

UNIDAD DE TOXICOLOGÍA EXPERIMENTAL  
UNIVERSIDAD DE CIENCIAS MÉDICAS  
“DR. SERAFÍN RUIZ DE ZÁRATE RUIZ”  
SANTA CLARA, VILLA CLARA

## ARTÍCULO ORIGINAL

### EVALUACIÓN DE LA ACCIÓN HEMOLÍTICA DEL *APIUM GRAVEOLENS* EN PRESENCIA DE LA LUZ ULTRAVIOLETA

Por:

Lic. Deodely Bermúdez Toledo<sup>1</sup>, Dra. CM. María Boffill Cárdenas<sup>2</sup>, Lic. Arianna Valido Díaz<sup>3</sup>, Téc. Nieves Iglesias Rodríguez<sup>4</sup> y Lic. Celia María Martínez Montalbán<sup>5</sup>

1. Licenciada en Ciencias Farmacéuticas. Investigadora Agregada. Unidad de Toxicología Experimental. Universidad de Ciencias Médicas de Villa Clara. e-mail: [deodelsybt@iscm.vcl.sld.cu](mailto:deodelsybt@iscm.vcl.sld.cu)
2. Doctora en Ciencias Médicas. Profesora Titular y Consultante. Universidad de Ciencias Médicas de Villa Clara.
3. Licenciada en Ciencias Farmacéuticas. Unidad de Toxicología Experimental. Universidad de Ciencias Médicas de Villa Clara.
4. Técnico en Medicina Veterinaria. Universidad de Ciencias Médicas de Villa Clara.
5. Licenciada en Tecnología de la Salud. Perfil Laboratorio. Universidad de Ciencias Médicas de Villa Clara.

### Resumen

La prueba de fotohemólisis es un método alternativo propuesto para evaluar el potencial fototóxico de diversos productos que dañan la membrana del eritrocito bajo la acción de la luz ultravioleta-visible. En el presente trabajo se evaluó el efecto fotoirritante del *Apium graveolens* como prueba de estimación de riesgo, para lo cual se procedió según el protocolo 81 de las técnicas *in vitro* en toxicología; se emplearon eritrocitos humanos de los diferentes grupos sanguíneos y, además, se determinaron los metabolitos secundarios principales del extracto vegetal, responsables de los efectos observados. Mediante el tamizaje fitoquímico se comprobó la presencia de determinados metabolitos en diferentes proporciones, que pudieran determinar las diferencias en relación con el efecto hemolítico y fotohemolítico. Por otro lado, los valores de densidad óptica y el factor hemolítico obtenidos fueron inferiores al rango de clasificación, lo que nos permite concluir que el extracto de la planta de estudio no es fotoirritante.

**Descriptor DeCS:**

APIUM GRAVEOLENS  
HEMOLISIS  
AGENTES FOTSENSIBILIZADOS

**Subject headings:**

APIUM GRAVEOLENS  
HEMOLYSIS  
PHOTOSENSIBILIZING AGENTS

## Introducción

El glóbulo rojo es utilizado ampliamente como modelo para el estudio de numerosos fenómenos a nivel celular. Las radiaciones ultravioletas provocan la hemólisis de estos en presencia de un agente fotosensibilizante, hecho que ha permitido su empleo para identificar agentes potencialmente fototóxicos<sup>1-5</sup>.

El ensayo de fotohemólisis, también conocido como Photo-RBC, permite determinar la capacidad que tiene un producto de dañar las membranas eritrocitarias, oxidar la hemoglobina en presencia de la luz ultravioleta (UV), o ambas, de modo que nos permite conocer el efecto beneficioso o perjudicial de este sobre las membranas biológicas.

El *Apium graveolens*, conocido como apio, es una planta medicinal empleada comúnmente por la población<sup>6</sup>; sin embargo, a pesar de su referencia etnomédica, no cuenta con los estudios toxicológicos preclínicos establecidos. En el presente estudio, se evaluó el efecto fotoirritante de esta planta como prueba de estimación de riesgo.

## Métodos

La planta fue cultivada y recolectada en el Huerto de Plantas Medicinales de la Unidad Básica de Producción Cooperativa "Octubre Victorioso" de Villa Clara, en horas de la mañana. La parte aérea fue secada a la sombra, molida y finalmente tamizada. Posteriormente, se procedió a la elaboración de un extracto hidroalcohólico por el método de percolación en el Laboratorio Provincial de Plantas Medicinales de Villa Clara, con su correspondiente control de la calidad, a partir del cual, luego de un proceso de rotoevaporación (rotoevaporador IKA-Labortechnik), se obtuvo un extracto blando, del cual se evaluaron seis concentraciones por triplicado empleando solución amortiguadora salino fosfato (PBS) como vehículo, para mantener el pH a 7,4 y la osmolaridad del medio. Las concentraciones de estudio fueron: 0,5 mg/ml, 1,0 mg/ml, 1,5 mg/ml, 2,0 mg/ml, 2,5 mg/ml y 3,0 mg/ml basadas en los sólidos totales, de modo que la mayor concentración sea aquella que coincida con la mínima concentración para lograr el 100% de hemólisis.

Para la determinación del efecto fotohemolítico, se procedió según el protocolo 81 de las técnicas *in vitro* en toxicología (INVITTOX), y se empleó como control positivo la clorpromazina, por su reconocida acción fotohemolítica.

Las células rojas de sangre humana fueron lavadas con PBS, y se preparó una suspensión de eritrocitos en una proporción de 0,8 ml de glóbulos suspendidos en 1 ml de PBS. Se empleó sangre de los diferentes grupos sanguíneos, al demostrarse en estudios previos realizados en nuestro laboratorio que estos no producen diferencias en relación con el potencial hemolítico y fotohemolítico<sup>7</sup>.

Se prepararon dos placas idénticas: una de ellas se incubó en la oscuridad a temperatura ambiente cubierta en papel de aluminio, y la otra, bajo una lámpara de luz UV con una intensidad de radiación de UVA 960 mw/cm<sup>2</sup>, ambas durante 60 minutos. Transcurrido el tiempo de exposición, la placa expuesta a la irradiación permaneció 30 minutos en la oscuridad. Posteriormente, fue transferido el contenido de las placas a tubos y centrifugados durante 10 minutos (aproximadamente 3 500 rpm). Para evaluar el punto final, se determinó la cantidad de hemoglobina liberada en el sobrenadante a 540 nm. El sobrenadante se monitorizó a 540 contra un blanco de eritrocitos en PBS, además de un blanco con extracto. El 100 % de hemólisis se obtuvo incubando los eritrocitos en agua destilada.

Los procedimientos experimentales se realizaron de forma rápida y hábil para minimizar los efectos cinéticos, debido a que la hemólisis y la formación de metahemoglobina no se detienen con el cese de la irradiación.

La concentración hemolítica 50 (CH<sub>50</sub>) es aquella que produce el 50 % de los eritrocitos hemolizados, y tanto el de las muestras irradiadas (MI) como las no irradiadas (MNI) fueron determinadas por regresión lineal. Los valores CH<sub>50</sub> de los extractos sin irradiar e irradiados fueron comparados, y se obtuvo la relación CH<sub>50</sub>(MNI)/CH<sub>50</sub>(MI), que posteriormente nos permitirá emitir un criterio de clasificación.

El ensayo de oxidación de la hemoglobina tiene la finalidad de determinar la formación de metahemoglobina (meta-Hb) intracelular y extracelular. Se realizó en las mismas condiciones que el ensayo de fotohemólisis.

El extracto se probó por triplicado a una concentración de sólidos totales de 10 mg/mL, y se añadieron 200  $\mu$ L de una solución de Tritón X-100 al 1%, para solubilizar las células remanentes a razón de 200  $\mu$ L en cada pocillo de las muestras irradiadas y no irradiadas después de la incubación en la oscuridad. Se centrifugaron y se realizó una lectura espectrofotométrica a 630 nm, para determinar la cantidad de meta-Hb.

El valor de la máxima cantidad de meta-Hb es la diferencia de densidad óptica (DO) a 630 nm entre las muestras irradiadas y las no irradiadas.

Los productos potencialmente fototóxicos serán aquellos cuyo factor hemolítico =  $CH_{50}$  muestra no irradiada /  $CH_{50}$  muestra irradiada  $> 3$ , DO  $> 0,05$  o ambos, obtenido en la prueba de oxidación de la hemoglobina.

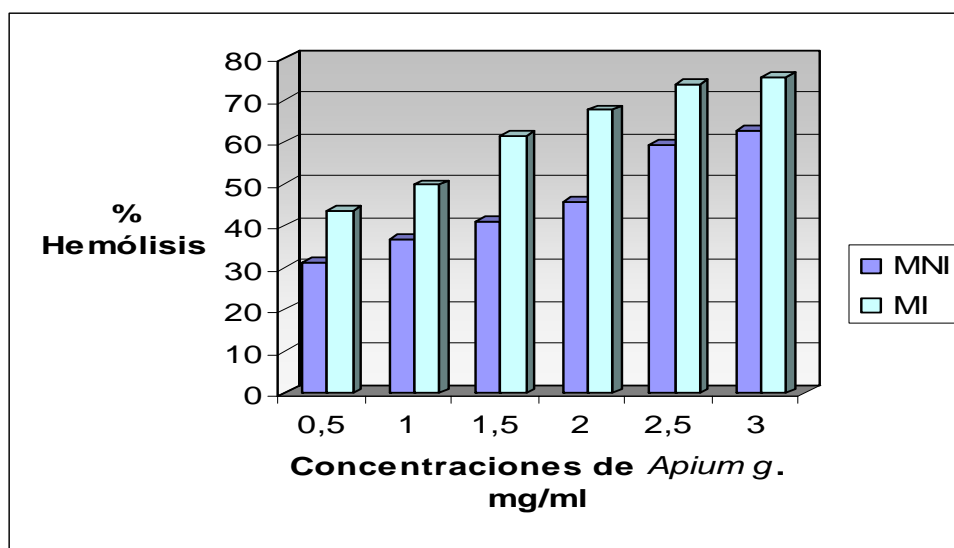
Finalmente, se determinaron cualitativamente, mediante técnicas de tamizaje fitoquímico, los metabolitos secundarios principales del extracto hidroalcohólico, al cual se le realizó una batería de ensayos, entre los que se encuentran: Shinoda, espuma, Ninhidrina, Dragendorff, cloruro férrico, resina, Baljet, Borntrager, Liebermann Burchard, Fehling y Kedde<sup>8</sup>.

Los resultados obtenidos fueron procesados mediante el paquete estadístico SPSS 11.5 para Windows. Se determinó la media aritmética de la variable estudiada (absorbancia) para cada una de las concentraciones de estudio, además de los valores de  $CH_{50}$  que fueron obtenidos mediante el programa Excel versión 6.0 por el método de regresión lineal, partiendo de las curvas dosis-respuestas. La significación estadística del porcentaje hemolítico en cada uno de los momentos (antes de la irradiación y después de ella) se determinó a través de la prueba no paramétrica de los rangos con signo de Wilcoxon. Se consideró significativo un nivel de  $p < 0,05$ .

## **Resultados**

En la figura se muestran los resultados obtenidos mediante la prueba de fotohemólisis en presencia del extracto de estudio, donde se observó cómo la  $CH_{50}$  en las muestras irradiadas fue superior. La actividad hemolítica obtenida de las muestras sin irradiar a las diferentes concentraciones de estudio fue menor en relación con las muestras expuestas a la luz UV, y a pesar de este comportamiento, es de señalar que se evidenciaron valores apreciables de hemólisis en ambos momentos, pero siempre superiores en las muestras irradiadas con valores marcados en las concentraciones de 1,5 mg/ml y 2,0 mg/ml. Las diferencias estadísticas entre cada una de las muestras (sin exposición a la luz UV y con exposición a ella, en relación con el porcentaje hemolítico, fueron significativas ( $p = 0,028$ ), y la  $CH_{50}$  de las MI y de las MNI fue de 0,86 y de 2,03 mg/ml respectivamente.

La relación entre los valores de  $CH_{50}$  de las MNI y la  $CH_{50}$  de las MI obtenidos en la prueba de fotohemólisis fue de 2,36, lo que permite afirmar que el extracto de ensayo no se considera fotoirritante, según criterio de clasificación.



MNI: Muestras no irradiadas

MI: Muestras irradiadas

Figura: Porcentaje hemolítico del *Apium graveolens*.

El valor de  $DO_{630}$  obtenido en la prueba de oxidación de la hemoglobina fue de 0,019, inferior a 0,05, lo que permite concluir que el extracto de la planta de estudio no es fotoirritante.

El tamizaje fitoquímico del extracto hidroalcohólico de la parte aérea de la planta resultó positivo para los ensayos de espuma, resina, Ninhidrina, Dragendorff, Baljet y el ensayo de Fehling, lo que indica la presencia de aminoácidos libres, saponinas, resinas y, en mayor proporción, alcaloides y coumarinas.

### Discusión

Los valores superiores de CH50 de las muestras irradiadas pueden deberse a la presencia de saponinas u otros metabolitos secundarios en la composición de la planta evaluada, que pudieran interferir sobre membranas celulares sensibilizadas por la acción de la luz UV, unido al tiempo de exposición, lo que incrementa de este modo su inestabilidad y, por consiguiente, la lisis celular.

Por otra parte, a pesar de que la relación entre los valores de CH50 de las MNI y MI fue inferior a 3, se considera un valor muy cercano al rango permisible, lo que puede estar dado por la presencia de determinados metabolitos y en diferentes proporciones que puedan interferir en la estabilidad de las membranas celulares; esto motiva la realización de estudios ulteriores en relación con este comportamiento. En este sentido, la presencia de aminoácidos libres en dependencia de sus estructuras químicas, puede provocar daños a nivel de la membrana celular y, por consiguiente, la lisis del eritrocito<sup>9,10</sup>. Por otra parte, a pesar de existir evidencias de los efectos antioxidantes de los alcaloides<sup>11,12</sup>, el carácter tensoactivo de las saponinas pudiera precipitar la hemólisis. La cantidad relativa de estos metabolitos en el extracto evaluado pudieran determinar, finalmente, diferencias en el efecto hemolítico y fotohemolítico.

### Summary

Photohemolysis test is an alternative method which was proposed to evaluate the phototoxic potential of several products that damage the erythrocyte under the action of visible ultraviolet light. The photoirritant effect of *Apium Graveolens* was evaluated in this study as a risk assessment

testing, following the 81 protocol of the in vitro techniques in toxicology. Human erythrocytes from different blood groups were used and also main secondary metabolites of the vegetable extract were determined. These metabolites caused the effects we could check. By means of phytochemical sifting the presence of certain metabolites on different rates that could determine the differences in relation to the hemolytic and photohemolytic effect was checked. On the other hand the optical density values and the hemolytic factor obtained were lower than the classification rank. Then we got to the conclusion that the extract of this plant it is not photoirritant.

### **Referencias bibliográficas**

1. Vargas F, Rivas C, Zoltan T, Fuentes A, Padrón L, Díaz Y, et al. Photodegradation and in vitro phototoxicity of aceclofenac. *C Pharmazie* 2007;2(5):337-41.
2. Pérez MU, Murillo G, Tur E, Vinardell MP, García SG, Pascual JR. Evaluación de la irritación ocular mediante un ensayo de hemólisis y desnaturalización de la hemoglobina *in vitro*. *Rev Toxicol*. 2003;20:193-8.
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. Placzek M, Krosta I, Gaube S, Eberlein K, Przybilla B. Evaluation of phototoxic properties of antimicrobials used in topical preparations by a photohaemolysis test. *Acta Derm Venereol*. 2005;85(1):13-6.
5. 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.
6. Martínez JL, Rodríguez J, Prieto JM. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas medicinales y aromáticas*. *Latindex*. 2006;5(2):7-10.
7. González YM, Boffill MC, Bermúdez DT, Sánchez CA, Castillo OA. Evaluación del ensayo de fotohemólisis en el sistema de Clasificación ABO Rh+. *Medicentro Electrónica [Internet]*. 2007 [citado el 29 de enero de 2010];11(1): [aprox.5p.]. Disponible en: <http://www.vcl.sld.cu/sitios/medicentro/paginas%20de%20acceso/Sumario/ano%202007/v11n1a07/evaluacion.htm>
8. Miranda M, Cuellar A. *Manual de prácticas de laboratorio de Farmacognosia y Productos naturales*. La Habana: Pueblo y Educación; 2001.
9. 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.
10. 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.
11. Gálvez M, Martín-Cordero C, Houghton PJ, Ayuso MJ. Antioxidant activity of *Plantago bellardii* All. *Phytother Res*. 2005;19(12):1074-76.
12. Singh RP, Kaur G. Hemolytic activity of aqueous extract of *Livistona chinensis* fruits. *Food and Chemical Toxicology*. 2008;46(2):553-56.

Recibido: 22 de octubre de 2009

Aprobado: 16 de febrero de 2010