

**Revista Facultad  
de Farmacia Universidad  
Central de Venezuela**

Vol. 74 - Nº 2 - 2011 - ISSN: 0041-8307  
Depósito legal: 195902 DF 224  
Caracas/Venezuela

Indexada en LILACS, Latindex y Revencyt

**Universidad Central de Venezuela**

**Rectora**

*Dra. Cecilia García-Arocha*

**Vicerrector Académico**

*Dr. Nicolás Bianco*

**Vicerrector Administrativo**

*Dr. Bernardo Méndez*

**Secretario**

*Dr. Amalio Belmonte*

**Facultad de Farmacia**

**Decana**

*Dra. Margarita Salazar Bookaman*

**Directora**

*Dra. Yajaira Bastardo*

**Coordinadora Académica**

*Dra. Evelyn Pérez*

**Directora del Instituto de Investigaciones**

*Dra. Alírica Suárez*

**Directora de Postgrado**

*Dra. Miriam Regnault*

**Coordinadora de Extensión**

*Dra. Suria Elnezer*

**Revista Facultad de Farmacia**

**Editora**

*Dra. Anita Stern Israel*

**Editora Asociada**

*Dra. Fanny Carrillo de Padilla*

**Comité Editorial**

*Dra. María Margarita Salazar Bookaman*

*Dra. Alírica Suárez*

*Dra. María del Rosario Garrido*

*Dr. Jaime Charris*

*Dra. Isabel Andueza*

*Dr. David De Souza*

*Dra. Miriam Regnault*

**Diagramación, composición, montaje e impresión**

Luz Márquez Negretti

Tiraje: 300 ejemplares

**Dirección**

Facultad de Farmacia UCV - Apartado 40.109  
Caracas 1040-A - Venezuela

**Contenido**

Desarrollo y validación de un método 2  
microbiológico para la determinación  
de la potencia de la azitromicina

**ALESSANDRA GARCÉS, ILIANA RIVAS,  
MIRIAM REGNAULT Y LUISA ROSSI**

Compuestos fenólicos y actividad antioxidante 10  
en cervezas venezolanas

**ALICIA M RINCÓN, LIZET BOU RACHED Y FANNY C PADILLA**

Efecto del tempol en la preeclampsia 17  
experimental

**ELSA CAMACHO, JOSÉ ANTONIO SILVA Y ANITA ISRAEL**

Estudio de Acoplamiento Molecular 25  
(Docking) de una serie de derivados sintéticos  
del 5-nitrofurano en el sitio de unión  
de la Tripanotión Reductasa  
del *Trypanosoma cruzi*

**MELINA MONASTERIOS, ÁNGEL AMESTY Y MILAGROS AVENDAÑO**

Ensayos de quimiotaxis *in vitro* 31  
en *Leishmania sp.* Evaluación de la técnica  
de los capilares-dos cámaras en promastigotes

**EMILIA DÍAZ, LÁSZLÓ KÓHIDAI, ARTURO RÍOS,  
ORIANA VANEGAS, ALICIA PONTE-SUCRE**

Grupo Trifluorometilo: un sustituyente 40  
importante en química medicinal

**SIMÓN E LÓPEZ Y ÁNGEL ROMERO**

ÍNDICE DE DESCRIPTORES 53

ÍNDICE DE AUTORES 54

NORMAS DE PUBLICACIÓN 55

*Esta revista se publica bajo los auspicios  
del Consejo de Desarrollo Científico  
y Humanístico de la UCV*

# Desarrollo y validación de un método microbiológico para la determinación de la potencia de la azitromicina

## Development and validation of a microbiological method for the determination of the potency of azithromycin

ALESSANDRA GARCÉS\*, ILIANA RIVAS\*, MIRIAM REGNAULT\* Y LUISA ROSSI\*

### Resumen

Se desarrolló y validó un método analítico para la determinación de la potencia del antibiótico azitromicina como materia prima, empleando un método microbiológico que se fundamenta en la difusión producida desde reservorios cilíndricos de acero inoxidable en placas de Petri de 20 x 100 mm, en agar antibiótico # 11 como medio de cultivo, *Kocuria rhizophila* ATCC 9341 como microorganismo de prueba y un rango de concentración del antibiótico en estudio comprendido entre 0,20 µg/mL y 3,35 µg/mL. El análisis de regresión lineal mostró un coeficiente de correlación promedio de  $r = 0,9910$ ; un coeficiente de determinación promedio de  $r^2 = 0,9821$ , una pendiente promedio de  $b = 6,22$  y un intercepto promedio de  $y = 14,10$ . Estos datos demuestran que el método fue lineal para el rango de concentraciones empleadas, una recuperación promedio del 99,00% y un CV (DSR = 3,07%), tolerancia de  $T = 32,00\%$ , indicando una adecuada precisión. Se demostró la selectividad del método al no obtenerse una respuesta cuantificable con el metanol a la concentración empleada en el ensayo, y la robustez del método se evaluó a pH 7, resultando insatisfactoria a este valor de pH. De acuerdo a los criterios de aceptación exigidos por la Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (AEFI), podemos concluir que el ensayo microbiológico de cilindro en placa en las condiciones indicadas, puede ser empleado como un método confiable para cuantificar *in vitro* la actividad antimicrobiana de la azitromicina y podría ser empleado como punto de partida para el análisis de este antibiótico en formas farmacéuticas.

**Palabras claves:** azitromicina, método microbiológico, difusión en agar, validación.

### Abstract

An analytical method was developed and validated to determine the potency of the antibiotic azithromycin as a raw material, using a microbiological method based on diffusion produced from cylindrical reservoirs made of stainless steel in petri dishes of 20 x 100 mm, antibiotic medium # 11 as growth medium, *Kocuria rhizophila* ATCC 9341 as a test microorganism and a range of concentrations of antibiotics from 0.20 µg/mL to 3.35 µg/mL. Linear regression analysis showed an average of correlation coefficient of  $r = 0.9910$ , an average of determination coefficient of  $r^2 = 0.9821$ , an intercept of  $y = 14.10$  and an average slope of  $b = 6.22$ . This data demonstrates that the method was linear for the range of concentrations employed, an average recovery of 99.00%, and CV (DSR = 3.07%), tolerance ( $t = 32.00\%$ ), indicating suitable precision. Selectivity of the method was demonstrated, because we had not quantifiable respond to methanol at concentrations used in the assay, and robustness to pH 7 with unsatisfactory results for this pH. According to the acceptance criteria required by the Spanish Pharmaceutical Industry Association (AEFI), the microbiological test of the cylinder plate method on the terms indicated can be used to quantify azithromycin *in vitro* and could be used as a starting point for the analysis of this antibiotic in pharmaceutical forms.

**Key words:** azithromycin, microbiological method, diffusion in agar, validation.

\* Postgrado de Aseguramiento de la Calidad, Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela. Apdo. 40109 Caracas 1040A Venezuela. Telf. (58-212) 605.275; Fax:(58-212)605.2707. miriamregnault@hotmail.com; alessgarces@hotmail.com

## Introducción

La azitromicina es un antibiótico que forma parte del grupo de los macrólidos entre los cuales están: la eritromicina, la claritromicina, la roxitromicina, entre otros, llamados así por su estructura, constituida de un anillo de lactona macrocíclico formado por varios miembros, a los que se unen uno o más desoxiazúcares. La diferencia entre los miembros de este grupo se basa en el cambio de sustituyentes presentes en el anillo o en el número de átomos que forman el mismo. La eritromicina fue el primer macrólido descubierto, en el año 1952, sin embargo este antibiótico presentó una gran cantidad de efectos adversos, por esta razón los Laboratorios Pliva en Croacia propusieron el incremento en el número de miembros del anillo de lactona de 14 miembros de la eritromicina a 15 y 16, resultando un nuevo grupo de macrólidos llamado azalidas, lográndose cambios significativos en las propiedades farmacocinéticas y en el espectro de acción comparado con los antiguos macrólidos (Turcinov y Pepeljnjak, 1998). Así surge la azitromicina como consecuencia de la inserción de un grupo amino en el anillo de la eritromicina, convirtiéndola así en un compuesto semisintético cuya estructura se puede observar en la figura 1.

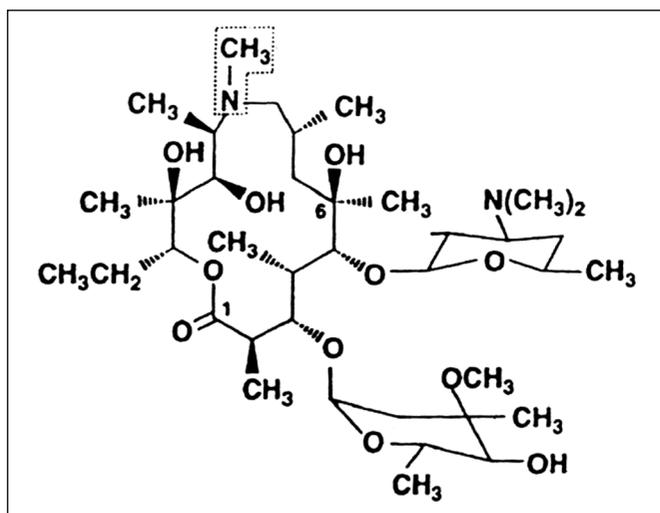


Figura 1. Estructura Química de la Azitromicina.

Los macrólidos son compuestos bacteriostáticos que inhiben la síntesis de proteínas al ligarse en forma reversible a la subunidad ribosómica 50S de microorganismos sensibles. El antibiótico no inhibe de manera directa la formación del enlace peptídico, sino que bloquea la fase de translocación del aminoacil-tRNA en la cual la cadena del péptido en crecimiento se desplaza del sitio aceptor en el ribosoma al sitio peptídico o donador (Goodman y Gilman, 1996).

La azitromicina fue aprobada por la Food and Drug Administration (FDA) en noviembre de 1990, y se sa-

be que alcanza la mayor concentración intracelular de todos los macrólidos. Es empleada en afecciones respiratorias debido a su actividad contra el *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catharralis*, *Mycoplasma hominis*. Es muy eficaz en las enfermedades de transmisión sexual provocadas por: *Neisseria gonorrhoeae*, *Haemophilus ducrey*, *Chlamydia trachomatis* y *Ureaplasma urealyticum*. Tiene buena actividad contra *Bacteroides spp* y anaerobios Gram positivos spp, las micobacterias atípicas son muy sensibles, no así *Mycobacterium tuberculosis* (González y col., 1998).

La azitromicina muestra propiedades farmacocinéticas superiores a la eritromicina, es absorbida rápidamente alcanzando altos niveles en plasma y en tejidos por períodos largos, con una vida media tisular de 2 a 4 días. Su administración consiste de una sola dosis diaria para el tratamiento de enfermedades de transmisión sexual, infecciones de la piel, infecciones respiratorias, etc. por períodos significativamente más cortos de 3 a 5 días. Adicionalmente al compararla con otros miembros del grupo de los macrólidos, la azitromicina presenta menos efectos adversos y menos interacción con otras drogas (Goodman y Gilman, 1996). Es por ello que en Venezuela, la azitromicina es ampliamente prescrita por el gremio médico, además de ser uno de los antibióticos de elección para sustituir a las penicilinas en personas hipersensibles a este antibiótico.

La United States Pharmacopoeia 32 (USP 2009) y el Code of Federal Regulations (CFR 21 1997) señalan que la azitromicina se puede cuantificar por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), utilizando un detector electroquímico amperométrico. La European Pharmacopoeia (EP 2008) describe la identificación y cuantificación de la azitromicina por HPLC con detección espectrofotométrica ultravioleta a 210 nm al igual que la British Pharmacopoeia (BP 2009).

Diversos autores han realizado una serie de estudios que demuestran que la potencia de la azitromicina puede ser determinada microbiológicamente. Turcinov y Pepeljnjak (1998), determinaron cuáles microorganismos de un grupo de 10, mostraban la mayor sensibilidad a dicho antibiótico y bajo qué condiciones. Para ello emplearon el método de difusión en placas de agar, resultando la *Kocuria rhizophila* ATCC 9341 como un microorganismo recomendable para la determinación de la potencia de este antibiótico, ya que mostró resultados de sensibilidad, precisión y exactitud aceptables. Igualmente Breier, García y Oppe (2002), realizaron la validación de un ensayo microbiológico, aplicando el método de cilindro en placa 3 x 3. Para la determinación de la azitromicina, utilizaron la *Kocuria rhizophila* ATCC 9341 como microorganismo de ensayo y trabajaron con concentraciones de 0,1

a 0,4 µg/mL para cápsulas y suspensiones. Calcularon linealidad, precisión y exactitud, concluyendo que el ensayo microbiológico era satisfactorio para su cuantificación. Estos resultados demuestran que la azitromicina puede ser determinada microbiológicamente.

En Venezuela existen en la actualidad once laboratorios comercializadores de azitromicina, de ellos sólo cinco aplican métodos químicos para determinar la potencia del antibiótico, de los cuales tres emplean el método de la USP, y dos métodos propios, esto probablemente debido a la carencia de los equipos específicos para la cuantificación de este antibiótico. Por ello se han empleado métodos microbiológicos para la determinación de azitromicina, a pesar de que éstos no están referenciados en los textos oficiales antes mencionados. Cabe destacar que las condiciones utilizadas por estos laboratorios difieren entre sí y en su mayoría, son las indicadas para la eritromicina.

Por lo antes expuesto fue de nuestro interés desarrollar un método microbiológico a nivel nacional que permita unificar los criterios que permitan determinar la potencia de la azitromicina; estableciendo la metodología y las condiciones óptimas para alcanzar resultados confiables, y al mismo tiempo cumplir con las normativas existentes para la industria farmacéutica.

Hoy en día existe gran variedad de textos oficiales que hablan sobre la validación de métodos químicos y muy pocos sobre la validación de bioensayos, entre los que se encuentran los métodos microbiológicos. Sin embargo, la Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (AEFI 2001) en su libro: «Validación de Métodos Analíticos», publicó la validación de métodos de análisis en microbiología, dentro de los cuales se encuentra la valoración microbiológica de antibióticos, donde se establece el significado de cada uno de los parámetros de validación, los criterios de aceptación y las herramientas estadísticas necesarias para la evaluación de los datos obtenidos para cada una de estas pruebas. Basándonos en ello, se planteó desarrollar y validar un método microbiológico que determine la potencia de la azitromicina. Esto nos permitirá ofrecer a los laboratorios farmacéuticos nacionales una metodología microbiológica validada para cuantificar el mencionado antibiótico, como alternativa a los métodos cromatográficos en el control de calidad del antibiótico y demostrar la fiabilidad de los resultados a través de la validación del mismo.

## Materiales y métodos

### ESTANDARIZACIÓN DEL MICROORGANISMO DE ENSAYO

Un cultivo puro y fresco (24 horas) de *Kocuria rhizophila* ATCC 9341 en agar antibiótico N° 1 (agar de siembra Penassay, marca BBL), se resuspendió en 3 mL

de solución salina estéril con perlas de vidrio y se inoculó en una botella de Roux con agar antibiótico N° 1. Se incubó a una temperatura de  $32,5 \pm 2,5$  °C por 24 horas. Posteriormente se recogió el crecimiento microbiano con 45 mL de solución salina estéril, y se preparó una dilución 1:40 la cual proporcionó el 25% de transmitancia al leerse a una longitud de onda de 580 nm en el espectrofotómetro (Milton Roy Company (Spectronic 20D).

Medios de cultivo: Éstos fueron preparados siguiendo las instrucciones del fabricante (BBL). En el caso del agar neomicina (agar antibiótico N° 11, marca BBL) se ajustó el pH a 8,0 con una solución de NaOH 1N. Se esterilizaron en autoclave (Högner modelo VAP-5001), a 121 °C por 15 min, almacenándose a temperatura ambiente y en ausencia de luz.

Preparación de patrones y muestras: Las soluciones de patrones y muestras para los ensayos preliminares se prepararon inmediatamente antes de ser utilizadas. Se prepararon soluciones madre de azitromicina de 10 µg/mL y 100 µg/mL de concentración. El antibiótico se disolvió inicialmente en 10 mL de metanol y luego se llevó a volumen con solución buffer fosfato 0,1M pH 8 y en solución buffer fosfato 0,1M pH 7 para el estudio de la robustez. Con el propósito de establecer cuál era el rango de concentración óptimo para la determinación de la potencia de la azitromicina, a partir de las soluciones madre, se prepararon las diluciones para cada uno de los rangos de concentraciones estudiados en los ensayos preliminares: ensayos 1, 2 y 3, rango de concentración comprendido desde 0,64 µg/mL hasta 1,56 µg/mL; ensayo 4 y 5 con un rango de concentración desde 0,41 µg/mL hasta 2,44 µg/mL; ensayo 6 con un rango de concentración en estudio a partir de 0,41 µg/mL hasta 7,45 µg/mL; ensayo 7 ampliación del rango a partir de 1 µg/mL hasta 32 µg/mL y un ensayo 8 con un rango comprendido desde 0,05 µg/mL hasta 12,8 µg/mL.

Preparación de las placas de Petri: Cada ensayo requirió una placa de Petri por cada concentración a ensayar. Para su preparación se añadió a cada placa 21 mL de agar neomicina fundido y se dejó solidificar en una superficie plana y nivelada por un período entre 20 y 30 minutos, para formar la capa base. Se evaluaron diferentes inóculos para determinar la mejor respuesta en cuanto a tamaño, nitidez y definición de los halos de inhibición. Los tamaños de inóculos ensayados fueron: 1,2%; 2%; 3%; 4%, 5%, 10% y 12%, para lo cual se añadieron 4,0 mL de agar neomicina inoculado al porcentaje seleccionado, a cada una de las placas que contenían la capa base, distribuyéndose uniformemente por toda la superficie para formar la capa semilla y se dejaron solidificar a temperatura

ambiente alrededor de 20 a 30 minutos. En cada una de las placas se colocaron 6 cilindros de acero inoxidable ( $6 \pm 0,1$  mm de diámetro interno y  $8 \pm 0,1$  mm de diámetro externo). El llenado se realizó en forma de concentraciones creciente (Clavell, 1991; Hewitt, 2004). Se incubaron las placas de Petri en la estufa (marca Heraus modelo B6060) a una temperatura de  $32,5 \pm 2,5^\circ\text{C}$  (CFR 21 y USP 32) por un período de 18 a 24 horas. Posteriormente se realizaron las lecturas de cada uno de los halos de inhibición obtenidos, haciendo uso del medidor de halos (Fischer Scientific).

## Validación del método

### LINEALIDAD

Ésta se determinó ensayando por triplicado el rango de concentraciones escogido ( $0,2-0,32-0,51-0,82-1,31-2,10$  y  $3,35$   $\mu\text{g/mL}$ ). Para ello se realizaron tres pesadas del patrón USP de azitromicina y de cada pesada se prepararon las diluciones de trabajo y se siguió la metodología analítica propuesta. Una vez obtenidos los resultados, se graficó el logaritmo de la concentración  $\mu\text{g/mL}$  vs. los halos de inhibición en mm y se determinó para cada uno: la ecuación de la recta, el intercepto (a), la pendiente (b), los coeficientes de correlación (r) y determinación ( $r^2$ ), la varianza residual, la normalidad de los residuales, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de linealidad.

### PRECISIÓN (REPETIBILIDAD)

Se determinó con la dilución intermedia ( $0,82$   $\mu\text{g/mL}$ ) del rango ensayado, para ello se tomaron los resultados completos de una placa, que contenían 6 réplicas para esta concentración. Con los datos obtenidos, se calcularon el coeficiente de variación (CV) o la desviación estándar relativa (% DSR) y la tolerancia, que son los criterios que miden la precisión.

### EXACTITUD

Se determinó para las concentraciones de  $0,20$   $\mu\text{g/mL}$ ,  $0,82$   $\mu\text{g/mL}$  y  $3,35$   $\mu\text{g/mL}$  del mismo ensayo, las cuales corresponden a las concentraciones: baja, media y alta del rango seleccionado. Para ello sólo se tomaron 3 lecturas por cada placa de concentración a evaluar. Con los resultados obtenidos se calculó: el coeficiente de recuperación en porcentaje (R), la homogeneidad de las varianzas y la prueba de *t de Student*.

### SELECTIVIDAD

Se determinó realizando un blanco (metanol y buffer pH 8) de la solución madre para 6 réplicas y de esta manera observar si se producía una respuesta

cuantificable en ausencia del antibiótico y corroborar así la selectividad del método.

### LÍMITE DE DETECCIÓN (LD) Y CUANTIFICACIÓN (LC)

Se determinó a partir de un blanco (metanol y buffer pH 8) de la solución madre en ausencia del antibiótico para 6 réplicas. Con los datos obtenidos y la pendiente de la curva de calibración se procedió a realizar la estimación para el LD y el LC según lo indica la guía Q2B de la Internacional Conference on Harmonisation (ICH).

### ROBUSTEZ

Se determinó para el rango de concentraciones seleccionado ( $0,2-0,32-0,51-0,82-1,31-2,10-3,35$   $\mu\text{g/mL}$ ). La condición escogida para este estudio fue variar el pH del buffer fosfato empleado como diluyente. Se procedió a realizar el método propuesto empleando un buffer pH 7 para preparar las diluciones en vez del buffer pH 8 siguiendo la metodología analítica propuesta y de esta manera observar los cambios en las respuestas.

## Resultados y discusión

Se eligió la *Kocuria rhizophila* ATCC 9341 ya que el CFR (1997) la indica para la determinación de eritromicina y es descrita por Turcinov y Pepeljnjak (1998) como el microorganismo que brindó los mejores resultados en cuanto a precisión y exactitud de un total de 10 microorganismos estudiados. Se utilizó la temperatura de  $32,5 \pm 2,5^\circ\text{C}$  como la óptima que permite el crecimiento de la *Kocuria rhizophila* ATCC 9341 y la difusión del antibiótico. Como medio de cultivo se empleó el agar antibiótico N° 11, debido a que es un medio adecuado para el crecimiento del microorganismo a ensayar y ofrece un pH óptimo (7,8-8,0) que evita la degradación de la azitromicina, lo cual ocurre cuando se trabaja con pHs ácidos debido a la naturaleza básica de esta droga (Turcinov y Pepeljnjak, 1998). Como diluyente se utilizó buffer fosfato pH 8, de manera de favorecer la estabilidad del antibiótico y metanol para disolver la azitromicina ya que al ser éste alcohol miscible con el agua permite la difusión del antibiótico en el agar, sin inhibir la respuesta del microorganismo frente al antibiótico, esto se comprobó al ensayar un blanco, utilizando una solución madre (10 mL de metanol/ buffer pH 8 csp 100 mL) demostrándose que no hubo interferencia por parte de éste, al no obtenerse halos de inhibición.

Se ensayaron tres concentraciones del antibiótico baja, media y alta (1, 32, 128  $\mu\text{g/mL}$ ) para distintos tamaños de inóculo (2, 3, 4, 5, 10 y 12%), y de esta manera se determinó la cantidad de microorganismo a

ser empleada en el ensayo. Según la USP 32 (2009) los halos de inhibición obtenidos en un análisis de cilindro en placa, deben estar por encima de 14 mm de diámetro para considerarlos como una zona de inhibición satisfactoria. En las evaluaciones realizadas, a tamaños de inóculos muy elevados (3 a 12%), los halos de inhibición obtenidos fueron difusos. Se decidió entonces trabajar con tamaños de inóculos por debajo del 2%, con los cuales se obtuvieron halos de inhibición definidos y nítidos a concentraciones bajas, facilitando así la lectura de los mismos. Con una concentración del 1,2% del inóculo, la cual es la empleada por la mayoría de los laboratorios que aplican métodos microbiológicos para la azitromicina, los halos de inhibición obtenidos tenían diámetros mayores a 14 mm con bordes claramente definidos que facilitaron su lectura y mejoraron la precisión en el análisis.

Para determinar el rango óptimo de concentraciones a utilizar en el método propuesto, se realizó una serie de ensayos preliminares, donde se varió el rango de concentración del antibiótico y se analizaron las medidas de los halos de inhibición del microorganismo de ensayo frente a esta variación. Los datos obtenidos fueron evaluados según el capítulo <111> de la USP «Diseño y Análisis de Ensayos Biológicos» (2009), para el rechazo de observaciones que parecen fuera de lugar o aberrantes, y se graficó el diámetro de los halos de inhibición (mm) *vs.* logaritmo de la concentración ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) tal y como se muestra en la figura 2. Al analizar este gráfico se observa que al aumentar las concentraciones del antibiótico disminuye el valor de la pendiente y por consiguiente la sensibilidad del método.

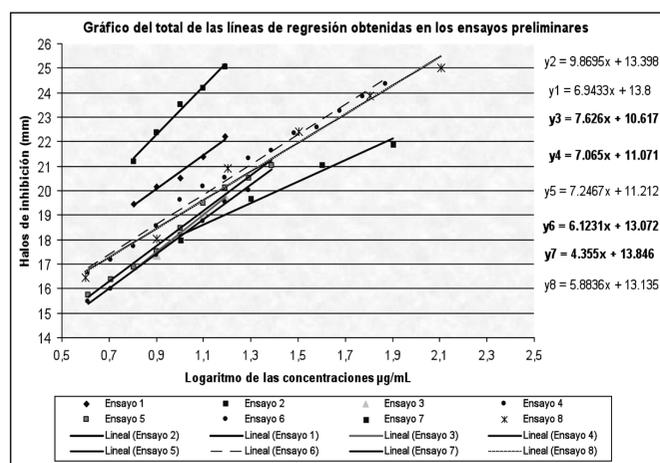


Figura 2. Gráficos de los Ensayos Preliminares.

Para escoger el rango a emplear en el método propuesto, se realizó un análisis estadístico de las pendientes obtenidas para los diferentes rangos de concentraciones ensayados. Se aplicó la prueba de Grubb indicada en la norma COVENIN 2972-2: 1997 y se calculó la desviación estándar relativa (DSR) de las pendientes

para determinar cuál rango presenta una mayor repetibilidad. De acuerdo a la prueba de Grubb no existen valores atípicos en la muestra analizada, pero se obtuvo una DSR de 20,31% (criterio de aceptación <5%), lo que indica que no hay repetibilidad en todo el rango de concentraciones estudiado que va desde 0,4 hasta 12,8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Sin embargo, se observó que existe repetibilidad para los rangos de concentraciones entre 0,41 hasta 2,44  $\mu\text{g}/\text{mL}$  correspondientes a los ensayos N° 1, 3, 4 y 5, obteniéndose una DSR de 4,12%, así como para los ensayos 6 y 8 en donde también se observó repetibilidad con un valor de DSR de 3,43% pero con una menor sensibilidad (menor pendiente), ya que en éstos se llegaron a emplear concentraciones más altas como 7,45  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y 12,8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

Se concluyó entonces, que el rango para determinar la azitromicina se encuentra entre 0,4 y 2,44  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , ya que es aquí donde se han observado los mayores valores de pendiente y repetibilidad, además de obtener en este rango de concentración la mejor definición en los halos de inhibición, facilitando su lectura y disminuyendo así los errores durante la medición. Siendo la azitromicina un macrólido, semejante a la eritromicina, esperábamos conseguir un rango de dosis parecido al utilizado para determinar su potencia 0,64-1,56  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , (CFR 21, 1997). Adicionalmente de acuerdo a los estudios de Breier, García y Oppe (2002), la azitromicina puede ser determinada microbiológicamente a concentraciones bajas en un rango de 0,1 a 0,4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

## Validación del método

### LINEALIDAD

El estudio de la linealidad implica una representación gráfica y una comprobación estadística, la cual se realizó empleando todos los datos obtenidos en cada uno de los ensayos y no los promedios. La figura 3 muestra los gráficos obtenidos para los 3 ensayos de validación, en ella se aprecian los resultados del análisis de regresión correspondiente y se observa que existe repetibilidad, ya que los valores de las pendientes presentan una DSR igual a 2,99%. Para el análisis de regresión lineal se empleó el programa Minitab® y se encontró para los 3 ensayos de validación un coeficiente de correlación y determinación >0,95 y la regresión lineal es estadísticamente significativa ya que  $p < 0,005$ .

Para poder realizar el ANOVA, inicialmente se demostró que los residuales provienen de una distribución normal, ya que se encuentran formando una línea recta en donde la prueba de Anderson-Darling revela un valor de  $p < 0,05$ . Adicionalmente se puede observar que la distribución de los residuales *vs.* los valores

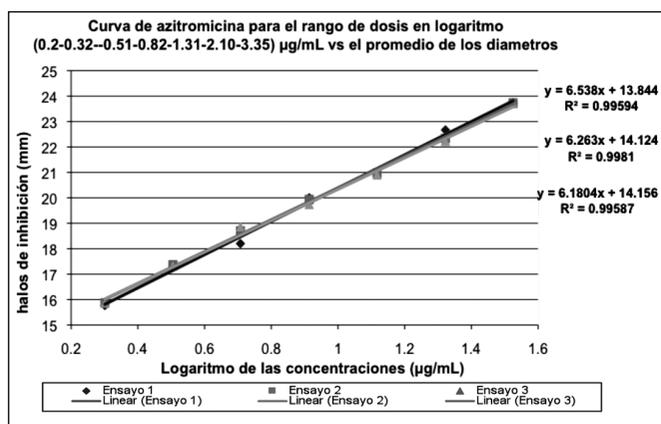


Figura 3. Ensayos de Validación.

estimados es aleatoria y no refleja ninguna tendencia, concluyendo entonces que hay homoscedasticidad indicando la validez del modelo empleado (AEFI, 2001), por lo cual se procedió a realizar el análisis de varianza para cada uno de los ensayos, resumiendo los resultados en la Tabla I.

Tabla I  
Análisis de Varianza (ANOVA)

| (F)               | Ensayo 1 | Ensayo 2 | Ensayo 3 |
|-------------------|----------|----------|----------|
| F1 Tabla<br>4,075 | 1823,70  | 2257,91  | 2655,45  |
| F2 Tabla<br>2,492 | 2,490    | 0,8467   | 1,9717   |

Los tres ensayos cumplen con el ANOVA:  $F1_{exp} > F1_{tab}$  indicando que las pendientes son estadísticamente diferentes de cero y  $F2_{exp} < F2_{tab}$  demostrando la linealidad de los resultados obtenidos. Adicionalmente se comprobó que existe una pendiente significativamente distinta de cero mediante la prueba de t de Student ya que el  $t_{exp} > t_{tab(0,05)}$ , cumpliendo con la prueba de linealidad y se calcularon los intervalos de confianza a partir de la expresión  $b \pm t * Sb$ , siendo en este caso t el valor de la distribución de la t de Student para n-2 grados de libertad y un grado de significación  $\alpha = 0,05$ ; b el valor promedio de las pendientes y Sb la desviación estándar de la pendiente; en donde para ninguno de los 3 ensayos se encontró el cero incluido.

Una vez aplicadas todas las herramientas estadísticas para el cálculo de la linealidad, se encontró que los 3 ensayos cumplieron con los parámetros recomendados por la AEFI para determinar la linealidad de un método microbiológico, lo cual indica, que en el rango escogido 0,20 µg/mL a 3,35 µg/mL las respuestas fueron lineales.

#### PRECISIÓN

Se determinó analizando 6 réplicas en una misma placa de la dilución intermedia (0,82 µg/mL) del rango

de concentraciones estudiado, preparada a partir de la misma solución madre. Con los resultados obtenidos se calculó el coeficiente de variación (Tabla II) y la tolerancia, arrojando respectivamente 3,07% y 32,2. Los resultados obtenidos indican, que la precisión cumple con los parámetros establecidos por la AEFI, es decir, el método fue repetitivo.

Tabla II  
Precisión del Método Analítico

| Halos de Inhibición (mm) | Log de la concentración µg/mL | Concentración µg/mL | Resultado % |
|--------------------------|-------------------------------|---------------------|-------------|
| 19,8                     | 0,9186                        | 0,8291              | 101,11      |
| 19,8                     | 0,9186                        | 0,8291              | 101,11      |
| 19,6                     | 0,8857                        | 0,7686              | 93,73       |
| 19,7                     | 0,9021                        | 0,7982              | 97,34       |
| 19,8                     | 0,9186                        | 0,8291              | 101,11      |
| 19,7                     | 0,9021                        | 0,7982              | 97,34       |
|                          |                               | Promedio            | 98,62       |
|                          |                               | S                   | 3,03        |
|                          |                               | CV                  | 3,07        |

#### EXACTITUD

Se determinó calculando el porcentaje de recuperación de 3 réplicas para cada una de las siguientes concentraciones 0,20 µg/mL; 0,82 µg/mL y 3,35 µg/mL preparadas a partir de un patrón USP de azitromicina. Con los resultados obtenidos, se determinó el coeficiente de recuperación, la homogeneidad de las varianzas y la prueba de «t de student» (Tabla III). De acuerdo a los resultados obtenidos: el  $G_{exp} < G_{tab}$  lo que indica que las varianzas son homogéneas y la prueba de t de Student arrojó un  $t_{exp} < t_{tab}$ , lo que indica que no hay diferencia entre la recuperación media obtenida y el 100%. Estos datos nos indican que se cumplió con la exactitud para el método, es decir, se detectaron las concentraciones de los extremos sin ningún inconveniente.

Tabla III  
Exactitud del Método Analítico

| Criterios de aceptación   | Resultados         |
|---|--------------------|
| Coeficiente de recuperación para materias prima 80 - 120%             | 99%                |
| Homogeneidad de variancias<br>$G_{exp} < G_{3,2,0,05} = 0,8709_{tab}$ | $G_{exp} = 0,3532$ |
| t de Student: $t_{exp} < t_{tab} = 2,306$                             | $t_{exp} = 0,6565$ |

## SELECTIVIDAD

Se realizó una valoración microbiológica de 6 réplicas para un blanco de la solución madre y el promedio de las lecturas obtenidas fue de 8,47 mm. Se observó que no hubo difusión, no hubo respuesta cuantificable; demostrándose la selectividad del método, ya que sólo se obtuvo respuesta en presencia del antibiótico.

## LÍMITE DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN

Se determinó a partir de las lecturas obtenidas para 6 replicas de un blanco de la solución madre (metanol/buffer fosfato pH 8) en ausencia del antibiótico. Con los resultados obtenidos, se determinó la desviación estándar de las respuestas proporcionadas por el blanco y con la pendiente de la curva de calibración se estimaron ambos parámetros, LD y LC siguiendo la metodología descrita en la guía ICH Q2B. El valor promedio de las respuestas del blanco fue de 8,47 mm y el promedio obtenido a la concentración de 0,2 µg/mL fue de 15,84 mm (menor concentración del rango lineal); lo que indica que realmente hubo un proceso de difusión a esta concentración, ya que el diámetro del halo de inhibición obtenido es muy superior al obtenido por el blanco. Matemáticamente el límite de detección se encontró a una concentración de 0,1264 µg/mL, siendo este valor menor de 0,2 µg/mL la cual es la menor concentración utilizada en la curva de calibración. El valor del límite de cuantificación se encontró que matemáticamente estaba alrededor de 0,3828 µg/mL; sin embargo, experimentalmente se encontró que a un valor de 0,2 µg/mL se contenía una respuesta cuantificable y satisfactoria según los requisitos exigidos en el capítulo <81> de la USP, el cual señala que los mismos deben estar por encima de 14 mm, demostrándose además que las mediciones efectuadas a esta concentración son exactas y precisas, razón por la cual se decidió incluirla dentro del rango de linealidad.

## ROBUSTEZ

El ensayo fue realizado empleando buffer fosfato pH 7 como diluyente en las diluciones de trabajo, para de esta manera demostrar si el método soporta cambios de pH, sin alterar sus respuestas. Tanto la pendiente como el coeficiente de determinación se mantuvieron en el valor estudiado de pH 7, siendo esto indicativo de que la linealidad del método permanece constante. Sin embargo, al comparar los halos de inhibición obtenidos a pH 7 y pH 8 respectivamente, se observaron cambios en dichas respuestas. Las respuestas obtenidas a pH 7 son significativamente menores a los halos de inhibición obtenidos a pH 8 para el mismo nivel de concentración, demostrándose así

la degradación que sufre la azitromicina a este valor de pH 7. Esto permite concluir que el pH de la solución buffer fosfato, es un factor crítico, capaz de causar variaciones en los resultados del método; en este caso los resultados se encontrarán por debajo de los valores reales, lo cual indica que el método desarrollado no es robusto a pH 7.

## Conclusiones y recomendaciones

Los resultados obtenidos en el rango ensayado, indicaron que el método cumple con los parámetros de validación recomendados por la AEFI: linealidad, exactitud, precisión, selectividad y robustez, por lo que se puede señalar que el mismo fue validado satisfactoriamente y puede ser empleado como método alternativo a los métodos oficiales, en el control de calidad de rutina para la determinación de la azitromicina bajo la forma de materia prima, según los parámetros evaluados en este estudio.

Los parámetros de límite de detección y cuantificación no son requisitos exigidos por la AEFI para los métodos microbiológicos utilizados en la determinación de potencia de antibióticos, pero fueron incluidos en este estudio y calculados según la guía ICH Q2B dándole mayor validez al rango escogido en el método propuesto.

Con el presente trabajo se logró un avance en el tema de validación de los métodos microbiológicos cuantitativos en Venezuela, específicamente en el ensayo de difusión en placas de agar aplicado al análisis de antibióticos, sirviendo de guía en el desarrollo y validación de otros métodos microbiológicos, siendo un aporte importante en esta rama de investigación.

Se recomienda emplear el método microbiológico desarrollado no sólo a materias primas, sino a formas farmacéuticas, tales como tabletas, cápsulas y polvo para suspensión. Adicionalmente es necesario realizar mejoras en el sistema de medición de los halos de inhibición, tales como acoples a sistemas computarizados en donde se amplíe la imagen y se pueda realizar una mejor lectura o cambiar el medidor de halos por modelos más actualizados, de manera de obtener hasta dos decimales en cada lectura, facilitando los cálculos y por ende mejorando los resultados estadísticos.

## Agradecimientos

Agradecemos al Instituto Nacional de Higiene «Rafael Rangel», en especial a todo el personal del Departamento de Microbiología de Medicamentos y Cosméticos, al Postgrado de Aseguramiento de la Calidad de la Facultad de Farmacia de la UCV, y a los profesores: Manuel Caetano (Escuela de Química de la Fa-

cultad de Ciencias) y Thaís Fajardo (INHRR) por su valiosa colaboración y ayuda en la realización de este trabajo.

### Referencias bibliográficas

- Antúñez S, Carro A, García A, Niubó C, Olivar M. 2001. Validación de Métodos de Análisis en Microbiología. En: Pérez J y Pujol Martí, coordinadores. Monografías de A.E.F.I. Validación de Métodos Analíticos. Gráficas GISPERT S.A, Girona, p. 190-205.
- Breier A, García C, Oppe T, Steppe M, Schapoval E. 2002. Microbiological Assay for Azithromycin in Pharmaceutical Formulations. *J Pharm Biomed Anal.* 29: 957-961.
- British Pharmacopoeia. 2009. Monographs. Londres: British Pharmacopoeia Commission Market.
- Clavell L, Pedrique de Aulacio M. 1991. Análisis Microbiológico de Antibióticos. Fondo Editorial Facultad de Farmacia-UCV, Caracas, Venezuela.
- Code of Federal Regulations. Título 21. Parte 436 Test and Methods of Assay Antibiotic and Antibiotic-containing Drugs. Subparte D Microbiological Assay Methods. Washington: FDA; 1997.
- Comisión Venezolana de Normas Industriales. Exactitud (Veracidad y Precisión) de Métodos de Medición y Resultados. Parte 2: Método Básico para la Determinación de Repetibilidad y Reproducibilidad de un Método Estándar de Medición. Venezuela: COVENIN 2972-2: 1997.
- European Pharmacopoeia. Monographs. 5<sup>ta</sup> ed. Vol 2. France: Directorate for Quality of Medicines of the Council of Europe EDQM; 2008.
- González J, Barreto J, Rodríguez M, Pino P, Lim N. 1998. Macrólidos. En: [http://www.informed.sld.cu/revistas/act/vol8\\_1\\_98/act10198.pdf](http://www.informed.sld.cu/revistas/act/vol8_1_98/act10198.pdf). Acceso 19 de febrero de 2004.
- Goodman & Gilman. 1996. Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica. Vol. 2. 9<sup>na</sup> ed. Editorial McGRAW-HILL / INTERAMERICANA, México.
- Hewitt W. 2004. Microbiological Assay for Pharmaceutical Analysis a Rational Approach. Interpharm/CRC press LLC, Florida.
- ICH Topic Q2B Validation of Analytical Procedures: Methodology. International Conference on Harmonisation. Rockville MD: FDA 1996.
- Turcinov T, Pepeljnjak S. 1998. Azithromycin Potency Determination: Optimal Conditions for Microbiological Diffusion Method Assay. *J Pharm Biomed Anal* 17: 903-910.
- United States Pharmacopoeia. General Information and Biological Test. 29 ed. Rockville: USP; 2009.

# Compuestos fenólicos y actividad antioxidante en cervezas venezolanas

## Polyphenolic compounds and antioxidant activity in venezuelan beers

ALICIA M RINCÓN<sup>1\*</sup>, LIZET BOU RACHED<sup>1</sup> Y FANNY C PADILLA<sup>1</sup>

### Resumen

La cerveza junto con el vino, constituyen las bebidas alcohólicas mayormente usadas, que con el café y el té aportan polifenoles con actividad antioxidante que pueden prevenir ciertas enfermedades, particularmente aterosclerosis y cáncer. Los polifenoles en la cervezas provienen de la cebada y el lúpulo. Se evaluó el contenido de polifenoles y su actividad antioxidante en cervezas y las materias primas utilizadas en su elaboración. Los polifenoles y los flavonoides fueron determinados por espectrofotometría (Folin y cloruro de aluminio), y las propiedades antioxidantes por poder reductor, capacidad antirradical y decoloración del  $\beta$ -caroteno. Los polifenoles de la cerveza presentaron un rango de 145,49 – 259,75 mg equivalentes de ácido gálico (EAG)/L, y los flavonoides de 17,82 – 35,84 mg equivalentes de rutina/L. El poder reductor varió de 43,26 a 86,03 mg equivalentes ácido ascórbico/L y la capacidad antirradical de 0,21 a 0,37 mM equivalentes de Trolox/L. El % de actividad antioxidante y coeficiente de actividad antioxidante variaron entre 28,10 - 51,27 y 136,36 – 268,66, respectivamente. La cebada, el maíz y el lúpulo presentaron valores de polifenoles de 383,05; 30,96 y 319,44 mg EAG/100g en base seca y los flavonoides de 108,20; 4,76 y 138,65 mg de equivalentes de rutina/100g. El contenido de polifenoles y la actividad antioxidante presentaron correlación positiva. Se deduce que la cebada y el lúpulo son los mayores contribuyentes de polifenoles y actividad antioxidante en la cerveza. El cereal usado produjo un aumento en el contenido de polifenoles. Estos resultados sugieren que el consumo moderado de cerveza podría tener efectos beneficiosos para la salud, similares a los reportados para el vino.

**Palabras clave:** cerveza, cebada, lúpulo, polifenoles, actividad antioxidante.

### Summary

Beer is one of the most commonly consumed alcoholic beverages, which as well as wine, coffee, and tea are present in the human diet; they contain phenolic compounds with antioxidant activity which seem to prevent several human diseases, particularly atherosclerosis and cancer. Polyphenols in beer originate from barley and hops. The phenolic compounds and the antioxidant activity of malt, cereal adjuncts, and hops, and their presence in beer, were investigated. Total phenolics and flavonoids were determined by spectrophotometric methods (Folin and aluminum chloride), and the antioxidant properties by the ferric reducing power, antiradical capacity, and  $\beta$ -carotene bleaching methods. Beer total polyphenolic compounds range was 145.49–259.75 mg gallic acid equivalents (GAE)/L, and flavonoids 17.82–35.84 mg rutin equivalents/L. Reducing power varied from 43.26 to 86.03 mg ascorbic acid equivalents/L and the antiradical capacity presented values from 0.21 to 0.37 mM Trolox equivalents/L. The % antioxidant activity and the coefficient of antioxidant activity values range from 28.10 – 51.27 and 136.36 – 268.68 respectively. Malt, corn and hops presented values for total phenolic of 383.05; 30.96 and 319.44 mg GAE/100g dry weight and flavonoids as mg of rutin equivalents/100g were 108.20, 4.76 and 138.65. The antioxidant properties presented a positive correlation with the polyphenol content. Our results show that hops and malt are the mayor contributors of polyphenols and antioxidant activity of beer. The cereal adjunct produced an increase in beer's polyphenolic content. These results suggest that moderate beer drinking might have some health beneficial effects similar to those reported for wine.

**Key words:** Beer, malt, hops, polyphenols, antioxidant activity.

<sup>1</sup> Unidad de Análisis de Alimentos, Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela Apdo. Postal 40109, 1040-A Caracas, Venezuela.

\* Autor para la correspondencia e-mail: rinconam@gmail.com

## Introducción

Es bien conocido que el estrés oxidativo se encuentra asociado a altos niveles de radicales libres o especies reactivas de oxígeno, los cuales conllevan a una variedad de lesiones bioquímicas y fisiológicas que pueden resultar en disfunción metabólica y muerte celular (Ames, 1993). Existen evidencias epidemiológicas que indican que el consumo de alimentos y bebidas que contengan compuestos antioxidantes (flavonoides y otros polifenoles) tiene efectos benéficos para la salud (Pulido y col., 2000) pues ellos pueden proteger el organismo de los radicales libres y retardar el progreso de varias enfermedades crónicas. Son muchas las enfermedades relacionadas con la producción de radicales libres como aterosclerosis, cáncer, infarto al miocardio, enfermedades inflamatorias, trastornos del sistema nervioso central (Parkinson y Alzheimer), envejecimiento, etc. (Middleton y Kandaswami, 1994; Stadler y col., 1995). Estas enfermedades tienen una gran prevalencia en los países desarrollados y están directamente relacionadas con la alimentación, y sobre todo con los niveles de los antioxidantes dietarios. Por ello, Kühnau (1976) recomienda introducir en la dieta alimentos que contengan compuestos antioxidantes, como frutas, verduras, hortalizas, aceite de oliva y determinadas bebidas como el vino y la cerveza, esta última rica en polifenoles y otros compuestos fenólicos capaces de capturar radicales libres.

Se cree que los antioxidantes son esencialmente importantes para el organismo por la capacidad que tienen de proteger a las macromoléculas biológicas contra el daño oxidativo. Entre los más conocidos figuran los tocoferoles, el ácido ascórbico, los flavonoides, antocianinas, carotenoides, ácido fenólicos (Larson, 1997).

En la mayoría de los países occidentales las bebidas alcohólicas son una parte integral de la dieta (Renaud y Lorgeril, 1992) y representan cerca del 4 al 6% del consumo calórico (Christiansen y col., 1994). Se asume generalmente que a mayor contenido de polifenoles en una bebida, mayor será su actividad antioxidante (Abu-Amsha y col., 1996). Otros estudios *in vitro* e *in vivo* muestran que solamente algunos polifenoles poseen propiedades antioxidantes (Christiansen y col., 1994; Frankel y col., 1993). Sin embargo, los compuestos fenólicos presentes en alimentos y bebidas son susceptibles de transformación durante el procesamiento.

La cerveza es una bebida de bajo contenido alcohólico resultante de fermentar mediante levadura seleccionada, el mosto elaborado con malta de cebada, arroz, maíz, lúpulo y agua (Hough, 1982). Mundialmente, la cerveza es una bebida natural tradicional de

bajas calorías y sin grasa, con ácidos orgánicos y vitaminas que provienen de la malta, proteínas, lúpulo y agua. La cerveza tiene mayor contenido nutricional que otras bebidas alcohólicas debido a sus minerales y nutrientes esenciales como potasio, magnesio, calcio y sodio. El uso de cereales y malta en la producción de la cerveza puede contribuir en la ingestión de compuestos antioxidantes naturales como los polifenoles; por lo que su consumo podría tener un efecto beneficioso para la salud, no completamente elucidado (Ghiselli y col., 2000; Wei y col., 2001).

Los compuestos fenólicos antioxidantes provienen del lúpulo en un 20-30%, mientras que la malta proporciona un 70-80%. La cebada, contiene como componente antioxidante principal el ácido ferúlico, junto con proantocianidinas, monómeros hasta tetrámeros, mientras que el lúpulo contiene ácidos fenólicos, chalconas, flavonoides, catequinas y proantocianidinas (Gerhauser, 2005).

Durante el proceso de obtención de la cerveza progresivamente las moléculas grandes reducen su cantidad, presumiblemente porque son hidrolizadas, poco solubles en el medio, se precipitan fácilmente y se pierden en la etapas de macerado, cocción, fermentación, maduración, y pasteurización.

A los polifenoles se le atribuyen diversas propiedades funcionales; ellos influyen sobre la estabilidad coloidal de la cerveza, siendo responsables de la turbidez originada por la interacción con las proteínas de la cerveza y asimismo, tienen importancia en las características nutricionales y sensoriales (color, aroma, sabor).

El comportamiento antioxidante de los compuestos fenólicos parece estar relacionado con su capacidad para quelar metales, inhibir la lipoxigenasa, capturar radicales libres y descomposición de peróxidos. Los compuestos fenólicos pueden también actuar como prooxidantes quelando metales, bien de manera que mantienen o incrementan su actividad catalítica o bien reduciendo metales, incrementando así su capacidad para formar radicales libres de los peróxidos (Decker, 1997).

Para que un compuesto fenólico sea clasificado como antioxidante debe cumplir dos condiciones básicas. La primera es que cuando se encuentre en una concentración baja con relación al sustrato que va a ser oxidado pueda retrasar, reducir o prevenir la autooxidación o la oxidación mediada por un radical libre. La segunda es que el radical formado tras el secuestro sea estable y no pueda actuar en oxidaciones posteriores.

Se ha sugerido que los polifenoles como la fenilchacona y los fenilflavonoides de la cerveza ejercen

un efecto protector ya que son capaces de inhibir la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) *in vitro* (Miranda y col., 2000). Igualmente, las chalconas procedentes de la cerveza presentan actividad antioxidante, que protegen de la peroxidación lipídica inducida por terbutilhidroperóxido en hepatocitos aislados de rata (Rodríguez y col., 2001).

Tomando en consideración los beneficios que para la salud presentan los polifenoles gracias a su actividad antioxidante, aunado al hecho que no existen datos acerca del contenido de polifenoles y actividad antioxidante en las cervezas nacionales y la materia prima usada en Venezuela en su elaboración, en el presente trabajo se plantea realizar la evaluación del contenido de polifenoles y su actividad antioxidante en dichas bebidas alcohólicas.

## Materiales y métodos

### TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Las muestras sólidas: cebada y adjuntos fueron sometidas a molienda y tamizadas por un tamiz malla 60. A todas las muestras se les determinó el contenido de humedad.

Las muestras líquidas obtenidas en diferentes establecimientos comerciales se desgasificaron con ultrasonido durante 15 min. y se analizaron directamente. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

Un gramo de muestra se extrajo a temperatura ambiente con una mezcla de metanol-agua acidificada (0,8% HCl)(50:50) durante 1h con agitación constante, se centrifugó a 3000 rpm y se filtró, el residuo se extrae luego con acetona-agua (70:30), se centrifugó y se filtró, los filtrados se combinaron en el balón aforado de 100 ml y se llevó a volumen con una mezcla 50:50 de las dos soluciones extractivas (Rincón y col., 2005; Padilla y col., 2008).

Se determinaron los polifenoles totales mediante el método de Folin-Ciocalteu (Singleton y col., 1999), modificado por Dewanto y col. (2002), en una alícuota de 125  $\mu$ L del extracto que se mezclaron con 0,5 mL de agua destilada y 125  $\mu$ L del reactivo Folin-Ciocalteu, después de 6 min. se agregaron 1,25 mL de una solución de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 7% en agua y 1 mL de agua destilada, después de 90 min. se leyó la absorbancia a 760 nm, tomando como blanco agua destilada, usando una curva patrón de ácido gálico en un rango de concentración de 20-500  $\mu$ g/ml y los resultados se expresaron como gramos equivalentes de ácido gálico (EAG) /100g de muestra seca.

Este método utiliza como reactivo una mezcla de ácidos fosfowolfrámico y fosfomolibdico en medio

básico, que se reducen al oxidar los compuestos fenólicos, originando óxidos azules de wolframio ( $\text{W}_8\text{O}_{23}$ ) y molibdeno ( $\text{Mo}_8\text{O}_{23}$ ).

## Flavonoides totales

El contenido de flavonoides totales fue determinado usando un método colorimétrico descrito por Dewanto y col. (2002). Los flavonoides forman un complejo coloreado con el tricloruro de aluminio cuya intensidad se mide a 415 nm, la concentración de flavonoides se determina con una curva patrón de rutina y se expresa en mg de equivalentes de rutina (ERT)/ 100 g de muestra o/L. El método consiste en tomar 1 mL de la muestra o extracto, se mezcla con 1 mL de  $\text{AlCl}_3$  en etanol (20 g/L) y se diluye con etanol a 25 mL. Se lee la absorbancia a 415 nm después de 40 min. a 20 °C. El blanco se prepara a partir de 1 mL de muestra, 1 gota de ácido acético, sin  $\text{AlCl}_3$  y se diluye a 25 mL con etanol. Todas las determinaciones se hicieron por cuadruplicado.

## $\beta$ -Caroteno/Linoleato

El método  $\beta$ -caroteno/linoleato (Suja y col., 2005) se basa en la oxidación del ácido linoleico en presencia de  $\text{O}_2$ , que pasa a radical hidroperóxido que oxida al  $\beta$ -caroteno, el cual se decolora con el tiempo. La relación dosis/respuesta de la actividad antioxidante para los extractos se determina a diferentes concentraciones e intervalos de tiempo (cada 15 min). La actividad antioxidante (AA) de los extractos es evaluada en términos de decoloración del  $\beta$ -caroteno usando 2-ter-butyl-4-hidroxianisol (BHA) en etanol (100 ppm) para propósitos comparativos. Un ml de una solución de  $\beta$ -caroteno en cloroformo (0,2 mg/mL) se mezcla en un balón aforado de 50ml con 20 mg de ácido linoleico y 200 mg Tween 40. Se evapora el cloroformo con corriente de nitrógeno, al residuo se añaden lentamente con agitación vigorosa, 10 ml de agua destilada y oxigenada por agitación, para formar la emulsión, se lleva a volumen con agua destilada. Se toman alícuotas de 4 ml de la emulsión y se colocan en tubos de ensayo que contienen: a) 0,2 ml del extracto metanólico de la muestra, b) 0,2 ml de una solución de (100ppm) BHA en metanol que se usa como comparación, c) 0,2 ml de metanol como control y. d) un blanco con 4 ml de la emulsión sin adición de  $\beta$ -caroteno y 0,2 ml de metanol. Se leen las absorbancias a 470 nm de todos los tubos al tiempo cero ( $t=0$ ). Los tubos se cubren con papel de aluminio, se colocan en un baño de agua a 50 °C y se leen las absorbancias cada 15 min hasta desaparición del color del  $\beta$ -caroteno en el tubo control. La actividad antioxidante de los extractos se basó en tres paráme-

tros diferentes: la actividad antioxidante (AA), la relación de la velocidad de oxidación (Ror) y el coeficiente de la actividad antioxidante (CAA). El índice de actividad antioxidante (AA) fue determinada como el porcentaje de inhibición relativa al control.

$$Aa = [(R_{control} - R_{muestra}) / (R_{control})] 100$$

donde  $R_{control}$  y  $R_{muestra}$  representan la velocidad de decoloración del  $\beta$ -caroteno sin y con la adición de antioxidante respectivamente. La velocidad de degradación (Rd) fue calculada de acuerdo con cinética de primer grado:

$$Rd = \ln(A_t / A_x)(1/t)$$

donde  $\ln$  es el log natural,  $A_t$  es la absorbancia inicial a 470 nm a ( $t = 0$ ) y  $A_x$  es la absorbancia a 470 nm a  $t = 15, 30, 45, \dots$  min.

La relación de la velocidad de oxidación se calcula según:

$$R_{OR} = R_{muestra} / R_{control}$$

Donde  $R_{muestra}$  y  $R_{control}$  representan la velocidad de decoloración del  $\beta$ -caroteno sin y con la adición de antioxidante respectivamente.

El coeficiente de la actividad antioxidante (CAA) es calculado usando:

$$CAA = \left[ \left( A_{m(90)} - A_{c(90)} / A_{c(0)} - A_{c(90)} \right) \right] 1000$$

donde  $A_{m(90)}$  es la absorbancia de la muestra conteniendo antioxidante a un tiempo  $t=90$  min.,  $A_{c(90)}$  es la absorbancia del control a un tiempo  $t=90$  min., y  $A_{c(0)}$  es la absorbancia del control a  $t = 0$  min.

### Poder reductor

Los antioxidantes, causan la conversión del  $Fe^{+3}$  del complejo ferricianuro usado en este método a la forma ferrosa. Se forma azul de Prusia que absorbe a 700 nm y se compara contra una curva patrón de ácido ascórbico.

El poder reductor fue determinado de acuerdo al método de Yen y Duh (1993), modificado. La modificación consistió en comparar los resultados con una curva estándar de vitamina C. Los ensayos se realizaron por triplicado, expresándose los resultados en equivalentes de Ac. Ascórbico (EAAs)mg / 100g de muestra en base seca (bs). El método consiste en tomar 1ml de muestra se añaden 2,5 ml de buffer fosfato (0,2 M, pH 6,6) y 2,5 ml de ferricianuro de

potasio al 1% en tubos de 10 mL. La mezcla se coloca por 20 min en un baño de agua a 50 °C, luego de este tiempo se le agrega 2,5 ml de ácido tricloroacético al 10% se centrifuga a 5.000 rpm por 10 min. Se toman 2,5 ml del sobrenadante se mezclan con 2,5 ml de agua destilada y 0,5 ml de cloruro férrico 0,1%. Finalmente se mide la absorbancia a 700 nm en el espectrofotómetro. Se realiza una curva patrón con ácido ascórbico en un rango de 25 a 200 ppm

### Capacidad antirradical

La capacidad antirradical se determinó mediante método del radical DPPH<sup>\*</sup> (1,1-difenil-2-picril- hidracil) (Arnaous y col., 2002), el cual se basa en la reducción del radical DPPH<sup>\*</sup> por los antioxidantes de la muestra. El barrido de los radicales libres es uno de los mecanismos conocidos mediante el cual los antioxidantes inhiben la oxidación de los lípidos. El ensayo permite evaluar en forma rápida la actividad antioxidante *in vitro* de compuestos específicos o extractos. El radical (DPPH<sup>\*</sup>) en solución metanólica al 0,025g/L es estable y tiene una coloración púrpura que se pierde progresivamente cuando se añade la muestra conteniendo sustancias antioxidantes. La decoloración del radical se determina a 515 nm y la cuantificación se realiza empleando una curva patrón de Trolox. Este método refleja la habilidad de los compuestos antioxidantes, capaces de donar hidrógeno, para secuestrar el radical DPPH<sup>\*</sup> (Miller y Rice-Evans, 1997), y se define como la concentración de una solución de Trolox con un potencial antioxidante equivalente a una concentración mM del compuesto fenólico a estudiar.

El análisis se realiza sobre 0,025 mL de la muestra se mezclan con 0,975 mL de solución de DPPH (60  $\mu$ M en metanol) después de agitar se mide la absorbancia en el tiempo 0 ( $t = 0$ ) y después de treinta minutos ( $t = 30$  min). Los resultados se expresan en equivalentes de Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico) (ETR) mM / L. Se realiza una curva patrón con Trolox en el rango de 0,08 – 1,28 mM.

### Análisis estadístico

Todas las determinaciones se realizaron por triplicado y se expresaron los valores como los promedios  $\pm$  la desviación estándar (DE).

### Resultados y discusión

Los polifenoles juegan un papel importante en la estabilidad del sabor y estabilidad coloidal de la cerveza (Vanderhaegen y col., 2006). Los polifenoles de

las cervezas variaron de 145.49–259.75 mg EAG/L, y los flavonoides de 17.82–35.84 mg ERT/L, mostrando el mayor valor la cerveza tipo Ice 1 para los polifenoles mientras que la tipo Pilsen 2 presentó el mayor valor de flavonoides (Tabla I). El contenido de polifenoles resultó ser similar al obtenido por Zhao y col. (2010), quienes encontraron valores entre 152,01 y 339,12 mg EAG/L,

**Tabla I**  
**Contenido de polifenoles y flavonoides en las cervezas venezolanas**

| Muestra       | Polif.Totales EAG <sup>1</sup> mg/L | Flavonoides ERT <sup>2</sup> mg/L |
|---------------|-------------------------------------|-----------------------------------|
| Tipo Ice 1    | 259,75 ± 2,855                      | 17,82 ± 1,444                     |
| Tipo Ice 2    | 162,16 ± 3,214                      | 22,80 ± 1,814                     |
| Tipo Pilsen 1 | 212,61 ± 5,246                      | 33,33 ± 3,441                     |
| Tipo Pilsen 2 | 145,49 ± 4,949                      | 35,84 ± 2,429                     |
| Tipo Pilsen 3 | 152,87 ± 2,526                      | 29,39 ± 2,110                     |

<sup>1</sup> EAG = Equivalentes de ácido gálico

<sup>2</sup> ERT = Equivalentes de rutina

En cuanto a la actividad antioxidante (Tabla II) representada por el poder reductor los valores variaron de 43,26 a 86,03 EAAs mg/L donde la cerveza tipo Ice 1 presentó el valor más alto y la tipo Pilsen 2 el más bajo. Estos resultados se correlacionan bien con el contenido de polifenoles. Las propiedades reductoras están asociadas a la presencia de compuestos fenólicos que ejercen su acción a través del rompimiento de la reacción en cadena de los radicales libres por donación de un átomo de hidrógeno (Duh y col., 1999) y con la presencia de reductonas. Las procianidinas presentes en la cerveza podrían actuar de manera similar a las reductonas por donación de electrones (Jayaprakasha y col., 2001). Es de hacer notar que la diferencia en la estructura química de cada uno de los polifenoles presentes los puede hacer reaccionar como donadores de electrones o no.

La capacidad antirradical presentó valores de 0.21 a 0.37 mM Trolox/L., en este caso la Pilsen 1 y la Pilsen 2 presentaron los valores más altos y más bajos respectivamente. Estos resultados también son similares a los encontrados por Zhao y col. (2010), y representan la habilidad de los polifenoles presentes en la cerveza para donar hidrógeno a radicales libres inhibiendo de esta manera la propagación de la oxidación lipídica.

De las materias primas cebada malteada (Malta), maíz y lúpulo (Tabla III), el maíz presentó el contenido de polifenoles más bajo 30,96 mg/100g base seca y el lúpulo el más alto, resultados similares se presentaron en el caso de los flavonoides expresados

como ERT mg/100g, 4,76 para el maíz y 138,65 para el lúpulo.

Los resultados muestran que el lúpulo y la cebada (malta) son las fuentes principales de compuestos fenólicos y por lo tanto los responsables de la actividad antioxidante presente en la cerveza.

A pesar que el lúpulo es añadido en pequeñas cantidades, los resultados confirman que los polifenoles presentes contribuyen altamente con el poder reductor de la cerveza. Sin embargo la actividad antioxidante depende de la variedad, calidad y proceso de obtención. En la actualidad se usa el lúpulo isomerizado y el extraído con CO<sub>2</sub> supercrítico que es el que presenta mayor cantidad de polifenoles. El cereal usado como adjunto también influye en el contenido de polifenoles pues aporta cierta cantidad de ellos, lo cual se ve reflejado en las cervezas fabricadas sin el uso adicional de cereales como son la tipo Pilsen 2 y Ice 2. Los cereales usados son el arroz, maíz amarillo y blanco.

De los resultados obtenidos con el método del beta-caroteno (Tabla II) representado por los valores de actividad antioxidante (AA) y el coeficiente de actividad antioxidante (CAA) la cerveza que presentó el menor valor fue la tipo Pilsen 3, los resultados obtenidos para los diferentes tipo de cerveza fueron mucho menores que el presentado por el BHA antioxidante sintético. Sin embargo, cuando la capacidad antioxidante se expresa como poder reductor o actividad antirradical la cerveza tipo Pilsen 2 fue la que presentó el valor más bajo, lo cual se correlaciona con el contenido de polifenoles totales.

**Tabla II**  
**Actividad antioxidante de algunas cervezas venezolanas**

| Muestra       | Pod. Reductor EAAs.mg/L | Cap. Antirrad. ETrolox mM/L | %AA <sup>1</sup> | CAA <sup>2</sup> |
|---------------|-------------------------|-----------------------------|------------------|------------------|
| Tipo Ice 1    | 86,03 ± 2,132           | 0,23 ± 0,014                | 51,27            | 268,66           |
| Tipo Ice 2    | 61,63 ± 4,842           | 0,30 ± 0,034                | 48,35            | 178,13           |
| Tipo Pilsen 1 | 59,21 ± 3,094           | 0,37 ± 0,063                | 44,76            | 261,43           |
| Tipo Pilsen 2 | 43,26 ± 1,966           | 0,21 ± 0,024                | 30,12            | 146,69           |
| Tipo Pilsen 3 | 78,48 ± 2,890           | 0,23 ± 0,008                | 28,10            | 136,36           |
| BHA           |                         |                             | 94,05            | 887,37           |

<sup>1</sup> % AA = Porcentaje de actividad antioxidante

<sup>2</sup> CAA = Coeficiente de actividad antioxidante

Asimismo, el lúpulo y la cebada presentan el contenido más alto de polifenoles, lo que se correlaciona con todos los valores que miden la capacidad antioxidante (Tabla III y IV), sin embargo al comparar los resultados del % AA y el CAA de todas las materias primas, éstos son mucho menores que la actividad antioxidante del BHA.

De acuerdo a los resultados se puede decir que el contenido de polifenoles totales se correlaciona bien con la actividad antioxidante expresada como poder reductor (EAs g/100g), capacidad antirradical y co-

**Tabla III**

**Contenido de polifenoles y flavonoides en la materia prima usada en la fabricación de cervezas venezolanas**

| Muestra | Polif. Totales<br>EAG <sup>1</sup> mg /100g (bs) | Flavonoides<br>ERT <sup>2</sup> mg/100g (bs) |
|---------|--|--|
| Cebada  | 383,05 ± 36,329                                  | 108,20 ± 15,56                               |
| Maíz    | 30,96 ± 2,109                                    | 4,76 ± 1,316                                 |
| Lúpulo  | 319,44 ± 15,19                                   | 138,65 ± 5,19                                |

<sup>1</sup> EAG = Equivalentes de ácido gálico

<sup>2</sup>ERT = Equivalentes de rutina

**Tabla IV**

**Actividad antioxidante de la materia prima usada en la fabricación de cervezas venezolanas**

| Muestra | Poder Reductor<br>EAs. mg/100g (bs) | Cap. Antirrad.<br>ETrolox mM/L | %AA <sup>1</sup> | CAA <sup>2</sup> |
|---------|-------------------------------------|--------------------------------|------------------|------------------|
| Cebada  | 509,65 ± 49,888                     | 0,371 ± 0,1229                 | 74,99            | 510,09           |
| Maíz    | 71,53 ± 6,481                       | 0,098 ± 0,0796                 | 74,54            | 282,37           |
| Lúpulo  | 870,76 ± 21,04                      | 1,260 ± 0,087                  | 84,72            | 680,810          |
| BHA     |                                     |                                | 94,05            | 887,37           |

<sup>1</sup> % AA = Porcentaje de actividad antioxidante

<sup>2</sup> CAA = Coeficiente de actividad antioxidante

mo % actividad antioxidante (AA) (Tabla IV); lo que significa que a mayor presencia de polifenoles mayor actividad antioxidante, sin embargo la calificación del poder antioxidante depende del tipo de método usado y el parámetro con el cual se mide.

**Conclusión**

Estos resultados sugieren que las cervezas estudiadas presentan un contenido de polifenoles y por ende una actividad antioxidante que provee un medio importante para mejorar la estabilidad del sabor de la cerveza. Asimismo, pueden tener algunos efectos beneficiosos para la salud, similares a los que presenta el vino, sin embargo como toda bebida alcohólica debe ser consumida con mucha moderación.

**Agradecimientos**

Los autores agradecen al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico (CDCH) de la UCV por el financiamiento de este trabajo y a las empresas Polar por el suministro de las materias primas.

**Referencias bibliográficas**

Abu-Amsha R, Croft KD, Puddey IB, Proudfoot JM, Beilin LJ. 1996. Phenolic content of various beverages the extent of inhibition of human serum and low density lipoprotein oxidation in vitro: identification and mechanism of action of some cinnamic acid derivatives from red wine. *Clin Sci* 91:449-458.

Ames BM, Shigena MK, Hagen TM. 1993. Oxidants, antioxidants and the degenerative disease of aging. *Proc Nat Acad Sci USA*, 90:7915-7922.

Arnaous A, Makris, DP, Kefalas, P. 2002. Correlation of pigment and flavonol content with antioxidant properties in selected aged regional wines from Greece. *J Food Comp Anal* 15:655-665.

Christiansen C, Thomsen C, Rasmussen D, Hauerslev C, Balle M, Hansen C, Hermansen K. 1994. Effect of alcohol on glucose, insulin free fatty acids and triacylglycerol responses to a light meal in non insulin dependent diabetic subjects. *Br J Nutr* 71: 449-454.

Decker EA. 1997. Phenolics: Prooxidants or antioxidants? *Nutritional Reviews* 55:396-398.

Dewanto V, Wu X, Adom KK, Liu RH. 2002. Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. *J Agric Food Chem* 50: 3010-3014.

Duh PD, Du PC, Yen GC. 1999. Action of methanolic extract of mung hulls as inhibitors of lipid peroxidation and non lipid oxidative damage. *Food Chem Toxicol* 37:1055-1061.

Frankel EN, Waterhouse AL, Kinsella JE. 1993. Inhibition of human LDL-C oxidation by resveratrol. *Lancet* 341: 1103-1104.

Gerhauser C. 2005. Beer constituents as potential cancer chemopreventive agents. *Eur J Cancer* 41:1941-1954.

Ghiselli A, Natella F, Guidi A, Montanari L, Fantozzi P, Sczccini C. 2000. Beer increases plasma antioxidant capacity in humans. *J Nutr Biochem* 11:76-80.

Hough JS, Briggs DE, Stevens R, Young TM. 1982. In: *Malting and Brewing Science*, vol. 2, 2nd ed., Chapman and Hall, London.

Jayaprakasha GK, Singh RP, Sacariah KK. 2001. Antioxidant activity of grape seed (*Vitis vinifera*) extracts on peroxidation models in vitro. *Food Chem* 73:285-290.

Kühnau J. 1976. The flavonoids, a class of semi-essential food components: their role in human nutrition. *World Rev Nutr Diet* 24: 117-191.

Larson R. 1997. Naturally occurring antioxidants. CRC Press LLC, pp. 116.

Middleton E, Kandaswami C. 1994. Potential health-promoting properties of citrus flavonoids. *Food Technol* 8:115-119.

Miller NJ, Rice-Evans CA. 1997. Factors influencing the antioxidant activity determined by the ABTS<sup>+</sup> radical cation assay. *Free Radical Res* 26:195-199.

- Miranda CL, Stevens JF, Ivanov V, McCall M, Frei B, Veinzer ML, Buhler DR. 2000. Antioxidant and prooxidant actions of prenylated and non-prenylated chalcones and flavonones *in vitro*. *J Agric Food Chem* 48:3876-3884.
- Padilla FC, Rincón AM, Bou-Rached L, Suárez A. 2008. *Prostium neglectum*, *Podocalis lorantoides*, and *Brosimum utile* source of flavonoids and other phenolic compounds with antioxidant activity. *Rev Fac Far, UCV*. 71:8-14.
- Pulido R, Bravo L, Saura-Calixto F. 2000. Antioxidant capacity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. *J Agric. Food Chem* 48:3396-3402.
- Renaud S, de Lorgeril M. 1992. Wine, alcohol, platelets and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet* 339:1523-1526.
- Rincón AM, Vázquez AM, Padilla FC. 2005. Composición química y compuestos bioactivos de las harinas de cáscaras de naranja (*Citrus sinensis*), mandarina (*Citrus reticulata*) y toronja (*Citrus paradisi*) cultivadas en Venezuela. *Arch Latinoamer Nutr*.55:305-310.
- Rodríguez RJ, Miranda CL, Stevens JF, Deinzer ML, Buhler DR. 2001. Influence of prenylated and non-prenylated flavonoids on liver microsomal lipid peroxidation and oxidative injury in rat hepatocytes. *Food Chem Toxicol* 39:437-445.
- Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of the Folin-Ciocalteu reagent. *Meth Enzymol* 299:152-178.
- Stadler RH, Markovic J, Turesky RJ. 1995. In vitro anti- and pro-oxidative effects of natural polyphenols. *Biol Trace Elem Res* 47:299-305.
- Suja KP, Jayalekshmy A, Arumughan C. 2005. Antioxidant Activity of sesame cake extracts. *Food Chem* 91:213-219.
- Wei A, Mura K, Shibamoto T. 2001. Antioxidant activity of volatile Chemicals extracted from beer. *J Agric Food Chem* 49:4097-4101.
- Yen GC, Duh PD. 1993. Antioxidant properties of methanolic extracts from peanut hulls. *J Am Oil Chem Soc* 70:383-386.
- Zhao H, Chen W, Lu J, Zhao M. 2010. Phenolic profiles and antioxidant activities of commercial beers. *Food Chem* 119:1150-1158.
- Vanderhaegen B, Neven H, Verachtert H, Derdelinckx G. 2006. The chemistry of beer aging – A critical review. *Food Chem* 95:357-381.

# Efecto del tempol en la preeclampsia experimental

## Effect of tempol in experimental preeclampsia

ELSA CAMACHO, JOSÉ ANTONIO SILVA Y ANITA ISRAEL\*

### Resumen

La preeclampsia (PE) es un trastorno multisistémico del embarazo caracterizado por hipertensión, proteinuria y edema, que se asocia con la disfunción endotelial generalizada y el estrés oxidativo. En el embarazo normal, los mecanismos de vasodilatación sugieren que el óxido nítrico (ON) es el más importante mediador en la reducción de la resistencia vascular, mientras que en la PE la respuesta dilatadora dependiente de endotelio y mediada por el ON se encuentra reducida. Se ha demostrado que la inhibición de la síntesis del ON mediante la administración crónica de L-NAME en ratas preñadas, resulta en un modelo animal que ocasiona un síndrome similar a la PE, el cual cursa con hipertensión, proteinuria, trombocitopenia y retardo de crecimiento intrauterino. En el presente estudio caracterizamos las alteraciones renales que ocurren durante la PE experimental, para lo cual empleamos el modelo animal de preeclampsia inducido por la inhibición de la síntesis de óxido nítrico, en ratas de 13 días de gestación. Se cuantificó la posible alteración en la actividad de las enzimas antioxidantes como la catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD) y glutatión peroxidasa (GPx) renal. El tratamiento crónico con L-NAME en ratas preñadas incrementó la PAM (+20 mmHg), produjo proteinuria, redujo el peso promedio de los fetos, sin embargo no alteró significativamente el número de ellos. El estudio histológico de los riñones de animales pre-eclámpicos mostró que los mismos presentan tumefacción turbia de epitelios tubulares, focos hemorrágicos y congestión de capilares glomerulares. La inhibición de la sintasa del óxido nítrico en las ratas preñadas redujo la actividad de las tres enzimas antioxidantes evaluadas. El tratamiento crónico con tempol, un compuesto que mimetiza a la actividad de la SOD, previno el incremento de la presión arterial, la proteinuria, la evidencia morfológica de endoteliosis glomerular, la reducción del peso de feto y la disminución de la actividad de las enzimas antioxidantes inducida por el L-NAME en ratas preñadas. Estos hallazgos sugieren que la PE experimental cursa con alteración de la función renal asociada a la reducción de la actividad antioxidante. Igualmente indican que estas acciones están mediadas por un incremento de la producción de especies reactivas de oxígeno, por lo que el uso terapéutico de los antioxidantes como estrategia farmacológica en la preeclampsia parece ser prometedor.

**Palabras clave:** preeclampsia, tempol, catalasa, superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa.

### Abstract

Preeclampsia (PE) is a multisystem disorder of pregnancy characterized by hypertension, proteinuria and edema. PE is associated with endothelial dysfunction, oxidative stress and decreased endothelial nitric oxide synthase activity. The mechanisms of normal pregnancy-associated vasodilatation suggest that nitric oxide (NO) is the most important mediator for the reduction of vascular resistance. Many studies demonstrated reduction of endothelium-dependent dilator response mediated by NO in PE. Inhibition of NO synthesis is an animal model which results in a PE-like syndrome such as hypertension, proteinuria, thrombocytopenia and intrauterine growth retardation. In order to assess the possible renal alteration in this animal model of preeclampsia induced by chronic administration of L-NAME, we determined the activity of three antioxidant enzymes: catalase, superoxide dismutase and glutathione peroxidase in the rat kidney. Chronic L-NAME treatment in pregnant rats increased MAP (+20 mmHg), produced proteinuria, reduced fetuses mean weight, while did not change their number. Histological examination of the kidneys showed cloudy swelling PE tubular epithelia, hemorrhagic foci and congestion of glomerular capillaries. Likewise, inhibition of ON synthesis reduced CAT, SOD, GPx activity in the kidney. Tempol treatment blunted hypertension, proteinuria, reduction in fetus weight, morphological evidences of endotheliosis and decreased antioxidant enzyme activity induced by L-NAME in pregnant rats. These findings suggest that in experimental preeclampsia, renal alterations are associated with a reduction in the antioxidant enzyme activity. In addition, they suggest a role of reactive oxygen species production in renal dysfunction indicating the possible use of antioxidants as a therapeutic tool in preeclampsia.

**Key words:** preeclampsia, tempol, catalase, superoxide dismutase, glutathione peroxidase.

Laboratorio de Neuropeptidos. Facultad de Farmacia. Universidad Central de Venezuela. Caracas - Venezuela.

\* Correspondencia: Apartado Postal 50176, Sabana Grande 1050A, Caracas, Venezuela. E-mail: astern88@gmail.com  
teléfonos: 0414-121-0405, oficina: 605-2689; hogar: 9790025.

## Introducción

La preeclampsia se considera como un desorden hipertensivo que ocurre principalmente por una mala adaptación placentaria, que involucra disfunción endotelial y que afecta consistentemente al riñón (Shah, 2005). La génesis del proceso reside, probablemente, en una implantación anómala del trofoblasto placentario mediado por mecanismos inmunológicos y quizás genéticos. Esto provoca hipoperfusión útero-placentaria, la cual favorece a la liberación de sustancias citotóxicas que lesionan difusamente al endotelio causando disfunción endotelial y vasoconstricción generalizada (riñón, cerebro, hígado, etc), así como activación de la cascada de la coagulación. Además se produce la activación del sistema nervioso simpático y el desequilibrio entre la síntesis de sustancias vasodilatadoras (prostaciclina y óxido nítrico) y vasoconstrictoras (tromboxano  $A_2$  y endotelina), desviándose el equilibrio hacia estas últimas (Seligman y col., 1994; Lyall y Greer, 1996; Silver y col., 1996; Dekker y Sibai, 1998; Clambers y col., 2001; Roberts y Cooper, 2001; Pacheco, 2003).

Además de la liberación de sustancias vasoactivas y angiogénicas, como la angiotensina II, se liberan sustancias como el anticuerpo anti-receptor  $AT_1$  ( $AT_1$ -AA) y de un antagonista del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) el sFlt-1 (*placental soluble fms-like tyrosine kinase 1*). Este último, al reducir los niveles circulantes del VEGF y del factor de crecimiento placentario (PIGF), contribuyen a la hipertensión, la disfunción endotelial y al daño renal (Bank y col., 1998; Tsatsaris y col., 2003). Aún más, el predominio de la liberación de sustancias vasoactivas que ocurre en la placenta, a su vez favorece a la activación de vías intrínsecas y extrínsecas de la coagulación, y con ello se genera incremento de tromboxanos, citoquinas, factor de necrosis tumoral que afecta también la integridad endotelial vascular.

Como consecuencia al daño endotelial que ocurre en los vasos sanguíneos, se produce un incremento del estrés oxidativo y por ende de la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO), lo cual conlleva a un aumento de la reactividad vascular a la angiotensina II periférica y al daño renal (Shah, 2005). Otro de los factores que influyen en el daño renal en la preeclampsia, es la disminución de la actividad de las enzimas antioxidantes SOD y GPX placentarias, a los altos niveles de malonil-dialdehído (MDA) (producto final de peroxidación lipídica), al incremento de tromboxanos y lipoperóxidos. Por ello, la desregulación funcional está asociada a una baja protección oxidativa que favorece a la insuficiencia renal (Balal y col., 2003).

La disfunción endotelial en el riñón en la preeclampsia se manifiesta por disminución del flujo plasmático renal (FPR) y de la tasa de filtración glomerular (TFG), presencia de proteinuria que puede estar en rango nefrótico, así como también evidencia morfológica de endoteliosis glomerular (Munkhaugen y Egil, 2009). La evidencia indica que durante el embarazo normal existe una adaptación fisiológica vascular, que comprende un incremento en el volumen sanguíneo, un aumento del gasto cardíaco y una disminución de la resistencia periférica vascular, acompañada de un incremento endógeno en la producción de óxido nítrico (ON), y un aumento en la respuesta vascular dependiente del endotelio intacto (Buhimschi y col., 1998). Actualmente no existen dudas que el incremento de la producción de ON en el endotelio vascular y su biodisponibilidad normal constituyen mecanismos críticos que explican la adaptación hemodinámica en el embarazo normal (López-Jaramillo y col., 2008).

Ahora bien, la característica más importante observada en la preeclampsia es la vasoconstricción generalizada. Debido a ello, se ha propuesto la existencia de una alteración en la síntesis de ON endotelial. En efecto, se ha demostrado que durante la preeclampsia ocurre una disminución de la concentración de nitratos y nitritos, asociada a disminución de los niveles de GMPc, cuando se compara con pacientes controles. Además, existe una disminución de la biodisponibilidad del ON, posiblemente mediado por la acumulación de la dimetilarginina asimétrica (ADMA), un inhibidor endógeno de la sintasa de óxido nítrico endotelial (Slaghekkee y col., 2006), al posible incremento de la actividad arginasa endotelial (Demougeot y col., 2005) y a un incremento del estrés oxidativo responsable de la rápida degradación del ON, especialmente debido a su gran reactividad con el anión superóxido para formar peroxinitrito, lo cual explicaría la vasoconstricción periférica, la disfunción endotelial y las manifestaciones clínicas de la enfermedad (López-Jaramillo y col., 2008).

Debido a la fuerte evidencia que indica el papel primordial del ON y su desregulación en la preeclampsia, se generó un modelo experimental que resulta de la inhibición crónica de la síntesis de ON mediante la administración de L-NAME a ratas preñadas. En este modelo los animales desarrollan hipertensión, y cambios fisiológicos como la potenciación de la respuesta presora a la angiotensina II, vasopresina y noradrenalina, proteinuria e incremento de la agregación plaquetaria, similar a los cambios que ocurren en la preeclampsia humana (Molnar y Hertelendy, 1992). El tratamiento con L-NAME en ratas preñadas produce disfunción renal, vasoconstric-

ción en las arterias renales, y una disminución en la tasa de filtración glomerular, alteraciones en la placenta y trombosis en los vasos sanguíneos. De manera que la reducción de la síntesis óxido nítrico en ratas preñadas desarrolla un buen modelo de preeclampsia muy similar a la preeclampsia desarrollada en humanos (Pandhi y col., 2001).

En la actualidad se conocen algunas de las generalidades de este modelo experimental, sin embargo aun no se ha caracterizado la contribución relativa del estrés oxidativo y de la actividad de las enzimas antioxidantes en la alteración de la función renal en este modelo de preeclampsia.

## Materiales y métodos

### ANIMALES Y PROTOCOLOS DE EXPERIMENTACIÓN

Como animales de experimentación se utilizaron ratas hembras primigestas, de la cepa Sprague-Dawley, de 12-13 semanas de edad, provenientes del Bioterio del Instituto de Medicina Experimental (Caracas), mantenidas bajo libre acceso al agua y a la comida (Ratarina®) hasta el momento del experimento. Después del apareamiento, la presencia del espermatozoide en el frotis vaginal marca el día 1 de la gestación. A partir del día 13 de la gestación, los animales se distribuyeron aleatoriamente en cuatro grupos. Los animales del grupo I que recibieron una dosis de 50 mg/kg/día de N-nitro-L-arginina (L-NAME) administrada por vía intraperitoneal, durante 7 días. El grupo II recibió solo vehículo (solución fisiológica). El grupo III recibió tempol (20 mg/kg/día, i.p.) durante 7 días y el grupo IV recibió el tratamiento combinado de L-NAME+tempol durante 7 días. Todos los animales fueron pesados dos veces a la semana y se les determinó la presión arterial sistólica, diastólica y frecuencia cardíaca.

Al día 20 de la gestación, los animales fueron colocados en jaulas metabólicas individuales para la recolección de orina de 24 horas. Inmediatamente después de la recolección de las muestras de orina los animales fueron sacrificados por decapitación, se recolectaron muestras del riñón y fetos los cuales fueron colocadas inmediatamente en hielo. Los fetos fueron cuantificados y pesados y las cortezas renales fueron homogenizadas y congeladas a -20 °C, hasta su utilización en los ensayos respectivos.

Los procedimientos empleados en los experimentos fueron sometidos para su aprobación, al Comité de Bioterio de la Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela. Todos los experimentos fueron realizados siguiendo las buenas prácticas para el manejo de animales de laboratorio (NIH Guide, 1996).

### DETERMINACIÓN DE LA PRESIÓN ARTERIAL (PA) Y DE LA FRECUENCIA CARDÍACA (FC)

Para la determinación de la PA (PAS y PAD) y FC se utilizó el método indirecto no invasivo mediante el empleo de un pletismógrafo digital de cola (Digital Pressure Meter LE 5000, LETICA y el Pressure Cylinder LE 5100, LETICA® Scientific Instruments, Barcelona, España). Para ello, las ratas fueron calentadas en una estufa graduada a 42 °C durante 15 minutos, y luego colocados en un cepo para la determinación no invasiva de los parámetros cardiovasculares. Estos fueron determinados a la misma hora del día durante los períodos de entrenamiento y del experimental. La PAM fue calculada de acuerdo a la fórmula:  $PAD + 1/3(PAS - PAD)$ .

### CUANTIFICACIÓN DE LA EXCRECIÓN URINARIA DE PROTEÍNAS

Se empleó el método colorimétrico basado en el método de Biuret, en el cual se determina la cantidad de proteínas presentes en la orina mediante la formación de un quelato coloreado, donde ocurre una reacción entre los iones cúprico y los enlaces peptídicos. El método se fundamenta en la co-precipitación de proteínas, en presencia del reactivo de rojo Ponceau y la adición del ácido tricloroacético. La concentración de proteínas urinaria se cuantificó espectrofotométricamente a una longitud de onda de 560 nm, su concentración se calculó mediante la utilización de una curva estándar de albúmina sérica de bovino. Los resultados se expresaron como mg de proteínas/100 g de rata (Pesce y Strande, 1973).

### DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA CATALASA (CAT)

La actividad de la catalasa fue determinada empleando una modificación del método de Aebi (1984), que se basa en la disminución de la absorbancia del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> debido a su degradación enzimática y monitoreada a una longitud de onda de 240 nm, a 25 °C. Brevemente, en una celda de cuarzo se colocan 25 µL de homogenizado del tejido diluido 1:33 en amortiguador de fosfatos 10 mM (pH 7,0), se adiciona 725 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 7,7 mM e inmediatamente se mide el cambio de absorbancia a 240 nm, a los 15 y 30 segundos. De acuerdo a Aebi, se utiliza la constante de reacción de primer orden (k) como la unidad de actividad de la CAT, la cual queda definida de acuerdo a la siguiente fórmula:  $k = (1/t) (2,3 \times \log A_1/A_2)$ , donde t es el intervalo de tiempo medido (seg), A<sub>1</sub> y A<sub>2</sub> son las absorbancias del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en los tiempos t<sub>1</sub> y t<sub>2</sub>. Los resultados se expresan como k/mg de proteína.

#### DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA SUPERÓXIDO DISMUTASA (SOD)

La actividad de SOD se determinó mediante una modificación del método de Oberley y col. (1984), el cual mide la capacidad SOD presente en la muestra para inhibir la reducción del azul de nitrotetrazolio (NBT) por el anión superóxido generado a través del sistema de la xantina-xantina oxidasa presente en la mezcla de reacción. Los resultados son expresados como U/mg proteína. Una U de actividad SOD se define como la cantidad de enzima requerida para inhibir en un 50% la formación de los cristales de formazán.

#### DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA GLUTATIÓN PEROXIDASA (GPx)

La actividad de la glutatión peroxidasa (GPx) fue determinada de forma indirecta de acuerdo al método descrito por Flohé (1984), mediante una reacción acoplada con la glutatión reductasa. El glutatión reducido es empleado por la GPx para reducir el peróxido de hidrógeno, el cual es regenerado por la glutatión reductasa a partir de glutatión oxidado y NAD(P)H. La reacción mide la disminución de la absorbancia a 340 nm debido a la desaparición de NAD(P)H. Los resultados fueron expresados como actividad enzimática en U/mg proteína ( $\epsilon = 6.22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Una U de GPx representa un mmol de NAD(P)H oxidado/min por mg proteína.

#### DETERMINACIÓN LAS PROTEÍNAS TISULARES

Las proteínas tisulares totales fueron determinadas por el método de Lowry y col. (1951) utilizando albúmina sérica de bovino como patrón. Los resultados fueron expresados como mg de proteínas/ml.

### Histología renal

Los animales fueron sacrificados mediante decapitación, se practicó una incisión en la parte media del abdomen, y el riñón izquierdo fue extraído, decapsulado y pesado. El riñón derecho, fue fijado en formalina y embebido en parafina para los estudios histopatológicos, utilizando rebanadas de riñón de unas 4-6 micras. Los estudios morfológicos fueron realizados por un observador ciego con respecto al grupo de tratamiento al que pertenece el animal.

El daño tubulointestinal, fue evaluado mediante el uso de una escala semicuantitativa. Las rebanadas de riñón embebidas en parafina, fueron teñidas con hematoxilina y eosina y observadas bajo un microscopio de luz.

### Análisis estadístico

Todos los resultados fueron expresados como la

media más o menos el error estándar de la media ( $X \pm \text{EEM}$ ). Las diferencias entre los grupos se determinó mediante el uso de la prueba de «t» de Student y el análisis de varianza de una vía (ANOVA). Un valor de  $p < 0.05$  fue considerado como estadísticamente significativo.

### Resultados

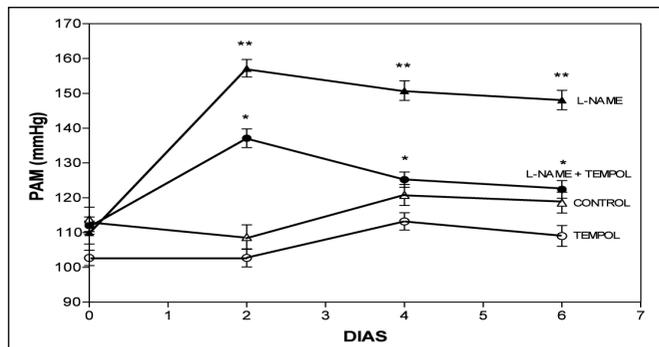
*Presión arterial media y excreción urinaria de proteínas en ratas con preeclampsia experimental inducida mediante el tratamiento con L-NAME. Efecto del tratamiento con tempol.*

El tratamiento a ratas preñadas con L-NAME durante 7 días consecutivos produjo un incremento significativo de la presión arterial media, cuyos valores alcanzaron a  $157,3 \pm 3 \text{ mmHg}$  (Figura 1). De igual forma, el tratamiento con L-NAME elevó significativamente la excreción urinaria de proteínas (Tabla I y Figura 2). Aun cuando no se observaron reducciones en el número de fetos después del tratamiento con L-NAME, si se produjo una reducción significativa en el peso promedio de los fetos asociada con incremento de la resorción (Tabla I). La observación al microscopio de luz (Figura 3) muestra que el riñón de la rata preñada sin tratamiento presenta tumefacción turbia y edema glomerular, mientras que en el riñón proveniente de las ratas preñadas y tratadas con L-NAME presentan tumefacción turbia de epitelios tubulares, focos hemorrágicos y congestión de capilares glomerulares. El tratamiento con tempol (20 mg/kg/día) durante 7 días consecutivos redujo en forma significativa el incremento de la presión arterial media inducido por la inhibición de la síntesis de ON en ratas preñadas (Figura 1). El tempol por sí mismo no alteró significativamente el curso temporal de la presión arterial media en ratas preñadas (Figura 1). De igual forma, el tratamiento con tempol revirtió completamente la proteinuria, la reducción de los pesos promedio de los fetos y la resorción observada en este modelo de preeclampsia experimental (Figura 2, Tabla I).

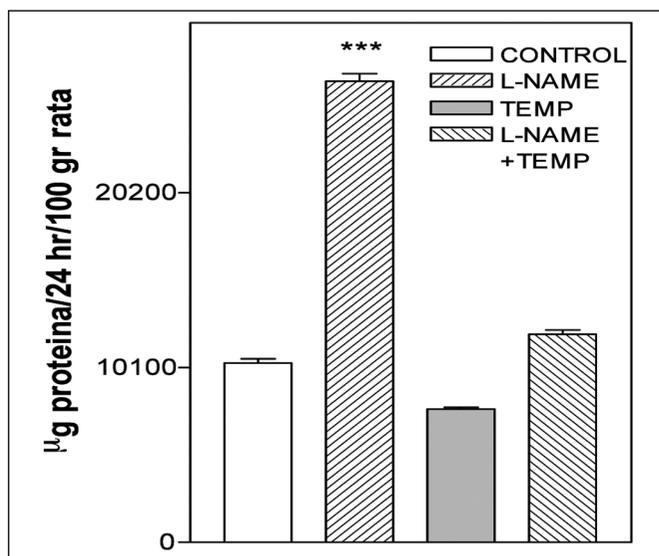
### Efectos histológicos

La observación al microscopio de luz (Figura 3) muestra que el riñón de la rata preñada sin tratamiento presenta tumefacción turbia y edema glomerular (CONTROL); mientras que en el riñón proveniente de las ratas preñadas y tratadas con L-NAME presenta tumefacción turbia de epitelios tubulares, focos hemorrágicos y congestión de capilares glomerulares (L-NAME). Los riñones provenientes de animales tratados con tempol muestran tumefacción turbia de epitelios tubulares, edema glomerular (TEMPOL);

mientras que el tratamiento simultáneo con L-NAME + tempol muestra riñones con tumefacción turbia de epitelios tubulares, congestión de capilares glomerulares, pequeños focos hemorrágicos.



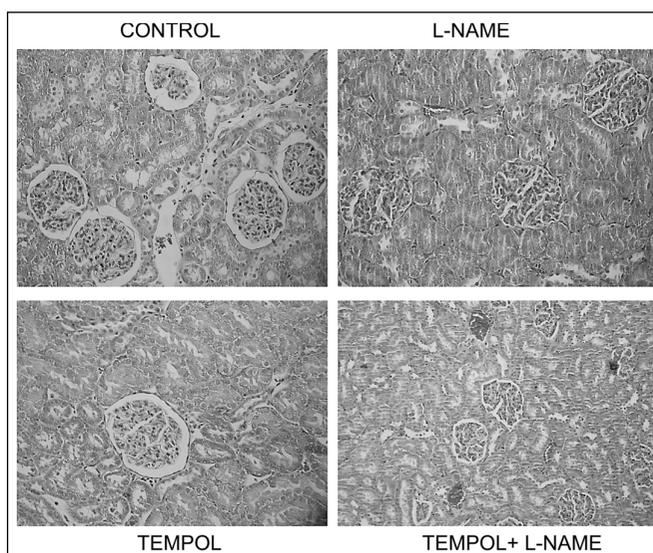
**Figura 1.** Curso temporal del efecto del tempol (20 mg/kg/día) durante 7 días, sobre el incremento de la presión arterial inducido por el L-NAME en ratas preñadas. N= 8 por grupo. \*p<0,01 comparado con ratas tratadas con tempol, \*\*p<0,001 comparado con ratas tratadas con L-NAME.



**Figura 2.** Efecto del tempol (20 mg/kg/día) durante 7 días, sobre la excreción urinaria de proteínas en ratas con preeclampsia inducida por el tratamiento con L-NAME. N = 8 animales por grupo. \*\*\*p<0,0001 comparado con ratas preñadas control.

*Efecto del tempol sobre la actividad de las enzimas antioxidantes renales en ratas con preeclampsia experimental inducida mediante el tratamiento con L-NAME.*

Como se observa en las figura 4, la actividad renal de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa (-54%), catalasa (-55%) y glutatión peroxidasa (-42%) se encuentran significativamente disminuidas en la corteza renal de las ratas con preeclampsia experimental inducida por el tratamiento con L-NAME. El tratamiento crónico con tempol previno la reducción de la actividad de las enzimas antioxidantes SOD y CAT inducida por el L-NAME en ratas preña-

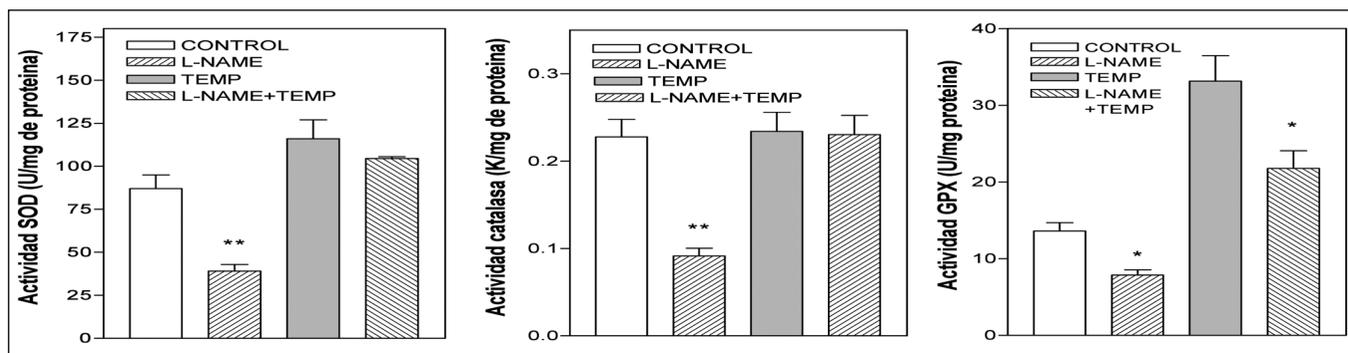


**Figura 3.** CONTROL: Riñón de ratas preñadas tratadas con vehículo: tumefacción turbia. Edema glomerular; L-NAME: Riñón de ratas tratadas con L-NAME: tumefacción turbia de epitelios tubulares, focos hemorrágicos, congestión de capilares glomerulares; TEMPOL: Riñón de ratas tratadas con tempol: tumefacción turbia de epitelios tubulares, edema glomerular; TEMPOL+ L-NAME: Riñón de ratas preñadas tratadas con Tempol+L-NAME: tumefacción turbia de epitelios tubulares, congestión de capilares glomerulares, pequeños focos hemorrágicos. Tinción con eosina y hematoxilina.

das, pero afectó solo parcialmente la reducción de la GPx (-33%).

## Discusión

Los resultados del presente trabajo están en concordancia con las evidencias acerca de un modelo experimental de preeclampsia que resulta de la inhibición crónica de la síntesis de ON mediante la administración de L-NAME a ratas preñadas y ratifican el papel primordial del ON y su desregulación en la preeclampsia humana (Molnar y Hertelendy, 1992). Efectivamente, la preeclampsia es un desorden hipertensivo que ocurre principalmente por una mala adaptación placentaria, que involucra disfunción endotelial, la cual afecta consistentemente al riñón (Shah, 2005). Nuestros hallazgos apoyan este concepto ya que la PE inducida por la inhibición de la síntesis de óxido nítrico (Camacho y col., 2011), estuvo asociada a disfunción endotelial en el riñón que se manifestó por proteinuria, así como evidencias morfológicas de endoteliosis glomerular (Munkhaugen y Egil, 2009). Así, se observó una lesión renal precisa, identificable mediante microscopía de luz, caracterizada por tumefacción turbia de las células endoteliales tubulares, focos hemorrágicos y congestión de capilares glomerulares,



**Figura 4. Efecto del tempol (20 mg/kg/día) durante 7 días, sobre la actividad de las enzimas antioxidantes renales: superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa (N=8 por grupo), en ratas con preeclampsia inducida por el tratamiento con L-NAME. \*p<0,01 y \*\*p<0,001 comparado con ratas preñadas control; #p<0,01 comparado con TEMP.**

**Tabla I**

|                         | CONTROL     | L-NAME      | TEMPOL       | L-NAME + TEMPOL |
|-------------------------|-------------|-------------|--------------|-----------------|
| Número de fetos         | 10,11 ± 0,5 | 9,0 ± 0,5   | 10,01 ± 1,02 | 11,1 ± 0,9      |
| Pesos /no. de fetos (g) | 3,24 ± 0,2  | 1,95 ± 0,1* | 3,8 ± 0,3    | 2,13 ± 0,1      |
| Necrosis                | 0           | 1,5 ± 0,1 * | 0            | 0,33 ± 0,02     |

\*p<0,01 comparado con control. N= 28-40 por grupo.

posibles responsables de las alteraciones de la función renal. Al respecto, se ha demostrado que mientras que en el embarazo normal, aumenta la tasa de filtración glomerular (TFG), por un aumento del flujo plasmático renal (FPR), las alteraciones funcionales a nivel renal en la mujer preecláptica incluyen disminución del flujo plasmático renal (FPR) y la tasa de filtración glomerular (TFG), como también proteinuria que puede estar en rango nefrótico (Moran y col., 2003).

Otro hallazgo significativo en este estudio fue la observación de los signos clásicos de la preeclampsia en ratas, como lo es el retardo en el crecimiento intrauterino e incremento de la resorción fetal; signos que probablemente son debidos a la vasoconstricción y a la isquemia de la unidad feto-placentaria descrita en la preeclampsia.

Ahora bien, el estrés oxidativo es un desbalance entre las fuerzas pro-oxidantes y anti-oxidantes y se ha demostrado que en los embarazos con preeclampsia ocurre una disminución significativa de la protección antioxidante. Muchas son las causas que parecen estar involucradas en el incremento del estrés oxidativo en la preeclampsia. Se ha postulado que el incremento del estrés oxidativo y la producción de anión superóxido en la preeclampsia (Biri y col., 2007) se asocia a una temprana placentación anormal con isquemia placentaria e hipoxia (Gilbert y col., 2007); a la pre-

sencia de anticuerpos anti-receptores AT<sub>1</sub> de angiotensina II (Xia y col., 2003), a alteraciones en el metabolismo de carbohidratos asociado a la resistencia a la insulina con sobrepeso y obesidad (Joffe y col., 1998) y a la presencia de infecciones subclínicas en la vagina, sistema urinario y enfermedad periodontal (Herrera y col., 2007). Todas estas alteraciones conducen a una reacción inflamatoria intravascular generalizada y un estado de estrés oxidativo que produce disfunción endotelial que predispone a la mujer embarazada a desarrollar preeclampsia (Herrera y col., 2001). En estudios de placentas de mujeres con preeclampsia comparadas con placentas normales, se ha demostrado en las primeras un aumento de la peroxidación de lípidos mitocondriales y de la generación de aniones superóxidos, lo que podría contribuir y ser una fuente importante de estrés oxidativo en la placenta (Wang y Walsh, 1998). Debido a este desbalance oxidativo de origen placentario, se ha postulado que la hipoperfusión sanguínea mediada por la angiotensina II, la vasoconstricción sistémica y el estrés oxidativo placentario, son factores responsables de la disfunción endotelial vascular renal, y que contribuye con el desarrollo de la preeclampsia (Shah, 2005).

Uno de los factores que podrían influir en daño renal en la preeclampsia, es el estrés oxidativo local que resultaría, entre otras causas, por la disminución de la actividad de las enzimas antioxidantes renales. Nuestros resultados apuntan a esa posibilidad ya que la inhibición de la síntesis de ON que se demuestra por la reducción de la actividad de la sintasa de óxido nítrico renal (Camacho y col., 2011), genera un modelo de PE experimental con endoteliosis glomerular que está asociado a la disminución significativa de tres de las enzimas antioxidantes renales: la catalasa, la superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa. La disminución de la actividad de las enzimas antioxidantes, las cuales son mecanismos enzimáticos que defienden en situaciones de estrés oxidativo, sugiere

que la desregulación de la funcionalidad renal está asociada a una baja protección oxidativa que condiciona a la insuficiencia renal (Balal y col., 2003).

El organismo normalmente contiene mecanismos enzimáticos antioxidantes que limita este proceso. Sin embargo, en ciertas circunstancias estos mecanismos regulatorios no pueden controlar el balance redox intracelular, generando elevadas concentraciones de peróxidos lipídicos (Buhimschi y col., 1998) y del anión superóxido, el cual es capaz de unirse al ON y formar peroxinitrito, este último al unirse a proteínas es altamente citotóxico; además, los niveles elevados de peroxinitrito reducen la biodisponibilidad de ON con todos los efectos perjudiciales que a nivel vascular y renal esto implica.

Se ha sugerido que el incremento temprano del estrés oxidativo placentario, que cursa antes del inicio de los síntomas maternos, juega un papel fundamental en la disfunción endotelial generalizada y el daño renal, por lo que el tratamiento temprano con antioxidantes podría interrumpir el proceso de la enfermedad. Nuestros resultados apoyan esta posibilidad ya que demuestran que el tratamiento crónico con un compuesto que mimetiza a la SOD, el tempol, fue capaz de reducir significativamente la hipertensión y bloquear completamente la proteinuria. Así mismo el tempol fue capaz de revertir la disminución de la actividad de dos de las enzimas antioxidantes y los daños a nivel renal. Todo ello sugiere un papel determinante del estrés oxidativo en las manifestaciones disfuncionales en este modelo experimental de preeclampsia. En apoyo a nuestros hallazgos se encuentran los descritos por Hoffmann y col. (2008), quienes demostraron que el tempol es capaz de prevenir la hipertensión, la proteinuria y la función feto-placentaria en un modelo de preeclampsia en ratón, el BPH/5, el cual desarrolla de forma espontánea las características clínicas de la preeclampsia humana.

En conclusión, en la preeclampsia experimental inducida por la inhibición crónica de la SON, la disfunción renal se asocia a una disminución de los mecanismos antioxidantes renales, lo que conduce a un incremento del estrés oxidativo. La producción de especies reactivas de oxígeno parece ejercer un efecto causal importante en la disfunción endotelial generalizada y del daño renal, y por ello el uso de terapéutico de los antioxidantes como tratamiento de la preeclampsia parece ser prometedor.

## Agradecimientos

Los autores agradecen al Sr. Banny Caraballo por su ayuda técnica en los experimentos y al Departamento de Patología del Instituto de Higiene «Rafael

Rangel» por los estudios histológicos. Este trabajo fue subvencionado por el Ministerio Popular de Ciencia Tecnología e Industrias, Proyecto Misión Ciencia, Subproyecto 7, ECCV No. 2007001585.

## Referencias bibliográficas

- Aebi H. 1984. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 105:121-126.
- Balal M, Karayaylah I, Paydaç S, Seyrek N, Canacankatan N, Kayrin L. 2003. Oxidative anti-oxidative system In peripartum acute renal failure and preeclampsia –eclampsia. *Journal of the Turkish Society of Sefprology* 12 (3): 141-147.
- Banks RE, Forbes MA, Searles J, Pappin D, Canas B, Rahman D, Kaufmann S, Walters CE, Jackson A, Eves P, Linton G, Keen J, Walker JJ, Selby PJ. 1998. Evidence for the existence of a novel pregnancy-associated soluble variant of the vascular endothelial growth factor receptor, Flt-1 *Mol Hum Reprod* 4(4):377-86.
- Biri A, Bozkurt N, Gunaydina G, Korucuoglu U, Durakb IM, Kavutcu C. 2007. Antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in preeclampsia. *Intern J Gynecol Obst* 96: 196-207.
- Bredt DS, Snyder SH. 1990. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. 87:682-685.
- Buhimschi IA, Saade GR, Chwalisz K, Garfield RE. 1998. The nitric oxide pathway in pre-eclampsia: pathophysiological implications *Human Reproduction Update*. European Society for Human Reproduction and Embryology 4:25-42.
- Camacho E, Silva JA, Matos MG, Garrido MR, Israel A. 2011. Actividad de las enzimas antioxidantes en el riñón de la rata con preeclampsia experimental. *Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica* 30:44-50.
- Clambers JC, Fusi L, Malik IS, Haskard DO, De Swiet M, Kooner JS. 2001. Association of Maternal Endothelial Dysfunction with Preeclampsia. *JAMA* 285(12): 1607-1612.
- Dekker GA, Sibai BM. 1998. Etiology and pathogenesis of preeclampsia: Current concepts. *Am J Obstet Gynecol* 179: 1359-75.
- Demougeot C, Prigent-Tessier A, Marie C, Berthelot A. 2005. Arginase inhibition reduces endothelial dysfunction and blood pressure rising in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 23:971-978.
- Flohé L, Günzler WA. 1984. Assays of glutathione peroxidase. 105:114-21.
- Gilbert JS, Ryan MJ, LaMarca BB, Sedeek M, Sydney R, Murphy, Joey P Granger. 2008. Pathophysiology of hypertension during preeclampsia: linking placental ischemia with endothelial dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 294: H541-H550.
- Herrera JAG, Chaudhuri G, López-Jaramillo P. 2001. Is infection a major risk for preeclampsia? *Med. Hypotheses* 57:393-397.

- Herrera JA, Parra B, Herrera E, Botero JE, Arce RM, Contreras A, López-Jaramillo P. 2007. Periondental disease severity related to high levels C-reactive protein in preeclampsia. *J Hypertens* 25:1459-1464.
- Hoffmann DS, Weydert Ch J, Lazartigues E, Kutschke WJ, Kienzle MF, Leach JE, Sharma JA, Sharma EV, Davison RL. 2008. Chronic tampol prevents hypertension, proteinuria, and poor feto-placental outcomes in BPH/5 mouse model of preeclampsia. *Hypertension* 51: 1058-1065.
- Joffe GM, Esterlitz J, Levine R, Clemens J, Ewell M, Sibai B, Catalano P. 1998. The relationship between abnormal glucose tolerance and hypertensive disorders of pregnancy in healthy nulliparous women. Calcium for Preeclampsia Prevention. (CPEP) Study Group. *Am J Obstet Gynecol* 179: 1032-1037.
- López-Jaramillo P, Arenas WD, García R, Rincón MY, López M. 2008. The role of the L-arginine-nitric oxide pathway in preeclampsia. *Therapeutic Advances in Cardiovascular Disease* 2: 1-10.
- Lowry OH, Rosbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1996. *J. Biol Chem* 1951; 193:265.
- Lyall F, Greer A. The vascular endothelium in normal pregnancy and pre-eclampsia. *Reviews of Reproduction* 1:107-116.
- Molnar M, Hertelendy F. 1992. N<sup>o</sup>-Nitro-L-arginine, an inhibitor of nitric oxide synthesis, increases blood pressure in rats and reverses the pregnancy-induced refractoriness to vasopressor agents. *Am J Obstet Gynecol* 166:1560-1567.
- Moran P, Baylis PH, Lindheimer MD, Davison JM. 2003. Glomerular ultrafiltration in normal and preeclamptic pregnancy. *14(3):648-52.*
- Munkhaugen J, Egil BV. 2009. News aspects of preeclampsia: lessons for the nephrologist. *Nephrol Dial Transplant* 1-3.
- NIH Guide for the care and use of laboratory animals. NIH Guide 1996; 25: 1-111.
- Oberley L, Spitz D. 1984. Assay of superoxide dismutase activity in tumor tissue. *Meth Enzymol* 105:457-464.
- Pacheco Romero J. 2003. Disfunción endotelial en la preeclampsia. *Anales de la Facultad de Medicina. Universidad Nacional Mayor de San Marcos.* 64: 43-54.
- Pandhi P, Saha L, Malhotra S. 2001. Prolonged blockade of nitric oxide synthesis in pregnant rats as a model of pre-eclampsia. *Indian J Pharmacol* 133: 92-95.
- Pesce M, Strande D. 1973. A New micromethod for determination of protein in cerebrospinal fluid and urine. *Clin Chem* 19:1265-1267.
- Roberts JM, Cooper DW. 2001. Pathogenesis and genetics of preeclampsia. *Lancet* 357: 53-56.
- Seligman SP, Buyon, JP, Clancy RM, Young BK, Abramson SB. 1994. The role of nitric oxide in the pathogenesis of preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 171:944-948.
- Shah DM. 2005. Role of the renin-angiotensin system in the pathogenesis of preeclampsia. *Am J Physiol Renal Physiol* 288: F614-F625.
- Slaghekkee F, Dekker G, Jeffries B. 2006. Endogenous inhibitors of nitric oxide and preeclampsia: a review. *J Matern Fetal Neonatal Med* 19: 447-452.
- Silver RK, Kupfermanc MJ, Russell TL, Adler L, Mullen TA, Caplan MS. 1996. Evaluation of nitric oxide as a mediator of severe preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 175: 1013-1017.
- Tsatsaris V, Goffin F, Munaut C, Brichant JF, Pignon MR, Noel A, Schaaps JP, Cabrol D, Frankenne F, Foidart JM. 2003. *J Clin Endocrinol Metab* 88(11):5555-5563.
- Wang Y, Walsh SW. 1998. Placental mitochondria as a source of oxidative stress in pre-eclampsia. *Placenta* 19: 581-586.
- Xia Y, Hong H, Sol B, Day M-C, Rodney KE. 2003. Maternal autoantibodies from preeclamptic patients activate angiotensin receptors on human trophoblast cells. *J Soc Gynecol Inv* 10: 82-93.

# Estudio de Acoplamiento Molecular (Docking) de una serie de derivados sintéticos del 5-nitrofurano en el sitio de unión de la Tripanotión Reductasa del *Trypanosoma cruzi*

## Computational docking study of a serial of synthetic 5-Nitrofurans derivatives in the binding site of the enzyme Trypanothion reductase from *Trypanosoma cruzi*

MELINA MONASTERIOS\*, ÁNGEL AMESTY Y MILAGROS AVENDAÑO

### Resumen

Se describe un estudio teórico de acoplamiento molecular (docking) realizado en una serie de derivados benzotiazolil-5-nitrofuranos, en el sitio de unión de la enzima Tripanotión Reductasa del *Trypanosoma cruzi* (agente causal de la enfermedad de Chagas). La estructura cristalina de la enzima fue obtenida de la base de datos Protein Data Bank y se utilizó el software Arguslab version 4.0.1 para el estudio. Los resultados obtenidos muestran que los derivados sintéticos acoplados tienen una alta probabilidad de ser inhibidores suicidas de la enzima tripanotión reductasa debido a que presentan una mayor afinidad de unión con respecto al Nifurtimox, compuesto empleado como referencia. Esta mayor afinidad relativa se encuentra asociada a una energía libre de unión ( $\Delta G$ ) más negativa.

**Palabras clave:** Posicionamiento molecular, derivados del 5-nitrofurano, compuestos antichagásicos.

### Abstract

The present investigation describes a computational docking study developed with a serial of benzothiazolyl-5-Nitrofurans derivatives, in the binding site of the enzyme Trypanothion reductase from *Trypanosoma cruzi* (causal agent of Chagas' disease). The crystal structure of the enzyme was downloaded from the database of the Protein Data Bank and the software used for the docking study was Arguslab version 4.0.1. Our results show that the docked synthetic derivatives have a high probability of behaving as suicidal inhibitors of trypanothion reductase because they display a higher affinity that the reference compound, Nifurtimox. This higher relative affinity is in turn associated to a more negative binding free energy ( $\Delta G$ ).

**Key words:** Docking, 5-nitrofurans derivatives, anti-trypanosomal compounds.

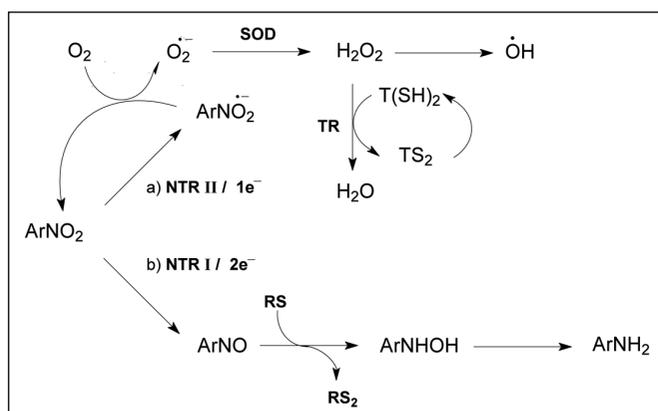
### Introducción

Los protozoarios parásitos de la familia Trypanosomatidae son agentes causantes de muchas enfermedades tropicales importantes, incluyendo la leishmaniasis, la tripanosomiasis africana y la enfermedad de Chagas (Baell y col., 2009), ahora llamadas enfermedades tropicales desatendidas (NTD por sus siglas en inglés, neglected tropical diseases) (Bolognesi y col., 2009). La enfermedad de Chagas o tripanoso-

miasis americana es un importante problema de salud que afecta a unas 20 millones de personas en Centro y Sur América, alrededor de 2 a 3 millones de individuos desarrollan los síntomas típicos de esta enfermedad. Su agente causal es el protozoario hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), el cual es transmitido a humanos y otros mamíferos por insectos vinchucas tales como el *Rhodnius prolixus* y el *Triatomma infestans* (Cerecetto y col., 2006).

\* Unidad de Química Medicinal. Facultad de Farmacia. Universidad Central de Venezuela. Apdo. 40109 Caracas 1040-A. Venezuela. Telf.: (58)212.6052757. Fax.: (58)212.6052757. E-mail: melinalf@yahoo.es

El tratamiento vigente para esta enfermedad se basa en fármacos de viaja data (Nifurtimox (Nfx), Benznidazol) que a pesar de ser capaces de eliminar la parasitemia y reducir los títulos serológicos, no garantizan la curación completa y están asociados con severos efectos tóxicos (Gambino y col., 2008). El modo de acción de ambos fármacos contra este parásito está asociado con la biorreducción del grupo nitro. Este proceso se inicia con la reducción del grupo nitro a radical-anión nitro, en una reacción catalizada por nitroreductasas. En el caso del Nfx sufre un ciclo redox, con el oxígeno molecular, el cual produce anión superóxido y seguidamente peróxido de hidrógeno, mediante una reacción catalizada por la enzima superóxido dismutasa (SOD) (figura 1) (Tarlovsky y col., 2006). Estas especies, en presencia de hierro, forman radicales hidroxilos fuertemente oxidantes vía reacción de Haber-Weiss. La producción incrementada de estas especies reactivas de oxígeno (ROS) eventualmente conduce al parásito a estrés oxidativo (Denicola y col., 2010).



**Figura 1. Biorreducción de los fármacos nitroaromáticos.** a) Reducción de un electrón por la nitroreductasa tipo II (NTR II) promoviendo el ciclo redox con formación de superóxido/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y regenerando el fármaco, la producción de esta ROS oxidan los tioles de los parásitos. b) Reducción de dos electrones por la nitroreductasa tipo I (NTR I) formando los nitroso compuestos, que es un buen recolector de tioles.

Estos fármacos son inefectivos, imprácticos y severamente tóxicos, he aquí la necesidad precisa de encontrar nuevos compuestos que sean capaces de inhibir selectivamente un blanco que se encuentre solamente en estos organismos, como es el caso de la enzima Tripanotión reductasa (TR) del *T. cruzi* (Cecchetto y col., 2004). La TR es una óxido-reductasa NADPH-dependiente que ayuda al parásito a protegerse del estrés oxidativo mediante el mantenimiento de un medio ambiente intracelular reducido. Realiza esto mediante la reducción del tripanotión (T(S)<sub>2</sub>): Conjugado N<sup>1</sup>, N<sup>5</sup>-bisglutacionil espermidina a dihidrotriptanotión (T(SH)<sub>2</sub>) (Tapia y col., 2002). El T(SH)<sub>2</sub>

juega un papel importante en la inactivación del daño potencial de radicales y especies reactivas de oxígeno, y es re-oxidado a T(S)<sub>2</sub> en este proceso (Hamilton y col., 2003). Los 5-nitrofuranos inhiben la reducción del T(S)<sub>2</sub> por la TR, reduciéndose ellos mismos en el ciclo redox en presencia de oxígeno para formar las ROS como superóxido y peróxido de hidrógeno; dado que el T(S)<sub>2</sub> es un captador de radicales libres, al bajar sus niveles, las células del parásito se vuelven hipersensibles al daño oxidante (Chauviere y col., 2003; Fairlamb, 1990). La utilización de la enzima en estos derivados del nitrofurano constituye una subversión de su papel normal antioxidante, por tal motivo estos compuestos fueron denominados substratos «subversivos» para la TR (Docampo, 1990).

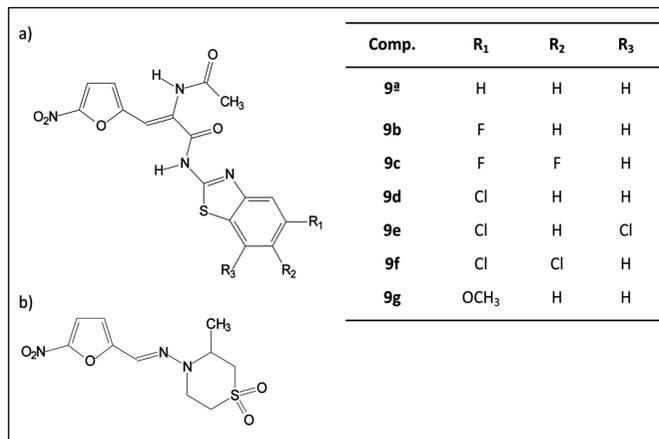
Una metodología empleada para hallar compuestos que inhiban esta enzima es mediante la realización de un estudio de acoplamiento molecular o Docking. El Docking es un método computacional que tiene como objetivo principal identificar las posiciones correctas (poses) de los ligandos en el sitio de unión (binding site) para así predecir la afinidad entre el ligando y la proteína. En otras palabras, describe un proceso mediante el cual una molécula interacciona con otra para formar un complejo estable en un espacio tridimensional (Krovat y col., 2005). Con base a lo anteriormente expuesto y a los resultados obtenidos en investigaciones previamente reportadas, se planteó la realización de un estudio teórico de Docking en una serie de derivados sintéticos del 5-nitrofurano en el sitio activo de la enzima TR del *T. cruzi*, con miras a determinar sus afinidades y modos de unión y con base a los resultados obtenidos, la realización de pruebas biológicas.

## Sección experimental

### LIGANDOS Y ENZIMA

En este estudio se utilizaron como ligandos una serie de siete derivados del 5-nitrofurano desarrollados por nuestro grupo de investigación para los cuales se reportó su síntesis (Monasterios y col., 2003; Charris y col., 2002), los cálculos computacionales donde se determinó que cumplen con unos requisitos estéricos para que este tipo de compuestos presenten actividad antichagásica (Monasterios y col., 1998), requisitos estéricos, electrostáticos y electrónicos para que presenten actividad antibacteriana (Monasterios y col., 2006; Monasterios y col., 2005) y la evaluación preliminar de su posible toxicidad (Amaro y col., 2009). Se escogió conjuntamente el Nfx como compuesto activo de referencia (figura 2). La enzima utilizada fue la Tripanotión reductasa (TR) del *T. cruzi*. La estructura cristalina del dímero de la

mencionada enzima bajo su forma oxidada se extrae de la base de datos Protein Data Bank, en un complejo con su sustrato natural Tripanotión (T) y con el cofactor dinucleotido adenina-flavina (FAD), que se encuentra registrada bajo la entrada 1BZL (figura 3) (Hunter y col., 1999).



**Figura 2. Ligandos utilizados en el estudio: a) Derivados sintéticos. b) Nifurtimox.**



**Figura 3. Enzima TR del *T. cruzi* en complejo con el T y el FAD (1BZL). Definición del sitio de unión de los ligandos (Binding site).**

## CÁLCULOS

El primer paso en este estudio teórico consistió en la construcción de los modelos moleculares de todos los derivados del 5-nitrofurano. Se realizaron dos optimizaciones geométricas para cada estructura, primero usando los algoritmos *Conjugate Gradient* y *Block-Diagonal Newton Raphson*, del campo de fuerza MM3 (Allinger, 1989) mediante el software de la compañía CAChE (CaChe, 2003), y después empleando el método químico-cuántico semiempírico, Método Paramétrico 3 (PM3) en vacío, utilizando el software libre ArgusLab 4.0.1 (Tompson, 2004). Las orientaciones y/o conformaciones obtenidas fueron

organizadas en orden creciente de sus valores de calor de formación para seleccionar las que iban a ser posicionadas. El Nfx también fue incluido en este esquema de trabajo.

## ACOPLAMIENTO MOLECULAR «DOCKING»

El Docking se realizó con el software libre ArgusLab 4.0.1; el cual emplea algoritmo genético para generar las conformaciones u orientaciones de los ligandos en el sitio de unión. La estructura cristalina de la enzima se refinó removiéndole todas las moléculas de agua presentes y posteriormente añadiéndole los átomos de hidrógenos faltantes como en la estructura PDB original. El sitio activo de la enzima se delimitó antes de hacer el docking y está contenido en una caja que tiene unas dimensiones de X = 24.686000 Å, Y = 20.117000 Å, Z = 21.750000 Å y una resolución de la cuadrícula (grid) de 0.4000 Å. La metodología empleada fue la semiflexible, es decir enzima rígida y ligandos flexibles. Los ligandos moleculares se posicionaron usando un esquema de puntuación (scoring), esto es, mediante el contacto y la energía de la cuadrícula, se realizó una minimización de la energía para cada orientación posicionada y se calculó una energía final de puntuación. Este proceso se realizó diez veces en cada caso y se calcularon los valores promedios (Young, 2009). El análisis de los resultados, para cada ligando, fue realizado considerando las orientaciones de menor energía y los valores de desviación de la raíz media cuadrática (RMSD) reportados por el programa. Para cada ligando se obtuvieron agrupaciones de conformaciones (clusters) a fin de identificar las diferentes maneras de unión. Las orientaciones fueron asignadas a las diferentes agrupaciones cuando los valores de RMSD fueron menores que 3,0 Å. También se midieron los contactos moleculares entre las orientaciones de los ligandos y los residuos del sitio activo hasta un radio de 5,0 Å.

## Resultados y discusión

### AFINIDAD DE UNIÓN

La afinidad relativa de los ligandos en el sitio unión de su receptor es la principal información que proporciona un docking. El sitio de unión de la TR está constituido por dos cadenas: la cadena A formada por 12 residuos de aminoácidos y la cadena B formada por 9 residuos de aminoácidos (Tabla I). Las energías libres de unión para los complejos de los derivados sintéticos del 5-nitrofurano y el Nfx con el sitio de unión de la TR se reportan en la Tabla II. En estos datos correspondientes a las orientaciones de menor energía (mejor puntuación) de cada ligando

se puede evidenciar que las energías resultantes para todos los derivados sintéticos fueron inferiores al valor de energía obtenida para el compuesto activo de referencia Nfx. Estos hallazgos indican que si esta unión es indispensable para la actividad antichagásica de los 5-nitrofuranos, los compuestos sintéticos deberían tener una gran probabilidad de ser activos.

**Tabla I**  
**Residuos de los aminoácidos presentes en el sitio activo de la TR**

| Cadena A |         | Cadena B |         |
|----------|---------|----------|---------|
| Cys 53   | Ser 110 | Glu 949  | Ser 947 |
| Glu 19   | Thr 335 | Glu 950  | Ser 953 |
| Ileu 107 | Trp 22  | His 944  | Thr 946 |
| Ileu 339 | Tyr 111 | Phe 879  |         |
| Leu 18   | Val 54  | Pro 881  |         |
| Ser 15   | Val 59  | Pro 945  |         |

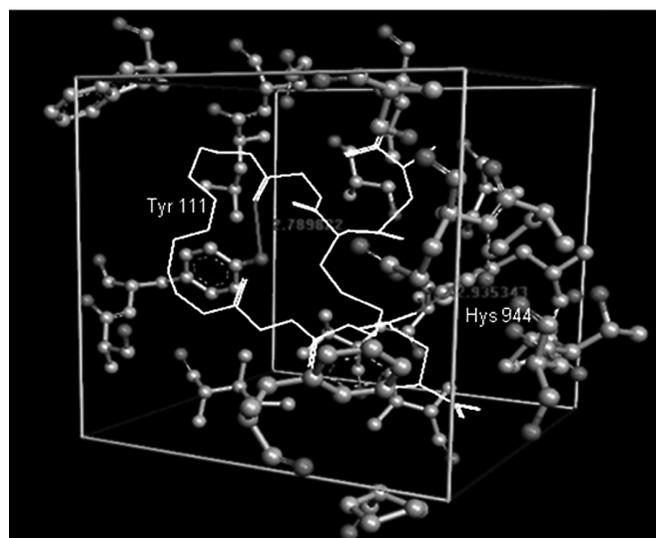
**Tabla II**  
**Energías libres de unión (DG) para las orientaciones de mínima energía de los nitrofuranos posicionados en el sitio activo de la TR**

| Ligando | E (kcal/mol) |
|---------|--------------|
| 9a      | -9.84329     |
| 9b      | -7.54972     |
| 9c      | -8.14886     |
| 9d      | -8.57123     |
| 9e      | -9.50419     |
| 9f      | -9.34536     |
| 9g      | -8.57272     |
| Nfx     | -7.22516     |

## Puentes de Hidrógenos

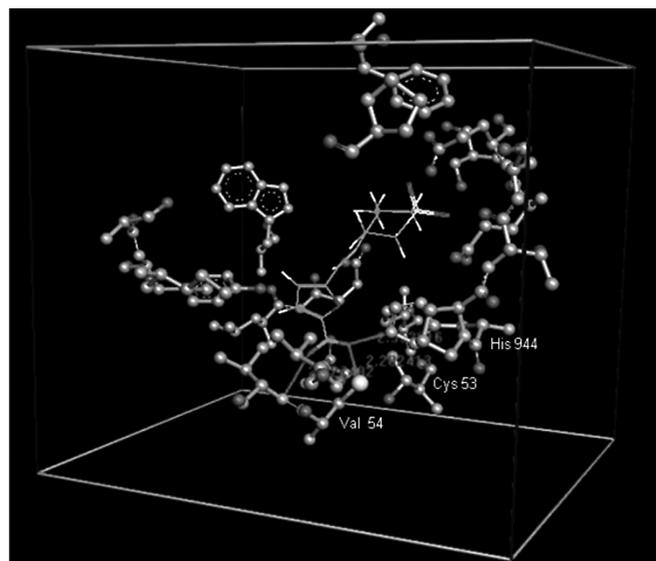
El análisis gráfico de los modos de unión de los derivados del 5-nitrofurano en el sitio activo de la TR mostró que la mayoría de estos ligandos fueron capaces de establecer varias interacciones de puente de hidrógeno, principalmente entre el grupo nitro y los residuos polares. El sustrato natural de la enzima T, efectúa sólo dos interacciones de puente de hidrógeno con la misma, que son entre dos de sus grupos carbonilos y el residuo histidina 944 (His 944) de una hoja-b de la cadena B y el residuo tirosina 111 (Tyr 111) de un codo de la enzima (Figura 4).

Para todos los compuestos tipo 5-nitrofurano, el número de interacciones de puente de hidrógeno que establecen con los residuos de aminoácidos presentes en el sitio de unión de la TR es mayor que las que realiza el T. En el caso del compuesto de referen-



**Figura 4.** Puentes de hidrógeno establecidos entre el T (cilindros color blanco) y el sitio catalítico de la TR, se observan los residuos involucrados en estos enlaces.

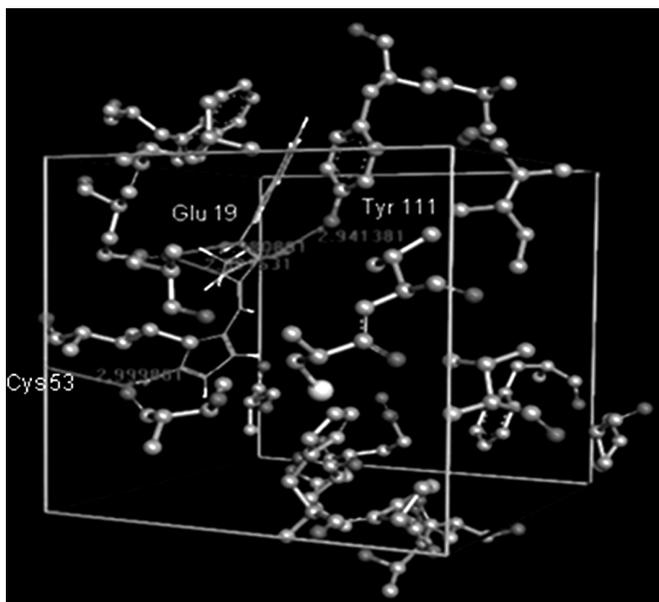
cia, Nfx, se realizan tres enlaces puente de hidrógeno, que se establecen entre los dos átomos de oxígeno del grupo nitro con tres de los residuos presentes en el sitio de unión de la enzima, que son: valina 54 (val 54) y cisteína 53 (cis 53) de una  $\alpha$ -hélice de la cadena A e histidina 944 (His 944) de una hoja-b de la cadena B (figura 5).



**Figura 5.** Puentes de Hidrógeno establecidos entre el NFX (cilindros color gris, amarillo y rojo) y el sitio catalítico de la TR, se observan los residuos involucrados en estos enlaces.

En lo referente al modo de unión de los derivados sintéticos, todos son energéticamente más estables y presentan más números de contactos en el sitio de unión de la enzima que el T. En el caso específico del derivado sintético **9a**, se observó el establecimiento de cuatro interacciones de puente de hidrógeno, las

cuales son: entre un oxígeno de grupo nitro y el residuo cis 53, entre el nitrógeno del grupo acetamido y los oxígenos del grupo carboxilato del ácido glutámico 19 (Glu 19) de una  $\alpha$ -hélice de la cadena A y otro entre el nitrógeno del grupo benzotiazolilamido con estos mismos oxígenos del grupo carboxilato del ácido Glu 19 y finalmente entre el carbonilo del grupo acetamido y el residuo Tyr 111, igual que lo hace el T con éste último residuo. Esto indica que los 5-nitrofuranos interactúan con el sitio de unión de la enzima de igual manera que lo hace su sustrato natural (figura 6), formando adicionalmente un complejo muy estable evidenciado en el bajo valor de energía libre de unión que ellos presentan.



**Figura 6.** Puentes de Hidrógeno establecidos entre el compuesto 9a (cilindros color gris, amarillo y rojo) y el sitio catalítico de la TR, se observan los residuos involucrados en estos enlaces.

## Conclusiones

De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente estudio de Docking se puede concluir lo siguiente:

1. Los derivados sintéticos benzotiazolilsustituido-5-nitrofurano muestran una alta afinidad por la enzima TR y su modo de unión con esta enzima es similar a la de su sustrato natural el T.
2. Los compuestos estudiados benzotiazolil-5-nitrofuranos al ser tan afines por la enzima TR y formar complejos con ella altamente estables, tienen muchas probabilidades de presentar una marcada actividad antichagásica, que podría ser atribuida además de la bio-reducción del grupo nitro a un posible comportamiento como sustratos «subversivos».

3. Este estudio teórico de Docking podrá ser validado cuando se realice la evaluación de la posible actividad antichagásica *in vitro* de estos derivados sintéticos.

## Agradecimientos

Al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad Central de Venezuela, Proyecto PG 06-00-5645-2004.

## Referencias Bibliográficas

- Aguirre G, Boiani M, Cabrera E, Cerecetto H, Di Maio R, González M, Denicola A, Sant'anna CM, Barreiro. 2006. New potent 5-nitrofuryl derivative as inhibitor *Trypanosoma cruzi* growth. 3D-QSAR (CoMFA) studies. *Eur J Med Chem* 41: 457-466.
- Aguirre G, Boiani L, Cerecetto H, Fernández M, González M, Denicola A, Otero L, Gambino D, Rigol C, Olea-Azar C, Fernández M. 2004. In vitro activity and mechanism of action against the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi* of 5-nitrofuryl containing thiosemicarbazones. *Bioorg Med Chem Lett* 12: 4885-4893.
- Allinger NL, Yuh YH, Lii HJ. 1989. Molecular mechanics. The MM3 force field for hydrocarbons. *J Am Chem Soc* 111: 8551-8556.
- Amaro MI, Monasterios M, Avendaño M, Charris J. 2009. Preliminary evaluation of the toxicity of some synthetic furan derivatives in two cell lines and *Artemia salina*. *J App Toxicol* 29: 36-41.
- Bioani M, Piacenza L, Hernández P, Bioani L, Cerecetto H, González M, Denicola A. 2010. Mode of action of Nifurtimox and N-oxide-containing heterocycles against *Trypanosoma cruzi*: is oxidative stress involved? *Biochem Pharmacol* 79:1736-1745.
- Bond CS, Zhang Y, Berriman M, Cunningham ML, Fairlamb AH, Hunter WN. 1999. Crystal structure of *Trypanosoma cruzi* trypanothione reductase in complex with trypanothione, and the structure-based discovery of new natural products inhibitors. *Structure* 7: 81-89.
- CAChe reference. version 6.0. 2003. Fujitsu Limited CAChe.
- Cavalli A, Lizzi F, Bongarzone S, Brun R, Krauth-Siegel RL, Bolognesi ML. 2009. Privileged structure-guided synthesis of quinazoline derivatives as inhibitors of trypanothione reductase. *Bioorgan Med Chem* 19: 3031-3035.
- Charris J, Monasterios M, Domínguez J, Infante W, Castro N. 2002. Synthesis of some 5-Nitro-2-furfurylidene derivatives and their antibacterial and antifungal activities. *Heterocycl Commun* 8: 275-280.
- Docampo R. 1990. Sensitivity of parasites to free radical damage by antiparasitic drugs. *Chem-Biol Interact* 73: 1-27.
- Fairlamb AH. 1990. Novel approaches to the chemotherapy of trypanosomiasis. *TransRoy Soc Trop Med Hyg* 84: 613-617.

- Hamilton CJ, Saravanamuthu A, Eggleston IM, Fairlamb AH. 2003. Ellman's-reagent-mediated regeneration of trypanothione in situ: substrate-economical microplate and time-dependent inhibition assays for trypanothione reductase. *Biochem J* 369: 529-537.
- Hernández SM, Sánchez MS, Schwarch de Tarlovsky MN. 2006. Polyamines as a defense mechanism against lipoperoxidation in *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop* 98: 94-102.
- Holloway GA, Charman WN, Fairlamb AH, Brun R, Kaise M, Kostewicz E, Novello PM, Parisot JP, Richardson J, Street, IP, Watson KG, Baell JB. 2009. Trypanothione reductase high-throughput screening campaign identifies novel classes of inhibitors with antiparasitic activity. *Antimicrob Agents Chemother* 53: 2824-2833.
- Krovat EM, Steindl T, Langer T. 2005. Recent advances in Docking and scoring. *Curr. Comput. Aided Drug Des* 1: 93-102.
- Maya JD, Bollo S, Núñez-Vergara LJ, Squella JA, Repetto Y, Morillo A, Perie J, Chauviere G. 2003. *Trypanosoma cruzi*: effect and mode of action of nitroimidazole and nitrofurans derivatives. *Biochem Pharmacol* 65:999-1006.
- Monasterios M, Avendaño M, Amaro MI, Infante W, Charris J. 2006. Relation between electrostatic molecular potential, several electronic properties and antibacterial activity of some synthetic furane derivatives. *J Mol Struc* 798: 102-108.
- Monasterios M, Capobianco M, Cordero MI. 1998. Conformational analysis of Nifurtimox and derivatives applied to the rational design of trypanocide drugs. *An Quim-Int Ed* 94: 345-348.
- Monasterios M, Charris J, Infante W, De Castro N. 2003. Avance en la síntesis de Derivados del 5-nitrofurano con posible actividad antibacteriana. *Revista de la Facultad de Farmacia*. 66: 27-32.
- Monasterios M, Escorche M, Avendaño M. 2005. Conformational analysis, electronic properties and molecular electrostatic potential of nitrofurans derivatives with antibacterial activity. *J Mol Struc* 748: 49-55.
- Otero L, Maya JD, Morello A, Rigol C, Barriga G, Rodríguez J, Folch C, Norambuena E, González M, Olea Azar C, Cerecetto H, Gambino D. 2008. Insight into the bioreductive mode of action of antitrypanosomal nitrofuril containing thiosemicarbazones. *Med Chem* 4: 11-17.
- Paulino M, Iribarne F, Hansz M, Vega M, Seoane G, Cerecetto H, Di Maio R, Caracelli I, Zukerman-Schpector J, Olea C, Stoppani AOM, Berriman M, Fairlamb A H, Tapia O. 2002. Computer assisted design of potentially active anti-trypanosomal compounds. *J Mol Struc-THEOCHEM* 584: 95-105.
- Thompson MA. 2004. ArgusLab 4.0. Planaria Software LLC, Seattle, WA.
- Young, DC. 2009. *Computational Drug Design. A guide for computational and Medicinal Chemistry*. USA. John Wiley & Sons inc. P. 141.

# Ensayos de quimiotaxis *in vitro* en *Leishmania sp.* Evaluación de la técnica de los capilares-dos cámaras en promastigotes

## Chemotaxis assays *in vitro* in *Leishmania sp.* Evaluation of the capillary-two chambers technique in promastigotes

EMILIA DÍAZ\*<sup>1</sup>, LÁSZLÓ KÖHIDAI<sup>2</sup>, ARTURO RÍOS<sup>1</sup>, ORIANA VANEGAS<sup>1</sup>, ALICIA PONTE-SUCRE<sup>1</sup>

### Resumen

La respuesta quimiotáctica es un fenómeno que ocurre a lo largo de todo el ciclo de vida de la *Leishmania braziliensis*, incluyendo la infección activa. El presente trabajo se revisan los métodos utilizados hasta el momento para evaluar quimiotaxis *in vitro* en *Leishmania sp.* Adicionalmente, se describe la adaptación del «ensayo de los capilares-dos cámaras» al estudio de los fenómenos de quimiotaxis en *Leishmania*. Para ello, se estandarizaron parámetros fundamentales como la densidad celular en la cámara externa, el tiempo de incubación, el rango de concentraciones de los agentes quimiotácticos y la osmolalidad de las soluciones empleadas. Para validar la metodología se usaron gradientes químicos de dos monosacáridos, la D-glucosa y la D-fructosa cuyas propiedades quimiotácticas han sido descritas para *Leishmania*. Los resultados sugieren que el «ensayo de los capilares, dos cámaras» constituye un método de detección confiable, cuantitativo, reproducible y sencillo de la quimiotaxis en *Leishmania*. Adicionalmente, confirman que las hexosas ensayadas, inducen una respuesta quimiotáctica positiva sobre los parásitos, proporcional al incremento de concentración de las mismas. Finalmente, demuestran que el tiempo de incubación y la osmolalidad de las soluciones empleadas determinan la capacidad migratoria de los parásitos. Esta optimización garantiza la reproducibilidad y la validez de este método como una técnica útil para la evaluación cuantitativa de la quimiotaxis en *Leishmania*.

**Palabras clave:** quimiotaxis, *Leishmania*, ensayo de los capilares-dos cámaras.

### Abstract

Chemotactic responses play a significant role, both during *Leishmania braziliensis* differentiation through its life cycle and during infection, a process that inoculates parasites into a mammalian host and results in the acquisition of the disease leishmaniasis. This paper reviews the methods described until now to assess chemotaxis *in vitro* in *Leishmania sp.* Further, the present study describes the adaptation of a modified «two-chamber capillary chemotaxis assay» as a technique useful for the quantitative evaluation of chemotaxis in *Leishmania*. In order to ensure reproducibility and validity of this method we standardized key parameters to assess the chemotactic response such as the cell density in the outer chamber, incubation time, the concentration range of chemotactic agents and the osmolality of the solutions. In addition, the effectiveness of this sensible and reproducible method for the evaluation of parasite migration was validated by the use of chemical gradients of the monosaccharide D-glucose and D-fructose, compounds with showed chemotactic properties in *Leishmania*. Results presented herein demonstrate that monosaccharide induce a positive chemotactic effect on parasites, depending on the concentration range. Interestingly, both the time course and the osmolality of the solution influence the migration capacity of the parasites. Our results suggest that this novel and improved methodology quantitatively evaluates the taxis of *Leishmania* towards/against gradients of different substances in a rapid and reliable way.

**Key words:** Chemotaxis, *Leishmania*, two-chamber capillary chemotaxis assay.

<sup>1</sup> Laboratorio de Fisiología Molecular, Instituto de Medicina Experimental, Escuela Luis Razetti, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela.

<sup>2</sup> Department of Genetics, Cell and Immunobiology Semmelweis University, Budapest, Hungary.

\* Correspondencia: Laboratorio de Fisiología Molecular, Instituto de Medicina Experimental, Escuela Luis Razetti, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela. Fax: +58 212 6053415. E-mail: emilid68@gmail.com

## Introducción

Existen células que lejos de ser estáticas son móviles. Ellas detectan la presencia de señales extracelulares y orientan sus movimientos en la dirección de gradientes de concentración de las moléculas tóxicas. Este proceso, llamado *quimiotaxis*, es fundamental en diversas funciones celulares tales como, el suministro de nutrientes en los procariotas, la formación de estructuras multicelulares en protozoos, el rastreo de las bacterias por los neutrófilos y la organización de los embriones en los metazoos (Van Haastert y Devreotes, 2004).

En teoría, una célula para orientar sus movimientos podría utilizar el aspecto espacial del gradiente del agente quimiotáctico, o alternativamente las señales temporales generadas cuando la célula se mueve en un gradiente estático. En el caso de los procariotas, debido a su tamaño (1-2  $\mu\text{m}$ ) sólo pueden usar el componente temporal de los estímulos. Ellos se mueven de acuerdo a lo que se denomina un «paseo aleatorio» con movimientos en todas las direcciones que son interrumpidos por caídas súbitas («tumbles»). Cuando se encuentran con un cambio en la concentración del agente quimiotáctico la frecuencia de los «tumbles» disminuye y el desplazamiento en una dirección se prolonga en el tiempo (Van Haastert y Devreotes, 2004; Wang, 2010).

Por su parte, las células eucariotas por ser grandes (10-20  $\mu\text{m}$  de diámetro), les permite procesar tanto temporal como espacialmente la información. Ellas detectan el gradiente del agente quimiotáctico y responden a cambios de concentraciones muy pequeñas entre sus polos (2 -10%), desplazándose hacia el mismo (Van Haastert y Devreotes, 2004; Devreotes y Janetopoulos, 2003). Además, expresan una variedad de receptores de membrana y vías de señalización intracelular que les permiten organizar su respuesta fisiológica; es decir, poseen toda la maquinaria celular necesaria para detectar y responder a gradientes químicos, entre otros (Van Haastert y Devreotes, 2004; Wang, 2010). En resumen, la naturaleza de las células móviles varía de acuerdo al tipo celular al que hacemos referencia. Así, los granulocitos, macrófagos y linfocitos *in vitro* tienen la habilidad de migrar hacia gradientes de concentración de varias sustancias. La naturaleza exacta de cómo los leucocitos reciben una señal y la traducen en movimiento direccional involucra varios eventos. La movilidad leucocitaria es de tres tipos: *aleatoria* (activa, esporádica, espontánea y no direccional), *quimioquinesis* (aumentada pero no vectorial, inducida por excitantes químicos y requiere receptores celulares) y *quimiotaxis* (aumentada y vectorial a lo largo de

gradientes de concentración de una sustancia química o quimiotaxina), que demanda un sistema de receptores y un mecanismo de orientación acoplado al de movilidad (Rojas-Dotor y col., 2009)

En animales y microorganismos que poseen un cilio o flagelo, la motilidad es proporcionada por este organelo, el cual es fundamental para la alimentación celular, desarrollo y la reproducción. Para algunos protistas, como es el caso de la *Leishmania*, uno de los estadios durante su ciclo de vida es una forma móvil flagelada; y el flagelo acoplado y su motilidad son integrales para la morfogénesis y la división celular. En los tripanosomátidos, se ha sugerido que la inhibición de la motilidad flagelar pudiera ser un nuevo blanco en el diseño de drogas para el tratamiento de las enfermedades causadas por estos parásitos (Ginger y col., 2008).

Debido a que los fenómenos que caracterizan la motilidad de células humanas como son la formación de pseudópodos, la polarización y el sensor direccional, no han sido descritos para los tripanosomátidos, los estudios recientes en estos protozoos se han enfocado en la estructura y composición del flagelo. El flagelo puede ser comparado con un órgano sensor crítico debido a su posición y orientación en la superficie celular. Posee un alto contenido en moléculas sensoras (receptores o efectores), las cuales son dinámicamente controladas por un proceso llamado transporte intraflagelar: movimiento bidireccional de partículas entre la membrana del flagelo y el axonema (Rotureau y col., 2009).

Los parásitos del género de la *Leishmania* causan una enfermedad con síntomas diversos que van desde las lesiones cutáneas autolimitantes, pasando por las mucocutáneas no cicatrizantes, hasta la leishmaniasis visceral que es letal si no es tratada. Aproximadamente 350 millones de personas de 88 países están en riesgo de contraer la enfermedad. Se estima que al menos 12 millones de personas están infectadas, y que cerca de 1-2 millones de nuevos casos ocurren cada año (OMS, 2010).

Los parásitos de la *Leishmania* transcurren a lo largo de su ciclo de vida por dos estadios con características morfológicas específicas; así como una morfología flagelar diferente. Los amastigotes que se alojan en el fagolisosoma de las células del sistema reticuloendotelial del hospedero y los promastigotes de vida extracelular. La *Leishmania* se comporta como parásito intracelular en macrófagos de vertebrados mamíferos y como parásito extracelular en el tubo digestivo del insecto vector y es el estadio que puede mantenerse en los cultivos *in vitro*. Cuando el insecto vector ingiere sangre de un mamífero, estos

regurgitan promastigotes en la piel del hospedador los cuales son reconocidos por los receptores de superficie en los macrófagos y células dendríticas para luego ser fagocitados. Durante el ciclo de vida de la *Leishmania*, el flagelo muestra cambios en su longitud, punto de inserción y posición; presumiblemente como una respuesta a señales ambientales (Rotureau y col., 2009). La superficie celular está cubierta de lipofosfoglicanos y receptores de membrana especializados que se distribuyen a lo largo del flagelo, el bolsillo flagelar y en toda la superficie de la célula. Algunos de los receptores están especializados para detectar cambios en los gradientes de moléculas fundamentales para su supervivencia (Handman y col., 2008). Presentan un kinetoplasto cercano al bolsillo flagelar (Molineux y Killick-Kendrick, 1987).

El flagelo, además de su función en la motilidad, juega un papel clave en la división celular y la adhesión del parásito al epitelio del insecto. Además, recientemente se ha demostrado que la motilidad es esencial para la supervivencia de la forma del parásito que se encuentra en el torrente sanguíneo del mamífero (Gadelha y col., 2007). Por lo tanto, la evidencia sugiere que la respuesta migratoria (quimiotáctica) es decisiva en todo el ciclo de vida de la *Leishmania*.

Ahora bien, se ha demostrado en la *Leishmania* que puede moverse hacia un gradiente de concentración en línea recta por pocos segundos (~ 10 seg) sin cambios bruscos de dirección. Generalmente antes de este cambio brusco realizan un movimiento denominado «tumbling» (volteretas), similares a los descritos en bacterias (Barros y col., 2006). El movimiento de estas células flageladas es libre, al azar y tiene dos componentes: el golpeteo del flagelo y el desplazamiento resultante de la traslación (Gadelha y col., 2007).

La comprensión de los fenómenos quimiotácticos es útil para ahondar en el conocimiento de la fisiología y el comportamiento de las células móviles, incluyendo la *Leishmania*. Por otra parte, la quimiotaxis es un requisito fundamental de la interacción exitosa entre la célula hospedera y el parásito (*Leishmania*), ya que numerosas señales químicas determinan el reconocimiento mutuo y las respuestas migratorias involucradas en el establecimiento de la infección (Pozzo y col., 2009).

En tal sentido, la evaluación de la quimiotaxis en la *Leishmania* ha evolucionado desde el primer ensayo descrito en 1983 por Bray (Tabla I), en el cual una suspensión de promastigotes es colocada dentro de una cámara de Wilkinson. Esta consiste de jeringas desechables de tuberculina (1 ml), cuyo fondo es-

tá recortado y cubierto con un filtro Millipore (poros 1.2 µm). Las cámaras se sumergen hasta el nivel de la suspensión de los promastigotes en la solución con el agente quimiotáctico y se incubaban por un período determinado. Posteriormente, los filtros son fijados en alcohol etílico, removidos y teñidos con hematoxilina de Harris. Finalmente, los promastigotes fijados al filtro son contados en un microscopio de luz (Bray, 1983). Debido a que el método de Bray (1983) presenta la desventaja que requiere de altas concentraciones del quimioatrayente, Oliveira y colaboradores (2000) desarrollaron un método en el cual se construye un gradiente discontinuo de la sustancia a analizar, en el que los diferentes tubos capilares contienen concentraciones crecientes del agente quimiotáctico, utilizando agarosa como soporte. Seguidamente los tubos son sumergidos horizontalmente en la suspensión de promastigotes. Después de la incubación, la capacidad de la sustancia para promover la migración es evaluada al contar los parásitos presentes dentro de los tubos capilares (Tabla I). Estos autores demostraron por primera vez en la *Leishmania* la capacidad quimiotáctica *in vitro* de los monosacáridos como glucosa y fructosa.

Posteriormente, Leslie y col. (2002) modificaron el ensayo previamente descrito por Oliveira y col. (2000) (Tabla I). En el mismo se emplean capilares de vidrio llenos con una solución de agarosa preparada con el buffer utilizado para suspender los promastigotes y con tubos adicionales llenos con el soluto quimioatrayente. Seguidamente, todos los capilares son colocados de forma vertical en un tubo de «bijou». El extremo abierto de cada capilar es sumergido en la suspensión de promastigotes. Luego el sistema se incuba a temperatura ambiente y las células que migraban hacia los capilares se determinan usando una cámara de Neubauer (Leslie y col., 2002; Barros y col., 2006). El desarrollo de esta técnica permitió interpretar los resultados de Oliveira y col. (2000) a la luz de una metodología más sofisticada. Así Leslie y col. (2002) concluyeron que el movimiento de los promastigotes hacia la glucosa y la fructosa es una respuesta fundamentalmente quimiotáctica, aunque alguna de las mismas podría incluir osmotaxis.

Barros y col. (2006), introdujeron modificaciones sustanciales que permitieron estudiar más sistemáticamente los mecanismos involucrados en estas respuestas fisiológicas. Su método determina el tiempo promedio en el que el promastigote permanece moviéndose en línea recta, en ausencia o presencia de una concentración homogénea del agente tático en estudio. Con este modelo fue posible distinguir las respuestas quimiotácticas de las osmotácticas en los promastigotes de *Leishmania*.

Tabla I

Estudio comparativo de las técnicas desarrolladas para evaluar quimiotaxis *in vitro* en *Leishmania sp.*

| Autores/ Parámetros                | Bray y col., 1983                                       | Oliveira y col., 2000  | Leslie y col., 2002                       | Roychoudhury col., 2006                     | Barros y col., 2006                         | Pozzo y col., 2009 | Ensayo presentado    |
|------------------------------------|---|--|---|---|---|--------------------|----------------------|
| Orientación del sistema            | vertical  | horizontal   | vertical                                  | vertical                                    | horizontal                                  | horizontal         | vertical             |
| Utiliza gradiente de concentración | si  | si   | si  | si  | no  | si                 | si                   |
| Interfase celula-quimioatrayente   | con filtro  | sin filtro   | sin filtro                                | con filtro                                  | sin filtro                                  | sin filtro         | sin filtro           |
| Tipos de quimioatrayentes          | rafinosa<br>manosa<br>sacarosa<br>maltosa<br>metilbiosa | glucosa<br>fructosa<br>sacarosa<br>rafinosa<br>manosa<br>galactosa<br>maltosa<br>melibiosa | glucosa<br>fructosa<br>manosa<br>inositol | Quimiocinas<br>CCL2<br>CCL3<br>CCL4<br>CCL5 | sacarosa<br>manitol<br>glicina<br>guanósina | glucosa            | glucosa,<br>fructosa |
| Incubación                         | 30 min  | 1 hr   | 1 hr                                      | 0-2 horas                                   | 15 min                                      | 1-10 hr            | 30 min               |
| Duración <sup>1</sup>              | TF  | TF   | TF  | TF  | TF  | TR                 | TF                   |
| Evaluación <sup>2</sup>            | MO  | MO   | MO  | MO  | MO  | MO                 | MO                   |
| Sensibilidad                       | razonable   | Razonable  | Razonable                                 | buena                                       | Buena                                       | buena              |                      |
| Automatización                     | pobre   | pobre  | pobre                                     | buena                                       | buena                                       | buena              |                      |

1TF= tiempo final; TR tiempo real 2MO= microscopio óptico; CCL2: MCAF, JE; CCL3: MIP-1 $\alpha$ ; CCL4: MIP-1 $\beta$ ; CCL5: RANTES

Finalmente, los estudios más recientes descritos en la literatura utilizan las denominadas «pinzas ópticas» (optical tweezers) para cuantificar la quimiotaxis en *Leishmania amazonensis* (Pozzo y col., 2009). Para ello, se desarrolló una técnica para medir en tiempo real las fuerzas vectoriales bidimensionales (x, y) y la direccionalidad del movimiento flagelar (Tabla I) de los parásitos en presencia de gradientes de concentraciones de cualquier tipo de sustancia química. La utilidad de este método estriba en su capacidad de cuantificar la taxis de *Leishmania* en gradientes de diversos tipos de estímulos químicos o físicos.

En vista de la evidencia, en el presente estudio se realizó la modificación del ensayo de «los capilares-dos cámaras» inicialmente desarrollado por Kóhidai (1995), a fin de aplicarlo al estudio de la quimiotaxis en promastigotes de *Leishmania* y así lograr la estandarización de parámetros fundamentales y la validación de esta técnica en *Leishmania*, que permita cuantificar sistemáticamente y de forma reproducible las respuestas migratorias de este parásito. Debido a la importancia de la quimiotaxis en el establecimiento exitoso de la infección, este ensayo re-

sultará potencialmente útil para evaluar la interacción parásito-hospedero y por ende nuevos blancos para el desarrollo de fármacos antiinfectivos.

## Materiales y métodos

### CEPA Y CONDICIONES DE CULTIVO

Para realizar los ensayos se utilizó la cepa de referencia *Leishmania (V.) braziliensis* (MHOM/BR/84/LTB300) gentilmente cedida por la Dra. Noris Rodríguez, (Instituto de Biomedicina, Universidad Central de Venezuela). Los promastigotes de *Leishmania* fueron cultivados a 26 °C en una base semisólida de agar sangre suplementado con medio glucosa-NaCl (glucosa 1,5%, NaCl 0,85%, p.v.), hasta el día del experimento.

Partiendo de un cultivo de promastigotes de *L. braziliensis* en fase de crecimiento logarítmica tardía las células fueron centrifugadas a 1500 x g por 10 min a temperatura ambiente (TA). El medio de cultivo fue descartado y las células resuspendidas en buffer A: 10 mM Hepes (pH 7,3); 132 mM NaCl; 3,5 mM KCl; 1 mM CaCl<sub>2</sub> y 0,5 mM MgCl<sub>2</sub>; osmolalidad = 288

mOsm / kg). Nuevamente las células fueron centrifugadas (lavadas) y el buffer descartado. Finalmente, las células fueron resuspendidas en un volumen de buffer A necesario para obtener la densidad celular requerida. El buffer A fue usado en todos los experimentos como solución control para probar la quimiotaxis de los parásitos.

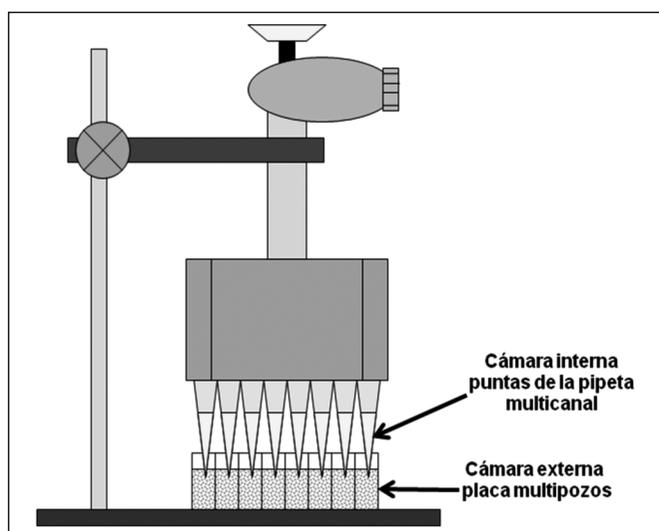
#### SOLUCIONES DE CARBOHIDRATOS

Las soluciones madres de los carbohidratos D-glucosa (100 mM) y D-fructosa (300 mM) fueron preparadas en buffer A y conservadas a -20 °C hasta el día del experimento. Las diluciones de los carbohidratos fueron preparadas frescas para cada experimento.

#### ENSAYO DE LOS CAPILARES-DOS CÁMARAS

La respuesta quimiotáctica de los promastigotes de *Leishmania braziliensis* fue medida con el ensayo de los capilares-dos cámaras originalmente desarrollado por Köhidai (1995) y modificado por nosotros.

En nuestro sistema de dos cámaras (figura 1), ocho puntas de una pipeta multicanal fueron usadas como la cámara interna y los pozos de una microplaca de 96 pozos utilizados como la cámara externa. Las puntas fueron llenadas con 100  $\mu$ l de la sustancia experimental (control o concentraciones crecientes del carbohidrato). Los pozos de la microplaca fueron llenados con 200  $\mu$ l de la suspensión de promastigotes de *L. braziliensis*. Las células fueron incubadas a distintos tiempos, para estandarizar dicho parámetro. Al finalizar el periodo de incubación las células que migraron a la cámara interna fueron fijadas en solución de formaldehído al 2% en PBS (0,05 M buffer fosfato, pH 7,2 y 0,9 M NaCl). El conteo de los parásitos se realizó en cámara de Neubauer.



**Figura 1. Sistema del ensayo de los capilares-dos cámaras. Las dos cámaras están conectadas a través de los capilares (puntas de la pipeta multicanal) que contienen la sustancia a ensayar.**

#### ESTANDARIZACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE CONTROL DE CALIDAD

Para garantizar la reproducibilidad y la validez del ensayo como un método confiable para evaluar la respuesta quimiotáctica se estandarizaron parámetros fundamentales como la densidad celular en la cámara externa, el tiempo de incubación del experimento, el rango de concentraciones de los agentes quimiotácticos y la osmolalidad de las soluciones. Así, la densidad celular óptima en la cámara externa fue escogida de acuerdo a ensayos previos descritos en la literatura ( $4 \times 10^7$  células  $\text{ml}^{-1}$ ) (Bray, 1983; Oliveira y col., 2000; Leslie y col., 2002). El tiempo óptimo de incubación se determinó evaluando la respuesta quimiotáctica a los 15, 30, 45 y 60 min. Los gradientes de monosacáridos fueron elegidos de acuerdo a lo descrito por Oliveira y colaboradores (2000), empleando concentraciones de D-glucosa desde 4 hasta 100 mM y de D-fructosa desde 4 hasta 225 mM. La osmolalidad de las soluciones (mOsm/kg) fue medida con un osmómetro (The Advanced™ Osmometer Model 3D3; Advanced Instruments, INC. USA), con una reproducibilidad (0 a 400 mOsm/kg) del 2% (1 D.S.). Todas las soluciones utilizadas en este estudio fueron evaluadas por este método.

#### Análisis estadístico

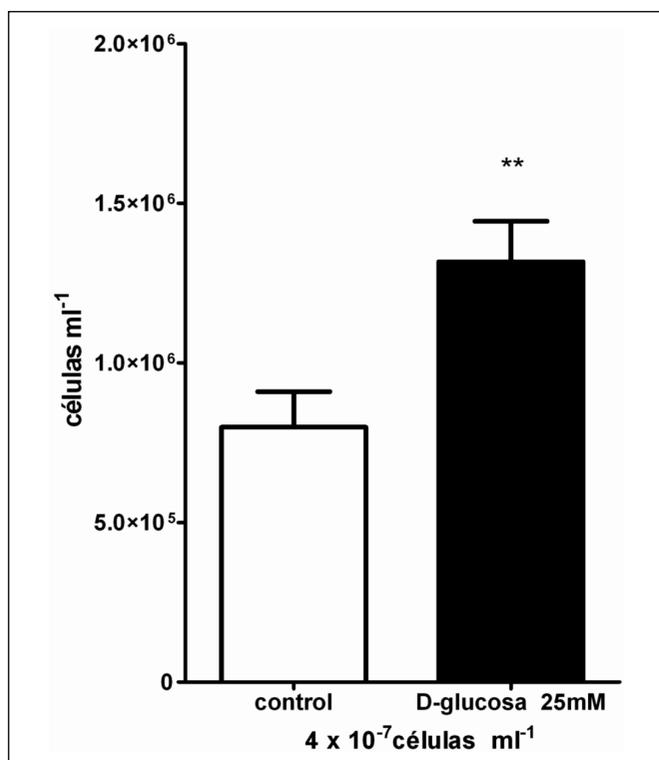
Los datos fueron expresados como la media  $\pm$  el error estándar de la media (E.E.M.) del número de células que migraron a la cámara interna (N= al menos 5 experimentos). La significancia estadística de las diferencias entre las células expuestas a los carbohidratos y el control fueron determinadas mediante la prueba de la *t de Student*. El análisis y la representación de los datos se realizaron con el software Graph Pad Prism, 5ª versión.

#### Resultados

##### DENSIDAD CELULAR

Para validar el ensayo de los capilares-dos cámaras con el fin de cuantificar la quimiotaxis en *L. braziliensis*, se estandarizaron los parámetros más importantes que se requieren para evaluar las respuestas migratorias. Por lo tanto, inicialmente se seleccionaron dos densidades celulares ( $4 \times 10^7$  y  $8 \times 10^7$  células  $\text{ml}^{-1}$ ) y se ensayaron las propiedades quimiotácticas de una solución de D-glucosa 25 mM, comparándola con el buffer A. Nuestros resultados demostraron que una densidad de  $4 \times 10^7$  células  $\text{ml}^{-1}$  fueron suficientes para obtener una respuesta quimiotáctica significativa, aproximadamente 200% ( $p=0,004$ ) con respecto al buffer A (figura 2). Por esta razón, los

experimentos sucesivos se realizaron utilizando esta densidad celular.



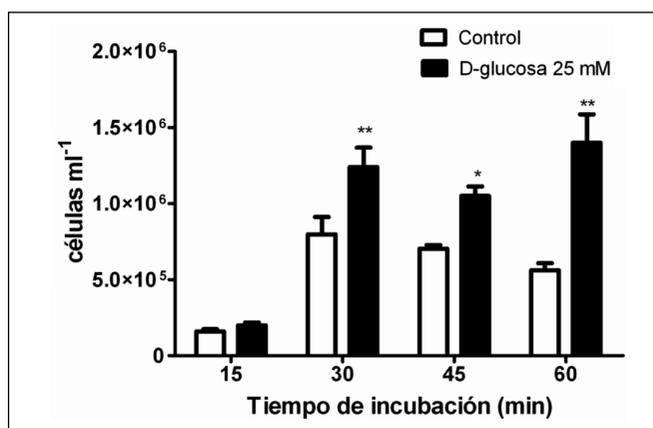
**Figura 2.** Efecto de la densidad celular sobre la respuesta quimiotáctica producida por la D-glucosa 25 mM en promastigotes de *L. braziliensis*. Los datos fueron analizados utilizando la prueba de la *t* de Student. Los valores representan la media  $\pm$  el E.E.M. (N=5-8); \*\**p*<0,01 comparado con el control.

#### TIEMPO DE INCUBACIÓN

Para estandarizar el ensayo de los capilares-dos cámaras se evaluó la respuesta quimiotáctica a varios períodos de incubación. Nuestros resultados sugieren que el tiempo óptimo de incubación es de 30 min (figura 3). Períodos más cortos (15 min) no fueron suficientes para estimular una respuesta migratoria significativa. Períodos más largos de incubación (45 y 60 min) resultaron en un incremento significativo de la migración de células hacia la cámara interna. Sin embargo, debido a que a estos tiempos prolongados los gradientes de concentración de monosacáridos fueron perturbados, la respuesta migratoria podría incluir tanto el componente quimiotáctico como el quimiocinético. Puesto que el objetivo fue medir exclusivamente la respuesta quimiotáctica, se utilizaron 30 minutos como tiempo de incubación.

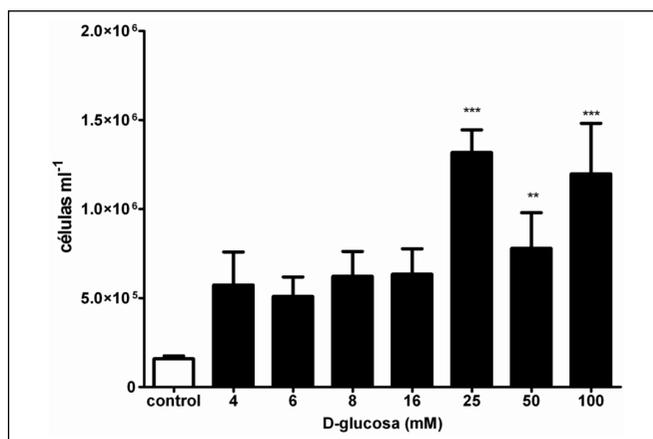
#### CONCENTRACIONES DE LOS MONOSACÁRIDOS

Se evaluó la respuesta quimiotáctica de los promastigotes de *L. braziliensis* en presencia de concentraciones crecientes de D-glucosa y D-fructosa. Los resultados se muestran en las figuras 4 y 5. Los expe-



**Figura 3.** Efecto del tiempo de incubación sobre la respuesta quimiotáctica producida por la D-glucosa 25 mM en promastigotes de *L. braziliensis*. Los datos fueron analizados utilizando la prueba de la *t* de Student. Los valores representan la media  $\pm$  el E.E.M. (N= 5-14); \**p*<0,05; \*\**p*<0,01 comparado con el control.

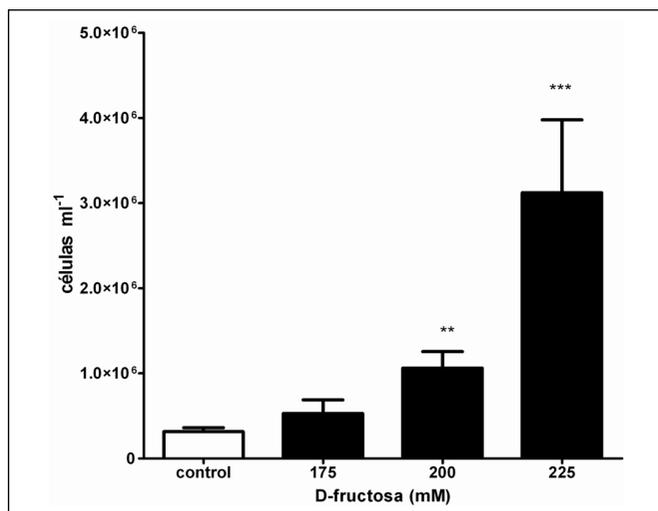
rimentos realizados con D-glucosa demostraron que esta hexosa promueve significativamente la migración del parásito a las concentraciones de 25, 50 y 100 mM (25 mM = 100 mM >100mM) con respecto al control (figura 4). Las concentraciones menores de 25 mM (0 - 16 mM) no produjeron respuesta quimioatrayente en *L. braziliensis*. Así mismo, la D-fructosa indujo una respuesta quimioatrayente significativa solamente a las concentraciones de 200 y 225 mM (figura 5).



**Figura 4.** Efecto de las concentraciones crecientes de la D-glucosa sobre la migración *in vitro* de promastigotes de *L. braziliensis*. Los valores representan la media  $\pm$  E.E.M. (N= 5-8); \*\**p*<0,01;\*\*\**p*<0,001 comparado con el control.

#### EFFECTO DE LA OSMOLALIDAD EXTERNA SOBRE LA MIGRACIÓN DE CÉLULAS

Para descartar que la osmolalidad de las soluciones constituya una variable que afecta la respuesta migratoria de los promastigotes, se determinó este parámetro en todas las soluciones a las concentraciones utilizadas. Posteriormente, se comparó la actividad quimiotáctica a cada concentración (mM) con los



**Figura 5.** Efecto de las concentraciones crecientes de D-fructosa sobre la respuesta quimiotáctica *in vitro* producida en promastigotes de *L. braziliensis*. Los valores representan la media  $\pm$  EEM (N= 5-8); \*\*p<0,01;\*\*\*p<0,001 comparado con el control.

valores de osmolalidad de las soluciones de los carbohidratos (Tabla II y III).

Nuestros resultados muestran que la osmolalidad de las soluciones de los carbohidratos fue proporcional a su concentración (Tablas II y III). La respuesta de los promastigotes de *L. braziliensis* a los gradientes osmóticos fue diferente para cada carbohidrato ensayado. En la presencia de D-glucosa un incremento en la osmolalidad de 22 mOsm/kg fue suficiente para detectar una migración significativa con respecto al control (Tabla II). Por otra parte, la migración de parásitos incubados con D-fructosa ocurre cuando el incremento en la osmolalidad es de, al menos, 212 mOsm/Kg comparado con el control (Tabla III).

**Tabla II**

**Efecto de la concentración y la osmolalidad de la D-glucosa sobre la migración *in vitro* de los promastigotes de *L. braziliensis***

| D-Glucosa (mM) | Actividad quimiotáctica <sup>a</sup><br>% número de células que migraron (control=100%) | Gradiente osmótico <sup>b</sup><br>mOsm/kg |
|----------------|---|--|
| 4              | 122,00 $\pm$ 20.28  | 3,00 $\pm$ 0.47                            |
| 6              | 124,24 $\pm$ 15.43  | 5,67 $\pm$ 0.82                            |
| 8              | 151,14 $\pm$ 19.17  | 7,67 $\pm$ 1.41                            |
| 16             | 158,07 $\pm$ 25.93  | 16,34 $\pm$ 1.25                           |
| 25             | 269,00 $\pm$ 62.62*   | 22,00 $\pm$ 0.47                           |
| 50             | 183,22 $\pm$ 21.62*   | 48,00 $\pm$ 1.25                           |
| 100            | 293.57 $\pm$ 45.47*   | 89,00 $\pm$ 0.47                           |

Los valores representan el promedio  $\pm$  E.E.M.a Porcentaje de células que migraron con respecto al control. (n=5-8). b Incremento en la osmolalidad (mOsm/kg) con respecto al control (n=3).

\*p<0.05, fue considerado estadísticamente significativo.

**Tabla III**

**Efecto de la concentración y la osmolalidad de la D-fructosa sobre la migración *in vitro* de los promastigotes de *L. braziliensis***

| D-Fructosa (mM) | Actividad quimiotáctica <sup>a</sup><br>% número de células que migraron (control=100%) | Gradiente osmótico <sup>b</sup><br>mOsm/kg |
|-----------------|---|--|
| 175             | 178,7 $\pm$ 34.5  | 184 $\pm$ 0.47                             |
| 200             | 231,57 $\pm$ 81.85*   | 212.66 $\pm$ 2.05                          |
| 225             | 448,31 $\pm$ 97.29**  | 242 $\pm$ 1.7                              |

Los valores representan el promedio  $\pm$  E.E.M. <sup>a</sup>Porcentaje de células que migraron con respecto al control (n=5-8). <sup>b</sup>Incremento en la osmolalidad (mOsm/kg) con respecto al control (n= 3). \*p<0.05; \*\*p=0.01, fueron considerados estadísticamente significativos

## Discusión

El estudio de los fenómenos involucrados en la quimiotaxis es esencial para entender las interacciones hospedero-parásito. La comprensión de esta respuesta celular podría ser útil para identificar los pasos fundamentales que intervienen durante la interacción exitosa, el reconocimiento mutuo y las respuestas migratorias que determinan la infección. Ese es el caso en la *Leishmania* cuando interactúa con sus hospedadores, el invertebrado (insecto) y el macrofago como célula hospedera en el mamífero (seres humanos).

La descripción de los fenómenos de migración celular data desde la época del desarrollo del microscopio. Sin embargo, fue a partir de finales del siglo XIX cuando investigadores como Pfeffer (1888) desarrollaron ensayos de quimiotaxis empleando capilares. Este ensayo, posteriormente mejorado por Adler (1973), es el más utilizado actualmente para cuantificar la quimiotaxis. La optimización continua de este método ha permitido estudiar y comprender los fenómenos de quimiotaxis y otros tipos de taxis como la osmotaxis, en diversos microorganismos y tipos celulares (Barros y col., 2006; Rao y col., 2008; Miller y col., 2009).

El presente trabajo constituye una propuesta en la que se combinan dos técnicas, el ensayo de las dos cámaras y la técnica de los capilares, para estudiar quimiotaxis en *Leishmania*. Debido a la importancia de mantener la reproducibilidad de los datos y el control de calidad de los resultados a obtener, el estudio que aquí se presenta describe la estandarización y la validación de este método. Los resultados obtenidos demuestran que los parámetros óptimos para medir quimiotaxis en *Leishmania braziliensis* son una densidad celular de  $4 \times 10^7$  promastigotes ml<sup>-1</sup> en la cámara externa y 30 min de incubación a temperatura ambiente.

Para validar el método, se ensayaron dos carbohidratos cuyas propiedades como agentes atrayentes habían sido descritas (Oliveira y col., 2000). Los resultados confirman que la D-glucosa es quimioatrayente para los promastigotes a una concentración de 25 mM ( $\Delta$  22mOsm/Kg). La concentración más elevada utilizada de este carbohidrato (100 mM,  $\Delta$  89 mOsm/Kg), también aumentó significativamente la respuesta migratoria. Para parásitos expuestos a D-fructosa, fue necesario incrementar diez veces la concentración del carbohidrato para detectar migración de los parásitos (200 y 225 mM,  $\Delta$  212 y 242 mOsm/Kg, respectivamente). Estos datos sugieren que los promastigotes de *L. braziliensis* detectan y responden con respuestas migratorias a incrementos menores de concentración y osmolalidad de D-glucosa que de D-fructosa (figuras 4 y 5; Tablas II y III).

Se ha propuesto que la migración de los promastigotes de *Leishmania* en presencia de una concentración de D-glucosa de 100mM se debe a una respuesta osmotáctica (Leslie y col., 2002). Al analizar nuestros resultados se evidencia que la osmolalidad de las soluciones de D-glucosa 100 mM ( $\Delta$ 89 mOsm/kg) y de D-fructosa 100 mM ( $\Delta$ 105 mOsm/kg) son similares; sin embargo, a diferencia de la D-glucosa, la D-fructosa no produjo una respuesta migratoria significativa a esta concentración. Si la respuesta a la D-glucosa fuese exclusivamente osmotáctica, un efecto similar (es decir, una respuesta migratoria) debería haber ocurrido con la D-fructosa 100 mM (datos no mostrados). Por ello, se sugieren que la respuesta migratoria a la D-glucosa 100 mM se debe a una combinación de eventos quimiotácticos y osmotácticos. Barros y col. (2006) llegaron a una conclusión similar al demostrar que soluciones de NaCl, Hepes y guanosina que aportan más osmolitos a concentraciones similares a las utilizadas para glicina, lactosa, manitol y sacarosa, por ende aumentan más la presión osmótica que estos; sin embargo, no produjeron una mayor respuesta migratoria.

Se sabe que cambios en la osmolalidad del medio modifican la fisiología celular de la *Leishmania*. Así, un aumento en la osmolalidad de 308-625 mOsm/kg disminuye levemente la tasa de crecimiento de los parásitos (Darling y Blum, 1990; Burrows y Blum, 1991, Viera y col., 1996) y alteran la morfología celular (Darling y Blum, 1990); mientras que una reducción (aguda) de la osmolalidad promueve la liberación de aminoácidos, especialmente de alanina, cambia la morfología y el volumen celular (Darling y Blum, 1990) y disminuye la viabilidad celular (LeFurgey y col., 2001). Aún más, el estrés agudo producido por aumentos de 310 mOsm/kg (de 305 a 615 mOsm/kg) durante 10 min se traduce en cambios menores en el contenido citoplasmático de iones y elementos (LeFurgey y col., 2001), mas no en modificaciones importantes de la

fisiología celular. Por ello, y para garantizar la integridad celular, en los experimentos aquí descritos se utilizaron soluciones con osmolalidades ligeramente superiores a las del control ( $< \Delta$ 89 mOsm/kg para D-glucosa;  $< \Delta$ 242mOsm/kg para D-fructosa) y tiempos de incubación cortos, de 30 min, que no alteran las actividades metabólicas del parásito, garantizan su movilidad y minimizan la posibilidad de mezclar respuestas quimiotácticas con respuestas osmotácticas.

Nuestros resultados indican que la D-glucosa (25 mM) fue el estímulo quimiotáctico más potente observado. La expresión de receptores con amplia gama de afinidades podría explicar la susceptibilidad de los parásitos a cambios menores de concentración y osmolalidad de D-glucosa con respecto a D-fructosa (Oliveira y col., 2000, Leslie y col., 2002, Barros y col., 2006).

En conclusión, en el presente trabajo se adaptó el método de los capilares-dos cámaras para medir la actividad migratoria de *L. braziliensis* en presencia de gradientes de sustancias simples (hexosas). Esta metodología constituye una técnica simple, eficaz y reproducible de detección confiable, rápida y sencilla que permite evaluar cuantitativamente *in vitro* la quimiotaxis de promastigotes de *L. braziliensis*, hacia/ contra un gradiente de cualquier tipo de molécula. La confiabilidad del método estriba en que la migración se determina en condiciones en las cuales el parásito debe movilizarse en contra de la gravedad, con osmolalidad controlada de las soluciones y durante un tiempo de incubación que garantice la cuantificación de la quimiotaxis y en el cual no deben estar ocurriendo procesos de osmotaxis.

El método constituye una herramienta fiable y útil en el diagnóstico clínico de la leishmaniasis, así como en el desarrollo de nuevos fármacos anti-infectivos. Sus aportes resultan fundamentales para comprender el comportamiento quimiotáctico y migratorio de una población de parásitos, tal y como ocurre durante la interacción parásito-hospedero en una infección natural, por lo que la metodología aquí descrita y validada resulta de gran fortaleza ya que la migración poblacional es un fenómeno complejo que requiere de eventos múltiples, incluso de interacción parásito-parásito que se suceden cuando se produce una infección exitosa.

Desde que esta tecnología constituye una primera aproximación en la detección de moléculas o drogas que afectan la migración del parásito, nos permitimos proponer su uso como el paso inicial en la discriminación de nuevas drogas contra la *Leishmania*, ya que permite evaluar un tipo de taxis (quimioatrayente o quimiorepelente) en forma rápida para discriminar si existe o no una respuesta.

Finalmente, desde que la inhibición de la motilidad flagelar ha sido propuesta como blanco para el estudio de nuevas drogas contra tripanosomas africanos (Ginger y col., 2008), el estudio de la quimiotaxis en diferentes cepas de *Leishmania* sería de mucha utilidad en los diversos fenotipos los cuales deberían expresar diferencias en las respuestas migratorias. Por ello, mediante el empleo de este método se podría obtener una aproximación a la respuesta fisiológica primaria. Con ello se daría paso al enfoque bioquímico, celular, proteómico y genético, lo que debería conducir a un punto de vista integrado de la implicación de la motilidad del parásito en su ciclo de vida, virulencia o infectividad.

## Agradecimientos

Este trabajo fue subvencionado por los proyectos del CDCH-UCV: PI-09-00-7084-2008; PG-09-00-7378-2008; así como por el Fondo de la Coordinación de investigación de la Facultad de Medicina de la UCV CI 3/2008. Los autores agradecen a la Dra. Maritza Padrón-Nieves por su apoyo académico y a la Sra. Pilar Rodríguez por su asistencia técnica.

## Referencias bibliográficas

- Barros V, Oliveira J, Melo M, Gontijo N. 2006. *Leishmania amazonensis*: chemotactic and osmotactic responses in promastigotes and their probable role in development in the phlebotomine gut. *Exp Parasitol* 112(3): 152-157.
- Bray RS. 1983. *Leishmania*: chemotactic responses of promastigotes and macrophages in vitro. *J. Protozool* 30(2): 322-329.
- Burrows C, Blum JJ. 1991. Effect of Hyper-osmotic stress on alanine content of *Leishmania major* promastigotes. *J Protozool* 38(1): 47-52.
- Darling TN, Blum JJ. 1990. Changes in the shape of *Leishmania major* promastigotes in response to hexoses, proline, and hypoosmotic Stress. *J Protozool* 37(4): 267-272.
- Devreotes P, Janetopoulos C. 2003. Eukaryotic Chemotaxis: distinction between directional sensing and polarization. *J Biol Chem* 278(23): 20445-20448.
- Gadelha C, Wickstead B, Gull K. 2007. Flagellar and ciliary beating in trypanosome motility. *Cell Motil Cytoskeleton* 64: 629-643.
- Ginger L, Portman N, McKean P. 2008. Swimming with protons: perception, motility and flagellum assembly. *Nat Rev Microbiol* 8(11): 838-850.
- Handman E, Papenfuss A, Speed T, Goding J. *Leishmania* Surface Proteins. En: *Leishmania after de Genome*. Eds: Myler P, Fasel N. Caister Academic Press, 2008, pp. 177-204.
- Köhidaí L, Lemberkovics E, Csaba G. 1995. Molecule dependent chemotactic responses of *Tetrahymena pyriformis* elicited by volatile oils. *Acta Protozool* 34: 181-185.
- LeFurgey A, Ingram P, Blum JJ. 2001. Compartmental responses to acute osmotic stress in *Leishmania major* result in rapid loss of Na<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup>. *Comp Biochem Physiol. Part A: Mol Integ Physiol* 128: 385-394.
- Leslie G, Barrett M, Burchmore R. 2002. *Leishmania mexicana*: promastigotes migrate through osmotic gradients. *Exp Parasitol* 102(2): 117-120.
- Miller LD, Russel MH, Alexandre G. 2009. Diversity in bacterial chemotactic responses and niche adaptation. *Adv APPL Microbiol* 66:53-76.
- Molineux W, Killick-Kendrick R. *Leishmaniasis in Biology and Medicine*. En: *Leishmaniasis: Biology and Medicine*. W Peters y R Killick-Kendrick. Eds. New York. Academic Press. 1987, pp. 794-845.
- Oliveira J, Melo M, Gontijo N. 2000. A Sensitive method for assaying chemotactic responses of *Leishmania* promastigotes. *Exp Parasitol* 96:187-189.
- Pfeffer W. 1888. Ueber chemotaktische bewegungen von bakterien flagellaten und volvocineen. *Unter Botany Institute Tubingen* 2: 582-661.
- Pozzo LY, Fontes A, de Thomaz AA, Santos BB, Farias P, Ayres DC, Giorgio S, Cesar CL. 2009. Studying taxis in real time using optical tweezers: applications for *Leishmania amazonensis* parasites. *Micron* 40: 617-620.
- Rao CV, Glekas GD, Ordal GW. 2008. The three adaptation systems of *Bacillus subtilis* chemotaxis. *Trends Microbiology* 16: 480-487.
- Roychoudhury K, Dasgupta B, Sena P, Laskayb T, Solbachb W, Dea T, Roya S. 2006. Evidence of direct interactions between the CC-chemokines CCL3, CCL4 and CCL5 and *Leishmania* promastigotes. *Mol Biochem Parasitol* 150:374-377.
- Rojas-Dotor S, Pérez-Ramos J, Rico-Rosillo MG. 2009. Quimiotaxis y enfermedad. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc* 47 (1): 51-56.
- Rotureau B, Morales MA, Bastin P, Spath G. 2009. The flagellum-mitogen-activated protein kinase connection in Trypanosomatids: a key sensory role in parasite signalling and development? *Cell Microbiol* 11(5):710-718.
- Van Haastert P, Devreotes P. 2004. Chemotaxis: Signalling the way forward. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5: 626-63.
- Vieira LL, Lafuente E, Gamarro F, Cabantchik Z. 1996. An amino acid channel activated by hypotonically induced swelling of *Leishmania major* promastigotes. *Biochem J* 319: 691-697.
- Wang F. 2010. The Signaling Mechanisms Underlying Cell Polarity and Chemotaxis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 14: 1-16.
- OMS (Organización Mundial de la Salud). Technical Report Series 2010. Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis. Disponible en [http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO\\_TRS\\_949\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_949_eng.pdf)

Recibido: 24 de agosto de 2011  
Aceptado: 07 de octubre de 2011

# Grupo Trifluorometilo: un sustituyente importante en química medicinal

(Trifluoromethyl Group: an important substituent in medicinal chemistry)

SIMÓN E LÓPEZ\* Y ÁNGEL ROMERO

## Resumen

El flúor es un elemento de vital importancia en Química Medicinal, ya que imparte propiedades únicas a las moléculas orgánicas donde se incorpora, alterando sus propiedades fisicoquímicas y biológicas. Posee un muy pequeño radio de van der Waals por lo que tiene una escasa demanda estérica, alta electronegatividad, el enlace C-F es muy estable frente a transformaciones metabólicas, alta lipofilicidad –lo cual contribuye a facilitar la distribución de las moléculas que lo contienen en el organismo humano– y es capaz de participar en la formación de puentes de hidrógeno a través de sus pares de electrones libres. En particular, el grupo trifluorometilo (CF<sub>3</sub>) es uno de los sustituyentes fluorados más comunes en química medicinal, ya que ofrece de manera simultánea una alta lipofilicidad, elevada densidad electrónica y demanda estérica similar a la del grupo isopropilo. Presente en fármacos de uso clínico tales como el Efavirez (anti-HIV) y la 26,26,26-f3-12,13-Desoxiepotilona B (anticancerígeno), el grupo trifluorometilo se ha hecho hoy en día cada vez más frecuente en moléculas disponibles para el mercado farmacéutico.

**Palabras clave:** trifluorometilo, flúor, química medicinal.

## Abstract

Fluorine is a vital importance element in Medicinal Chemistry, because it gives unique properties to the organic molecules where is incorporated, altering their physicochemical and biological properties. It possesses a very small van der Waals ratio and so a low steric demand, high electronegativity, the C-F bond is very stable towards metabolic transformations, high lipophilicity –which contributes to facilitate the distribution of the molecules containing it inside the human body– and it is able to participate in hydrogen bonding through its free electron pairs. Particularly, the trifluoromethyl group (CF<sub>3</sub>) is one of the most common fluorinated substituents in medicinal chemistry, while it offers simultaneously a high lipophilicity, an elevated electron density and a steric demand similar as that of the isopropyl group. Present in clinical use drugs such as Efavirez (anti-HIV) and the 26,26,26-f3-12,13-Desoxyepothilone B (anticancer), the trifluoromethyl group has become nowadays more frequent in available molecules for the pharmaceutical market.

**Key words:** trifluoromethyl, fluorine, medicinal chemistry.

## Introducción

A pesar de que el flúor es un elemento muy común en la corteza terrestre, ocupando el décimo tercer lugar en abundancia, llama la atención su escasa presencia en moléculas de origen natural (Figura 1) (O'Hagan y Harper, 1999), quizás debida a la dificultad que encuentran los organismos vivos de incorporar este elemento por la fuerte energía de solvatación

del ión fluoruro en agua (Dolbier, 2005). Pese a esto, es cada vez más frecuente encontrar moléculas organofluoradas en fármacos de uso común, ya que alrededor del 20-25% de las moléculas utilizadas como principios activos farmacéuticos alrededor del mundo contienen al menos un átomo de flúor en su estructura (Hagmann, 2008; Purser y col., 2008). Muchos de los fármacos que generan mayores ganancias

Laboratorio de Química Medicinal y Heterociclos, Departamento de Química, Universidad Simón Bolívar, Valle de Sartenejas, Baruta, Estado Miranda, Caracas 1080-A, Apartado 89000, Venezuela.

\* Email: slopez@usb.ve • Telf: +58-212-9063960; Fax: +58-212-9063961.

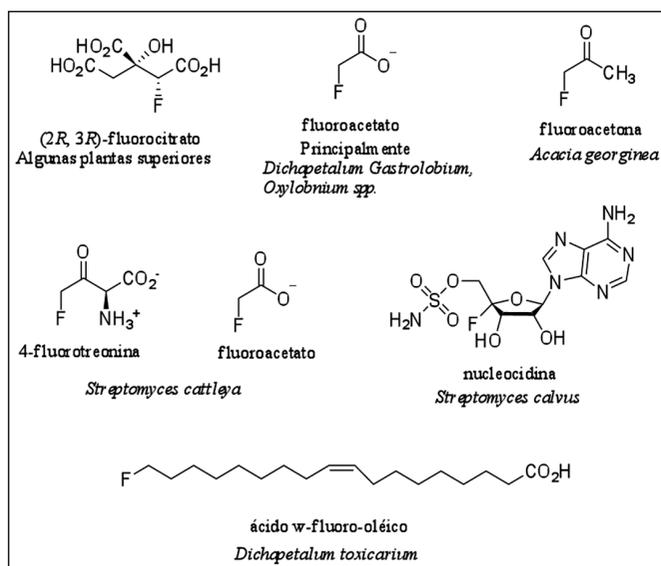
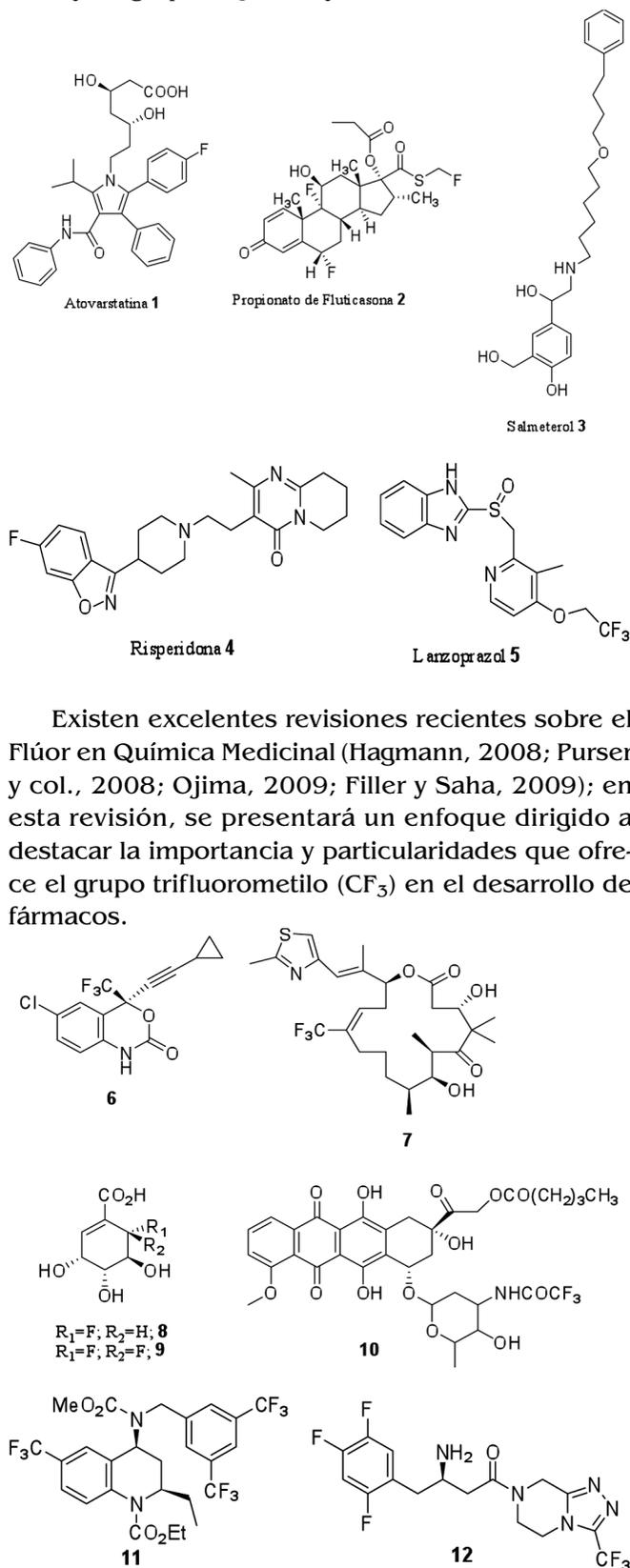


Figura 1. Moléculas orgánicas naturales que contienen flúor.

cias en ventas mundialmente son fluorados, tales son los ejemplos reflejados en el año 2006 por el Lipitor® (Atovarstatina **1**, Pfizer/Astellas: N° 1 en ventas con 14,4 billones de dólares/año), Advair® (Una mezcla de Propionato de Fluticasona **2** y Salmeterol **3**; GlaxoSmithKline: N° 2 con 6,1 billones de dólares/año), Risperidona **4** (Janssen: N° 10 con 4,2 billones de dólares/año) y el inhibidor de la bomba de protones Lanzoprazol **5** (Takeda/Abbott: No 14 con 3,4 billones de dólares/año) (*MedAdNews*, 2007).

Se estima que con el desarrollo de nuevos métodos sintéticos, capaces de permitir con mayor facilidad la incorporación de flúor en moléculas orgánicas (Wilkinson, 1992; Shimizu e Hiyama, 2005; Kiselyov y Strekowski, 1996; McClinton y McClinton, 1992; López, 2010), el número de compuestos fluorados que pasarán a estudios de fase clínica se incrementa notablemente (Hagmann, 2008). La alta electronegatividad y pequeño tamaño del flúor así como el hecho de poder alterar dramáticamente la reactividad de las moléculas que lo poseen, son sólo algunas de las variables tomadas en consideración por los diseñadores de fármacos cuando desean hacer cambios en el desarrollo de nuevas entidades químicas con actividad farmacológica a partir de un líder. En la mayoría de los casos, los nuevos candidatos incorporan de 1-3 átomos de flúor para sustituir a grupos hidroxilo o bien hidrógenos, ejemplos representados por el Efavirenz **6** (Bristol-Myers Squibb; CF<sub>3</sub>, antiviral HIV) (Tan y col., 1991), un análogo de la Epatilona B (26,26,26-F<sub>3</sub>-12,13-Desoxiepatilona B **7**; CF<sub>3</sub>, anticancerígeno) (Chou y col., 2003), ciertos derivados del ácido shikímico **8,9** (CHF o CF<sub>2</sub>, antibacterianos) (Humphreys y col., 2006) y el 14-valerato de *N*-trifluoroacetil-doxorubicina **10** (CF<sub>3</sub>, anticancerígeno) (Cotterill y Rich, 2005). Aunque en menor cantidad, también se encuentran cierto número de fármacos que incorpo-

ran en sus moléculas de 6-9 átomos de flúor, como por ejemplo el Torcetrapib **11** (Pfizer; potente inhibidor de la proteína de transferencia del éster de colesterol; posee 2 grupos CF<sub>3</sub>) (Damon y col., 2006) y la Sitagliptina **12** (Merck; antidiabético para el tratamiento de diabetes del tipo 2; posee 3 átomos de flúor y un grupo CF<sub>3</sub>) (Kim y col., 2005).



Existen excelentes revisiones recientes sobre el Flúor en Química Medicinal (Hagmann, 2008; Purser y col., 2008; Ojima, 2009; Filler y Saha, 2009); en esta revisión, se presentará un enfoque dirigido a destacar la importancia y particularidades que ofrece el grupo trifluorometilo (CF<sub>3</sub>) en el desarrollo de fármacos.

## EFECTO ESTÉRICO DEL GRUPO TRIFLUOROMETILO

El flúor posee un radio de van der Waals relativamente pequeño, mayor al del hidrógeno y bastante similar al del oxígeno, con el cual comparte una alta electronegatividad (Tabla I) (Bondi, 1964). El volumen del grupo  $\text{CF}_3$  ha sido estimado basándose en la comparación de las barreras rotacionales a lo largo del eje bifenilo de diversos bifenilos 1,1'-sustituídos (**13a-c**, **14a-b**, Figura 2), donde puede observarse claramente que el grupo trifluorometilo ocupa un volumen bastante similar al de un grupo isopropilo (Bott y col., 1980; Wolf y col., 1995; Leroux, 2004). El cambio isostérico del grupo metilo ( $\text{CH}_3$ ) por trifluorometilo ( $\text{CF}_3$ ), suele verse con cierta frecuencia en diversas publicaciones de química medicinal, sin embargo, es importante recordar que el volumen de estos dos grupos no es similar y que el efecto estérico causado por este último es una variable importante a considerar en las interacciones fármaco-receptor. Recientemente, se han realizado algunas pruebas con ciertos derivados de barbitúricos sustituidos sobre el sitio activo de la enzima gelatinasa B (MMP-9) que indican que en realidad, el efecto bioisostérico del grupo trifluorometilo es ligeramente inferior al del isopropilo, pero muy superior al del grupo metilo, y más bien bastante parecido al del grupo etilo (Figura 3) (Jagodzinska y col., 2009). Aunque el volumen de van der Waals del grupo trifluorometilo es similar al del etilo, la forma de ambos es muy diferente. El grupo isopropilo posee un volumen ligera-

mente mayor que el del  $\text{CF}_3$  y es axialmente anisotrópico (Leroux, 2004).

En la Figura 4 pueden observarse los volúmenes de van der Waals calculados para diversos  $\alpha$ -aminoácidos sustituidos con diferentes cadenas laterales del tipo fluoro-etilo, en donde puede evidenciarse una vez más que la demanda estérica del grupo trifluorometilo (TfeGly) es en realidad inferior a la del isopropilo (Leu), pero superior a la del metilo (Abu) (Zhao y col., 2003).

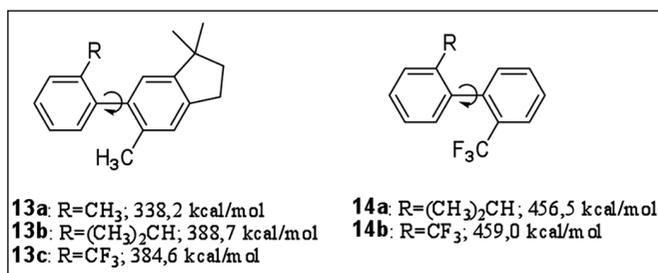


Figura 2. Barreras rotacionales en torno al eje de bifenilos **13a-c** y **14a-b**.

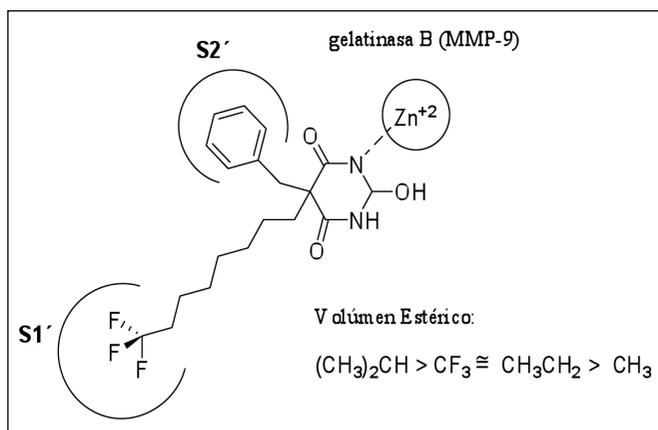


Figura 3. Efecto estérico del grupo trifluorometilo en la bolsa lipofílica (S1') de la enzima gelatinasa B (MMP-9) (Jagodzinska y col., 2009).

Tabla I

Radios de van der Waals y Electronegatividades de Pauling (Bondi, 1964)

|    | Radio de van der Waals (Å) | Electronegatividad de Pauling |
|----|----------------------------|-------------------------------|
| C  | 1,70                       | 2,55                          |
| H  | 1,20                       | 2,20                          |
| F  | 1,47                       | 3,98                          |
| O  | 1,52                       | 3,44                          |
| N  | 1,55                       | 3,04                          |
| Cl | 1,75                       | 3,16                          |

## LIPOFILICIDAD

Generalmente, la incorporación de flúor en moléculas orgánicas contribuye al aumento de su lipofili- cidad, este efecto es bastante notorio cuando este

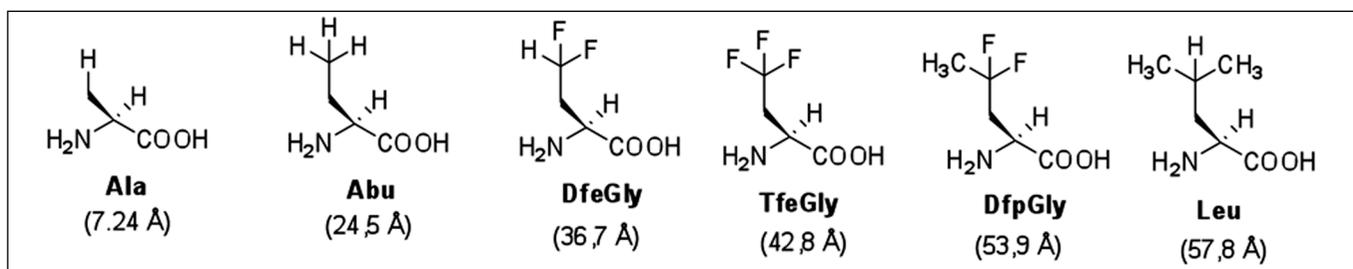
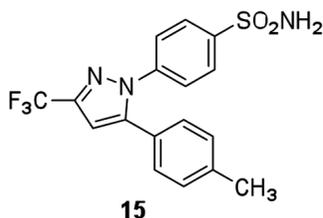


Figura 4. Demanda estérica calculada para diversos  $\alpha$ -aminoácidos sustituidos con diferentes cadenas laterales del tipo fluoro-etilo (Zhao y col., 2003).

átomo o grupos que lo contienen están unidos a sistemas aromáticos, como por ejemplo el benceno (Ojima, 2009). El fluorobenceno es ligeramente más lipofílico que el benceno, pero menos que el clorobenceno (Tabla II); al igual que el trifluorometil-benceno (CF<sub>3</sub>-Ph), el cual es 57% más lipofílico que el tolueno (CH<sub>3</sub>-Ph). En la Tabla II, pueden observarse ciertos parámetros de hidrofobicidad de Hansch para diversos bencenos sustituidos (Hansch y col., 1995), donde se detecta rápidamente una mayor lipofilicidad para aquellos sistemas sustituidos con el grupo trifluorometilo (CF<sub>3</sub>-Z-Ph vs. CH<sub>3</sub>-Z-Ph; Z= O, CO, CONH, SO<sub>2</sub>). Un análisis de los datos anteriores refleja que la cercanía del CF<sub>3</sub>, con un fuerte carácter electroatractor, disminuye la densidad electrónica de grupos polares (Z) unidos al anillo aromático, comprometiendo la capacidad de estos grupos para formar puentes de hidrógeno con el agua que los rodea, reduciendo entonces la hidrofobicidad, y por tanto aumentando su lipofilicidad. La presencia de un CF<sub>3</sub> en posiciones *orto* o *para* a sustituyentes con grupos funcionales capaces de actuar como bases de Lewis en anillos aromáticos (amina, alcohol, éter, carbonilo, amida), también disminuye la capacidad que tienen estos grupos de formar puentes de hidrógeno con el agua, lo cual conlleva a un aumento en su carácter lipofílico. La incorporación de un grupo trifluorometilo en sistemas heterocíclicos, comunes en la mayoría de los fármacos, muchas veces conduce a una mejoría en la unión a receptores biológicos a través de interacciones con sitios lipofílicos de estos; un ejemplo resaltante de este caso lo representa el Celecoxib **15** (Celebrex®, Pfizer; inhibidor selectivo de la COX-2), donde el CF<sub>3</sub> ubicado en la posición 3 del anillo central de pirazol se une a una bolsa lipofílica de la enzima ciclooxigenasa 2 (COX-2) (Kurumbail y col., 1996).



**Tabla II**  
Parámetros de hidrofobicidad de Hansch para diversos bencenos sustituidos

| X en C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> -X | π <sub>X</sub> <sup>a</sup> | X en C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> -X | π <sub>X</sub> | X en C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> -X | π <sub>X</sub> |
|---------------------------------------|-----------------------------|---------------------------------------|----------------|---------------------------------------|----------------|
| F                                     | 0,14                        | OCH <sub>3</sub>                      | -0,02          | CH <sub>3</sub> C(O)NH-               | -1,63          |
| Cl                                    | 0,71                        | OCF <sub>3</sub>                      | 1,04           | CF <sub>3</sub> C(O)NH-               | 0,55           |
| OH                                    | -0,67                       | CH <sub>3</sub> C(O)-                 | -1,27          | CH <sub>3</sub> SO <sub>2</sub> -     | -1,63          |
| CH <sub>3</sub>                       | 0,56                        | CF <sub>3</sub> C(O)-                 | 0,08           | CF <sub>3</sub> SO <sub>2</sub> -     | 0,55           |
| CF <sub>3</sub>                       | 0,88                        |                                       |                |                                       |                |

<sup>a</sup>π<sub>X</sub>: log P<sub>X</sub>-log P<sub>H</sub> (octanol-agua)

El efecto del grupo CF<sub>3</sub> en compuestos alifáticos tiende a ser inverso al que ejerce cuando está unido a sistemas aromáticos, ya que en líneas generales promueve una disminución de la lipofilicidad en cadenas hidrocarbonadas. El pentano (log P= 3,11), por ejemplo, es más lipofílico que el 1-fluoropentano (log P= 2,33); el (3-fluoropropil)benceno Δlog P= -0,7 es menos lipofílico que el *n*-propil-benceno (Lide, 2005). Los valores π de Hasch para CF<sub>3</sub> y CH<sub>3</sub> en sistemas alifáticos son respectivamente 0,54 y 0,06 (Ganguly y col., 1983).

Cuando existe un grupo polar relativamente cercano al CF<sub>3</sub> en una cadena alifática, por ejemplo OH o bien NH<sub>2</sub>, la situación puede cambiar aumentando la lipofilicidad debido al gran efecto inductivo electroatractor del grupo trifluorometilo, lo cual conlleva a una disminución de la densidad electrónica en estos grupos polares que ciertamente reducen su capacidad para formar puentes de hidrógeno como bases de Lewis (Ganguly y col., 1983; Morgenthaler y col., 2007). Un ejemplo de lo anteriormente señalado lo refleja el trifluoroetanol (Δlog P= -0.68), más lipofílico que el etanol; en el caso de que el CF<sub>3</sub> se aleje del grupo polar, el efecto que este tiene sobre la densidad electrónica del grupo polar disminuye (Tabla III) (Ganguly y col., 1983).

**Tabla III**  
Valores de log P para alcoholes alifáticos de cadena lineal

| Alcoholes  | X=H                | X=F                | (Δlog P <sub>F</sub> - log P <sub>H</sub> ) |
|--|--------------------|--------------------|---|
|  | log P <sub>H</sub> | log P <sub>F</sub> |   |
| CX <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> OH                 | -0,32              | 0,36               | 0,68  |
| CX <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> OH | 0,34               | 0,39               | 0,05  |
| CX <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> OH | 0,88               | 0,90               | 0,02  |
| CX <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> OH | 1,40               | 1,15               | -0,25                                       |
| CX <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> OH | 2,03               | 1,14               | -0,89                                       |

Conociendo que la mayoría de los fármacos permean a través de membranas biológicas mediante una difusión pasiva, la lipofilicidad de los mismos es considerada un factor muy importante y determinante en su biodisponibilidad. Por otra parte, la halogenación de fármacos es usada con gran frecuencia para mejorar la unión a membranas y su permeabilidad a través de éstas (Gerebtzoff y col., 2004; Zaldini Hernandez y col., 2010). Se ha estudiado y cuantificado el efecto de reemplazo de un átomo de hidrógeno sobre la posición C-2 de diversas fenotiazinas antipsicóticas (promazina **16**, perazina **19** y perfenazina **22**; Figura 5) por cloro o trifluorometilo sobre la lipofilicidad de las mismas y su permeabilidad a través de membranas, encontrando que el aumento del

coeficiente de permeabilidad coincide con el incremento del coeficiente de partición agua-lípido según el orden  $R_1 = H < Cl < CF_3$  (Gerebtzoff y col., 2004). Otro ejemplo lo representa el Aprepitant **25** (Emend<sup>®</sup>, Merck; antiemético usado en quimioterapia, antagonista del receptor de neurokinina 1), donde la presencia del grupo bis-trifluorometilfenilo al parecer mejora la penetración de este fármaco a través de la barrera hematoencefálica (Humphrey, 2003).

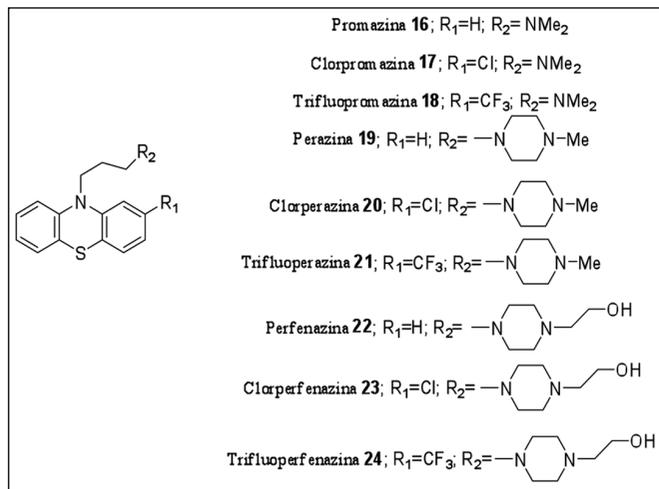
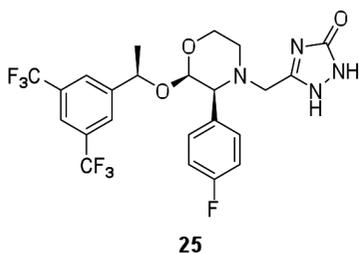


Figura 5. Diversas fenotiazinas antipsicóticas sustituidas en la posición C-2 ( $R_1 = H, Cl, CF_3$ ).

Dentro de los mayores problemas que afectan a los fármacos peptídicos se encuentran su rápida degradación por proteasas, baja lipofiliidad y ausencia de un sistema de transporte específico para introducirlos dentro de las células, aparte de que la mayoría de las membranas celulares ofrecen resistencia al libre paso de péptidos. Una de las estrategias manejadas para retardar la degradación proteolítica de péptidos y además estabilizar su estructura secundaria es la incorporación de aminoácidos  $\alpha, \alpha$ -disustituidos, tales como los  $\alpha$ -trifluorometil-aminoácidos, en posiciones claves de la cadena peptídica (Toniolo y Benedetti, 1991; Marshal y col., 1988; Kokschi y col., 1996). Ciertos péptidos modificados estructuralmente con  $\alpha$ -trifluorometil-aminoácidos presentan una degradación retardada por parte de peptidasas, lo cual ha permitido prolongar la actividad intrínseca de los mismos; además, el aumento en la lipofiliidad de estos ha mejorado su absorción *in vivo* así como la permeabilidad a través de ciertas barreras biológicas (Kokschi y col., 1996).



## EFEECTO INDUCTIVO

Al ser el flúor el elemento más electronegativo de la tabla periódica (Tabla 1), es lógico suponer que sin duda afecta, a través de su efecto inductivo, las propiedades fisicoquímicas de las moléculas a las cuales está unido. Con la introducción de átomos de flúor, se observa una marcada reducción de los valores de  $pK_a$  en diversos ácidos carboxílicos y alcoholes alifáticos (Tabla IV) (Dean, 1999; Abraham y col., 1989); de manera similar, la introducción de este elemento reduce la basicidad de las aminas, teniendo un impacto notorio en su permeabilidad a través de membranas (Avdeef, 2001). El efecto inductivo electroattractor de los átomos flúor presentes en los grupos trifluorometilos del  $(CF_3)_3COH$  hacen que el valor de su  $pK_a$  tenga una diferencia de apenas 0,64 unidades con respecto al del ácido acético (Tabla IV). La incorporación de flúor o grupos que lo contienen en compuestos bioactivos ejerce un poderoso efecto en las afinidades de unión a receptores biológicos, su actividad biológica general, así como sobre los parámetros farmacocinéticos de los mismos.

Tabla IV

Valores de  $pK_a$  para algunos ácidos carboxílicos y alcoholes alifáticos fluorados

| Compuesto     | $pK_a$ | Compuesto       | $pK_a$ | Compuesto     | $pK_a$ |
|---------------|--------|-----------------|--------|---------------|--------|
| $CH_3CO_2H$   | 4,76   | $CH_3CH_2CO_2H$ | 4,87   | $(CH_3)_3COH$ | 19,00  |
| $CH_2FCO_2H$  | 2,59   | $CF_3CH_2CO_2H$ | 3,06   | $(CF_3)_3COH$ | 5,40   |
| $CH_2ClCO_2H$ | 2,87   | $CH_3CH_2OH$    | 15,93  |               |        |
| $CH_2BrCO_2H$ | 2,90   | $CF_3CH_2OH$    | 12,39  |               |        |
| $CHF_2CO_2H$  | 1,33   | $(CH_3)_2CHOH$  | 17,10  |               |        |
| $CF_3CO_2H$   | 0,50   | $(CF_3)_2CHOH$  | 9,30   |               |        |

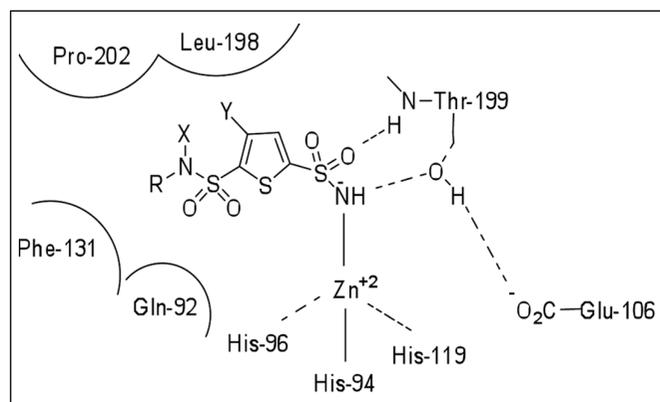
El  $pK_a$  de aminas alifáticas también disminuye con la introducción de flúor en la cadena carbonada (Tabla V) (Morgenthaler y col., 2007). Estudios sobre ciertos inhibidores del receptor de serotonina 5-HT<sub>1D</sub> humano demuestran que con un número suficiente de átomos de flúor cercanos, incluso se puede lograr que una amina se encuentre no-protonada a  $pH$  fisiológico, aumentando su biodisponibilidad (van Niel y col., 1999).

La basicidad de diferentes metanosulfonamidas afecta la potencia de estos compuestos como inhibidores de la enzima anhidrasa carbónica, una metaloenzima de zinc (Maren y Conroy, 1993; Kim y col., 2000). Cuando se comparan las afinidades de la trifluorometanosulfonamida ( $CF_3SO_2NH_2$ ;  $K_i = 2 \times 10^{-9}$  M;  $pK_a=5.8$ ) y la metanosulfonamida ( $CH_3SO_2NH_2$ ;  $K_i =$  alrededor de  $10^{-4}$  M;  $pK_a = 10.5$ ) por esta enzima, puede observarse que el derivado fluorado ofrece

una mayor potencia que el análogo hidrogenado, la cual coincide con la disminución en su  $pK_a$ . Esto quizás pueda atribuirse al incremento considerable en la acidez de la sulfonamida causado por la introducción del grupo trifluorometilo, lo que facilita la desprotonación y una mejor unión al ión Zinc (II) ubicado en el sitio catalítico de esta enzima (Figura 6) (Maren y Conroy, 1993; Kim y col., 2000; Boriack-Sjodin y col., 1998).

**Tabla V**  
Valores de  $pK_a$  para diversas etilaminas fluoradas

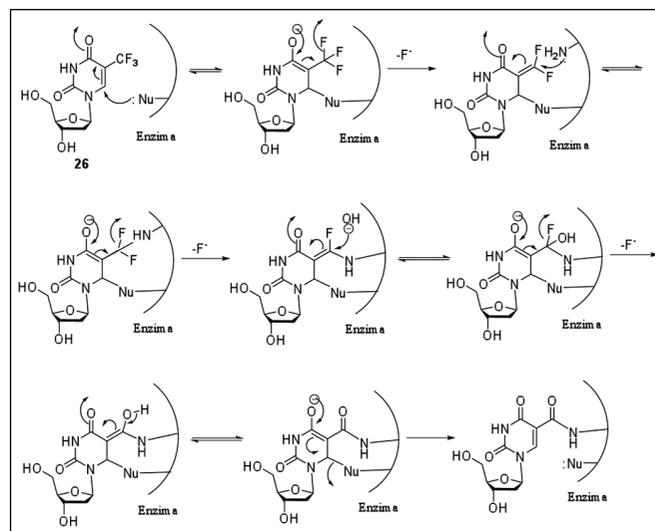
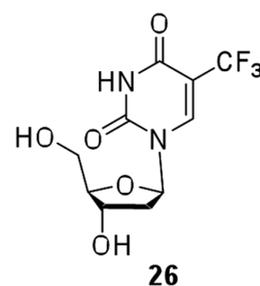
| Compuesto       | $pK_a$ |
|-----------------|--------|
| $CH_3CH_2NH_2$  | 10,7   |
| $CH_2FCH_2NH_2$ | 9,0    |
| $CHF_2CH_2NH_2$ | 7,3    |
| $CF_3CH_2NH_2$  | 5,7    |



**Figura 6.** Ejemplo de una sulfonamida inhibidora de la enzima anhidrasa carbónica en el sitio activo (Boriack-Sjodin y col., 1998).

Estudios de relación estructura química-actividad biológica del antiviral Efavirenz **6** han revelado que la presencia de grupo  $CF_3$  mejora la potencia de este fármaco mediante una disminución del  $pK_a$  del carbamato cíclico presente en la molécula, lo cual ayuda a establecer un puente de hidrógeno muy importante en su unión a la proteína receptora (Rabel y col., 2001).

La alta electronegatividad del flúor puede conllevar a ciertos mecanismos de acción bastante inusuales, tales como la inhibición irreversible de la enzima timidilato sintasa (TS) por parte de la Trifluridina **26** (Viroptic®, GlaxoSmithKline, antiviral) mediante la generación de un enlace covalente (Figura 7) (Purser y col., 2008; Santi y col., 1971). El mecanismo propuesto para esta inhibición envuelve la adición de Michael por parte de un nucleófilo del sitio activo de la enzima a la posición C-6 de la uridina, promovida por el gran efecto electroatractor ejercido por el grupo trifluorometilo en C-5.

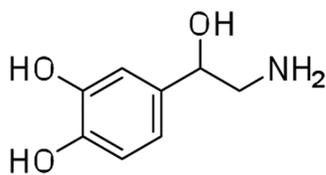
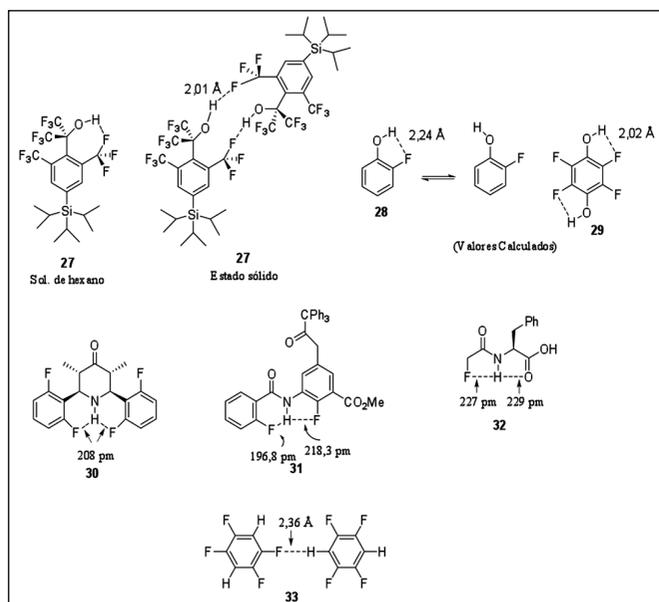


**Figura 7.** Mecanismo de acción propuesto para la inhibición de TS por el antiviral Trifluridina **26**.

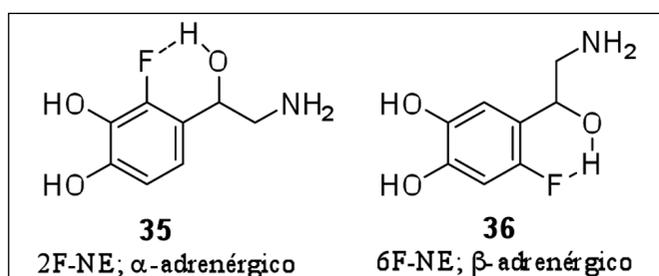
#### PUENTE DE HIDRÓGENO

La generación de puentes de hidrógeno con enlaces C-F y su importancia en las interacciones inter e intramoleculares en química medicinal ha generado una gran controversia (Purser y col., 2008; Ojima, 2009; Dunitz y Taylor, 1997; Bartolomé y col., 2007). A pesar de su elevada electronegatividad y sus tres pares de electrones libres, el flúor es considerado un pobre aceptor de puentes de hidrógeno como sustituyente. Esto se debe a la baja capacidad de polarización de los electrones que posee en sus orbitales  $s$  y  $p$  (O'Hagan y Harper, 1999; O'Hagan, 2003). Los cálculos estimados sobre la fuerza del enlace puente de hidrógeno C-F—H-O muestran que el mismo es aproximadamente dos veces más débil que la del enlace C-O—H-X ( $\sim 2,5$  kcal/mol) (Dolbier, 2005). La mayoría de los enlaces del tipo H—F que se han reportado en la literatura corresponden a enlaces de hidrógeno intra- e intermoleculares con el mismo compuesto (fluorofenoles, fluoroalcoholes, fluoroanilinas; Figura 8) (Barbarich y col., 1999; Katagiri y Uneyama, 2001; Dixon y Smart, 1991; Pham y col., 1998; Li y col., 2005), estos reportes atienden más a intereses estructurales en química orgánica que a su efecto sobre la actividad biológica. El enlace C-F es fundamentalmente no polarizable, pudiendo participar solo en la formación de puentes de hidrógeno

débiles, donde la existencia de los mismos pueden darse solo a distancias interatómicas bastante cortas, entre 2,0 y 2,3 Å (Bégué y Bonnet-Delpon, 2008). En ciertos casos, el enlace de hidrógeno con flúor puede afectar enormemente la conformación de isómeros, alterando su modo de acción biológica, tal es el ejemplo de los isómeros fluorados de la norepinefrina **34**. La 2-fluoro-norepinefrina (2F-NE, **35**) es un agonista  $\alpha$ -adrenérgico, mientras que su isómero 6-fluoro-norepinefrina (6F-NE, **36**) es un agonista  $\beta$ -adrenérgico; esta diferencia en la afinidad por receptores distintos ha sido atribuida a las diferentes conformaciones que adoptan ambos isómeros con motivo de la formación de un puente de hidrógeno intramolecular entre el enlace C-F del anillo aromático y el grupo hidroxilo de la cadena lateral (Figura 9) (Cantacuzene y col., 1979).

**34**

**Figura 8.** Ejemplos representativos de puentes de hidrógeno inter e intramoleculares con enlaces C-F.



**Figura 9.** Diferentes conformaciones para análogos fluorados de la norepinefrina mediante formación de puentes de hidrógeno intramoleculares.

El efecto electroattractor de grupos fluoroalquilados, tales como el trifluorometilo, modifica no solo el  $pK_a$  de funcionalidades cercanas (OH, NH, C=O) sino también su carácter como aceptor o donador de puentes de hidrógeno. La Tabla VI muestra tanto los valores de  $pK_a$ , como aquellos que representan la capacidad de un sustituyente para ser donador de puentes de hidrógeno (parámetro  $\alpha_2^H$ ) o bien aceptor de puentes de hidrógeno (parámetro  $\beta_2^H$ ) en una serie de compuestos fluorados (Bégué y Bonnet-Delpon, 2008). Existe un claro incremento en la capacidad donadora de puentes de hidrógeno del grupo OH presente en el  $CF_3CH_2OH$  ( $\alpha_2^H = 0,57$ ), frente a la del etanol ( $\alpha_2^H = 0,33$ ); de igual manera, se reduce considerablemente la tendencia de aceptar puentes de hidrógeno en la bis-trifluorometil acetona  $CF_3COCF_3$  ( $\beta_2^H = 0,20$ ), frente a la acetona ( $\beta_2^H = 0,48$ ).

**Tabla VI**

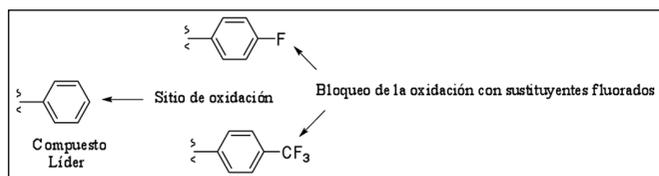
**Valores de  $pK_a$ ,  $\alpha_2^H$  y  $\beta_2^H$  para varios compuestos organofluorados en  $CCl_4$**

| Compuesto      | $pK_a$ | $\alpha_2^H$ | $\beta_2^H$ |
|----------------|--------|--------------|-------------|
| $CH_3CH_2NH_2$ | 10,7   | 0            | 0,70        |
| $CF_3CH_2NH_2$ | 5,9    |              | 0,36        |
| $CH_3CONEt_2$  |        |              | 0,71        |
| $CF_3CONEt_2$  |        |              | 0,47        |
| $CH_3CH_2OH$   | 15,9   | 0,33         | 0,44        |
| $CF_3CH_2OH$   | 12,4   | 0,57         | 0,18        |
| $CF_3CHOHCF_3$ | 9,3    | 0,77         | 0,03        |
| $CH_3COCH_3$   |        |              | 0,48        |
| $CF_3COCF_3$   |        |              | 0,20        |

#### EFEECTO SOBRE EL METABOLISMO DE FÁRMACOS

En términos generales, la introducción de flúor en moléculas con actividad biológica puede utilizarse para modificar el metabolismo de los mismos. Dependiendo del tipo de reacción metabólica involucrada (Fase I: oxidación, reducción, etc; Fase II: gluconidación, sulfatación, hidrólisis, etc), el flúor puede alterar bloqueando o favoreciendo una ruta metabólica determinada. Este halógeno, así como sus derivados fluoroalquilados (p.ej.  $CF_3$ ) se usan con gran frecuencia en el bloqueo de la hidroxilación metabólica en anillos aromáticos (Figura 10), una reacción oxidativa de Fase I (Bégué y Bonnet-Delpon, 2008).

Los grupos fluoroalquílicos, tales como  $CF_2$ ,  $CF_3$  y  $C_2F_5$  son prácticamente inertes a reacciones de oxidación metabólica, por lo que se utilizan con gran frecuencia para evitar la oxidación de grupos alquilo. El análogo trifluorometilado en la cadena alquímica



**Figura 10. Bloqueo de la hidroxilación aromática con sustituyentes fluorados.**

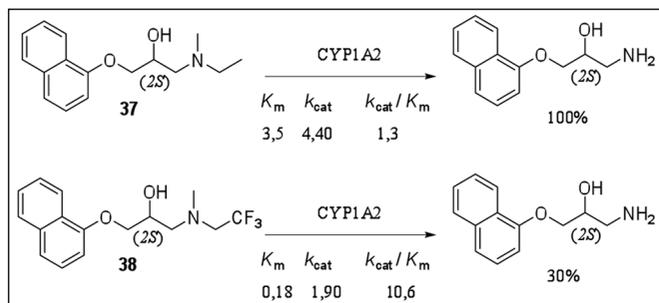
del propanolol **38**, presenta un proceso de desalquilación oxidativa que es, en proporción, 10 veces menor que la del propanolol **37** (Figura 11). En este caso, pese a que la hidroxilación del naftaleno no ocurre en el propanolol, esta representa un proceso oxidativo mayoritario en su análogo fluorado, lo cual demuestra claramente el cambio en la ruta metabólica por efecto de la sustitución con  $\text{CF}_3$  (Boulet y col., 2004).

La oxidación hepática de primer paso sobre la cadena lateral presente en el analgésico muscarínico **39** puede ser prácticamente eliminada al sustituir el grupo metilo terminal por trifluorometilo **40**. Esta sustitución aumenta considerablemente la concentración plasmática del fármaco, además eleva la afinidad por los receptores muscarínicos gastrointestinales, mejorando su actividad farmacológica (Figura 12) (Mitch y col., 1997).

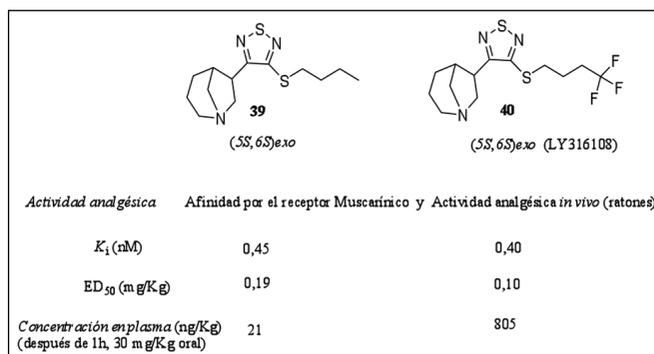
La sustitución con un grupo trifluorometilo en la posición C-10 del fármaco antimalárico Artemeter **41**, mejora considerablemente la estabilidad metabólica del compuesto original frente a la hidrólisis (Figura 13). El  $\text{CF}_3$ -Artemeter **42** es unas 45 veces más estable que **41** bajo condiciones simuladas de acidez estomacal, además de mejorar también la actividad antimalárica *in vivo* en ratones infectados con *Plasmodium berghei* NK173, eliminando completamente la parasitemia durante el período total de observación (25 días) (Magueur y col., 2004).

#### METABOLISMO DE FÁRMACOS ORGANOFUORADOS Y TOXICIDAD

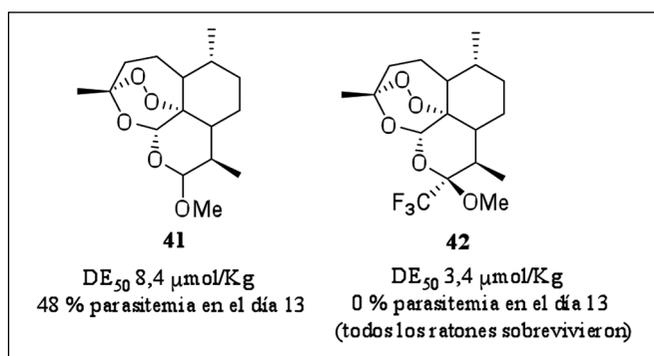
La inclusión de un átomo de flúor en una molécula de fármaco puede tener una influencia importante



**Figura 11. Metabolismo de análogos fluorados del propanolol mediante Citocromo P recombinante (CYP1A2) (Boulet y col., 2004).**



**Figura 12. Aumento en la concentración plasmática de un analgésico muscarínico mediante la reducción de su metabolismo oxidativo a través de la sustitución con un grupo trifluorometilo (Mitch y col., 1997).**

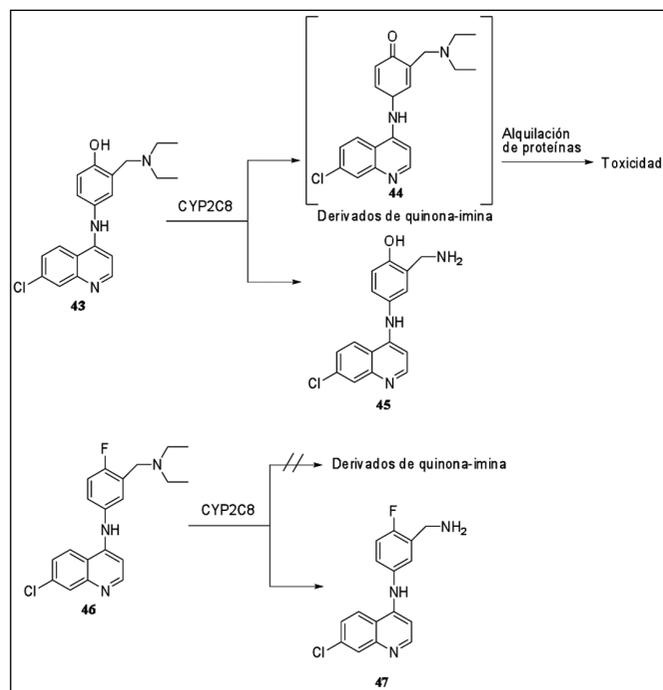


**Figura 13. Dosis efectiva 50 ( $DE_{50}$ ) del derivado C-10 trifluorometilado del Artemeter **41** y porcentajes de parasitemia después de 13 días de tratamiento en ratones infectados con *Plasmodium berghei* NK173 (Magueur y col., 2004).**

en la generación de cambios notorios sobre la disposición del mismo, así como en la interacción con el blanco farmacológico de éste (Park y col., 2001). Por otra parte, la sustitución con flúor afecta profundamente la disposición de un fármaco en términos de distribución, depuración, ruta y extensión de su metabolismo (Park y col., 1994), pudiendo ser utilizada para poder disociar las propiedades farmacológicas y toxicológicas de un fármaco en el caso de que para éste haya sido identificado algún metabolito tóxico que pueda ser evitado (Park y col., 2001). Así, puede observarse cómo la sustitución con un átomo de flúor, es capaz de bloquear el sitio de un ataque metabólico, basándose en el hecho de que el enlace carbono-flúor es mucho más resistente al ataque químico directo de sistemas enzimáticos tales como el Citocromo P-450, comparado con el enlace carbono-hidrógeno (Figuras 10 y 12). Adicionalmente, su efecto puede trasladarse a grupos cercanos a través de resonancia/inductividad alterando el metabolismo de los mismos (Kirk y col., 1982; Morgan y col., 1992).

El bloqueo de una bioactivación metabólica conducente a un metabolito tóxico puede observarse en ciertos derivados fluorados de la 4-aminoquinolina antimalárica Amodiaquina **43** (Figura 14). El metabolismo de este fármaco promueve la formación de un

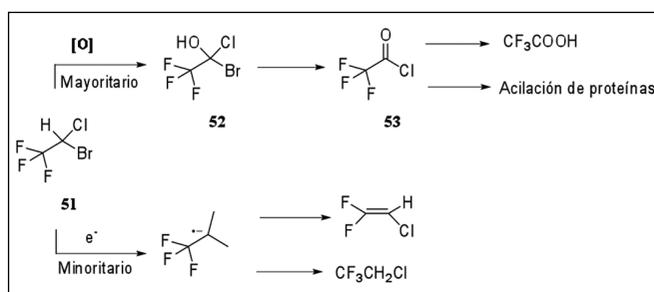
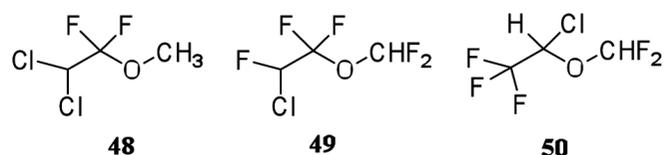
intermediario quinona-imina **44** responsable de efectos no deseables tales como hepatotoxicidad y agranulocitosis (O'Neill y col., 2004), que puede bloquearse mediante el uso de una sustitución isostérica del grupo hidroxilo presente por flúor; sin embargo, al hacerse este cambio también se induce una mayor proporción del proceso de *N*-desalquilación oxidativa que sufre la amina terciaria de la cadena *N,N*-dietil lateral, lo cual puede reducir su biodisponibilidad.



**Figura 14. Metabolismo de la Amodiaquina **43** y Fluoroamodiaquina **46**.**

Un caso interesante de toxicidad metabólica de agentes fluorados lo representa el desarrollo de fármacos utilizados en anestesia general, tales como el metoxifluorano **48**, empleado extensamente durante los años sesenta hasta el descubrimiento de su nefrotoxicidad (Eger y col., 1986). Dicha toxicidad ha sido asociada al extenso metabolismo de este anestésico (>40%) acompañada de altas concentraciones serológicas de ión fluoruro inorgánico (Mazze y col., 1971). En años más recientes, esta teoría ha sido cuestionada debido a que otros derivados anestésicos fluorados como el enflurano **49** e isoflurano **50**, generan niveles modestos de ión fluoruro en suero, pero sólo presentan una escasa nefrotoxicidad para el primero y prácticamente ninguna para el segundo (Eger y col., 1986; Mazze y col., 1974; Mazze y col., 1977). El primer anestésico fluorado moderno de amplio uso fue el halotano **51**, sin embargo el uso clínico del mismo ha sido limitado debido a la hepatotoxicidad asociada a su metabolismo (National halothane study, 1966). Se han propuesto dos rutas principales para el metabolismo de este fármaco trifluorometilado (Figura 15): (a) una vía reductiva, aso-

ciada con un aumento en el nivel de transaminasas, la cual genera radicales libres y que conlleva luego a una posterior reducción y eliminación de ión fluoruro para formar 1-cloro-2,2-difluoroetileno y (b) una oxidativa donde se genera cloruro de trifluoroacetilo **53** ( $\text{CF}_3\text{COCl}$ ), el cual es una especie reactiva altamente electrofílica capaz de unirse covalentemente a proteínas (asociada con su hepatotoxicidad), o bien hidrolizarse para producir ácido trifluoroacético que posteriormente se excreta a través de la orina.

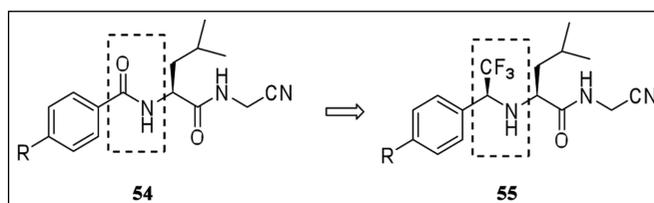


**Figura 15. Metabolismo general del Halotano **51**.**

## ISOSTERISMO

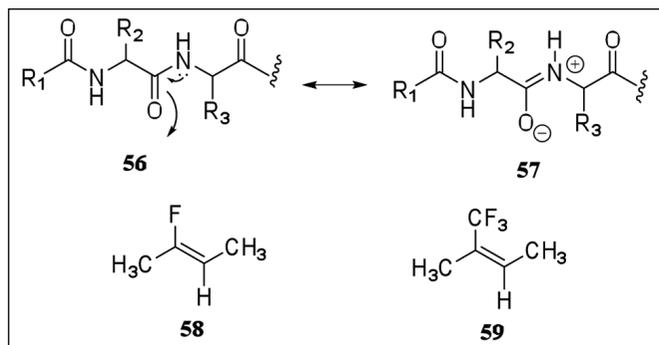
Aparte de su frecuente utilización como isómero de grupos alquilo (isopropilo y etilo) fundamentalmente por su volumen estérico (Bott, 1980; Wolf y col., 1995; Leroux, 2004; Jagodzinska y col., 2009), el  $\text{CF}_3$  se ha empleado con éxito en la sustitución bioisostérica de la funcionalidad amida presente en el enlace peptídico (Figura 16) (Black y col., 2005; Sani y col., 2007). El grupo trifluorometilo del fragmento trifluoroetilamino presente en ciertos inhibidores de la enzima captesina K, ha funcionado como un excelente isómero del enlace amida, generando una amina prácticamente no básica que posee una muy buena capacidad para formar puentes de hidrógeno (donadora) debido al efecto inductivo electrotractor del  $\text{CF}_3$  adyacente (Black y col., 2005).

En vista de las estructuras de resonancia presentes en el enlace amida, que muestran una clara polarización hacia el átomo de oxígeno electronegativo,



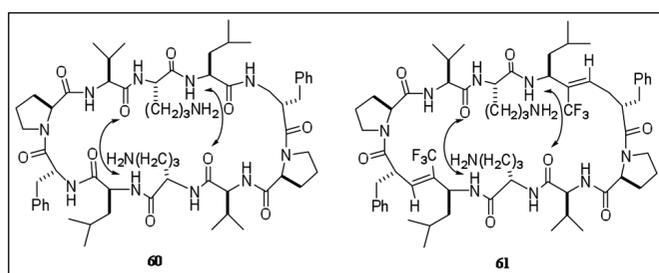
**Figura 16. Uso del fragmento trifluoroetilamino como bioisómero del grupo amida.**

así como la característica de doble enlace parcial que ofrece el enlace  $N-C_{C=O}$  (Figura 17), también se han empleado los sistemas fluoroetileno **58** y trifluorometileno **59** como biosósteros fluorolefínicos de este grupo (Datar y col., 2004; Allmendinger y col., 1990; Xiao y col., 2005; Wipf y col., 1998).



**Figura 17. Estructuras de resonancia del enlace amida en péptidos e isósteros fluorados.**

El isótero (*E*)-trifluometil etileno ha sido utilizado con éxito en análogos fluorados del antibiótico Gramicidina **60** (Xiao y col., 2005). Esta funcionalidad se empleó para reemplazar el enlace peptídico presente entre los aminoácidos leucina (Leu) y valina (Val) de este antibiótico, generando al análogo **61** (Figura 18). Pese a ciertas diferencias conformacionales producidas por el volumen estérico del grupo  $CF_3$ , estudios de RMN en solución a temperatura variable (NOESY) y cristalografía de rayos X han confirmado que los dos puentes de hidrógeno intramoleculares presentes entre los grupos NH (Val) y  $C=O$  (Leu) de la Gramicidina **60**, se mantienen en el análogo fluorado **61**. La actividad antibiótica de **61** frente a *Bacillus subtilis* es equivalente a la de **60**.



**Figura 18. Análogo del antibiótico Gramicidina **60** con el isótero del enlace peptídico (*E*)-trifluometil etileno (Xiao y col., 2005).**

## Conclusiones

El grupo trifluorometilo puede ejercer un profundo e importante efecto en moléculas con actividad biológica, pudiendo alterar parámetros fisicoquímicos tales como el efecto estérico, lipofiliidad,  $pK_a$ , polarizabilidad y la formación de puentes de hidrógeno, lo cual conlleva a cambios en parámetros farmacocinéticos tales como la absorción y el metabolis-

mo. Su uso racional en el diseño de fármacos sin duda, puede contribuir a mejorar propiedades de moléculas líderes, generando compuestos con una mayor afinidad a receptores biológicos y propiedades farmacocinéticas apropiadas para su uso clínico posterior. El éxito en la utilización del grupo  $CF_3$  ha quedado reflejado en el hecho de cada vez con más frecuencia pueden encontrarse moléculas trifluorometiladas en el mercado farmacéutico mundial, tales como el inhibidor de la bomba de protones Lanzoprazol **5**, el antiviral Efavirenz **6** y el inhibidor de Ciclooxigenasa 2 Celecoxib **15**.

## Referencias bibliográficas

- Abraham MH, Grellier PL, Prior DV, Duce PP, Morris JJ, Taylor PJ. 1989. Hydrogen bonding. Part 7. A scale of solute hydrogen-bond acidity based on log *K* values for complexation in tetrachloromethane. *J Chem Soc Perkin Trans. 2*:699-711.
- Allmendinger T, Felder E, Hungerbühler E. 1990. Fluoroolefin dipeptide isosteres-II. Enantioselective synthesis of both antipodes of the Phe-Gly dipeptide mimic. *Tetrahedron Lett* 31: 7301-7304.
- Avdeef A. 2001. Physicochemical profiling (solubility, permeability and charge state). *Curr Top Med Chem* 1: 277-351.
- Banks JW, Batsanov AS, Howard JAK, O'Hagan D, Rzepa H S, Martin-Santamaria S. 1999. The preferred conformation of  $\alpha$ -fluoroamides. *J Chem Soc Perkin Trans 2*: 2409-2411.
- Barbarich TJ, Rithner CD, Miller SM, Anderson OP, Strauss SH. 1999. Significant inter- and intramolecular O-H...F-C hydrogen bonding. *J Am Chem Soc* 121: 4280-4281.
- Bartolomé C, Espinet P, Martín-Alvarez JM. 2007. Is there any bona fide example of O-H...F-C bond in solution? The cases of  $HOC(CF_3)_2(4-X-2,6-C_6H_2(CF_3)_2)$  ( $X = Si(i-Pr)_3, CF_3$ ). *Chem Commun* 4384-4386.
- Bégué JP, Bonnet-Delpon D. 2008. *Bioorganic and Medicinal Chemistry of Fluorine*. Wiley, New Jersey, USA.
- Black WC, Baylya CI, Davis DE, Desmarais S, Falguyret JP, Léger S, Li CS, Massé F, McKay DJ, Palmer JT, Percival MD, Robichaud J, Tsou N, Zamboni R. 2005. Trifluoroethylamines as amide isosteres in inhibitors of cathepsin K. *Bioorg Med Chem Lett* 15: 4741-4744.
- Bondi A. 1964. van der Waals volumes and radii. *J Phys Chem* 68: 441-451.
- Boriack-Sjodin PA, Zeitlin S, Chen HH, Crenshaw L, Gross S, Dantanarayana A, Delgado P, May JA, Dean T, Christianson DW. 1998. Structural analysis of inhibitor binding to human carbonic anhydrase II. *Protein Science* 7: 2483-2489.
- Bott G, Field LD, Sternhell S. 1980. Steric effect. A study of a rationally designed system. *J Am Chem Soc* 102: 5618-5626.

- Boulet SL, Mathes BM, Hudziak KJ, Boot JR, Clugery AH, Findlay JD, Lavis AA, Mahadevan S, Wallace L, Filla SA. 2004. Effect of hydroxylation and fluorination of aryloxy phenylpropanamine serotonin and norepinephrine reuptake inhibitors on CYP450 2D6 dependant metabolism. *in* Abstracts of Papers, 228th National Meeting of the ACS, Philadelphia, PA, USA, August 22-26, p. 58.
- Cantacuzene D, Kirk KL, McCulloh DH, Creveling CR. 1979. Effect of fluorine substitution on the agonist specificity of norepinephrine. *Science* 204: 1217-1219.
- Chou TC, Dong HJ, Rivkin A, Yoshimura F, Gabarda AE, Cho YS, Tong WP, Danishefsky SJ. 2003. Design and total synthesis of a superior family of epothilone analogues, which eliminate xenograft tumors to a nonrelapsable state. *Angew. Chem Int Ed.* 42: 4762-4767.
- Cotterill IC, Rich JO. 2005. Chemoenzymatic Synthesis of *N*-Trifluoroacetyl Doxorubicin-14-Valerate (Valrubicin). *Org Process Res Dev* 9: 818.
- Damon DB, Dugger RW, Magnus-Aryitey G, Ruggeri RB, Wester RT, Tu M, Abramov Y. 2006. Synthesis of the CETP inhibitor torcetrapib: The resolution route and origin of stereoselectivity in the iminium ion cyclization. *Org Process Res Dev* 10: 464-471.
- Datar P, Srivastava S, Coutinho E, Govil G. 2004. Substance P: structure, function, and therapeutics. *Curr Top Med Chem* 4:75-103.
- Dean JA. 1999. *Lange's Handbook of Chemistry*, 15th Ed., McGraw-Hill, New York, USA.
- Dixon DA, Smart BE. 1991. *In* Selective Fluorination in Organic and Bioorganic Chemistry. Welch JT. Ed., ACS Symposium Series 456, ACS, Washington DC, USA, pp. 18.
- Dolbier Jr. WR. 2005. Fluorine Chemistry at the Millennium. *J Fluorine Chem* 126: 157-163.
- Dunitz JD, Taylor R. 1997. Organic Fluorine Hardly Ever Accepts Hydrogen Bonds. *Chem Eur J* 3: 89-97.
- Eger EI, Smuckler EA, Ferrell LD, Goldsmith CH, Johnson BH. 1986. Is enflurane hepatotoxic? *Anesth Analg* 65: 21-30.
- Filler R, Saha R. 2009. Fluorine in Medicinal Chemistry: a century of Progress and a 60-year retrospective of selected highlights. *Future Med Chem* 1: 779-791.
- Ganguly T, Mal S, Mukherjee S. 1983. Hydrogen bonding ability of fluoroalcohols. *Spectrochim Acta. Part A*, 39A: 657-660.
- Gerebtzoff G, Li-Blatter X, Fischer H, Frentzel A, Seelig A. 2004. Halogenation of Drugs Enhances Membrane Binding and Permeation. *Chem Med Chem*, 5: 676-684.
- Hagmann WK. 2008. The Many Roles for Fluorine in Medicinal Chemistry. *J Med Chem* 51: 4359-4369.
- Hansch C, Leo A. 1979. *Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, USA.
- Hansch C, Leo A, Hoekman DH. 1995. *Exploring QSAR: Fundamentals and Applications in Chemistry and Biology*, American Chemical Society, Washington, DC, USA.
- Hansch C, Leo A, Hoekman DH. 1995. *Exploring QSAR: Hydrophobic, electronic, and steric constants*, American Chemical Society, Washington, DC, USA.
- Humphreys JL, Lowes DJ, Wesson KA, Whitehead RC. 2006. Arene *cis*-dihydrodiols-useful precursors for the preparation of antimetabolites of the shikimic acid pathway: application to the synthesis of 6,6-difluoroshikimic acid and (6*S*)-6-fluoroshikimic acid. *Tetrahedron* 62: 5099-5108.
- Humphrey JM. 2003. Medicinal chemistry of selective neurokinin-1 antagonists. *Curr Top Med Chem* 3: 1423-1435.
- Jagodzinska M, Huguenot F, Candiani G, Zanda M. 2009. Assessing the Bioisosterism of the Trifluoromethyl Group with a Protease Probe. *Chem Med Chem* 4: 49-51.
- Katagiri T, Uneyama K. 2001. Chiral recognition by multi-center single proton hydrogen bonding of trifluorolactates. *Chem Lett* 1330-1331.
- Kim CY, Chang JS, Doyon JB, Baird Jr. TT, Fierke CA, Jain A, Christianson DW. 2000. Contribution of fluorine to protein-ligand affinity in the binding of fluoroaromatic inhibitors to carbonic anhydrase II. *J Am Chem Soc* 122: 12125-12134.
- Kim D, Wang L, Beconi M, Eiermann GJ, Fisher MH, He H, Hickey GJ, Kowalchick JE, Leitinger B, Lyons K, Marsilio F, McCann ME, Patel RA, Petrov A, Scapin G, Patel SB, Roy RS, Wu JK, Wyvratt MJ, Zhang BB, Zhu L, Thornberry NA, Weber AE. 2005. (2*R*)-4-Oxo-4-(3-(trifluoromethyl)-5,6-dihydro(1,2,4)triazolo(4,3-*a*)pyrazin-7(8*H*)-yl)-1-(2,4,5 trifluorophenyl)butan-2-amine: A potent, orally active dipeptidyl peptidase IV inhibitor for the treatment of type 2 diabetes. *J Med Chem* 48: 141-151.
- Kirk KL, Cantacuzene D, Collins B, Chen GT, Nimit Y, Creveling CR. 1982. Syntheses and adrenergic agonist properties of ringfluorinated isoproterenols. *J Med Chem* 25: 680-684.
- Kiselyov AS, Strekowski L. 1996. The trifluoromethyl group in organic synthesis. A review. *Org Prep Proc Intl* 28: 289-318.
- Koch B, Sewald N, Jakubke I HD, Burger K. 1996. Synthesis and Incorporation of  $\alpha$ -Trifluoromethyl-Substituted Amino Acids into Peptides, *In* Biomedical Frontiers of Fluorine Chemistry; Ojima, I., et al.; ACS Symposium Series; American Chemical Society: Washington, DC, USA.
- Kurumbail RG, Stevens AM, Gierse JK, McDonald JJ, Stegeman RA, Pak JY, Gildehaus D, Miyashiro JM, Penning, TD, Seibert K, Isakson PC, Stallings WC. 1996. Structural basis for selective inhibition of cyclooxygenase-2 by anti-inflammatory agents. *Nature* 384: 644-648.
- Leroux F. 2004. Atropisomerism, biphenyls, and fluorine: A comparison of rotational barriers and twist angles. *Chem Bio Chem* 5: 644-649.
- Li C, Ren SF, Hou JL, Yi HP, Zhu SZ, Jiang XK, Li ZT. 2005. F···H-N Hydrogen bonding driven foldamers: Efficient receptors for dialkylammonium ions. *Angew Chem Int, Ed. Engl* 44: 5725-5729.

- Lide DR. 2005. Handbook of Chemistry and Physics, 86th Ed., CRC Press, New York, USA.
- López SE. 2010. The Trifluoromethyl Group in Organic Synthesis: Recent Developments. *Curr Org Synth* 7: 402.
- Magueur G, Crousse B, Charneau S, Grellier P, Bégué JP, Bonnet-Delpon D. 2004. Fluoroartemisinin: Trifluoromethyl Analogues of Artemether and Artesunate. *J Med Chem* 47: 2694-2699.
- Maren T, Conroy CW. 1993. A new class of carbonic anhydrase inhibitor. *J Biol Chem* 268: 26233-26239.
- Marshal GR, Clare JD, Dunbar JB, Jr Smith GD, Zabrocki J, Redlinski AS, Leplawy MT. 1998. Conformational effects of chiral alpha, alpha-dialkyl amino acids. I. C-terminal tetrapeptides of emerimicin containing alpha-ethylalanine. *Int J Pept Protein Res* 32: 544-555.
- Mazze RI, Calverley RK, Smith NT. 1977. Inorganic fluoride nephrotoxicity: prolonged enflurane and halothane anesthesia in volunteers. *Anesthesiology* 46: 265-271.
- Mazze RI, Cousins MJ, Barr GA. 1974. Renal effects and metabolism of isoflurane in man. *Anesthesiology* 40: 536-542.
- Mazze RI, Trudell JR, Cousins MJ. 1971. Methoxyflurane metabolism and renal dysfunction: clinical correlation in man. *Anesthesiology* 35: 247-252.
- McClinton MA, McClinton DA. 1992. Trifluoromethylation and related reactions in organic chemistry. *Tetrahedron* 48: 6555-6666.
- MedAdNews 200-World's Best-Selling Medicines, MedAdNews, July 2007. ([http://en.wikipedia.org/wiki/List\\_of\\_top\\_selling\\_drugs](http://en.wikipedia.org/wiki/List_of_top_selling_drugs)).
- Mitch CH, Brown TJ, Bymaster FP, Calligaro DO, Dieckman D, Merrit L, Peters SC, Quimby SJ, Shannon HE, Shipley LA, Ward JS, Hansen K, Olesen PH, Sauerberg P, Sheardown MJ, Sweedberg MDB, Suzdak P, Greenwood B. 1997. Muscarinic Analgesics with Potent and Selective Effects on the Gastrointestinal Tract: Potential Application for the Treatment of Irritable Bowel Syndrome. *J Med Chem* 40: 538-546.
- Morgan P, Maggs JL, Page PCB, Park BK. 1992. Oxidative dehalogenation of 2-fluoro-17 $\alpha$ -ethynyl-estradiol in vivo. A distal structure-metabolism relationship of 17 $\alpha$ -ethynylation. *Biochem Pharmacol* 44: 1717-1724.
- Morgenthaler M, Schweizer E, Hoffmann-Roder A, Benini F, Martin RE, Jaeschke G, Wagner B, Fischer H, Bendels S, Zimmerli D, Schneider J, Diederich F, Kansy M, Müller K. 2007. Predicting and tuning physicochemical properties in lead optimization: amine basicities. *Chem Med Chem* 2: 1100-1115.
- Nagle JK. 1990. Atomic polarizability and electronegativity. *J Am Chem Soc* 112: 4741-4747.
- National Halothane Study. 1966. Summary of the national halothane study. Possible association between halothane anesthesia and postoperative hepatic necrosis. *JAMA* 197: 775-788.
- O'Hagan D. 2003. In Proceedings of the International Symposium on Fluorine in the Life Sciences, Bürgenstock, Switzerland.
- O'Hagan D, Harper DB. 1999. Fluorine-containing natural products. *J Fluorine Chem* 100: 127-133.
- Ojima I. 2009. Fluorine in Medicinal Chemistry and Chemical Biology. Wiley-Blackwell, New York USA.
- O'Neill PM, Ward SA, Berry NG, Jeyadevan JP, Biagini GA, Asadollady E, Park BK, Bray PG. 2006. Medicinal Chemistry Perspective on 4-Aminoquinoline Antimalarial Drugs. *Curr Top Med Chem* 6: 479-507.
- Park BK, Kitteringham NR. 1994. Effects of fluorine substitution on drug metabolism-pharmacological and toxicological implications. *Drug Metab Rev* 26: 605-643.
- Park BK, Kitteringham NR, O'Neill PM. 2001. Metabolism of fluorine-containing drugs. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 41: 443-470.
- Pham M, Gdaniec M, Polonski T. 1998. Three-center CF $\cdots$ HN intramolecular hydrogen bonding in the 2,6-bis(2,6-difluorophenyl)piperidine systems. *J Org Chem* 63: 3731-3734.
- Purser S, Moore PR, Swallow S, Gouverneur V. 2008. Fluorine in medicinal chemistry. *Chem Soc Rev* 37: 320-330.
- Rabel SR, Sun S, Maurin MB. 2001. Electronic and Resonance Effects on the Ionization of Structural Analogues of Efavirenz. *AAPS Pharm Sci* 3: 1-4.
- Sani M, Volonterio A, Zanda M. 2007. The trifluoroethylamine function as peptide bond replacement. *ChemMedChem*, 2: 1693-1700.
- Santi DV, Sakai TT. 1971. Thymidylate synthetase. Model studies of inhibition by 5-trifluoromethyl-2'-deoxyuridylic acid, *Biochemistry*, 10: 3598-3607.
- Shimizu M, Hiyama T. 2005. Modern synthetic methods for fluorinesubstituted target molecules. *Angew Chem Int Ed*. 44: 214-231.
- Smart BE. 1994. in *Organofluorine Chemistry: Principles and Commercial Applications*, Bank RE, Smart BE, Tattlow JC. Eds., Plenum Press, New York, pp. 58.
- Smart BE. 2001. Fluorine substituent effects (on bioactivity). *J Fluorine Chem* 109: 3-11.
- Tan LS, Chen CY, Tillyer RD, Grabowski EJJ, Reider PJ. 1991. A novel, highly enantioselective ketone alkynylation reaction mediated by chiral zinc aminoalkoxides. *Angew Chem Int Ed*. 38: 711-713.
- Thalladi VR, Weiss HC, Bläser D, Boese R, Nangia A, Desiraju GR. 1998. C-H $\cdots$ F Interactions in the crystal structures of some fluorobenzenes. *J Am Chem Soc* 120: 8702-8710.
- Toniolo C, Benedetti E. 1991. Structures of polypeptides from  $\alpha$ -amino acids disubstituted at the  $\alpha$ -carbon. *Macromolecules* 24: 4004-4009.
- van Niel MB, Collins I, Beer MS, Broughton HB, Cheng SKF, Goodacre SC, Heald A, Locker KL, MacLeod AM, Morrison D, Moyes CR, O'Connor D, Pike A, Rowley M, Russell MGN, Sohal B, Stanton JA, Thomas S, Verrier H, Watt AP, Castro JL. 1999. Fluorination of 3-(3-(Piperidin-1-yl)propyl)indoles and 3-(3-(Piperazin-1-yl)propyl)indoles

- Gives Selective Human 5-HT<sub>1D</sub> Receptor Ligands with Improved Pharmacokinetic Profiles. *J Med Chem* 42: 2087-2104.
- Wilkinson JA. 1992. Recent advances in the selective formation of the C-F bond. *Chem Rev* 92: 505-519.
- Wipf P, Henninger TC, Geib SJ. 1998. Methyl- and (trifluoromethyl)alkene peptide isosteres: synthesis and evaluation of their potential as  $\beta$ -turn promoters and peptide mimetics. *J Org Chem* 63: 6088-6089.
- Wolf C, König WA, Roussel C. 1995. Influence of substituents on the rotational energy barrier of atropisomeric biphenyls-Studies by polarimetry and dynamic gas chromatography. *Liebigs Ann* 781-786.
- Xiao JB, Weisblum B, Wipf P. 2005. Electrostatic versus steric effects in peptidomimicry: Synthesis and secondary structure analysis of gramicidin S analogues with (*E*)-alkene peptide isosteres. *J Am Chem Soc* 127: 5742-5743.
- Zaldini Hernandez M, Cavalcanti SMT, Moreira DRM, Filgueira de Azevedo Jr W, Lima Leite AC. 2010. Halogen Atoms in the Modern Medicinal Chemistry: Hints for the Drug Design *Curr Drug Targets* 11: 303-314.
- Zhao YH, Abraham MH, Zissimos AM. 2003. Fast calculation of van der Waals volume as a sum of atomic and bond contributions and its application to drug compounds. *J Org Chem* 68:7368-7373.

# ÍNDICE DE DESCRIPTORES

Vol. 74 - Nº 2 - 2011

|  |    |
|--|----|
| <b>A</b>                                 |    |
| Actividad antioxidante .....             | 10 |
| Azitromicina.....                        | 2  |
| <b>C</b>                                 |    |
| Catalasa.....                            | 17 |
| Cebada.....                              | 10 |
| Cerveza .....                            | 10 |
| Compuestos antichagásicos .....          | 25 |
| <b>D</b>                                 |    |
| Derivados del 5-nitrofurano.....         | 25 |
| Difusión en agar .....                   | 2  |
| <b>E</b>                                 |    |
| Ensayo de los capilares-dos cámaras..... | 31 |
| <b>F</b>                                 |    |
| Flúor.....                               | 40 |
| <b>G</b>                                 |    |
| Glutación peroxidasa.....                | 17 |
| <b>L</b>                                 |    |
| <i>Leishmania</i> .....                  | 31 |
| Lúpulo .....                             | 10 |
| <b>M</b>                                 |    |
| Método microbiológico .....              | 2  |
| <b>P</b>                                 |    |
| Polifenoles .....                        | 10 |
| Posicionamiento molecular .....          | 25 |
| Preeclampsia.....                        | 17 |
| <b>Q</b>                                 |    |
| Química Medicinal.....                   | 40 |
| Quimiotaxis .....                        | 31 |
| <b>S</b>                                 |    |
| Superoxido dismutasa .....               | 17 |
| <b>T</b>                                 |    |
| Tempol .....                             | 17 |
| Trifluorometilo .....                    | 40 |
| <b>V</b>                                 |    |
| Validación .....                         | 2  |

---

# ÍNDICE DE AUTORES

Vol. 74 - Nº 2 - 2011

---

|                          |    |
|--------------------------|----|
| <b>A</b>                 |    |
| Amesty Ángel .....       | 25 |
| Avendaño Milagros .....  | 25 |
| <b>B</b>                 |    |
| Bou Rached Lizet .....   | 10 |
| <b>C</b>                 |    |
| Camacho Elsa .....       | 17 |
| <b>D</b>                 |    |
| Díaz Emilia .....        | 31 |
| <b>G</b>                 |    |
| Garcés Alessandra .....  | 2  |
| <b>I</b>                 |    |
| Israel Anita .....       | 17 |
| <b>K</b>                 |    |
| Köhidai László .....     | 31 |
| <b>L</b>                 |    |
| López Simón E .....      | 40 |
| <b>M</b>                 |    |
| Monasterios Melina ..... | 25 |
| <b>P</b>                 |    |
| Padilla Fanny C .....    | 10 |
| Ponte-Sucre Alicia ..... | 31 |
| <b>R</b>                 |    |
| Regnault Miriam .....    | 2  |
| Rincón Alicia M .....    | 10 |
| Ríos Arturo .....        | 31 |
| Rivas Iliana .....       | 2  |
| Romero Ángel .....       | 40 |
| Rossi Luisa .....        | 2  |
| <b>S</b>                 |    |
| Silva José Antonio ..... | 17 |
| <b>V</b>                 |    |
| Vanegas Oriana .....     | 31 |

# Normas de Publicación

La *Revista de la Facultad de Farmacia* fue creada en 1959 y constituye una publicación periódica, arbitrada, de aparición semestral, destinada a promover la difusión de artículos científicos en el área de las ciencias de la salud, así como en áreas básicas y aplicadas relacionadas con la obtención, ensayos, análisis, usos y producción de medicamentos, alimentos, cosméticos, tóxicos y sustancias relacionadas.

Está basada en la existencia de un Comité Editorial, consistente en un editor-director, editores asociados y una Comisión Editorial. Los manuscritos que publica pueden ser de autores nacionales o extranjeros, residentes o no en Venezuela, en español o inglés. Los manuscritos deben ser trabajos inéditos y su aceptación por el Comité Editorial implica que no ha sido publicado, ni está en proceso de publicación, en otra revista en forma parcial o total. Igualmente podrán ser publicadas revisiones o cartas al editor. El manuscrito deberá ir acompañado de una carta de solicitud firmada por el autor responsable. En caso de ser aceptado, el Comité Editorial no se hace responsable del contenido expresado en el trabajo publicado. Aquellos manuscritos que no se acojan a las condiciones indicadas o que sean rechazados por dos de los árbitros que dictaminen sobre su calidad y contenido, no serán publicados y serán devueltos a los autores.

## Forma y preparación de los manuscritos

Para la publicación de trabajos científicos en la *Revista de la Facultad de Farmacia*, los mismos estarán de acuerdo con los requisitos originales para su publicación en revistas biomédicas, según el Comité Internacional de Editores de Revistas Médicas (2003). Además, los editores asumen que los autores de los artículos conocen y han aplicado en sus estudios la ética de experimentación (Declaración de Helsinki, y el *Código de Bioética y Bioseguridad*, 2da. edición, 2002, del Ministerio de Ciencia y Tecnología y el Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología).

Los manuscritos deben ser enviados en original y dos copias impresas dentro de un sobre de papel grueso, incluyendo copias fotográficas y figuras entre cartones para evitar que se doblen, con una versión en disquete o CD-ROM. Los manuscritos deberán ser enviados al Editor-Director a la Dirección de la Revista, en el Instituto de Investigaciones Farmacéuticas de la Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela, Los Chaguaramos, Apartado Postal 40109, Nueva Granada, Caracas, Venezuela.

Los manuscritos deben estar escritos a doble espacio, en papel Bond blanco tamaño carta, por una cara, sin borrones ni tachaduras y con márgenes de 2,5 cm. Todas las páginas deben ser numeradas correlativamente, empezando por el título. El número de la página deberá colocarse en el ángulo superior derecho de cada página. Su longitud no debe exceder de veinte páginas, excluyendo el espacio destinado a figuras, tablas y leyendas.

Cada uno de los componentes del original deberá comenzar en página aparte, en la secuencia siguiente:

- a. Página del título, nombre completo de(l) (los) autor(es) y su filiación institucional.
- b. Resumen y palabras clave.
- c. Texto (Introducción, materiales y métodos, resultados, discusión, conclusiones y recomendaciones).
- d. Agradecimientos.
- e. Referencias bibliográficas.
- f. Tablas: cada una de las tablas en páginas aparte, completas, con título y llamadas al pie de la tabla.
- g. Figuras: cada una en página aparte con su título.
- h. Leyenda de las figuras.

La página del título deberá contener:

1. Título del artículo en español e inglés, conciso e informativo, no mayor de veinte palabras.

Primer nombre e inicial del segundo nombre y apellido(s) de los autores (con una llamada para identificar al pie de página al autor responsable de la correspondencia, indicando su dirección electrónica). Afiliación institucional de cada uno de los autores.

2. La segunda página debe contener un resumen en español e inglés, con un máximo de 250 palabras. El texto debe dar una visión general del trabajo, señalar someramente el propósito, los métodos y los hallazgos. No se deben citar referencias.

El resumen debe hacer énfasis en los aspectos nuevos e importantes del estudio o de las observaciones. Inmediatamente después del resumen, proporcionar o identificar como tales: 3-10 palabras clave que ayuden a los indexadores en la construcción de índices cruzados de su artículo y que pueda publicarse con el resumen; utilice los términos del encabezamiento temático (Medical Subject Heading (Mesh)) del Index Medicus.

3. En cuanto al texto, debe dividirse en: Introducción, materiales y métodos, resultados y discusión. La **introducción** debe aparecer después del resumen, debe contener lo esencial para situar el problema y la justificación del trabajo utilizando las referencias más relevantes. Los **materiales y métodos** deben contener la descripción breve y clara que permita la comprensión y la reproducibilidad del trabajo. En caso de técnicas y métodos clásicos ya publicados, se debe indicar sólo la referencia. Los **resultados** deben ser presentados en forma clara y precisa, con un mínimo de discusión o interpretación personal. Todas las figuras y tablas deben ser citadas en el texto. **La discusión** debe ser restringida a la interpretación de los resultados y eventualmente a comparar con los resultados de otros autores. **Las conclusiones** pueden ser incluidas dentro de la discusión; sin embargo, se puede hacer una sección aparte, indicando de forma clara y concisa los nuevos hallazgos. Se pueden incluir recomendaciones de aplicación práctica. **Los agradecimientos** deben hacerse a las personas o instituciones que han hecho contribuciones al estudio.

4. Las **referencias bibliográficas**: Las mencionadas en el texto deben citarse escribiendo entre paréntesis el apellido y año. Ejemplo: (Ávila, 1983); (Brenes y Rodríguez, 1961); (Zimmermann y col., 2003).

La lista de referencias bibliográficas llevará por título «Referencias bibliográficas» y su ordenamiento será según el orden alfabético manteniendo la estructura siguiente: Autor(es): Apellido(os), inicial del nombre, año, título del artículo, revista (abreviatura aceptada), Vol. número, páginas (en el caso de artículos científicos). No se aceptarán trabajos que no se ajusten a las normas presentes.

#### **Ejemplos:**

Ávila JL. 1983. New national approaches to Chagas disease chemotherapy. *Interciencia* 8: 405-417.

Ávila JL, Ávila A, Muñoz E. 1981. Effect of allopurinol on different strains of *Trypanosoma cruzi*. *Am J Trop Med Hyg* 39: 769-774.

En el caso de que se trate de referencias de libros debe contener:

Nombre(es) de autor(es), capítulo del libro. En: título de libro, número de la edición (excepto si es la primera), editorial, lugar de la edición, año de publicación y páginas.

#### **Ejemplo:**

Decampo R, Moreno SNJ. Free radicals intermediates in the antiparasitic action of drugs and fugacitic cells. En: *Free radicals in Biology*. Eds: WA-Pryors Academic Press, 1984. pp. 243-288.

5. **Tablas**: Las tablas deben presentarse en hojas separadas, a doble espacio, y numeradas correlativamente en números romanos con el título en la parte superior. No se debe duplicar material del texto o de las figuras. En caso necesario coloque material explicativo en notas al pie de la tabla y no en el encabezamiento; explique en notas al pie de la tabla las abreviaturas no estandarizadas o utilizadas; identifique claramente las variables tales como desviación estándar y error estándar de la media; cite cada tabla en orden correlativo dentro del texto; cite la fuente de información al pie de la tabla si ésta no es original.

6. **Figuras**: Las figuras deben ser de buena calidad, en papel con fondo blanco. Las fotografías de especímenes anatómicos, de lesiones o de personas, deberán tener suficiente nitidez como para identificar claramente los detalles importantes. En caso de tratarse de fotos en colores, los gastos de su impresión correrán a cargo del autor del trabajo.

Todas las figuras deben ser identificadas en el reverso de la hoja, indicando número de la figura, apellidos y nombres de los autores (Ejemplo: Fig. 1; Fig. 2; etc.).

En caso de fotografía de personas evite que el sujeto sea identificable, o acompañe de la autorización escrita de la misma.

Las leyendas de las figuras deberán presentarse a doble espacio en página aparte y usar el número que corresponde a cada figura. Cuando se usen símbolos y fechas, números o letras para identificar partes en las figuras, identifíquelas y explique cada una en la leyenda. Si se trata de fotomicrografía, indique la escala e identifique el método de coloración.

**Fórmulas y ecuaciones**: Éstas deben presentarse claramente para su reproducción.

---

# PUBLICACIONES CDCH - UCV

## 2010

---



Cabrera, Arturo  
LA ENERGÍA EN EL ÁMBITO DE LA BIOLOGÍA  
(Coedición con el Vicerrectorado Académico)

Canelón, Fidel  
POLÍTICA DE LA ALTERIDAD

García Guevara, Bailde y Antonio Salgado-Sabel  
DEL PARADIGMA DE LOS CROQUIS  
A LA GEORREFERENCIA AUTOMATIZADA.  
Historia y su aplicabilidad en la gestión de programas  
comunitarios e investigaciones en salud

González, Yomar y Miguel Cerrolaza  
SIMULACIÓN COMPUTACIONAL DEL TEJIDO ÓSEO

Iribarren, Mariana  
DE CATEDRAL A SAN JACINTO.  
Una sede para el mercado principal en la Caracas del siglo XIX  
(Coedición con la Facultad de Arquitectura y Urbanismo)

Landa D., Isazkun  
LOS EJIDOS DE LA CIUDAD DE CARACAS ENTRE 1594-1846  
(Coedición con la Facultad de Arquitectura y Urbanismo)

Layrisse de Niculescu, Irene y María Antonia Moreno  
LA DESCENTRALIZACIÓN FISCAL EN VENEZUELA.  
Un ciclo de corta duración. ¿Fallas de diseño?

Leal Pinto, Freddy, Geo Coppens D' Eeckenbrugge,  
Luis Avilán Rovira y Ernesto Medina  
LA PIÑA DE AMÉRICA O ANANÁS

Martínez González, Ana Beatriz  
y Naysia María Hernández Carvajal (Compiladoras)  
COMUNICACIÓN Y APRENDIZAJE EN EL CIBERESPACIO.  
Las comunidades virtuales

Rodríguez Parisca, Oscar Simón  
CONSERVACIÓN DE SUELOS Y AGUA.  
Una premisa del desarrollo sustentable

Swanston, Gilberto  
TOPOGRAFÍA. MENSAJE GRÁFICO GEOESPACIAL  
(1ª reimpresión)

Texera Arnal, Yolanda  
ESTRATEGIA DEL ESTADO PARA LA REFORMA DE  
LA UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA, 1936-1948



Nuestras publicaciones pueden ser adquiridas en el Departamento de Relaciones y Publicaciones del Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico, ubicado en la Av. Principal de La Floresta, Quinta Silenia, La Floresta, Caracas.

Teléfonos: 286.8648 (Directo) 284.7077 – 286.7666 • Fax: Ext. 244 • E-mail: publicac@movistar.net.ve

Igualmente, están a la venta en la librería de la Biblioteca Central, PB. Ciudad Universitaria, UCV y en el portal [www.lalibreriadelaucv.com](http://www.lalibreriadelaucv.com)  
Toda la información inherente al Programa de Publicaciones puede ser consultada en [www.cdch-ucv.org.ve](http://www.cdch-ucv.org.ve)

---

**REVISTA FACULTAD DE FARMACIA N° 74-2**

Se imprimió durante el mes de diciembre de 2011

en los talleres de LUZ MÁRQUEZ NEGRETTI

IMPRESOR DIGITAL

Caracas

[luzmarquez1950@gmail.com](mailto:luzmarquez1950@gmail.com)