

INSTITUTO SUPERIOR DE CIENCIAS MÉDICAS
“DR. SERAFÍN RUIZ DE ZÁRATE RUIZ”
SANTA CLARA, VILLA CLARA

HEMÓLISIS PRODUCIDA POR *SOLANUM MELONGENA*, *CISSUS SICYOIDES*,
PLANTAGO MAJOR Y *ACHYRANTHES ASPERA*

Por:

MSc. Yisel González Madariaga¹, Dra. CM. María Boffill Cárdenas², Lic. Deodelsys Bermúdez Toledo³, Ing. Orestes Castillo Alfonso⁴ y MSc. Carmen Sánchez Álvarez⁵

1. Máster en Bioquímica General. Investigadora agregada. Instructora adjunta. Unidad de Toxicología Experimental. ISCM-VC. e-mail: yiselgm@iscm.vcl.sld.cu
2. Doctora en Ciencias Médicas. Especialista en Bioquímica. Unidad de Toxicología Experimental. Profesora Titular y Consultante. ISCM-VC. e-mail:
3. Investigadora agregada. Instructora adjunta. Unidad de Toxicología Experimental. ISCM-VC. e-mail: deodelsybt@iscm.vcl.sld.cu
4. Ingeniero Pecuario. Unidad de Toxicología Experimental. ISCM-VC. e-mail: orestesca@iscm.vcl.sld.cu
5. Máster en Ciencias Toxicológicas. Unidad de Toxicología Experimental. Instructora adjunta. ISCM-VC. e-mail: carmensa@iscm.vcl.sld.cu

Resumen

El eritrocito constituye un modelo óptimo para el estudio de actividad sobre membranas biológicas. El ensayo de hemólisis es utilizado para conocer, además, el mecanismo de toxicidad de una sustancia. En el presente trabajo, se efectuó previamente un tamizaje fitoquímico de las plantas en estudio, para posteriormente evaluar los efectos que sobre la membrana de eritrocitos presentan los extractos hidroalcohólicos de las plantas medicinales: *Solanum melongena*, *Cissus sicyoides*, *Plantago major* y *Achyranthes aspera*. Se utilizaron glóbulos rojos provenientes de donantes sanos. El porcentaje de hemólisis fue determinado, así como la concentración hemolítica 50 por regresión lineal. El tamizaje fitoquímico mostró cualitativamente la presencia de flavonoides, aminoácidos libres, saponinas y alcaloides. Los extractos de *Solanum melongena*, *Cissus sicyoides* y *Plantago major* no produjeron hemólisis en el rango de las concentraciones evaluadas. Solo se produjo una hemólisis significativa con el extracto de *Achyranthes aspera*, aunque la concentración hemolítica 50 fue 47 veces mayor que el control positivo.

Descriptores DeCS:

HEMÓLISIS
EXTRACTOS VEGETALES
TESTS DE TOXICIDAD

Subject headings:

HEMOLYSIS
PLANT EXTRACTS
TOXICITY TESTS

Introducción

La relativa simplicidad estructural y funcional del eritrocito y la presencia de una bicapa lipídica semejante al resto de las células del organismo, permiten inferir que un daño en su membrana se correlacionaría con una alta probabilidad de que otras células más complejas, y con mayor

cantidad de organelos susceptibles al daño en su sistema membranoso, puedan responder de igual forma o, con mayor intensidad que los eritrocitos^{1,2}; por ello, esta célula constituye un buen modelo para estudiar la actividad de diversas sustancias sobre membranas biológicas.

El ensayo de hemólisis se usa en la actualidad para conocer, además, el mecanismo de toxicidad de una sustancia. Se ha estudiado mediante este método *in vitro* el efecto de los derivados de la naftoquinonas, que son compuestos que tienen un alto potencial terapéutico, pero son tóxicos para los animales y el hombre; muchos son agentes hemolíticos, mientras otros causan necrosis de las células tubulares epiteliales³. Asimismo, se ha estudiado el efecto de la acumulación de metales pesados en los eritrocitos⁴, como control de calidad en el almacenamiento de la sangre, en su transportación⁵ y en los estudios de virulencias de algunos virus⁶.

Solanum melongena pertenece a una especie a la que se le ha identificado un alto contenido de ácido clorogénico, uno de los compuestos fenólicos que más abunda en los vegetales con un elevado potencial antioxidante⁷. Esta planta contiene muchos polifenoles que intervienen en la eliminación de los radicales libres⁸ y producen una alta inhibición de la alfa glucosidasa, y en forma específica modera la actividad inhibitoria de la enzima convertidora de la angiotensina I. *Cissus sicyoides* es una de las especies que se encuentra muy difundida por todo el país y posee una alta frecuencia de empleo popular; se ha comprobado su potencial antioxidante a partir de su composición fitoquímica⁹, y ha sido poco estudiada desde el punto de vista farmacognóstico y farmacológico. Los extractos acuosos de *Plantago major* han sido evaluados en diferentes modelos biológicos, y se han comprobado sus propiedades antimicrobiana y hemopoyética *in vitro*¹⁰. Diferentes extractos de *Achyranthes aspera* han mostrado tener actividades inmunomoduladoras, antilipemiantes, hipoglicémicas, diuréticas, anticancerígenas, entre otras¹¹. La administración de un extracto etanólico de la planta demostró la disminución del conteo de espermatozoides en comunidades africanas, lo cual sería útil para el control de la natalidad^{12, 13}.

Métodos

Se elaboraron extractos hidroalcohólicos a partir de las partes aéreas de las plantas, excepto en el caso de *Solanum melongena*, de la que se utilizó el fruto maduro.

Las células rojas de la sangre humana fueron lavadas con PBS, y se preparó una suspensión de eritrocitos con una concentración aproximada de 8×10^9 glóbulos/mL. La sangre humana empleada fue independiente del grupo sanguíneo, pues estudios previos realizados en nuestro laboratorio demostraron que este factor no influye en la evaluación del potencial hemolítico y fotohemolítico¹⁴.

Se prepararon diluciones seriadas de cada extracto y del Sodio Dodecil Sulfato (SDS), conocido agente hemolítico, para obtener una curva de dosis-respuesta desde un nivel donde no se produjo efecto hasta el 100 % de hemólisis.

Fueron evaluadas seis concentraciones por triplicado para cada extracto, en el rango de dosis de 0,5 hasta 3 mg/mL sobre la base de los sólidos totales. El contenido de las muestras fue preparado a partir de volúmenes correspondientes de PBS, suspensión eritrocítica y extracto de ensayo.

La suspensión de los glóbulos, en presencia de los extractos de las plantas en estudio o del SDS, se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos. El período de incubación se terminó con una corta y rápida centrifugación (10 minutos a 2500 rpm). El sobrenadante resultante se monitorizó para detectar hemólisis mediante la lectura en un espectrofotómetro a 540 nm contra un blanco de eritrocitos en PBS (monitorización de la hemólisis espontánea). El 100 % de la hemólisis se consiguió incubando los eritrocitos durante 10 minutos con agua destilada, a temperatura ambiente.

El porcentaje de hemólisis se determinó por el cociente entre la absorbancia del sobrenadante de las muestras tratadas con los extractos y las controles que fueron hemolizadas totalmente con agua destilada a 540 nm. La concentración de cada extracto que produce un 50 % de los eritrocitos hemolizados (CH50), se determinó por regresión lineal.

Resultados

El tamizaje fitoquímico mostró cualitativamente la presencia de flavonoides, aminoácidos libres, saponinas y alcaloides, este último en mayor proporción. Por otra parte, no fueron detectados fenoles o taninos en la composición de *Achyranthes aspera*. Las coumarinas solo están presentes en *Plantago major* y *Solanum melongena*, y las quinonas en *Cissus sicyoides*; este último metabolito influye en el posible efecto hemolítico de esta planta medicinal³.

El efecto producido por los extractos sobre los glóbulos rojos en el ensayo de Red Blood Cell (RBC) se observan en la tabla. El análisis de los resultados demuestra que solo se produjo una hemólisis significativa en el rango de concentraciones ensayadas (0,5 a 3,0 mg/mL) con el extracto de *Achyranthes aspera*; el resto de los extractos no provocaron hemólisis significativa; por tanto, solo pudo ser determinada la CH50 en *Achyranthes aspera* (1,67 mg/mL).

Tabla Resultados del ensayo de hemólisis.

Concentraciones mg/mL	Por ciento de hemólisis			
	<i>Plantago major</i>	<i>Solanum melongena</i>	<i>Cissus sicyoides</i>	<i>Achyranthes aspera</i>
0,5	0	0,2	0	2,37
1,0	0	0,1	0	13,3
1,5	0	0,3	0	25,04
2,0	0	0,9	0	91,37
2,5	0	0,6	0	94,43
3,0	0	2,81	0	93,99
CH50	-	-	-	1,67mg/mL

Discusión

La proporción relativa de los diferentes metabolitos secundarios presentes en los extractos estudiados influyen en las diferencias observadas en la evaluación hemolítica. Los flavonoides son metabolitos que, en dependencia de sus estructuras químicas, pueden producir daños en la membrana celular con producción de hemólisis^{15,16}. Sin embargo, también se ha informado que los fenoles o taninos son metabolitos que pudieran manifestar efectos antioxidantes¹⁷⁻¹⁹. La presencia de saponinas contribuye, por su carácter tensoactivo, a la pérdida de la integridad de la membrana del eritrocito y, con excepción de *Solanum melongena*, todas las plantas estudiadas presentaron este fitocompuesto.

Los extractos de *Solanum melongena*, *Cissus sicyoides* y *Plantago major* no produjeron hemólisis, teniendo en cuenta que el rango de concentraciones evaluadas para los extractos, se corresponde con valores mucho mayores que los presentados por agentes con propiedades hemolíticas probadas. Esto explica que el efecto hemolítico observado en *Achyranthes aspera* sea muy inferior al control positivo, lo que se evidencia con el cálculo de la CH50 (1,67 mg/mL). Una comparación de la CH50 de *A. aspera* con el reconocido agente hemolítico Dodecil Sulfato de Sodio (SDS), demuestra que el valor alcanzado por la planta fue 47 veces mayor que el control positivo. *Achyranthes aspera* presenta un comportamiento marcadamente diferente al resto de las plantas estudiadas. Este resultado pudiera estar justificado, en buena medida, por la ausencia en esta planta de algún tipo de fenol o tanino, metabolitos que pudieran tener efecto protector al daño en la membrana; además, en el extracto acuoso de esta planta se detectaron los valores más bajos de alcaloides, en comparación con el resto de los extractos estudiados, lo que pudiera influir en el comportamiento observado frente a eritrocitos.

Summary

The erythrocyte is an ideal model for the study of activity about biological membranes. The hemolysis trial is used to know the toxicity mechanism of a substance. In the current work a phytochemical screening of the plants under study was carried out in order to analyze the effects that the hydro-alcoholic extracts of medicinal plants exert on the erythrocyte membrane. *Solanum melongena*, *Cissus sicyodes*, *Plantago major* and *Achyranthes aspera*. Red blood cells from healthy donors were used. By means of the linear regression the hemolysis percentage was determined and so was the hemolytic concentration 50 (HC50). The phytochemical screening qualitatively showed the presence of flavonoides, free amino acids, saponins and alkaloids. In the range of the evaluated concentrations the extracts of *Solanum melongena*, *Cissus sicyoides* y *Plantago major* L. did not produce hemolysis. Only with *Achyranthes aspera* extract a significant hemolysis was produced though the hemolytic concentration 50 was 47 times greater than the positive control.

Referencias bibliográficas

1. Pape W. Red blood cell test system. ERGATT FRAME. 1992;37(Pt 1):1-14.
2. Tse WT, Lux SE. Red blood cell membrane disorders. Br J Haematol. 1999;104:2-13.
3. Munday R, Smith BL, Munday CM. Structure-activity relationships in the haemolytic activity and nephrotoxicity of derivatives of 1,2- and 1,4-naphthoquinone. J Appl Toxicol. 2007;27(3):262-9.
4. Lee MY, Shin JH, Han HS, Chung JH. In vivo effects of lead on erythrocytes following chronic exposure through drinking water. Arch Pharm Res. 2006;29(12):1158-63.
5. Tiwari AK, Shah P, Harimoorthy V. Estimation of supernatant hemoglobin in red cell units with and without temperature interruptions. Indian J Pathol Microbiol. 2007;50(2):437-40.
6. Wu TK, Wang YK, Chen YC, Feng JM, Liu YH, Wang TY. Identification of a *Vibri furnissii* oligopeptide permease and characterization of its in vitro hemolytic activity. J Bacteriol. 2007;189(22):8215-23.
7. Matsubara K, Kaneyuki T, Miyake T, Mori M. Antiangiogenic activity of nasunin, an antioxidant anthocyanin, in eggplant peels. J Agric Food Chem. 2005 Aug 10;53(16):6272-5.
8. Sadilova E, Stintzing FC, Carle R. Anthocyanins, colour and antioxidant properties of eggplant (*Solanum melongena* L.) and violet pepper (*Capsicum annum* L.) peel extracts. Z Naturforsch (C). 2006;6(7-8):527-35.
9. Khalil NM, Pepato MT, Brunetti IL. Free Radical Scavenging Profile and Myeloperoxidase Inhibition of Extracts from Antidiabetic Plants: *Bauhinia forficata* and *Cissus sicyoides*. Bio Res. 2008;4(2):165-71.
10. Velasco-Lezama R, Tapia-Aguilar R, Román-Ramos R, Vega-Ávila E, Pérez-Gutiérrez MS. Effect of *Plantago major* on cell proliferation in vitro. J Ethnopharmacol. 2006;103(1):36-42.
11. Bhoomika RG, Ramesh KG, Mehta AA. Plant Review Phyto-pharmacology of *Achyranthes aspera*. Pharmacognosy Reviews. 2007;1(1):143-50.
12. Shibeshi W, Makonnen E, Zerihun L, Debella A. Effect of *Achyranthes aspera* L. on fetal abortion, uterine and pituitary weights, serum lipids and hormones. Afr Health Sci. 2006;6(2):108-12.
13. Vasudeva N, Sharma SK. Post-coital antifertility activity of *Achyranthes aspera* Linn. Root J Ethnopharmacol. 2006;107(2):179-81.
14. González YM, Boffill MC, Bermúdez DT, Sánchez CA, Castillo OA. Evaluación del ensayo de fotohemólisis en el sistema de Clasificación ABO Rh+. Medicentro Electrónica [serie en Internet]. 2007 [citado 20 Dic 2008];11(1):[aprox 5 p.]. Disponible en: <http://www.vcl.sld.cu/sitios/medicentro/paginas%20de%20acceso/Sumario/ano%202007/v11n1a07/evaluacion.htm>
15. Benavides T, Martínez V, Mitjans M, Infante MR, Moran C, Clapes P, et al. Assessment of the potential irritation and photoirritation of novel amino acid-based surfactants by in vitro methods as alternative to the animal tests. Toxicology. 2004;201(1-3):87-93.
16. Pignatello R, Noce C, Campisi A, Acquaviva R, Bucolo C, Puglisi G, et al. Evaluation of cell tolerability of a series of lipoamino acids using biological membranes and a biomembrane model. Curr Drug Deliv. 2007;4(2):109-21.

17. González Lavau JA, Montes de Oca Rojas Y, Domínguez Mesa MI. Breve reseña de la especie *Solanum melongena* L. Rev Cubana Plant Med [serie en Internet]. 2007 [citado 20 Dic 2008];12(3):[aprox. 11 p.]. Disponible en:
http://bvs.sld.cu/revistas/pla/vol12_3_07/pla06307.html
18. Shen G, Van Kiem P, Cai XF, Li G, Dat NT, Choi YA, et al. Solanoflavone, a new biflavonol glycoside from *Solanum melongena*: seeking for anti-inflammatory components. Arch Pharm Res. 2005;28(6):657-9.
19. Gálvez M, Martín-Cordero C, Houghton PJ, Ayuso MJ. Antioxidant activity of *Plantago bellardii* All. Phytother Res. 2005;9(12):1074-6.

Recibido: 4 de diciembre de 2008

Aprobado: 11 de febrero de 2009