente utilizados para tratar este tipo de infecciones, por lo que para la industria

farmacéutica es relevante trabajar en el eventual desarrollo de nuevos *medicamentos herbarios* que constituyan un tratamiento alternativo y efectivo para estas complicaciones locales.

Con esta batería de ensayos, se seleccionaron los **extractos etanólicos de partes aéreas** obtenidos del material vegetal **recolectado en PP**, más específicamente los de **primavera (A2II PP)** y **verano (A2III PP)**, como los más activos de la especie vegetal, continuando el trabajo con **A2III PP**.

Se obtuvieron **seis (6) fracciones** por cromatografía flash en columna, resultando las más polares **4, 5 y 6** enriquecidas en los componentes alexitéricamente activos, logrando el máximo de actividad contra veneno, tanto por SDS-PAGE, como en su capacidad inhibitoria de las actividades *in vitro* del veneno (proteolítica, hemolítica indirecta y coagulante). Además, tanto **A2III PP** como **F6** fueron capaces de inhibir la actividad fibrinogenolítica del veneno. Sin embargo, ninguna de estas fracciones fue enriquecida en componentes antimicrobianos, ya que fueron incapaces de inhibir el desarrollo de *S. aureus* por bioautografía directa. La actividad antimicrobiana manifestada por el extracto entero **A2III PP** podría ser resultado de un sinergismo entre componentes que, al separarse en las fracciones, ya no manifiestan actividad.

La etapa de pruebas *in vitro* se concluyó con un ensayo de citotoxicidad de la fracción polar **F6** en cultivo de mioblastos murinos C2C12, **no resultando la misma citotóxica**, aún a grandes concentraciones (800 µg/mL) **y siendo capaz de inhibir el 100% de la citotoxicidad producida por el veneno** a una concentración de 300 µg/mL. Estos resultados permitieron tener toda la información necesaria para proceder a realizar ensayos *in vivo*, conforme lo establecido por las normas internacionales de ensayos con animales de experimentación.

Se verificó así que **5 mg** del extracto entero **A2III PP** y la misma cantidad de fracción activa **F6**, protegieron en un **100%** a los ratones de cepa *Balb-c* de 4DL50 del veneno, mientras que **3 mg** de **F6** protegieron sólo en un **75%**. Además, esto confirmó que tanto **A2III PP** como **F6**, a ninguna de las concentraciones ensayadas (**5mg** y **3mg**), manifestaron toxicidad aguda.

Con los datos obtenidos y para finalizar el trabajo, se elaboró un *medicamento herbario* de aplicación tópica con **F6** como principio activo, con consistencia de gel termosensible: a temperatura ambiente su estado es líquido facilitando su aplicación y a 37°C gelifica, favoreciendo la permanencia y permeación en el sitio de la lesión. La efectividad del gel se evaluó en ratones de cepa *Balb-c* pudiendo observarse que aquellos

ratones tratados con el gel, independientemente de la vía de inyección (ID o SD), presentaron una mejor evolución de la lesión producida por el veneno, ya que impresionó un aceleramiento en la cicatrización, favoreciendo la eliminación del tejido necrótico por desprendimiento y observándose por debajo, tejido revitalizado evidenciado por bordes hemorrágicos, comparados con aquellos ratones no tratados con el gel; aunque según al análisis histológico de los cortes obtenidos, la protección resultó mayor cuando la vía de inyección fue ID. Esto podría representar un desafío para la farmacotecnia que deberá profundizar en estudios farmacocinéticos y farmacodinámicos de la formulación en vistas de mejorar la permeación de los principios activos del preparado, de modo de lograr una protección mayor en las zonas más profundas.

Respecto de la caracterización de la química volátil de la especie, se ha determinado por primera vez la composición de los extractos volátiles, más específicamente de aquellos obtenidos a partir del material vegetal recolectado en PP en verano, ya que fue la región y estación con mayor actividad biológica; encontrándose una predominancia tanto en partes aéreas como en raíces de hidrocarburos monoterpénicos ( $\alpha$ -pineno;  $\beta$ -pineno;  $\beta$ -mirceno y limoneno), y además, en raíces, gran proporción de ácidos grasos (ácido esteárico y linoleico) ausentes en partes aéreas.

Finalmente, con relación a los componentes no volátiles, se logró determinar la composición química presuntiva de la fracción polar purificada en compuestos alexitéricamente bioactivos **F6** por HPLC-DAD, que orientó su composición hacia **compuestos polihidroxilados: flavonoides**. Con esta información, se trabajó con espectrometría de masa de alta resolución para dilucidar la identidad de los componentes de por UHPLC-MS. Esta fue la primera vez que resultó posible relacionar la actividad antiveneno (alexitérica) de la especie *C. pareira* con la naturaleza estructural de los compuestos involucrados, logrando dilucidar en esta fracción la presencia de **quercetina 3-O-soforosido [quercetina 3-O- $\beta$ -D-glucosil-(1,2)- $\beta$ -D-glucósido], naringenina 7-O- $\beta$ -D-glucósido, eriodictyol-7-O- $\beta$ -D-glucósido; galangina-7-glucósido y baicaleína-7-O-glucósido (oroxina A).**

Resulta importante destacar que este trabajo de tesis tiene una gran importancia ya que es el primero que valida científicamente el uso etnobotánico como antiveneno de la especie *C. pareira* frente al veneno de *B. diporus*. Todos los estudios existentes al respecto se han realizado con ejemplares de *C. pareira* de otras regiones del mundo y frente a otras especies de *Bothrops*, distintas a *diporus*. Además, es la primera vez que se

ensaya la inhibición de la citotoxicidad del veneno de *B. diporus* por extractos de la especie vegetal pudiendo poner a punto la técnica para realizarlo y la primera vez que se elabora un gel de aplicación tópica a partir de un producto natural ensayado en modelo animal con el objetivo de inhibir la acción del veneno de yarará chica. Por lo tanto, aun cuando este trabajo constituye el inicio de una larga investigación de carácter farmacológica/farmacotécnica que lo excede, sienta las bases de conocimiento para contribuir al tratamiento complementario del accidente ofídico, una problemática de salud pública principalmente en áreas rurales y lejanas a centros asistenciales. La elaboración de un producto que permita contener los daños locales producidos por el veneno hasta lograr la aplicación del suero hiperinmune sería de una utilidad invalorable para la sociedad.



