



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



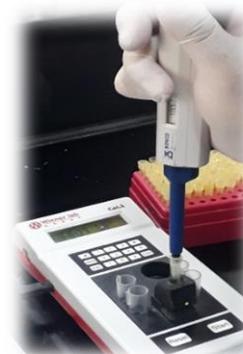
Trabajo Final para aspirar al grado de Licenciado en Ciencias Químicas

*Optimización de la extracción de fitometabolitos de *Cissampelos pareira*,
bioactivos contra veneno de *Bothrops diporus* “yarárá chica”*



Palacios Adan Luis

**Dirigida por la Dra. Ana María Torres
Co-Dirigida por el Dr. Gonzalo Ojeda**



**Corrientes-Argentina
2022**

Índice

	Pag.
1-Resumen	1
2-Introducción	2
2.1 Accidentes ofídicos	2
2.2 Plantas alexitéricas- <i>Cissampelos pareira</i>	3
2.3 Química de las plantas alexitéricas: Polifenoles	5
2.4 Métodos tradicionales de extracción de fitometabolitos	8
2.5 Diseño experimental y superficie de respuesta	10
3- Objetivos generales y particulares	12
4- Hipótesis de trabajo	12
5- Materiales y métodos	13
5.1 Obtención de material vegetal	13
5.2 Obtención del veneno ofídico	13
5.3 Diseño experimental	14
5.4 Preparación de extractos vegetales	15
5.5 Análisis fitoquímico	16
5.5.1 Fenoles Totales	16
5.5.2 Flavonoides Totales	17
5.6 Propiedades biológicas <i>in vitro</i>	18
5.6.1 Inhibición de la actividad coagulante del veneno	18
5.6.2 Inhibición de la actividad hemolítica indirecta	19
5.6.3 Determinación de la capacidad neutralizante de los extractos	20
6- Resultados y Discusión	22
6.1 Rendimiento de la extracción	22
6.2 Fenoles Totales	23
6.3 Flavonoides Totales	24
6.4 Propiedades biológicas <i>in vitro</i>	26
6.4.1 Inhibición de la actividad coagulante del veneno	26
6.4.2 Inhibición de la actividad hemolítica	28
6.5 Optimización	30
6.6 Pos Análisis y Validación	32
7- Conclusión	33
Bibliografía	34
Anexo	39

Agradecimientos

A Dios por darme la fortaleza y la sabiduría para lograr esta meta.

A mi esposa, que es mi sostén y de la familia que formamos que, gracias a su amor, paciencia y tolerancia, hemos podido mantenernos uno al lado del otro para seguir afrontando juntos los desafíos que nos depara nuestro camino hasta que Dios decida. Eternamente agradecido de la vida a su lado.

A mis hijas, que son esas personitas que me dan fuerzas, me enseñan a que cada día tengo que ser mejor persona y disfrutar de la vida.

A mi madre, porque cada día me motiva a seguir con mis estudios, que siempre confió en mí y lo sigue haciendo, sé que va a estar muy feliz con este logro.

A mis Amigos, porque son la familia que uno elige y están siempre presente.

A mis compañeros de la universidad, por las enseñanzas y la buena predisposición.

A todos aquellos que contribuyeron en mi formación académica y profesional, a mis profesores, que me brindaron sus conocimientos a lo largo de mi carrera universitaria.

A mi director **Dra. Ana María Torres** y mi co-director **Dr. Gonzalo Ojeda**, por la paciencia, gracias por darme todas las herramientas y los conocimientos necesarios siendo mi guía para alcanzar esta meta académica.

A la **Dra. Sonia Sgroppo** y el **Dr. Darío Duarte** por facilitar el equipamiento necesario.

A la **Bqca. Natalia Serrano** por proveer el material biológico para la realización de los ensayos.

A todo el equipo de laboratorio de productos naturales, por siempre bríndame un lugar cálido de trabajo y sin mezquindades.

A todas las personas que de una u otra manera me estimularon en la culminación de este proyecto.

1-Resumen

El envenenamiento por mordedura de serpientes representa un problema de salud pública desatendido en muchos países tropicales y subtropicales. Los accidentes ofídicos desde 2017 son considerados por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como una enfermedad tropical que “*causan aproximadamente entre 81.000 y 138.000 muertes al año, y alrededor del triple de casos de amputación y discapacidad permanente*” (OMS 2019). El uso de las plantas en la medicina indígena y folklórica se halla en franca revalorización dado el vasto conocimiento ancestral aborígen que es acervo cultural abundante en la región del Nordeste Argentino (Chifa et al. 2014). Su interés ha sido avalado por la OMS como consecuencia del examen crítico de las propiedades atribuidas, cuya posible confirmación o rechazo permitiría, no solamente depurar dicha tradición, sino además poner a disposición fármacos para ser aplicados en situaciones de emergencia (accidentes en regiones alejadas de centros de salud) mientras se espera la terapia de suero antiveneno (único tratamiento avalado por la OMS). Por lo mencionado, resulta relevante el estudio de nuevas drogas o fármacos preparados a partir de compuestos químicos de origen natural, los cuales podrían tener menor severidad de efectos secundarios a la vez que se validaría el uso etnofarmacológico.

En el presente trabajo, el objetivo fue optimizar la técnica de extracción de bioactivos de interés en *Cissampelos pareira* especie utilizada como alexitérica y con un potencial uso en fitomedicina. Se utilizó el veneno de *Bothrops diporus*, principal ofidio causante de accidentes en la Argentina, y para la optimización se recurrió al programa Desing Expert® 12. Se obtuvieron 11 proporciones de los distintos solventes de extracción (Agua, Etanol, Hexano) realizándose en cada uno de los extractos el dosaje de fenoles, flavonoides, y actividades biológicas *in vitro* como inhibición de la actividad hemolítica indirecta e inhibición de la actividad procoagulante del veneno de *B. diporus*.

El dosaje de fenoles totales y flavonoides se realizaron por medidas espectrofotométricas (Ding et al., 2016 con ligeras modificaciones; Lock et al., 2006; Ortega et al., 2016 respectivamente). Para las propiedades biológicas *in vitro*, se analizaron las actividades más representativas del veneno de *B. diporus*, considerando que un efecto inhibitorio de la actividad procoagulante y/o hemolítica indirecta por los extractos vegetales, justifica el uso tradicional de preparados a base de *C. pareira* para contrarrestar los efectos tóxicos del veneno. Se evaluaron los efectos de los extractos sobre la hemostasia, mediante el tiempo de coagulación (coagulómetro COL1 Wiener) y la Inhibición de la actividad hemolítica indirecta mediante placas de agar sangre-fosfatidilcolina (Gutiérrez et al, 1988; Otero et al, 1995).

Los valores encontrados en las determinaciones, fueron evaluados en el programa Desing Expert® 12, proyectando un extracto óptimo compuesto por 100% de etanol, con mayores concentraciones de bioactivos y una deseabilidad próxima a 1. Posteriormente se verificó los resultados obtenidos con el extracto optimizado, logrado corroborar la optimización de la extracción de bioactivos en el *C. pareira*.

2- Introducción

2-1 Accidentes ofídicos

En la actualidad los envenenamientos por mordedura de serpientes representan un problema de salud pública desatendido en muchos países tropicales y subtropicales, los accidentes ofídicos desde 2017 son considerados por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como una enfermedad tropical que “*causan aproximadamente entre 81.000 y 138.000 muertes al año, y alrededor del triple de casos de amputación y discapacidad permanente*” (OMS 2019). La mayoría de los casos de envenenamiento por mordeduras de serpiente se producen en África, Asia y Latinoamérica. En Asia se registran hasta 2 millones de reportes anuales de personas envenenadas por mordeduras de serpiente, mientras que en África se calcula que cada año hay 435000 a 580000 mordeduras que necesitan tratamiento.

Los individuos más expuestos a los accidentes ofídicos son las mujeres, niños y trabajadores rurales de comunidades pobres de países de ingresos bajos y medianos, la mayoría de ellos en países que disponen de sistemas de salud débiles y escasos recursos médicos, por ello el OMS se propuso como objetivo para el año 2030 disminuir al 50% la mortalidad y la discapacidad causadas por envenenamiento por mordeduras de serpiente, y esta estrategia se basa en cuatro pilares: empoderar a las comunidades y lograr su participación; reforzar los sistemas de salud; garantizar tratamientos eficaces y seguros; potenciar las alianzas, la coordinación, y aumentar los recursos (WHO, 2021).

En Argentina hay un promedio de 700 accidentes ofídicos por año, causados en un 98% por serpientes del género *Bothrops* (yará), estos accidentes en general tienen una mortalidad bastante baja (<1%) (De Roodt, 2015). La principal especie responsable es *B. diporus* Cope “yará chica”, “yará overa” la cual habita desde el norte de Entre Ríos hasta el sur de Paraguay y sudeste de Brasil y se la encuentra en ambientes un poco más secos o pedregosos que los de *B. alternatus*, la segunda en importancia médica. El cuerpo de *B. diporus*, de color castaño grisáceo a castaño rojizo, presenta un diseño de figuras laterales más oscuras trapezoidales o triangulares, que se unen en la línea dorsal media por su base menor; su vientre es blanquizco con manchas más oscuras (Figura 1).



Figura 1. *Bothrops diporus*: A: ejemplar adulto (Facultad de Veterinaria. UNNE). B: Características del diseño de cabeza y cuerpo.

Los venenos de ofidios son un pool de proteínas que, en el caso del género *Bothrops*, le confieren actividad proteolítica, coagulante y vasculotóxica. El accidente se caracteriza principalmente por un cuadro clínico local consistente en dolor, edema y sangrado que puede tener complicaciones locales como ampollas, infección y necrosis (Figura 2). Cuando el cuadro es grave, sistémico, se producen alteraciones en la coagulación y hemorragias en órganos y mucosas.



Figura 2. Accidente bothrónico. Fotos extraídas de: Ministerio de Salud de la Nación, Dirección Nacional de Determinantes de la Salud e Investigación. Disponible en https://www.toxicologia.org.ar/wp-content/uploads/2016/03/protocolos_envenenamientos_animales_tratamiento.pdf

2-2 Plantas alexitéricas- *Cissampelos pareira*

En la actualidad, el uso de las plantas en la medicina indígena y folklórica se halla en franca revalorización dado el vasto conocimiento ancestral aborigen que es acervo cultural abundante en la región del Nordeste Argentino (Chifa et al., 2014). Su interés ha sido avalado por la OMS como consecuencia del examen crítico de las propiedades atribuidas, cuya posible confirmación o rechazo permitiría, no solamente depurar dicha tradición, sino además poner a disposición de fármacos para ser aplicados en situaciones de emergencia (accidentes en regiones alejadas de centros de salud) mientras se espera la terapia de suero antiveneno (único tratamiento avalado por la OMS). Por lo mencionado, resulta relevante el estudio de nuevas drogas o fármacos preparados a partir de compuestos químicos de origen natural, los cuales podrían tener menor severidad de efectos secundarios a la vez que se validaría el uso etnofarmacológico.

Particularmente *Cissampelos pareira* L. (Menispermaceae), conocida vulgarmente como ka'apeva, ka'á-peva, ysyóp-morotí, caápebá, zarza, pareira brava, mil hombres, (Figura 3) ha sido utilizada en forma de decocción de raíces, el polvo o las semillas en cataplasma contra picaduras de víboras (Ricciardi et al., 1996). Según algunos cronistas de la época de la colonia:

-Hno P. de Montenegro: *es el más eficaz remedio que ellos usan en las mordeduras de todas las Serpientes... dando a beber su cocimiento y poniendo sus hojas molidas, o el polvo de su raíz sobre las heridas.* (sic) (Montenegro, 1945)

-Manfred: *el jugo externamente contra las picaduras de víboras* (sic) (Manfred, 1977).

-Jolis: *la negra es más eficaz cuando se come parte de sus hojas o se toma su polvo disuelto en un licor o se aplica machacada a la herida* (sic) (Jolis, 1972)

-González Torres: se toma la infusión de raíz y se aplica localmente cataplasmas de polvo o machacado de raíz y de hojas (sic). En Paraguay: el cocimiento de las raíces o el polvo en cataplasma se aplica contra picaduras de víboras. (González Torres, 1997)

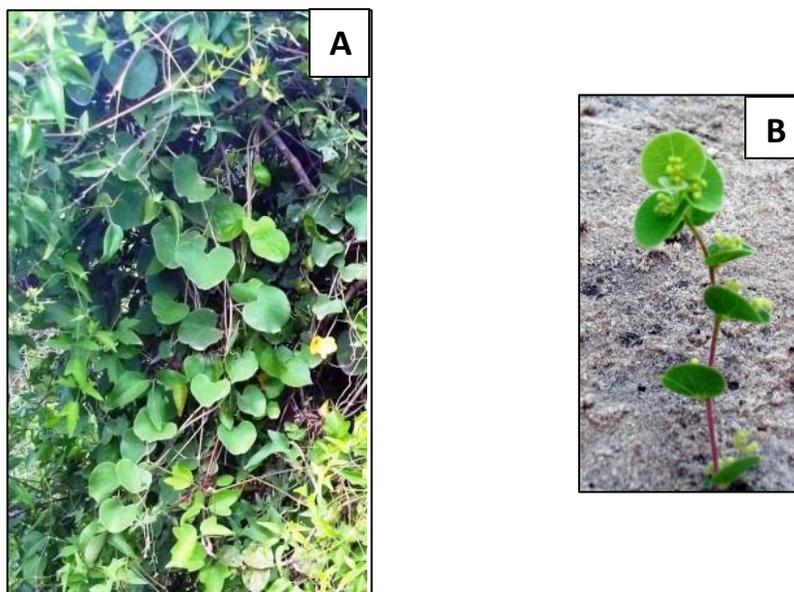


Figura 3. *Cissampelos pareira* L. ejemplar colectado en Paso de la Patria (Corrientes). A: planta entera; B: detalle de la floración.

En la medicina tradicional de la India se utiliza como antiveneno la decocción de sus raíces; las raíces machacadas sobre la picadura o la planta entera que también es utilizada en Pakistan. (Jain et al, 2005; Chakraborty et al., 2006; Sankaranarayanan et al., 2010; Jabeen et al., 2009).

En México se utiliza la planta completa, la cual se pulveriza en mortero, se hace hervir, y esta solución se ingiere por vía oral, como tratamiento contra el veneno de serpientes (Ramos Hernandez et al., 2007). La decocción acuosa de la raíz es empleada en muchos países tropicales para tratar mordeduras de serpientes y otros animales ponzoñosos (Morton, 1981). En Colombia las hojas y ocasionalmente los tallos en extracto alcohólico se dan como toma y la cocción de los mismos se aplica en cataplasma. Es interesante la coincidencia de uso como antiofídica en diferentes pueblos de Amazonía (Ecuador y Perú) y de Centroamérica (México y Guatemala) (Barranco Pérez, 2010).

La morbilidad y mortalidad por ofidismo varían ampliamente, tanto a nivel global como dentro de países y regiones, por razones que abarcan factores ecológicos (especies locales y comportamiento de las mismas) y sociales (actividades que pueden incrementar la probabilidad del encuentro hombre-serpiente, acceso a servicios médicos, etc). (MINSAL, 2014). Como se mencionó anteriormente, el único tratamiento eficaz hasta el momento para el accidente ofídico, es la administración de suero antiveneno (Resolución 132/2001 MINSAL) suero heterólogo (equino) que contiene anticuerpos específicos contra las toxinas que componen los venenos. Por ello, el suero antiveneno no está exento de riesgos y, además, según lo aclara el protocolo de la OMS, debe ser específico para los venenos de las serpientes de una determinada región; este requisito puede dificultar el escenario, ya que, por ejemplo, un antiveneno producido contra venenos de serpientes de una determinada región no sería efectivo contra venenos de serpientes de otra. (MINSAL, 2015).

Por otra parte, las especies vegetales pueden variar su composición química, debido a influencias edafoclimatológicas. Por ejemplo, en un estudio realizado en plantas de *C. pareira* de Costa Rica, lo único que ha sido científicamente comprobado con respecto a las propiedades alexitéricas de la especie es que, la planta entera en infusión acuosa al 10% tiene una actividad antihemorrágica y antiproteolítica contra el veneno de *B. asper* (Badilla et al., 2008). Desde este punto de vista, no se dispone de información científica sobre la composición ni la actividad de *C. pareira* autóctona de la región, excepto las ya publicadas por el grupo de investigación “Laboratorio de Productos Naturales Prof. Ricciardi” de la FaCENA que detectaron mayor actividad en extractos alcohólicos de hojas (Torres et al., 2007a; Torres et al., 2007b; Dellacassa et al. 2014; Ricciardi Verrastro et al., 2014a; Ricciardi Verrastro et al., 2014b; Ricciardi Verrastro et al., 2015), extracto que luego fuera separado por cromatografía flash obteniendo una fracción F4 polar, enriquecida en compuestos activos (flavonoides glicosilados).

2-3 Química de las plantas alexitéricas: Polifenoles

Las plantas sintetizan una gran variedad de productos secundarios y dentro de los fitometabolitos bioactivos de interés, se encuentran los compuestos fenólicos, polifenoles o fenilpropanoides (Isaza, 2007). Representan un grupo muy diverso de sustancias que comprende desde moléculas sencillas como los ácidos fenólicos, hasta polímeros complejos como los taninos condensados y lignina. Dentro de los compuestos fenólicos también se encuentran los flavonoides que constituyen un grupo importante de metabolitos secundarios presentes en el reino vegetal (Avalos y Pérez, 2009). Entre sus diversas funciones destacan la defensa contra predadores y patógenos, actuar como agentes alelopáticos (que son liberados para ejercer efectos sobre otras plantas), atraer a polinizadores o a los dispersores de las semillas, protección frente a la radiación UV, aportar estabilidad estructural en los tejidos y actuar como aislantes que impermeabilizan las paredes celulares. Por tanto, la mayoría de estas moléculas son bioactivas, interactúan con el medio ambiente y desempeñan un importante papel de protección contra el estrés abiótico y biótico en las plantas (Croteau et al., 2000). Existen dos vías principales de síntesis de compuestos fenólicos, una se denomina ruta del ácido shiquímico (Figura 4), y es en general la ruta dominante. También pueden obtenerse en menor medida a través de la ruta de síntesis de la malonil-coenzima A (también denominada ruta del ácido malónico); o por ambas rutas como en el caso de los flavonoides (Robbins, 2003; Tohge et al., 2013).

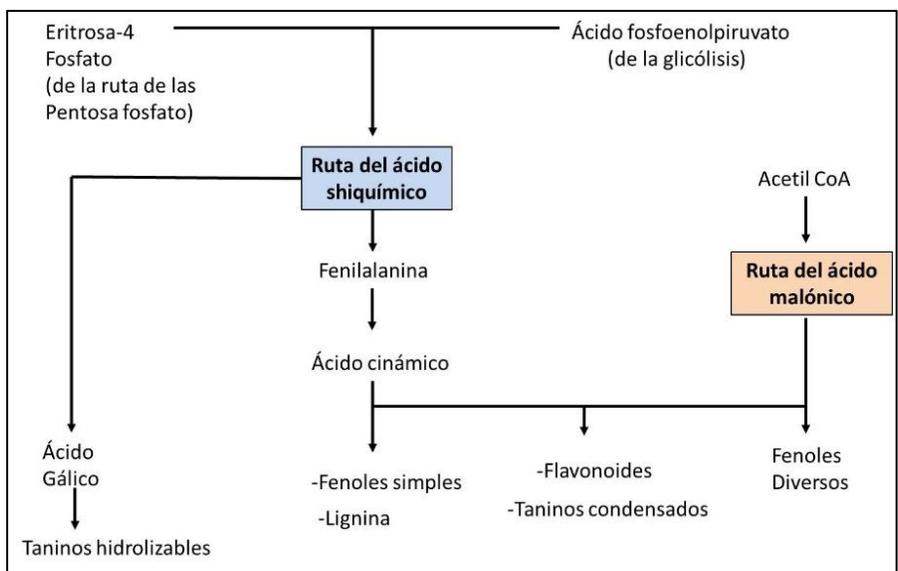


Figura 4. Rutas de síntesis de compuestos fenólicos en plantas (adaptado de Ábalos García 2009)

Los compuestos fenólicos se pueden clasificar en función del número de grupos fenoles que contienen (Figura 5), del número y tipo de grupo funcional que se une al anillo aromático y de los elementos estructurales que unen unos anillos a otros. De esta forma se puede distinguir entre los ácidos fenólicos, flavonoides, estilbenos y lignanos. Los flavonoides a su vez se dividen en flavonas, flavonoles, isoflavonas, flavanonas, antocianinas y flavanoles (catequinas y proantocianinas) (Manach et al., 2004).

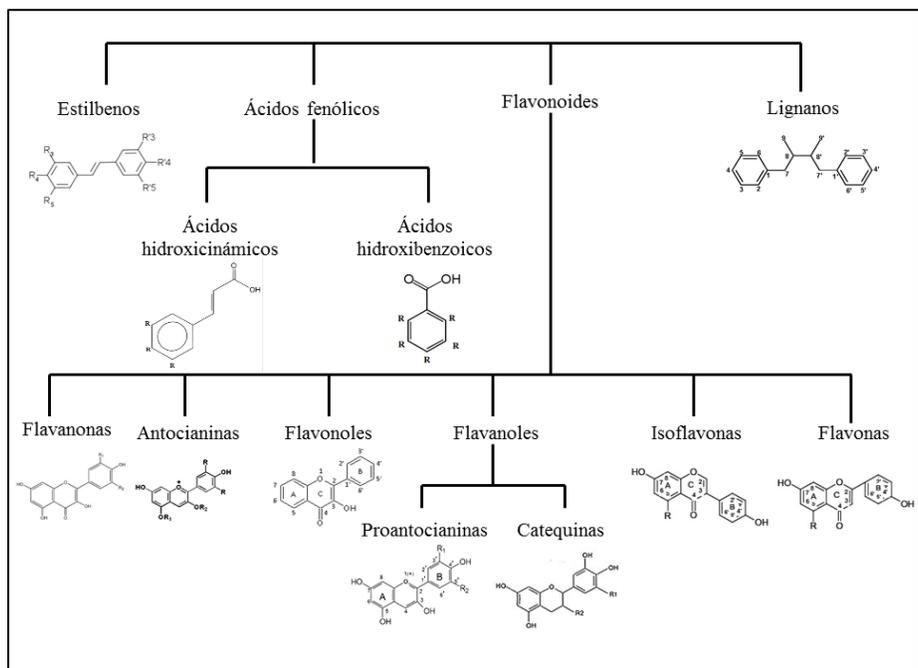


Figura 5. Representación esquemática de la clasificación de compuestos fenólicos basado en Manach et al. (2004). Cada grupo muestra su fórmula química general. (extraída de la tesis doctoral Santamaría)

La mayoría de estas sustancias de interés bioactivo y de sus precursores se sintetizan a través de la ruta del ácido shiquímico intermediario en la producción de los aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina y triptófano) y de un grupo de metabolitos secundarios conocidos como fenilpropanoides, en la cual se obtienen los ácidos cinámico y cumárico, precursores de lignina, flaonas, isoflavonas y flavonoides. (Figura 6).

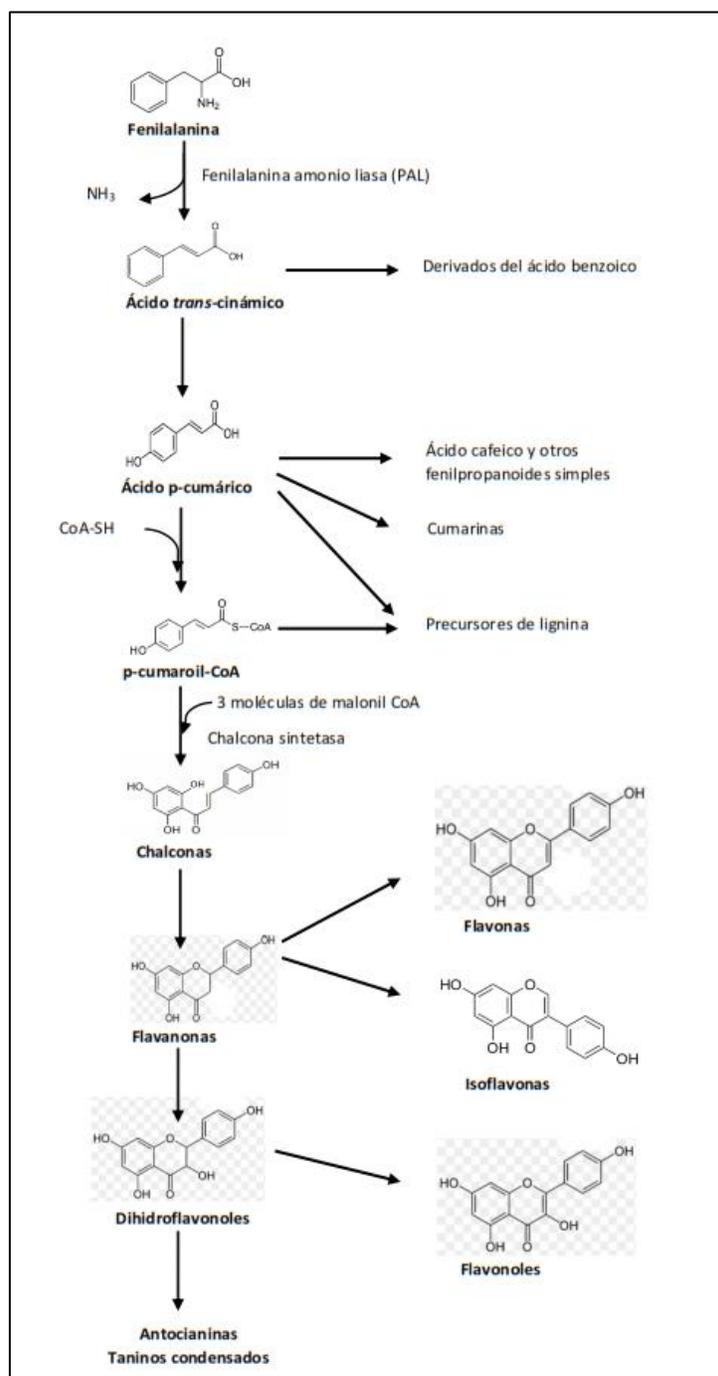


Figura 6. Ruta del ácido shiquímico: desaminación de fenilalanina y formación de ácidos cinámico y cumárico, precursores de lignina, flaonas, isoflavonas y flavonoides. (Adaptado de Ábalos García, 2009).

Nos encontramos con una gran diversidad de compuestos de interés que se pueden encontrar en la constitución de la planta de *Cissampelos pareira* L., teniendo en cuenta las distintas influencias edafoclimatológicas y la gran variante de condiciones que se pueden dar en una ruta metabólica. Esta gran diversidad de fitometabolitos requiere de un gran número de métodos de extracción, teniendo en cuenta los distintos matrices que se pueden dar al momento de preparación de los extractos y la finalidad de estos. Se debe tener además en cuenta el potencial uso en fitomedicina.

2-4 Métodos tradicionales de extracción de fitometabolitos

Para la extracción de fitometabolitos activos de un material vegetal se debe tener en cuenta que existen diferentes métodos, los cuales necesitan de un líquido extractivo que va a depender del procedimiento técnico y de la naturaleza química del principio activo a extraer, la porción de planta empleada, el rendimiento esperado, etc. Existe una gran variedad de métodos y combinaciones de métodos algunos de los cuales se resumen en la Figura 7.

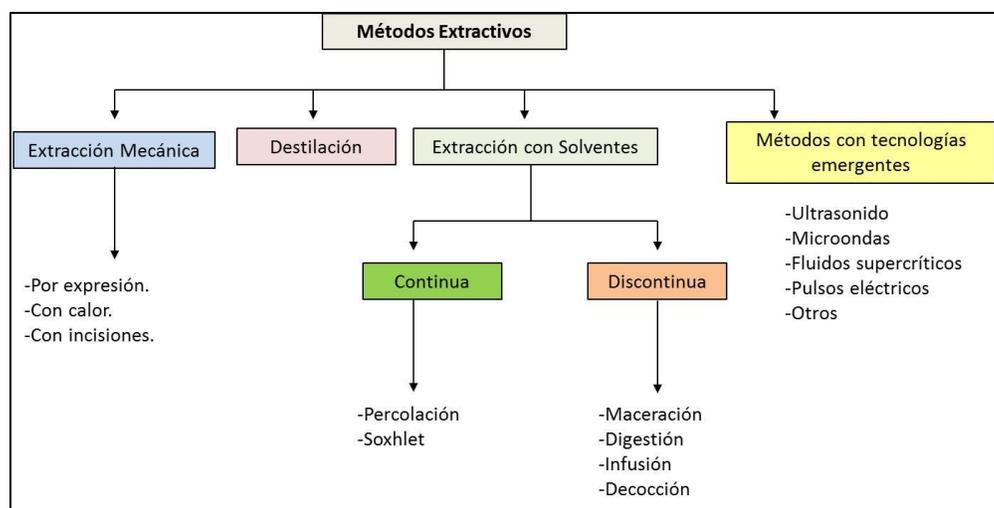


Figura 7. Clasificación de los métodos de obtención de extractos vegetales. Fuente (Kuklinski, 2003)

Se presentan a continuación una tabla (Tabla 1) indicando las características más importantes de los métodos tradicionales de extracción de fitometabolitos. En este trabajo de las actividades se realizaron mediante la extracción tradicional con solventes de polaridad variable.

Extracción por solvente: se separan los compuestos con base en sus solubilidades por dos líquidos inmiscibles, usualmente agua y un solvente orgánico. La introducción de un transductor ultrasónico dentro de la unidad de extracción, puede incrementar considerablemente la eficiencia del método, debido a que, por lo general, se utilizan solventes fríos (Vinatoru, 2001). Son parámetros determinantes la selección de solvente, temperatura o agitación con el fin de incrementar la solubilidad de los materiales y la tasa de transferencia de masa (Gao y Liu. 2005).

Método	Fundamento	Tiempo de proceso	Ventajas	Desventaja	Cita
Decocción o Cocimiento	Consiste en llevar a la mezcla de sustancias activa más el solvente (agua) a la temperatura de ebullición, manteniendo esta temperatura durante un período	15 a 30 min.	- Los pasos y cuidados son sencillos. - Bajo Costo.	- Pérdida de sustancias por volatilidad y reacciones al elevar la temperatura. - Método Discontinuo.	Prats Gravet et al., 1992
Infusión	Radica en verter agua hirviendo sobre la planta colocada en un recipiente de cierre bien ajustado, a fin de evitar la pérdida de principios activos, y se deja en reposo	5 a 15 min.	-Menos pérdida de sustancias volátiles (con relación al Cocimiento).	-No se extrae completamente los principios activos	Guerra, 2005. Soler Cano, et al., 2009
Maceración	Consiste en un contacto prolongado durante cierto tiempo de la planta con el solvente, constituyendo un conjunto homogéneamente mezclado en el cual el solvente actúa simultáneamente sobre toda la matriz, hasta producirse una concentración en equilibrio con la del contenido celular	Es diverso, oscila entre 12 horas y 15 días, dependiendo del solvente y del metabolito de interés.	-Procedimiento de extracción más simple. - Reducción de costos de solventes.	-No se extrae completamente los principios activos. -Lentitud del proceso. -Extracción incompleta. - Saturación del solvente	Prats Gravet et al., 1992 Voigt, 1982 Soler Cano, et al., 2009
Digestión	Es una maceración realizada a una temperatura suave que oscila alrededor de los 50 o 60° C	De 30 min a 24 horas.	-Mayor rendimiento de la extracción.	-Extracción incompleta. -Saturación del solvente	Prats Gravet et al., 1992 Carrión Jara, et al., 2010
Percolación	En este caso el agua, alcohol u otro disolvente atraviesa una columna llena de planta pulverizada, arrastrando durante el proceso los principios activos	24 horas.	- Extracción total de los principios activos. - Es posible conocer la concentración exacta de principios activos. -Menor tiempo para la extracción (comparado con la maceración). - No se produce saturación del solvente	- Menos adecuado en el caso de gran gelificación o si las sustancias a extraer son muy voluminosas. - Alto consumo de solventes.	Voigt, 1982

Tabla 1. Características principales de métodos tradicionales de extracción de fitometabolitos

2-5 Diseño experimental y superficie de respuesta

El diseño de un experimento es la secuencia completa de los pasos que se deben tomar de antemano, para planear y asegurar la obtención de toda la información relevante y adecuada al problema bajo investigación, la cual será analizada estadísticamente para obtener conclusiones válidas y objetivas con respecto a los objetivos planteados. (Nóchez et al., 2009). Sabiendo que es necesario realizar un diseño de mezcla, cuando se utiliza mezcla de solventes en un proceso extractivo con diferentes polaridades para diferentes compuestos a extraer; Cuando los factores analizados son componentes de una mezcla, sus niveles no son independientes entre sí, el espacio experimental es una figura que tiene tantos vértices como componentes, en un espacio cuya dimensionalidad es igual al número de componentes menos uno; la respuesta es una función de las proporciones de los componentes. (Cámara et al., 2016)

La Metodología de Superficie de Respuesta es un conjunto de técnicas matemáticas y estadísticas que son útiles para la modelización y análisis en aplicaciones en las que una respuesta de interés es influenciada por distintas variables y el objetivo es optimizar esta respuesta (García Díaz, 1995).

La MSR es la estrategia experimental y de análisis que permite resolver el problema de encontrar las condiciones de operación óptimas de un proceso, es decir, aquellas que dan por resultado “valores óptimos” de una o varias características de calidad del producto (Gutiérrez et al., 2008).

La superficie de respuesta permite que el investigador inspeccione de manera visual, la respuesta promedio para cierta zona de los niveles de los factores de interés y evaluar su sensibilidad a dichos factores.

La estrategia de análisis supone que el promedio de la variable de respuesta está en función de los niveles cuantitativos representados por los factores x_1, x_2, \dots, x_k . Los modelos polinomiales son los utilizados para efectuar una aproximación práctica a la función de respuesta verdadera o real (Cuesta, 2010; Santamaría Rubio, 2017). Los desarrollos incorporados hasta ahora en programas computacionales (por ejemplo, Design Expert® 12.0) permiten analizar fácilmente y en forma gráfica modelos polinomiales de primer (efectos lineales y de interacción) y de segundo orden (efectos lineales, cuadráticos y de interacción) (Cuesta, 2010; Santamaría Rubio, 2017). De los Diseños y modelos matemáticos para MSR, se busca el que mejor se ajusta al experimento, para ellos se tiene:

En los Diseños de Primer Orden: $y = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \beta_{12}x_{12} + \varepsilon$

Son diseños con propiedad de ortogonalidad. Se considera que un diseño es ortogonal cuando los coeficientes estimados en el modelo ajustado no están correlacionados entre sí.

En los diseños de Segundo Orden: $y = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \beta_{12}x_{12} + B_{11}x_1^2 + \beta_{22}x_2^2 + \varepsilon$

El objetivo primordial de esta etapa es modelar el comportamiento del proceso en una región muy precisa y relativamente pequeña (Cuesta, 2010; Santamaría Rubio, 2017). Se estima que el punto óptimo se encuentra dentro de la región experimental. Permite ajustar un modelo de 2° orden para estudiar además de los efectos lineales y de interacción, los efectos cuadráticos o de curvatura pura, modelo jerarquizado. (Argenti, 2018). Ver Figuras 8,9 y 10.

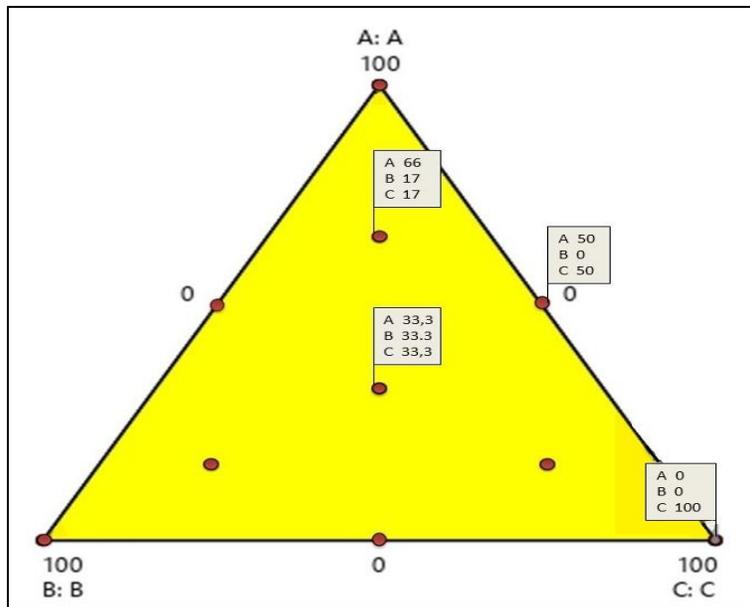


Figura 8. Triangulo de Respuesta en 2D con puntos del diseño (puntos rojos) y porcentaje de cada componente en 4 puntos marcados.

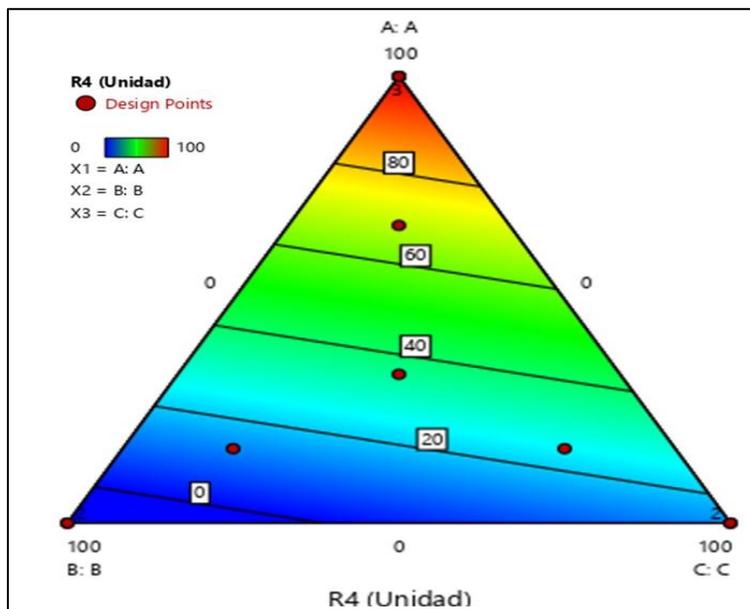


Figura 9. Triangulo de Respuesta en 2D con puntos del diseño (puntos rojos) y colores de interacción con la variable de interés que van desde azul 0 a rojo 100

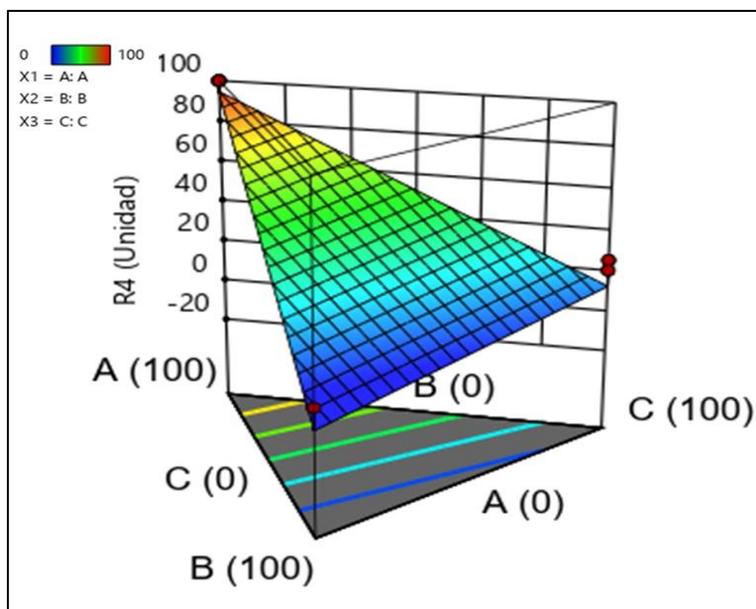


Figura 10. Triangulo de Respuesta en 3D, colores de interacción con la variable de interés que van desde azul 0 a rojo 100 y pendiente de interacción

Por todo lo expuesto, y teniendo en cuenta que, en nuestro país, los accidentes ofídicos son un grave problema de Salud Pública, siendo el género *Bothrops* responsable del 97% de los accidentes y, específicamente *B. diporus* del 80% (BEP, 2009), consideramos muy importante poder optimizar la técnica de extracción de componentes de efectiva actividad antiviviente en vista de una futura aplicación.

3-Objetivos general y particulares

Objetivo general:

-Contribuir al conocimiento fitoquímico y la quimiotaxonomía de especies autóctonas regionales, validando la actividad etnofarmacológica atribuida a la especie *Cissampelos pareira*, aportando información sobre la interacción entre extractos de plantas, con venenos animales de la región.

Objetivos particulares:

- Optimizar la extracción de fitometabolitos activos, mediante extracción sólido líquido variando la polaridad del solvente.
- Realizar un seguimiento bioguiado de los distintos extractos obtenidos a fin de comprobar la actividad biológica.

4- Hipótesis de trabajo

Mediante cambios en alguna condición de extracción como ser la polaridad del solvente, se puede extraer selectivamente los compuestos de interés a partir del material vegetal.

5- Materiales y métodos

5.1 Obtención de material vegetal

Se realizó una prospección del material vegetal en busca de poblaciones estables de *C. pareira*, encontrando crecimiento abundante a 35 km de la Capital correntina: Paso de la Patria (PP), departamento de San Cosme (27° 23' 27" S; 58° 35' 38" W) correspondiente al Dominio Chaqueño. Una vez individualizadas las poblaciones, se colectó un ejemplar para depósito en herbario de referencia con el número Torres, A.M.; Cano, B.; Ricciardi, B. y Ricciardi, G. 17(CTES). El resto del material se colectó en bolsas de arpillera (Figura 11) teniendo en cuenta la preservación de la especie y en el laboratorio se separaron sus partes constituyentes: partes aéreas consistentes en hojas y tallos; y se secó por venteo durante 72 h a temperatura ambiente.



Figura 11. Colección de material vegetal

5.2 Obtención del Veneno ofídico

Se obtuvo por expresión manual, siguiendo la técnica de ordeño, esto lo realizó personal capacitado del Serpentario de la ciudad de Corrientes (Figura 12). Teniendo la precaución que sea un pool de varios ejemplares de la especie *Bothrops diporus*, para evitar particularidades o variaciones genéticas. El veneno líquido así obtenido se deseca a presión reducida y se pesa. Se guarda en freezer a -20° C hasta el momento de uso.

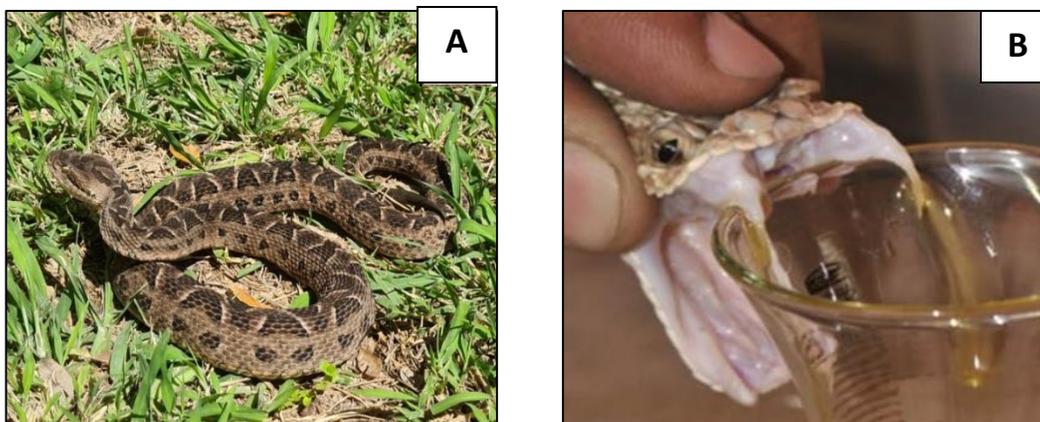


Figura 12. A-Bothrops diporus (Yarará Chica). B-Técnica de ordeño, extracción

5.3 Diseño experimental

Se utilizó el software Design Expert® 12.0 (Stat-Ease Inc) para el diseño de mezclas de solventes (Etanol, Agua, Hexano) en proporciones variables (0 a 100%). (Tabla 2). El software diseña un modelo simplex-centroide para evaluar el efecto de las proporciones relativas de los solventes en la mezcla sobre las variables de respuesta seleccionadas (contenido de fenoles totales, flavonoides, inhibición de la actividad coagulante e inhibición de la actividad de la enzima PLA2). Esta metodología establece un modelo de superficie de respuesta el cual evalúa las interacciones entre las variables para determinar la combinación óptima de solventes para maximizar/minimizar una respuesta dada. En el diseño propuesto para este trabajo, los factores considerados fueron los solventes y sus niveles fueron restringidos a que la suma de los tres debía dar 100 (Martínez-Ramos *et al.*, 2020). Por lo tanto, un diseño simplex-centroide de 3 componentes y 3 puntos adicionales fue seleccionado. Como resultado se obtuvo un esquema de trabajo que incluyó 11 mezclas con proporciones variables de solventes como se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2. Muestras: extractos del 1 al 11 teniendo en cuenta las proporciones de los solventes (Etanol, Agua, Hexano) arrojadas por el software Design Expert® 12.0 (Stat-EaseInc).

Mezcla	Etanol (%)	Agua (%)	Hexano (%)
1	0	100	0
2	17	17	66
3	50	50	0
4	100	0	0
5	50	0	50
6	17	66	17
7	0	50	50
8	100	0	0
9	0	0	100
10	34	33	33
11	66	17	17

Con cada una de las mezclas diseñadas se procedió a la preparación de extractos vegetales.

5.4 Preparación de Extractos vegetales

Se realizó molienda del material vegetal seco utilizando un molinillo (Numak F100) hasta obtener un material que pase tamiz 12 del material vegetal seco, dividiéndose en doce partes el material molido, la muestra 12 se guardó a -20°C en un sobre de papel de aluminio como material testigo para verificación posterior (Figura 13, 14).



Figura 13. Molinillo a hélice Numak, modelo F100 utilizado para moler el material vegetal.



Figura 14. Balanza analítica Shimadzu, modelo AUY220, con precisión de 0,1 mg, utilizado para la determinación de masa del material vegetal.

Se prepararon los extractos por maceración con agitación continua durante 48 h (Figura 15) en el solvente o mezcla correspondiente utilizando una proporción 7,5g:90ml (muestra: solvente), teniendo en cuenta las proporciones en mililitros de los distintos solventes de extracción, según la tabla 2.

Luego se filtraron al vacío con papel de filtro y se secó en rotavapor a presión reducida (Figura 16) Durante este proceso la temperatura no se superó los 50°C para evitar la pérdida de compuestos termolábiles y/o reacciones secundarias.



Figura 15. Instrumento utilizado para la agitación continua del material vegetal.



Figura 16. Rotavapor Buchi, modelo R-124, utilizado para el secado del material vegetal a presión reducida y temperatura controlada inferior a 50° C.

Los extractos secos (n=11) así obtenidos, se procedió al cálculo del rendimiento en peso seco y luego fueron guardados en desecador hasta su utilización.

5.5 Análisis fitoquímico

5.5.1 Fenoles Totales

Se realizó la determinación espectrofotométrica utilizando la técnica propuesta por Ding et al., 2016 con ligeras modificaciones. Se mezclaron 20 μL de extracto (1mg/mL) con 1,5 ml H_2O destilada y 100 μL Reactivo Folin-Ciocalteu, se dejó reaccionar 5 min y se agregaron 300 μL de solución Na_2CO_3 20 % (p/v), se incubó a 40°C durante 30 min y finalmente se midió la absorbancia a 765 nm utilizando un espectrofotómetro. Los resultados se expresan en mg de ácido gálico / g extracto, a

partir de una curva de calibración construida con ácido gálico en el rango de 0,1 a 0,7 mg/ml (miligramos de ácido gálico en mililitro de solución) (Figura 17)



Figura 17. Tubos de Ensayos con soluciones de los extractos y reactivos

5.5.2 Flavonoides Totales

Se realizó la determinación espectrofotométrica de flavonoides (Lock et al., 2006; Ortega et al., 2016). Para ello, se disolvió 1,2 mg de extracto seco en 0,1 ml de etanol al 80% hasta disolución total. En un matraz de 10 mL se agrega el extracto previamente disuelto, 3ml de etanol al 96%, 0,2ml de AlCl_3 al 10%, 0,2ml de acetato de potasio 1M y se lleva a volumen con etanol al 80%.

Se deja en reposo al resguardo de la luz por 40 min y se midió la absorbancia a 434 nm, calculando la concentración en base a la curva de calibración preparada con quercetina.



Figura 18. Espectrofotómetro Exylon UV-VIS y muestras empleadas determinación de flavonoides totales.

5.6 Propiedades biológicas *in vitro*:

5.6.1 Inhibición de la actividad coagulante del veneno

El veneno de *B. diporus* tiene propiedades coagulantes. Un efecto inhibitorio de la actividad coagulante de los extractos vegetales, justifica el uso tradicional de preparados a base de *C pareira* para contrarrestar los efectos tóxicos del veneno.

Para evaluar el efecto de los extractos sobre la hemostasia, se seleccionó como prueba de comparación, la medición del tiempo de coagulación mediante recalcificación de plasma citratado (Iovine et al., 1985). Para las determinaciones se trabajó con un coagulómetro semiautomático CoL1 de Wiener Lab (Figura 20).

Se obtuvo sangre anticoagulada con citrato de sodio 3,8% (relación 1+9) a partir de voluntarios sanos. Las muestras se centrifugaron durante 15 min a 5000 rpm, se separó el plasma y se preparó un pool. Se determinó:

-El tiempo de coagulación normal (TCN), se realizó agregando a 100 μ l de plasma, 100 μ l de CaCl_2 0,025M, dando como resultado 110 a 180 segundos (valores normales).

-El tiempo de coagulación del plasma + veneno (TCV), se realizó agregando a 100 μ l de plasma, 100 μ l de solución de veneno (1mg en 25ml PBS), obteniendo la Dosis Coagulante Mínima (DCM), la cual lleva el tiempo de coagulación del plasma a 1 min.

-El tiempo de coagulación veneno + extracto (TCv+e), se realizó agregando a 100 μ l de plasma, 100 μ l del sobrenadante del Extracto más veneno (E+V) (relación 1:30 veneno: extracto).

-Se realizaron además pruebas de control de veneno con los diferentes solventes (agua, etanol y hexano) para ver su efecto sobre la coagulación.

Todas las pruebas se realizaron por triplicado. En la figura 19, se presenta el esquema general de trabajo.

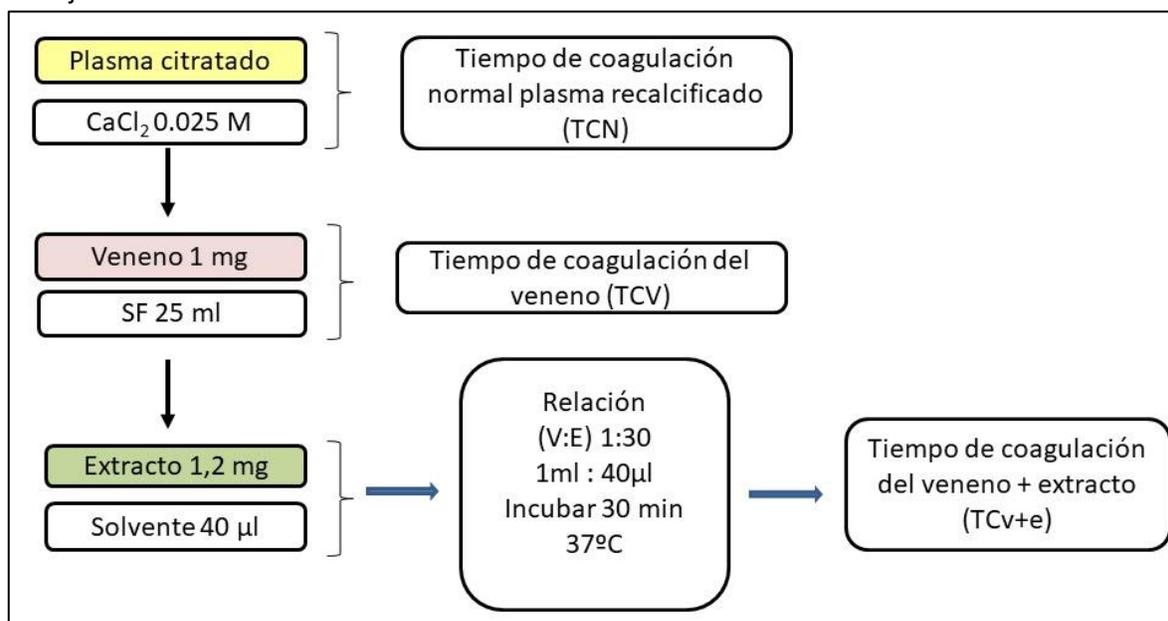


Figura 19. Esquema general de trabajo para la medición inhibición del tiempo de coagulación.



Figura 20. Coagulómetro Col1 de Wiener lab. utilizado para la determinación del tiempo de coagulación del plasma.

Si el tiempo de coagulación está cercano al de la DCM se considera que el extracto no tiene actividad. Cuanto más se acerca el tiempo al TCN mayor es la capacidad inhibitoria del extracto. Se considera como 100% de inhibición un TC de 500 segundos.

Los resultados se expresan como Inhibición porcentual, calculado como se indica a continuación:

$$\% \text{ Inh. Prom.} = \frac{t(s) \times 100}{500(s)}$$

t(s): TCv+e - TCV

500(s): tiempo considerado 100 % inhibición

5.6.2 Inhibición de la actividad hemolítica indirecta (Gutiérrez *et al.*, 1988; Otero *et al.*, 1995)

Se disolvieron 4,2 g de agar base Columbia en 100 ml de agua destilada (con el agregado de azida de sodio para evitar la contaminación) y se calentó a 80 °C hasta disolución completa.

Se preparó agar sangre-fosfatidilcolina mezclando 30 ml de la solución de agar templada a 37 °C; 1,5 ml de sangre entera anticoagulada con EDTA y 1,5 ml de yema de huevo. Se colocó en placa de Petri estéril y dejó solidificar a temperatura ambiente (Figura 21).

Se realizaron pocillos en el agar con varilla hueca de plástico (2 mm de diámetro). Se cargaron pocillos por triplicado con las muestras que se detallan:

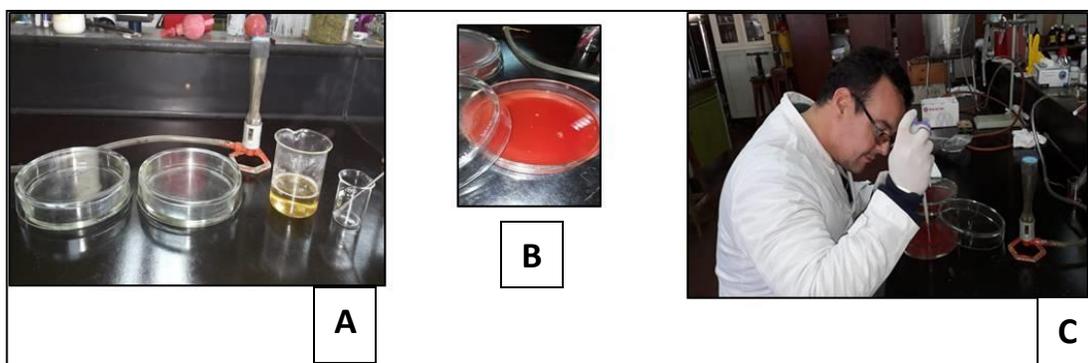


Figura 21. A: Preparación de las placas para la determinación de la inhibición hemolítica indirecta.

B: placa de agar sangre fosfatidilcolina preparada. C: Siembra de las distintas disoluciones

Dosis Hemolítica Mínima (MIHD): dosis que induce un halo de hemólisis de 10 mm luego de 20 h de incubación a 37 °C. Preparar distintas diluciones de veneno de manera de poder determinar la DHM

Colocar en cada pocillo 10 μ l de cada dilución de veneno por triplicado (50 μ g/ml, 25 μ g/ml, 12,5 μ g/ml, etc.); Incubar 20 h a 37 °C en cámara húmeda; Medir el halo de hemólisis.

5.6.3 Determinación de la capacidad neutralizante de los extractos

Los extractos se pesaron y disolvieron en el solvente adecuado; se preparó la dilución de veneno.

Se agregaron 5 ml de la dilución del veneno (MIHD) a cada extracto disuelto (según se indica en el cuadro de preparación de muestras), mezclando apropiadamente

Incubaron 30 min. a 37 °C (Largó la incubación de cada extracto + solución del veneno con 5 minutos de diferencia). Se sembraron 10 μ l del sobrenadante en cada pocillo respectivo de la placa; Incubaron 20 h a 37 °C en cámara húmeda; se midieron los halos de hemólisis.

Una reducción del halo de hemólisis con respecto al producido por la solución del veneno, indica inhibición *in vitro* de la actividad del veneno. Además, se sembraron los venenos con la proporción de solvente correspondiente, para evaluar el fenómeno de dilución.

Los ensayos de inhibición de la actividad hemolítica *in vitro* se realizaron por duplicado como mínimo.

Preparación de las muestras

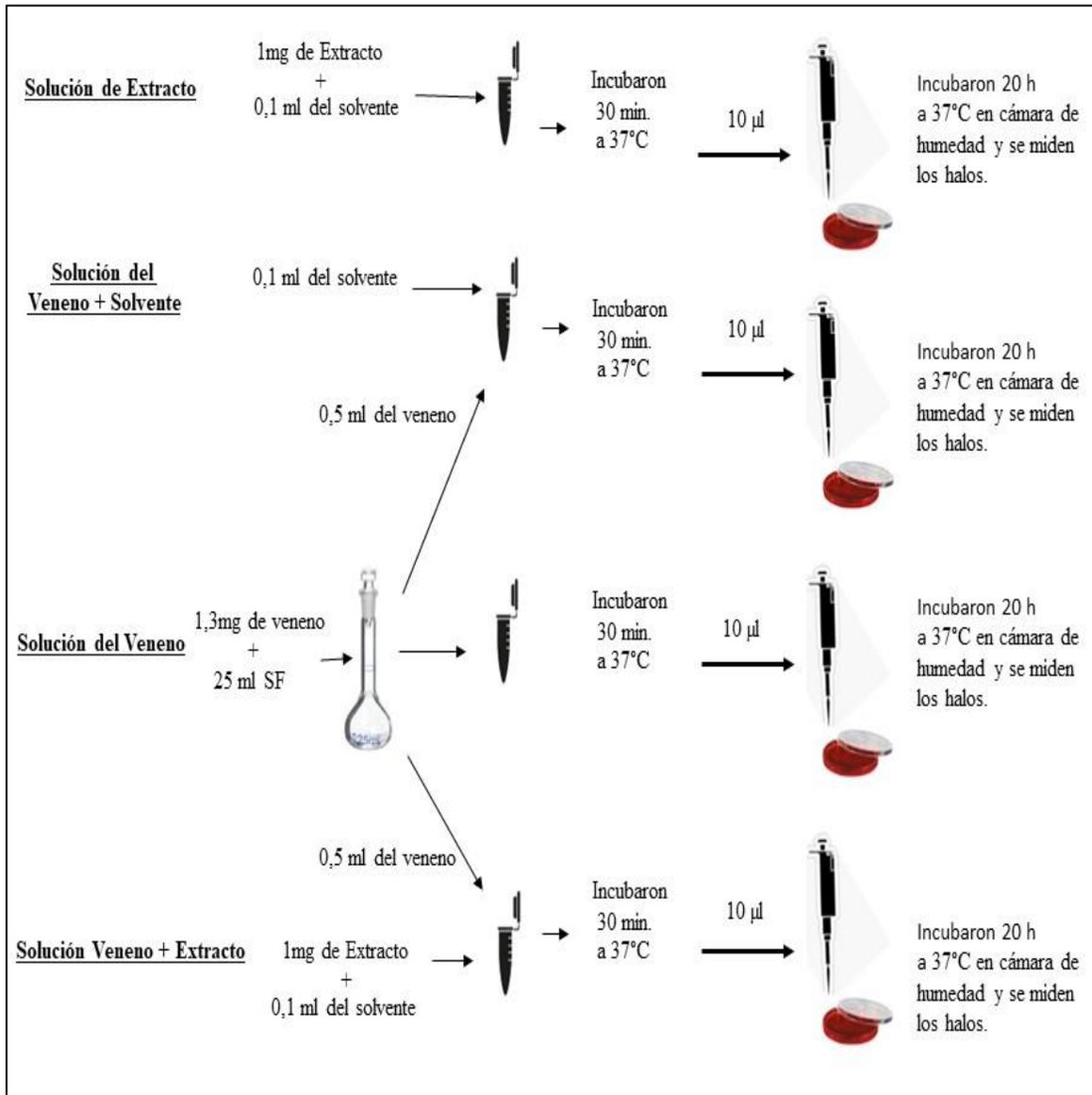


Figura 22. Metodología de trabajo

Relación veneno: extracto 1:20

Solución de extracto: 1 mg de extracto + 0,1 ml del solvente, de esta solución se sembraron 10 µl en el agar sangre-fosfatidilcolina.

Solución del veneno + solvente: 0,1 ml del solvente + 0,5 ml de solución del veneno, de esta solución se sembraron 10 µl en el agar sangre-fosfatidilcolina.

Solución del veneno: 1,3mg de veneno + 25 ml de Solución Fisiológica (SF), de esta solución se sembraron 10 µl en el agar sangre-fosfatidilcolina.

Solución veneno + extracto: 1mg del extracto en 0,1 ml del solvente + 0,5 ml de solución del veneno, esto se incubó 30 min. a 37 °C, de esta solución se sembraron 10 µl en el agar sangre-fosfatidilcolina.

Los extractos que muestran actividad deben ensayarse en otras relaciones mayores.

6-Resultados y Discusión

6.1 Rendimiento de la extracción

Se prepararon los 11 extractos de *Cissampelos pareira L.* según las proporciones con los distintos solventes de extracción (Tabla 2 de Materiales y Métodos), posteriormente se filtraron y desecaron al vacío obteniéndose el rendimiento porcentual. Ver Tabla 3.

Tabla 3: Extracto: Extractos de *Cissampelos pareira L.*; Masa de material vegetal(g): masa en gramos del material vegetal utilizado; Masa (g): masa en gramos de los extractos. Rendimiento (%): porcentaje del Rendimiento obtenido a partir del peso de los extractos y muestra original.

Extracto	Masa de material vegetal (g)	Masa (g) de extracto	Rendimiento (%)
1	7,5033	0,8689	11,6
2	7,5013	0,4959	6,6
3	7,5005	1,3122	17,5
4	7,5010	0,9259	12,3
5	7,5001	0,4559	6,1
6	7,5006	1,0731	14,3
7	7,5012	0,4567	6,1
8	7,5000	0,9022	12
9	7,5002	0,1679	2,24
10	7,5011	1,1645	15,5
11	7,5004	0,9061	12,1

A partir de los resultados hallados, se puede notar que la extracción de *Cissampelos pareira L.* correspondiente a la mezcla del 50% de agua y 50% de etanol, extracto 3, es la más efectiva, obteniendo un 17,5 % de rendimiento. Por el contrario, el de menor rendimiento es el correspondiente al solvente con 100% Hexano, extracto 9, obteniendo un 2,24 % de rendimiento. De acuerdo a los valores obtenidos, se podría adjudicar esas diferencias, que en el extracto 3, tanto el etanol como el agua disuelven sustancias inorgánicas y sustancias orgánicas polares, las mismas, al ser solventes polares y al estar mezclados, se ven favorecidas. Sin embargo, el extracto 9, es un solvente no polar, este va a disolver sustancias no polares como hidrocarburos, ceras, resinas, etc. Siendo que los últimos se encuentran en menor proporción a otras sustancias.

6.2 Fenoles Totales

Los fenoles del *Cissampelos pareira* están constituidos principalmente por polifenoles o fenilpropanoides o derivados, desde ácidos fenólicos hasta polifenoles complejos como taninos condensados y compuestos flavonoides (Njeru et al. 2015, Pradeep Kumar et al. 2013, Thavamani et al. 2013).

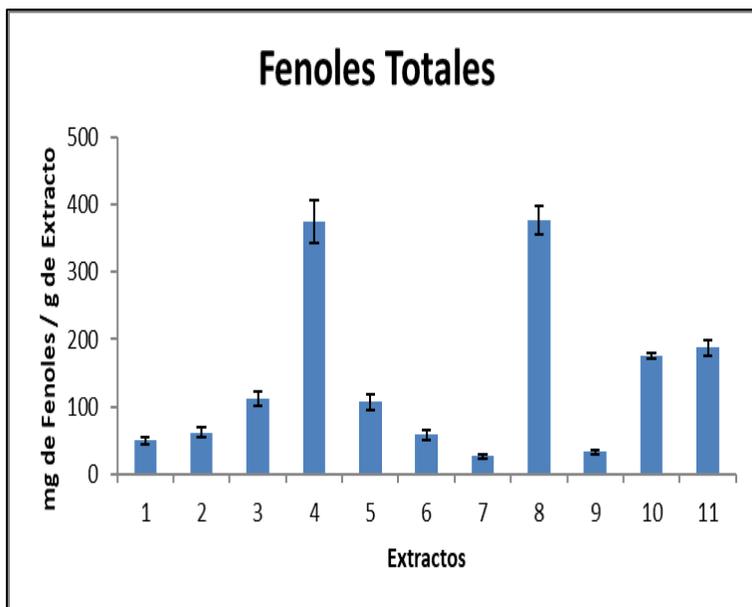


Figura 23. Contenido total de fenoles (expresado en mg de equivalente de ácido gálico/g de extracto seco) promedio a partir de los extractos de *Cissampelos pareira* y sus respectivas desviaciones estándar.

Las mezclas con mayor contenido de fenoles totales, fueron los extractos 4 y 8, esto podría asociarse a que el solvente extractivo es 100 % etanol, siendo este de la misma familia de alcoholes; seguidos por los extractos 11 y 10, los cuales son mezclas que contienen etanol, agua y hexano, los de menor contenido son los extractos 7 y 9, esto podría deberse a que el extracto 9 el solvente es 100% hexano, siendo este un solvente apolar y el extracto 7 el solvente es 50% agua y 50% hexano siendo este último un solvente apolar. Ver Figura 23.

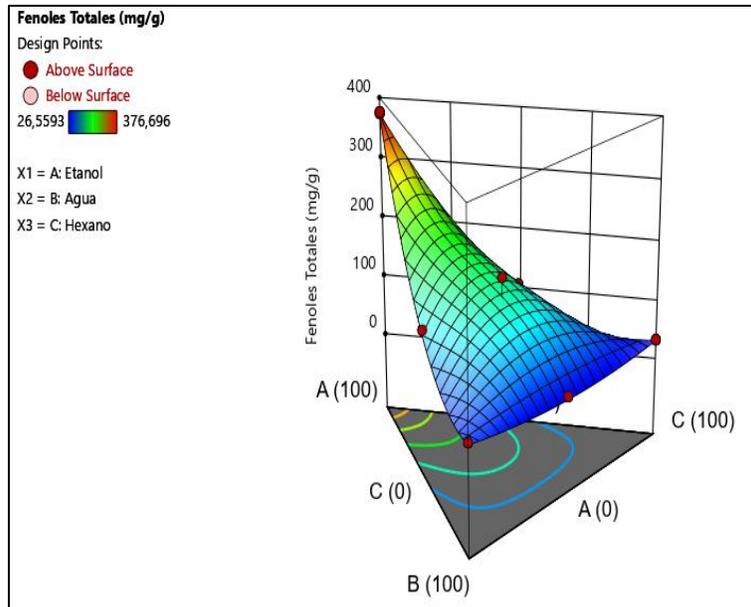


Figura 24. Triángulo de Respuesta en 3D de fenoles totales en mg/g de extracto, con los solventes A: Etanol, B: Agua y C: Hexano. Colores de interacción con la variable de interés que van desde azul mínimo a rojo máximo y pendiente de interacción.

Los resultados de modelos estadísticos propuestos para fenoles totales indican que el modelo Cúbico Especial sería significativo, encontrándose un valor de F de 44,27, existiendo solo un 0,13% de probabilidad de que un valor F tan grande se produzca debido a interferencias. En la figura 24 se observa la representación de la superficie de respuestas tridimensional para el modelo propuesto para extracción de fenoles totales, donde se observa que los máximos rendimientos se obtienen con soluciones ricas con etanol. Numerosos estudios indican que la extracción de compuestos fenólicos se ven favorecidos por extractos ricos en etanol (Soto-García y Castro. 2016), teniendo un valor máximo de 376,696 mg/g de extracto cuando el extracto se realizó con un 100% de etanol.

Por lo tanto, para obtener extractos ricos en compuestos polifenólicos a partir de *C. pareira* sería aconsejable preparar extractos con soluciones con alto contenido en etanol, teniendo además la ventaja de resultar adecuado al momento de eliminar el solvente por evaporación lo que permite obtener extractos libres de residuos de solventes orgánicos

6.3 Flavonoides Totales

Los flavonoides que se encuentran involucrados en la actividad antiviral en el *Cissampelos pareira* son, quercetina 3-O-soforosido [quercetina 3-O-β-D-glucosil-(1,2)-β-D-glucósido]; naringenin-7-O-β-D-glucósido; eriodictiol-7-O-β-D-glucósido; galangin-7-glucósido y baicaleín-7-O-glucósido (oroxina A)(Ricciardi Verrastro, 2020).

“Los flavonoides son metabolitos secundarios que se encuentran en todas las partes de las plantas, y cumplen una función protectora de ella y sus frutos. Así como estos compuestos tienen una función relevante en la planta, también cobran importancia farmacéutica” (García, 2016).

Los resultados en *C. pareira* se observan en la figura 25.

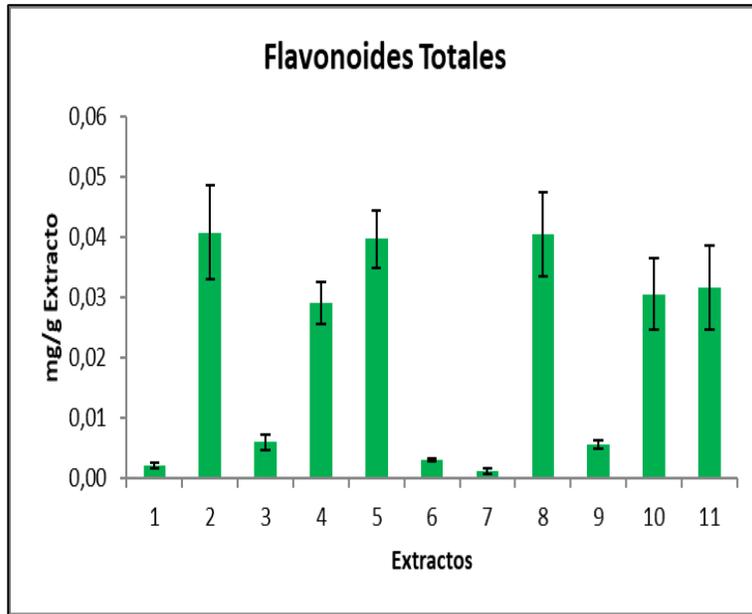


Figura 25. Contenido total de flavonoides (expresado en mg de equivalente de Quercetina /g de extracto seco) promedio a partir de los extractos de *Cissampelos pareira* Teniendo en cuenta las cuatro muestras, con sus respectivas desviaciones estándar

Las mezclas con mayor contenido de flavonoides, fueron los extractos 2, 8 y 5, el extracto 2 es una mezcla de 17% etanol, 17% agua y 66% hexano, el extracto 8 es 100% etanol y el 5 es 50% etanol y 50% hexano. Los extractos que se detectaron menos concentración de flavonoides son los extractos 7 y 1, siendo el extracto 7 una mezcla de 50% agua y 50% hexano y el extracto 1 es 100% agua.

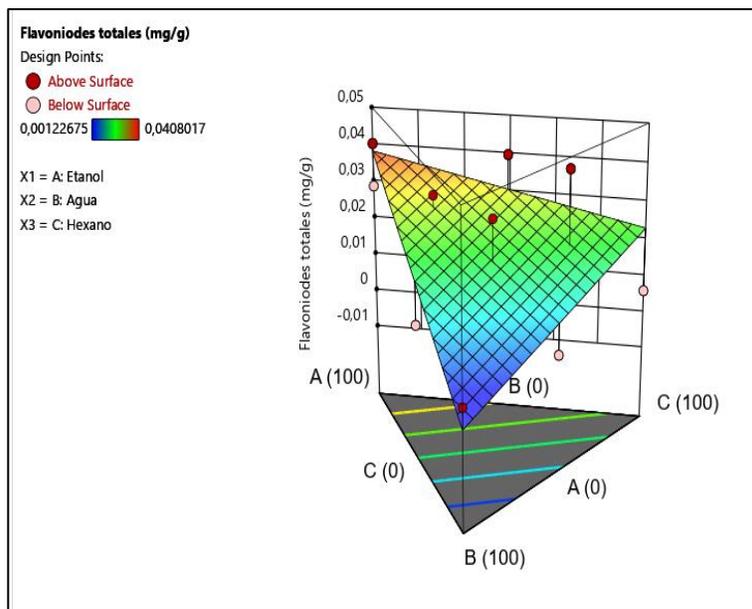


Figura 26. Análisis estadístico para flavonoides totales de *C. pareira*

Los resultados de modelos estadísticos propuestos para flavonoides, indican que el modelo lineal sería significativo, encontrándose un valor de F de 5,30, existiendo un 3,42% de probabilidad de que un valor F se produzca debido a interferencias. En la figura 26, podemos observar que se obtendría buenos rendimientos en mezclas compuestas por los solventes de hexano y etanol, en este caso es contradictorio a lo que dice “con el aumento de la concentración de etanol se incrementa el contenido de flavonoides...” (García et al., 2016) . dado que los flavonoides se extraen con mezclas etanolicas, esto podría deberse a que existe una extracción simultanea de flavonoides y otros compuestos que puedan reaccionar con el reactivo o con pigmentos coloreados amarillos que provocaría una sobre estimación en el método o por el tiempo de exposición con el solvente ya que a menor de 1,5h se obtienen mayores concentraciones(García et al., 2016) esto puede deberse a la degradación de los metabolitos , por este motivo sería interesante realizar la determinación de estos compuestos por otra metodología o modificando otros parámetros en la extracción.

6.4 Propiedades biológicas *in vitro*:

6.4.1 Inhibición de la actividad coagulante del veneno

El tiempo de coagulación normal del pool de plasmas fue de TCN= 194,33segundos (promedio de tres determinaciones) y el tiempo de coagulación del plasma con agregado de veneno TCV= 67,4 segundos (promedio de 5 determinaciones). Los tiempos de coagulación del veneno con los solventes agua y hexano no tuvieron ningún efecto significativo respecto al veneno (56,2 y 54,9 segundos respectivamente). En el caso del solvente etanol, produjo un 13.9% de inhibición, lo cual no resulta significativo ya que consideramos activo un extracto cuando produce como mínimo un 30% de inhibición.

Respecto a la capacidad de los extractos para producir la inhibición de la actividad coagulante del veneno (plasma con el agregado de los extractos preincubados con el veneno 30 minutos 37 °C) se detallan en la figura 27.

A diferencia de los resultados obtenidos por Saravia-Otten *et al.* (2017) quienes estudiaron la capacidad inhibitoria de la actividad coagulante de extractos etanólicos de raíces del *Cissampelo pareira* contra *B. asper*, encontrándose activos contra esta actividad, para las partes aéreas de la planta y coincidiendo con resultados de Ricciardi Verrastro et al. (2020).

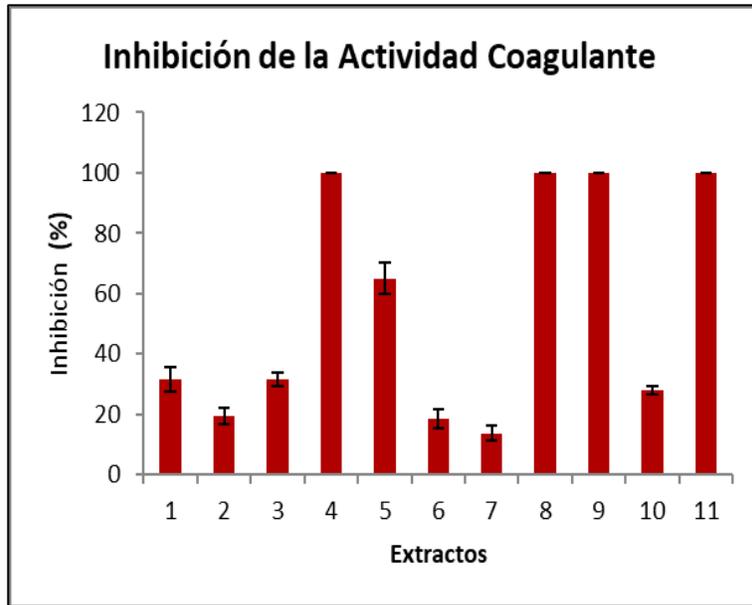


Figura 27. Porcentaje de Inhibición de la actividad coagulante de los extractos de *Cissampelos pareira* y sus respectivas desviaciones estándar.

Las mezclas con mayor inhibición de la actividad coagulante, fueron los extractos 4, 8, 9 y 11 (100%), luego el extracto 5 con un porcentaje de inhibición cercano al 65% y Los extractos con menor porcentaje de inhibición son los extractos 7, 2 y 6, siendo estos últimos menores que un 20%.

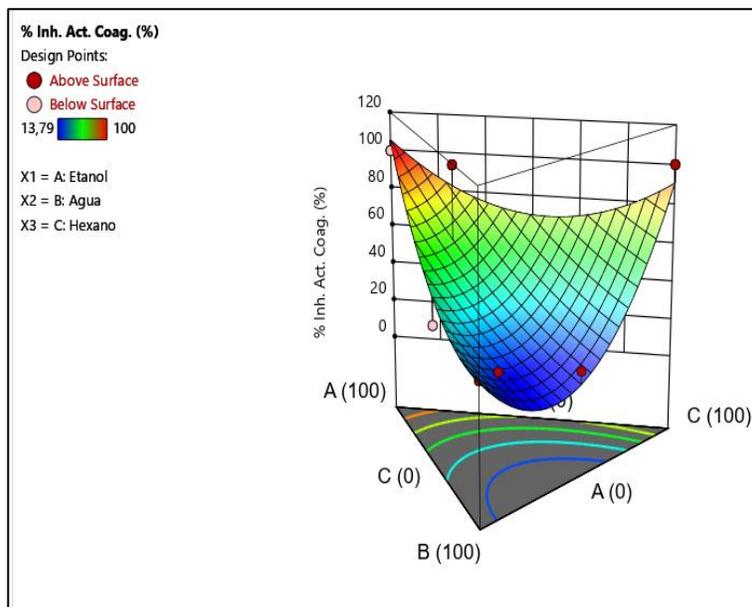


Figura 28. Análisis estadístico para la inhibición de la actividad coagulante por extractos de *C. pareira*

Los resultados del modelo estadístico propuesto para la Inhibición de la actividad coagulante indican que el modelo cuadrático sería significativo para este, encontrándose un valor de F de 4,71,

existiendo un 5,72% de probabilidad de que un valor F se produzca debido a interferencias. En la Figura 28, al interpretar el gráfico, se puede observar que tiene una pendiente ascendente hacia el máximo en el solvente etanol, obteniendo buenos rendimientos en dichas mezclas para la inhibición de actividad coagulante y una pendiente descendente hacia las mezclas con agua, siendo estas de bajos rendimientos de los mismos. Figura 28.

6.4.2 Inhibición de la actividad hemolítica

La actividad de la fosfolipasa A2 presente en el veneno de *B. diporus*, se evidencia por la formación de halos de hemólisis en la placa de agar sangre fosfatidilcolina (figura 29). Esto es debido a la actividad de la lisolecitina liberada por la PLA2 al actuar sobre la yema de huevo, con acción detergente sobre la membrana de los glóbulos rojos (Ricciardi Verrastro, 2020).

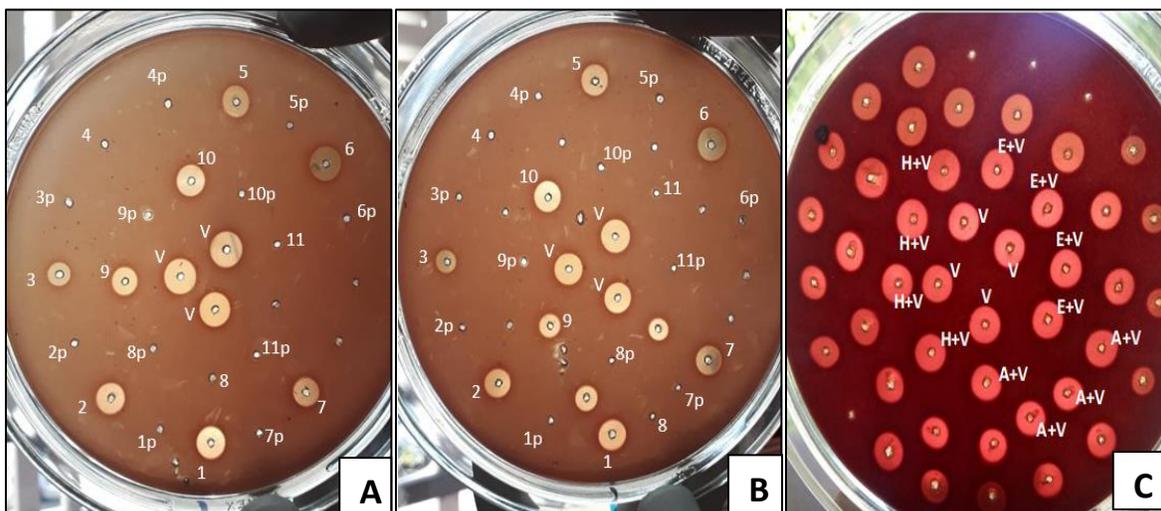


Figura 29. Inhibición de la actividad hemolítica indirecta in vitro por los extractos de *C. pareira*.
 Figura 29A: 1: Extracto 1 más veneno; 1p: Extracto solo; 2: Extracto 2 más veneno; 2p: Extracto solo; 3: Extracto 3 más veneno; 3p: Extracto solo; 4: Extracto 4 más veneno; 4p: Extracto solo; 5: Extracto 5 más veneno; 5p: Extracto solo; 6: Extracto 6 más veneno; 6p: Extracto solo; 7: Extracto 7 más veneno; 7p: Extracto solo; 8: Extracto 8 más veneno; 8p: Extracto solo; 9: Extracto 9 más veneno; 9p: Extracto solo; 10: Extracto 10 más veneno; 10p: Extracto solo; 11: Extracto 11 más veneno; 11p: Extracto solo; V: Veneno.
 Figura:29B: 1: Extracto 1 más veneno; 1p: Extracto solo; 2: Extracto 2 más veneno; 2p: Extracto solo; 3: Extracto 3 más veneno; 3p: Extracto solo; 4: Extracto 4 más veneno; 4p: Extracto solo; 5: Extracto 5 más veneno; 5p: Extracto solo; 6: Extracto 6 más veneno; 6p: Extracto solo; 7: Extracto 7 más veneno; 7p: Extracto solo; 8: Extracto 8 más veneno; 8p: Extracto solo; 9: Extracto 9 más veneno; 9p: Extracto solo; 10: Extracto 10 más veneno; 10p: Extracto solo; 11: Extracto 11 más veneno; 11p: Extracto solo; V: Veneno.
 Figura:29C: A+V: Agua más veneno; H+V: Hexano más veneno; E+V: Etanol más veneno; V: Veneno sin solventes.

Se considera activo un extracto cuando el halo de hemólisis que produce el V+E preincubados 30' a 37 °C es menor que el halo producido por la DHM del veneno solo.

Son 100% activos los extractos 4, 8 y 11, tienen mayor que 15% de actividad los extractos 3, 5, 7 y 9 y una actividad de 15% o menos los extractos 1, 2, 6 y 10 teniendo en cuenta la actividad del veneno puro V. (halo veneno en placa A: 10 mm; en B: 9mm). Figura 29.

Se realizaron las mismas pruebas con los extractos solos, para evidenciar si poseen actividad hemolítica *per se*, encontrándose que ninguno produce hemólisis, a excepción del extracto 9 (extracto del hexano) en donde se encontró una actividad mínima del 2,5 %.

El veneno adicionado con los solventes agua, hexano y etanol, dieron igual hemólisis que el veneno patrón (figura 29C)

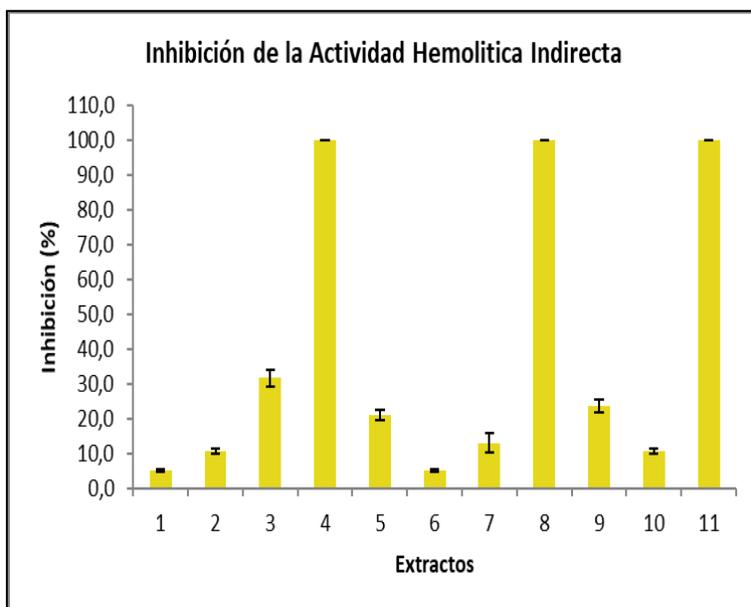


Figura 30. Porcentajes de Inhibición de la Actividad Hemolítica Indirecta de los extractos de *Cissampelos pareira* y sus respectivas desviaciones estándar

Las mezclas con mayor inhibición de la actividad hemolítica indirecta, fueron los extractos 4, 8 y 11 (100%), luego el extracto 3 con un porcentaje de inhibición cercano al 30%, los extractos 9 y 5 con un porcentaje de inhibición próximo al 20% y los extractos con menor porcentaje de inhibición son los extractos 1, 2, 6, 7 y 10, siendo estos últimos menores que un 15%. Figura 30.

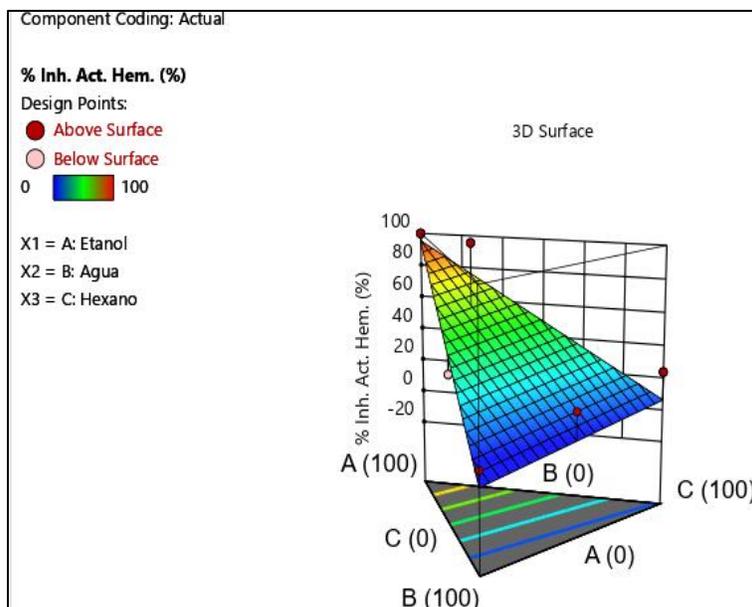


Figura 31. Análisis estadístico para la inhibición de la actividad hemolítica indirecta con extractos de *C. pareira*

Los resultados del modelo estadístico propuesto para la Inhibición de la actividad hemolítica indirecta con extractos de *C. pareira* indican que el modelo lineal sería significativo para este, encontrándose un valor de F de 13,77, existiendo un 0,26% de probabilidad de que un valor F se produzca debido a interferencias. En la figura 31, al interpretar el gráfico, se puede observar que tiene una pendiente ascendente hacia el máximo en el solvente etanol, obteniendo buenos rendimientos en dichas mezclas para la inhibición de actividad hemolítica indirecta y una pendiente descendente hacia las mezclas con agua y hexano, siendo estas de bajos rendimientos de los mismos.

6.5 Optimización

Con los datos obtenidos en forma experimental, el programa Desing Expert® 12, arroja dos soluciones para la optimización de la extracción (Tabla 4). La primera opción es con una composición del 100% de Etanol, 0% de agua y 0% de hexano, con una deseabilidad del 0,971. La segunda solución tiene una composición de 50% de etanol y 50% de agua, con una deseabilidad del 0,346. Ver Tabla 4.

Tabla 4. Soluciones provistas por el programa Desing Expert® 12, con sus Deseabilidades respectivas a cada solución propuesta.

Etanol	Agua	Hexano	Fenoles Totales mg/gExt.	Flavonoides Totales mg/gExt.	% Inh. Actividad Coagulante	% Inh. Actividad Hemolítica	Deseabilidad
100	0	0	373,22	0,038	105,426	95,731	0,971
50	50	0	103,55	0,017	45,988	45,665	0,346

Proporciones de los solventes (Etanol, Agua, Hexano) en porcentaje; Fenoles Totales mg/g Ext.: miligramos de equivalente de ácido gálico por gramos de extracto seco; Flavonoides Totales mg/gExt.: miligramos de equivalente de quercetina por gramos de extracto seco; % Inh. Actividad

Coagulante: Porcentaje de Inhibición de la actividad coagulante del veneno; % Inh. Actividad Hemolítica: Porcentaje de Inhibición de la actividad hemolítica indirecta del veneno; Deseabilidad.

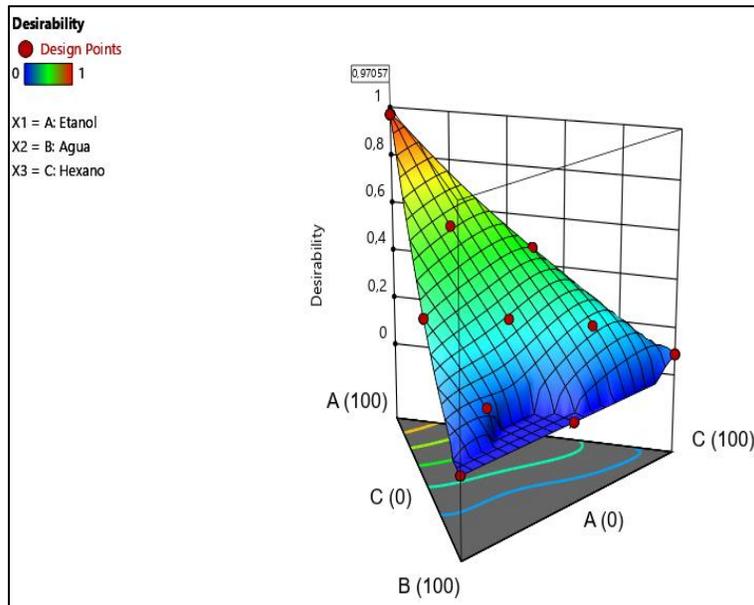


Figura 32. Gráfico de deseabilidad

En la figura 32, al interpretar el gráfico de deseabilidad, se puede observar que tiene una pendiente ascendente con un máximo en el solvente etanol, donde se obtendrían buenos rendimientos en dichas mezclas y una pendiente descendente hacia las mezclas con agua y hexano, siendo estas de bajos rendimientos.

Teniendo en cuenta los valores arrojados, se eligió la primera solución con una composición de 100% etanol y una deseabilidad próxima a 1. Donde se trabajó con la muestra testigo, utilizando la metodología antes descrita.

6.6 Pos Análisis y Validación

Predicción puntual y validación

Confianza bilateral = 95%

Tabla 5. Datos arrojados por Desing Expert y valores experimentales

	Media prevista	Mediana prevista	SD	Error Estándar de la Media	95% Intervalo de Confianza por bajo de la Media	Valor Experimental	95% Intervalo de Confianza por arriba de la Media
Fenoles Totales (mg/g Ext.)	373,218	373,218	24,4974	17,0449	325,894	332,22	420,542
Flavonoides totales (mg/g Ext.)	0,0384	0,0384	0,0125	0,0074	0,0212	0,0481	0,0555
% Inh. Act. Coag.	105,426	105,426	22,3838	15,5554	65,4391	100	145,412
% Inh. Act. Hem.	95,7308	95,7308	21,4397	12,7449	66,3411	100	125,121

Fenoles Totales mg/g Ext.: miligramos de equivalente de ácido gálico por gramos de extracto seco; Flavonoides Totales mg/gExt.: miligramos de equivalente de quercetina por gramos de extracto seco; % Inh. Actividad Coagulante: Porcentaje de Inhibición de la actividad coagulante del veneno; % Inh. Actividad Hemolítica: Porcentaje de Inhibición de la actividad hemolítica indirecta del veneno; Media prevista: Media esperada de los parámetros; Mediana prevista: Mediana esperada de los parámetros; SD: Desviaciones estándar esperada de los parámetros; Error Estándar de la Media; 95% Intervalo de Confianza por bajo de la Media; 95% Intervalo de Confianza por arriba de la Media; Valor Experimental: Valores experimentales promedios, obtenidos de las Tablas A10, A11, A12, A13.

Los valores experimentales con el extracto optimizado caen dentro del rango predicho por el modelo arrojado.

Nota: Con respecto a los valores porcentuales, se considera un máximo de 100%, valores superiores a estos carecen de interpretación biológica para este trabajo.

7- Conclusión

La extracción de fitometabolitos con potencial bioactivo a partir de plantas de uso tradicional presenta diversas particularidades que afectan la eficiencia del proceso. La extracción con solventes de polaridad variables, ha sido empelada durante mucho tiempo. Sin embargo, en la actualidad la búsqueda de métodos alternativos que aumenten la eficiencia y/o disminuyan la utilización de solventes representa un campo de estudio muy interesante.

La optimización del proceso de extracción utilizando diseño de mezclas es una alternativa racional para el desarrollo del proceso de extracción. En este trabajo utilizando el software Desing Expert®, se optimizó mediante mezcla de solventes, la extracción de fitometabolitos bioactivos contra veneno de *B. diporus* obtenidos a partir de *C. pareira*.

La evaluación del diseño mediante el análisis de respuestas asociadas a composición fitoquímica (contenido de fenoles y flavonoides totales) y actividad biológica *in vitro* (propiedades alexitéricas) permitió optimizar la selección del solvente que permitiese obtener extractos con elevado potencial bioactivo.

Los resultados indicaron que los extractos obtenidos con 100% de etanol serían los más indicados para extraer compuestos bioactivos del tipo polifenoles, particularmente flavonoides. Mediante ensayos de actividad alexitérica *in vitro* (inhibición de la actividad hemolítica e inhibición de la actividad coagulante) se logró comprobar la eficacia de los extractos obtenidos.

Bibliografía

- Avalos García, A., Pérez, E. (2009). *Metabolismo secundario de plantas. REDUCA (Biología)*,2(3).
- Argenti, P. (2018). *Metodología de Superficie de Respuesta*. Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de Salta, Provincia de Salta, Argentina. 24(4), 15-17. Disponible en <https://www.ing.unsa.edu.ar/docs/1jestadistica/03.pdf>
- Badilla, B., Chaves, F., Jimenez S., Rodriguez G, Poveda L. (2008). *Effects of an extract of Cissampelos pareira on the hemorrhagic and proteolytic activities from Bothrops asper venom*. *Pharmacogn.Mag.*, 4, 27-31.
- Barranco Pérez W. (2010). *Tesis de Magister en Bosques y conservación ambiental: Especies vegetales de uso antiofídico en las estribaciones de la Sierra Nevada de Santa Marta: inventario, etnobotánica y evaluación biológica*. Universidad Nacional de Colombia. Sede Medellín. Facultad de Ciencias Agropecuarias.
- Boletín Epidemiológico Periódico (BET). (2009). *Envenenamiento por animales ponzoñosos*, Ministerio de Salud, Presidencia de la Nación Argentina.
- Cámara, M., De Zan, M., Vera Candioti, L., Goicoechea, H. (2016) . *Diseño experimental y optimización de sistemas con múltiples respuestas*. Cátedra de química analítica I.
- Carrión Jara, A., García Gómez, C. (2010). *Preparación De Extractos Vegetales: Determinación De Eficiencia De Metódica*. Universidad De Cuenca, Tesis previa a la obtención del título de Bioquímica y Farmecéutica, 27-31. Disponible en <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/2483/1/tq1005.pdf>
- Chakraborty, M., Bhattacharjee, A. (2006). *Some common ethnomedicinal uses of various diseases in Purulia district, West Bengal*. *Indian Journal of Traditional Knowledge*, 5, 554-558.
- Chifa, C., Ricciardi, A. (2014). *Las plantas medicinales del nordeste argentino en las crónicas de la época de la colonia*. Ediciones Elemento.
- Pradeep Kumar, C., Sachin, J. (2013). *Extraction and isolation of bioactive compounds from Ficus racemosa bark and Cissampelos pareira root by chromatographic techniques*. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 20(2), 101-106.
- Croteau, R., Kutchan, T., Lewis, N. (2000). *Natural products (secondary metabolites). Biochemistry and molecular biology of plants*, American Society of Plant Physiologists, Rock Ville. 1250-1318.
- Cuesta, A. (2010). *Metodología de Superficies de Respuesta, gran alternativa para incrementar la productividad de sus procesos*. 572, 23. Disponible en <http://www.cicalidad.com/articulos/RSM.pdf>
- De Roodt, A. (2015). *Ofidismo. Serie: salud ambiental en pocas palabras*. Ministerio de Salud, Presidencia de la Nación. 3. Disponible en

https://www.msal.gob.ar/images/stories/ryc/graficos/0000001300cnt-0000001162cnt-3_ofidismo.pdf

- Dellacassa, E., Torres, A., Ricciardi, G., Camargo, F., Tressens, S., Ricciardi, A. (2014). *Anti-venom Activity of Medicinal Plants from South America. Vol. 2 the book series Utilisation and Management of Medicinal Plants*. Daya Publication House, New Delhi.
- Dey, A., De, J. (2012). *Traditional use of plants against snakebite in Indian Subcontinent: a review of the recent literatura*. Afr. J. Tradit. Complement Altern. Med. 9 (1): 153-174.
- Ding, Y., Zhu, Z., Zhao, J., Nie, Y., Zhang, Y., Sheng, J., Meng, D., Mao, H., & Tang, X. (2016). *Effects of Postharvest Brassinolide Treatment on the Metabolism of White Button Mushroom (Agaricus bisporus) in Relation to Development of Browning During Storage*. Food and Bioprocess Technology, 9(8), 1327-1334. Disponible en <https://doi.org/10.1007/s11947-016-1722-1>
- Gao, M., Liu, C. (2005). *Comparison techniques for the extraction of flavonoides from cultures cells of Sausurea medusa Maxim*. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 21, 1461-1463.
- García Díaz, A., Phillips, D. (1995). *Principles of Experimental Design and Analysis*, Chapman and Hall; New York. 409.
- García, Y., Izquierdo, S., Acosta Esquijarro, J., Romero Díaz, A., López, M., Mercado Vidal, J. (2016). *Optimization of variables for extraction of flavonoids from Annona muricata L. leaves*. Revista Cubana de Plantas Medicinales, 21(3), 298-308.
- González Torres, D. (1997). *Catálogo de Plantas Medicinales (y alimenticias y útiles) Usadas en Paraguay*. Asunción. Servilibro. 51, 258.
- Guerra, E. (2005). *Obtención, caracterización y evaluación de las propiedades fisicoquímicas de los extractos fluidos, blandos y secos así como de las tinturas del rizoma y de la fronda de calahuala (phlebodium pseudoaureum) a nivel de laboratorio*. Universidad De San Carlos De Guatemala, 1(1), 55-60. Disponible en http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/08/08_0951_Q.pdf
- Gutierrez, J., Avila 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 Pulido, H., De la Vara Salazar, R. (2008). *Análisis y Diseño de Experimentos segunda edición*, Mc Graw Hill, México.
- Henry García, Y., Salomón Izquierdo, S., Acosta Esquijarro, J., Romero Díaz, A., López, M., & Mercado Vidal, J. (2017). *Optimización de las variables de extracción de flavonoides a partir de hojas de Annona muricata L.*. Revista Cubana de Plantas Medicinales, 21(3). Disponible en <http://www.revplantasmedicinales.sld.cu/index.php/pla/article/view/363>
- Iovine, E., Selva, A. (1985). *El laboratorio en la práctica clínica*. 3° Edición. Panamericana. 168-169.
- Isaza, M. (2007). *Taninos o polifenoles vegetales*. Scientia et Technica, 1(33), 13-18.
- Jabeen, A., Khan, M. Ahmad, M., Zafar, M.; Ahmad, F. (2009). *Indigenous uses of economically important flora of Margallah Hills National Park, Islamabad, Pakistan*. African Journal of Biotechnology, 8(5), 763-784.

- Jain, A., Katewa, S., Galav, P., Sharma, P. (2005). *Medicinal plant diversity of Sitamata wild life sanctuary, Rajasthan, India*. Journal of Ethnopharmacology, (102), 143-157.
- Jolís J. (1972). *Ensayo sobre la historia natural del Gran Chaco. Faenza 1789*, Traducción de Ma. L. Acuña, edición UNNE (Resistencia). Traducida y editada con el título de Ensayo sobre la Historia natural del Gran Chaco en 1972.
- Kuklinski, K. (2003). *Farmacognosia: Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural*. Barcelona: Omega. S.A., Barcelona 2000. ISBN 84-282-1191-4.
- Lock, O., Cabello I., Doroteo V. (2006). *Análisis de flavonoides en plantas*. Disponible en www.iupac.org/publications/cd/medicinal_chemistry
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., Jiménez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American journal of clinical nutrition*, 79(5), 727-747.
- Manfred I. (1977). *7000 Recetas botánicas a base de plantas medicinales*, Buenos Aires-Argentina, II.ª, Ed. Kier
- MINSAL (2001). Resolución 132/2001 disponible en <http://servicios.infoleg.gob.ar/infolegInternet/anexos/65000-69999/66255/norma.htm>
- Montenegro, P. reedición (2007). *Materia Médica Misionera*. Editorial Universitaria, Universidad Nacional de Misiones.
- Morton, J. (1981). *Atlas of medicinal plants of Middle America*. Bahamas to Yucatan. Springfield: Charles Thomas.
- Njeru, S., Obonyo, M., Onsarigo, S., Ngari, S. (2015). Bioactivity of *Cissampelos pareira* medicinal plant against *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 3,167-173.
- Nóchez, J., Ventura, A. (2009). *Metodología de Superficie de Respuesta (MSR), conceptos y aplicación para obtener el valor óptimo en un experimento*. Facultad de Ciencias Naturales y Matemática. Universidad del Salvador. 186.
- Ortega Villarreal, A., López Hernández, A., González Martínez, B. (2016). *Determinación del contenido de compuestos fenólicos presentes en extractos alcohólicos de semilla de chía (Salvia hispánicaL.)*. Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos. 1, No. 2 424-429.
- Otero, R., Nuñez, V., Osorio, R., Gutiérrez, J., Giraldo, C., Posada, L. (1995). *Ability of six Latin American antivenoms to neutralize the venom of Mapana equis (Bothrops atrox) from Antioquia and Chocó (Colombia)*. *Toxicon* 33, 809-815.
- Prats Gravet, S., Rodríguez Galán, I., Roig Montblanch, A., Salazar Macián, R., Salvado Lladós M., Selles Flores, E., Sánchez Morcillo, J., Solan Marsa, C., Suiñe Negre, J., Tico Grau J. (1992). *Tratado de Farmacia Galénica*, Madrid.
- Ramos Hernández M., Avila Bello C., Morales Mávil J. (2007). *Etnobotánica y ecología de plantas utilizadas por tres curanderos contra la mordedura de serpientes en la región de Acayucan, Veracr Galav uz, México*. Bol.Soc.Bot.Mex. 81, 91-102.
- Ricciardi A., Caballero E., Chifa C. (1996). *Identificación botánica de plantas descritas en "Materia Médica Misionera" usadas en accidentes ofídicos*. *Rojasiana*, 3 (2), 239-245.

- Ricciardi Verrastro, B, Torres, A., Dellacassa, E. (2014b). Extractos de *Cissampelos pareira*: inhibidores de la actividad coagulante del veneno de *Bothrops diporus*. XLVI Reunión Anual SAFE- Corrientes. 43.
- Ricciardi Verrastro, B., Dellacassa, E., Torres, A. (2015). *Inhibición de la actividad letal del veneno de Bothrops diporus por extractos de Cissampelos pareira*. Comunicaciones Científicas y Tecnológicas CE52. UNNE. Resistencia, Chaco.
- Ricciardi Verrastro, B., Torres, A, Dellacassa E. (2014a). *Diferencias estacionales en la inhibición de la enzima fosfolipasa A2 del veneno de Bothrops diporus por extractos de Cissampelos pareira*. Comunicaciones científicas y tecnológicas. CE 028. UNNE. Corrientes.
- Ricciardi Verrastro, B. V. (2020). *Trabajo de Tesis para acceder al Título de Doctora de la UNNE en Química "Evaluación fitoquímica y biológica (actividades antimicrobiana y alexitérica) de extractos de Cissampelos pareira"*.
- Robbins, R. (2003). *Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology*. J. Agric. Food Chem. Vol. 51, 2866-2887.
- Sankaranarayanan, S., Bama, P., Ramachandran, J., Kalaichelvan, P., Deccaraman, M., Vijayalakshimi, M., Dhamotharan, R., Dananjeyan, B., SathyaBama S. (2010). *Ethnobotanical study of medicinal plants used by traditional users in Villupuram district of Tamil Nadu, India*. Journal of Medicinal Plants Research, 4(12), 1089-1101.
- Santamaría Rubio, L. (2017). *Identificación de reductasas de ácidos hidroxicinámicos y sus derivados en Lactobacillus plantarum WCFS1*. 4.
- Saravia-Otten, P., Hernández, R., Marroquín, N., García, G., Mérida, M., Cruz, S., Orozco, N., Cáceres, A., & Gutiérrez, J. M. (2017). *Inhibición de los efectos coagulante, fosfolipasa A2 y proteolítico del veneno de Bothrops asper por plantas usadas tradicionalmente en Centroamérica*. Ciencia, Tecnología Y Salud, 4(2), 203–216. Disponible en <https://doi.org/10.36829/63CTS.v4i2.355>
- Soler Cano, D., Macías Bestard, L., Pereira Relis, D., Dranguet Olivero, L., Guzmán Guzmán, L., Calzada Rodríguez, A. (2009). *Farmacología de las plantas medicinales*. Revista Información Científica, 61(1). Disponible en <http://www.revinfcientifica.sld.cu/index.php/ric/article/view/1213/2391>
- Sospeter Ngoci, N., Meshack A. Obonyo, S., Nyambati, Silas M. Ngari. (2015). *Bioactividad de la planta medicinal Cissampelos pareira contra Mycobacterium tuberculosis*. J Pharmacogn Phytochem 3(6), 167-173
- Soto García, M., Rosales Castro, M., (2016). *Efecto del solvente y de la relación masa/solvente, sobre la extracción de compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante de extractos de corteza de Pinus durangensis y Quercus sideroxylla*. Disponible en https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-221X2016000400017
- Thavamani, B., Mathew, M., Dhanabal, S. (2013). *Pharmacognostical Studies of Cissampelos pareira*. Biosciences, Biotechnology Research Asia, 10, 909-912.

- Tohge, T., Watanabe, M., Hoefgen, R., Fernie, A. (2013). La evolución del metabolismo fenilpropanoide en el linaje verde. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* doi: 10.3109 / 10409238.2012.758083. [Publicación electrónica antes de la impresión].
- Torres, A., Camargo, F., Ricciardi, G., Dellacassa, E., Ricciardi, A. (2007a). Study of antihemolytic activity of *Cissampelos pareira* extract against poison of *Bothrops neuwiedi diporus* (COPE) (yará chica). BLACPMA, Universidad de Santiago de Chile-Chile, 6, 280-281.
- Torres, A., Camargo, F., Ricciardi, G., Dellacassa, E., Ricciardi, A. (2007 b). Estudio de la actividad antihemolítica de extractos de *Cissampelos pareira* contra veneno de *Bothrops neuwiedi diporus* (COPE) (yará chica), IX Simposio Argentino de Farmacobotánica, XII Simposio Latinoamericano de Farmacobotánica, Tucumán-Argentina, julio.
- Torres, A., Camargo, F., Ricciardi Verrastro, B., Ricciardi, G. y Dellacassa, E. (2015). *Plantas como antiveneno: del mito al logos*. Ediciones Universitarias.
- Vinatoru, M. (2001). *An overview of the ultrasonically assisted extraxtion of bioactive principles from herbs*. Ultrasonics Sonochemistry. 8, 303-313.
- Voigt R., *Tratado de tecnología Farmacéutica*. España: Acriba, 1982
- WHO, (2021) disponible en <https://www.who.int/es/news-room/factsheets/detail/snakebite-envenoming>

ANEXO

Determinación Fenoles Totales

Curva de Calibración de Fenoles Totales

Se prepararon soluciones estándar de ácido gálico para la determinación de la curva de calibración. Lectura a 765nm. Ver Tabla y figuraA1.

Tabla A1. Curva de calibración con ácido gálico

mg/ml	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Abs
0,1	0,130	0,113	0,117	0,120
0,2	0,227	0,212	0,242	0,227
0,3	0,325	0,351	0,309	0,328
0,4	0,464	0,395	0,394	0,418
0,5	0,605	0,526	0,491	0,541
0,6	0,628	0,652	0,645	0,642
0,7	0,720	0,703	0,702	0,708

mg/ml: miligramos de ácido gálico por mililitro de solución; Abs 1, 2 y 3: Absorbancias obtenidas Abs: Absorbancia promedio

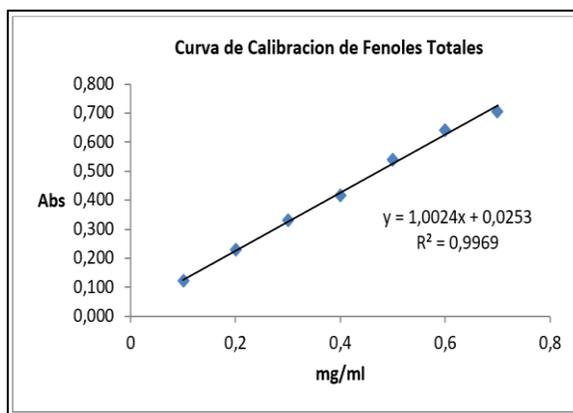


Figura A1. curva de calibración de fenoles totales con ácido gálico.

Se pesó 3mg de los extractos y se realizó la técnica de fenoles totales antes mencionada, obteniéndose las distintas las absorbancias a 765nm y se calculó los miligramos de equivalente de ácido gálico por gramos de extracto seco. Ver Tabla A2 y A3.

Tabla A2. Determinación de fenoles totales de los 11 extractos realizados

Extracto	Muestra (g)	Abs1	Abs2	Abs3	mg1/gExt.	mg2/gExt.	mg3/gExt.
1	0,0031	0,184	0,203	0,188	51,0710	57,1853	52,3582
2	0,0032	0,253	0,645*	0,230	70,9859	193,1926*	63,8156
3	0,0031	0,356	0,330	0,386	106,4220	98,0550	116,0763
4	0,0033	1,159	1,180	1,321	342,7229	349,0713	391,6963
5	0,0033	0,357	0,429	0,424	100,2745	122,0404	120,5289
6	0,0033	0,188	0,214	0,186	49,1850	57,0449	48,5804
7	0,0031	0,101	0,101	0,103	24,3609	24,3609	25,0045
8	0,0033	0,826	0,890	0,753	242,0554*	261,4029*	219,9872*
9	0,0034	0,145	0,126		35,1216	29,5467	
10	0,0033	0,395	0,421		111,7621	119,6220	
11	0,0033	0,618	0,691		179,1760	201,2443	

Muestra (g): masa de los extractos en gramos; Abs 1, 2 y 3: Absorbancias obtenidas a 765nm; mg/g Ext. (1, 2 y 3): miligramos de equivalente de ácido gálico por gramos de extracto seco. Los valores en color rojo son los que exceden la curva de calibración y (*) los valores con son valores extremos rechazados por el coeficiente de variación de Peterson.

Para segunda determinación las masas de los extractos 4 y 8 se repitieron con menor masa de las muestras, de 0,0033g a 0,0020 g, debido a que las absorbancias eran muy elevadas para los valores buscados teniendo en cuenta la curva calibración de fenoles totales (figura A1).

Tabla A3. repetición de las determinaciones de fenoles totales

Extracto	Muestra(g)	Abs1	Abs2	Abs3	mg1/gExt.	mg2/gExt.	mg3/gExt.
1	0,0032	0,183	0,157	0,180	49,1633	41,0577	48,2280
2	0,0033	0,372	0,217	0,202	104,8091*	57,9518	53,4173
3	0,0032	0,387	0,446	0,375	112,7606	131,1540	109,0196
4	0,0020	0,768	1,255	0,864	370,4609	613,3779*	418,3460
5	0,0033	0,383	0,320	0,364	108,1344	89,0892	102,3906
6	0,0032	0,241	0,233	0,226	67,2449	64,7508	62,5686
7	0,0033	0,125	0,121	0,158	30,1398	28,9306	40,1158*
8	0,0020	0,768	0,789	0,776	370,4609	380,9358	374,4513
9	0,0030	0,044	0,037	0,034	6,2184*	3,8907*	2,8931*
10	0,0033	0,623	0,606	0,595	180,6876	175,5484	172,2230
11	0,0032	0,610	0,827	0,944	182,2813	249,9314	286,4064

Muestra (g): masa de los extractos en gramos; Abs 1, 2 y 3: Absorbancias obtenidas a 765nm; mg/g Ext. (1, 2 y 3): miligramos de equivalente de ácido gálico por gramos de extracto seco. Los valores en color rojo son los que exceden la curva de calibración y (*) los valores con son valores extremos rechazados por el coeficiente de variación de Peterson.

A partir de los datos obtenidos se calculó los contenidos totales de fenoles (expresado en mg equivalente de ácido gálico/g de extracto seco) promedio y sus respectivas desviaciones estándar. Ver Tabla A4.

Tabla A4. Determinación de fenoles totales: Promedio y desviación estándar

Extracto	Promedio	SD
1	49,8439	5,3291
2	61,5426	7,5995
3	112,2479	11,1190
4	374,4595	31,1885
5	107,0764	11,5309
6	58,2291	7,2909
7	26,5593	2,7625
8	376,6959	20,7228
9	32,3342	3,9420
10	176,1530	4,2645
11	187,5672	11,9460

Promedio de miligramos equivalente de ácido gálico por gramos de extracto seco; SD: desviación estándar.

Determinación de flavonoides totales

Curva de Calibración de Flavonoides Totales

Se realizó la curva de calibración con soluciones estándar de quercetina (tabla A5)

Tabla A5. Curva de Calibración de flavonoides con quercetina

Muestra	Masa (g)	Abs	Abs	Abs Prom.
1	0,0600	0,346	0,350	0,348
2	0,0300	0,190	0,194	0,192
3	0,0150	0,097	0,095	0,096
4	0,0075	0,044	0,072	0,058
5	0,0037	0,033	0,033	0,033
6	0,0018	0,028	0,014	0,021

Masa (g): masa de quercetina en gramo; Abs: Absorbancia de la luz a 434nm frente a diferentes concentraciones de Quercetina. Abs prom.: Absorbancia promedio.

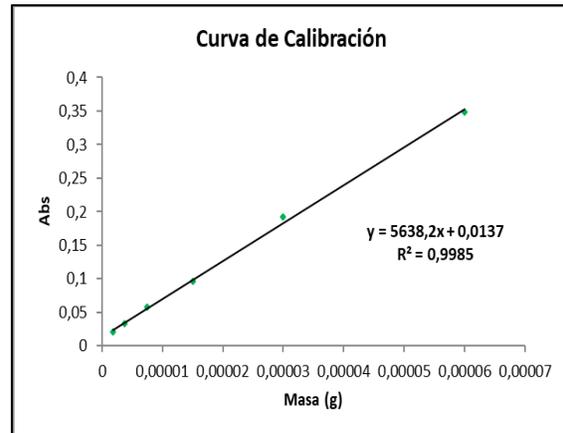


Figura A2. La curva estándar se obtuvo a partir del trazado de la absorción de la luz frente a diferentes concentraciones de Quercetina

Datos obtenidos

Tabla A6. Datos de Contenido total de flavonoides

Extractos	Muestra 1 (mg)	Abs 1	Muestra 2 (mg)	Abs2	Muestra 3 (mg)	Abs 3	Muestra 4 (mg)	Abs 4
1	1,2	0,030	1,2	0,026	1,3	0,205	1,2	0,040
2	1,2	0,454	1,2	0,641	1,3	0,280	1,2	0,320
3	1,2	0,085	1,2	0,052	1,3	0,043	1,3	0,061
4	1,2	0,178	1,2	0,225	1,3	0,248	1,3	0,223
5	1,2	0,250	1,2	0,327	1,3	0,300	1,3	0,295
6	1,2	0,020	1,2	0,033	1,3	0,053	1,3	0,037
7	1,2	0,024	1,2	0,043	1,3	0,085	1,2	0,020
8	1,2	0,299	1,2	0,235	1,3	0,354	1,3	0,175
9	1,2	0,150	1,2	0,280	1,3	0,051	1,3	0,058
10	1,2	0,249	1,2	0,192	1,2	0,093	1,3	0,112
11	1,2	0,282	1,2	0,196	1,3	0,149	1,3	0,222

Muestra 1, 2, 3 y 4 (mg): masas de las muestras de los distintos extractos de Cissampelos pareira en miligramos. Abs1, 2, 3 y 4: Absorbancia a 434 nm.

Tabla A7. Datos en miligramos de quercetina por gramos de extracto para flavonoides totales con sus promedios y desviaciones estándar.

Extractos	mg1/gExt	mg2/gExt	mg3/gExt	mg4/gExt	Prom. mg/gExt	SD
1	0,0024	0,0018	0,0261*	0,0039*	0,0021	0,0004
2	0,0651*	0,0927*	0,0363	0,0453	0,0408	0,0063
3	0,0105*	0,0056	0,0040	0,0064	0,0060	0,0013
4	0,0243	0,0312	0,0320	0,0286	0,0290	0,0035
5	0,0349	0,0463	0,0391	0,0383	0,0396	0,0048
6	0,0009*	0,0028	0,0054*	0,0032	0,0030	0,0002
7	0,0015	0,0043*	0,0097*	0,0009	0,0012	0,0004
8	0,0421*	0,0327*	0,0464	0,0220*	0,0404	0,007
9	0,0201*	0,0393*	0,0051	0,0060*	0,0055	0,0007
10	0,0347	0,0263	0,0117	0,0134	0,0305	0,006
11	0,0396	0,0269	0,0184*	0,0284	0,0316	0,007

Extractos; mg/g Ext. (1, 2, 3 y 4): miligramos de equivalente de Quercetina por gramos de extracto seco. Prom. mg/gExt: Promedio de miligramos equivalente de Quercetina por gramos de extracto seco entre mg/gExt de 1,2,3 y 4 de cada extracto; SD: desviación estándar. Los valores con (*) son valores extremos rechazados por el coeficiente de variación de Peterson.

Determinación de Inhibición de la Actividad Coagulante.

Tabla A8. Tiempo que tarda en coagular los extractos más el veneno (E+V), y los tiempos de coagulación de los extractos patrones de *Cissampelos pareira*, y sus respectivos tiempos promedios.

Extracto	Muestra (g)	E + V t 1 (s)	E + V t 2 (s)	% Inh. 1	% Inh. 2	% Inh. Prom.	SD
1	0,0013	144,4	173,2	28,88	34,64	31,76	4,07
2	0,0012	87,8	106,7	17,56	21,34	19,45	2,67
3	0,0012	150,8	166	30,16	33,2	31,68	2,15
4	0,0012	500	500	100	100	100	0,00
5	0,0012	306,1	342,7	61,22	68,54	64,88	5,18
6	0,0012	104,4	82,4	20,88	16,48	18,68	3,11
7	0,0012	60,9	77	12,18	15,4	13,79	2,28
8	0,0012	500	500	100	100	100	0,00
9	0,0012	500	500	100	100	100	0,00
10	0,0012	144	135,5	28,8	27,1	27,95	1,20
11	0,0012	500	500	100	100	100	0,00

Muestra (g): Muestra en gramos de los extractos; E+V t1(s) y E+V t2(s): Tiempo de coagulación de extracto con el veneno.; % Inh. 1: Porcentaje de Inhibición teniendo en cuenta ensayo t1; % Inh. 2:

Porcentaje de Inhibición teniendo en cuenta ensayo t2; % Inh. Prom. : Porcentaje de Inhibición promedio entre % Inh. 1 y % Inh. 2.; SD.: Desviación estándar.

Determinación de Inhibición de la Actividad Hemolítica Indirecta

Tabla A9. Inhibición de la actividad hemolítica indirecta del veneno por los extractos de *Cissampelos pareira*.

Extracto	Muestra (g)	A(mm)	Inh. A %	B(mm)	Inh. B %	Inh. % Prom.	SD
1	0,001	9,5	10	9	0	5,3	0,4
2	0,001	9	10	8	11,1	10,6	0,8
3	0,001	7	30	6	33,3	31,7	2,4
4	0,0011	0	100	0	100	100,0	0,0
5	0,001	8	20	8;7;6	22	21,1	1,6
6	0,001	9	10	9	0	5,3	0,4
7	0,001	8,5	15	8	11,1	13,1	2,7
8	0,001	0	100	0	100	100,0	0,0
9	0,001	7,5	25	7	22	23,6	2,0
10	0,001	9	15	9	0	10,6	0,8
11	0,001	0	100	0	100	100,0	0,0

Muestra (g): Masa de los extractos en gramos; A(mm) y B(mm): diámetro en milímetros de los distintos halos de hemólisis en la caja de Petri A y B respectivamente; Inh.A % y Inh.B%: Cálculo del porcentaje de inhibición respecto al veneno entero en caja de Petri A y B respectivamente; A` (mm) y B` (mm): diámetro en milímetros de los distintos halos de hemólisis de extractos en la caja de Petri A y B respectivamente; Inh. % prom.: Cálculo del porcentaje promedio de inhibición respecto al veneno entero con respecto a Inhib.A y Inhib.B; SD: Cálculo de Desviación Estándar de inhibición respecto al veneno entero con respecto a la. A y Inh.B.

Comprobación

Fenoles Totales

Tabla A10. Determinación de fenoles totales

Extracto	Muestra(g)	Abs	mg/gExt.
ExtOPT.	0,0020	0,706	339,5351
ExtOPT.	0,0020	0,677	335,0459
ExtOPT.	0,0020	0,671	322,0770

Extracto: ExtOPT. Extracto Optimizado; Muestra (g): masa de los extractos en gramos; Abs: Absorbancias obtenidas a 765nm; mg/g Ext.: miligramos de equivalente de ácido gálico por gramos de extracto seco.

Promedio y Desviación Estándar

Promedio	SD
332,22	13,72

Promedio de miligramos equivalente de ácido gálico por gramos de extracto seco; SD: desviación estándar, datos calculados de la tabla A10.

Flavonoides totales

Tabla A11. Determinación de flavonoides totales.

Extracto	Muestra(g)	Abs	mg/gExt.
ExtOPT.	0,0012	0,350	0,0497
ExtOPT.	0,0012	0,321	0,0454
ExtOPT.	0,0013	0,374	0,0491

Extracto: ExtOPT. Extracto Optimizado; Muestra (g): masa de los extractos en gramos; Abs: Absorbancias obtenidas a 434nm; mg/g Ext.: miligramos de equivalente de quercetina por gramos de extracto seco.

Promedio y
Desviación Estándar

Promedio	SD
0,0481	0,0023

Promedio de miligramos equivalente de quercetina por gramos de extracto seco; SD: desviación estándar. Datos calculados de la tabla A11.

Inhibición de la actividad coagulante del veneno

Tabla A12. Determinación de Inhibición de la actividad coagulante del veneno.

Extracto	Muestra (g)	E + V t 1 (s)	E + V t 2 (s)	% Inh. 1	% Inh. 2
ExtOPT.	0,0012	500	500	100	100
ExtOPT.	0,0012	500	500	100	100
ExtOPT.	0,0012	500	500	100	100

Extracto: ExtOPT. Extracto Optimizado; Muestra (g): Muestra en gramos del extracto; E+V t1(s) y E+V t2(s): Tiempo de coagulación de extracto con el veneno.; % Inh. 1: Porcentaje de Inhibición teniendo en cuenta ensayo t1; % Inh. 2: Porcentaje de Inhibición teniendo en cuenta ensayo t2;

Promedio y Desviación
estándar

Inh. % Prom.	SD
100	0,0

% Inh. Prom.: Porcentaje de Inhibición promedio entre % Inh. 1 y % Inh. 2.; SD: Desviación estándar. con respecto a la Inh. 1 y 2

Inhibición de la actividad hemolítica

Tabla A13. Determinación de la Inhibición de la actividad hemolítica indirecta.

Extracto	Muestra (g)	A(mm)	Inh.A %
ExtOPT.	0,001	0	100
ExtOPT.	0,001	0	100
ExtOPT.	0,001	0	100

Extracto: ExtOPT. Extracto Optimizado; Muestra (g): Masa en gramos; A(mm): diámetro en milímetros de los distintos halos de hemólisis en la caja; Inh.A %: Calculo del porcentaje de inhibición respecto al veneno entero en caja de Petri.

Promedio y Desviación estándar

Inh. % Prom.	SD
100	0,0

Inh. % prom.: Calculo del porcentaje promedio de inhibición respecto al veneno entero con respecto a Inh.A; SD: Calculo de Desviación Estándar de inhibición respecto al veneno entero con respecto a la Inh.A

Tabla A14. Promedios de datos verificación con extracto testigo.

Etanol	Agua	Hexano	Fenoles Totales mg/gExt.	Flavonoides Totales mg/gExt.	% Inh. Actividad Coagulante	% Inh. Actividad Hemolítica
100	0	0	332,22	0,0481	100	100

Proporciones de los solventes (Etanol, Agua, Hexano) en porcentaje; Fenoles Totales mg/g Ext.: miligramos de equivalente de ácido gálico por gramos de extracto seco; Flavonoides Totales mg/gExt.: miligramos de equivalente de quercetina por gramos de extracto seco; % Inh. Actividad Coagulante: Porcentaje de Inhibición de la actividad coagulante del veneno; % Inh. Actividad Hemolítica: Porcentaje de Inhibición de la actividad hemolítica indirecta del veneno.