

>> PRACTICA ELECTIVA 2023

AISLAMIENTO DE BIOACTIVOS COMO ALEXITÉRICOS A PARTIR DEL LÁTEX DE CROTON URUCURANA "SANGRE DE DRAGO"

ALUMNO: CHACON FACUNDO

DIRECTORA: DRA. TORRES ANA MARÍA

CO-DIRECTOR: DR. OJEDA GONZALO



Aislamiento de bioactivos como alexitéricos a partir del látex de *Croton urucurana* “sangre de drago”

OBJETIVOS

Generales:

Promover el desarrollo de competencias en técnicas analíticas para la determinación de propiedades biológicas de productos naturales

Particulares:

- Aislar componentes bioactivos del latex de *C. urucurana* mediante fraccionamiento bioguiado en columna flash
- Realizar un screening de actividad alexitérica por SDS-PAGE contra veneno de *Bothrops diporus* “yarára chica”
- Analizar en el extracto activo, la capacidad de inhibir las actividades hemolítica indirecta, coagulante y proteolítica del veneno de yarára
- Profundizar conocimientos sobre los fundamentos de técnicas como electroforesis SDS-PAGE, determinación de tiempo de coagulación (método semiautomatizado) y de hemolisis (placas de agar sangre fosfatidilcolina)
- Promover el manejo y la interpretación con criterio científico de los datos obtenidos.

1. INTRODUCCION

Desde tiempos remotos el hombre ha utilizado las plantas con fines medicinales. En la actualidad el uso de plantas medicinales se ha afianzado en aquellos países de menor grado de industrialización y economía en desarrollo, donde el acceso a los medicamentos en ocasiones constituye un bien al alcance de pocos. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), cerca del 75% de la población mundial depende casi exclusivamente del uso de las plantas para el cuidado de la salud. En virtud de ello, dicho organismo ha instado a los diferentes gobiernos del mundo a reconocer y validar aquellas prácticas tradicionales para poder ofrecer alternativas terapéuticas a los sectores más desprotegidos y carenciados, que constituyen los denominados grupos de riesgo sanitario (Desmarchelier, 2012).

El envenenamiento resultante de mordeduras de serpientes es un problema de salud pública en muchas regiones, particularmente en los países tropicales y subtropicales, es por ello que la OMS ha declarado al accidente ofídico como una enfermedad tropical desatendida (ETD) en 2017. Aunque varios laboratorios de todos los continentes producen antidotos, la carga del envenenamiento por mordedura de serpiente, que causa tanto morbilidad como mortalidad, todavía tiene un gran impacto en la población y en los sistemas de atención de salud, especialmente en África, Asia, Oceanía y América Latina. (Gutiérrez et al., 2006).

Los accidentes ofídicos son una urgencia médica, frecuente en algunas zonas del país. Según datos del Sistema Nacional de Vigilancia de la Salud - SNVS, fueron notificados 4385 casos en el período de 2007 a 2012 (promedio de 730 casos/año), siendo en su gran mayoría producidos por víboras del género *Bothrops* (“yarára”), en menor número (menos del 3%) por víboras del género *Crotalus* (“cascabel”), y en un porcentaje minoritario por serpientes del género *Micrurus* (“coral”).

Si bien se registran casos en todo el país, la mayoría son notificados por las provincias del Nordeste y Noroeste (Fig.1), durante la temporada de verano. Los envenenamientos se producen en todos los grupos etarios, pero el 20% de las notificaciones corresponden a envenenamientos en adolescentes (15 a 24 años) con franco predominio del sexo masculino (mayor al 66%) (Haas et al., 2014).

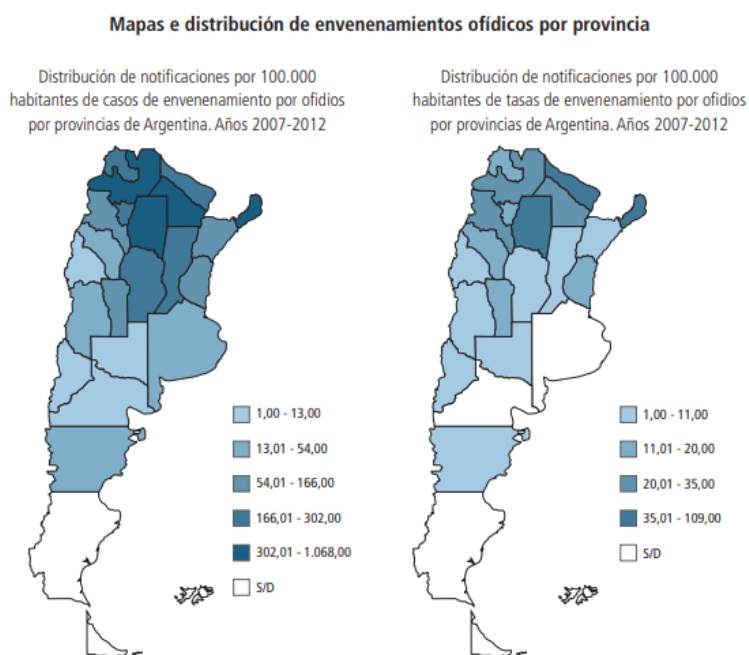


Figura 1. GUIA DE PREVENCION, DIAGNOSTICO, TRATAMIENTO Y VIGILANCIA EPIDEMIOLOGICA DE LOS ENVENENAMIENTOS OFIDICOS Edición 2014-Ministerio de Salud

Hasta el momento, el único tratamiento médico aprobado por la OMS ante un accidente ofídico es la administración de suero antiveneno heterólogo obtenido por inmunización en caballos, el cual no está exento de riesgos (shock anafiláctico, hipertermia, enfermedad del suero, etc.), necesita condiciones de mantenimiento adecuadas, administración por parte de personal idóneo, etc. Por otra parte, hay que tener en cuenta que este tratamiento tiene baja efectividad sobre las acciones locales producidas por el veneno inmediatamente luego de la mordedura (dolor, edema, hemorragia local y necrosis). Si se tiene en cuenta que los accidentes por mordedura de serpientes son un grave problema de Salud Pública, con mayor incidencia en zonas rurales donde buena parte de la población frecuentemente se encuentra alejada de centros asistenciales, es evidente el interés en el estudio de las plantas alexíteras (antiveneno), ya que constituyen la primera línea utilizada por la población hasta la aplicación del tratamiento específico como recurso terapéutico para neutralizar el veneno o mitigar los síntomas locales de envenenamiento (dolor, sangrado, inflamación e infección) (Torres et al., 2014).

En este sentido existen múltiples especies vegetales con amplia tradición de uso en la etnomedicina sudamericana, dentro de las cuales *Croton leichleri* “sangre de drago” es particularmente importante, sin embargo, en nuestra región, la especie nativa es *Croton urucurana* Baill, utilizada en la etnomedicina (Salatino et al, 2007). La goma ha sido utilizada por vía oral para tratar disentería y cáncer, vía tópica como cicatrizante (Milo et al., 2002). El látex, sangre de drago,

es antidiarreico (Gurgel et al., 2001), analgésico (Rao et al., 2007), antibacteriano (Oliveira et al., 2008), antifúngico (Gurgel et al., 2005), antiviral (Konz et al., 2006), inhibidor de acetilcolinesterasa (Salles Trevisan et al., 2003), posee toxicidad durante el embarazo (Moraes Souza et al., 2017) y el péptido cíclico aislado [1–9-NaC]-crouorb A1 es antitumoral (Cândido-Bacania et al., 2015, 2017). El extracto metanólico de la corteza es analgésico (Peres et al., 1998), gastroprotector (Cordeiro et al., 2012); antiedematogénico (Cordeiro et al., 2016), antimicrobiano (Barbieri et al., 2014, Peres et al., 1997) e insecticida (Silva et al., 2009). El extracto etanólico de la corteza es cicatrizante (Casao et al., 2020) y el de hojas es hipolipemiente, protector renal y cardíaco (Zago et al., 2021). El extracto acuoso de hojas inhibe la actividad hemorrágica del veneno de *Bothrops jararaca* (Esmeraldino et al., 2005). La química de *Croton* incluye diterpenos como clerodanos (Pizzolatti et al., 2013), alcaloides, proantocianidinas, fenilbutanoides, flavonoides y fenoles (Salatino et al., 2007; Oliani et al., 2021; Lopes Alves et al., 2020), N-alcanos y alcoholes primarios (Silvestroni Pimentel et al., 2020). Posee aceites esenciales activos como anticancerígenos (Simionatto et al., 2007; 2009; Turiel et al., 2013).

***Croton urucurana* Baill.** Se trata de un árbol nativo sudamericano perteneciente a la familia *Euphorbiaceae* de porte pequeño a mediano cuya altura ronda los 4 a 10 metros, con un diámetro del tronco aproximado de 0,4 m. La corteza es fina de color castaño grisáceo, que al ser herida exuda un látex color rojizo (Figura 2-A). Follaje verde claro de hojas simples, alternas, cordadas y de bordes lisos (Figura 2-B). Flores blanquecinas en espiga. La especie prefiere suelos húmedos, es frecuente encontrarla en inmediaciones de cursos de agua. En cuanto a su distribución, se encuentra en países vecinos como Brasil, Paraguay y Uruguay. En nuestro país se halla frecuentando cursos de aguas de las provincias del NEA (Corrientes, Chaco, Misiones, Entre Ríos, Formosa y Santa Fe) (Figura 3).



Figura 2. A) Látex exudado por la corteza. B) Follaje de *Croton Urucurana* Baill. Instituto Botánica Darwinion-CONICET.

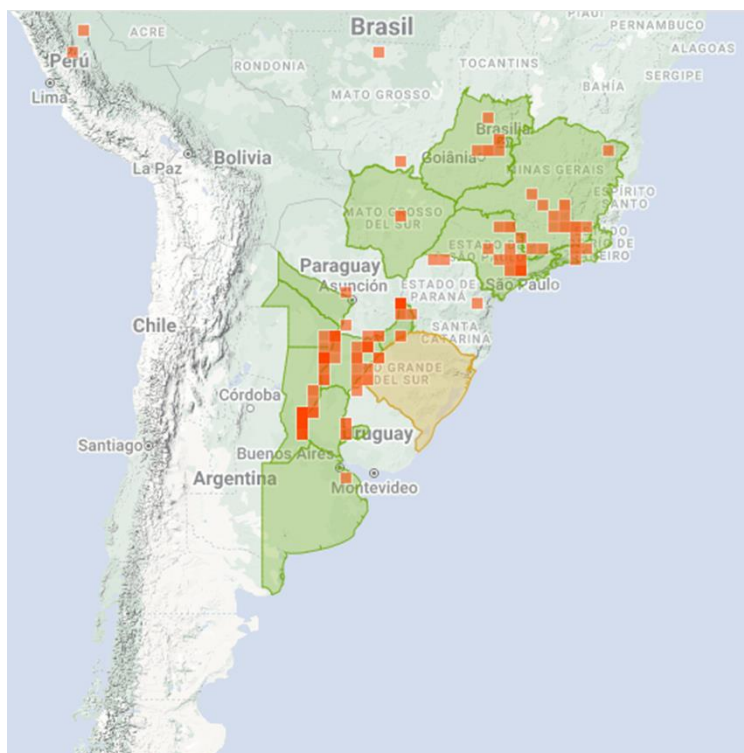


Figura 3. Distribución de *Croton urucurana* Baill. <https://mexico.inaturalist.org/>

Confome a lo expuesto, este trabajo está dirigido al aislamiento de componentes bioactivos de *Croton urucurana* Baill mediante fraccionamiento bioguiado en columna flash a partir del látex y posterior evaluación de la actividad biológica mediante pruebas *in vitro* de las fracciones activas.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Material Vegetal

El látex se obtuvo mediante cortes de la corteza de *C. urucurana*. Se eliminaron las impurezas por filtración y se desecó al vacío en rotavapor Büchi.

2.2. Veneno

Se acondicionaron los venenos de ofidios obtenidos por expresión manual (ordeño) a partir de varios ejemplares de *Bothrops diporus* por personal idóneo de la Dirección de Fauna de Corrientes. Se desecaron a presión reducida y se conservó a -20 °C.

2.3. Fraccionamiento bioguiado en columna Flash

El fraccionamiento bioguiado se realizó en columna flash de sílica gel utilizando como eluyente una serie elutrópica de polaridad creciente. El fraccionamiento bioaguiado en columna flash consiste en una técnica que permite la separación de grupos de compuestos de diferente polaridad pertenecientes a una mezcla compleja, proporcionando presión a través de una bomba de aire que somete a los solventes al paso por la columna. La función de la sílica gel en el fraccionamiento es aumentar la superficie de contacto entre el eluyente y la muestra con el fin de lograr la mejor separación posible de los compuestos.

La serie elutrópica de polaridad creciente que se utilizó fue la siguiente:

	Solvente	
1	Hexano (100 ml)	<p>Menor polaridad</p>  <p>Mayor polaridad</p>
2	Hexano (50 ml) + Acetato de Etilo (50 ml)	
3	Acetato de Etilo (100 ml)	
4	Acetato de Etilo (80 ml) + Metanol (20 ml)	
5	Acetato de Etilo (50 ml) + Metanol (50 ml)	
6	Acetato de Etilo (20 ml) + Metanol (80 ml)	
7	Metanol (100 ml)	
8	Metanol (50 ml) + Ácido Acético (50 ml)	
9	Metanol (20 ml) + Ácido Acético (80 ml)	
10	Ácido Acético (25 ml)	
11	Ácido Fórmico	

Tabla 1. Solventes y volúmenes utilizados en el fraccionamiento bioguiado en columna flash, ordenados de menor a mayor polaridad.

Preparación de la muestra: La muestra a fraccionar se preparó disolviendo en metanol, 500 mg de látex de *C. urucurana* desecado (material vegetal). Posteriormente la solución se mezcló con un poco de sílica gel común para aumentar la superficie de contacto. Después se procedió con la evaporación a presión reducida hasta sequedad, en rotavapor.

Armado de la columna: Se preparó una columna de 24x400 mm con robinete de teflón y tapón esmerilado. En el extremo inferior de la columna se agregó una pequeña cantidad de algodón para contener el relleno de la misma y evitar contaminación en los tubos de recolección. Por encima del algodón se agregó arena, para que el frente de solvente eluya de la columna en forma homogénea. Se colocó por encima del algodón y la arena, 50 g de Sílica gel FLASH (Sílica gel flash 60 0,04-0,063 mm, MN) en hexano. Luego se agregó la muestra acondicionada y sobre esta se agregó una pequeña cantidad de algodón, de tal manera que al agregar los diferentes eluyentes estos tengan un contacto homogéneo con la misma, e ingresen a la columna de manera uniforme.



Figura 4: Esquema de la columna de fraccionamiento

Las fracciones fueron recolectadas en tubos de vidrios numerados del 1 al 120.

2.4. Cromatografía en capa delgada (TLC)

La cromatografía de capa delgada (TLC, thin-layer chromatography) permite un análisis cualitativo de los componentes de una muestra.

Se evaluaron diferentes sistemas de separación utilizando como muestra al látex entero, disuelto en distintos solventes. El sistema que mejor resultado proporcionó fue Acetato de etilo-Ácido acético glacial-Ácido Fórmico-Agua (100:11:11:26) (Santos, 2013). Una vez identificado el mejor sistema de separación, se procedió a sembrar en la placa de TLC cada uno de los tubos obtenidos en el fraccionamiento bioguiado en columna flash.

Las placas de TLC fueron evaluadas con luz UV y reactivo universal de anisaldehído sulfúrico. Los tubos que presentaron el mismo perfil cromatográfico fueron agrupados en fracciones, obteniéndose 8 fracciones que se rotavaporaron a presión reducida hasta extracto seco.

2.5 Electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)

Se utilizó la electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes como método de screening rápido para evaluar la actividad de las fracciones obtenidas sobre proteínas del veneno (Camargo et al., 2011).

Los reactivos se prepararon según la técnica de Pilosof & Bartholomai, (2000). Gel de separación al 12% y gel de stacking al 4%. Se utilizaron patrones de bajo peso molecular (Bio-rad) preparados según indicaciones del fabricante.

Cada una de las fracciones, el látex entero y los controles negativos de solventes fueron incubados con veneno (30 minutos a 37 °C) y luego sembradas en las calles del gel. También se sembró veneno (patrón) para determinar el perfil proteico de referencia, y patrones de peso molecular para estimar el PM de cada proteína presente en el veneno. Se procedió a realizar la electroforesis.

Aquellas fracciones que modificaron el patrón de las proteínas del veneno en la electroforesis (desaparición de bandas o aparición de nuevas bandas a diferente PM) fueron consideradas activas.

Esquema de preparación de controles negativo de solventes (solvente + veneno):

Solvente + Veneno		
Solvente	Solvente	Solución de veneno
	15 µL	-
Solución Veneno: 2 mg Veneno /80 µL Solución Fisiológica (SF)	-	10 µL
	Mezclar ambos	
1era Incubación	30 minutos a 37 °C	
Buffer Muestra	25 µL	
2-Mercaptoetanol	2,5 µL	
2da Incubación	5 minutos 100 °C	
Siembra	3,5 µL	

Esquema de preparación de patrones de veneno y látex entero:

	Veneno patrón	Látex patrón
Veneno	1 mg	-
Látex entero	-	1,2 mg
Buffer Muestra	300 μ L	50 μ L
2-Mercaptoetanol	15 μ L	2,5 μ L
Incubación	5 minutos 100 °C	
Siembra	5 μ L	

Esquema de preparación del extracto + veneno (1:7)

Veneno + Extracto (1:7)		
	Solución de Látex/fracción	Solución de veneno
Látex entero/fracción	1,8 mg	-
Solvente Dimetilsulfóxido (DMSO)	15 μ L	-
Solución Veneno (2 mg Veneno /80 μL SF)	-	10 μ L
Mezclar ambas soluciones		
1era Incubación	30 minutos a 37 °C	
Buffer Muestra	25 μ L	
2-Mercaptoetanol	2,5 μ L	
2da Incubación	5 minutos en baño maría	
Siembra	3,5 μ L	

En la primera electroforesis se sembraron las muestras de los distintos solventes + veneno, junto al patrón del veneno y los patrones de PM (Figura 5).

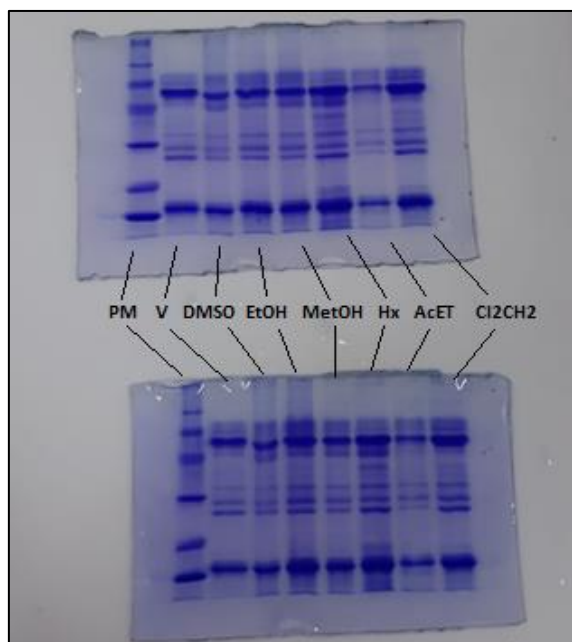


Figura 5: SDS-PAGE con diferentes solventes enfrentados al veneno. Referencias: PM (Patrón de Peso Molecular), V (Veneno patrón), DMSO (Dimetilsulfóxido), EtOH (Etanol), MetOH (Metanol), Hx (Hexano), AcET (Acetato de Etilo), Cl₂CH₂ (Diclorometano).

Ninguno de los disolventes afectó de manera importante a las proteínas del veneno. Esto nos permitió optar por el disolvente más adecuado para disolver las distintas fracciones/látex, y estar seguro de que no interfiere en la electroforesis. Se optó por DMSO para disolver las fracciones y el látex entero.

Para evaluar la actividad de las diferentes fracciones/látex contra las proteínas del veneno mediante la SDS-PAGE se realizó la siembra de los patrones de peso molecular, veneno patrón, látex patrón y del látex/fracciones disueltos en DMSO y pre incubado con veneno. Posteriormente se realizó la electroforesis.

2.6 Inhibición de la actividad hemolítica indirecta

Uno de los principales componentes del veneno del género *Bothrops* es la enzima Fosfolipasa A2 (PLA2) que desempeña una acción hemolítica indirecta en contacto con la sangre. La PLA2 es una enzima estearasa que cataliza la hidrólisis de un grupo éster a nivel del carbono 2 de un 1,2-diacil-3-glicerofosfato. De esta manera, al actuar sobre la lecitina (fosfatidilcolina), hidroliza el ácido graso presente en posición 2, dando a lugar a la formación de lisolecitina, la cual presenta una acción detergente sobre la bicapa fosfolipídica del glóbulo rojo logrando la destrucción de la membrana celular y por ende la hemólisis.

La técnica se basa en la difusión del veneno en placas de agar sangre-fosfatidil colina (Gutiérrez et al, 1988; Otero et al, 2000). La placa se prepara utilizando un agar base (Mueller Hinton, Columbia, etc.), se adiciona yema de huevo para proporcionar las lecitinas, glóbulos rojos lavados y además se agrega azida para evitar el crecimiento de microorganismo que puedan interferir con la interpretación de los resultados. Al inocular en esta placa una cierta cantidad del veneno, la PLA2 presente en el mismo actuará sobre la lecitina proporcionada por la yema de huevo, dando como producto la lisolecitina, quien actuará sobre los glóbulos rojos presentes, lisándolos. Este fenómeno se visualizará en la placa con la formación de un halo alrededor de la siembra. Para evaluar la capacidad de inhibición de hemólisis de las fracciones se pre-incuba veneno y fracción en proporción 1:25 luego se siembra la mezcla. Si alguna de las fracciones obtenidas tiene la capacidad de inhibir la actividad hemolítica indirecta del veneno, se observará una disminución del diámetro del halo respecto a la generada por el veneno sólo.

En primer lugar, se determinó la Dosis Hemolítica Mínima (DHM), definiéndose como la concentración de veneno que logra un halo aproximadamente de 10 mm luego de una siembra de 10 µL y una incubación de 20 horas a 37 °C. Para ello se sembraron diferentes concentraciones del veneno y se incubó en las condiciones mencionadas.

Se disolvieron las 8 fracciones en metanol puro, luego se las enfrentó a la solución de veneno (DHM), se pre-incubaron durante 30 minutos a 37 °C y se procedió a la siembra, de acuerdo al siguiente esquema:

Fracciones	Látex	1	2	3	4	5	6	7	8
	1 mg	1 mg	1mg	1 mg	1 mg	1 mg	1 mg	1 mg	1 mg
Metanol	40 µL								
Veneno (DHM)	1000 µL								

Pre incubación	30 min a 37 °C en baño
	Siembra 10 uL

El ensayo se realizó por triplicado.

Se ensayaron además, patrones como látex y solventes, para observar si producían *per se* hemólisis en estas condiciones.

Se midieron los halos obtenidos luego de la incubación y con dichos resultados se calculó el *porcentaje de inhibición de la actividad hemolítica indirecta* de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$100 - \frac{H_f \times 100}{H_v}$$

Donde H_f corresponde al halo (en mm) de la mezcla veneno + fracción y H_v corresponde al halo (en mm) del veneno.

2.7 Neutralización de la actividad coagulante del veneno

Otro de los componentes importantes del veneno de *Bothrops* son enzimas con actividad trombin-like. Estas son las responsables de las alteraciones de la hemostasia en personas o animales que sufrieron un accidente bothrópico. Esta enzima participa en la activación de la coagulación ya que desdobra el fibrinógeno transformándolo en fibrina. Es importante tener en cuenta que en los ensayos *in vitro* la acción del veneno es pro-coagulante, sin embargo *in vivo* se comporta manifestando (además de un síndrome doloroso) un síndrome hematológico el cual evidencia alteraciones sistémicas en la coagulación, con alteraciones en el tiempo de coagulación y el tiempo de protrombina, y en la mitad de los casos con la aparición de un cuadro clínico hemorrágico como gingivorragia, equimosis, hematuria etc. que se explican como respuesta al consumo de fibrinógeno o en mayor medida de otros factores de la coagulación como la protrombina (Silva Haad, 1980).

Para determinar la capacidad de neutralización de la actividad coagulante del veneno por parte del látex/fracciones, se determinaron tiempos de coagulación (TC). En primera instancia se requiere conocer el tiempo de coagulación del plasma citratado pobre en plaquetas, enfrentado al veneno (TCV), que representa el tiempo que tarda en formarse el coagulo de fibrina cuando el plasma es expuesto al veneno. Para ello, se determinó el TC enfrentando plasma citratado a una solución que contiene solo el veneno. Para determinar la capacidad de neutralización por parte de las fracciones, se determinaron los TC enfrentando el veneno pre-incubado con las fracciones y el plasma citratado. Los tiempos de coagulación se determinaron utilizando un coagulómetro Col1 (Wiener).

En caso de que alguna fracción sea capaz de neutralizar la actividad coagulante, se observará una prolongación en el tiempo de coagulación respecto del TCV. Por ende, el grado de inhibición de la actividad pro-coagulante será proporcional al tiempo de coagulación obtenido (a mayor TC mayor inhibición de la coagulación). Por último, teniendo en cuenta los valores obtenidos, se calculó el porcentaje de inhibición de la actividad coagulante mediante la siguiente ecuación:

$$\frac{(TCi - TCV) \times 100}{(500 - TCV)}$$

Donde TCV representa el tiempo de coagulación del plasma citratado enfrentado al veneno y TC_i representa el tiempo de coagulación del plasma citratado enfrentado a cada fracción/látex pre-incubado con el veneno. El término “500” representa el tiempo de coagulación (en segundos) para el cual se consideró un porcentaje de inhibición de la coagulación del 100% como tiempo de corte.

La solución de veneno utilizada corresponde a la Dosis Coagulante Mínima (DCM) que se define como la dosis de veneno capaz de lograr un TC de 60 segundos.

El plasma citratado se obtuvo a partir de la centrifugación de sangre venosa entera anti-coagulada con citrato de sodio 3,8% (relación 9+1).

Las muestras de látex/fracciones se prepararon disolviendo 1 mg de cada una en 40 µL de metanol puro.

El esquema de la técnica realizada fue el siguiente:

Para obtener el TCV: Se mezclaron 100 µL de solución de veneno (DCM) + 100 µL de plasma citratado. Se determinó el tiempo de coagulación.

Para obtener los tiempos de coagulación del plasma + veneno + látex/fracción se realizó lo siguiente:

	Látex	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8
	1 mg	1 mg	1 mg	1mg	1 mg	1 mg	1 mg	1 mg	1 mg
Metanol	40 µL								
Veneno (DCM)	1000 µL								
	Incubar 30 min 37 °C								
Alícuota	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL
Plasma citratado	100 µL								
	Determinar el TC								

El ensayo se realizó por duplicado. Por último, se calculó el porcentaje de inhibición de la coagulación.

Se ensayaron patrones como látex y solventes, para observar si producían *per se* una modificación en el TC.

2.8 Inhibición de la actividad hemolítica indirecta y neutralización de la actividad coagulante del veneno para las fracciones activas. Ensayos de dilución

Los procedimientos realizados fueron los mismos que los descritos anteriormente en los puntos correspondientes (2.6 y 2.7), la diferencia es que en este caso se realizaron diluciones del látex entero y de la fracción 2, que corresponde la fracción más activa en términos de la inhibición de la actividad coagulante y actividad inhibitoria de la hemólisis indirecta (ver apartado de “Resultados”).

Evaluar diluciones del extracto nos brinda información acerca de que tan enriquecida está la fracción con el o los componentes/s biológicamente activos. Aquellas muestras que dieron 100% de actividad, fueron sometidas a diluciones para comprobar cual poseía mayor actividad.

Neutralización de la actividad coagulante: Se pesaron 3 mg de extracto (Látex y Fracción 2) y se disolvieron en 120 µL de Metanol. A partir de esta solución se realizaron diluciones seriadas: Pura, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32 (volumen final: 60 µL)

Se preparó la solución de Veneno de *Bothrops diporus*: 1 mg en 25 mL de solución fisiológica (DCM).

Se determinó el tiempo de coagulación del veneno (TCV): Se enfrentó 100 µL de solución de veneno + 100 µL de plasma, se leyó el tiempo de coagulación.

En distintos tubos Eppendorf se mezclaron 40 µL de cada solución (distintas diluciones de látex y fracción 2) + 1000 µL de la solución de veneno (DCM). Se incubó durante 30 minutos a 37 °C. Luego de la incubación, 100 µL del sobrenadante del tubo que contiene Extracto + Veneno se lo enfrentó a 100 µL de plasma citratado. Luego se leyó el tiempo de coagulación.

Inhibición de la actividad hemolítica indirecta: Se prepararon placas de agar sangre-fosfatidil colina de acuerdo a la técnica ya mencionada (punto 2.6). Se sembraron soluciones de látex y fracción 2, ambas, a distintas diluciones. Las soluciones de látex y fracción 2 que se ocuparon fueron las utilizadas en el punto anterior: 1000 µl veneno + 40 µL de solución de extracto pre-incubadas 30 minutos a 37 °C. Se sembró 10 µL de cada solución por triplicado. Luego se procedió con la incubación durante 20 horas a 37 °C en estufa. Al finalizar la incubación se midieron los halos correspondientes.

2.9 Inhibición de la actividad proteolítica

Este ensayo está dirigido a evaluar la capacidad de los extractos (fracciones/látex) de inhibir la acción proteolítica que presenta el veneno de *Bothrops diporus* sobre la proteína caseína. En la electroforesis, esta proteína presenta 3 bandas características, pero cuando es enfrentada al veneno, la acción proteolítica de este resulta en la desaparición completa de dichas bandas. Cuando un extracto presenta cierta actividad de inhibición de proteólisis, al enfrentarlo a la mezcla caseína + veneno, se visualizarán las bandas de la caseína como resultado de la neutralización de la actividad proteolítica.

Soluciones utilizadas:

Caseína: 0,1 g de leche descremada (en polvo) en 10 mL de Buffer TRIS HCl pH 8

Veneno: 1 mg de Veneno en 4 mL de Buffer TRIS HCl pH 8

Extracto: 1 mg de Extracto en 50 µL de solvente (DMSO)

Extracto patrón: 0,5 mg de Látex entero en 50 µL de solvente (DMSO)

Procedimiento:

	Extracto + Veneno
Extracto (Látex/fracción)	1 mg
DMSO	50 µL
	Disolver
Solución de veneno	50 µL
Primera Incubación	1 hora a 37 °C

trasvasar alícuota del sobrenadante a nuevos eppendorf	50 µL		
		Extracto patrón	Veneno (1/2)
Extracto patrón (0,5 mg Látex/50 µL DMSO)	-	50 µL	-
Solución de veneno	-	-	25 µL
Buffer TRIS HCL pH 8	-	-	25 µL
Solución de Caseína	50 µL	50 µL	50 µL
Segunda incubación	1 hora a 37 °C		
trasvasar alícuota del sobrenadante a nuevos eppendorf	50 µL		
			Caseína (1/2)
Solución de Caseína	-		25 µL
Buffer TRIS HCL pH 8	-		25 µL
Buffer Muestra doblemente concentrado	50 µL		
Tercera incubación	5 min. en baño a ebullición		
	Se realizó la electroforesis de las muestras		

2.10 HPLC-DAD

Se evaluó el perfil cromatográfico del extracto y de las fracciones por medio de cromatografía líquida de alta performance (HPLC). Se trabajó con un equipo HPLC Shimadzu LC-10/20 A, detector UV-Visible DAD Shimadzu SDP-20 MA y columna Hypersil ODS 250 × 4.6 mm, 5 µm. La separación se realizó con gradiente binario de ácido acético 1% (v/v) como fase A y Metanol con 1% ácido acético (v/v) como fase B. El flujo utilizado fue de 1 ml/min. El gradiente programado fue el siguiente: 0 a 10 min: 10% a 26% B; 10 a 25 min: 26% a 40% B; 25 a 45 min: 40% a 65% B; 45 a 55 min: 65% a 95% B; 55 a 58 min: 95% a 10% B; 58 a 61 min: 10% B (Zhang et al., 2008).

La separación en gradiente de polaridad consiste en variar la composición de la fase móvil (con distintas proporciones de los solventes A y B), a lo largo de la corrida, permitiendo obtener un mejor grado de separación de los analitos.

Preparación de la muestra para HPLC: Se pesó 4 mg de látex/fracción y se disolvió utilizando la siguiente mezcla de solventes: 50 µL DMSO + 450 µL de MetOH. Una vez disuelta, se realizó el filtrado de la misma utilizando un filtro de jeringa de Nylon 0,45 µm para HPLC. Finalmente se procedió con la inyección de la muestra al equipo.

3 RESULTADO Y DISCUSIÓN

3.1 Fraccionamiento bioguiado:

Durante el fraccionamiento bioguiado en columna flash, se recogió el eluido en un total de 120 tubos. El siguiente cuadro describe en que tubo se realizó el cambio de solvente durante la serie elutrópica de polaridad creciente.

Solvente	Tubos
Hexano (100 mL)	1-9
Hexano (50 mL) + Acetato de Etilo (50 mL)	10-18
Acetato de Etilo (100 mL)	19-28
Acetato de Etilo (80 mL) + Metanol (20 mL)	29-37
Acetato de Etilo (50 mL) + Metanol (50 mL)	38-45
Acetato de Etilo (20 mL) + Metanol (80 mL)	46-54
Metanol (100 mL)	55-68
Metanol (50 mL) + Ácido Acético (50 mL)	69-81
Metanol (20 mL) + Ácido Acético (80 mL)	82-94
Ácido Acético (25 mL)	95-97
Ácido Fórmico	98-120

Se procedió a descartar los primeros 9 tubos dado el volumen muerto de la columna.

3.2 TLC

Se realizó la TLC de todos los tubos recogidos (10 a 120) utilizando el sistema: Acetato de etilo-Ácido acético glacial-Ácido Fórmico-Agua (100:11:11:26) (Santos, 2013).

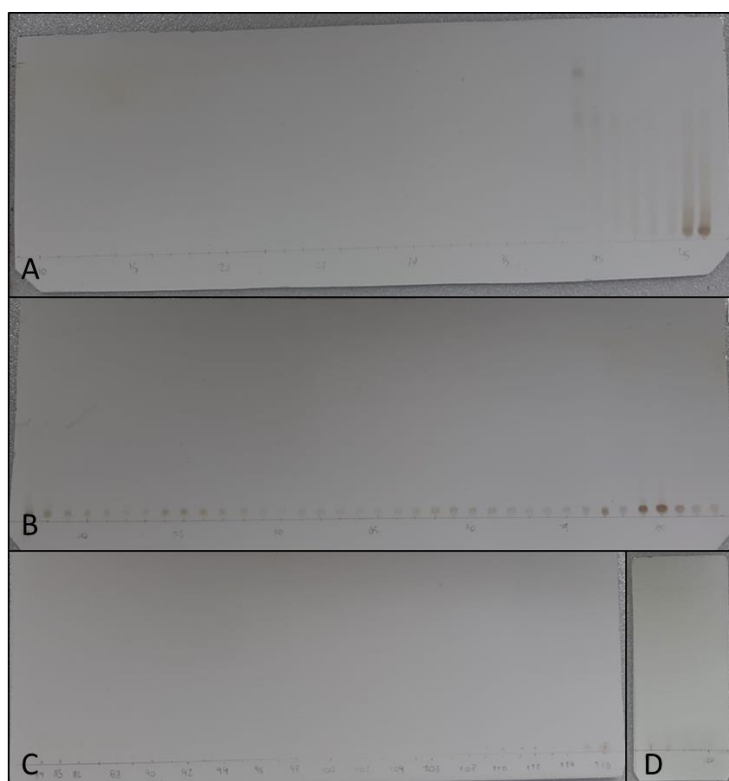


Figura 6. TLC observada sin revelador con luz natural. A) Tubos del nº 10 al nº 46. B) Tubos del nº 47 al nº 83. C) Tubos del nº 84 al 116. D) Tubos del nº 117 al nº 120.

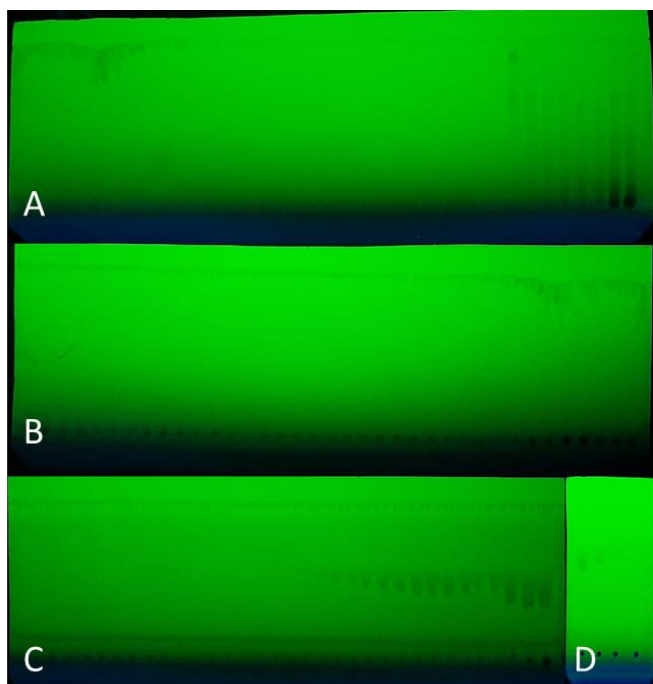


Figura 7. TLC observada con luz UV 254 nm. A) Tubos del nº 10 al nº 46. B) Tubos del nº 47 al nº 83. C) Tubos del nº 84 al 116. D) Tubos del nº 117 al nº 120.

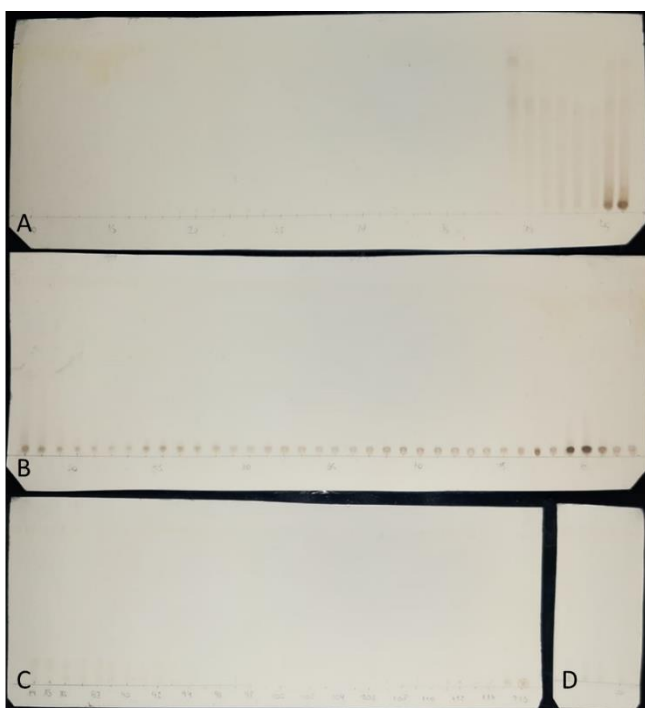


Figura 8. TLC revelada con anisaldehído sulfúrico observada con luz natural. A) Tubos del nº 10 al nº 46. B) Tubos del nº 47 al nº 83. C) Tubos del nº 84 al 116. D) Tubos del nº 117 al nº 120.

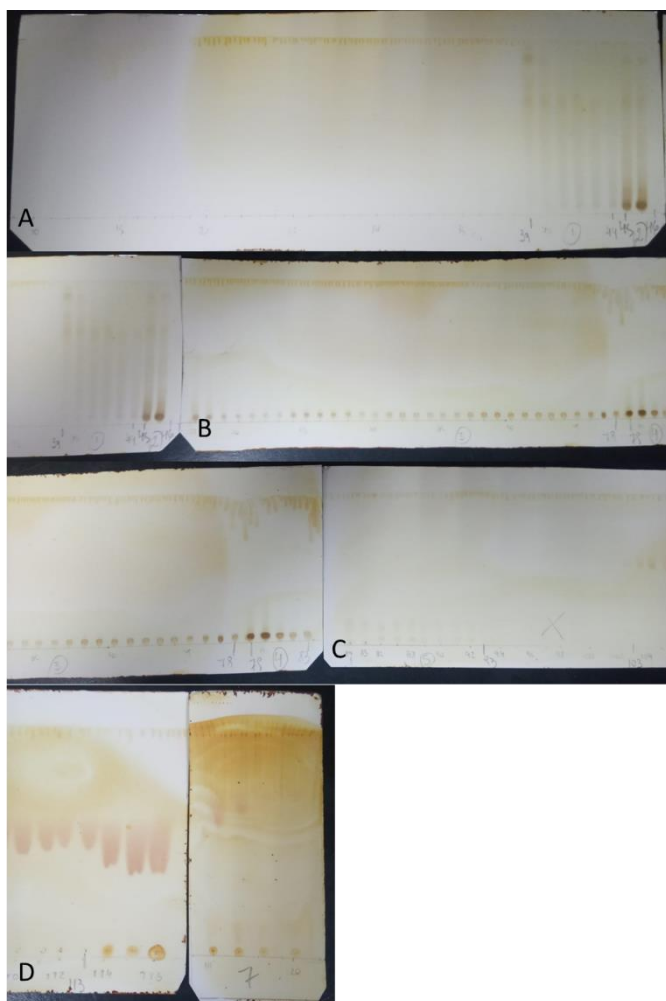


Figura 9. TLC revelada con vapores de yodo y observada con luz natural. A) Tubos del nº 10 al nº 46. B) Tubos del nº 47 al nº 83. C) Tubos del nº 84 al 109. D) Tubos del nº 110 al nº 120.

De acuerdo a lo observado en las placas de TLC se reunieron en un mismo balón (previamente pesado) aquellas fracciones que presentaban un perfil cromatográfico similar. Del total de tubos recogidos quedó reducido a 8 fracciones. Cada una de las fracciones fue secada en rotavapor al vacío. Se pesó. Por diferencia de masa se obtuvo la masa de cada fracción seca.

FRACCIÓN	Nº TUBO	MASA (mg)	%
1	39-44	72,2	7,48
2	45-46	92,1	9,55
3	47-48	202,7	21,02
4	79-83	221,6	22,97
5	84-93	187,9	19,48
6	103-113	101	10,47
7	114-116	52,8	5,47
8	117-120	34,2	3,55
Total Recolectado	-	964,5	100

Tabla 2. Masa obtenida de cada fracción y porcentaje de cada una del total recolectado.



Figura 10. Fracciones del 1 al 8.

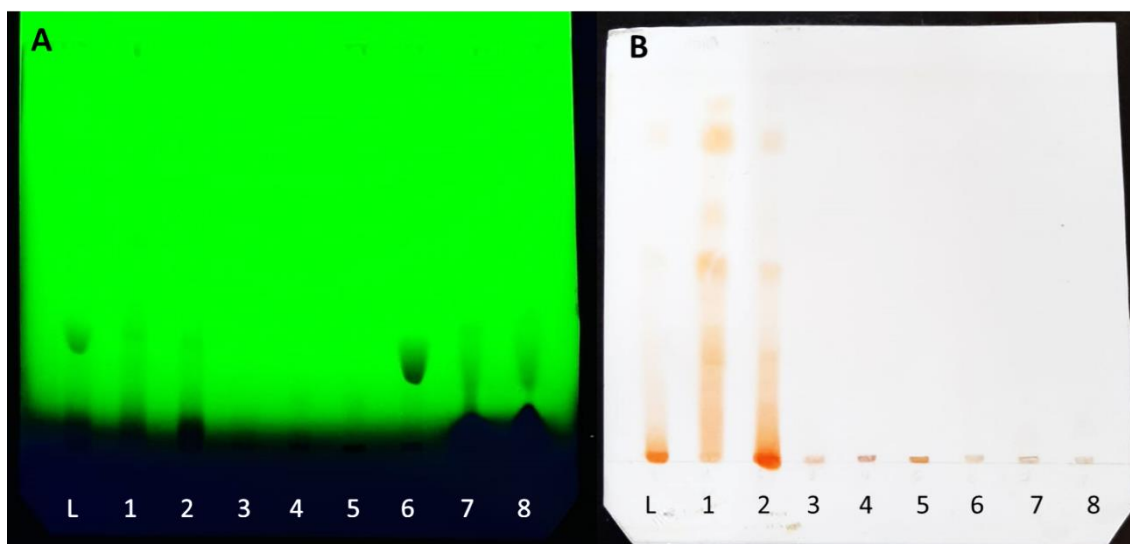


Figura 11. TLC del látex entero y fracciones 1 a 8. A) TLC observada bajo luz UV a 256 nm. B) TLC revelada con anisaldehído sulfúrico y observada en luz natural.

3.3 Electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)

Se sembraron el total de las muestras en dos geles. Los resultados fueron los siguientes (figura 12).

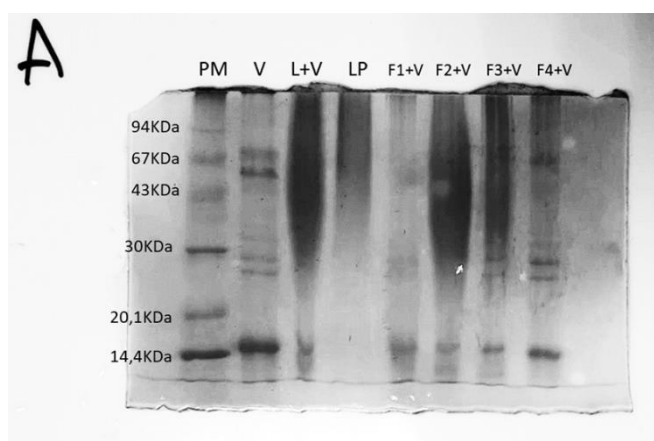


Figura 12. Resultado de SDS-PAGE del **GEL A**. Referencia de siembra: Patrón de peso molecular (PM), Veneno patrón (V), Látex entero + solución de veneno (L+V), Látex patrón (LP), Fracción 1 + solución de veneno (F1+V), Fracción 2 + solución de veneno (F2+V), Fracción 3 + solución de veneno (F3+V), Fracción 4 + solución de veneno (F4+V).



Figura 13. Resultado de SDS-PAGE del **GEL B**. Referencia de siembra: Patrón de peso molecular (PM), Veneno patrón (V), Látex entero + solución de veneno (L+V), Látex patrón (LP), Fracción 5 + solución de veneno (F5+V), Fracción 6 + solución de veneno (F6+V), Fracción 7 + solución de veneno (F7+V), Fracción 8 + solución de veneno (F8+V).

Movilidad de patrones (mm)	PM KDa	Log PM
7,7	94	1,97
13	67	1,83
19,8	43	1,63
30,7	30	1,48
43,1	20,1	1,3
50,5	14,4	1,16

Tabla 3. Movilidad de los distintos patrones en mm y su correspondiente PM en KDa. La expresión Log PM se utiliza para la representación gráfica lineal.

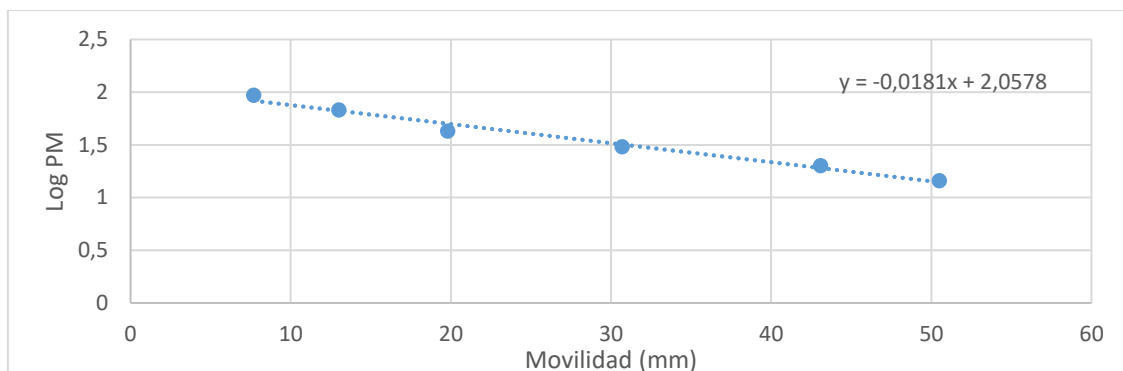


Figura 14. Gráfico Log PM vs Movilidad. Permite estimar los PM de las bandas proteicas del veneno obtenido en la electroforesis.

Movilidad del veneno (mm)	Log PM	PM (KDa)
11,6	1,848	70,5
15,6	1,775	59,6
18,5	1,722	52,7
28,5	1,542	34,8
31,8	1,482	30,3
35	1,424	26,5
49	1,171	14,8

Tabla 4. Movilidad (en mm) de las bandas proteicas del veneno patrón obtenidas en la electroforesis, y sus respectivos pesos moleculares (en KDa) obtenidos a partir de la conversión de Log PM que se calcularon con la ecuación lineal del grafico de la figura 14.

Al analizar el perfil proteico del veneno de *Bothrops diporus* se pueden visualizar 7 bandas que presentan los siguientes pesos moleculares aproximados: 70,5 KDa, 59,6 KDa, 52,7 KDa, 34,8 KDa, 30,3 KDa, 26,5 KDa y 14,8 KDa.

En la calle L+V y LP (Figura 12 y 13) se visualiza una banda continua en la primera porción del gel, que también aparecen en las calles F2+V y F3+V (Figura 12), lo cual corresponde a componentes propios del látex que se concentran en dichas fracciones. No corresponde a proteínas del veneno ya que no se la observa en la calle del veneno patrón.

En las calles F1+V, F2+V y F3+V (Figura 12) se aprecia disminución en la intensidad de la banda de 14,8 KDa, siendo de menor intensidad la correspondiente a la calle F2+V, seguida de F1+V y F3+V. Esta banda proteica de migración rápida se corresponde con las fosfolipasas presente en el veneno de *Bothrops diporus*. Además, en las calles F5+V, F6+V, F7+V y F8+V (Figura 13) no se produjo modificación evidente en la intensidad de estas bandas.

Por lo cual, podemos interpretar que existe correlación de la SDS-PAGE con los resultados obtenidos en la prueba *in vitro* de inhibición de la hemólisis indirecta, donde las más activas fueron la fracción 2 (62,1% de inhibición), fracción 1 (45,5% inhibición) y fracción 3 (28,8% de inhibición), y las menos activas corresponden a las fracciones 5 (0% de inhibición), 6 (3,7% de inhibición), 7 (3,7% de inhibición), 8 (11,1% de inhibición) y 4 (22,2% de inhibición) respectivamente.

Las bandas proteicas de 52,7 KDa y la de 30,3 KDa corresponden a proteínas que participan en la acción pro coagulante del veneno de *Bothrops diporus* (52,7 KDa: Activadoras de la protrombina, y 30,3 KDa botroalternina: lectina tipo C inhibidora de trombina y botrocetina: coaglutina de plaquetas). Con lo cual, la desaparición o disminución de la intensidad de dichas bandas (migración lenta e intermedia) podría tener correlación con los resultados obtenidos en la prueba de inhibición de la coagulación. Las fracciones más activas en términos de esta propiedad biológica son las fracciones 2 (100% inhibición), 3 (54,8% inhibición) y 1 (37,5% de inhibición) respectivamente, y las fracciones que menos actividad inhibitoria presentaron fueron la 6 (1,52% de inhibición), 5 (4,1% de inhibición), 7 (15,7% de inhibición), 8 (19,6% de inhibición) y 4 (24,6% de inhibición) respectivamente.

Podemos apreciar en la calle F1+V la casi desaparición de las bandas de migración lenta, de PM 52,7 KDa; 59,6 KDa; y 70,5 KDa, y una gran disminución en la intensidad de las bandas de migración intermedia con PM de 26,5 KDa, 30,3 KDa y 34,8 KDa, lo cual correlaciona con lo obtenido en la prueba de inhibición de la coagulación. En la calle F2+V y F3+V no se logra apreciar las bandas de migración lenta por solapamiento con los compuestos propios del látex que se concentran en estas fracciones, pero si se logra apreciar una desaparición de las bandas de 26,5 KDa, 30,3 KDa y 34,8 KDa en la calle F2+V, sin embargo, en la calle F3+V estas bandas de migración intermedia siguen presentes sin presentar una disminución significativa en la intensidad. En este sentido habría una falta de correlación, ya que la fracción 3 fue la segunda más activa en cuanto a inhibición de la acción coagulante del veneno.

En la calle F8+V se percibe una notable disminución de las bandas de migración lenta e intermedia, sin embargo, esta fracción resultó ser una de las menos activas en cuanto a la propiedad de inhibir la acción coagulante, por lo que denota falta de correlación entre estos resultados y los obtenidos en la prueba *in vitro* de inhibición.

Algo interesante es que las bandas visualizadas en la calle del látex patrón (LP) se concentran casualmente en las fracciones que presentaron mayor inhibición de la acción coagulante (fracción

2 y 3). Por lo que no habría que descartar la posibilidad de que estos compuestos sean los responsables de inhibir dicha acción del veneno.

Concluyendo, la implementación de SDS-PAGE como método de screening de actividad biológica en el látex de *C. urucurana*, presenta una buena correlación con los resultados obtenidos de la prueba de inhibición de hemólisis indirecta, visualizándose disminución de intensidad en la banda de las fosfolipasas en aquellas fracciones que resultaron más activas. Por otro lado, no hubo buena correlación con los resultados obtenidos en la prueba de inhibición de la acción coagulante, ya que no se visualizó desaparición o disminución en la intensidad de bandas en todas las fracciones que resultaron activas (solo en algunas, quizás el mecanismo de acción pueda ser el secuestro de metales necesarios para la función enzimática, lo cual no se observaría en la SDS-PAGE), además se observó disminución en la intensidad de bandas en fracciones que no tuvieron una actividad significativa en la prueba de inhibición *in vitro*.

3.4 Inhibición de la actividad hemolítica indirecta

Como se describió en el punto 2.5 se calculó el porcentaje de inhibición de hemólisis utilizando la siguiente fórmula:

$$100 - \frac{\text{Halo Fracción} \times 100}{\text{Halo Veneno}}$$

Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

	H1	H2	H3	H p	DE	% inh 1	% inh2	% inh3	% p	DE2
Látex	0	0	0	0,0	0,0	100,0	100,0	100,0	100,0	0
F1	6	6	6	6,0	0,0	45,5	45,5	45,5	45,5	9E-15
F2	4,5	4	4	4,2	0,3	59,1	63,6	63,6	62,1	3E+00
F3	8	8	7,5	7,8	0,3	27,3	27,3	31,8	28,8	3E+00
Veneno	11	12	12	11,7	0,6					
F4	7	7	7	7,0	0,0	22,2	22,2	22,2	22,2	0E+00
F5	9	9	9	9,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0E+00
F6	9	8	9	8,7	0,6	0,0	11,1	0,0	3,7	6E+00
F7	9	8	9	8,7	0,6	0,0	11,1	0,0	3,7	6E+00
F8	8	8	8	8,0	0,0	11,1	11,1	11,1	11,1	0E+00
Veneno	9	9	9	9,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0E+00

Tabla 5. Tabla de resultados de la prueba de inhibición de la hemólisis indirecta. Referencia: "H1", "H2" y "H3" representan los halos del ensayo triplicado de cada una de las fracciones y veneno (en mm). "Hp" representa el promedio de los mismos, y "DE" sus respectivos desvíos estándar. "%inh1", "%inh2" y "%inh3", representan los porcentajes de inhibición del ensayo triplicado de cada una de las fracciones. "% p" es el porcentaje de inhibición promedio de los mismos, y DE2 sus respectivos desvíos estándar.

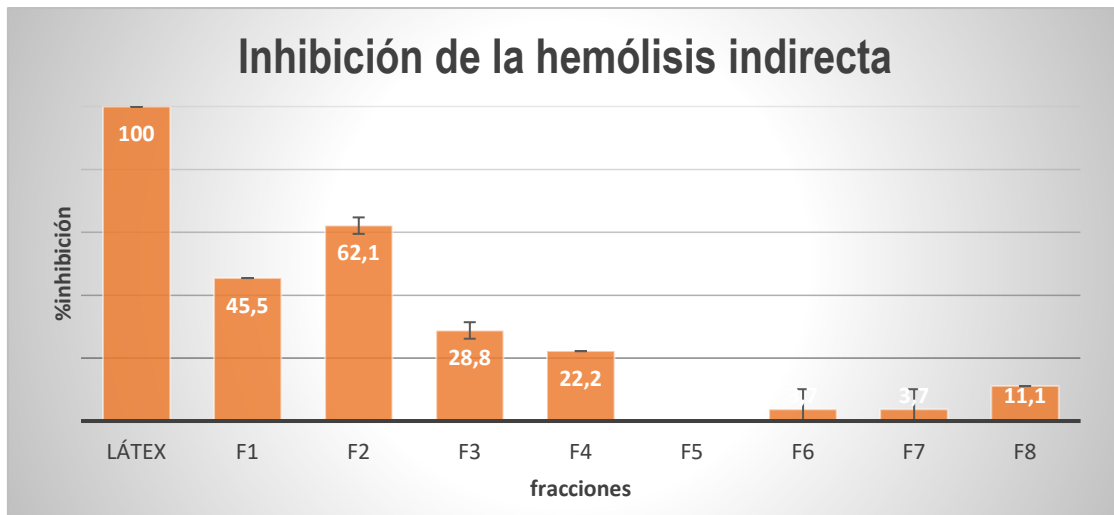


Figura 15. Representación gráfica de los “% de inhibición de la hemólisis indirecta” de cada una de las fracciones. Basados en los datos de la tabla 5.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, podemos ver que la fracción número 2 presenta la mayor actividad biológica en términos de inhibición de hemólisis indirecta (62,1% de inhibición) respecto a las demás fracciones, seguida de la fracción 1 y 3 con un porcentaje de inhibición de 45,5% y 28,8%, respectivamente. Sin embargo, podemos observar que el látex entero presentó un 100% de inhibición (Figura 15). Esta diferencia existente entre látex entero y las fracciones podría ser atribuible a que los compuestos responsables de la inhibición de la hemólisis actúan en forma sinérgica, y que al fraccionar la muestra estos se hayan distribuidos en varias de las fracciones, lo que explicaría por qué ninguna de estas presentan un % de inhibición comparable con el del látex entero.

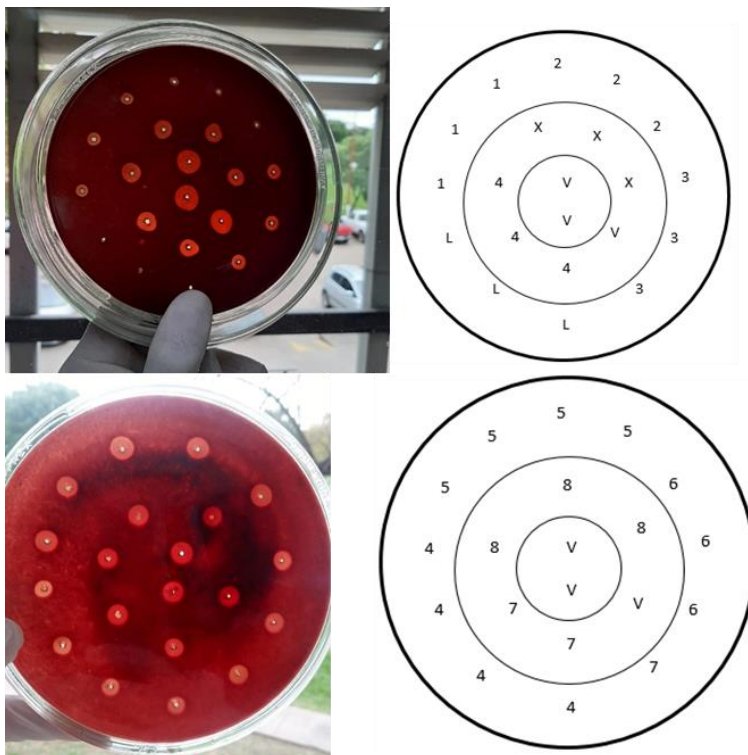


Figura 16. Placas de agar sangre-fosfatidil colina. Referencia de siembra: L: Látex, 1: Fracción 1, 2: Fracción 2, y así sucesivamente. V: Veneno, X: No corresponde a este trabajo.

3.5 Neutralización de la actividad coagulante del veneno

Para evaluar la capacidad de neutralización de la actividad coagulante, se midieron los tiempos de coagulación (TC) y posteriormente se calculó el porcentaje de inhibición de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\frac{(TC_i - TCV) \times 100}{(500 - TCV)}$$

Para TC > 500 segundos se consideró un 100% de inhibición de la coagulación. Se utilizaron dos TCV diferentes porque las muestras correspondientes se procesaron en distintos días, de acuerdo a este esquema.

Fracciones trabajadas	TCV 1 (seg)	TCV 2 (seg)	TCV 3 (seg)	Promedio (seg)
L,1,2,3	39,7	38,85	41,7	40,1
4,5,6,7,8	46,5	48,3	-	47,4

Los resultados obtenidos son los siguientes:

	TC1	TC2	TC promedio	DE	% Inh 1	%Inh2	%Inh p	DE
Látex	500	500	500	0,0	100,00	100,00	100,00	0,0
F1	207,8	217,4	212,6	6,8	36,46	38,55	37,51	1,5
F2	500	500	500	0,0	100,00	100,00	100,00	0,0
F3	287,4	297,2	292,3	6,9	53,77	55,90	54,84	1,5
F4	148,2	169,6	158,9	15,1	22,27	27,00	24,64	3,3
F5	63,9	68,2	66,05	3,0	3,65	4,60	4,12	0,7
F6	53,3	55,3	54,3	1,4	1,30	1,75	1,52	0,3
F7	116	121,5	118,75	3,9	15,16	16,37	15,76	0,9
F8	134,8	137,4	136,1	1,8	19,31	19,89	19,60	0,4

Tabla 6. Resultados obtenidos de la prueba de inhibición de la coagulación. "TC1" y "TC2" representan los tiempos de coagulación (en segundos) de los ensayos duplicados de cada fracción, "TC promedio" representa la media de tiempo de coagulación correspondiente y "DE" sus respectivos desvíos estándar. "%Inh 1" y "%Inh 2" representan el porcentaje de inhibición de la actividad coagulante de los ensayos duplicados de cada fracción, "%Inh p" representa sus promedios de porcentaje de inhibición, y "DE2" sus respectivos desvíos estándar.

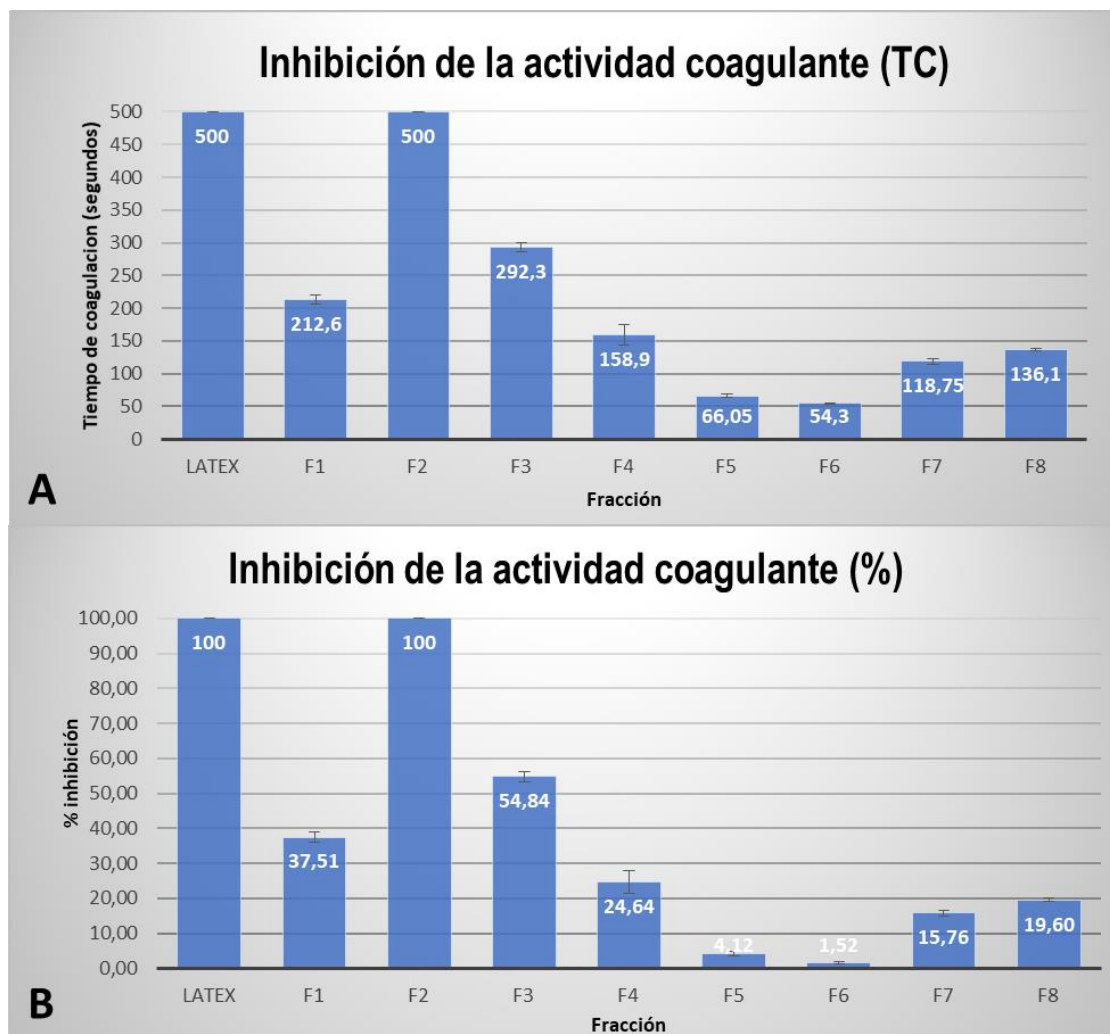


Figura 17. Representación gráfica de los resultados de la inhibición de la actividad coagulante de las fracciones sobre el veneno. **A)** Inhibición expresada en tiempo de coagulación (segundos). **B)** Inhibición expresada en porcentaje (%).

De los resultados obtenidos, se concluye que la fracción número 2 resultó ser la más activa en términos de inhibición de la acción coagulante del veneno de *Bothrops diporus*, con un porcentaje de inhibición del 100%, seguida de las fracciones 3 y 1 con un porcentaje de inhibición de 54,8% y 37,5%, respectivamente. El látex entero presentó un porcentaje de inhibición del 100% (Figura 17-B). En este caso, la inhibición producida por la fracción número 2 es comparable a la del látex entero, lo que indica que la mayoría de los compuestos responsables de dicha acción se encuentran presentes en esta fracción.

3.6 Inhibición de la actividad hemolítica indirecta y neutralización de la actividad coagulante del veneno para las fracciones activas. Ensayos de dilución

3.6.1 Neutralización de la actividad coagulante:

Se determinó el TCV por duplicado, y los resultados fueron 47,45 y 48 segundos, el promedio del mismo fue 47,73 segundos.

	TC1	TC2	TC3	TCmedio	DE	% INH1	%INH2	%INH3	%INH medio	DE2
Látex	500	500		500	0	100	100		100	0
L 1/2	500	500		500	0	100	100		100	0

L 1/4	500	500		500	0	100	100		100	0
L 1/8	500	500		500	0	100	100		100	0
L 1/16	500	500		500	0	100	100		100	0
L 1/32	403	441,7	448	430,90	24,37	78,55	87,11	88,50	84,72	5,39
Fracción 2	500	500		500	0	100	100		100	0
F2 1/2	500	500		500	0	100	100		100	0
F2 1/4	500	500		500	0	100	100		100	0
F2 1/8	224	246		235	15,56	38,97	43,84		41,41	3,44

Tabla 7. Resultados obtenidos del ensayo de "inhibición de la actividad coagulante" para distintas diluciones del látex entero y fracción 2. Referencia: "TC1", "TC2" y "TC3" representan los tiempos de coagulación obtenidos para cada una de las diluciones del látex y fracción 2. "TCmedio" es el promedio de los mismos, y "DE" sus respectivos desvíos estándar. "%INH1", "%INH2" Y "%INH3" representan los porcentajes de inhibición calculados para cada dilución del látex y fracción 2. "%INHmedio" es el promedio de los mismos, y "DE2" sus respectivo desvíos estándar.

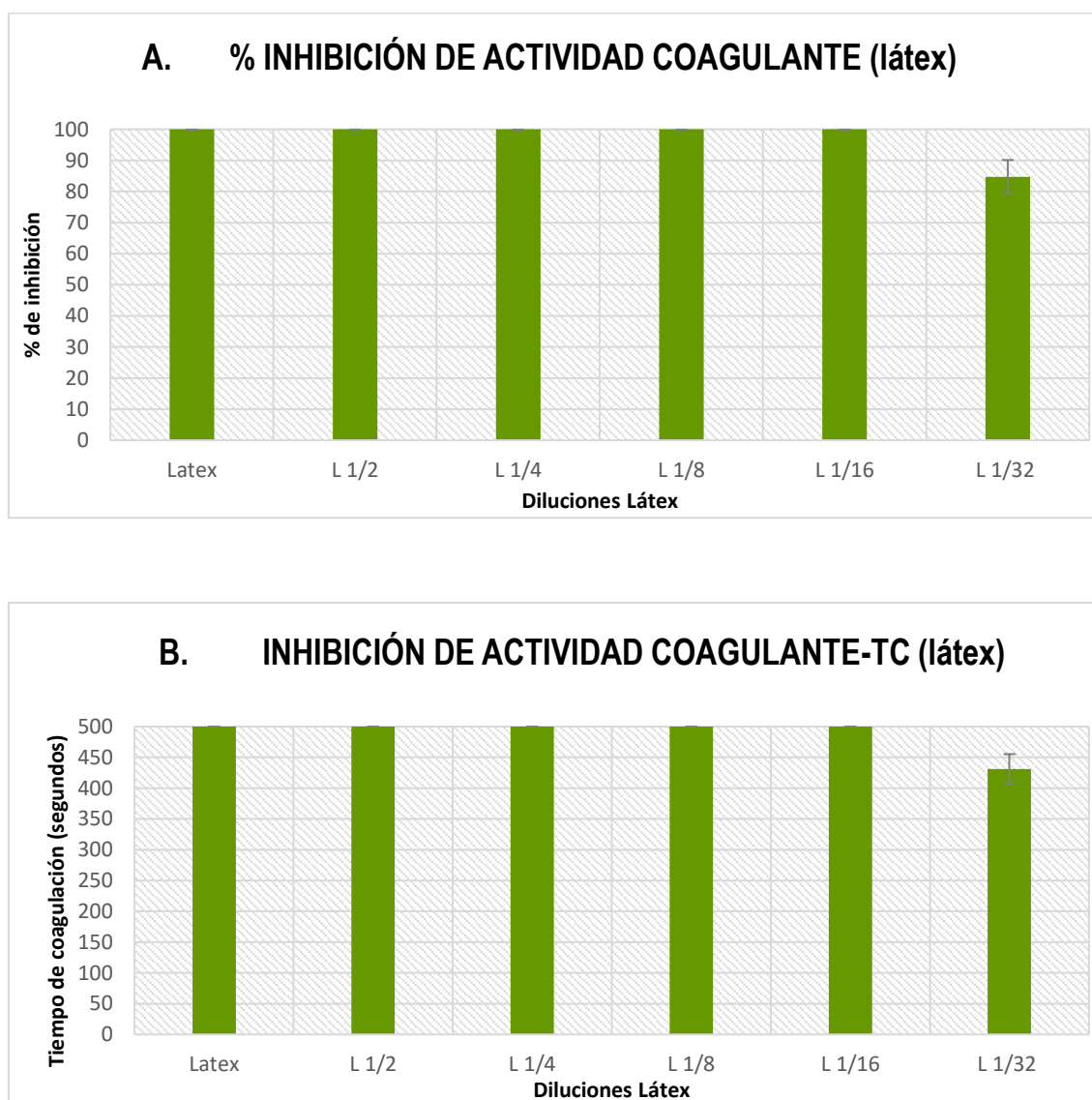


Figura 18. Gráficos de los resultados obtenidos en la prueba de "inhibición de la coagulación" con distintas diluciones del látex entero, de acuerdo a la tabla nº 7. **A)** Inhibición de la actividad coagulante expresado en porcentaje (%). **B)** Inhibición de la actividad coagulante expresado en TC (en segundos).

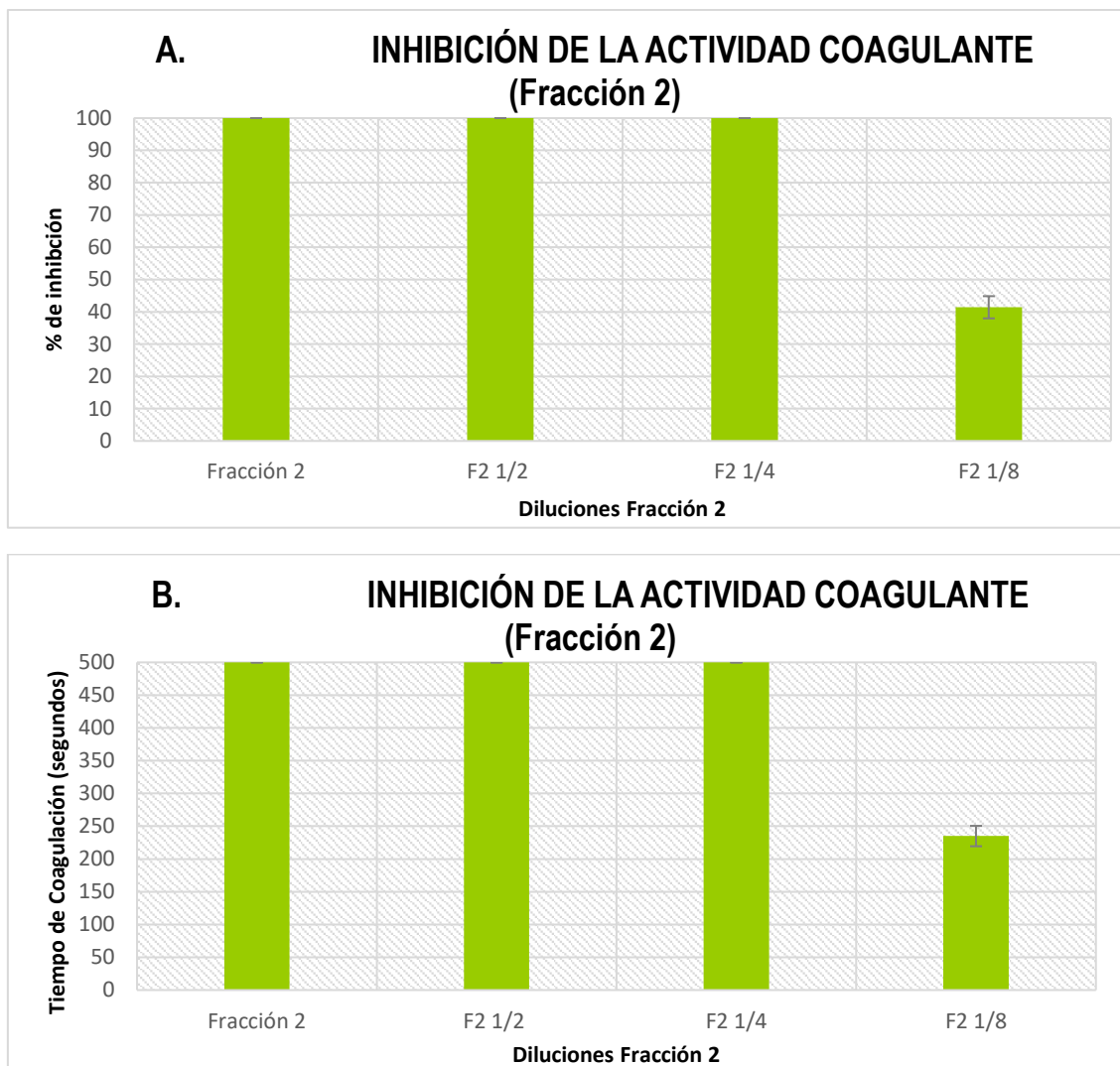


Figura 19. Gráficos de los resultados obtenidos en la prueba de “inhibición de la coagulación” con distintas diluciones de la fracción 2, de acuerdo a la tabla nº 7. **A)** Inhibición de la actividad coagulante expresado en porcentaje (%). **B)** Inhibición de la actividad coagulante expresado en TC (en segundos).

Los gráficos anteriores (Figuras 18 y 19) evidencian las diluciones en las que el látex entero y la fracción 2 dejan de manifestar el 100% de su capacidad inhibitoria, expresado en porcentaje de inhibición de coagulación (%) y en tiempo de coagulación (en segundos). El látex entero conservó su actividad inhibitoria de la coagulación en un 100% hasta la dilución 1/16. En la dilución 1/32 la inhibición cayó a un 84,7% (Figura 18-A). La fracción número 2 logró mantener un 100% de actividad inhibitoria hasta la dilución 1/4. En la dilución 1/8 el porcentaje de inhibición fue de 41,4% (Figura 19-A). Se podría pensar que, al fraccionar, los compuestos responsables de la acción biológica tuvieron una tendencia a concentrarse en la fracción número 2, lo cual se evidencia en los resultados de los gráficos de la Figura 17, donde dicha fracción obtuvo un 100% de inhibición de la coagulación, al igual que el látex entero. Sin embargo, al realizar las distintas diluciones (del látex y fracción 2), el látex fue quien mantuvo mayor inhibición al diluir la muestra. Este hecho podría estar asociado a una posible sinergia entre varios compuestos para efectuar dicha acción biológica, y que al fraccionar se distribuyen haciendo que las fracciones tengan menor actividad que el látex entero. O bien, que el compuesto activo siga saliendo en la F2 y en otras fracciones, como la fracción 3 (segunda fracción más activa en término de inhibición de actividad coagulante, con un 54,8%).

3.6.2 Inhibición de la actividad hemolítica indirecta:

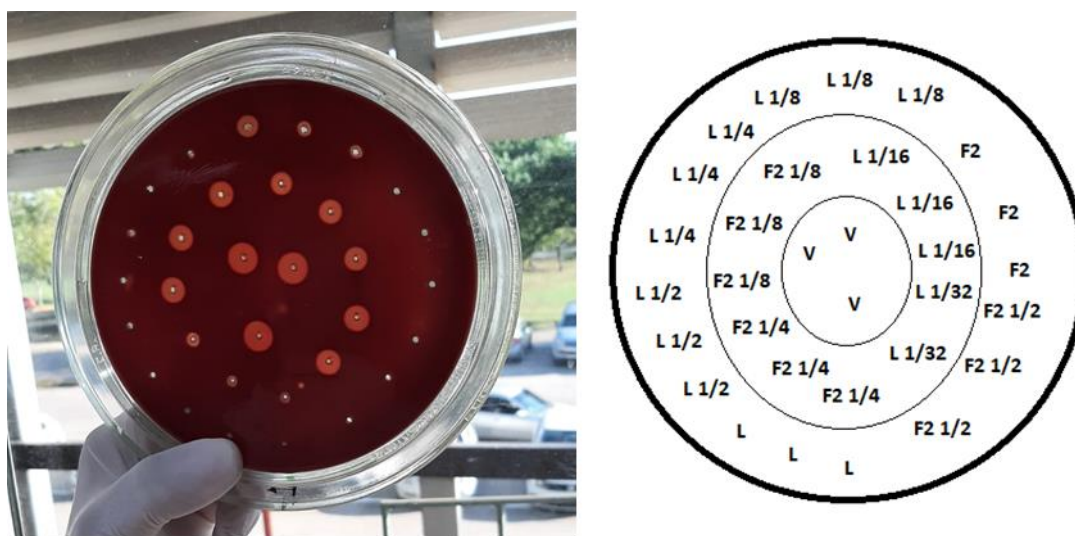


Figura 20. Placas de agar sangre-fosfatidil colina luego de la incubación. Referencia de siembra: L: Látex puro, F2: Fracción 2, V: Veneno. Los números fraccionarios expresan la dilución. Ej.: L 1/2 indica la dilución al medio del látex puro.

	H1	H2	H3	Hmedio	DE	%inh 1	%inh2	%inh3	% inh prom	DE2
Latex	0	0	0	0	0	100	100	100	100	0
L 1/2	0	0	0	0	0	100	100	100	100	0
L 1/4	0	0	0	0	0	100	100	100	100	0
L 1/8	4	4		4	0	60	60		60	0
L 1/16	8	8	8	8	0	20	20	20	20	0
L 1/32	9	9		9	0	10	10		10	0
Fracción 2	0	0	0	0	0	100	100	100	100	0
F2 1/2	0	0	0	0	0	100	100	100	100	0
F2 1/4	4	4	5	4,3	0,58	60	60	50	56,67	5,77
F2 1/8	9	9	9	9	0	10	10	10	10	0
V	10	10	10	10	0	0	0	0	0	0

Tabla 8. Resultados obtenidos de la prueba de "inhibición de la hemólisis indirecta" con distintas diluciones del látex entero y fracción 2. H1, H2 y H3 representan los halos (en mm) obtenidos en el ensayo triplicado para cada dilución del látex y fracción 2. "Hmedio" representa el promedio de los mismos, y "DE" su respectivo desvío estándar. "%inh 1", "%inh2" y "%inh3" representa los porcentajes de inhibición calculados para cada dilución de látex y fracción 2, "%inh prom" es el promedio de los mismos, y "DE2" sus respectivos desvío estándar. L: Látex, F2: Fracción 2, y los números fraccionarios corresponden a la dilución.

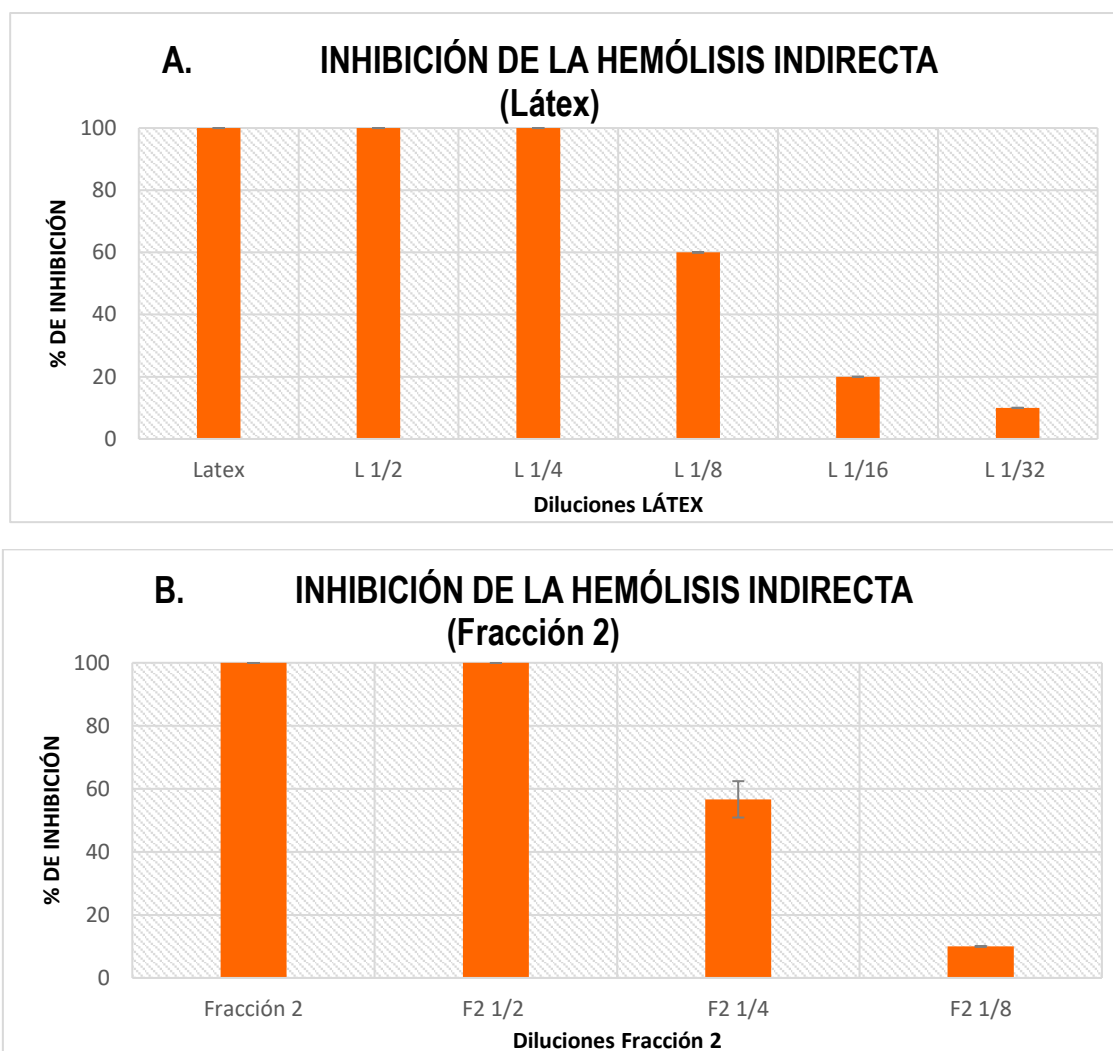


Figura 21. Gráficos de los resultados obtenidos en la prueba de “inhibición de la hemólisis indirecta” expresados en % de inhibición, de acuerdo a la tabla nº 6. **A)** Resultados para distintas diluciones del látex entero. **B)** Resultados para distintas diluciones de la fracción 2.

Los gráficos anteriores (Figura 21) representan la dilución a la cual el látex entero y la fracción 2 disminuyen su actividad de inhibición de la hemólisis indirecta, expresados en porcentaje de inhibición (%). El látex entero mantuvo un 100% de inhibición hasta la dilución 1/4. En las diluciones 1/8, 1/16 y 1/32, la inhibición disminuyó a un 60%, 20% y 10% respectivamente (Figura 21-A). En cuanto a la fracción 2, el 100% se mantuvo solamente hasta la dilución 1/2. Luego en las diluciones 1/4 y 1/8, la inhibición cayó a un 56,7% y 10% respectivamente (Figura 21-B). Estos resultados pueden explicarse de igual manera que en 3.5.1

3.7 Inhibición de la actividad proteolítica

Referencia de siembra:

Gel A

Calle C: Solución de Caseína (Para obtener el perfil electroforético patrón característico de la caseína)

Calle V+C: Caseína + Veneno (Para observar el efecto proteolítico producido por el veneno contra la caseína: desaparición de bandas)

Calle L+V+C: Caseína + Veneno + Látex entero (Para evaluar la capacidad de inhibición de la actividad proteolítica por parte del látex entero)

Calle Ep+C: Caseína + Extracto patrón (Para evaluar si algún componente del látex interfiere con el perfil electroforético de la caseína)

Calle 1, 2, 3 y 4: Caseína + Veneno + Fracciones (1 a 4) (Para evaluar la capacidad de inhibición de la actividad proteolítica por parte de cada fracción)

Gel B

Calle 1, 2, 3 y 4: Ídem Gel A

Calle 5, 6, 7 y 8: Caseína + Veneno + Fracciones (5 a 8)

Resultados:

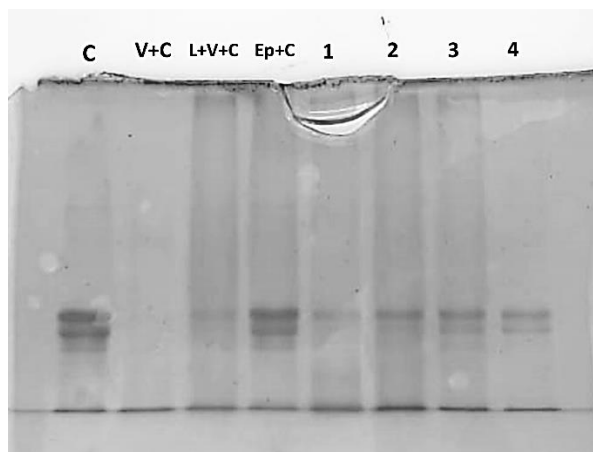


Figura 22. Resultado de electroforesis del GEL A para la evaluación de inhibición de la actividad proteolítica.

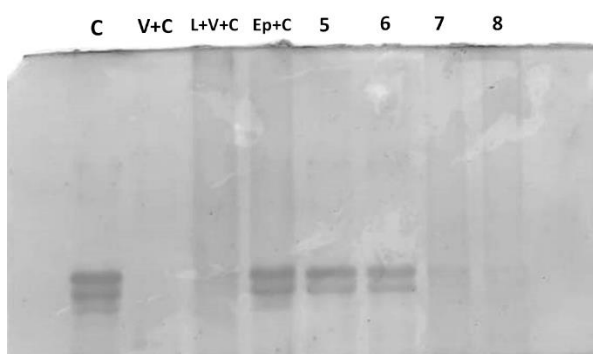


Figura 23. Resultado de electroforesis del GEL B para evaluación de inhibición de la actividad proteolítica.

Las figuras 22 y 23 corresponden a las electroforesis obtenidas. En la calle “C” (gel A y gel B) se observa el patrón de 3 bandas proteicas característico de la caseína, formado por la α_{S2} -Caseína, α_{S1} -Caseína, β -Caseína y κ -Caseína. En la calle “V+C” (gel A y gel B) se observa desaparición de las bandas proteicas producto de la pre-incubación de la solución de caseína junto con el veneno de *Bothrops diporus*, donde se pone de manifiesto su acción proteolítica. En la calle “L+V+C” (gel A y gel B) tras la pre-incubación de la caseína, veneno y látex entero, se logra apreciar que las

bandas vuelven a visualizarse levemente como consecuencia de la neutralización del látex sobre el veneno, haciendo que este último no actúe en forma adecuada sobre la caseína. Sin embargo, el efecto de inhibición de proteólisis por parte del látex no es tan intenso. De la calle “Ep+C” (pre-incubación de Látex patrón y caseína) se puede concluir que el látex entero no tiene ningún componente que interfiera con el patrón electroforético de la caseína, ya que se observa el mismo patrón de la calle “C”.

En cuanto a la inhibición de la proteólisis efectuada por las distintas fracciones concluimos que las fracciones 7 y 8 (Calle 7 y 8 respectivamente, del gel B- Figura 23) no presentan actividad, por lo cual el veneno no es inhibido en su actividad proteolítica por estas fracciones, pudiendo ejercer así su acción sobre la caseína, observándose el borrado de las bandas. El resto de las fracciones sí presentó actividad, consecuentemente se logra visualizar las bandas proteicas. De todas las fracciones, las que mayor actividad presentan son las fracciones 5 y 6 (calle 5 y 6 respectivamente, gel B-Figura 23). Algo interesante a mencionar es que la fracción 2, que fue la que mayor actividad de inhibición de la coagulación e inhibición de la hemólisis indirecta presentó en las anteriores pruebas in vitro, en este caso presentó una inhibición de la acción proteolítica relativamente baja respecto a las otras fracciones activas (Calle 2, gel A- Figura 22).

3.8 HPLC-DAD

Se realizó HPLC al látex entero y a la fracción 2, ya que esta es la que mayor actividad biológica presentó frente al veneno de *Bothrops Diporus* en las pruebas in vitro.

Cromatogramas obtenidos correspondiente al látex entero y la fracción número 2:

Látex:

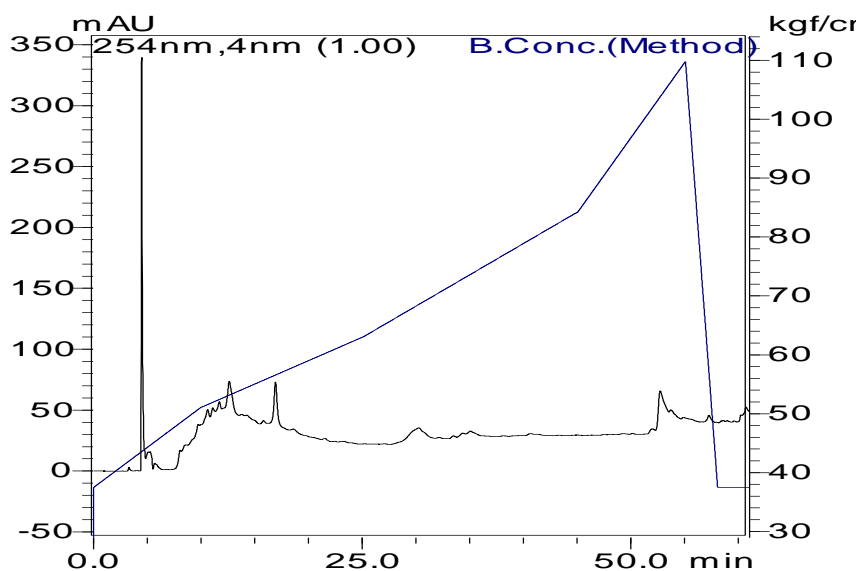


Figura 24. Cromatograma del látex de *C. urucurana* para señales obtenidas a 254 nm.

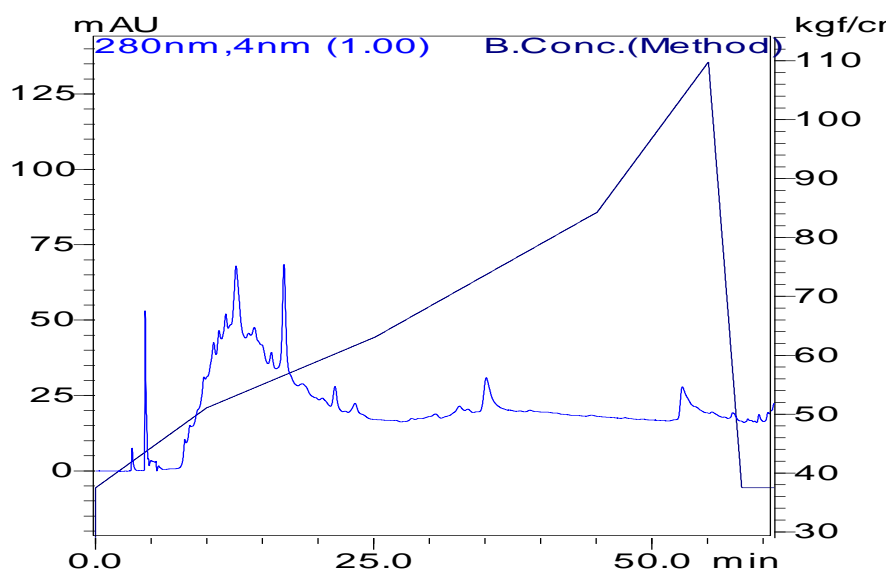


Figura 25. Cromatograma del látex de *C. urucurana* para señales obtenidas a 280 nm.

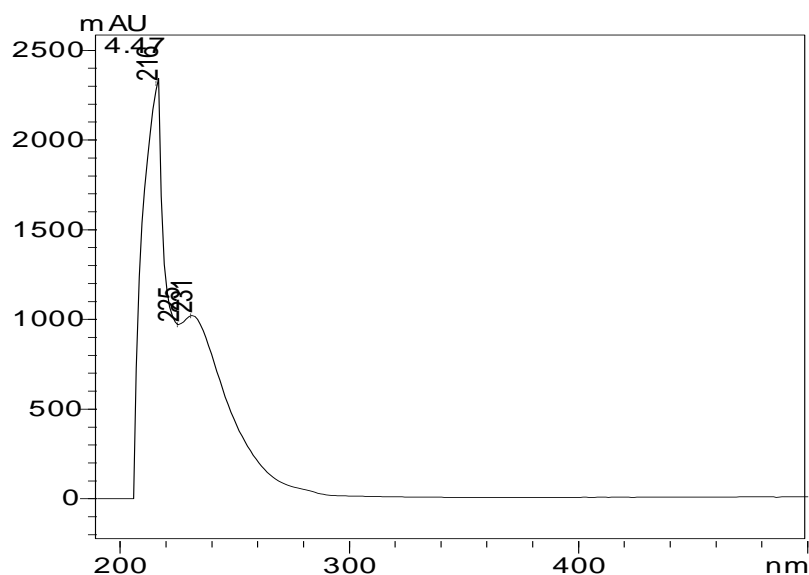


Figura 26. Espectro de absorción de señal visualizada en un tiempo de retención de 4,47 minutos en el cromatograma del látex de *C. urucurana*.

Las Figuras 24 y 25 representan los cromatogramas del látex a 254 nm y 280 nm respectivamente. Si bien se observan varios picos a lo largo del cromatograma, el pico más significativo es el encontrado en un tiempo de retención de 4,47min (siendo mayor la señal a 254 nm). Este pico podría considerarse como frente de solvente, sin embargo, al analizar el espectro de absorción de dicha señal (Figura 26) se observa un máximo de absorción a 216 nm y un segundo máximo a 231nm. Espectros de este tipo no se corresponden con los solventes utilizados por lo que podría tratarse de una sustancia de alta polaridad que no es retenida por la columna.

Fracción 2:

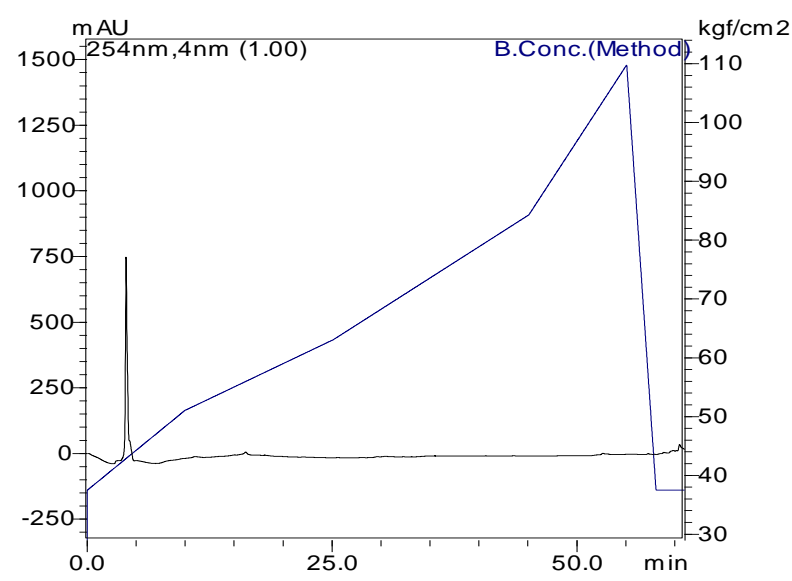


Figura 27. Cromatograma de la fracción 2 a 254 nm.

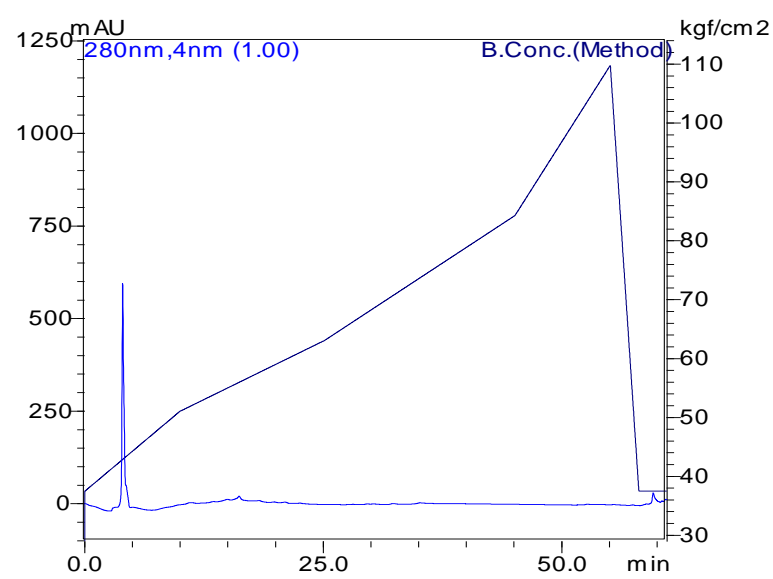


Figura 28. Cromatograma de la fracción 2 a 280 nm.

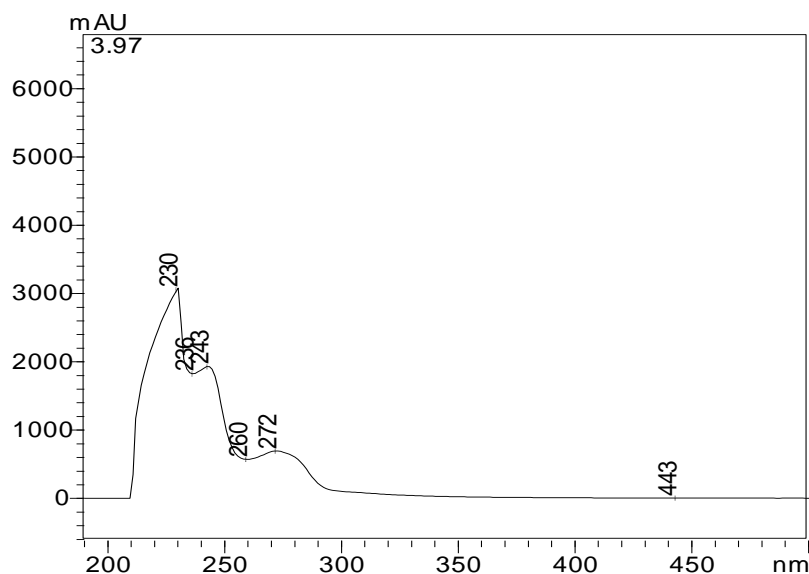


Figura 29. Espectro de absorción de señal visualizada en un tiempo de retención de 3,97 minutos en el cromatograma de la fracción 2.

Las Figuras 27 y 28 corresponden a los cromatogramas de la fracción número 2 a 254 y 280 nm respectivamente. En estos, ya no se encuentran los distintos picos de señales que se encontraban en el cromatograma del látex entero, esto se debe al proceso de fraccionamiento que recibió la muestra en las primeras etapas del trabajo, haciendo que la gran mayoría de los compuestos presentes en el látex no estén presentes en dicha fracción. Sin embargo, se logra observar una única señal considerable a los 3,97min de tiempo de separación. El espectro de absorción de dicha señal se caracteriza por presentar $\lambda_{\text{máx.}}$ 230; 243 y 272 nm (Figura 29). Si comparamos con el espectro de absorción de la señal analizada en el látex (Figura 26), se observa que los espectros de absorción de los picos no son equivalentes, lo que podría asociarse a que en el látex entero se produjo co-elución de sustancias para el tiempo de retención 4,47 min, mientras que en la F2 no habría co-elución. Si bien la evaluación del espectro no nos permite identificar al compuesto de estudio, resulta de utilidad la comparación del mismo para evaluar el proceso de fraccionamiento. Además, es un resultado preliminar que puede ser utilizado para controlar fracciones en términos de similitud. Restaría evaluar el perfil cromatográfico con otro sistema de solventes para ver el comportamiento del látex y F2 así como también identificar los compuestos presentes utilizando espectrometría de masas u otra metodología.

4 CONCLUSIONES

El desenvolvimiento a través de esta práctica electiva me permitió desarrollar competencias en distintas técnicas analíticas dedicadas a la determinación de propiedades biológicas en productos naturales, como las pruebas *in vitro* de inhibición de la coagulación e inhibición de la propiedad hemolítica indirecta, en las cuales además vincula el aprendizaje en la utilización del coagulómetro (Col1 wiener) y la preparación de las placas de agar sangre fosfatidilcolina respectivamente; prueba *in vitro* de inhibición de la actividad proteolítica del veneno de *Bothrops diporus*, y la realización de SDS-PAGE como método de screening de actividad alexitéra. También, progresé con los conocimientos acerca de la realización e interpretación de cromatogramas obtenidos por HPLC-DAD.

Por otra parte, de acuerdo a los objetivos específicos del trabajo, se logró el fraccionamiento en columna flash con serie elutrópica de polaridad creciente del látex de *Croton urucurana*

obteniéndose 8 fracciones diferentes. Se pudo evaluar la capacidad de las distintas fracciones de inhibir la actividad hemolítica indirecta y coagulante del veneno de *Bothrops diporus*. Con ello, se consiguió el aislamiento de componentes bioactivos del látex de *C. urucurana*, donde la fracción número 2 que se aísla a partir de la mezcla de acetato de etilo:metanol 50:50, es la que mayor actividad posee. Además, al realizar la HPLC sobre la fracción número 2, se detectó una señal en el tiempo de retención de 3,97 minutos que presentó un espectro de absorción con λ máx. en los 230; 243 y 272 nm. Si bien el espectro de absorción no nos permite identificar el compuesto en estudio, resulta de utilidad la comparación del mismo para evaluar el proceso de fraccionamiento. En adelante, restaría darles identidad a los compuestos con la aplicación de espectrometría de masa por ejemplo.

BIBLIOGRAFÍA

- Barbieri, D.S., Tonial, F., López, P.V., Sales Maia, B., Santos, G.D., Ribas, M.O., Glienke y C., Vicente, V.A. (2014). Antiadherent activity of *Schinus terebinthifolius* and *Croton urucurana* extracts on in vitro biofilm formation of *Candida albicans* and *Streptococcus mutans*. Arch.Oral Biol, 59(9), 887-96.
- Camargo, F., Torres, A., Ricciardi, G., Ricciardi, A. y Dellacassa, E. (2011). SDS-PAGE: una herramienta útil en la evaluación preliminar de la actividad alexitéra de extractos vegetales. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas, 10(5), 429-434.
- Cândido-Bacani, P., Figueiredo, P., Matos, M., Garcez, F.R. y Garcez W.S. (2015). Cytotoxic Orbitide from the Latex of *Croton urucurana*. J Nat Prod. 78(11):2754-60.
- Cândido-Bacania, P., Ezan, F., Figueiredo, P., Matos, M., Rodrigues Garcez, F. y Silva Garcez W. (2017). [1-9-NaC]-crouorb A1 isolated from *Croton urucurana* latex induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis in human hepatocarcinoma cells. Toxicol. Lett. 273: 44-54.
- Casao, T.d.R.L., Pinheiro, C.G., Sarandy, M.M., Zanatta, A.C., Vilegas, W., Dias Novaes, R., Gonçalves, R.V. y Viana Leite, J.P. (2020). *Croton urucurana* Baillon stem bark ointment accelerates the closure of cutaneous wounds in knockout IL-10 mice. J. Ethnopharmacol.261:113042.
- Cordeiro, K.W., Pinto, L.A., Formagio, A.S.N., Faloni de Andrade, S., Cândida, A.L.K. y Freitas, K. (2012). Efecto antiulcerogénico de la corteza de *Croton urucurana* Baillon. J.Ethnopharmacol. 143(1), 331-337.
- Cordeiro, K.W., Felipe, J.L., Malange, K.F., do Prado, P.R., de Oliveira Figueiredo, P., Rodrigues Garcez, F., Freitas, K., Silva Garcez, W. y Toffoli-Kadri M.C. (2016). Anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Croton urucurana* Baillon bark. J Ethnopharmacol. 183:128-135.
- Desmarchelier, C. (2012). Fitomedicina. Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva de la Nación. Disponible en: https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/fitomedicina_doc.pdf
- Esmeraldino, L.A., Souza, A.M. y Sampaio, S.V. (2005). Evaluación del efecto del extracto acuoso de *Croton urucurana* Baillon (Euphorbiaceae) sobre la actividad hemorrágica inducida por el veneno de *Bothrops jararaca*, utilizando nuevas técnicas para cuantificar la actividad hemorrágica en piel de rata. Phytomedicine. 12(8):570-6.

- Gurgel, L. A., Sidrim, J. J., Martins, D. T., Cechinel Filho, V. y Rao, V. S. (2005). Actividad antifúngica in vitro de la sangre de drago de *Croton urucurana* frente a dermatofitos. *J.Ethnopharmacol.*, 97(2), 409–412.
- Gurgel, L. A., Silva, R. M., Santos, F. A., Martins, D. T., Mattos, P. O. y Rao, V. S. (2001). Estudios sobre el efecto antidiarreico de la sangre de drago de *Croton urucurana*. *Phytother.Res.*, 15(4), 319–322.
- 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.
- Gutiérrez, J.M. , Theakston, R.D.G. y Warrell, D.A. (2006). Enfrentando el problema desatendido del envenenamiento por mordeduras de serpiente: la necesidad de una alianza global. *PLoS Med* 3(6): e150. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0030150>
- Haas, A., Orduna, T., Lloveras, S., De Roodt, A., Costa de Oliveira, V. y García, S. (2014). Guía de Prevención, Diagnóstico, Tratamiento y Vigilancia Epidemiológica de los Envenenamientos Ofídicos. Ministerio de Salud de la Nación. Programa Nacional de Prevención y Control de las Intoxicaciones. Disponible en: https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/guia_de_ofidismo_2014.pdf
- Konz, P., Pekoe, G., Shaffer, C. y Almeida, F. (2006). Dragons blood anti-viral materials and methods. CAPLUS AN 2006:952639 (Patent).
- Lopes Alves, J.J., Dias, M.I., Barreira, J.C.M., Barros, L., Resende, O., Ribeiro Aguiar, A.C. y Ferreira, I.C.F.R. (2020). Perfil fenólico de *Croton urucurana* Baill. Hojas, tallos y corteza: influencia por pares de la temperatura de secado y el solvente de extracción. *Molecules*. 25(9):2032.
- Milo, B., Risco, E., Vila, R., Iglesias, J. y Cañigueral, S. (2002). Characterization of a fucoarabinogalactan, the main polysaccharide from the gum exudate of *Croton urucurana*. *J. Nat. Prod.* 65(8), 1143–1146.
- Moraes-Souza, R. Q., Soares, T. S., Carmo, N. O., Damasceno, D. C., Campos, K. E. y Volpato, G. T. (2017). Efectos adversos de la exposición a *Croton urucurana* B. durante el embarazo de ratas. *J. Ethnopharmacol.*, 199, 328–333.
- Oliani, J., Peña Ferreira, M. J., Salatino, A. y Salatino, M.L.F. (2021). Flavonoides de las hojas de *Croton urucurana* y *C. floribundus* (Euphorbiaceae). *Biochem. Syst. Ecol.* 94: 104217.
- Oliveira, I. S., Lima, J.C.S., Silva, R. M. y Martins, D.T.O. (2008). In vitro screening of antibacterial activity of the latex and extracts from *Croton urucurana* Baillon. *Rev. Bras. Farmacogn.* 18(4): 587-593.
- 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.
- Peres M. T., Delle Monache F., Cruz, A. B., Pizzolatti M. G., Yunes R. A. (1997). Composición química y actividad antimicrobiana de *Croton urucurana* Baillon (Euphorbiaceae). *J. Ethnopharmacol.* 56(3), 223–226.

- Peres, M., Delle Monache, F., Pizzolatti, M., Santos, A.R.S., Beirith, A., Calixto, J.B. y Yunes, R.A. (1998). Analgesic compounds of *Croton urucurana* Baillon. Pharmaco-chemical criteria used in their isolation. *Phytother Res.* 12.3- 209-211.
- Pilosof A.M.R., Bartholomai G.B. (Eds). 2000. Caracterización funcional y estructural de proteínas. CYTED-Eudeba, Universidad de Buenos Aires, pp. 159-166.
- Pizzolatti, M.G., Bortoluzzi, A.J., Brighente, I.M., Zuchinalli, A., Carvalho, F.K. y Candido, A. (2013). Clerodane diterpenes from bark of *Croton urucurana baillon*. *J. Braz. Chem. Soc.*, 24, 609-614.
- Rao, V. S., Gurgel, L.A., Lima-Júnior, R.C., Martins, D.T., Cechinel-Filho, V. y Santos F.A. (2007). Dragon's blood from *Croton urucurana* (Baill.) attenuates visceral nociception in mice. *J. Ethnopharmacol.* 113(2):357-360.
- Salatino, A., Faria Salatino, M.L. y Negri, G. (2007). Traditional uses, Chemistry and Pharmacology of *Croton* species (Euphorbiaceae). *J. Braz. Chem. Soc.*, 18, 1, 11-33.
- Salles Trevisan, M.T. y Viana Macedo, F.V. (2003). Screening for acetylcholinesterase inhibitors from plants to treat Alzheimer's disease. *Quim. Nova*, 26. 3: 301-304.
- Santos, Diego; Cavalcanti, Rodrigo; Rostagno, Mauricio; Queiroga, Carmen; Eberlin, Marcos; Meireles, Maria Angela. (2013). Extraction of Polyphenols and Anthocyanins from the Jambul (*Syzygium cumini*) Fruit Peels. *Food and Public Health.* 3. 10.5923/j.fph.20130301.02.
- Silva Haad, J.J. (1980). Accidentes humanos por las serpientes de los géneros *Bothrops* y *Lachesis*. *Inst. Butantan.* 44/45: 403-423.
- Silva, L., Silva, W., Rodrigues Macedo, M. y Lopes Pereira Peres, M. (2009). Effects of *croton urucurana* extracts and crude resin on *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae). *Braz Arch Biol Technol.* 52, 3: 653-664.
- Silvestroni Pimentel, B., Negri, G., Cordeiro, I., Barbosa Motta, L. y Salatino, A. (2020). Importancia taxonómica de la distribución de los componentes de las ceras cuticulares de las hojas de especies de *Croton* (Euphorbiaceae). *Biochem Sys Ecol.* 92, 104106.
- Simionatto, E., Bonani, V., Morel, A., Poppi, N., Raposo Júnior, J.L., Stuker, C.Z., Peruzzo, G.M., Peres, M. y Hess, S.C. (2007). Chemical composition and evaluation of antibacterial and antioxidant activities of the essential oil of *Croton urucurana Baillon* (Euphorbiaceae) stem bark. *J. Braz. Chem. Soc.*, 18, 5: 879-885.
- Simionatto, E., Bonani, V., Peres, M., Hess, S.C, Candido, A., Diraimo, D., Poppi, N.R., Matos, M., Santos, E., Oguma, P.M. y Carvalho, J.E. (2009). Bioactividad y composición química de los aceites esenciales de *Croton urucurana Baillon* (Euphorbiaceae). *JEOBP*, 12 (3) : 250 – 261.
- Torres, A., Camargo, F., Ricciardi Verrastro, B., Ricciardi, G. y Dellacasa E. (2014). Plantas como antiveneno: del mito al logos. *Biblioteca Plural - CSIC – UDELAR*, Uruguay.
- Turiel, N.A., Ribeiro, A.F., Carvalho, E.E., Domingos, V.D., Lucas, F.C., Carreira, L.M., Andrade, E.H. y Maia, J.G. (2013). Essential oils composition of *croton* species from the Amazon. *Nat Prod Commun*, 8(10): 1471-1472.
- Zago, P., da Silva, G. R., Amaral, E. C., Barboza, L. N., Braga, F. A., Lorençone, B. R., Marques, A., Moreno, K., Leite, P., Veiga, A. A., de Souza, L. M., Souza, R, Dos Santos, A.C., Ribeiro-Paes,

J. T., Gasparotto Jr, A. y L      , F. (2021). Multiple Risk Factors for Heart Disease: A Challenge to the Ethnopharmacological Use of *Croton urucurana* Baill. Evid Based Complement Alternat Med.: 6580458.

Zhang, W., Han, F., He, J., & Duan, C. (2008). HPLC-DAD-ESI-MS/MS analysis and antioxidant activities of nonanthocyanin phenolics in mulberry (*Morus alba* L.). Journal of Food Science, 73(6). <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2008.00854.x>