

Estudio espectrofotométrico de la actividad hemolítica del extracto crudo de *Phoradendron bathyoryctum* Eichler sobre eritrocitos humanos

Miguel Martínez¹, Claudia Mancuello¹, Claudia Pereira¹, Fidelina González¹, Rebeca Prieto¹, Mónica Rolón¹, Sandra Álvarez¹, Bonifacia Benítez¹

¹Laboratorio de Análisis de Recursos Vegetales – Departamento de Biología – Facultad de Ciencias Exactas y Naturales – Universidad Nacional de Asunción.

E mail del autor: miguelangelquimi@hotmail.com

Estudio espectrofotométrico de la actividad hemolítica del extracto crudo de *Phoradendron bathyoryctum* Eichler sobre eritrocitos humanos. La determinación de la actividad hemolítica se realiza a partir de un test in vitro de gran importancia para compuestos que son fuertes candidatos a nuevos fármacos que deban atravesar la membrana celular e interactuar con la hemoglobina. En el presente trabajo se determinó la actividad hemolítica del extracto crudo de la especie vegetal *Phoradendron bathyoryctum* Eichler. Se realizó un estudio morfoanatómico de la especie vegetal, con el propósito de comprobar su autenticidad y se obtuvo el porcentaje de hemólisis correspondiente a las distintas concentraciones del extracto ensayadas (50, 100, 250 y 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Los resultados mostraron que, los metabolitos secundarios contenidos en las concentraciones de 50, 100 y 250 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ producen 0% de hemólisis; mientras que la concentración de 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ produce un 30,8% de hemólisis, lo que sobrepasa el valor de 10% reportado por la técnica como hemólisis permisible para un compuesto. No se observó una dependencia entre la concentración de los extractos y el porcentaje de hemólisis para las concentraciones estudiadas, a excepción de la concentración de 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Teniendo en cuenta las condiciones experimentales establecidas, se concluye que las concentraciones de 50, 100 y 250 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ensayadas no producen actividad hemolítica significativa sobre eritrocitos humanos, a diferencia de la concentración de 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ que si la produce.

Palabras Claves: Hemólisis – *Phoradendron bathyoryctum* Eichler – Eritrocito humano

Spectrophotometric study of hemolytic activity of the crude extract of *Phoradendron bathyoryctum* Eichler on human erythrocyte. Hemolytic activity is determined through an in vitro test of great importance for compounds that are strong candidates for new drugs which must pass through the membrane and interact with hemoglobin. In this study we investigated the hemolytic activity of the crude extract of the plant species *Phoradendron bathyoryctum* Eichler. A morpho-anatomical analysis was performed on the plant species in order to confirm its authenticity and the percentage of hemolysis corresponding to the various tested concentrations of the extract (50, 100, 250 and 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) was obtained. The results showed that, the secondary metabolites contained in concentrations of 50, 100 and 250 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, yield zero percent hemolysis, while the concentration of 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ produces 30.8% hemolysis, which exceeds the value of 10 % reported by the technique as allowable hemolysis for a compound. Dependence between the concentration of the extracts and the percent of hemolysis was not observed for the studied concentrations, except for the concentration of 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Considering the experimental conditions, it was concluded that the tested concentrations of 50, 100 and 250 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, produced no significant haemolytic activity on human erythrocytes, unlike the concentration of 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, which does produce it.

Keywords: Hemolysis - *Phoradendron bathyoryctum* Eichler - Human erythrocyte

INTRODUCCIÓN

Los eritrocitos son las células más abundantes en la sangre. Un micro litro de sangre contiene alrededor de 5 millones de glóbulos rojos, en comparación con solo 4.000 a 11.000 glóbulos blancos y entre 200.000 y 500.000 plaquetas. La función principal de los eritrocitos es facilitar el transporte de oxígeno desde los pulmones hacia las células y de dióxido de carbono desde las células hacia los pulmones. (Silverthorn, 2008)

Los eritrocitos deben ser reemplazados por nuevas células ya que la vida media de un eritrocito es tan solo de 4 meses. Por lo tanto, estas células se están produciendo y destruyendo constantemente al mismo ritmo (Wilmore, 2007)

El término hemólisis hace referencia al fenómeno de ruptura o lisis de la membrana del eritrocito provocando la liberación de la hemoglobina debido a la acción de agentes físicos o químicos (Falcón, 2003).

La determinación de la actividad hemolítica constituye un test de gran utilidad para candidatos a fármacos que atraviezan la membrana celular e interactúan con la hemoglobina.

La hemólisis de los eritrocitos provoca déficit de oxígeno en los tejidos, desgaste físico de la médula ósea y liberación al flujo sanguíneo de los reticulocitos, lo que puede ser provocado tanto por factores fisiológicos como agentes químicos externos que ocasionen la destrucción o lisis celular (Falcón, 2003).

Las moléculas de los fármacos en la sangre pueden ir disueltas en ella, disueltas en el plasma incorporadas a las células (particularmente eritrocitos, en los que algunos penetran y se acumulan) o fijadas a las proteínas plasmáticas. Existe un

equilibrio dinámico entre estas tres fronteras de transporte (Velázquez, 2008).

Es muy frecuente, que los fármacos interactúen con las células de plasma, ello condiciona en gran medida sus efectos farmacológicos, pero no deben dañar a las células (Velázquez, 2008). En referencia a lo mencionado, se llevó a cabo este trabajo, con el propósito de conocer el porcentaje de hemólisis (fenómeno indeseado para fármacos o extractos de plantas medicinales) que produce el extracto crudo de la especie vegetal *Phoradendron bathyoryctum* Eichler, del hospedero *Cordia americana* (L.) Gottschling & J.S. Mill., especie utilizada como medicinal por la población paraguaya.

MATERIALES Y MÉTODOS

Equipos

Evaporador rotatorio de la marca QUIMIS. Espectrofotómetro UV-Vis modelo Shimadzu serie 160 A. Microscopio óptico marca OLYMPUS serie BH2. Cámara digital MOTICAM 352. Centrífuga ERAEUS christ GMBH 1973 modelo piccolo. Vórtex marca HUMAN.

Reactivos químicos

Agua calidad destilada. Los reactivos grado pro-análisis utilizados fueron: etanol absoluto, cloruro de sodio (NaCl), cloruro de potasio (KCl), fosfato ácido de sodio ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$), fosfato ácido de potasio (K_2HPO_4), glucosa, ácido clorhídrico (HCl) e hidróxido de sodio (NaOH).

Materiales biológicos

Se utilizó sangre humana, extraída de alumnos voluntarios de la FACEN, por el Laboratorio Externo de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Asunción. La extracción se realizó con el previo consentimiento de los alumnos (por escrito) en relación al experimento.

La especie vegetal estudiada fue colectada en la ciudad de Areguá del Departamento Central con coordenadas geográficas 25°19'39.26"S, 57°25'26.43"O.

El procesamiento del ejemplar fue realizado según metodología convencional para tratamiento de especímenes. El material de referencia fue depositado en el Herbario FACEN, de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad Nacional de Asunción.

La identificación correcta del material vegetal, es un paso indispensable antes del estudio fitoquímico, farmacológico y/o toxicológico, para garantizar la autenticidad de la especie utilizada en la investigación (Hostettmann et. al. 2008).

Para la identificación taxonómica se utilizó la Base de Datos de Flora del Conosur, Darwinion (2013) además de la comparación con material de Herbario identificado. Se utilizó además claves de identificación taxonómica de Gentry (1992).

Caracterización morfológica de las especies vegetales

La morfo-anatomía vegetal constituye un campo de estudio de gran importancia para el reconocimiento preciso de las especies vegetales, desde el punto de vista del proceso de desarrollo de tejidos y órganos.

La caracterización botánica es el primer paso para la verificación de la autenticidad del espécimen vegetal con el que se trabaja, en este sentido es muy importante disponer de patrones micrográficos como referencia (World Health Organization, 1998), en todo trabajo relacionado a productos naturales de origen vegetal. De acuerdo a lo mencionado por la OMS, es relevante la caracterización morfológica de la especie *P. bathyoryctum* Eichler, para lo cual se siguió la metodología convencional de caracterización morfológica, con observación directa y al microscopio estereoscópico (Argüeso, 1986).

Caracterización anatómica foliar y caulinar

El material fue hidratado con agua destilada por 4(cuatro) horas. Se realizaron cortes transversales a mano alzada de hojas y tallos, se diafanizaron con disolución de hipoclorito de sodio al 2,5% y posteriormente se aplicó tinción directa con disolución de safranina al 1%. Para la detección de almidones se tiñó el material fresco con lugol (D'Ambrogio, 1986). Para la determinación del índice estomático (IS) de la hoja, se analizó ambas caras de la epidermis, posteriormente se utilizó la ecuación 1.

Las láminas fueron montadas con la técnica gelatina-glicerina (Argüeso, op. cit.) y depositadas en el herbario FACEN. Las microfotografías fueron tomadas con cámara digital MOTICAM 352 incorporada al microscopio óptico y editadas con el software Motic Images Plus 2.0 (Motic China Group, 2006).

$$IS = \frac{N^{\circ} \text{ de estomas}}{N^{\circ} \text{ de estomas} + N^{\circ} \text{ de células epidermicas}} \times 100 \quad (1)$$

Preparación del material vegetal para la obtención de extracto crudo y del polvo fino

El material vegetal utilizado en este trabajo fue secado a temperatura ambiente, con escasa aireación y bajo sombra, para evitar la acción del oxígeno, la luz, la temperatura y microorganismos; factores que podrían transformar los compuestos originales en artefactos (Hostettmann et al. 2008).

La molienda se realizó con la ayuda de un molino de rotación mecánica, hasta la obtención de un polvo fino.

Obtención del extracto crudo

El material vegetal previamente pulverizado se dejó embebido en etanol al 98% por 15 días (extracción por macerado), con agitaciones de hasta dos veces por día. Se filtró y se evaporó el solvente por medio de un evaporador rotativo, obteniéndose así el extracto crudo.

Preparación de las muestras de sangre

La sangre total heparinizada se centrifugó a 3.000 rpm durante 10 min (Human, Alemania); el precipitado celular fue sometido a tres lavados consecutivos con tampón PBS pH 7,4 para obtener los glóbulos rojos.

Determinación espectrofotométrica de la actividad hemolítica del extracto crudo

Se pesó 0,1 gramos del extracto crudo en un matraz volumétrico de 100 mL, se agregó 10 mL de etanol absoluto, se sonicó por 30 minutos y se llevó a volumen con tampón PBS pH 7,4 (1000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Se etiquetaron seis tubos de ensayo de la siguiente manera: a. Control negativo (CN), b. Control positivo (CP), c. 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, d. 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, e. 250 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ y f. 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Al tubo a se agregó 1,0 mL de tampón PBS: etanol relación 9:1, al tubo b 1,0 mL de disolución de Na_2CO_3 al 0,1%, a los tubos c, d, e y f se agregaron 0,1; 0,2; 0,5 y 1,0 mL de la solución madre del extracto (1000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Seguidamente a los tubos c, d y e se adicionaron 0,9; 0,8 y 0,5 mL de tampón PBS pH 7,4 respectivamente, se agitaron y finalmente se adicionaron a todos los tubos 1,0 mL de suspensión de sangre al 2%. Se homogeneizaron y se dejaron en reposo por 30 minutos. Cumplido el periodo de reposo, se centrifugaron a 3000 rpm por 10 minutos y se procedió a la medición espectrofotométrica de absorbancia de la solución sobrenadante de cada uno de los tubos a una longitud de onda de 545 nm. La actividad hemolítica fue reportada como por ciento de Hemólisis (%Hem.), empleando la ecuación 2:

$$\%Hem = \frac{A_M - A_{CN}}{A_{CP} - A_{CN}} * 100 \quad (2)$$

Donde:

A = absorbancia, M = muestra, CN = control negativo, CP = control positivo.

Tratamiento estadístico de los datos

Los resultados se graficaron en Microsoft Excel 97, se obtuvo la curva actividad hemolítica (%) vs. Concentración de extracto crudo (50, 100, 250 y 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Se compararon las medias con el test de rangos múltiples y el análisis de varianza simple ANOVA (SPSS,11).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Identificación y descripción taxonómica del espécimen vegetal *P. bathyoryctum* Eichler

Pertenece a la familia Viscaceae. Son plantas epífitas, sub-arbustos, con órganos que le permiten estar hundido en las ramas del hospedante, en este caso en las de la especie vegetal *C. americana* (L.) Gottschling & J.S. Mill de la familia Boraginaceae (Figuras 1 y 2).



Figura1: *Cordia americana* (L.) Gottschling & J.S. Mill. Árbol. Material testigo M. Martínez, 5



Figura 2: *C. americana* (L.) Gottschling & J.S. Mill. . Hojas

Tallos verdes fotosintetizadores. Hojas de color verde intenso, de 70-90 x 20-30 mm, con 2 catáfilos en la base (Figura 3).



Figura 3: *P. bathyoryctum* Eichler. Material testigo M. Martínez, 7

Entrenudos comprimidos, 65 mm entre un nudo y otro. Hojas asimétricas elípticas arqueadas, con nervadura poco perceptible, se visualizan recién en hojas secas, las más jóvenes carnosas y las más adultas son coriáceas, las del extremo de la rama tienen el ápice puntiagudo, algunas hojas de las

ramas tienen un pequeño mucrón, el resto de las hojas su ápice es redondeado, con peciolo y base atenuada. Inflorescencia en espiga. Frutos globosos pseudobaya color naranja.

Caracterización anatómica de P. bathyoryctum Eichler

Caracterización anatómica caulinar

Epidermis uniestrata, compuesta por células cuadrangulares y presencia de estomas del tipo paracítico. El parénquima cortical está constituido por células redondeadas, con casquetes de fibras esclerenquimáticas y agrupaciones de braquiesclereidas, coincidiendo con lo mencionado por Gómez-Sánchez et al (2011). El haz vascular es del tipo colateral abierto, está dispuesto alrededor de la medula formando un anillo discontinuo. En la parte central se halla la medula formada por tejido parenquimático (Figura 4).

Caracterización anatómica foliar

Epidermis uniestratificada, con células de contorno rectos, estomas del tipo paracítico presentes en ambas caras de la hoja, la caracterizan como anfiestomática, coincidiendo con lo mencionado por Gómez-Sánchez et al (2011). El Índice Estomático (IS , en $N = 26$) para la cara adaxial es 4,00 (8,08) 10,81; y para la cara abaxial es 5,66 (9,35) 13,04.

El mesófilo isobilateral, compuesto de células parenquimática cuadrangulares, con presencia de cristales de oxalato de calcio del tipo drusas. El haz vascular compuesto de xilema y floema, que se encuentran rodeados por fibras perixilemática y perifloemática respectivamente (Figura 5)

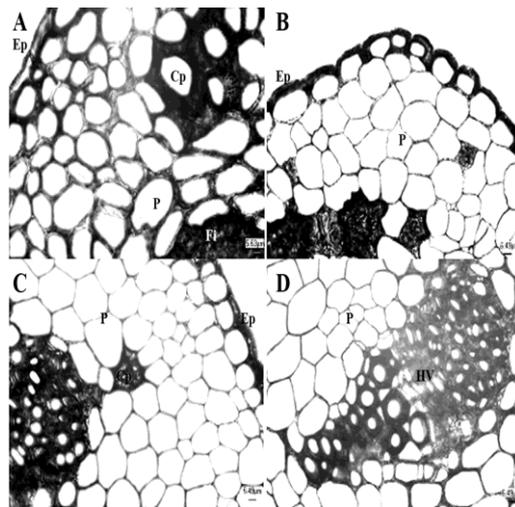


Figura 4: Corte transversal del tallo. A. B. C.- Detalle de la corteza. D.- Detalle del haz vascular. Referencias: Ep, epidermis; P, parénquima; Cp, células pétreas; HV, haz vascular; Fi, fibras esclerenquimáticas.

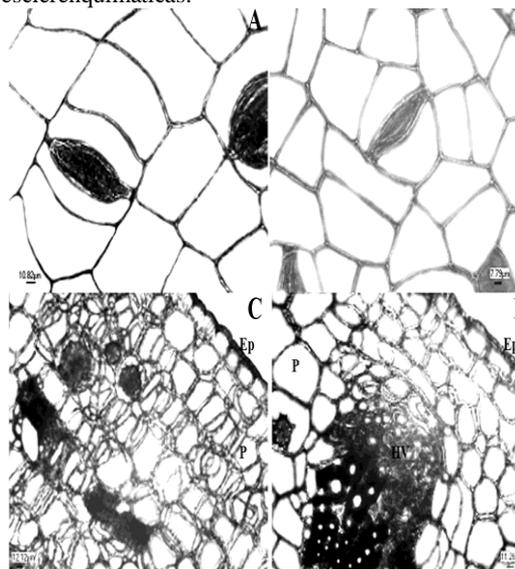


Figura 5: Anatomía de la Hoja. A.- Detalle de la cara Adaxial. B.- Detalle de la Cara Abaxial. C.- Mesófilo. D.- Haz Vascular. Referencias: Ep, epidermis; P, parénquima; HV, haz vascular.

Determinación espectrofotométrica de la actividad hemolítica del extracto crudo de P. bathyoryctum Eichler

Una prueba de utilidad en el estudio de extractos de plantas medicinales, así como en el desarrollo de un nuevo fármaco, es precisamente la determinación de su actividad hemolítica. Un candidato a fármaco debe atravesar la membrana celular e interactuar con la hemoglobina intracelular evitando que en este proceso se afecten la proteína y el glóbulo rojo, estructural y funcionalmente (Torres, 2005).

Atendiendo a estos criterios y asumiendo que el extracto crudo de una planta con propiedades medicinales contiene a la mayoría de los metabolitos secundarios, entre los cuales se encuentra el/los compuesto/os de actividad biológica, además del frecuente uso de la especie vegetal en estudio, fue más que necesario determinar la actividad hemolítica, con el propósito de conocer si produce o no este fenómeno indeseado.

No se obtuvo actividad hemolítica significativa para la mayoría de las concentraciones estudiadas del extracto de *P. bathyoryctum* Eichler, sobre eritrocitos humanos.

El % Hem. promedio para las concentraciones de 50, 100 y 250 $\mu\text{g extracto.mL}^{-1}$ fue de 0%, valor mucho menor al 10 % reportado (Falcón, 2003), como hemólisis permisible para un compuesto, sin embargo para la concentración de 500 $\mu\text{g extracto.mL}^{-1}$ el % de Hem. fue de 30,8 (Figura 6), superando ampliamente el valor de referencia, lo que implica que a esta concentración se produce este fenómeno indeseado.

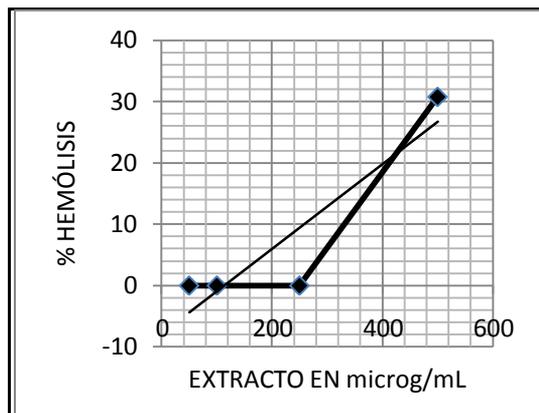


Figura 6: Porcentaje de hemólisis para las distintas concentraciones del extracto ensayadas.

CONCLUSIONES

La morfología y anatomía corresponden a *P. bathyoryctum* Eichler. Algunos caracteres anatómicos de importante valor diagnóstico son: la presencia de cristales de oxalato de calcio del tipo drusas, así como la presencia de braquiescleroides, el tipo estomático paracítico y el mesófilo isobilateral.

La actividad hemolítica que presentaron las concentraciones: 50, 100 y 250 $\mu\text{g extracto.mL}^{-1}$ fueron menor al 10%, por lo que se considera aceptable, no así la de 500 $\mu\text{g extracto.mL}^{-1}$, que superó el valor permisible, considerándose que a esta última concentración se produce el fenómeno de hemólisis indeseable.

No se observó una dependencia entre la concentración y la actividad hemolítica para las concentraciones de 50, 100 y 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, del extracto crudo en estudio, a excepción de la concentración de 500 $\mu\text{g extracto.mL}^{-1}$

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Argüeso, A. D'A. 1986. Manual de Técnicas en Histología Vegetal. Buenos Aires: Editorial Hemisferio Sur.
- D'Ambrogio, A. 1986. Manual de Técnicas en Histología Vegetal. Buenos Aires, Editorial Hemisferio Sur. 84p.
- Darwinion, Flora del Cono Sur. 2013. En: <http://www2.darwin.edu.ar/Proyectos/FloraArgentina/FA.asp>
- Falcón, J. et al. 2003. Revista Cubana de Química, Centro de Biofísica Médica, Universidad de Oriente. Vol 15 (1). 63-66 p.
- Gentry, A. H. 1992. Bignoniaceae-Part II (Tribe Tecomae). In: Flora Neotrópica, Monograph 25 (II). The New York Botanical Garden. 370 pp.
- Gómez Sanchez, M., Sanchez Fuentes, L., Salazar Olivo, L. 2011 .Anatomía de especies mexicanas de los géneros *Phoradendron* y *Psittacanthus*, endémicos del Nuevo Mundo. Revista Mexicana de Biodiversidad 82: 1203-1218.
- Hernández, Y. et al. 2006. Revista Electrónica de Veterinaria REDVET. Vol 8 (10)
- Hernández, R. et al. 2010. Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás, Hidalgo. 28-32 p.
- Hostettmann, K. 2008. Manual de estrategias para el aislamiento de productos naturales bioactivos. Bogotá-Colombia: Convenio Andrés Bello.
- Motic China Group. 2006. Motic Images Plus versión 2.0. Software de computadora para microscopía digital.
- Novara, L. J. 2012. Flora del Valle de Lerma-Viscaceae Batsch. Aportes Botánicos de Salta. Serie Flora. Vol. 11. Universidad Nacional de Salta, República Argentina. 1-14 pp.
- Pardo, A. y Ruiz, M.A. 2002. SPSS 11. Guía para el análisis de datos. Madrid: McGRAW-HILL.
- San Feliciano, A.; Pérez, A.L. y Fernández, E.O. 2008. Manual de determinación estructural de compuestos naturales.
- Silverthorn., 2008. Fisiología Humana-Un Enfoque Integrado. 4ta. Edición. Editorial Panamericana
- Torres, A. et al. 2005. Efecto in vitro de los 1-O-alkilgliceroles sintéticos en la falciformación y en la hemólisis de los eritrocitos SS. Revista de Bioquímica-Asociación Mexicana de Bioquímica Clínic. Vol 8(30). 101-109p.
- Velázquez L., 2008. Farmacología Básica y Clínica. 18° Edición. Editorial Panamericana
- Wilmore J., 2007. Fisiología del Esfuerzo y del Deporte. 5° Edición. Editorial Paidotribo
- World Health Organization. 1998. Quality control methods for medicinal plant materials. Geneva-Suiza.