

Estudio Fotobiológico del Aceite de Rosa Mosqueta (*Rosa aff. rubiginosa* L.)

S. BARROS*, X. LING*, M. GALEA**, F. CARVAJAL* y E. FERNANDEZ*

*Escuela de Química y Farmacia, Facultad de Medicina, Universidad de Valparaíso,
Casilla 92-V, Valparaíso, Chile.

**Instituto de Matemáticas, Universidad de Valparaíso, Valparaíso, Chile.

RESUMEN. En el presente trabajo se evalúa el efecto fotobiológico del aceite de Rosa Mosqueta (*Rosa aff. rubiginosa* L.), mediante la técnica de fotohemólisis modificada para un sistema de dos fases. Además se determina el grado de enranciamiento del aceite de Rosa Mosqueta, usando las técnicas de cromatografía y el test del ácido 2-tiobarbitúrico (TBA). Los resultados indican diferencias significativas entre los porcentajes de hemólisis y fotohemólisis, observándose una correlación entre la fotohemólisis y la descomposición de los productos secundarios del aceite, catalizada por la luz. Se postula la existencia de radicales libres, provenientes de la lipoperoxidación del aceite, como las responsables del efecto fotohemolítico observado.

SUMMARY. "Photobiological Study of Rosa Mosqueta Oil (*Rosa aff. rubiginosa* L.)". The photobiological effect of Rosa Mosqueta oil is evaluated by the photohemolysis technique modified for a two phases system. Furthermore, the degree of rancidity of Rosa Mosqueta oil is determined by gas chromatography and the tiobarbituric acid (TBA) technique. Significant differences between hemolysis and photohemolysis (in percentages) are obtained. A correlation between photohemolysis and light catalyzed descomposition of oil secondary products is observed. Free radical species from the oil lipoperoxidation are postulated to be responsible of the photohemolytic effect obtained.

INTRODUCCION

Numerosas drogas, entre las que cabe mencionar fármacos, cosméticos, preservantes de alimentos, productos naturales y agropecuarios, provocan reacciones de fotosensibilidad. Es así como se han descrito reacciones de fotosensibilidad producidas por un componente de filtros solares, como el ácido *p*-aminobenzoico (P.A.B.A.)¹. Además se ha observado que ciertas grasas constituyentes de cosméticos al ser expuestas a la luz artificial provocan dermatitis,

efecto que se relaciona con un aumento de los peróxidos, inducido por radiaciones ultravioletas.

Ultimamente ha despertado gran interés en la industria cosmética el beneficio que produce la aplicación de aceites vegetales ricos en ácidos grasos insaturados. No obstante, es necesario tomar ciertas precauciones debido a que ellos pueden experimentar fácilmente reacciones de oxidación, ocasionando lipoperóxidos dañinos al ser humano².

PALABRAS CLAVE: Fotosensibilización, Lipoperoxidación, Fotohemólisis.

KEY WORDS: Photosensibilization, Lipoperoxidation, Photohemolysis.

El aceite de semilla de Rosa Mosqueta es un producto natural formado principalmente por ácidos linoleico (40,5%) y linolénico (30,4%) de gran aplicación en cosmética, por sus excelentes propiedades regeneradoras de tejidos³.

Considerando la alta proporción de ácidos grasos insaturados que contiene el aceite de Rosa Mosqueta, la mayor dosis de radiación que recibe en la actualidad la población⁴ y los antecedentes clínicos sobre fotodermatitis inducida por el aceite de Rosa Mosqueta, se lleva a cabo este estudio preclínico con el objeto de investigar el posible efecto fototóxico del aceite de Rosa Mosqueta a través de la evaluación del potencial fotohemolítico. Además se investiga la lipoxidación catalizada por la luz solar.

MATERIALES Y METODOS

Preparación de la suspensión de Glóbulos Rojos

Los glóbulos rojos (G.R.) se aíslan de sangre heparinizada obtenida de pacientes voluntarios sanos. La sangre se centrifuga a 2000 x g durante 10 min. Después de remover la capa de leucocitos, los G.R. se lavan tres veces con buffer fosfato salino (P.B.S.) de pH 7,4 adicionando P.B.S. en cantidad suficiente para obtener una suspensión al 2% v/v.

Técnica de irradiación

Las muestras se irradian mediante una lámpara de mercurio de media presión (Hanovia 0679 A-36) provista de filtro pyrex ($\lambda > 290$ nm). Durante la irradiación los tubos que contienen las muestras se mantienen en reactor Ace Glass, con una velocidad de giro constante a una distancia aproximada de 7 cm del centro de la lámpara.

La radiación efectiva se limita a las líneas espectrales de mercurio, superiores a 297 nm. La irradiancia bajo las condiciones

usadas es aproximadamente de $1,5 \times 10^{16}$ quantas/s determinada por actinometría.

Preparación de la emulsión de aceite de Rosa Mosqueta

Se preparan 2 tipos de emulsiones de aceite de Rosa Mosqueta, según las siguientes formulaciones:

<i>Emulsión I</i>	<i>Emulsión II</i>
12,24 g de aceite de Rosa Mosqueta ^o	12,24 g de aceite de Rosa Mosqueta [⊕]
0,33 g de Span 60	0,33 g de Span 60
0,93 g de Twen 60	0,93 g de Twen 60
100 ml de PBS	100 ml de PBS

^o El aceite de Rosa Mosqueta viene estabilizado con 0,1% de terbutilhidroquinona (TBH).

[⊕] El aceite de Rosa Mosqueta además de TBH contiene un aceite esencial (Compose N° 21433 Flora matic).

Ambas fases oleosa y acuosa se calientan en forma separada a 60 °C hasta homogeneidad. Luego se mezclan y homogeneizan durante 5 min en un vortex.

Determinación del porcentaje de hemólisis

El porcentaje de hemólisis se determina midiendo el hierro liberado mediante espectrofotometría de absorción atómica (Perkin Elmer, Mod. 360), después de irradiar a diferentes tiempos una batería de tubos pyrex que contienen 2 ml de suspensión de G.R. (2% v/v) y 5 ml de emulsión de aceite de Rosa Mosqueta. En ambos tipos de emulsión se mide el efecto fotohemolítico, utilizando controles en oscuridad.

Cada ensayo hemolítico se realiza por triplicado, eligiéndose el valor mediano como representativo para cada caso.

Determinación del efecto peroxidativo sobre el aceite de Rosa Mosqueta

Con el fin de determinar el grado de oxidación que sufre el aceite de Rosa Mosqueta al ser irradiado con luz de mercurio filtrada por pyrex, se utilizan dos técnicas.

La primera se basa en determinar el malonaldehído (MDA) mediante la técnica descrita por Placer *et al.*⁵ modificada para un sistema de dos fases que se discute más adelante. Las determinaciones de MDA se efectúan por triplicado, eligiéndose el valor mediano como representativo.

La segunda técnica utilizada se basa en la determinación de ácidos grasos por cromatografía gaseosa, de acuerdo al método descrito por la A.O.A.C.⁶. El extracto lipídico se inyecta en un cromatógrafo de gases Varian, equipado con una columna D.E.G.S. al 20% sobre chromosorb W-A.W., D.M.C. S. en soporte de acero inoxidable de 1/8 de pulgada de diámetro externo y 1,8 m de largo. Como gas portador se utiliza N₂ (24 psi) con un programa de temperatura de 50-200 °C a una velocidad de 2 °C/min.

Como standard interno se usa ácido pentadecanoico.

Ambas determinaciones se realizan en las emulsiones I y II, usando como control muestras que se mantienen en oscuridad.

Efecto del Oxígeno y antioxidantes

Con el objeto de determinar la dependencia del O₂ en el proceso fotohemolítico se hace burbujear nitrógeno en tubos hemolíticos que contienen 2 ml de suspensión de G.R. y 5 ml de emulsión I. El burbujeo se realiza a través de una aguja hipodérmica a una presión de 1,25 kg/cm² durante 15 min. La mitad de las muestras posteriormente se irradian con luz de mercurio filtrada por pyrex y las restantes se mantienen en oscuridad como control.

En forma paralela se repite el ensayo en condiciones de equilibrio atmosférico.

En todos los casos se determina el porcentaje de hemólisis y MDA.

Además se evalúa el efecto de dos antioxidantes, tiourea y butilhidroxitolueno (BHT), sobre el porcentaje de fotohemólisis

y MDA, usando como control muestras en oscuridad.

Análisis estadístico

Todas las curvas representadas en los gráficos se ajustan por el método de los mínimos cuadrados.

En la emulsión I se utilizó el test-student para muestras pareadas sobre 10 ensayos.

RESULTADOS Y DISCUSION

El ensayo de fotohemólisis representa un método adecuado para determinar el potencial fototóxico de una droga. No obstante, se presentan dificultades al trabajar en el sistema bifásico aceite-agua. Con el objeto de aumentar la estabilidad de la emulsión se incorpora una mezcla de los tensoactivos Twen y Span.

Al irradiar la mezcla de tensoactivos no se observan variaciones significativas en los porcentajes de hemólisis, en relación a los controles en oscuridad (datos no tabulados). La experiencia anterior demuestra que la luz no produce cambios fotoquímicos ni fotofísicos sobre la mezcla, atribuyéndose las diferencias de hemólisis solamente a la presencia del aceite de Rosa Mosqueta.

Por otra parte, con el objeto de esclarecer el mecanismo fotohemolítico inducido por el aceite de Rosa Mosqueta, se determina el grado de lipoperoxidación y enrarecimiento catalizado por la luz midiendo el índice de malonaldehído a través de la formación del complejo MDA-TBA.

En la figura 1 se presentan los porcentajes de hemólisis producidos por la emulsión I en muestras controles e irradiadas.

La curva se ajusta por el método de los mínimos cuadrados. Al analizar el coeficiente de determinación (r²) de los controles, se observa que el tiempo explica sólo el 27% de la variación en la hemólisis. En este

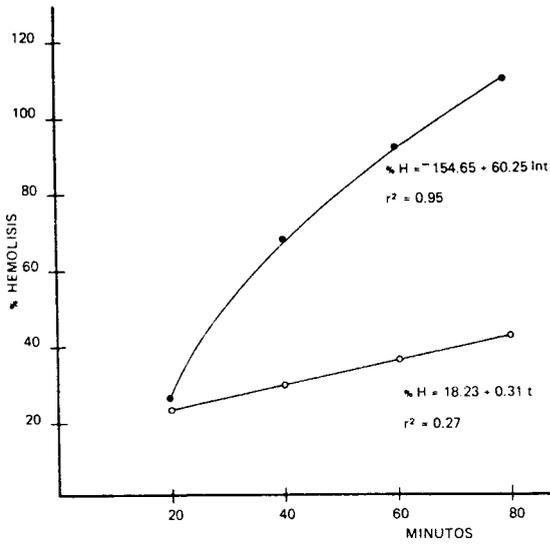


Figura 1. Hemólisis y fotohemólisis producida por emulsión tipo I.

● muestra irradiada
○ control

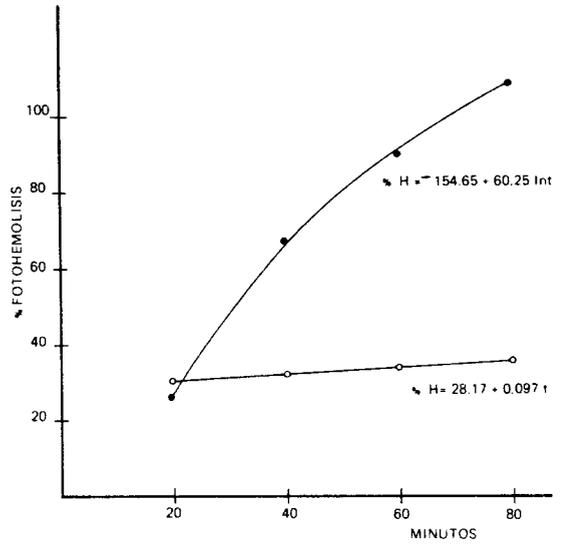


Figura 3. Fotohemólisis producida por ambos tipos de emulsiones.

● emulsión tipo I
○ emulsión tipo II

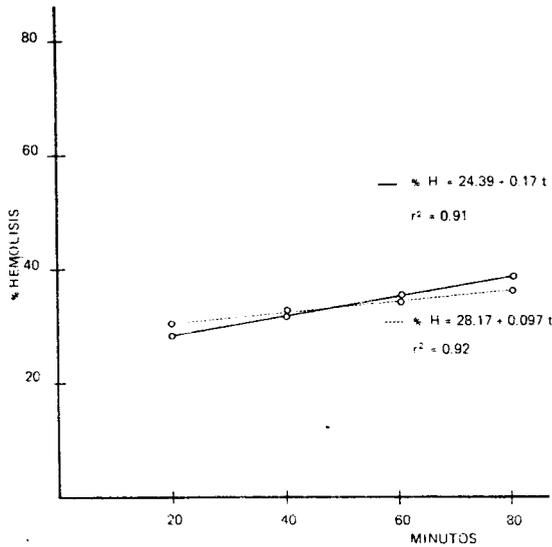


Figura 2. Hemólisis y fotohemólisis producida por emulsión tipo II.

● muestra irradiada
○ control

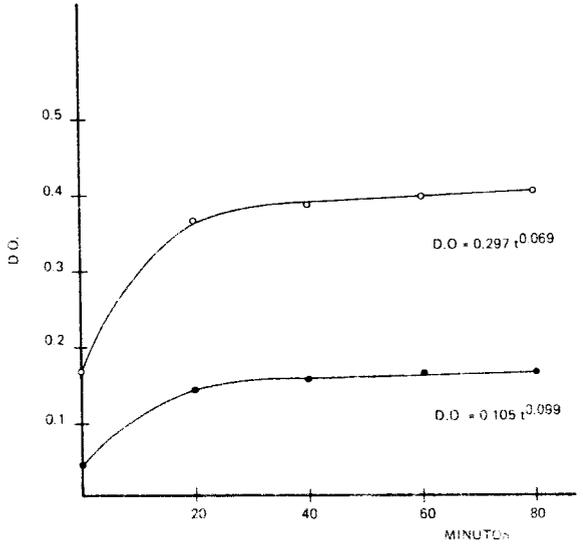


Figura 4. Determinación de MDA en ambos tipos de emulsiones.

● emulsión tipo I
○ emulsión tipo II

caso es posible que el efecto de los tensio-activos sobre la hemólisis cobre mayor importancia.

Por el contrario, en las muestras irradiada-

das el valor de r^2 calculado indica que el tiempo de irradiación explica el 95% de la variación en la hemólisis.

Al analizar los datos de 10 ensayos se-

gún el test t-student para muestras pareadas, se observan diferencias significativas entre muestras irradiadas y controles ($p \approx 0$).

La figura 2 presenta los porcentajes de hemólisis producidos por la emulsión II.

Finalmente, en la figura 3 se comparan los porcentajes de hemólisis obtenidos al irradiar ambos tipos de emulsiones. Las diferencias encontradas se atribuyen a la presencia del aceite esencial incorporado a la emulsión II. Probablemente la inhibición de la hemólisis producida por el aceite esencial se debe a un efecto atrapador de radicales ("quenching"), los cuales posiblemente sean los responsables del efecto hemolítico observado.

La figura 4 muestra los valores de MDA expresados en función de la densidad óptica (D.O.) del cromóforo MDA-TBA, producidos durante la fotooxidación del aceite de Rosa Mosqueta. Las curvas graficadas, al igual que en los casos anteriores, se ajustan por el método de los mínimos cuadrados.

La producción de MDA en la emulsión I indica un grado de lipoperoxidación importante para el aceite de Rosa Mosqueta. Las curvas representadas indican que la descomposición de los productos secundarios del aceite aumentan con el tiempo de irradiación. Este efecto es bastante menor en

la emulsión II, probablemente debido a la acción protectora del aceite esencial sobre la peroxidación lipídica.

En la tabla 1 se presentan los porcentajes de ácidos grasos determinados en las emulsiones I y II, tanto en las muestras controles como en las irradiadas 80 min.

Como se observa en la tabla 1, no se produce variación significativa en la composición de ácidos grasos en ambas emulsiones antes y después de la irradiación, lo cual demuestra que el proceso de irradiación no induce la descomposición de éstos; por lo tanto el aumento de MDA se debe presumiblemente a la descomposición de productos de oxidación previamente formados y no a una oxidación de ácidos grasos insaturados catalizada por la luz. El hecho que los valores de MDA encontrados sean similares a los comunicados por Koster para el hidroperóxido de ácido linoleico⁷ corrobora que el aumento de MDA se debe a la descomposición de productos de oxidación previamente formados. Por otra parte, en ausencia de O_2 no se observan diferencias apreciables en el porcentaje de MDA entre muestras irradiadas (datos no tabulados), demostrándose que el O_2 no interviene en los procesos oxidativos ni hemolítico del aceite de Rosa Mosqueta. Esta experiencia, unida a los resultados sobre la variación de

Ac. grasos	% Ac. grasos			
	Control		Irradiado	
	Emulsión I	Emulsión II	Emulsión I	Emulsión II
Palmítico	10,24	10,26	10,32	13,41
Esteárico	9,96	10,79	7,79	11,81
Oleico	10,24	9,89	10,92	9,56
Linoleico	41,66	37,82	42,20	35,83
Linolénico	27,88	27,80	28,67	29,37

Tabla 1. Efecto de la irradiación sobre la composición de ácidos grasos.

Muestra	Control		Irradiado	
	% hemólisis	D.O.	% hemólisis	D.O.
Emulsión con Tiourea	29,21	0,20	91,42	0,44
Emulsión sin Tiourea	31,75	0,19	89,52	0,49
Emulsión con BHT	11,50	0,13	65,73	0,37
Emulsión sin BHT	31,32	0,15	72,71	0,51

Tabla 2. Efecto de antioxidantes sobre peroxidación catalizada por luz.

ácidos grasos (tabla 1), confirma el hecho que durante la irradiación no se producen nuevas peroxidaciones del aceite de Rosa Mosqueta.

En la tabla 2 se muestra el efecto de dos antioxidantes sobre la fotohemólisis inducida por la emulsión I, después de ser irradiada con luz de mercurio durante 60 minutos y en oscuridad.

Como se aprecia en la tabla 2, la tiourea, un atrapador de radicales libres, prácticamente no produce inhibición sobre la fotohemólisis, ni variación en los índices de MDA. En contraste el BHT, también atrapador de radicales libres, produce una disminución de ambos procesos. Lo anterior indicaría una mayor efectividad en la captura de radicales libres por el BHT, que la tiourea.

La mayor influencia provocada por el

BHT en oscuridad que en luz, sobre la hemólisis, indica que la cantidad de radicales formados en oscuridad es bastante menor. Esto confirma el rol catalizador de la luz en la descomposición de los productos de oxidación.

Finalmente los datos obtenidos en el presente trabajo, indican que el aceite de Rosa Mosqueta posee un efecto fotohemolítico importante, atribuible a la presencia de radicales libres provenientes de la descomposición de los productos de oxidación presentes, postulándose una oxidación catalizada por la luz. Como apoyo a este postulado se menciona la toxicidad del t-butil hidroperóxido, que induce una peroxidación lipídica sobre la membrana del G.R.⁸ y el daño peroxidativo causado por el hiperóxido del ácido linoleico⁹.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Thune, P. (1984) *Photodermatology* 1: 5-9
2. Frankel, E. (1984) *J. Am. Oil Chem. Soc.* 61: 1908-17
3. Valladares, J., M. Palma, C. Sandoval y F. Carvajal (1983) *Tesis de Grado de Químico Farmacéutico*, Universidad de Concepción, Chile
4. Rundel, R. y S. Nachtwey (1983) *Photochem. Photobiol.* 38: 577-91
5. Placer, A., L. Cushman y C. Johnson (1966) *Analytical Biochemistry* 16: 359-64
6. Association of Official Agricultural Chemist (ed.) (1970) "Methods of Analysis of the A.O.A.C.", 11th. ed. Washington D.C., p. 454
7. Koster, J., G. Slee, C. Ruten-Van Beyster y A. Montfoort (1983) *Biochemica et Biophysica Acta* 754: 238-42
8. Trotta, R., S. Sullivan y A. Stern (1982) *Biochem. J.* 204: 405-15
9. Trotta, R., S. Sullivan y S. Stern (1983) *Biochem. J.* 212: 759-72