

Medicent Electrón 2014 abril-jun.;18(2)

UNIVERSIDAD CENTRAL “MARTA ABREU” DE LAS VILLAS  
 SANTA CLARA, VILLA CLARA

## ARTÍCULO ORIGINAL

### Efecto antioxidante de la *Chuquiraga jussieui* J. F. Gmel en el ensayo de hemólisis

### Antioxidant effect of the *Chuquiraga jussieui* J. F. Gmel using the hemolysis test

MSc. Alex Alberto Dueñas Rivadeneira<sup>1</sup>, MSc. Ulbio Eduardo Alcívar Cedeño<sup>2</sup>, Dr. C. Ervelio Olazábal Manso<sup>3</sup>, Dr. C. Remigio Cortés Rodríguez<sup>4</sup>

1. Máster en Investigación Educativa. Docente Agregado. Universidad Técnica de Manabí, Portoviejo, Manabí. Ecuador. Correo electrónico: [alduri81@hotmail.com](mailto:alduri81@hotmail.com)
2. Máster en Administración Ambiental. Docente Auxiliar. Universidad Técnica de Manabí, Portoviejo, Manabí. Ecuador. Correo electrónico: [ulbioalcivar@gmail.com](mailto:ulbioalcivar@gmail.com)
3. Doctor en Ciencias Veterinarias. Profesor Auxiliar. Centro de Bioactivos Químicos. Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas. Santa Clara, Villa Clara. Cuba. Correo electrónico: [ervelio@uclv.edu.cu](mailto:ervelio@uclv.edu.cu)
4. Doctor en Ciencias Farmacéuticas. Profesor Auxiliar. Centro de Bioactivos Químicos. Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas. Santa Clara, Villa Clara. Cuba. Correo electrónico [remigio@uclv.edu.cu](mailto:remigio@uclv.edu.cu)

## RESUMEN

Se realizó la evaluación del efecto hemolítico y antioxidante del extracto acuoso de la *Chuquiraga jussieui* utilizando el ensayo de hemólisis del eritrocito humano producido por el dodecilsulfato de sodio. Se evaluaron cinco concentraciones del extracto (7,5, 15, 30, 60 y 120 mg/L). Se validó el efecto hemolítico producido por el dodecilsulfato en una solución que contiene eritrocitos, dodecilsulfato de sodio y solución amortiguadora fosfato salino; se obtuvo la concentración de hemoglobina en la suspensión utilizando espectroscopia ultravioleta visible, y se determinó el efecto antioxidante del extracto de *Chuquiraga jussieui*. Se obtuvo una concentración de hemoglobina media (CH<sub>50</sub>) del dodecilsulfato de sodio de 35,35 mg/L; mientras que para el extracto de *Chuquiraga jussieui*, la CI<sub>50</sub> fue de 64,89 mg/L y la CI<sub>90</sub> fue de 86,96 mg/L. Estos resultados sugieren la posible utilización del extracto de esta planta como antioxidante.

*DeCS:* extractos, antioxidantes, hemólisis, eritrocitos, hemoglobinas.

## ABSTRACT

The evaluation of the hemolytic and antioxidant effect of the aqueous extract of *C. jussieui* was carried out using the hemolysis test with the human erythrocyte produced by the sodium dodecyl sulphate (SDS). Five concentrations of the extract (7, 5, 15, 30, 60 and 120 mg/L) were evaluated. The hemolytic effect produced by the dodecyl sulphate was validated in a solution that contains erythrocytes, SDS and phosphate-buffered saline (PBS), and the hemoglobin concentration was obtained in the suspension using ultraviolet- visible spectroscopy (UV-Vis), the one that was used to determine the antioxidant effect of the extract of *C. jussieui*. The average concentration of hemoglobin (CH<sub>50</sub>) of SDS obtained was of 35,35 mg/L; while for the extract of *C. jussieui*, the (CI<sub>50</sub>) was of 64,89 mg/L and the (CI<sub>90</sub>) was of 86,96 mg/L. These results suggest the possible use of the extract of this plant as an antioxidant.

*DeCS:* plant extracts, antioxidants, hemolysis, erythrocytes, hemoglobins.

## INTRODUCCIÓN

Las dietas ricas en plantas pueden ser beneficiosas para el hombre con respecto a la prevención de enfermedades, por lo cual existen muchas personas que individualmente dependen de productos de plantas con propósitos medicinales. No es por tanto inesperado, que la mayoría de las personas tengan fe en el uso de drogas de origen vegetal,<sup>1</sup> debido a que son baratas, fácilmente disponibles y suelen ser más eficaces.<sup>2</sup> Actualmente, hay un interés cada vez mayor en la comunidad de investigadores de profundizar en las bases científicas de la utilidad de muchas plantas o hierbas, ya que la mayoría de ellas todavía no han sido utilizadas en relación con la bioactividad demostrada.<sup>3</sup>

El género *Chuquiraga* se encuentra localizado en el Ecuador y varios países más de América del Sur, y es considerada una planta con varios efectos medicinales y actividad antioxidante. La infusión de tallos y hojas de *Chuquiraga spinosa* (R&P), se utiliza por sus propiedades antiinflamatorias y para el tratamiento de infecciones vaginales. Existe un estudio que evaluó la actividad antioxidante, antiinflamatoria y actividades antifúngicas de *C. spinosa*.<sup>4</sup>

Los extractos metanólicos de *Chuquiraga straminea* Sandwith, subfamilia Barnadesioideae (Asteraceae), mostraron la presencia de un grupo de flavonoides y fenoles totales con actividad antioxidante.<sup>5</sup> La *Chuquiraga atacamensis*, que crece en la región Puna de Argentina (3 800 msnm), es utilizada para reducir el estrés oxidativo y aliviar la gota y el dolor artrítico; los extractos de las partes aéreas de la planta fueron evaluados y estandarizados en términos de contenido de compuestos fenólicos, de flavonoides y de la actividad captadora de los radicales libres.<sup>6</sup>

Por otra parte, los eritrocitos son muy propensos al ataque de especies reactivas de oxígeno (ROS), debido a la alta cantidad de contenido de ácido graso poliinsaturado en sus membranas y a las reacciones de oxidación, debido al Fe de la hemoglobina. El ataque oxidativo de los eritrocitos es uno de los sucesos más importantes en algunas hemoglobinopatías.<sup>7</sup> La autoxidación de la oxihemoglobina contribuye a la degradación de núcleo hemo, por lo que el daño inducido experimentalmente al eritrocito es un buen modelo de investigación.<sup>8</sup> Los fitoquímicos pueden proteger los eritrocitos o incrementar su resistencia a las reacciones oxidativas.<sup>9</sup>

La *Chuquiraga jussieui* J.F. Gmel no ha sido evaluada como antioxidante; por ello, el objetivo del presente trabajo fue determinar la capacidad antioxidante en eritrocitos humanos in vitro de los extractos de hojas y tallos de esta planta para interferir la acción del dodecilsulfato de sodio (SDS) como inductor de la peroxidación lipídica del eritrocito, su efecto hemolítico, liberación de hemoglobina y oxidación.

## MÉTODOS

Este estudio experimental fue realizado en los laboratorios del Departamento Biológico del Centro de Bioactivos Químicos en la Universidad Central de las Villas, en junio de 2013; el equipo utilizado para realizar los análisis fue un espectro-fotómetro UV/VIS, Marca Camp Spec, con ancho de banda de +/- 1 nm, integración de 1s, celdas de 1 cm de espesor.

El material de la corteza de las hojas y tallos de *Chuquiraga jussieui* se secó al aire, hasta obtener un peso constante en el laboratorio. El material seco se pasó por un molino de cuchillas y, posteriormente, por un tamiz de 0,315 mm de acero inoxidable para convertirlo en un sólido pulverulento (SP), de tamaño de partícula uniforme, que se almacenó en una bolsa de plástico sellada herméticamente para su uso posterior. Para realizar el ensayo, se pesaron 20 gramos del SP y se adicionaron a 1 L de agua destilada a 100°C en un beaker por un tiempo de 10 minutos. Este extracto fue utilizado para realizar los ensayos, y se calculó que estaba a una concentración del 2 % del SP.

Se utilizó la metodología de preparación de los glóbulos rojos (GR) referida por Pape y Hope<sup>10</sup> con algunas reformas que se describen a continuación:

Se obtuvo sangre humana de voluntarios sanos, en viales de polietileno con EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) como anticoagulante; a continuación, se separaron los GR centrifugando a 1500 rpm durante 15 minutos. El paquete de GR obtenido se lavó tres veces en solución amortiguadora fosfato salino (PBS). Los GR limpios se mezclaron con PBS en proporción 1:1. Esta suspensión se almacenó a 8°C, durante tres días como máximo.

Previamente a los ensayos de hemólisis y desnaturalización, se ajustó mediante espectrofotómetro la concentración de oxihemoglobina (HbO<sub>2</sub>) en la suspensión de trabajo a un valor de 0,122 ± 0,003 mmol/L, ajustando con PBS los eritrocitos lavados en la suspensión, la cual se preparó diariamente.

### Ajuste de la concentración de hemólisis con SDS

Diferentes concentraciones de SDS (5, 10, 20, 40, 80, 100, 200, 400, 800, 1000 ppm) se utilizaron para mezclarla con la suspensión de eritrocitos, a razón de 1:40, en agitación continua y a temperatura de 25°C. El proceso de incubación fue detenido centrifugando a 10 000 rpm en microcentrífuga Eppendorf y, posteriormente, separando el sobrenadante y determinando en él la concentración de HbO<sub>2</sub> a 540 nm. Este ensayo se repitió con las mismas características para la evaluación del efecto hemolítico de *C. jussieui*.

La concentración hemolítica media (CH<sub>50</sub>) se obtuvo teniendo en cuenta el porcentaje de la hemoglobina liberada en el medio de ensayo, originada por las diferentes concentraciones del producto evaluado y calculada como porcentaje de la liberación de hemoglobina tomada como 100 %.

La *C. jussieui* se evaluó en concentraciones desde 0-120 mg/L en cinco concentraciones diferentes ((7,5, 15, 30, 60, 120). El porcentaje de hemólisis se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ hemólisis} = A/B * 100.$$

Donde: A = Absorbancia de la muestra (eritrocitos 20 % en PBS), más extracto (diferentes concentraciones). B = Absorbancia de la muestra (eritrocitos 20 % en PBS) más 74 mM de SDS (0,856). El efecto de inhibición de la hemólisis se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ inhibición de la hemólisis} = 100 - ((A/B) * 100)$$

## Controles

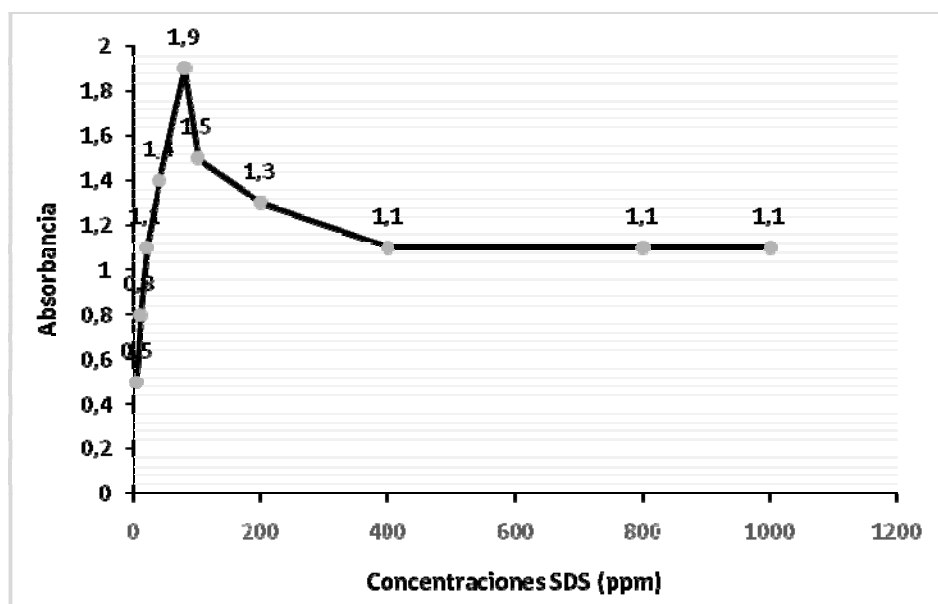
Se utilizaron como controles de hemólisis con eritrocitos y agua destilada para hemólisis espontánea, eritrocitos y PBS, y eritrocitos y SDS (1 %), todos a razón de 1:40. Se utilizó ácido ascórbico (Sigma-Aldrich) como patrón de sustancia antioxidante, después de calcular su  $CI_{50}$  por el método de regresión lineal.<sup>11</sup>

La validación de la metodología analítica se realizó sobre la base de la respuesta directamente proporcional a la concentración del analito, la repetibilidad y precisión intermedia. Para el grado de respuesta a la concentración del analito, se corroboró el coeficiente de regresión ( $R^2$ ) entre la absorbancia de HbO<sub>2</sub> y su concentración. Se evaluó la repetibilidad desarrollando la metodología completa en un mismo día, con los mismos reactivos y el mismo analista, utilizando la prueba C de Cochran. Se verificó la precisión intermedia a través de la evaluación de la diferencia estadística de los resultados obtenidos al desarrollar la metodología con tres repeticiones, diferentes días y analista. Se utilizó el análisis estadístico ANOVA como método de evaluación de los resultados (fueron verificados el cumplimiento de los supuestos para la realización del ANOVA).

## RESULTADOS

Los ajustes de HbO<sub>2</sub> liberada al mezclar el agua destilada con la suspensión de ensayo de los GR, estuvieron dentro de los parámetros de absorbancia declarados para el equipo. El máximo de absorbancia encontrado correspondió a la liberación máxima de hemoglobina, lo que permitió ajustar la concentración de GR a 0,122 mmol/L.

En el gráfico 1, se aprecia el efecto de las diferentes concentraciones de SDS sobre los GR. El aumento de las concentraciones de SDS corresponde con una elevación de la hemólisis, que continúa hasta la concentración de 85 ppm, a partir de la cual manifiesta un efecto de descenso, congruente con un proceso de desnaturalización de las proteínas, hasta que no hubo más proteínas por desnaturalizar.



\*Absorbancia de 540 nm

**Gráfico 1.** Hemólisis determinada por los cambios en la absorción de hemoglobina bajo diferentes concentraciones de SDS.

Los valores de inhibición de la hemólisis (mg/L) del extracto de *C. jussieui* fueron  $CI_{50}$  64,89 y  $CI_{90}$  86,96.

Los valores de inhibición de la hemólisis (mg/L) del ácido ascórbico (vitamina C) fueron  $CI_{50}$  55,82 y  $CI_{90}$  83,20.

En las tablas 1 y 2, se puede observar que la verificación de la varianza resultó no significativa, dado que la significación ( $p$ ) fue muy superior a 0,05, lo que demuestra la homogeneidad de las varianzas entre las diferentes repeticiones para cada concentración.

**Tabla 1.** Resultados del ANOVA para cada concentración de la hemoglobina bajo diferentes concentraciones de *C. jussieui* y SDS (1 %).

VC-mg/L	Promedio	Desviación Estándar	Razón-F	Valor-P	Verificación varianza Valor-P
7,5	17,83	0,94	0,14	0,88	0,84
15	49,83	0,18	0,29	0,76	0,95
30	70,02	0,23	0,00	0,99	0,50
60	82,87	0,25	0,45	0,66	0,41
120	94,16	0,12	1,83	0,24	0,98

$n = 9$  para cada concentración (3 ensayos con 3 repeticiones para cada concentración)

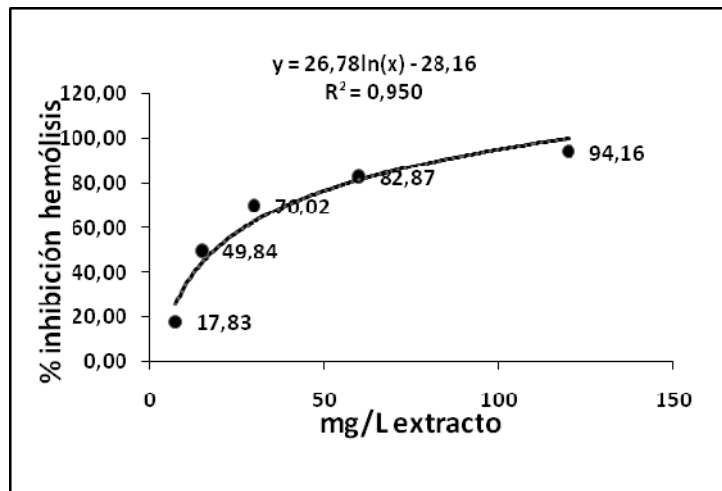
**Tabla 2.** Resultados del ANOVA para cada concentración de hemoglobina bajo diferentes concentraciones de Vitamina C y SDS (1 %).

VC-mg/L	Promedio Inhibición hemólisis %	Desviación estándar	Razón-F	Valor-P	Verificación varianza Valor-P
7,5	8,88	0,94	0,14	0,8757	0,84
15	29,13	1,4	0,06	0,9383	0,91
30	61,45	1,79	0,05	0,9490	0,71
60	71,96	0,93	0,12	0,8927	0,78
120	85,73	30,09	1,03	0,4125	0,42

VC-mg/L = Vitamina C mg/L,  $n = 9$  para cada concentración (3 ensayos con 3 repeticiones para cada concentración).

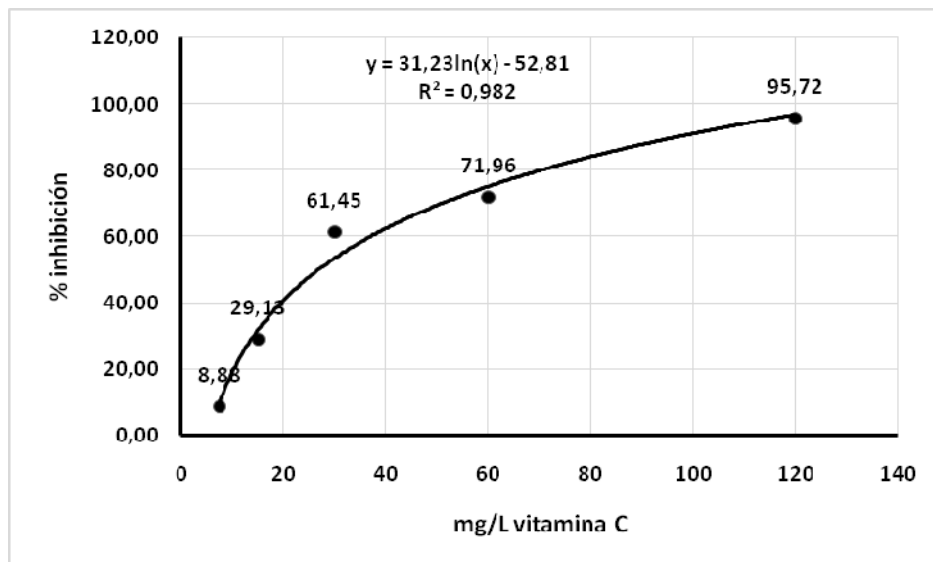
En el ensayo de efecto antioxidante, las concentraciones de los extractos de *C. jussieui* demostraron una alta capacidad de inhibición de la hemólisis, pues se encontró que esta produjo valores de inhibición de la hemólisis con  $CI_{50}$  de 64,89 y  $CI_{90}$  de 86,96 mg/L con su extracto. Mientras que la vitamina C tuvo una  $CI_{50}$  de 55,82 y una  $CI_{90}$  de 83,20, lo que se corresponde con una correlación positiva de los valores de absorbancia determinados.

Entre los diferentes modelos analizados en el ajuste de los datos, el más adecuado resultó ser el modelo logarítmico que se muestra en los gráficos 2 y 3, donde se informan los valores experimentales del análisis de regresión entre las variables dependientes y las independientes ( $R^2 = 0,9503$ ) en el gráfico 2 y ( $R^2 = 0,9825$ ) en el gráfico 3. Los resultados descritos anteriormente reafirman que las concentraciones de las sustancias evaluadas en este ensayo tienen un efecto directamente proporcional a la concentración.



\*Absorbancia de 540 nm

**Gráfico 2.** Inhibición de la hemólisis determinada por los cambios en la absorción de hemoglobina bajo diferentes concentraciones de *C. jusieuiy* SDS (1 %).



\*Absorbancia de 540 nm

**Gráfico 3.** Inhibición de la hemólisis determinada por los cambios en la absorción de hemoglobina bajo diferentes concentraciones de Vitamina C y SDS (1 %).

La prueba C de Cochran, que se aplicó para los resultados de esta investigación, indicó la existencia de varianzas semejantes (Cochran 0,31 con valor de  $p = 1,0$ ). Esto evidencia que la varianza de los resultados es independiente de la concentración de la muestra, lo que indica una buena repetibilidad de los resultados

## DISCUSIÓN

Aunque los experimentos de evaluación *in vitro* con eritrocitos no son tan reales como los ensayos *in vivo*, dado que no existen enzimas y otros elementos que pueden interferir en las reacciones desarrolladas con los productos de experimentación, sí ofrecen resultados que permiten un grado de confiabilidad para desarrollar otras verificaciones más complejas. También permiten definir, en este caso, si el producto evaluado tiene perspectivas como antioxidante, y aquí radica la importancia de esta investigación, que aporta resultados a favor de la profundización de estudios sobre el mecanismo de acción de la *C. jussieui* como antioxidante, dado que este presentó una concentración inhibitoria aceptable.

La relación dosis-respuesta establecida en la hemólisis producida por el SDS permitió el cálculo de una  $CH_{50}$  con 35,35 ppm. En otros ensayos realizados para determinar la  $CH_{50}$  del SDS, Pape y Hope<sup>10</sup> informaron 29,0 ppm, y Martínez<sup>12</sup> obtuvo 43,6 ppm. Los resultados que se informan en el presente trabajo están dentro del rango obtenido por estos investigadores. Se atribuye que las diferencias existentes entre los resultados pudieron ser ocasionadas por las condiciones experimentales de cada laboratorio.

Se ha señalado que la hemólisis producida por el SDS puede ocurrir debido a la acción de moléculas con carga negativa en el surfactante y los fosfolípidos de la membrana del eritrocito, que ocasionan, entre otras reacciones, una peroxidación lipídica,<sup>13</sup> y permite la salida de la hemoglobina de los GR, que por sus características químicas, puede ser determinada con el espectrofotómetro UV/VIS.<sup>14</sup> Todo ello permitió establecer el principio del ensayo de eritrocitos para la determinación de hemólisis.

Al enfrentar diferentes concentraciones de *C. jussieui* a una solución de eritrocitos, no se encontró que tuviera efecto hemolítico, lo que permitió continuar con la evaluación de su efecto antioxidante. De lo anteriormente analizado, se concluye que la *Chuquiraga jussieui* demostró propiedades antioxidantes, al inhibir la hemólisis de los eritrocitos ( $Cl_{50} = 64,89$  mg/L) en este ensayo.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Dubey NK, Kumar R, Tripathi P. Global promotion of herbal medicine: India's opportunity. Curr Sci [internet]. 2004 [citado 12 ago. 2013];81:[aprox. 5 p.]. Disponible en: [http://www.cccindia.co/corecentre/Database/Docs/DocFiles/herbal\\_medicine.pdf](http://www.cccindia.co/corecentre/Database/Docs/DocFiles/herbal_medicine.pdf)
2. Firuzi O, Miri R, Asadollahi M, Eslami S, Jassbi AR. Cytotoxic, antioxidant and antimicrobial activities and phenolic contents of eleven salvia species from Iran. Iran. J Pharm Res [internet]. 2013 [citado 31 oct. 2013];12(4):[aprox. 10 p.]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3920696/>
3. Chan CH, Ngoh GC, Yusoff R. A brief review on anti diabetic plants: Global distribution, active ingredients, extraction techniques and acting mechanisms. Pharmacogn Rev [internet]. 2012 [citado 8 ene. 2013];6(11):[aprox. 7 p.]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3358964/>
4. Casado R, Landa, A. Anti-inflammatory, antioxidant and antifungal activity of *Chuquiraga spinosa*. Pharm Biol [internet]. 2011 [citado 12 ago. 2013]; 49(6):[aprox. 7 p.]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Anti-inflammatory%2C+antioxidant+and+antifungal+activity+of+Chuquiraga+spinosa>
5. Mendiondo ME, Juarez BE. Bioactivities of *Chuquiraga straminea* sandwich. Nat Prod Commun [internet]. 2011 [citado 2 sep. 2013];6(7):[aprox. 4 p.]. Disponible en:



- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Bioactivities+of+Chuquiraga+straminea+sandwith>
6. Alberto MR, Zampini IC, Isla MI. Inhibition of cyclooxygenase activity by standardized hydroalcoholic extracts of four Asteraceae species from the Argentine Puna. *Braz J Med Biol Res* [internet]. 2009 Sep. [citado 12 ago. 2013]; 42(9):[aprox. 4 p.]. Disponible en: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-879X2009000900003&lng=en&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-879X2009000900003&lng=en&nrm=iso&tlng=en)
  7. Hirschler-Laszkiwicz I, Zhang W, Keefer K, Conrad K, Tong Q, Shu-jen C, et al. Trpc2 depletion protects RBC from Oxidative Stress Induced Hemolysis. *Exp Hematol* [internet]. 2012 [citado 6 mar. 2013];40(1):[aprox. 13 p.]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3237850/>
  8. Vitturi DA, Chiao-Wang S, Harper VM, Thrash-Williams B, Cantu-Medellin N, Chacko BK, et al. Antioxidant functions of the hemoglobin  $\beta$ 93 cysteine residues in erythrocytes and the vascular compartment in vivo. *Free Radic Biol Med* [internet]. 2012 Nov. 16 [citado 31 ene. 2013];55:[aprox. 10 p.]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3821075/>
  9. Mahejabeen F, Kumar Kesharwani R, Misra K, Syed IR. Protective effect of the aflavin on erythrocytes subjected to in vitro oxidative stress. *Biochem Res Int* [internet]. 2013 Dec. 21 [citado 3 ene. 2014];(2013):[aprox. 8 p.]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3880739/>
  10. Sachar S, Saxena RK. Cytotoxic effect of poly-dispersed single walled carbon nanotubes on erythrocytes in vitro and in vivo. *PLoS One* [internet]. 2011 Jul. 19 [citado 20 abr. 2013];6(7):[aprox. 9 p.]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3139600/>
  11. Okoko T, Ere D. Reduction of hydrogen peroxide-induced erythrocyte damage by *Carica papaya* leaf extract. *Asian Pac J Trop Biomed* [internet]. 2012 Jun. [citado 3 mar. 2013];2(6):[aprox. 5 p.]. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2221169112600744>
  12. Martinez V, Corsini E, Mitjans M, Pinazo A, Vinardell MP. Evaluation of eye and skin irritation of arginine-derivative surfactants using different *in vitro* endpoints as alternatives to the *in vivo* assays. *Toxicol Lett* [internet]. 2006 Jul. 15 [citado 10 abr. 2013];164(3):[aprox. 9 p.]. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378427406000142>
  13. Lin SH, Guidotti G. Purification of membrane proteins. *Methods in Enzimol* [internet]. 2009 [citado 21 nov. 2013];463(35):[aprox. 11 p.]. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0076687909630354>
  14. Kanas T, Acker JP. Biopreservation of red blood cells- the struggle with hemoglobin oxidation. *FEBS J* [internet]. 2010 Jan. [citado 17 abr. 2013];277 (2):[aprox. 13 p.]. Disponible en: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1742-4658.2009.07472.x/full>

Recibido: 14 de diciembre de 2013

Aprobado: 10 de febrero de 2014

MSc. Alex Alberto Dueñas Rivadeneira. Máster en Investigación Educativa. Docente Agregado. Universidad Técnica de Manabí, Portoviejo, Manabí. Ecuador. Correo electrónico: [alduri81@hotmail.com](mailto:alduri81@hotmail.com)