



FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y  
NATURALES Y AGRIMENSURA

TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN LICENCIATURA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS UNNE

# **Estudio de hidrogeles de palmitato de ascorbilo (ASC16) para el transporte y liberación de macromoléculas. Su aplicación con proteínas ofídicas**

**AUTOR:** SÁNCHEZ MASLOVSKI, FRANCO MARTÍN

**DIRECTOR:** DR. LUCIANO SEBASTIAN FUSCO

**CO-DIRECTOR:** DRA. FELICITAS PEYRANO

**LABORATORIO:** LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN EN  
PROTEÍNAS (LABINPRO)

**2022**

<b>Resumen</b>	<b>3</b>
<b>Introducción</b>	<b>4</b>
Generalidades.....	4
Ofidismo en Argentina y la importancia de los sueros antiofídico .....	7
Principales componentes proteicos del veneno de <i>Crotalus durissus terrificus</i> .....	7
Palmitato de ascorbilo como nueva estrategia en el diseño de sueros antiofídicos .....	8
Propuesta de Trabajo final de Graduación.....	8
<b>Objetivos</b>	<b>9</b>
Objetivo general.....	9
Objetivos específicos.....	9
<b>Hipótesis</b>	<b>9</b>
<b>Materias y métodos</b>	<b>9</b>
Hidrogeles de ASC16. ....	9
Preparación de hidrogeles con diferente concentración de ASC16 y a diferentes temperaturas.....	9
Preparación de hidrogeles combinado con diferentes concentraciones de veneno.....	10
Veneno .....	10
Formulación de hidrogeles con veneno de <i>C.d. terrificus</i> .....	10
Método cualitativo para evaluar la apariencia general de las formulaciones de hidrogeles.....	10
Liberación de las proteínas ofídicas del veneno de los hidrogeles y evaluación de la actividad enzimática más importantes	10
Sobrenadante de hidrogeles.	10
Actividad Hemolítica Indirecta (AHI).....	11
Electroforesis.....	11
Solución de Veneno incubada a 40 o 50 °C.....	11
Coagulación.....	11
Efecto del ASC16 sobre la actividad hemolítica indirecta.....	11
Citotoxicidad in vitro de hidrogeles de ASC16.....	11
Análisis estadísticos.....	12
<b>Resultados</b>	<b>12</b>
Hidrogeles de ASC16 .....	12
Efecto de la variación de concentración de ASC16 y temperatura en la formación de geles.....	12
Efecto de la incorporación de veneno.....	14
Evaluación de las actividades enzimáticas más importantes del veneno pos-formulación del hidrogel....	15
Actividad hemolítica indirecta(AHÍ).....	15
Efecto del calentamiento, producido en la preparación de las formulaciones, sobre el veneno crotálico.....	16
Efecto inhibitor del palmitato de ascorbilo (ASC16) .....	18
Citotoxicidad in vitro de hidrogeles de ASC16.....	19
<b>Discusión</b>	<b>20</b>
<b>Conclusiones</b>	<b>22</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>23</b>

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura (UNNE) quien me aceptó y permitió que pudiera formarme como biólogo durante el transcurso de la carrera, y también a todos los docentes que formaron parte de mi crecimiento en las distintas áreas de la biología, brindándome sus conocimientos viéndose reflejados en la culminación de mi paso por la Universidad.

A mi director Luciano Fusco y co-directora Felicitas Peyrano, por haberme propuesto innovar con un nuevo tema, y brindarme la oportunidad de realizar mi trabajo final de graduación junto a ellos, aportando sus conocimientos, como así también su tiempo para ayudarme a afianzar mis conocimientos y enseñarme lo que desconocía, teniendo toda la paciencia para guiarme durante el desarrollo de la tesis y para lo que queda en mi nuevo camino como investigador.

Al Laboratorio LabInPro junto a su personal, por haberme abierto sus puertas y permitido ser parte del equipo, brindándome todas las herramientas y ayuda necesaria para que pueda desenvolverme en mis actividades dentro del laboratorio.

A quienes recorrieron junto a mí todos estos años de formación, tanto en los momentos buenos como en los difíciles, ellos son mis amigos Ezequiel, Lautaro y Emir, también agradecer a todos mis compañeros de estudio, tanto para los que siguen en la carrera, como para los que por algún motivo no pudieron continuar, ya que siempre estuvieron conmigo durante las extensas jornadas de cursada y de estudio, brindándome ayuda cuando la necesite y las fuerzas necesarias para seguir adelante.

Para finalizar, y no menos importante, agradezco a mi familia, quienes me formaron como persona, permitiéndome llegar hasta la recta final estando siempre presentes, dándome el apoyo incondicional para poder formarme profesionalmente. Sin ellos nada hubiese sido posible.

## 1. RESUMEN

Un suero antiofídico es un inmunobiológico formado por inmunoglobulinas o fragmentos de ellas con capacidad de neutralizar la toxicidad de proteínas ofídicas. Se produce inmunizando animales de gran porte (caballos) que son inoculados con dosis sucesivas y crecientes de veneno para posteriormente purificar y procesar los anticuerpos generados, obteniendo el suero antiofídico. Lo que se inocula en los animales para inmunizarlos es una formulación con tres componentes principales: **Veneno, Matriz y Molécula adyuvante.**

Tradicionalmente se utilizó el adyuvante de Freund que consiste en una emulsión aceite-agua, como matriz, que puede tener micobacterias muertas (completo) o no (incompleto) como tercer componente. Dicho adyuvante es muy efectivo pero presenta diversos efectos adversos como abscesos no infecciosos en el sitio de la inoculación. Por esta razón se busca el diseño de nuevas nanoestructuras que puedan ser utilizadas como componente 2 y potencie la acción adyuvante del componente 3.

Los hidrogeles de palmitato de ascorbilo (PA) son estructuras de auto-ensamble de dicha molécula y su potencial uso farmacológico viene siendo estudiado para su uso en el transporte y entrega de fármacos. En el presente plan de trabajo se propuso estudiar dicha nanoestructura como transporte y entrega de proteínas ofídicas. El estudio se enfocó en preparar hidrogeles en diferentes condiciones experimentales de temperatura (40°C y 50°C), concentración de PA (2,5 y 5 % p/v) y concentración de proteínas ofídicas (53, 530 y 5300 µg/mL). Además se realizaron ensayos para analizar si las actividades del veneno se modificaban por la interacción con la nanoestructura de PA, con diluciones de PA (0,4-0,05µM) y finalmente, si las formulaciones presentaban citotoxicidad.

Se observó que las formulaciones preparadas a 40°C y una concentración de PA de 2,5% el gel era homogéneo de consistencia viscosa y al aumentar la temperatura (50° C) el gel se volvió firme. Al aumentar la concentración a 5% el gel era homogéneo y firme, independientemente de la temperatura empleada. Al incorporar veneno de *Crotalus durissus terrificus* en diferentes concentraciones a las formulaciones anteriores, la capacidad de gelificación no se modificó y los hidrogeles mantuvieron su consistencia.

Por otro lado, las actividades del veneno pos-formulación del hidrogel se vieron afectadas. En la actividad hemolítica indirecta, las formulaciones redujeron un 50-65% de la actividad. Se evaluó el efecto neutralizante del PA sobre la actividad hemolítica indirecta y se realizaron ensayos de veneno pre-incubado con PA, dando como resultado que el veneno en presencia del PA reduce su actividad. La formulación se prepara con calentamiento a 40°C y 50°C y por ello analizamos la influencia de la temperatura en nuestras formulaciones realizando ensayos de actividad hemolítica indirecta y coagulación, indicando que las proteínas del veneno reducen su actividad un 7,7% y 8,2% luego de 12 minutos.

Con el fin de evaluar la citotoxicidad del PA, se trabajó sobre monocapas de células de cultivo *in vitro*, y se observó que al aumentar concentraciones de PA también aumentaban su toxicidad destruyendo a las células y formando espacios líticos.

De esta manera se obtuvo información sobre una nueva preparación (matriz de PA + veneno) que pueda en un futuro ser utilizada como soporte en el diseño de nuevas vacunas de uso veterinario en la producción de suero antiofídico.

## **2. INTRODUCCIÓN**

### **2.1 Generalidades**

En el área de la nanotecnología, se han mostrado avances en el uso potencial de sistemas nanométricos para mejorar procesos biotecnológicos. En este sentido, nuevas formulaciones de vacunas se están diseñando con el objetivo de hacer procesos más seguros tanto para humanos como para animales. Un proceso biotecnológico que requiere futuras mejoras, es la producción de suero antiofídico o antiveneno. El mismo es un inmunobiológico formado por inmunoglobulinas o fragmentos de ellas con capacidad de neutralizar la toxicidad de proteínas ofídicas. Este suero se produce inoculando dosis sucesivas y crecientes de veneno a grandes animales (caballos), para inmunizarse y posteriormente purificar y procesar los anticuerpos generados por el animal, obteniendo así el suero antiofídico. Lo que se inyecta en los animales para inmunizarse es una formulación con tres componentes principales: Componente 1 - Veneno, del cual se quiere obtener el antisuero o antídoto; Componente 2 - matriz, donde están disueltas las proteínas del veneno, y permite la liberación lenta de las moléculas en el área subcutánea de inyección (ej. emulsión agua-aceite); y Componente 3 - molécula adyuvante, que estimula y potencia la respuesta inmune de los animales (Ej. Lipopolisacárido, muramildipéptido, entre otros). Tradicionalmente se utilizó el adyuvante completo de Freund que consiste en una emulsión aceite-agua, como matriz, que puede o no tener micobacterias muertas como tercer componente. Dicho adyuvante es muy efectivo pero presenta diversos efectos adversos como abscesos no infecciosos en el sitio de la inoculación. Por esta razón se busca el diseño de nuevas nanoestructuras que puedan ser utilizadas como componente 2 y complementen la acción de otro adyuvante menos dañino sin perder la capacidad de potenciar la respuesta inmune.

Un gel es un sólido viscoelástico, que presenta dos partes, un polímero el cuál forma una red tridimensional en virtud de enlaces covalentes o no covalentes y un líquido que queda atrapado en dicha red. (L.Z. Rogovina, V.G. Vasil'ev & E.E. Braudo 2008). Podemos diferenciarlo de una emulsión, la cual es un sistema disperso de dos fases inmiscibles, donde ambas, la fase interna y la externa, son líquidas (S.S. Olmos 2017).

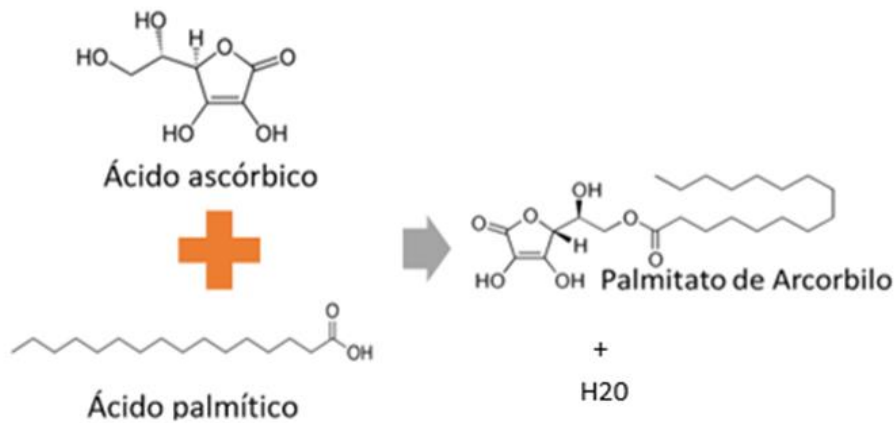
En los últimos 50 años, investigadores han enfocado sus estudios en los hidrogeles, debido a su potencia en una amplia gama de aplicaciones. Los hidrogeles, constituyen un grupo de materiales poliméricos, cuya estructura hidrófila los hace capaces de contener grandes cantidades de agua en sus redes tridimensionales (Enas M. Ahmed 2015). Los hidrogeles sufren

cambios de volumen en respuesta a la variación de las condiciones externas: temperatura, composición del disolvente, tensión mecánica, campo eléctrico, luz, pH, presión, etc. Trabajos de investigación han estado centrados en el efecto del pH y la temperatura debido a la importancia de estas variables en sistemas fisiológicos, biológicos y químicos, lo cual pasaría a ser una limitante al momento de formar hidrogeles ya que los mismos deben adaptarse a esos medios biológicos. La dependencia del grado de hinchamiento de polímeros entrecruzados con estas variables ha permitido su uso como materiales para diversas aplicaciones como: en membranas de separación sensibles al pH, purificación y recuperación de productos farmacéuticos de una disolución o en la liberación de fármacos (Jinlong Li, Xin Jia y Lijun Yin 2021).

En busca de nuevas estrategias para el diseño de hidrogeles, el ácido ascórbico (vitamina C) es uno de los mejores candidatos para la protección de especies importantes, otros ejemplos son: otras vitaminas (tocoferoles), moléculas poliinsaturadas (carotenos, ácidos omega-3 y omega-6) y otros. El ácido ascórbico se oxida fácilmente a ácido deshidroascórbico a través de una reacción de radicales y, por lo tanto, actúa como un antioxidante eficaz, potente, natural y, sobre todo, biocompatible y económico (Palma Santiago, et al. 2007).

Sin embargo, su uso se encuentra limitado por su muy escasa solubilidad en casi todos los disolventes, polares o apolares, a excepción del agua (40% a 45°C: Merck Index, 13a edición). Esta es la razón principal por la que, por ejemplo, el ácido ascórbico no puede penetrar a través de biomembranas, o es inútil en la estabilización de moléculas hidrófobas pequeñas o grandes. Por lo tanto, es de interés producir derivados del ácido ascórbico que presente mayor solubilidad y mantenga su propiedad antioxidante.

El palmitato de ascorbilo (PA o ASC16) es un éster formado por el ácido ascórbico y el ácido palmítico creando una forma liposoluble de vitamina C (Ácido 6-O-Palmitoil-L-ascórbico). Estudios previos explican que gracias a su porción hidrofóbica (cadena de alquilo) y su grupo polar (ácido ascórbico), este material tiene propiedades anfífilas que proporcionan un ambiente ideal para la solubilización de moléculas hidrofóbicas e hidrofílicas manteniendo la actividad antioxidante de la vitamina C (R. Mohamed, et al. 2010). Además, el uso de tensioactivos a base de vitamina C para la solubilización micelar es crucial cuando el soluto hidrófobo es particularmente sensible a la luz, el calor, los materiales oxidantes y los radicales, ya que los grupos de cabeza polar ascórbica pueden proporcionar un escudo eficaz contra estos agentes degradantes, y en particular frente al oxígeno molecular disuelto. (Palma Santiago, et al. 2007).



**Figura 1.1.** Formación del PA por la unión del ácido ascórbico y el ácido palmítico.

La variación en la longitud de la cadena lateral del PA tiene una influencia directa en sus propiedades físico-químicas, por ejemplo, el punto de fusión aumenta con la longitud de la cadena lateral (Palma, 2003). Los derivados con seis u ocho átomos de carbono tienen suficiente solubilidad a temperatura ambiente para formar agregados supramoleculares estables en agua (Lo Nostro et al., 2000a, b) mientras que para ASC<sub>n</sub> > 10 es necesario elevar la temperatura hasta que la solubilidad alcance la concentración micelar crítica (CMC). Esta dependencia de la temperatura de la solubilidad de los tensioactivos indica la existencia de la llamada temperatura de Krafft o punto de Krafft (temperatura micelar crítica, TMC) (Clint, 1992; Myers, 1994). La TMC del palmitato de ascorbilo aumenta a medida que la longitud de la cadena de hidrocarburos se hace más larga y, como se puede esperar, el tipo de agregados que se pueden formar por encima de TMC también depende de la estructura del derivado (Capuzzi et al., 1996a, b, 1997).

La solubilidad del ASC<sub>16</sub> en medios acuosos es reducida a temperaturas inferiores a 64 °C (TMC) y los valores de TMC permanecen constantes a medida que aumenta la concentración del palmitato de ascorbilo (Palma S., et al. 2007).

La capacidad de carga de fármacos para ASC<sub>n</sub> > 12 muestra un aumento muy importante. Esta observación está en consonancia con el hecho de que ASC<sub>12</sub>, ASC<sub>14</sub> y ASC<sub>16</sub> forman estructuras de gel por encima de TMC, donde hay un gran medio hidrófobo disponible para solubilización. Esta configuración laminar es capaz de incorporar mayores cantidades de fármaco por encima de TMC, en comparación con las dispersiones micelares formadas para ASC<sub>8</sub>, ASC<sub>10</sub> y ASC<sub>11</sub> (Palma y col., 2003b).

Por lo mencionado anteriormente, se hace evidente que estos sistemas poseen propiedades muy interesantes, poniendo en evidencia que el coagel (nanoestructura de cristal líquido formada por autoensamblaje del ASC<sub>16</sub>) es una plataforma farmacéutica prometedora para la administración de fármacos. Son capaces de solubilizar fármacos insolubles e inestables, protegerlos de cualquier posible entorno agresivo y favorecer su penetración a través de la piel (Palma S., et al. 2007). Otros estudios realizados por M. F. Sánchez Vallecillo y colaboradores (2015), también demostraron que el ASC<sub>16</sub> tiene gran potencial para ser usado en formulaciones de vacunas.

## 2.2 Ofidismo en Argentina y la importancia de los sueros antiofídicos

Los envenenamientos por mordeduras de serpientes constituyen un importante problema de salud pública, afectando principalmente a la población rural de bajos ingresos en los países tropicales (Gutiérrez *et al.*, 2010; Dolab *et al.*, 2014).

Cada caso de accidente ofídico constituye una emergencia médica que debe ser tratada con los medios adecuados, para evitar las lesiones locales o sistémicas (Rosenfeld, 1971; Warrell, 1996; Chippaux y Goyffon, 1998; de Roodt, 2014). Estos casos suelen ser mortales cuando el tratamiento con un antiveneno específico no se administra rápidamente (Acosta de Perez y col., 1997; Baudou y col., 2017; de Roodt *et al.*, 1998).

En Argentina, las principales especies de serpientes responsables de los accidentes en humanos pertenecen a la familia Viperidae (Subfamilia Crotalinae). En la región Nordeste (NEA) del país son los géneros *Crotalus* y *Bothrops* considerados peligrosos para el hombre y consecuentemente de importancia sanitaria (Cardoso *et al.*, 2003; de Roodt, 2014). *C. d.terrificus* es la única especie de la familia Viperidae en Argentina y si bien la frecuencia de accidentes por esta especie es baja (2,8%) su veneno posee una elevada letalidad.

## 2.3 Principales componentes proteicos del veneno de *Crotalus durissus terrificus*.

Los venenos de la familia Viperidae contienen alrededor de un 25% de sólidos totales, de los cuales el 70 a 90% están constituidos por una importante variedad de proteínas, muchas de ellas con actividad enzimática, constituyendo así una mezcla compleja de toxinas (Tu, 1977). Las mismas son responsables de la mayoría de los efectos biológicos (Zabaleta, 1990). El restante 10 a 30% de los solutos está constituido por una amplia gama de sustancias orgánicas de bajo peso molecular.

El perfil proteico y la abundancia relativa de los diferentes grupos de proteínas varían ampliamente de especie a especie e incluso existe diferencias entre una misma especie dependiendo de la edad, estación del año, zona geográfica y temperatura (Juarez Gómez, 2007).

En el envenenamiento producido por *C. d. terrificus* la parálisis neurotóxica es el principal efecto clínico, mientras que los efectos locales son pequeños o incluso ausentes (Rosenfeld, 1971). El envenenamiento causa efectos neurotóxicos, miotóxicos y coagulopáticos (Acosta de Perez *et al.*, 1997). En cuanto a la miotoxicidad sistémica, podría conducir a insuficiencia renal aguda, también con necrosis tubular (Amaral *et al.*, 1980; Azevedo-Marques *et al.*, 1985). En términos generales, el veneno de *C.d. terrificus* comprende toxinas de diferentes familias de proteínas: fosfolipasas A<sub>2</sub>, serina proteinasas, 5' nucleotidasas, metaloproteinasa, factores de crecimiento nervioso, fosfodiesterasas, glutaminilciclasa, lectina tipo C, crotamina, L-aminoácido oxidasa y desintegrinas (Boldrini-França *et al.*, 2010; Georgieva *et al.*, 2010; Gutierrez *et al.*, 2009; Wiezel *et al.*, 2018).

El veneno crotálico de nuestra región geográfica presenta en mayor proporción: crotoxina(CTX), las serinoproteasas y las L-aminoácidooxidasa (LAAO) (Fusco *et al.* 2020). Las

enzimas presentes en el veneno, si son inhibidas, podrían representar una potencial mejora en el tratamiento de las intoxicaciones ofídicas (L.O. Albulescu, et al. 2020) y por otro lado, mejorar la producción de antivenenos al reducir el impacto local y sistémico de las toxinas usadas en el proceso de inmunización (J.R. Rogero, & N. Nascimento, 1995; H. Oussedik-Oumehdi; F. Laraba-Djebari 2008). En este sentido hay un gran interés en la búsqueda de nuevos inhibidores de fosfolipasas A<sub>2</sub> u otras enzimas con un importante rol en el cuadro de intoxicación (A. Alangode, K. Rajan & B.G. Nair 2020).

#### **2.4 Palmitato de ascorbilo como nueva estrategia en el diseño de sueros antiofídicos**

Se ha demostrado que el derivado lipofílico del ácido ascórbico (PA) es uno de los inhibidores más potentes de las hialuronidasas, en particular contra la hialuronidasa testicular estreptocócica y bovina (A. Botzki, et al. 2004) y muestra una buena inhibición contra la PLA<sub>2</sub>. Este efecto neutralizante, se debe a interacciones hidrófobas y de hidrógeno estables con los residuos del sitio activo de la PLA<sub>2</sub> (Nanjaraj Urs, et al. 2015). Con esto, abre una nueva vía de enfoque para el uso de nuevos fármacos combinatorios para tratar la toxicidad local y sistémica inducida por el veneno de *C. t. durissus*.

Los adyuvantes aprobados para uso humano, cuando se administran con antígenos recombinantes o purificados (vacunas de la nueva generación), inducen una débil respuesta inmune celular. Es de interés el uso de nuevas nanopartículas para desarrollar una potente respuesta inmune humoral (IgG1 e IgG2a) y celular (Th1 y Th17) específica sin generar efectos adversos. El palmitato de ascorbilo no sólo constituye una plataforma para la administración de CpG-ODN (oligodesoxinucleótidos CpG-molécula adyuvante), sino también posee propiedades adyuvantes intrínsecas (María Fernanda Sánchez Vallecillo 2014). En este sentido, se están ensayando nuevas formulaciones adyuvantes con CpG-ODN aplicada a venenos crotálicos con resultados satisfactorios (datos no publicados).

Por lo tanto las formulaciones de Coagel tendrían potencial ventaja de presentar un efecto neutralizante de la actividad fosfolipasa A<sub>2</sub> (Nanjaraj Urs et al 2015) y con ello su toxicidad, podría ser considerada una alternativa para producir sueros antiofídicos.

#### **2.5 Propuesta de Trabajo Final de Graduación**

A partir de esta evidencia se propuso estudiar la formulación de hidrogeles de autoensamblaje de palmitato de ascorbilo combinado con veneno crotálico. En la preparación de los hidrogeles se ensayaron diferentes condiciones experimentales (temperatura y concentración del ASC16), se evaluó cómo afecta el calentamiento a las actividades enzimáticas más

importantes del veneno crotálico y para evaluar la toxicidad de las formulaciones se realizó ensayos de citotoxicidad in vitro.

### **3. Objetivos**

#### **3.1. Objetivo General:**

Estudiar la formulación de hidrogeles de autoensamblaje de palmitato de ascorbilo (ASC16) para transportar moléculas de interés biológico como las proteínas de origen ofídico.

#### **3.2. Objetivos Específicos:**

- Evaluar la formulación de hidrogeles de ASC16 con veneno crotálico en diferentes condiciones experimentales:
  - Temperatura
  - Concentración de ASC16
  - Concentración de veneno crotálico
  
- Evaluar si las actividades enzimáticas más importantes del veneno se mantienen activas luego de la formulación de gel.
- Evaluar la inocuidad de hidrogeles formulados determinando la citotoxicidad sobre células de cultivo in vitro

### **4. HIPÓTESIS**

Las moléculas de ASC16, por sus características anfipáticas, forman hidrogeles que son capaces de albergar proteínas ofídicas en su estructura manteniendo su actividad biológica, reduciendo su toxicidad.

### **5. Materiales y Métodos:**

#### **5.1 Hidrogeles de ASC16**

##### **5.1.1. Preparación de hidrogeles con diferente concentración de ASC16 y a diferentes temperaturas.**

Para la preparación de hidrogeles se siguió la técnica descrita por Jinyi Zhai (2018) con algunas modificaciones. Se preparó hidrogel de ASC16 al 2,5 y 5% p/v usando dimetilsulfóxido (DMSO) como solvente orgánico y solución salina de tampón de fosfatos, pH 8 (PBS) como solvente acuoso por ser el medio adecuado para solubilizar las proteínas ofídicas, en una relación DMSO-PBS 1:4. Se disolvió ASC16 en DMSO en un vial de vidrio. Posteriormente, se añadió PBS gota a gota a la solución de ASC16 calentando hasta 40°C o 50°C con agitación magnética

continúa, en un período de 10-15 min. Luego se enfrió la formulación a temperatura ambiente para permitir la gelificación.

### **5.1.2. Preparación de hidrogeles combinado con diferentes concentraciones de veneno**

Además de proteínas ofídicas, se conoce que el veneno de *C. d. terrificus* presenta iones del tipo  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  que podrían desestabilizar la red tridimensional que podría formar el ASC16 y las proteínas. Por lo tanto se evaluó el efecto de la presencia de veneno en concentraciones crecientes en diferentes formulaciones de hidrogeles de ASC16.

#### **5.1.2.1. Veneno**

El veneno se obtuvo de especímenes adultos de *Crotalus durissus terrificus* del serpentario del zoológico (Centro Aguará) en Paso de la Patria de la ciudad de Corrientes. El veneno desecado se mantuvo en freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Al momento de ser usado, se diluyó en PBS a una concentración determinada. El material insoluble se centrifugó y se trabajó a partir del sobrenadante.

#### **5.1.2.2. Formulación de hidrogeles con veneno de *C. d. terrificus***

Los hidrogeles que resultaron firmes según las condiciones de concentración de ASC16 y temperatura ensayadas en la sección 5.1.1 se prepararon con la incorporación de veneno de *C.d. terrificus* disuelto en PBS en concentraciones variables: 53, 530 y 5300  $\mu\text{g}/\text{mL}$  según la técnica descrita en la sección 5.1.1.

### **5.1.3. Método cualitativo para evaluar la apariencia general de las formulaciones de hidrogeles.**

**5.1.3.1. Consistencia:** Los hidrogeles formulados con y sin veneno se clasificaron según parámetros cualitativos de consistencia del hidrogel descritos por Coffmann y Garcia (1977). Los hidrogeles preparados en tubos de vidrios fueron invertidos con el fin de observar el comportamiento de la formulación. Los resultados se expresaron como líquido (si escurre por las paredes), viscoso (si es consistente pero escurre por las paredes) y firme (cuando queda en el fondo del recipiente y no escurre por las paredes).

**5.1.3.2. Homogeneidad:** se tomaron porciones de cada hidrogel y se colocaron entre porta y cubreobjeto, con la finalidad de observar homogeneidad y exudación de líquido de la matriz.

## **5.2 Liberación de las proteínas ofídicas del veneno de los hidrogeles y evaluación de la actividad enzimática más importantes**

### **5.2.1 Sobrenadante de hidrogeles**

Los hidrogeles de ASC16 recién preparados se trataron con vortex (5 minutos) y centrifugación (10.000 RPM a  $4^{\circ}\text{C}$  15 minutos) para que se formara un sobrenadante. Se determinó si los sobrenadantes presentaban actividad hemolítica indirecta (AHI) y se realizó electroforesis en geles de poliacrilamida para confirmar presencia de proteínas ofídicas.

### **5.2.2. Actividad Hemolítica Indirecta (AHI)**

Se empleó la técnica de Gutiérrez y col.(1988), en placas plásticas, se depositó 25 mL de agar al 1 % (previamente fundido y enfriado a 50 °C) pH 7.2 conteniendo 0,3 mL de solución 1:3 de yema de huevo en solución fisiológica, 0,3 mL de paquete de glóbulos rojos, 0,25 mL de CaCl 0,01M y 5 mg de azida sódica. Se dejó solidificar y se confeccionaron orificios de 3 mm de diámetro con una bomba de vacío. En los mismos se sembraron 15 µL de sobrenadante de los diferentes hidrogeles descritos en la sección 5.2.1 y solución de veneno testigo. Las placas se incubaron en cámara húmeda durante 20 h a 37 °C, midiéndose luego los diámetros de los halos de hemólisis.

### **5.2.3 Electroforesis**

La electroforesis se realizó en 15% de gel de poliacrilamida en SDS-PAGE en 200 V durante 45 minutos. El gel se tiñó con 0,1% Azul de Coomassie R-250 (en metanol al 40% y acético al 12% ácido) y destañido con ácido acético al 10%.

### **5.2.4 Solución de Veneno incubada a 40 o 50 °C**

Para evaluar posibles alteraciones de las proteínas del veneno crotálico en consecuencia a las temperaturas empleadas en la formulación de los hidrogeles, se incubó una solución de veneno en BPS semejante a las utilizadas en la formulación de hidrogeles a 40 o 50 °C por 12 minutos y se analizó la actividad de dos de las proteínas más abundantes del veneno crotálico (Crotoxina y Serina proteasa).

Para la Crotoxina con actividad Fosfolipasa A<sub>2</sub>, se ensayó la AHI como se indica en la sección 5.2.2. sembrando muestras de veneno incubado.

Para la Serina proteasa con actividad semejante a la trombina (capacidad de convertir fibrinógeno en fibrina), se realizó el ensayo de coagulación.

#### **5.2.4.1. Coagulación**

Se empleó la técnica descrita por Rodríguez y col. (2012). Muestras de plasma se pre-incubaron a 37° C y se adicionó un mismo volumen (75µL) de solución de veneno incubado a 40°C o 50°C y se determinó el tiempo de coagulación mediante un coagulómetro automático (Fibrintimer 2).

### **5.2.5 Efecto del ASC16 sobre la AHI**

Con el objetivo de determinar si el ASC16 inhibe la actividad fosfolipasa A<sub>2</sub> del veneno, se determinó la AHI de 1 mg/mL de veneno de *C. d. terrificus* incubado con diferentes concentraciones de ASC16 (0,4 µM, 0,2 µM, 0,1 µM y 0,05 µM) en baño de agua a 37°C durante 30 minutos.

## **5.3 Citotoxicidad in vitro de hidrogeles de ASC16**

Para los ensayos de citotoxicidad in vitro se realizaron diluciones sucesivas en solución salina de las formulaciones de ASC16 de 2,5 y 5,0% preparadas a 40 y 50 °C como se describieron en la sección 5.1.1 pero que no se dejaron enfriar a temperatura ambiente para evitar la gellificación. Se utilizaron línea celular de músculo esquelético murino (mioblastos) C2C12 obtenidos de monocapas subconfluentes

mantenidas en medio de cultivo adecuado para tal fin. En una placa de 96 pocillos con una monocapa de células (80 % de confluencia) se retiró el medio de cultivo y las diferentes diluciones de las formulaciones de ASC16, fueron adicionados a las células en cultivo. Medio de cultivo sin formulaciones y Tritón x-100 fueron utilizados como controles negativo y positivo de citotoxicidad luego de incubar 2 horas min a 37 °C se evaluaron alteraciones morfológicas de las células por microscopía óptica.

#### 5.4. Análisis estadísticos

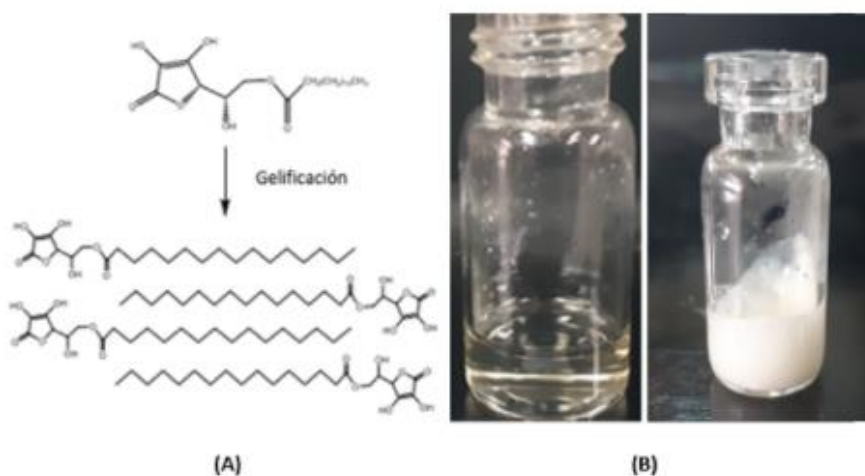
Cada uno de los ensayos *in vitro* se realizó por triplicado. Los resultados de las diferentes determinaciones se expresaron como la media  $\pm$  DE. Las diferencias entre grupos se valoraron mediante ANOVA con posterior prueba de Tukey ( $P < 0.01$ ) utilizando el software Infostat (Versión 2.1, 2004).

## 6. RESULTADOS

### 6.1. Hidrogeles de ASC16

#### 6.1.1. Efecto de la variación de concentración de ASC16 y temperatura en la formación de geles.

Para obtener hidrogeles de ASC16 de consistencia adecuada se ensayaron diferentes formulaciones, variando la concentración de de PA (2,5 y 5,0 %) y variando la temperatura de trabajo a la cual se disuelve el PA en DMSO(40 o 50°C). En la figura 1 (A) se representa el esquema del proceso de gelificación a través del autoensamblaje del PA y en figura 1 (B) la solución de PA en DMSO a 40 o 50 °C que luego del enfriamiento hasta temperatura ambiente genera un hidrogel estable.



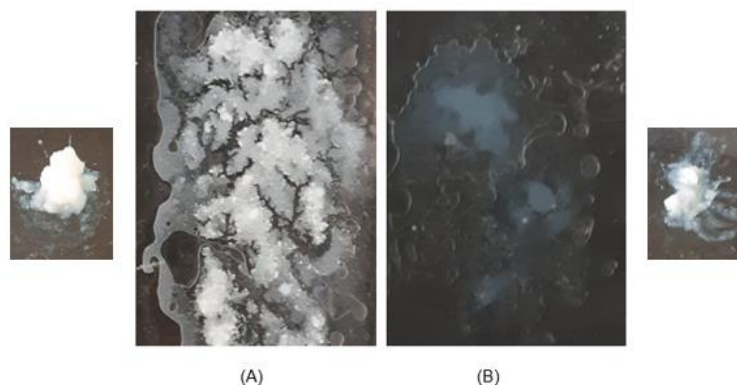
**Fig 1.** Formación de hidrogel de palmitato de ascorbilo (PA). **A- Esquema de** Estructura molecular de PA y ordenamiento molecular en el hidrogel ensamblado. **B-** Solución de PA en DMSO, PBS y Veneno a 40 o 50 °C (Fotografía izquierda) e hidrogel luego de un tiempo de reposo a temperatura ambiente (Fotografía derecha).

En la tabla 1 se muestran los resultados de los parámetros cualitativos de consistencia de los hidrogeles obtenidos al variar la concentración de PA y al variar la temperatura de formulación,. Al trabajar a baja temperatura (40 °C) se observó efecto de la concentración de PA sobre la consistencia de los geles, obteniendo un gel homogéneo y viscoso que se escurría por las paredes del tubo invertido cuando la concentración era 2,5%, y un gel homogéneo y firme que mantenía su forma cuando la concentración era 5,0%. Por otro lado, al aumentar la temperatura para formular los geles (50 °C) se obtuvieron geles homogéneos y firmes, a las dos concentraciones ensayadas (Tabla 1).

Para visualizar la textura y homogeneidad de los geles se observaron fragmentos de los mismos con microscopio luego de ser colocados entre dos portaobjetos. En la figura 2 se muestran las imágenes de los geles formulados a 50 °C, destacando que a 2,5% de PA la textura es homogénea con elevada exudación de líquido, mientras que a 5,0 % se observan mayor cantidad de grumos (partículas sólidas) y menor exudación de líquido.

**Tabla 1.** Parámetros cualitativos de consistencia de los hidrogeles, al variar la concentración de palmitato de ascorbilo (PA) y la temperatura de formulación.

T°	PA (% p/v)	LÍQUIDO	VISCOSO	FIRME
40°C	2,5%		X	
	5%			X
50°C	2,5%			X
	5%			X



**Fig.2.** Observación de las formulaciones del hidrogel en las dos concentraciones empleadas a 50°C. **A-** Coagel a 5% p/v, presentaba mayor cantidad de grumos. **B-** Coagel a 2,5% p/v, presentaba una consistencia más líquida y homogénea.

### 6.1.2 Efecto de la incorporación de veneno

. Se investigó las condiciones del hidrogel de PA usando concentraciones crecientes de veneno. Cuando la mezcla se preparó con una concentración de 53 µg/mL, los hidrogeles mantuvieron su consistencia independientemente de la temperatura empleada y la concentración del PA (Tabla 2). Aumentando la concentración 10 veces más (530 µg/mL), resultó en una gelificación firme. Posteriormente se aumentó a 5300 µg/mL y el hidrogel mantuvo su consistencia. En la Fig.3 se ejemplifica una de las formulaciones realizadas (PA al 5% p/v preparados a 40°C) cargadas con tres concentraciones diferentes de veneno.

**Tabla 2.** Clasificación según parámetros cualitativos de consistencia de los hidrogeles con veneno

T°	PA (% p/v)	Concentración veneno (µg/mL)	LIQUIDO	VISCOSO	FIRME
40°C	5%	53,530 y 5300			X
50°C	2,5%	53,530 y 5300			X
	5%	53,530 y 5300			X



**Fig.3.** Hidrogeles de PA (5% p/v) preparados a 40°C. Se ensayaron diferentes concentraciones de veneno. **A-** 53 µg/mL. **B-** 530 µg/mL. **C-** 5300 µg/mL.

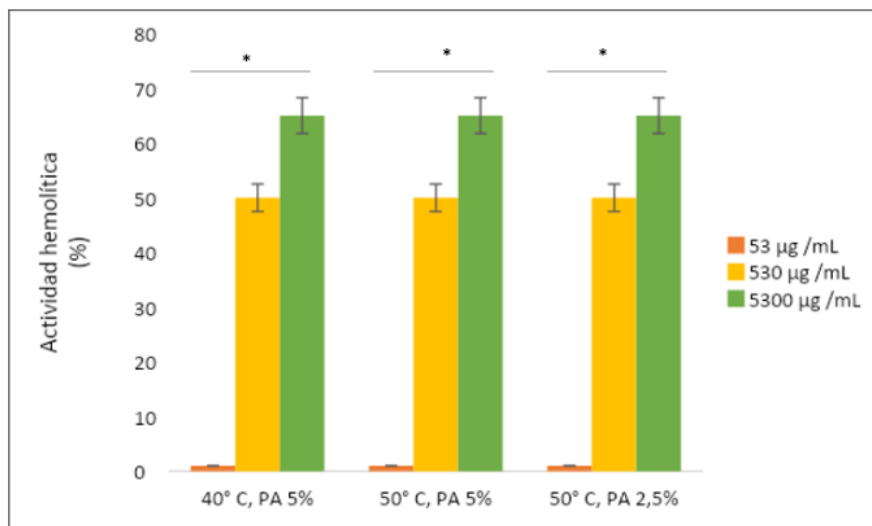
## 6.2. Evaluación de las actividades enzimáticas más importantes del veneno pos-formulación del hidrogel

### 6.2.1 Actividad hemolítica indirecta(AHI)

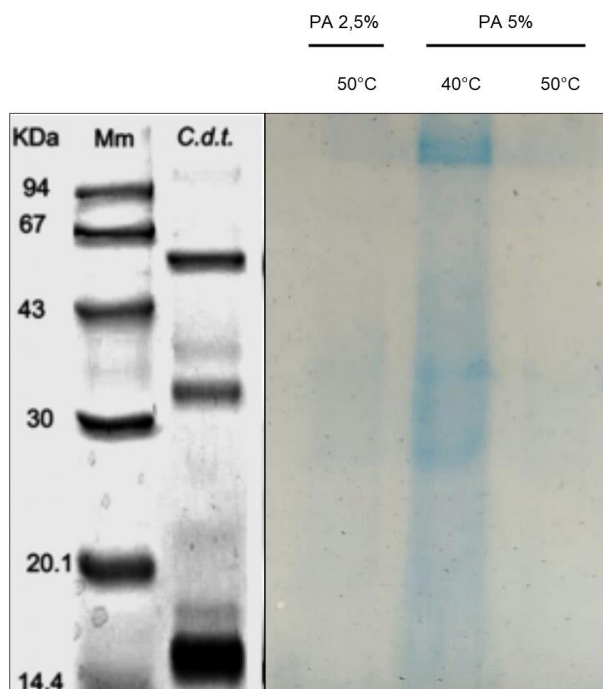
Para observar los efectos del procedimiento sobre la actividad catalítica de la fosfolipasa A<sub>2</sub>, se midió la reducción de los halos de hemólisis. Se formularon geles con diferentes concentraciones de veneno (53, 530 y 5300 µg/mL) y medimos el porcentaje de actividad que presentaban.

Las distintas formulaciones luego de ser preparadas fueron centrifugadas y del sobrenadante se ensayó la actividad hemolítica indirecta. Los hidrogeles cargados con 53 µg/mL no presentaron actividad hemolítica en relación al control con veneno que presentó 100% de actividad. Pero al cargar con 530 µg/mL y 5300 µg/mL, se observó una actividad del 50% y 65% respectivamente (Fig. 4) presentando diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) comparado con la solución de veneno solo (100% de actividad).

Por otro lado con los sobrenadantes se realizó una electroforesis en geles de poliacrilamida para evaluar cuáles de las proteínas estaban presentes. Como se ve en la figura 5, los componentes de alto peso molecular (más 30 kDa) fueron los que estaban presentes en el sobrenadante. En el gel observamos que formulaciones a 50°C retienen mayor cantidad de proteínas a diferencia de las formuladas a 40°C.



**Fig. 4.** Análisis porcentual de la actividad hemolítica indirecta de los hidrogeles con diferentes concentraciones de veneno. **Veneno:** 53 µg /mL(naranja). 530 µg /mL(amarillo). 5300 µg /mL(verde). \***p<0,05** diferencia significativa con respecto al veneno.



**Fig.5.** SDS-PAGE de sobrenadantes de las formulaciones. **MM:** Marcador de peso molecular, Fosforilasa b (97kDa), Ovalbumina (45kDa), anhidrasa carbónica (30kDa), α- lactoalbumina (14,4kDa). **C.d.t.:** Perfil proteico del veneno estudiado.

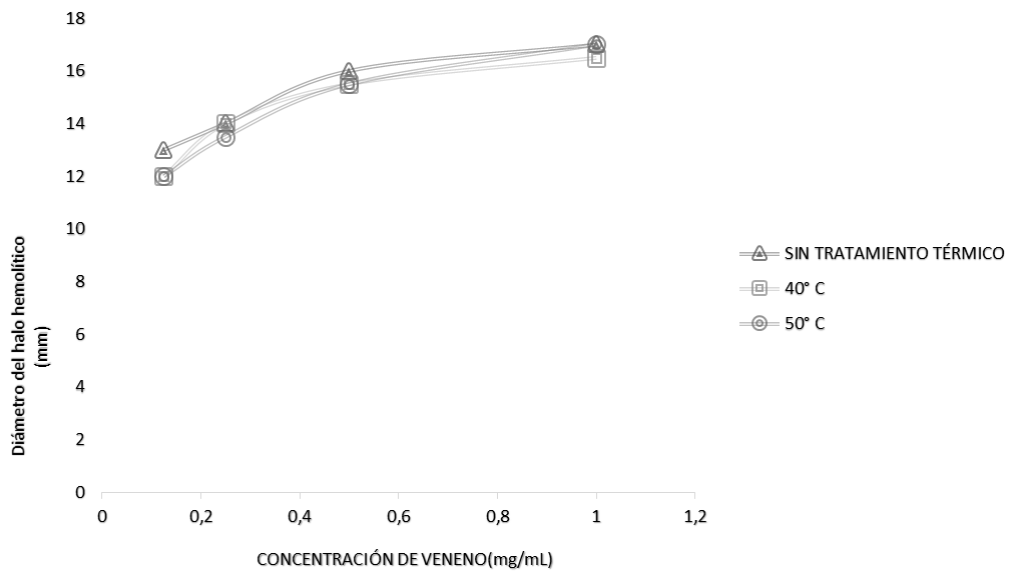
### 6.3. Efecto del calentamiento, producido en la preparación de las formulaciones, sobre el veneno crotálico:

Evaluamos si la temperatura empleada en las formulaciones afectaba la actividad enzimática del veneno crotálico. Se realizaron ensayos de actividad hemolítica indirecta y coagulación, siendo la actividad del veneno sin tratamiento térmico considerado como 100%, y con respecto a este se compararon los resultados producidos por el veneno usando dos temperaturas, 40°C y 50°C.

Diluciones de veneno (0,125-1 mg/mL) fueron ensayadas para determinar qué concentración produce el halo de 12-14 mm (Fig. 6). Esto fue establecido a priori, porque el veneno a concentraciones mayores de 1 mg/mL no presenta una relación actividad-concentración adecuada para ser medido por el test de AHI.

Seleccionamos la dilución de veneno 0.125mg/mL para ser tratada térmicamente y se midió la actividad hemolítica. Se observó un diámetro del halo hemolítico máximo de 13 mm siendo el 100% de actividad (sin tratamiento térmico), pero a 40°C y 50°C, el diámetro se reduce 1 mm presentando un 92,3% de actividad. Por lo tanto el tratamiento térmico ocasionó una reducción de 7,7% de la actividad (Fig.7).

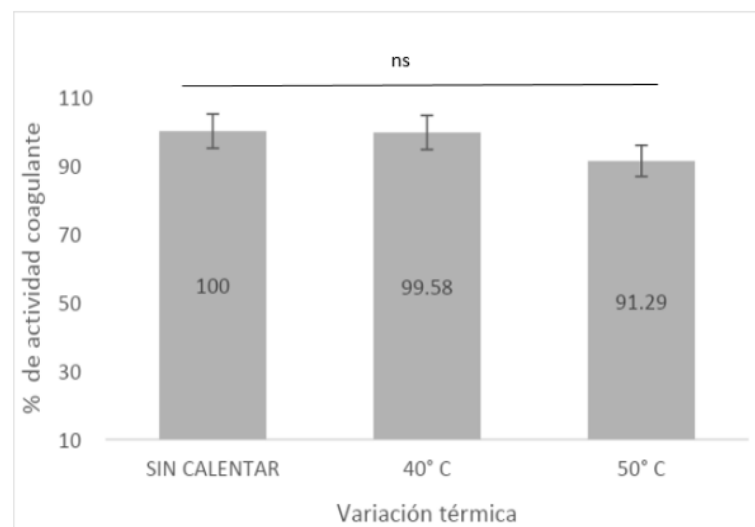
## ACTIVIDAD HEMOLÍTICA INDIRECTA



**Fig. 6. Efecto del calentamiento en la actividad hemolítica indirecta del veneno crotálico.** Se prepararon tres ensayos: Veneno sin calentar y veneno calentado a 40°C y 50°C.

Por otro lado, se determinó el tiempo en que proteínas plasmáticas coagulan (tiempo de coagulación) plasma citratado. Las soluciones de veneno fueron tratadas en las mismas condiciones de temperatura (40 o 50°C) que las utilizadas para la formulación de gel.

Los resultados ponen en evidencia que el tratamiento térmico a menor temperatura (40°C) no afecta la actividad coagulante del veneno (99,58% de actividad) por no presentar diferencias significativas (ns) con el veneno sin calentar. Por otro lado una reducción del 8,71 % en dicha actividad presentaron las muestras de veneno tratadas a 50°C (91,29% de actividad) durante 12 minutos.

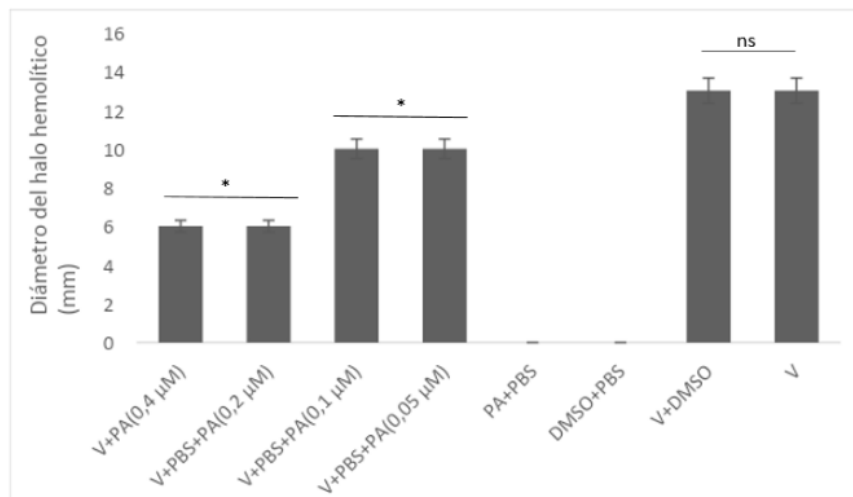


**Fig. 7. Efecto del calentamiento en la actividad coagulante del veneno crotálico.** Representación porcentual de la actividad coagulante del veneno. Se prepararon tres ensayos: Veneno sin calentar y veneno calentado a 40°C y 50°C. **ns:** no presenta diferencia significativa con respecto al veneno sin incubación térmica.

#### 6.4 Efecto inhibidor del palmitato de ascorbilo (ASC16):

Para determinar si la inhibición de la actividad fosfolipasa A<sub>2</sub> era consecuencia de la adición de PA en la formulación, se repitieron los ensayos de actividad hemolítica indirecta usando como referencia el halo producido por la actividad del veneno (530 µg /mL), y con respecto a este se compararon los halos producidos con el veneno pre-incubado con palmitato de ascorbilo (PA), y DMSO como control (Fig. 8).

Para los ensayos de PA con Veneno, se adicionaron concentraciones crecientes de PA mencionadas en el apartado 5.4. Los resultados mostraron una diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) con respecto al veneno solo y ponen en evidencia que veneno preincubado con PA (0,4 µM y 0,2 µM), formaron un halo de 6 mm, pero a menor concentración de PA (0,1 µM y 0,05 µM), se formó un halo de 10 mm. Siendo un indicio de que el palmitato de ascorbilo, podría estar neutralizando la actividad hemolítica indirecta. Veneno preincubado con DMSO no presentó diferencia significativa (ns) con respecto al veneno solo.



**Fig.8.** Efecto inhibitorio del PA a diferentes concentraciones sobre la actividad fosfolipasa A<sub>2</sub> del veneno crotálico. **Veneno (V).** **V+DMSO** (control positivo). **DMSO+PBS** y **PA+PBS** (controles negativos). **V+PA** (0,05; 0,1; 0,2 y 0,4 µM). **ns:** no presenta diferencia significativa. **\*p<0,05** diferencia significativa con respecto al veneno.



## 7. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se estudiaron formulaciones de PA que puedan contener proteínas de venenos ofídico con el objetivo de lograr formulaciones de hidrogeles que puedan ser utilizadas con fines biotecnológicos. Estudios previos demuestran que características como pH, temperatura, presencia de iones y, principalmente, concentración de PA y temperatura empleada, influyen en la formación de diferentes mesofases del hidrogel (Jinlong Li, et al. 2021; Benedini, et al. 2012). En el presente trabajo se encontró que a 40°C y 50°C el PA gelificó con éxito al trabajar al 5,0% de concentración, pero se observó que a 2,5% de PA a 40°C presentaba una consistencia de dispersión viscosa, no de gel firme. Esta dependencia de la temperatura de la solubilidad de los tensioactivos indica la existencia de la llamada temperatura de Krafft o temperatura micelar crítica (TMC) (Clint, 1992; Myers, 1994). Palma et al. (2007) proponen la TMC para el ASC16 a 64 °C. En el presente trabajo se formularon hidrogeles por debajo de la TMC, lo que podría deberse al uso del DMSO como disolvente del ASC16, y concuerda con Benedini (2012) que afirma que el uso de altas concentraciones del disolvente orgánicos disminuye la temperatura de transición de fases equivalente a la TMC.

La concentración de PA afecta la viscosidad del gel, que disminuye a medida que aumenta la concentración del tensioactivo (J.M. Llabot, et al. 2007). En concordancia con esto, cuando usamos menor concentración de palmitato (2,5%) la formulación sobre un vidrio de reloj presentaba mayor exudación y a concentraciones mayores (5%) la muestra no presentó exudación.

Formulaciones de hidrogeles en presencia de veneno fueron realizadas. Se observó que agregando 100 veces más proteínas que en la concentración más baja empleada, gelifican correctamente. En el mismo sentido, Gabriela Gamboa, et al. (2016) estudiaron una formulación de PA (0,02-0,7 p/v) y usaron albúmina como proteína integrada a la formulación. En sus estudios observaron que el ASC16 podría adaptarse a diferentes concentraciones de proteínas albúmina. Además, estos hallazgos podrían extrapolarse a otras sustancias hidrófilas en solución acuosa introducidas en fases de cristal líquido ya que siguen un comportamiento similar (Gamboa, et al.. 2016).

En la presente caracterización de una nueva formulación de PA con veneno crotálico, y la evaluación de los efectos que el proceso de calentamiento podría tener sobre la actividad de las principales enzimas del veneno, se observó una reducción del 8-9% de actividad hemolítica indirecta y coagulante en muestras de veneno tratadas a 50°C durante 12 minutos. En concordancia con lo mencionado, A. C. Rangel Santos y I. Mota (2000) muestran que el

calentamiento del veneno a 56, 70 o 100 ° C durante 30 min provoca una disminución de las actividades letales, fosfolipasa A<sub>2</sub> y mitotóxicas.

Si bien el DMSO, nos permitió trabajar a temperaturas de 40°C y 50°C al reducir la temperatura micelar crítica, detectamos que el DMSO afectaba las proteínas plasmáticas y por consiguiente se ve afectado el ensayo *in vitro* para la determinación del tiempo de coagulación del plasma. Un reporte previo ha demostrado que el DMSO en concentraciones superiores a 2,5% ocasiona un aumento en la desnaturalización de las enzimas plasmáticas (Li Di, et al. 2005), por lo que tuvimos que excluir al DMSO de la formulación, dejando abierta la posibilidad de buscar un nuevo disolvente para el PA.

La actividad de fosfolipasa A<sub>2</sub>, provocada por la crotoxina presente en el veneno de *Crotalus durissus terrificus*, afecta la neurotransmisión periférica a nivel de la placa neuromuscular, provocando parálisis respiratoria y muerte del paciente. (R. M. Kini 2003). Cuando el PA fue ensayado como inhibidor de la actividad de la fosfolipasa A<sub>2</sub>, resultados obtenidos en los ensayos de actividad hemolítica indirecta en esta tesis abren las puertas para considerar el PA como nueva estrategia para inhibir proteínas con actividad fosfolipasa A<sub>2</sub>. En concordancia con lo mencionado, se ha demostrado que el derivado lipofílico del ácido ascórbico (PA) es uno de los inhibidores más potentes de las hialuronidasas, en particular contra la hialuronidasa testicular estreptocócica y bovina (Botzki, A., et al. 2004) y muestra una buena inhibición contra la PLA<sub>2</sub>. Este efecto neutralizante, se debe a interacciones hidrófobas y de hidrógeno estables con los residuos del sitio activo de la PLA<sub>2</sub> (Nanjaraj Urs, et al. 2015).

Los resultados ponen en evidencia que las diferentes formulaciones de hidrogeles de ASC16 presentan cierta citotoxicidad y que al aumentar la concentración de ASC16 disminuye la viabilidad celular. Jinyi Zhai, et al. (2018), también demuestran que el ASC16 presenta un efecto citotóxico a medida que aumenta su concentración.

## 8. CONCLUSIONES

Los hidrogeles de palmitato de ascorbilo, por sus propiedades resultó ser una plataforma exitosa para el transporte y liberación de macromoléculas correspondientes a proteínas del veneno crotálico. También demostró ser un hidrogel capaz de almacenar grandes cantidades de veneno manteniendo su consistencia y su efecto inhibitor de la actividad PLA<sub>2</sub>, lo cual genera una oportunidad para establecer nuevas estrategias en el desarrollo de sueros antiofídicos.

También la utilización del DMSO favoreció a la formulación de hidrogeles a temperaturas que no afecten de manera significativa las actividades enzimáticas del veneno, pero a causa de alterar proteínas del plasma sanguíneo, corresponde encontrar un nuevo disolvente que lo reemplace sin perder el beneficio de trabajar a temperaturas bajas.

Por otra parte, las formulaciones ensayadas presentaron citotoxicidad, que aumentaba al aumentar la concentración de ASC16, por lo que futuras investigaciones serán necesarias para establecer una formulación con la mínima cantidad de ASC16 posible pero suficiente para formar un hidrogel de consistencia adecuada y mínima citotoxicidad.

Futuros estudios podrán completar estas evaluaciones preliminares, por lo que aún necesitamos continuar ensayando la eficacia y seguridad del hidrogel para presentarlo como nueva estrategia en el diseño de sueros antiofídicos.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

- 1- Acosta de Pérez, O.C., Koscinczuk, P., Gutiérrez, J.M., 1996. Actividades hemorrágicas y coagulante del veneno de *Bothrops alternatus* de Argentina. *Acta bioquím. clín. latinoam* 30, 401-405.
- 2- Ahmed, EM (2015). Hidrogel: Preparación, caracterización y aplicaciones: una revisión. *Revista de investigación avanzada*, 6 (2), 105-121.
- 3- Alangode, A., Rajan, K. y Nair, BG (2020). Antiveneno para serpientes: desafíos y enfoques alternativos. *Farmacología bioquímica* , 114135.
- 4- Albulescu, L. O., Xie, C., Ainsworth, S., Alsolaiss, J., Crittenden, E., Dawson, C. A., ... & Casewell, N. R. (2020). A therapeutic combination of two small molecule toxin inhibitors provides broad preclinical efficacy against viper snakebite. *Nature communications*, 11(1), 1-14.
- 5- Boldrini-França, J., Corrêa-Netto, C., Silva, M. M., Rodrigues, R. S., De La Torre, P., Pérez, A. & Calvete, J. J. (2010). Snake venomomics and antivenomics of *Crotalus durissus* subspecies from Brazil: assessment of geographic variation and its implication on snakebite management. *Journal of proteomics*, 73(9), 1758-1776.
- 6- Botzki, A., Rigden, DJ, Braun, S., Nukui, M., Salmen, S., Hoechstetter, J., ... y Buschauer, A. (2004). Ácido L-ascórbico 6-hexadecanoato, un potente inhibidor de la hialuronidasa: estructura de rayos X y modelado molecular de complejos enzima-inhibidor. *Revista de química biológica* , 279 (44), 45990-45997
- 7- Calvete, J.J., 2010. Brief History and Molecular Determinants of Snake Venom Disintegrin Evolution, Toxins and Hemostasis. Springer, pp. 285–300.
- 8- Capuzzi, G., Kulkarni, G., Fernández, J., Vincieri, J., Lo Nostro, P., 1997. Mixtura de ascorbil-estearato y vitamina D3: un estudio de monocapa en la interfaz gas-agua. *J. Colloid Interface Sci.* 186, 271.
- 9- Capuzzi, G., Lo Nostro, P., Kulkarni, K., Fernandez, J., 1996a. Mezclas de estearoil-6-O-ácido ascórbico y -tocoferol: un estudio de monocapa en la interfaz gas / agua. *Langmuir* 12, 3957.
- 10- Cardoso, J. L. C., França, F. D. S., Wen, F. H., Malaque, C. M. S., & HADDAD Jr, V. (2003). Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 45(6), 338-338.
- 11- Chippaux, J.P., M. Goyffon., 1998. Venoms, antivenoms and immunotherapy. *Toxicon* 36 (6): p.823-846.
- 12- Clint, J., 1992. Surfactant Aggregation. Blackie, Londres.
- 13- Coffmann, C. W., & V. V. Garciaj. 1977. Functional properties and amino acid content of a protein isolate from mung bean flour. *International Journal of Food Science & Technology*, 12(5): 473-484.a
- 14- de Roodt, A.C., 2014. Aspectos epidemiológicos del ofidismo en Argentina con énfasis en la región Nordeste. Ministerio de Salud. Presidencia de la Nación, Puerto Iguazú: INMeT.

- 15- Dolab, J. A., de Roodt, A. R., de Titto, E. H., García, S. I., Funes, R., Salomón, O. D., & Chippaux, J. P. (2014). Epidemiology of snakebite and use of antivenom in Argentina. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 108(5), 269-276.
- 16- Fusco, LS, Neto, EB, Francisco, AF, Alfonso, J., Soares, A., Pimenta, DC y Leiva, LC (2020). Análisis venómico rápido de *Crotalus durissus terrificus* del noreste de Argentina. *Toxicón: X*, 7, 100047.
- 17- Gamboa, GVU, Benedini, LA, Schulz, PC y Allemandi, DA (2016). Comportamiento de fase de coagels de palmitato de ascorbilo cargados con oligonucleótidos como un nuevo vehículo para adyuvantes de vacunas. *Revista de tensioactivos y detergentes*, 19 (4), 747-757.
- 18- Georgieva, D., Ohler, M., Seifert, J., Bergen, MV, Arni, RK, Genov, N. y Betzel, C. (2010). Veneno de serpiente de *Crotalus durissus terrificus* □ Correlación con actividades farmacológicas. *Revista de investigación del proteoma*, 9 (5), 2302-2316.
- 19- Gutiérrez, JM, Lomonte, B., León, G., Alape-Giron, A., Flores-Díaz, M., Sanz, L., ... y Calvete, JJ (2009). Venenos y antivenenos de serpientes: herramientas proteómicas en el diseño y control de antivenenos para el tratamiento del envenenamiento por mordedura de serpiente. *Revista de proteómica*, 72 (2), 165-182.
- 20- Gutiérrez, JM, Williams, D., Fan, HW y Warrell, DA (2010). Envenenamiento por mordedura de serpiente desde una perspectiva global: hacia un enfoque integrado. *Toxicon*, 56 (7), 1223-1235.
- 21- Juárez Gómez, P., 2007. Venómica. Mecanismos moleculares y evolutivos de la diversificación estructural de las familias de las desintegrinas. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Universidad de Valencia, Valencia.
- 22- Kini, R. M. (2003). Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A2 enzymes. *Toxicon*, 42(8), 827-840.
- 23- Li, J., Jia, X., & Yin, L. (2021). Hydrogel: Diversity of structures and applications in food science. *Food Reviews International*, 37(3), 313-372.
- 24- Lo Nostro, P., Capuzzi, G., Mulinacci, N., 2000a. Autoensamblaje y antioxidante propiedades del octanoil-6-O-ácido ascórbico. *Langmuir* 16, 1744.
- 25- Lo Nostro, P., Capuzzi, G., Pinelli, P., Mulinacci, N., Romani, A., Vincieri, F., 2000b. Actividad autoensamblante y antioxidante de algunos derivados de la vitamina C. *Surf coloides. A: Physicochem. Ing. Aspectos* 167, 83.
- 26- Mohamed, R., Dharmappa, K. K., Tarannum, S., Jameel, N. M., Kannum, S. A., Ashrafulla, H. S., ... & Vishwanath, B. S. (2010). Chemical modification of ascorbic acid and evaluation of its lipophilic derivatives as inhibitors of secretory phospholipase A 2 with anti-inflammatory activity. *Molecular and cellular biochemistry*, 345(1), 69-76.
- 27- Myers, D., 1994. *Surfactant Science and Technology*, segunda ed. VCH, nuevo York, pág. 83.
- 28- Nanjaraj Urs, A. N., Ramakrishnan, C., Joshi, V., Suvilesh, K. N., Veerabasappa Gowda, T., Velmurugan, D., & Vishwanath, B. S. (2015). Progressive hemorrhage and myotoxicity induced by *Echis carinatus* venom in murine model: neutralization by inhibitor cocktail of N, N, N', N'-Tetrakis (2-Pyridylmethyl) Ethane-1, 2-Diamine and Silymarin. *PloS one*, 10(8), e0135843.
- 29- Olmos, S. S. (2017). EMULSIONES (I). *Panorama actual del medicamento*, 41(402), 341-344.

- 30- Oussedik-Oumehdi, H., & Laraba-Djebari, F. (2008). Irradiated Cerastes cerastes venom as a novel tool for immunotherapy. *Immunopharmacology and immunotoxicology*, 30(1), 37-52.
- 31- P.J. Heskey, S.C. Owen, Handbook of Pharmaceutical Excipients, sixth ed. Pharmaceutical Press, London, 2009. 43–46.
- 32- Palma, S., Manzo, R., Allemandi, D., Fratoni, L., Lo Nostro, P., 2003a. Drogas solubilización en soluciones micelares de decanoato de ascorbilo. Surf coloides. A: Physicochem. Ing. Aspectos 212, 163.
- 33- Palma, S., Manzo, R., Lo Nostro, P., Fratoni, L., Allemandi, D., 2003b. Vehiculización de Antralina en coageles de norte-álquil derivados del Ácido Ascórbico. S. Palma, R. Manzo, P. Lo Nostro, L. Fratoni y D. Allemandi. Acta Farmacéutica Bonaerense 22, 305.
- 34- Palma, S., Manzo, R., Nostro, P. L., & Allemandi, D. (2007). Nanostructures from alkyl vitamin C derivatives (ASCn): properties and potential platform for drug delivery. *International journal of pharmaceutics*, 345(1-2), 26-34.
- 35- Rogero, J. R., & Nascimento, N. (1995). Detoxification of snake venom using ionizing radiation. *Journal of Venomous Animal and Toxins*.
- 36- Rogovina, L. Z., Vasil'Ev, V. G., & Braudo, E. E. (2008). Definition of the concept of polymer gel. *Polymer Science Series C*, 50(1), 85-92.
- 37- Rosenfeld, G., 1971. Symptomatology, pathology and treatment of snake bites in South America. *Venomous animals and their venoms* 2, 345-384.
- 38- Rosenfeld, G., 1971. Symptomatology, pathology and treatment of snake bites in South America. *Venomous animals and their venoms* 2, 345–384.
- 39- Tu, A.T., 1977. *Venoms: Chemistry and Molecular Biology*. Wiley, New York.
- 40- Vallecillo, M. F. S., de la Escalera, M. M. M., Aguirre, M. V., Gamboa, G. V. U., Palma, S. D., González-Cintado, L., ... & Maletto, B. A. (2015). A liquid crystal of ascorbyl palmitate, used as vaccine platform, provides sustained release of antigen and has intrinsic pro-inflammatory and adjuvant activities which are dependent on MyD88 adaptor protein. *Journal of Controlled Release*, 214, 12-22.
- 41- Warrell, D., 1996. Clinical features of envenoming from snakebites. *Toxicon* 2, 144.
- 42- Wiezel, GA, Rustiguel, JK, Morgenstern, D., Zoccal, KF, Faccioli, LH, Nonato, MC, ... y Arantes, EC (2019). Información sobre la estructura, función y estabilidad de la bordoneína-L, la primera L-aminoácido oxidasa del veneno de serpiente *Crotalus durissus terrificus*. *Biochimie* , 163, 33-49.
- 43- Zabaleta, A., 1990. Química y Farmacología del Veneno de Serpientes. *Rev Química*, 4.
- 44- Zhai, J., Mantaj, J. y Vllasaliu, D. (2018). Hidrogel de palmitato de ascorbilo para la liberación intestinal local de macromoléculas. *Farmacéutica* , 10 (4), 188.