

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

Vol. 71 - N° 1 - 2008 - ISSN: 0041-8307
Depósito legal: 195902 DF 224
Caracas/Venezuela

Indexada en LILACS y Latindex

Universidad Central de Venezuela

Rector

Dr. Antonio París

Vicerrector Académico

Dr. Eleazar Narváez

Vicerrectora Administrativa

Dra. Elizabeth Marval

Secretaria

Dra. Cecilia García-Arocha

Facultad de Farmacia

Decano

Dr. Orlando Vizcarrondo Monagas

Director

Dr. Gerard Haiek

Coordinadora Académica

Dra. Sofía Gutiérrez

Directora del Instituto de Investigaciones

Dra. Anita Stern Israel

Directora de Postgrado

Dra. Miriam Regnault

Coordinadora de Extensión

Dra. Consuelo Araujo de Vizcarrondo

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

Dr. Carlos Ayala

Dra. Gisela Ávila

Dr. Rafael Mucci

Dra. Aracelis Ortega

Dra. María Cecilia de Condado

Diagramación, composición, montaje e impresión

Miguel Ángel García e Hijo, S.R.L.

Sur 15, N° 107 - El Conde - Telf. 576.13.62

Caracas-Venezuela

Tiraje: 500 ejemplares - Abril 2006

Dirección

Facultad de Farmacia UCV - Apartado 40.109

Caracas 1040-A - Venezuela

Contenido

INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA SOBRE EL COMPORTAMIENTO REOLÓGICO DE UNA DISPERSIÓN DE METHOCEL® F4M AL 1%
MÓNICA J BUONANNO R, DORIS ATTÍAS DE G y GISELA ÁVILA DE A 2

PROTIUM NEGLECTUM, PODOCALYX LORANTHOIDES, AND BROSIMUM UTILE SOURCE OF FLAVONOIDS AND OTHER PHENOLIC COMPOUNDS WITH ANTIOXIDANT ACTIVITY
FANNY C PADILLA, A MARIELA RINCÓN, LIZET BOU RACHED y ALÍRICA SUÁREZ 8

ESTUDIO DE SEGURIDAD MICROBIOLÓGICA, TOXICIDAD Y EFECTIVIDAD ANTIMICROBIANA EN FORMULACIONES OFTÁLMICAS DE HIDROXIPROPILMETILCELULOSA
ISABEL ANDUEZA, ANA CARVAJAL y NORMA DE CASTRO 15

ANTAGONISMO ENTRE LA ANGIOTENSINA II Y EL PÉPTIDO NATRIURÉTICO AURICULAR EN LA GENERACIÓN DEL GMPC EN LA OLIVA INFERIOR DE LA RATA
MARÍA DEL ROSARIO GARRIDO y ANITA ISRAEL 24

SÍNTESIS DE 4-CLORO-3-(2-CLOROETIL)2-METILQUINOLINAS
EVALUACIÓN DE SU POTENCIAL ACTIVIDAD ANTIMALARICA
IN VITRO
GRICELA LOBO, JOSÉ CAMACHO, NEIRA GAMBOA, JUAN RODRIGUES, YVES BLACHE, REINALDO ATENCIO, TERESA GONZÁLEZ y JAIME CHARRIS 34

EFFECTO ANALGÉSICO Y ANTIINFLAMATORIO DEL EXTRACTO ACUOSO DE *CESTRUM BUXIFOLIUM* KUNTH
JUAN VICENTE GÓMEZ-BARRIOS, CARLOS CIANGHEROTTI, MARÍA G MATOS, MARIELLA PASTORELLO, DIOLMAR BUITRAGO, ANITA ISRAEL y MARGARITA SALAZAR-BOOKAMAN 42

JAHONIN AND ASIMICIN ACETOGENINS FROM *ANNONA JAHNII* (ANNONACEAE)
TRINA COLMAN-SAZARBITORIA, ÁNGEL AMESTY, MARÍA I AMARO, MARY I CORDERO y ALÍ BAHASAS 48

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

Influencia de la temperatura sobre el comportamiento reológico de una dispersión de Methocel® F4M AL 1%

Influence of the temperature on the Rheologic Behavior of Methocel F4M 1% Dispersion

MÓNICA J BUONANNO R, DORIS ATTÍAS DE G y GISELA ÁVILA DE A

Resumen

La industria cosmética y farmacéutica ha extendido la utilización de dispersiones poliméricas debido a la adaptabilidad de las propiedades físicas de estas formulaciones. Dentro de este grupo de dispersiones se encuentra un derivado polimérico de la celulosa, identificado como Methocel® F4M, cuya propiedades viscosantes y reológicas han sido objeto de evaluación y discusión en este trabajo.

El estudio se realizó sobre una dispersión acuosa al 1%, utilizando un viscosímetro rotacional tipo LVT, evaluándose variaciones por los efectos de la temperatura y el tiempo, sobre los cambios reológicos de la dispersión. Los resultados muestran la presencia de un flujo pseudoplástico, y poca influencia del tiempo y la temperatura sobre la estructura polimérica de la dispersión.

Palabras clave: Methocel, reología, viscosidad.

Abstract

The pharmaceutical and cosmetic industry have expanded applications of polymeric dispersions, due their physical properties which allow characteristics adaptation of this formulations; among this polymeric group are cellulose derivatives as Methocel, which viscosity and rheology behavior are discussed in this work.

The study was made in 1% aqueous dispersion with rotational viscometer LVT type, assessing the effect of temperature at time variations over the rheological properties of this dispersion. Results show pseudoplastic flow without thixotropic and low influence of time and temperature over the polymeric structure of the dispersion.

Key Words: Methocel, Rheology, Viscosity

Introducción

En el campo de la industria farmacéutica, al igual que cosmética, las aplicaciones de los polímeros está determinada por sus propiedades y por ello pueden utilizarse como viscosantes, gelificantes, formadores de películas, adhesivos, emulsificantes y suspensores (Buonanno y col., 2004). Estas propiedades, junto con la capacidad de biodegradación que presentan los hidrocoloides, los convierte en agentes con gran aceptación en la formulación de productos cosméticos y de cuidado personal (Ward, 2001). Varios tipos de derivados de celulosa, en específico éteres de celulosa como la hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), han sido muy utilizados en la elaboración

de matrices de liberación controlada por su compatibilidad con numerosos principios activos. Adicionalmente, debido a que ésta es acuosoluble, el agua penetra en la matriz, el polímero se hidrata y ocurren cambios en la matriz como tal. Los cambios de disolución del polímero desde la superficie de la matriz incluyen procesos distinguibles, como el desenmarañamiento de las moléculas individuales de la superficie de la matriz, con dependencia de la velocidad de hidratación (Díaz y García, 2003).

Los recursos más populares de liberación controlada son las matrices elaboradas con HPMC, por su facilidad de elaboración y su bajo costo. Sin embargo, la formulación de fármacos poco solubles en

este tipo de matrices puede resultar en una liberación incompleta del principio activo, porque la solubilidad de la misma es limitada y, por ende, también lo es la velocidad de disolución dentro de la matriz (Rao y col., 2001). Sobre esta base se han realizado estudios de las propiedades mecánicas de preparados semisólidos elaborados con un derivado celulósico no iónico, como es la hidroxipropilmetilcelulosa y diferentes derivados de metacrilato de metilo (Eudragit®), tanto iónicos como no iónicos (Díaz y García, 2003). En términos generales, la caracterización reológica de los materiales poliméricos resulta importante para proveer información útil tanto para la elaboración de un producto, como su control de calidad, pues este tipo de variables no sólo afectan la liberación del principio activo desde su base, sino que también afectan lo correspondiente a la aceptación del producto por el paciente, quien será determinante en el éxito de la formulación. Razón de peso adicional por la cual, se deben realizar a los productos de aplicación tópica pruebas de comportamiento reológico, además de las correspondientes pruebas de estabilidad en el tiempo (Bonacucina y col., 2004).

Sobre la base de la importancia de la caracterización reológica, la relación que ésta guarda con las características no sólo físicas, sino organolépticas, de las formulaciones y considerando la mayor aplicabilidad que se está presentando en los productos cosméticos y farmacéuticos de los derivados poliméricos por sus características propias, se evaluó un derivado de celulosa conocido como Methocel® F4M para establecer sus características físicas de viscosidad y comportamiento reológico, de manera de poder ser aplicado en el desarrollo de futuras formulaciones de uso tópico con estabilidad física y aceptación por el paciente.

METODOLOGÍA

Se utilizaron como componentes del sistema el Methocel® F4M como agente en estudio, agua desionizada, Nipagin y Nipasol como antimicrobianos para preservar el sistema. Las muestras de Methocel® F4M cuya composición química es la hidroxipropilmetilcelulosa, fueron suministradas por Colorcon®.

Elaboración de las muestras de Methocel® F4M al 1% en dispersión acuosa

Para la elaboración de las dispersiones de Methocel® F4M al 1% p/p en dispersión acuosa, se prepararon muestras de 1 Kg, preservadas con 0,18% de metilparabeno y 0,02% de propilparabeno. Para ello

se procedió a dispersar en el 70% del vehículo a temperatura ambiente, 10 g de Methocel® F4M con agitación constante, utilizando un agitador digital, de propela. Se calentó el 30% del vehículo restante a temperatura superior de 60 °C para, posteriormente disolver, con agitación, las correspondientes cantidades de metil y propilparabeno. Una vez reducida la temperatura de la solución de parabenos hasta más o menos 60 °C, se incorporó lentamente la dispersión de Methocel® F4M, con agitación constante, utilizando un agitador digital de propela, hasta la dispersión total. Finalmente se dejó reposar la dispersión con el fin de eliminar el aire incorporado por la agitación.

Caracterización del comportamiento reológico de las dispersiones acuosas de Methocel® F4M

Una vez elaboradas las dispersiones acuosas de Methocel® F4M se procedió a determinar su comportamiento reológico (Schott, 2000). Para ello se utilizó un viscosímetro rotacional de aguja tipo LVT marca Cannon y la aguja N° 3 seleccionada previamente (Fresno y col., 2001).

Se realizaron las lecturas a velocidades de 0.3, 0.6, 1.5, 3, 6, 12, 30 rpm, en sentido creciente y decreciente (Buonanno y col., 2004). Se repitió el procedimiento tres veces para cada velocidad, reportándose el promedio de los valores (Ayannides, 1999). Este procedimiento se aplicó a las muestras sometidas a temperatura de $T 25 \text{ °C} \pm 2 \text{ °C}$, $T 45 \text{ °C} \pm 2 \text{ °C}$ y $T 10 \text{ °C} \pm 2 \text{ °C}$; utilizando una estufa marca Memmert y una nevera marca Regina. Los valores obtenidos fueron expresados en centipoises. Las determinaciones se realizaron al tiempo 0, es decir luego de elaboradas, y al tiempo 1, 2, 7, 15, 30, 60 y 90 días.

Resultados y discusión

En la figura 1 se representa el comportamiento reológico de la dispersión acuosa de Methocel® F4M al 1% en tiempo 0 días a 25 °C, es decir, inmediatamente después de preparada la dispersión. En el eje de las ordenadas se representa la viscosidad en términos de centipoises (cps) y en el eje de las abscisas la velocidad de rotación de la aguja seleccionada en términos de revoluciones por minuto (RPM). En esta figura se observa que la dispersión presenta una disminución de la viscosidad, a medida que se incrementa la velocidad de rotación de la aguja, lo cual implica incremento en la fuerza de corte que se está aplicando a la dispersión. Este comportamiento es

típico de sistemas con flujo de tipo pseudoplástico; por lo que se podría pensar que la dispersión acuosa de Methocel® al 1% presenta un comportamiento reológico de este tipo. Adicionalmente se observa, para este caso, en el rango de viscosidad entre 2500 y 1500 cps; reconociéndose dos curvas, una en velocidad creciente, representada como viscosidad descendente en línea discontinua y otra en velocidad decreciente, viscosidad ascendente en línea continua. Ambas curvas se sobrepone a lo largo de la representación, lo cual permite pensar que esta dispersión acuosa elaborada al 1% de concentración no presenta característica de tixotropía.

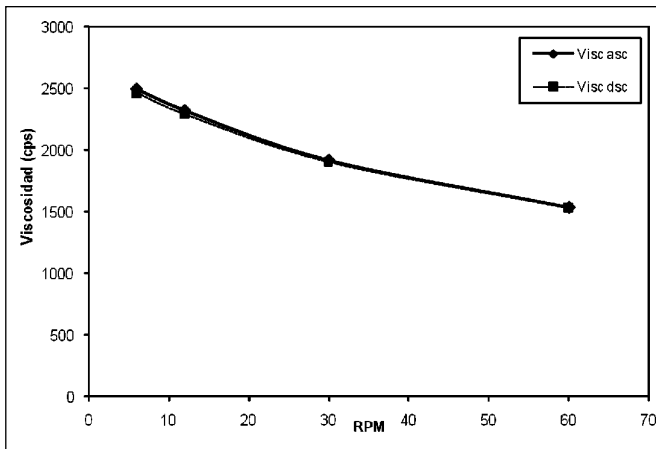


Figura 1. Comportamiento reológico de la dispersión de Methocel® al 1% a los 0 días.

En la figura 2 se representa el comportamiento reológico de la dispersión de Methocel® F4M al 1% en tiempo de 7 días, a diferentes temperaturas: ambiente $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, a $45\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $10\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$. Nuevamente, en el eje de las ordenadas se representa la viscosidad en centipoises (cps) y en el eje de las abscisas la velocidad de rotación de la aguja seleccionada en términos de revoluciones por minuto (RPM). En la misma, se observa para el caso de la dispersión a $T\ 25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ un rango de viscosidad entre 2336 cps y 1510 cps, valores bastante similares a los registrados en la figura 1 a esta misma temperatura. Con lo cual se infiere que la dispersión acuosa de Methocel® al 1% al tiempo de 7 días, a temperatura $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, mantiene su comportamiento reológico de tipo Pseudoplástico.

En cuanto a lo registrado para la dispersión sometida a la $T\ 45\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, se observa un rango de viscosidad entre 2000 cps y 1700 cps. En este caso se presenta un leve incremento en los valores de viscosidad con respecto a los encontrados en los tiempos anteriores. Esto podría atribuirse al desenrollamiento de la estructura polimérica en el sistema al mantenerse sometida a esta temperatura (Hussain y Keary,

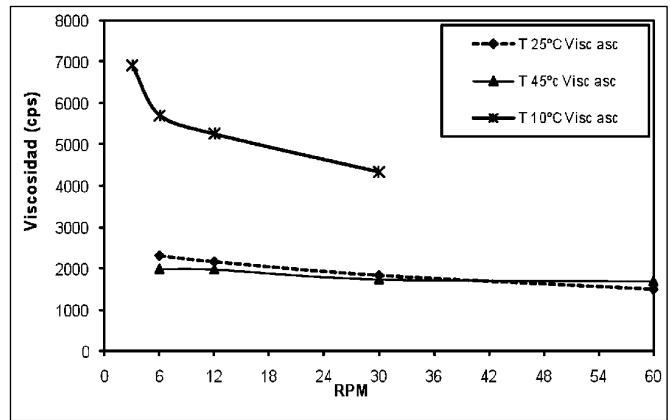


Figura 2. Comportamiento reológico de la dispersión de Methocel® al 1% a los 7 días, a diferentes temperaturas.

2002). Independientemente, se mantiene el comportamiento de tipo pseudoplástico, al igual que ocurre para la $T\ 25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$. Finalmente para esta figura, se observa el comportamiento de la dispersión acuosa a temperatura de $10\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$. En este caso se registran valores de rango de viscosidad entre 6900 cps y 4200 estos valores que reflejan un leve incremento en el rango de viscosidad al compararlos con los obtenidos para la temperatura de $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$. Sin embargo, no se generan modificaciones en el comportamiento reológico del sistema de Methocel®, por lo que se sigue identificando como un sistema pseudoplástico, al igual que en los casos descritos anteriormente. Comparando las tres zonas entre sí, se evidencia que prevalece la diferencia entre los tres sistemas a distintas temperaturas, lo cual pareciera indicar que existe una influencia importante de la temperatura sobre la viscosidad, al menos para este sistema analizado, con lo cual el incremento en la temperatura genera un descenso en el rango de viscosidad con respecto al presentado por el sistema a temperatura ambiente, mientras que al analizar el efecto del descenso en la temperatura, se obtiene un incremento en el rango de viscosidad; pero no se registra alteración en el tipo de comportamiento reológico.

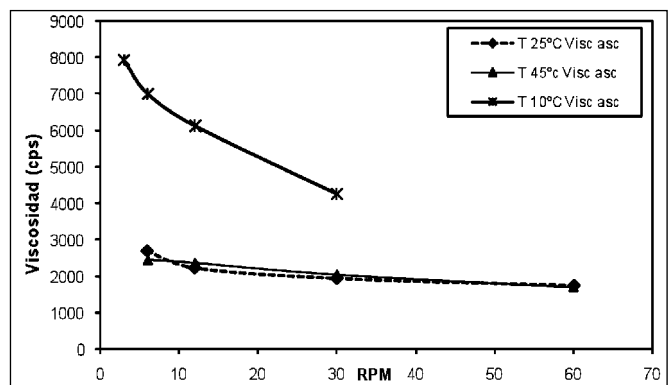


Figura 3. Comportamiento reológico de la dispersión de Methocel® al 1% a los 30 días, a diferentes temperaturas.

En la figura 3 se representa el comportamiento reológico de la dispersión de Methocel® F4M al 1% en tiempo de 30 días, a diferentes temperaturas: ambiente $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, a $45\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $10\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$. En esta figura se observa, para el caso de la dispersión a $T\ 25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ un rango de viscosidad entre 2306 cps y 1513 cps, valores muy cercanos a los registrados en las figuras anteriores a esta misma temperatura, considerándose que la dispersión a 30 días mantiene su comportamiento reológico de tipo pseudoplástico. En cuanto a lo registrado para la dispersión sometida a la $T\ 45\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, se observa un rango de viscosidad entre 2410 cps y 1600 cps, muy cercanos a los registrados para los tiempos de almacenamiento anteriores. El comportamiento reológico sigue registrándose como pseudoplástico.

En lo correspondiente al comportamiento de la dispersión a temperatura de $10\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, se registran valores en el rango de viscosidad entre 7910 cps y 4250 cps y no se generan modificaciones en el comportamiento reológico del sistema de Methocel® F4M, por lo que se sigue identificando como un sistema pseudoplástico.

Comparando las tres zonas entre sí, se observa que persiste la diferencia entre los tres sistemas a distintas temperaturas, lo cual pareciera indicar que existe una influencia importante de la temperatura sobre la viscosidad, al menos para este sistema analizado, con lo cual el incremento en la temperatura genera un descenso en el rango de viscosidad con respecto al presentado por el sistema a temperatura ambiente, mientras que, al analizar el efecto del descenso en la temperatura, se obtiene un incremento en el rango de viscosidad; pero no se registra alteración en el tipo de comportamiento reológico.

En la figura 4 está representado el comportamiento reológico de la dispersión de Methocel® F4M

al 1% en tiempo 60 días a diferentes temperaturas: ambiente $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, a $45\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $10\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$. Para el caso de la dispersión a $T\ 25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ el rango de viscosidad, está entre 2306 cps y 1513 cps, y se reitera el comportamiento reológico de tipo pseudoplástico. En la dispersión sometida a la $T\ 45\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ se observa un rango de viscosidad entre 2010 cps y 1600 cps, cercano a los encontrados para los casos anteriores; por lo cual podemos señalar que se mantiene el comportamiento de tipo pseudoplástico, al igual que ocurre para la $T\ 25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$. En lo correspondiente al comportamiento de la dispersión a temperatura de $10\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, tenemos un registro de valores en el rango de viscosidad entre 7680 cps y 4250 cps, sin modificaciones en el comportamiento reológico del sistema de Methocel® F4M, por lo que se sigue identificando como un sistema pseudoplástico. Al compararlas, observamos la persistencia de la variación por la influencia de la temperatura sobre la viscosidad, con lo cual el incremento en la temperatura genera un descenso en el rango de viscosidad con respecto al presentado por el sistema a temperatura ambiente, mientras que al analizar el efecto del descenso en la temperatura, se obtiene un incremento en el rango de viscosidad; pero no se registra alteración en el tipo de comportamiento reológico.

En la figura 5 se representa el comportamiento reológico de la dispersión de Methocel® F4M al 1% en tiempo 90 días, a diferentes temperaturas, ambiente $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, a $45\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $10\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$. En la misma se observa que se reitera el comportamiento pseudoplástico de la dispersión y los rangos de viscosidad registrados se mantienen relativamente similares a los analizados en las figuras anteriores.

A continuación se presentan las tablas que recopilan los valores absolutos de viscosidad registrados durante el estudio del comportamiento reológico del Methocel®, a diferentes temperaturas.

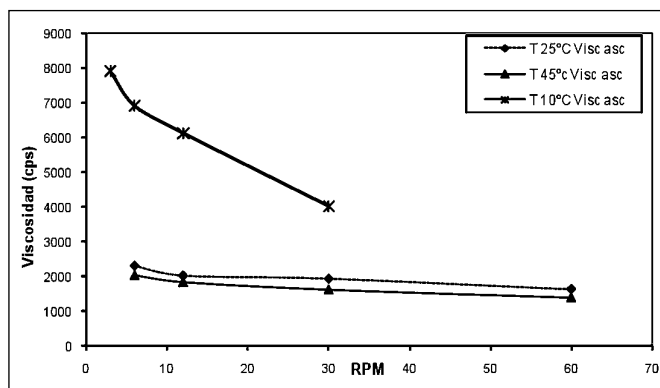


Figura 4. Comportamiento reológico de la dispersión de Methocel® al 1% a los 60 días, a diferentes temperaturas.

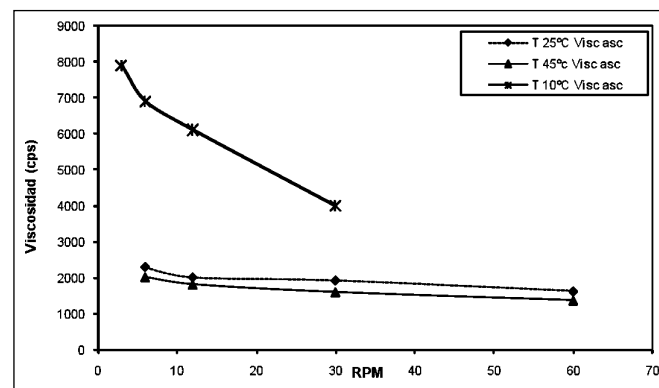


Figura 5. Comportamiento reológico de la dispersión de Methocel® al 1% a los 90 días, a diferentes temperaturas.

Tabla I
Valores de viscosidad de la dispersión acuosa de Methocel® F4M
al 1% a la temperatura de 25 °C ± 2 °C

| Rpm. | t 1d | t2d | t7d | t15d | t30d | t60d | t90d |
|------|------|------|------|------|------|--------|------|
| | Visc | Visc | Visc | Visc | Visc | Visc | Visc |
| 3 | | | | | | | |
| 6 | 2246 | 2133 | 2313 | 2386 | 2686 | 2686 | 2686 |
| 12 | 2140 | 2033 | 2170 | 2166 | 2220 | 2220 | 2220 |
| 30 | 1800 | 1720 | 1846 | 1833 | 1933 | 1933,3 | 1933 |
| 60 | 1460 | 1413 | 1510 | 1536 | 1736 | 1736 | 1736 |

Tabla II
Valores de viscosidad de la dispersión acuosa de Methocel® F4M
al 1% a la temperatura de 45 °C ± 2 °C

| Rpm. | t 1d | t2d | t7d | t15d | t30d | t60d | t90d |
|------|------|------|------|------|------|------|------|
| | Visc | Visc | Visc | Visc | Visc | Visc | Visc |
| 3 | | | | | | | |
| 6 | | | 2000 | 2030 | 2440 | 2440 | 2440 |
| 12 | 1506 | 1506 | 1990 | 2010 | 2356 | 2356 | 2356 |
| 30 | 1386 | 1386 | 1750 | 1950 | 2043 | 2043 | 2043 |
| 60 | 1183 | 1183 | 1703 | 1700 | 1703 | 1703 | 1703 |

En la Tabla I se recopilan los valores de viscosidad registrados para la dispersión acuosa de Methocel® F4M a diferentes tiempos, a la temperatura de 25 °C ± 2 °C, para las diferentes velocidades de rotación de la aguja. De la misma se observa que los valores de viscosidad desde la t1 día hasta la t90 días, no presentan variaciones importantes que denoten modificaciones en la viscosidad del sistema analizado, sino que más bien se mantiene bastante estable durante el tiempo de estudio de la dispersión.

En la Tabla II se observan los resultados de valores de viscosidad para la dispersión acuosa de Methocel® F4M al 1% en el tiempo a temperatura de 45 °C ± 2 °C. Para este caso se puede inferir que existen modificaciones de los valores en el tiempo, pues es notable que para t1 y t2 días, el mayor valor de viscosidad corresponde a 1506 cps, pero a partir del t7 días el valor de viscosidad registrado a 12 rpm es mayor y está por el orden de los 1990 cps, luego se registra un nuevo incremento para el t15 días y de allí en adelante la viscosidad permanece invariable hasta el t de 90 días.

Por lo que se puede concluir que la viscosidad de

la dispersión acuosa de Methocel® F4M al 1% sometida a temperatura de 45 °C se incrementa en el tiempo de estudio aplicado.

En la Tabla III se recogen los resultados correspondientes a valores de viscosidad de la dispersión acuosa de Methocel® F4M al 1% a temperatura de 10 °C ± 2 °C en el tiempo. En la misma se observa que esta variable presenta una tendencia a incrementarse con el paso del tiempo, desde t1 día hasta t30 días, siendo que para el primer caso la máxima viscosidad reportada es de 5396 cps y para el segundo de 7916 cps; de allí en adelante no se registran modificaciones en los valores de viscosidad.

Con lo que se puede indicar que para la dispersión en estudio, sometida a temperatura de 10 °C ± 2 °C, los valores de viscosidad se incrementan en el tiempo desde t1 a t30 días, hasta alcanzar valores constantes de viscosidad.

Conclusiones

- La dispersión acuosa de Methocel® F4M al 1% presenta un comportamiento reológico de tipo pseudoplástico sin tixotropía apreciable, el cual no se

Tabla III
Valores de viscosidad de la dispersión acuosa de Methocel® F4M al 1% a temperatura de 10 °C ± 2 °C

| Rpm. | t 1d | t2d | t7d | t15d | t30d | t60d | t90d |
|------|------|------|------|------|------|------|------|
| | Visc | Visc | Visc | Visc | Visc | Visc | Visc |
| 3 | 5396 | 6300 | 6900 | 6950 | 7916 | 7916 | 7916 |
| 6 | 5086 | 5900 | 5700 | 5790 | 6996 | 6996 | 6996 |
| 12 | 4340 | 5240 | 5250 | 4950 | 6115 | 6115 | 6115 |
| 30 | 3176 | 4035 | 4340 | 4250 | 4250 | 4250 | 4250 |
| 60 | | | | | | | |

modifica ni en el tiempo, ni por efecto de la temperatura utilizada en el estudio.

• El efecto de la temperatura se observa sobre los rangos de valores de viscosidad, siendo que el descenso de la misma en todos los casos analizados genera un incremento en este rango con respecto al obtenido para la temperatura ambiente. Pareciera que por efecto de la temperatura baja se reduce la energía térmica y el polímero tiende a enrollar su estructura, registrándose incrementos en los valores de rango de viscosidad. Mientras que en el caso del incremento de la temperatura, se observa al inicio un descenso de valores de rango de viscosidad por debajo de los obtenidos para la temperatura ambiente; para luego obtener valores muy similares a los encontrados en la etapa inicial. Esto refleja el efecto de la temperatura sobre la estructura polimérica, generando modificaciones en el desenrollamiento de la misma, con lo que se registran valores menores de viscosidad, luego al mantenerse la muestra sometida a temperatura de 45 °C ± 2 °C se genera un máximo de modificación y, por ende, el rango de viscosidad no sigue descendiendo.

Referencias bibliográficas

- Ayannides C. 1999. A rheological study on microemulsion gels of isopropyl myristate, polysorbate 80, glycerol, and water. *J Cosmet Sci* 50:3-4.
- Bonacucina G, Marteli S, Palimieri G. 2004. Rheological, adhesive and release properties of Carbopol gels. *Int J Pharm* 282:115-130.
- Buonanno M, Ávila de AG, Attías de GD. 2004. Comportamiento reológico de lipoesferas® en una dispersión gomosa nativa de *Cedrella odorata*. *Revista Facultad de Farmacia* 67: 35-38.
- Díaz J, García C. 2003. Determinación de las propiedades mecánicas de sistemas poliméricos de HPMC y Eudragit®. *Tecnología Farmacéutica* 65:2.
- Fresno M, Jiménez A, Ramírez A. 2001. Aplicación de la reología en la optimización de una emulsión silicónica. *Cienc Tecnol Pharm* 11: 130-39.
- Hussain S, Keary C. 2002. A thermorheological investigation into the gelation and phase separation of hydroxypropyl methylcellulose aqueous systems. *Polymer* 43: 5624.
- Rao V, Haslam J, Stella V. 2001. Controlled and complete release of a model poorly water soluble drug, prednisone, from hydroxypropylmethylcellulose matrix tablets using B-Cyclodextrin as a solubilizing agent. *J Pharm Sci* 90:807-815.
- Schott, H. 2000. *Rheology in Remington the Science and Practice of Pharmacy*. 20th edition. Philadelphia College of Pharmacy and Science.
- Ward, F. 2001. Water soluble gums in cosmetics and other personal care products. *Cosmetics and Toiletries Manufacture Worldwide*, 2: 52-55.

***Protium neglectum*, *podocalyx loranthoides*, and *brosimum utile* source of flavonoids and other phenolic compounds with antioxidant activity**

***Protium neglectum*, *Podocalyx loranthoides*, y *Brosimum utile* Fuente de flavonoides y otros compuestos fenólicos con actividad antioxidante**

FANNY C PADILLA^{a*}, A MARIELA RINCÓN^a, LIZET BOU RACHED^a, ALÍRICA SUÁREZ^b

Resumen

En los últimos años se ha enfocado el interés en el uso de los antioxidantes que protegen el organismo del daño oxidativo producido por los radicales libres los cuales juegan un papel importante en ciertas enfermedades. Existe información sobre la presencia de antioxidantes naturales en algunas plantas medicinales. En este trabajo se evaluó el contenido de polifenoles totales, flavonoides y taninos así como su actividad antioxidante en tres plantas medicinales venezolanas *Brosimum utile*, *Protium neglectum* y *Podocalyx loranthoides*. Los compuestos fenólicos fueron determinados por métodos espectrofotométricos específicos y las propiedades antioxidantes con los métodos del radical 1, 1-difenil-2-picrilhidracil, el poder reductor del ferricianuro-cloruro férrico y la decoloración del β -caroteno. Los resultados muestran que las plantas estudiadas son mas ricas en compuestos fenólicos que las frutas y vegetales, presentando un contenido de polifenoles totales en el rango de 61.83-125.31 mg-equivalentes de ácido gálico/g muestra en base seca, y los flavonoides y taninos en los rangos de 8.92-30.72 y 3.91- 44.83 mg-equivalentes de rutina y catequina/g de muestra en base seca, respectivamente. Todas las plantas presentaron actividad antioxidante que puede estar relacionada con sus propiedades medicinales como resultado de la presencia de compuestos fenólicos, de ciertas estructuras características de algunos de ellos y la concentración de taninos. Estas plantas se pueden considerar como buenas fuentes de antioxidantes para uso medicinal y comercial en la industrial farmacéutica, cosmética y alimentaria.

Palabras clave: *Protium neglectum*, *Podocalyx loranthoides*, *Brosimum utile*, flavonoides, actividad antioxidante

Abstract

Great attention has been focused on the use of antioxidants, to protect the human body from the oxidative damage by free radicals, which play an important role in human diseases. It has been reported that some medicinal plants contain a wide variety of natural antioxidants. Total polyphenols, flavonoids and tannins content, and the antioxidant properties of three Venezuelan medicinal plants *Brosimum utile*, *Protium neglectum* and *Podocalyx loranthoides* were evaluated. General methods were used for assessment of the phenolic compounds, while the antioxidant properties are investigated using the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl the ferricyanide and β -carotene bleaching methods. Results show that these plants are richer than fruits and vegetables in polyphenolic compounds, presenting a total phenolics range of 61.83–125.31 mg gallic acid equivalents/g dry weight, flavonoids and tannins range were 8.92–30.72 and 3.91–44.83 mg rutin and catechin equivalents/g dry weight, respectively. All plants demonstrated significant antioxidant activity which might be related to the medicinal properties as a result of polyphenolic compounds, the structure characteristic of some active phenolics and the concentration of tannins. These plants can be considered as good sources of antioxidants for medicinal and commercial uses in the pharmaceutical, cosmetic and food industry.

Keywords: *Protium neglectum*, *Podocalyx loranthoides*, *Brosimum utile*, flavonoids, antioxidant activity.

^{a*} Corresponding author. Lab. de Alimentos, Facultad de Farmacia, Univ. Central de Venezuela. Apdo. 40109 Caracas 1040-A Venezuela Fax: 582126052707. E-mail: fannypadilla@hotmail.com

^b Laboratorio de Productos Naturales, Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela.

Introduction

The antioxidant activity of fruits and vegetables is correlated mainly with their contents of polyphenols, carotenoids and vitamins C and E (Cadenas & Packer, 2002). Thus much attention has been focused on the use of antioxidants, specially natural antioxidants, to inhibit lipid peroxidation or to protect the human body from the oxidative damage by free radicals. Free radicals can be generated by metabolic pathways within body tissues; they can be introduced by external sources, with food, or drugs, can be caused by environmental pollution, etc. Oxidative damage caused by free radicals plays a significantly pathological role in human diseases. Cancer, emphysema, cirrhosis, atherosclerosis, and arthritis have been correlated with oxidative damage (Halliwell and Gutteridge, 1984; Anderson et al., 2001).

Among antioxidants, polyphenols constitute a large and complex category of compounds. They include flavonoids, the largest and most-studied group of polyphenols. It has been reported that some medicinal plants contain a wide variety of natural antioxidants, such as phenolic acids, flavonoids and tannins, which possess more potent antioxidant activity than dietary plants (Wong et al., 2006), and can play an important role in adsorbing and neutralizing free radicals, quenching singlet and triplet oxygen, or decomposing peroxides.

Nevertheless, scientific information on antioxidant properties of various plants, particularly those that are less widely used as foodstuffs and medicine, is still rather scarce.

Although it remains unclear which of the compounds of medical plants are the active ones, polyphenols recently have received increasing attention because of some interesting new findings regarding their biological activities and total antioxidant potential (Djeridane et al., 2006; Katalinic et al., 2006; Wong et al., 2006). Therefore, the assessment of such properties is interesting and useful, to find new sources of natural antioxidants, development of functional foods and nutraceuticals (Miliauskas et al., 2004).

The Amazon Region of Venezuela has a great variety of exotic food and medicinal plants with antioxidant activity, whose characterization could present some potential for sustainable non destructive forest-product development in Amazonia.

Protium neglectum, known in Venezuela as «curucay» or «taca-majaca», is a plant belonging to the genus *Protium* (Burseraceae) which is known for its ability to produce oleoresin exudates, which occur as a result of injuries to the bark (Siqueira et al.,

1995). The essential oil from leaves and resin of some *Protium* species as well as the leaves of *Podocalyx loranthoides* (Euphorbiaceae, *sensu lato*) known also as «palo de agua» or «reventillo», have been reported to have medicinal uses for the management of certain inflammatory diseases (Dowiejua et al., 1993; Siani et al., 1999).

The resins and leaves of *Protium* species are also commonly used in Brazilian folk medicine for the healing of ulcers and for the treatment of inflammatory complaints (Correa, 1984). The leaves of *Podocalyx loranthoides* are used in traditional medicine, in the Venezuelan Amazonas State, for some digestive problems and as a wound healer.

Brosimum utile (Moraceae), called «palo de vaca», «lechero», «vaca», «vacuno» is another oleoresin producing tree, found from Costa Rica, Brazil, Colombia, Venezuela, Ecuador, to Peru. As with the other two plants, it has been used in folk medicine in Amazonia for treatment of asthma and other respiratory diseases.

These genera (*Brosimum*, *Protium* and *Podocalyx*) contain flavonoids which have beneficial health effects in the prevention of cardiovascular diseases, certain diseases associated with oxidative stress, some cancer types, as an anti-inflammatory, and, during women's menopause, prevention of osteoporosis (Torres et al., 1997; Suárez et al., 2003).

Although, a multitude of natural antioxidants have been isolated from different kinds of plant materials such as oilseeds, cereal crops, vegetables, fruits, leaves, roots, spices and herbs (Ramarathnam et al., 1995). However, there is a lack of information with regard to polyphenolic content and antioxidant properties of extracts of *Protium neglectum*, *Podocalyx loranthoides* and *Brosimum utile*. The aim of the study of these Venezuelan plants used in folk medicine was to evaluate the *in vitro* antioxidant properties, including antioxidant activity, reducing power, scavenging abilities on radicals, and to link these properties with their content of phenolic compounds.

Experimental

SAMPLE PREPARATION

All samples were collected in Venezuela. *Brosimum utile* bark in Cerro de Valle Seco, Puerto Cabello, Carabobo State; *Podocalyx*'s leaves close to the Sipapo River, Puerto Ayacucho, Amazonas State, and *P. neglectum* leaves in Maturín, Monagas State. Samples were cleaned, identified botanically and deposited at the Herbarium V.M. Ovalles (MYF), Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela (UCV).

They were cleaned, dried in a convection oven at 60°C for 48h, milled, sieved through 60 mesh sieves, and stored in plastic jars at ambient temperature.

EXTRACTION

One (1) g of each sample was extracted at room temperature for 60 min with constant agitation, first with 40 ml of acidified methanol-water (50:50 v/v) and after with 40 ml of acetone-water (70:30 v/v). After centrifugation (15 min, 3000 rpm) supernatants were combined and diluted with a 50:50 (v/v) mixture of the two previous extracting solutions to 100 ml. Sample extracts were used to assess the different types of phenolics and the antioxidant properties.

All reagents were analytical grade and extraction and measurements were done in triplicates. Absorbance readings were done in a Shimadzu UV/VIS spectrophotometer model UV-1700, Kyoto, Japan.

TOTAL PHENOLIC CONTENT

The total phenolic content was determined using the Folin–Ciocalteu method (Singleton et al., 1999), and slightly modified by Dewanto et al. (2002). To 125 µL of the suitably diluted sample extract 0.5 mL of deionised water and 125µL of the Folin–Ciocalteu reagent were added. The mixture was allowed to stand for 6 min and then 1.25 mL of a 7% aqueous Na₂CO₃ solution was added. The final volume was adjusted to 3 mL. The mixture was allowed to stand 90 min and the absorption was measured at 760 nm against water as a blank. The amount of total phenolics was expressed as gallic acid equivalents (GAE mg /g dried sample). The calibration curve range was 20–500 µg/mL.

TOTAL FLAVONOIDS

Flavonoid content in extracts was determined spectrophotometrically (Miliauskas et al., 2004) using rutin as a reference compound; this method is based on the formation of a complex with aluminum. One ml of plant extract was mixed with 1 ml AlCl₃ in ethanol (20 g/L) and diluted with methanol to 25 ml. The absorbance of the reaction mixture was measured at 415 nm after 40 min at 20°C. Blank of samples were prepared taking 1 ml plant extract and 1 drop acetic acid, and diluted to 25 ml. The absorbance of a rutin calibration curve in the range 20–200 µg/mL in methanol was measured under the same conditions. Flavonoids are expressed as rutin equivalents (RTE mg/g dried sample)

TOTAL CONDENSED TANNINS

The analysis of condensed tannins (procyanidins)

was carried out according to the vanillin modified method (Broadhurst and Jones, 1978; Heimler et al., 2005). To 50µL of the suitably diluted sample, 3 mL of a 4% vanillin methanol solution and 1.5 mL of HCl were added. The mixture was allowed to stand for 15 min and the absorption was measured at 500 nm against methanol as a blank. The amount of total condensed tannins is expressed as (+) catechin equivalents (mg CTE /g dried sample). The calibration curve ranged from 50-600 µg/mL.

Antioxidant Properties

REDUCING POWER:

This was determined by the method of Yen and Duh (1993). Briefly, 1 ml of extract in an appropriate solvent was mixed with 2.5 ml phosphate buffer (0.2 M, pH 6.6) and 2.5 ml (1 %) K₃Fe (CN)₆ solution. After 30 min at 50°C, 2.5 ml (10 %) trichloroacetic acid (TCA) was added and the mixture was centrifuged for 10 min (2000 rpm). Finally, a 2.5 ml aliquot was mixed with 2.5 ml ultra-pure water and 0.5 ml (0.1%) FeCl₃ and the absorbance was recorded at 700 nm, comparing absorbance reading versus an ascorbic acid standard curve in the range of 50-500 µg/ml, since ascorbic acid is a well characterized natural reducing agent. Results are expressed as AsAE (mg ascorbic acid equivalents/g dry weight (dw)).

DPPH RADICAL SCAVENGING ASSAY

Free radical scavenging activity of plant extracts against stable DPPH• (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl hydrate, Sigma-Aldrich St. Louis, MO) was determined spectrophotometrically. When DPPH• reacts with an antioxidant compound, which can donate hydrogen, it is reduced. The changes in color (from deep-violet to light-yellow) were measured at 515 nm on a UV/visible light spectrophotometer. The antiradical capacity of the sample extracts was estimated taking 0,025mL of sample extracts suitably diluted that were added to 0.975 mL DPPH• solution (60 µM in MeOH), and the absorbance was read at *t* = 0 and at regular time intervals at 515 nm, until the reaction reach a plateau (time at the steady state) (Arnaous et al., 2002). The antioxidant dose required to cause a 50% inhibition (antioxidant activity) is expressed as EC₅₀ (g sample/g DPPH•); TEC₅₀, time needed to reach the steady state to the concentration corresponding at EC₅₀ was calculated, and AE was also calculated (Sanchez-Moreno, et al., 1998); also the radical scavenging activity was calculated by the following formula:

$$\% \text{ inhibition} = ((A_B - A_A)/A_B) \times 100$$

Where A_B = absorbance of blank sample (t=0min); A_A = absorbance of tested extract solution (t=30 min).

β-Carotene/Linoleate

The β-carotene bleaching method (Suja et al., 2005) was used; in brief, 0.2 mg β-carotene in 1mL chloroform, 20 mg of linoleic acid and 200mg of Tween 40 were transferred into a 50 mL volumetric flask. Once the chloroform had been removed by nitrogen flush, distilled H₂O was added and the resulting mixture was stirred vigorously. 4 mL aliquots of the emulsion were transferred to test tubes containing either a) 0.2 mL of sample extract, b) 0.2 mL of 100ppm butyl hydroxyanisol (BHA) methanol solution for comparison, c) 0.2 mL of methanol as a control, and d) 0.2mL methanol and 4mL of an emulsion prepared without the addition of β-carotene as a blank. After mixing, the absorbance (Abs t=0) at 470nm was recorded. All tubes were placed in a water bath at 50°C, taking readings at 15 min intervals until the β-carotene color in the control tube was bleached. Antioxidant activity was measured by the antioxidant activity coefficient (AAC), which is an estimation of the relative oxidation in the presence and absence of extracts:

$$AAC = \frac{(\text{Sample Abs}_{(t=100)} - \text{Control Abs}_{(t=100)}) / \text{Control Abs}_{(t=0)} - \text{Control Abs}_{(t=100)}}{1000}$$

The antioxidant activity (AA) is expressed as percent inhibition relative to the control after 100 min. incubation using the following equation: $AA = 100 (DR_C - DR_S) / DR_C$ where AA is the antioxidant activity, DR_C is the degradation rate of the control ($=\ln(a/b)/100$), DR_S is the degradation rate in the presence of the sample ($=\ln(a/b)/100$), a is the initial absorbance at time 0, and b is the absorbance at 100 min.

Linoleic acid in the presence of oxygen forms a hydroperoxide radical which produces the β-carotene oxidation and its bleaching with time. The antioxidant activity (AA) is evaluated in terms of β-carotene bleaching using BHA for comparative purposes.

Statistical Analysis

All data on all antioxidant activity tests are the average of triplicate analyses. The data were recorded as mean ± SD. Analysis of variance was performed by ANOVA procedures. Significant differences between means were determined by student's-t test, p values < 0.05 were considered as significant.

Results and Discussion

Polyphenolic composition is presented in Table I. Phenolic compounds are known as powerful chain-

Table I
Polyphenolic composition of three Venezuelan medicinal plants

| Plant | Polyphenols GAEmg/g d.w | Flavonoids RTE mg/g d.w | Tannins CTE mg/g d.w |
|-------------------------------|----------------------------|----------------------------|---------------------------|
| <i>Brosimum utile</i> | 61.83 ± 4.12 ^a | 8.92 ± 0.32 ^a | 3.91 ± 0.40 ^a |
| <i>Protium neglectum</i> | 85.15 ± 2.49 ^b | 30.72 ± 0.66 ^b | 4.10 ± 0.51 ^a |
| <i>Podocalyx loranthoides</i> | 125.31 ± 3.04 ^c | 25.47 ± 1.70 ^{bc} | 44.83 ± 2.79 ^b |

GAE: Gallic acid equivalents, RTE: Rutin equivalents, CTE: Catechin equivalents. Means with different letters in the same column were significantly different at the level p<0.05.

breaking antioxidants (Shahidi and Wanasundara, 1992). Phenolic compounds are very important constituents of plants and their radical scavenging ability is due to their hydroxyl groups (Hatano et al., 1989). The phenolic compounds may contribute directly to antioxidant action (Duh et al., 1999). It is suggested that polyphenolic compounds have inhibitory effects on mutagenesis and carcinogenesis in humans, when up to 1.0 g is ingested daily from a diet rich in fruits and vegetables (Tanaka et al., 1998).

Total phenolic content presented a range of 61.83–125.31 GAEmg/g (d.w), while the flavonoids and condensed tannins ranges were 8.92–30.72 and 3.91–44.83, RTE and CTE mg/g (d.w) respectively. *P. loranthoides* presented the highest content of all polyphenolic compounds tested. Data on polyphenolic composition of these plants was not found in the literature.

When these results are compared to total phenolic, flavonoid, and tannin content reported for *Brassicaceae* edible plants (white cabbage, broccoli, kale, cauliflower and Brussels sprouts) (Heimler et al., 2005), it was found that the plants studied showed much higher values for all compounds. These results show that these plants are rich in total polyphenols, flavonoids and tannins.

Antioxidant Properties

There are several methods for assessment of antioxidant activities. Plant extracts are a mixture of different phenolic compounds with different functional groups, polarity, and chemical behavior, which could lead to scattered results, depending on the test used. Therefore, the use of several assays for evaluating the antioxidant potential of extracts would be more informative and even necessary, to understand the biological activity of an antioxidant (Cao and Prior, 1998). In this study the ferric reducing power,

DPPH• radical scavenging activity, and the β -carotene bleaching methods were used. The results of the antioxidant properties are presented in Tables II and III.

Table II
Antioxidant properties of Venezuelan medicinal plants as assayed by the reducing power and β -carotene bleaching method

| Sample | Antiox. Activ. Coef. (AAC) | Antiox. Activ. (Aa) | Red. Power AsAE mg/g |
|-------------------------------|----------------------------|---------------------|--------------------------|
| <i>Brosimum utile</i> | 413.07 | 61.11 | 59.71±0.37 ^a |
| <i>Protium neglectum</i> | 702.06 | 79.82 | 62.75±2.05 ^b |
| <i>Podocalyx loranthoides</i> | 538.55 | 70.35 | 60.33±2.78 ^{ab} |
| BHA | 673.19 | 85.61 | |

Means with different letters were significantly different at the level $p < 0.05$

AsAE: Ascorbic Acid Equivalents

Table III
Antioxidant properties *in vitro* as scavenging abilities on radicals

| Sample | EC ₅₀ g/gDPPH | %TEC ₅₀ min | AE | % Inhibition |
|-------------------------------|--------------------------|------------------------|-------------------|--------------------|
| <i>Brosimum utile</i> | 1,28 | 27,60 | 0,028 | 82,95 |
| <i>Protium neglectum</i> | 0,64 | 29,97 | 0,05 | 85,44 |
| <i>Podocalyx loranthoides</i> | 0,18 | 29,35 | 0,185 | 86,68 |
| DL- <i>-tocopherol</i> | 0,201 ^a | 9,52 ^a | 0,52 ^a | 89,76 ^b |
| BHA | 0,093 ^a | 103,85 ^a | 0,10 ^a | 73,44 ^b |

^aSanchez-Moreno et al., 1998; ^bÖnay-Uçar et al., 2006. EC₅₀: Amount of antioxidant (g of sample) necessary to decrease 50% the initial DPPH• concentration. TEC₅₀: Time needed to reach the steady state to the concentration corresponding at EC₅₀. AE: Anti-radical Efficiency.

REDUCING POWER

The reducing properties are generally associated with the presence of reductones (Duh, 1998; Tanaka et al., 1998) as these species are known to be free radical chain terminators (Gordon, 1990). Therefore, it was considered important to determine the reductive capacity of these three medicinal plant extracts as this may indicate their potential as antioxidants. The extracts were capable of reducing Fe³⁺ ions, as can be seen in Table II, and all plants have similar effectiveness at reducing Fe³⁺, with ascorbic acid equivalents (AsAE) values in the range of 59.71-62.75 AsAE mg/g, even though there were significant differences between *Brosimum* and the other two plants. Accordingly, *Podocalyx* and *Protium* might contain higher

amounts of reductones, which could react with free radicals to stabilize and block chain reaction through donating a hydrogen atom. These results are higher than the ones reported, for methanol extracts of *Dra-cocephalum moldavica* L. (Lamiaceae) (41.74 mg AsAE/g) (Dastmalchi et al., 2007), that characterized their extracts as having mild reducing activity in comparison with values presented by reference compound such as gallic acid and quercetin (1,333.30 and 794.35 mg AsAE/g). These results suggest that these plants might be potential preservatives that could be used in foods or cosmetics.

DPPH RADICAL SCAVENGING ASSAY

A freshly prepared DPPH solution exhibits a deep purple color with an absorption maximum at 517 nm. This purple color generally fades or disappears when an antioxidant is present in the medium. Thus, antioxidant molecules can quench DPPH free radicals (i.e., by providing hydrogen atoms or by electron donation, conceivably via free-radical attack on the DPPH molecule) and convert them to a colorless/bleached product, resulting in a decrease in absorbance at 517 nm. Hence, the more rapidly the absorbance decreases the more potent the antioxidant activity of the extract. Free radical scavenging is one of the known mechanisms by which antioxidants inhibit lipid oxidation. When the antioxidant activity is expressed as TEC₅₀ (time which the antioxidant requires to cause a 50% inhibition of the DPPH•), the values found allow classifying the antioxidants in these plants as "intermediate" taking into account the kinetic classification proposed for some polyphenolic compounds (Sanchez-Moreno et al., 1998). This classification also considers butylhydroxyanisole (BHA), a synthetic antioxidant used in the oxidation prevention of fats and oils, as a «slow» and α -tocopherol as an intermediate antioxidant.

From the percentage scavenging values (% inhibition), it can be seen that all plant extracts presented similar scavenger activity. All of the extracts were more effective than quercetin (73.87%), much less effective DPPH• scavengers than ascorbic acid (AsCA) (103.57%) or gallic acid (GA) (102.27%) (Dastmalchi et al., 2007). Nevertheless, they presented higher effectiveness than BHA (73.76%) and were as effective as DL- α -tocopherol (89.76%) (Önay-Uçar et al., 2006). Moreover, taking in consideration values for the EC₅₀ and the anti radical efficiency (AE), the best of all plants as a radical scavenger was the *P. loranthoides*, which also presented the highest polyphenol and tannin content. This difference could be due to differences in structure conformation and hydroxyl group positions on the flavonoid molecules, which

determine antioxidant properties (Miliauskas et al., 2004; Choi et al., 2002), and also to the presence of two biflavonoids I 7, II 4-dimethylamentoflavone and II 4'-methylamentoflavone (Suárez et al., 2003). In general these properties depend on the ability to donate hydrogen or an electron to a free radical.

The DPPH• free radical scavenging activity suggests that components within the extracts are capable of scavenging free radicals via electron or hydrogen-donating mechanisms and, thus, should be able to prevent the initiation of deleterious free radical mediated chain reactions in susceptible matrices, e.g. biological membranes.

β-CAROTENE/LINOLEATE

In the β-carotene bleaching assay, linoleic acid produces hydroperoxides as free radicals during incubation at 50°C. The presence of antioxidants in the extract will minimize the oxidation of β-carotene by hydroperoxides. Hydroperoxides formed in this system will be neutralized by antioxidants from the extracts. Thus, the degradation rate of β-carotene depends on the antioxidant activity of the extracts. There is an indirect correlation between degradation rate and the bleaching of β-carotene, where the extract with the lowest degradation rate exhibited the highest antioxidant activity. *Brosimum* extract presented the lowest antioxidant activity while the other two plant extracts showed antioxidant activity almost similar to BHA (Fig. 1). Nevertheless, *Podocalyx*, which presented the highest polyphenolic content, did not show the best antioxidant activity, this might be related to the high tannin content. Good correlation was shown with the reducing power assay.

Conclusions

The results presented in this study are the first information on the antioxidant activities of these Venezuelan plants.

These results revealed that the medicinal plants studied exhibit clearly a higher antioxidant activity and contain more phenolic compounds than common vegetables and fruits. Due to differences in the results of the antioxidant properties of the plants by the methods used it can also be concluded that the antioxidant activity of plant extracts is not only the result of polyphenol, and flavonoid content, but may also be related to the presence of some individual active phenolic compounds and concentration of tannins. These plants can be considered as good sources of natural antioxidants for medicinal and commercial uses, and the beneficial effects against

some diseases could be attributed to the antioxidant activity and polyphenol content.

Acknowledgment

This research was supported by a grant CDCH-06-30-5331-03 from the Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad Central de Venezuela.

References

- Anderson KJ, Teuber SS, Gobeille A, Cremin P, Waterhouse AL, Steinberg FM. 2001. Walnut polyphenolics inhibit *in vitro* human plasma and LDL oxidation. Biochemical and molecular action of nutrients. *J Nutr* 131:2837-2842.
- 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.
- Broadhurst RB, Jones WT. 1978. Analysis of condensed tannins using acidified vanillin. *J Sci Food Agric* 29: 788-794.
- Cadenas E, Packer L. Handbook of antioxidants. Marcel Dekker. New York: 2002.
- Cao GH, Prior RL. 1998. Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum. *Clin Chem* 44:1309-1315.
- Choi CW, Kim SC, Hwang SS, Choi BK, Ahn HJ, Lee MY, Park SH, Kim SK. 2002. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. *Plant Sci* 163:1161-1168.
- Correa P. 1984. Diccionario de plantas uteis do Brasil e das Exoticas cultivadas. Ministerio da Agricultura, Rio de Janeiro, Brasil, Imprensa Nacional, pp.82.
- Dastmalchi K, Dorman HJD, Kos-ar M, Hiltunen R. 2007. Chemical composition and *in vitro* antioxidant evaluation of a water soluble extract of Moldavian balm (*Draacocephalum moldavica* L.) extract. *Food Sci Tech* 40:239-248.
- 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.
- Djeridane A, Yousfi M, Nadjemi B, Boutassouna D, Stocker P, Vidal N. 2006. Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chem* 97:654-660.
- Duh PD, Tu YY, Yen GC. 1999. Antioxidant activity of water extract of harn jzur (*Chrysanthemum morifolium* Ramat). *Lebens-Wiss und-Tech* 32:269-277.
- Duwiejua M, Zeitlin IJ, Waterman PG, Chapman J, Mhango GJ, Provan G. 1993. Anti-inflammatory activity of resins from some species of the plant family Burseraceae. *J Planta Med* 59:12-16.

- Gordon MH. In Food antioxidants. Eds. BJF. Hudson, Elsevier Applied Science London 1990. pp. 1–18.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. 1984. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J* 219:1-4.
- Hatano T, Edamatsu R, Mori A, Fujita Y, Yasuhara E. 1989. Effect of interaction of tannins with co-existing substances. VI. Effects of tannins and related polyphenols on superoxide anion radical and on DPPH radical. *Chem Pharm Bull* 37:2016-2021.
- Heimler D, Vignolini P, Dini MG, Vincieri FF, Romani A. 2005. Antiradical activity and polyphenol composition of local Brassicaceae edible varieties. *Food Chem* 99:464-469.
- Katalinic V, Milos M, Kulisic T, & Jukic M. 2006. Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. *Food Chem* 94:550-557
- Miliauskas G, Venskutonis PR, van Beek TA. 2004. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food Chem* 85:231-237.
- Önay-Uçar E, Karagöz A, Arda N. 2006. Antioxidant activity of *Viscum album ssp. Album*. *Fitoterapia* 77:556-560.
- Ramarathnam N, Osawa T, Ochi H, Kawakishi S. 1995. The contribution of plant food antioxidants to human health. *Trends Food Sci Tech* 6:75-82.
- Sanchez-Moreno C, Larrauri JA, Saura-Calixto F. 1998. Free radical scavenging capacity of selected red, rose, and white wines. *J Sci Food Agric* 79:1301-1304.
- Shahidi F, Wanasundara PKJPD. 1992. Phenolic antioxidants. In *Crit Rev Food Sci Nutr* 32:67-103
- Siani AC, Ramos MF, Menezes-de-Lima Jr. O, Ribeiro-dos-Santos R, Fernandez-Ferreira E, Soares RO, Rosas EC, Susunaga GS, Guimaraes AC, Zoghbi MG, Henriques MG. 1999. Evaluation of anti-inflammatory-related activity of essential oils from the leaves and resin of species of *Protium*. *J Ethnopharmacol* 66:57-69.
- 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.
- Siqueira JBG, Zoghbi MGB, Cabral JA, Filho WW. 1995. Lignans from *Protium tenuifolium*. *J Nat Prod* 58:730-732.
- Suárez A, Díaz B, Delle Monache F, Compagnone R. 2003. Biflavonoids from *Podocalyx loranthoides*. *Fitoterapia* 74:473-475.
- Suja KP, Jayalekshmy A, Arumughan C. 2005. Antioxidant activity of sesame cake extract. *Food Chem* 91:213-219.
- Tanaka M, Kuei CW, Nagashima Y, Taguchi T. 1998. Application of antioxidative maillard reaction products from histidine and glucose to sardine products. *Nippon Suisan Gakkaishil* 54:1409-1414.
- Torres SL, Monteiro JC, Arruda P MS, Müller A, Arruda AH, Arruda AC. 1997. Two flavans from *Brossimum acutifolium*. *Phytochemistry* 44:347-349.
- Wong C, Li H, Cheng K, Chen F. 2006. A systematic survey of antioxidant activity of 30 Chinese medicinal plants using the ferric reducing antioxidant power assay. *Food Chem* 97:705-711.
- Yen GC, Duh PD. 1993. Antioxidant properties of methanolic extracts from peanut hulls. *J Amer Oil Chem Soc* 70:383-386.

Estudio de seguridad microbiológica, toxicidad y efectividad antimicrobiana en formulaciones oftálmicas de hidroxipropilmetilcelulosa

Safety microbiological study, toxicity and antimicrobial effectivity in ophthalmologic formulation of Hydroxypropylmethylcellulose

¹ISABEL ANDUEZA*, ANA CARVAJAL y NORMA DE CASTRO

Resumen

En el desarrollo y elaboración de los productos oftálmicos se debe evitar la introducción de microorganismos que puedan ocasionar una infección en el paciente o el deterioro de la calidad del producto. Para ello se exige la aplicación de todo lo referente a las Buenas Prácticas de Manufactura, con especial énfasis en el control microbiológico. La esterilidad es uno de los requisitos fundamentales para estos productos tópicos e intraoculares oftálmicos; a éstos últimos, adicionalmente, se les exige prueba de pirógenos. Por otra parte, en el desarrollo de los mismos el estudio de la toxicidad ocular es indispensable a fin de garantizar su seguridad antes de ser aplicado a los pacientes. En este trabajo se evaluaron tanto la calidad microbiológica de diferentes desarrollos oftálmicos con Hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), así como también su toxicidad ocular y efectividad antimicrobiana de los agentes de conservación antimicrobiana presentes. En el ensayo de esterilidad se aplicó el método de inoculación directa del medio de cultivo de la USP 30. Para realizar la prueba de pirógenos fue necesario emplear el producto diluido al 50% en una solución de sales isotónicas estéril debido a la alta viscosidad de las dispersiones; esto con la finalidad de poder aplicar el método del aumento de la temperatura del conejo de la USP 30. Por otra parte, en el ensayo de toxicidad se evaluó el grado de irritación de la mucosa ocular del conejo por el Método de Draize modificado. La efectividad antimicrobiana se evaluó de acuerdo con el ensayo establecido por la USP 30. El comportamiento de las dispersiones isotónicas de HPMC evaluadas, cumplen con los ensayos de esterilidad y pirógenos. Los valores obtenidos de irritabilidad en la mucosa ocular del conejo fueron satisfactorios, permitiendo sugerir que no se observará efecto irritante sobre la conjuntiva humana. Ambos agentes de conservación antimicrobiana cumplieron con los ensayos de efectividad, lo que garantizará la esterilidad del producto durante su uso por parte del paciente. Estos resultados preliminares nos permitirán continuar con otros estudios, entre los cuales se encuentran validación de los procesos de manufactura y ensayos aplicados, así como las pruebas de farmacología clínica.

Palabras clave: Esterilidad, pirógenos, efectividad antimicrobiana.

Abstract

The development and elaboration of ophthalmic products should be avoided the introduction of microorganisms that could cause an infection in the patient or deterioration of the quality of the product. For it, is required the application of everything regarding the Good Manufacturing Practices with special emphasis, in the microbiological control. The sterility is one of the fundamental requirements for topics and intraocular ophthalmic products; the last one also require additionally pyrogen test. On the other hand, the ocular toxicity study is necessary in order to guarantee its security before being applied to the patients. In this work we evaluated the microbiological quality of different ophthalmic developments with Hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) as well as their ocular toxicity and antimicrobial effectiveness of the antimicrobial agents. In the sterility test we applied the direct method of the USP 30. To carry out the rabbit pyrogen test (USP 30) was necessary to dilute the product to 50% with an isotonic sterile salts solution; because the dispersions viscosity was too high. On the other hand, in the ocular toxicity test, the degree of irritation of the ocular mucous membrane of the rabbit by the Method of Draize modified was evaluated. For the antimicrobial effectiveness test we employed the USP 30 method. The sterility and pyrogen test of the isotonic dispersions of HPMC evaluated were conforming. The values obtained of irritability in the ocular mucous membrane of the rabbit were satisfactory, permitting to suggest that it has not irritating effect on the human conjunctive. Both antimicrobial agents are effectives to security the sterility of the product during the patient used. These preliminary results will permit us to continue with other studies like manufacturer process and assays validation, among which those of clinical pharmacology

Key words: Sterility, pyrogens, antimicrobial effectiveness

¹ Dpto. de Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela

* A quién debe dirigir la correspondencia. aduezai@ucv.ve.

Auspiciado: Instituto de Investigaciones Farmacéuticas – UCV.

Introducción

En las formulaciones oftálmicas se emplean con frecuencia sistemas coloidales que contribuyen a solventar problemas de estabilidad que se presentan durante su manufactura y/o dispensación final; también pueden contribuir, por sus características, a ejercer un efecto terapéutico y/o protector en el sitio de aplicación.

Los polímeros de celulosa como sistemas coloidales pueden ser empleados, entre otros, como protectivos y/o viscosantes en las preparaciones oftálmicas. En este mismo campo la hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) tiene entre otras aplicaciones la de servir de humectante para los lentes de contacto y como sustituto de las lágrimas naturales (Versura, 1989; Toda, 1996) y en productos viscoelástico (Andueza, 2000; Liesegang, 1986).

Otras de sus aplicaciones es como agente viscoelástico, el cual es producto de aplicaciones intraoculares que se emplean en cirugía oftalmológica. Para su elaboración, requieren las mismas consideraciones que los productos parenterales ya que el sitio de aplicación ha atravesado las primeras barreras protectoras. Por otra parte, las células endoteliales son muy sensibles, por lo que no se deben incluir componentes que tengan efecto tóxico, como los agentes de conservación antimicrobiana. Por ello deben ser envasados bajo la forma de unidosos (Bapatla, 1993).

El desarrollo de las de formulaciones oftálmicas requiere de los mismos principios científicos y tecnológicos que se utilizan para otras formas de dosificación. Por sus características propias del sitio de aplicación, se exige entre otras pruebas esterilidad y toxicidad ocular. En cuanto a la esterilidad se refiere, la presencia de microorganismos en los medicamentos oftálmicos podría ocasionar efectos adversos no solamente en la estabilidad de la fórmula, sino también riesgos para la salud del paciente; por ello, se debe evitar la contaminación durante la manufactura y uso de los productos. En circunstancias como intervenciones quirúrgicas, pos-operatorios o traumatismos, la córnea y la conjuntiva se encuentran muy sensibles a adquirir infecciones (Allwood, 1998). Esto justifica aún más tanto el proceso de esterilización (Pflug, 2000; Sterilizers, 2000), como la incorporación de preservantes en los productos multidosos puesto que es fundamental mantener la esterilidad.

Siempre que sea posible, los productos acuosos son esterilizados en su envase final por calor húmedo, a excepción de aquellos fármacos termosensibles. La Farmacopea Europea, al igual que la Farmacopea de Estados Unidos (USP 30, 2007), recomienda una tem-

peratura mínima de 121 °C mantenida por un período de 15 minutos, a menos que la monografía indique lo contrario.

Es importante señalar que los polímeros usados en el desarrollo de formulaciones oftalmológicas deben ser capaces de resistir el proceso de esterilización, manteniendo su integridad mecánica y su biocompatibilidad.

En estudios anteriores se ha comprobado que una dispersión isotónica unidosos de hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) al 2% 4000 cps, preparada en condiciones asépticas y esterilizada por calor húmedo a 121 °C durante 15 minutos, cumple con los requisitos de esterilidad establecidos por la USP. Así mismo, este proceso no tuvo influencia sobre las características físicas, como pH, formación de película, tensión superficial y comportamiento reológico (Andueza, 2004).

Los agentes preservantes son incluidos en las formulaciones multidosos con la finalidad de incrementar la vida útil del producto, ya que retarda el crecimiento bacteriano durante el uso por parte del paciente. Muchos preservativos son en diferentes grados tóxicos al epitelio celular oftálmico y rompen la capa lipídica de la película lagrimal haciéndola inestable; esto puede traer como consecuencia el agravamiento de las patologías de la superficie ocular, ya que la película lagrimal protectora no es capaz de cubrir uniformemente toda el epitelio corneal y superficie conjuntival. Otros efectos adversos de los agentes de conservación antimicrobiana son: incremento de la permeabilidad corneal, disminución de la actividad de las lisozimas en el fluido lagrimal y sensibilización que puede originar alergias oculares (Hedqvist, 1999).

Para estas formulaciones, el cloruro de benzalconio es el agente antimicrobiano estándar de referencia y es el más ampliamente utilizado en nuestro país. Posee una alta eficacia sobre numerosos microorganismos y su mecanismo de acción se basa en la destrucción de la proteína, ocasionando lisis de la membrana citoplasmática. Su estabilidad y efectividad antimicrobiana se encuentra dentro del amplio rango de pH. Se ha reportado que su uso frecuente puede acumularse en el tejido ocular y puede ocasionar muerte celular. Por sus propiedades detergentes, puede actuar fragmentando las paredes celulares (Lopez, 1993). Sin embargo, si se emplea en concentraciones de uso clínico (cuatro a seis veces al día), no se observan efectos adversos significativos (Abelson, 2002; Bapatla, 1993; Turco, 1994).

El cloruro de benzalconio se emplea asociado con el EDTA, es decir, la sal sódica del ácido etilen-

diaminotetracético con la finalidad de aumentar su espectro antimicrobiano, ya que éste es capaz de secuestrar los iones calcio ejerciendo un efecto citotóxico tanto al microorganismo como a las células humanas; así mismo se ha demostrado que el EDTA se absorbe acumulándose en el iris y cuerpo ciliar, de tal manera que altera la permeabilidad de la vasa uvea (túnica vascular del ojo), acelerando indirectamente la eliminación de los fármacos desde el humor acuoso (Lee, 1993). Pacientes con cuadro de ojo seco deben evitar los productos que lo contengan (Kaufman, 2004).

El perborato de sodio es un preservativo oxidativo; destruye numerosos tipos de bacterias y hongos tal como el *Aspergillus niger*. Cuando el perborato de sodio se combina con el agua se convierte en peróxido de hidrógeno, un efectivo agente antimicrobiano. Su mecanismo de acción es mediante la oxidación de la pared y membrana celular, afectando las uniones enzimáticas de la membrana así como la función celular. Una vez que esta sal entra en contacto con el ojo, se descompone en agua y oxígeno por acción de la catalasa y otras enzimas presentes en el saco conjuntival (Grant, 1996). De esta manera no se esperaría la manifestación de efectos tóxicos a nivel ocular. Sin embargo, no se ha reportado su efectividad antimicrobiana en productos oftálmicos.

Estos productos que incluyen agentes antimicrobianos, pueden utilizarse con seguridad en los pacientes cuya cornea es normal, en especial cuando se aplican con poca frecuencia. Es por ello que cada día se estudian nuevas alternativas en la incorporación de estos agentes con miras a evitar efectos citotóxicos, alteraciones en la estructura y fisiología celular del sistema ocular y, a su vez, que sean efectivos en conservar la esterilidad de los productos multidosis.

Por otra parte, la USP exige la realización de la prueba de pirógenos para los productos viscoelásticos empleados en cirugía intraocular. Los pirógenos son a menudo termoestables y resisten la esterilización en autoclave; son capaces de atravesar la mayoría de los filtros, aunque pueden ser retenidos por filtros de profundidad y por sustancias adsorbentes. Los pirógenos actúan a dosis muy bajas, es por ello que el control microbiológico de todo el proceso de manufactura es fundamental a fin de evitar poner en riesgo la vida de los pacientes.

Es importante destacar que la córnea es uno de los tejidos más sensibles del cuerpo, con una gran cantidad de terminaciones nerviosas, razón por la cual cualquier irritación o daño es extremadamente doloroso. Esto nos lleva a tomar en consideración

los estudios de toxicidad ocular de aquellos productos que están destinados a ser aplicados en el ojo, con el fin de garantizar su seguridad antes de ser aplicado a los pacientes.

Por todo lo antes expuesto, se ha desarrollado esta investigación con el objetivo de evaluar la calidad microbiológica y toxicidad de tres formulaciones oftálmicas piloto de hidroxipropilmetilcelulosa, una de ellas libre de agente de conservación antimicrobiana, que se empleará como viscoelástico en cirugía oftalmológica, y las otras son lágrimas artificiales, dirigidas a aliviar la queratoconjuntivitis seca; estas últimas se diferencian en el agente de conservación antimicrobiana incorporado, por lo que adicionalmente se ha evaluado la efectividad antimicrobiana de los preservativos.

Materiales y métodos

Las formulaciones oftálmicas, viscoelástico y lágrimas artificiales, se elaboraron mediante la dispersión de la HPMC en soluciones acuosas empleando el método caliente /frío:

VISCOELÁSTICO

HPMC al 2%: Se procedió a disolver en condiciones asépticas los componentes (Tabla I) previamente pesados en una balanza analítica Mettler AJ 150 DL, en orden creciente de solubilidad en el volumen total de agua recientemente destilada disponible para preparar una dispersión de HPMC al 2%. Para la incorporación del polímero se empleó el método ya reportado (Andueza, 2002).

Tabla I
Solución solvente de sales para
la fórmula viscoelástica de HPMC al 2%

| Componente | *Concentración % |
|---------------------|------------------|
| Cloruro de calcio | 0,048 |
| Cloruro de magnesio | 0,030 |
| Cloruro de potasio | 0,075 |
| Acetato de sodio | 0,390 |
| Citrato de sodio | 0,170 |
| Cloruro de sodio | 0,490 |

Cada 2 mL de la dispersión final se envasó en viales de borosilicato de 5 mL de capacidad con tapones de goma y sello de aluminio.

Los envases llenos y sellados se sometieron a esterilización por autoclave Fanem 415, a 120 °C por 15 minutos.

LÁGRIMAS ARTIFICIALES

HPMC al 0,5%:

Se elaboraron dos formulaciones de HPMC al 0,5%, con los mismos componentes como se encuentra descrito en la tabla II, a diferencia del agente de conservación antimicrobiana, en donde la fórmula 1A contenía cloruro de benzalconio con EDTA y la 1B contenía perborato de sodio.

Tabla II
Soluciones diluentes de las fórmulas de lágrimas artificiales de HPMC al 0,5%

| Componentes | Fórmula 1A (%) | Fórmula 1B (%) |
|-----------------------------------|----------------|----------------|
| Cloruro de calcio | 0,048 | 0,048 |
| Cloruro de magnesio | 0,030 | 0,030 |
| Cloruro de potasio | 0,075 | 0,075 |
| Ácido bórico | 0,560 | 0,560 |
| Borato de sodio | 0,096 | 0,096 |
| Cloruro de sodio | 0,490 | 0,490 |
| Cloruro de benzalconio | 0,010 | |
| EDTA | 0,055 | |
| Perborato de sodio tetrahidratado | | 0,053 |

Se procedió a elaborar dispersiones de HPMC al 2% en agua desmineralizada (dispersión concentrada), siguiendo el método de la USP 30 (2007) para el ensayo de viscosidad de la HPMC y se esterilizó por autoclave a 120 °C durante 15 minutos. Posteriormente se prosiguió con la elaboración de las soluciones diluentes estériles, disolviendo cada uno de sus componentes en orden creciente de solubilidad, empleando agua desmineralizada y una balanza analítica Mettler AJ 150 DL. Seguido de ello se realizó una prefiltración con membrana Millipore de 0,5 µm, con posterior filtración esterilizante en membrana Millipore de 0,20 µm y bajo campana de flujo unidireccional horizontal. En esa misma área y cumpliendo con las buenas prácticas de manufactura para estos productos, se procedió a mezclar porciones de la dispersión concentrada de HPMC al 2% con cada una de las soluciones diluentes estériles, de tal manera de obtener dos formulaciones de lágrimas artificiales con la concentración final deseada HPMC al 0,5%. Para finalizar, se envasaron en frascos goteros de vidrio color ámbar de 30 mL previamente lavados y esterilizados.

ESTERILIDAD

Se determinó siguiendo el método directo descrito en la USP 30 (2007). Una vez finalizados los 14 días de incubación, todas las muestras fueron inoculadas con 100 UFC: para el caldo de soya caseína (Difco) con *Candida albicans* ATCC 10231 y para el caldo Tioglicolato (Difco) con esporas de *Clostridium sporogenes* ATCC 19404, de acuerdo con la metodología empleada por el Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel (Australian Gov, 2006).

EFECTIVIDAD ANTIMICROBIANA

Se emplearon cuatro de los microorganismos especificados en la USP 30 (2007). Las cepas seleccionadas fueron: *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) y *Candida albicans* (ATCC 10231), las cuales fueron mantenidas en perlas de vidrio bajo refrigeración empleando medios selectivos específicos para el crecimiento de cada uno de los microorganismos. Una perla de cada cepa fue inoculada en Caldo Trypticase Soya (Difco), a excepción de la cepa de *Candida albicans*, con la que se empleó Caldo Sabouraud (Difco). Luego se incubaron a 32 °C por 24 horas y posteriormente se subcultivaron en medio sólido. Los crecimientos obtenidos se recogieron con solución salina y fueron diluidos hasta 10⁸ UFC/mL, empleando un estándar nefelométrico de Mac Farland.

Para determinar el número de células por mL de cada suspensión, se realizó un recuento en placas de agar. La selección de los microorganismos, medios de cultivo, preparación de los inóculos y procedimiento empleado se realizó siguiendo el método de la USP 30 (2007): «Ensayo de efectividad antimicrobiana».

Con el fin de evitar un falso negativo debido a la presencia de los preservativos, fue necesario neutralizar los agentes antimicrobianos. Para la formulación que contenía cloruro de benzalconio, se empleó Caldo Lethen (Difco) como solución neutralizante y para la dispersión que contenía perborato de sodio se utilizó Caldo Trypticase Soya con piruvato de sodio al 1% (Ohresser, 2004).

Para validar la neutralización fue necesario evaluar la capacidad y toxicidad de las soluciones empleadas:

ENSAYO DE CAPACIDAD DE LA SOLUCIÓN NEUTRALIZANTE

Se mezcló un volumen de cada una de las dispersiones isotónicas y preservadas de HPMC al 0,5%, con su correspondiente solución neutralizante en

una proporción de 1:10. Inmediatamente se añadió 0,5 mL de cada una de las suspensiones con 1×10^6 células/mL aproximadamente. Se tomaron alícuotas de 1 mL de la mezcla al cabo de 5, 10 y 15 minutos de contacto y se diluyeron con 9 mL del Caldo Trypticase Soya para las bacterias y con 9 mL de Caldo Sabouraud para *Candida albicans*. De cada dilución se sembró 0,1 mL, sobre la superficie de los agares Trypticase Soya y Sabouraud, las placas fueron incubadas a 32 °C por 24 horas para bacterias y 25 °C por 5 días para hongos.

ENSAYO DE TOXICIDAD DE LA SOLUCIÓN NEUTRALIZANTE

Se diluyó la suspensión de cada uno de los microorganismos con agua peptonada hasta obtener 1×10^6 células/mL aproximadamente. Luego se diluyó en una proporción de 1:10 en agua destilada, se toma 1 mL y se le añadió a 9 mL de cada una de las soluciones neutralizantes (Caldo Lethen y Caldo Trypticase Soya con piruvato de sodio al 1%). Se dejaron en contacto y al cabo de 5, 10 y 15 minutos se tomó 1 mL de cada mezcla y se diluyó con 9 mL de Caldo Trypticase Soya (concentración 1:10). Posteriormente se tomó 0,1 mL y se sembró por duplicado en la superficie de los agares Trypticase Soya y Sabouraud. Las placas fueron incubadas a 32 °C por 24 horas para bacterias y 25 °C por 5 días para hongos (Langsrud, 1998).

Paralelamente se realizó un control inoculando las mismas poblaciones de microorganismos, sustituyendo las soluciones neutralizantes por Caldo Trypticase Soya.

ENSAYO DE EFECTIVIDAD

Se inoculó por separado 10^6 UFC/mL para cada uno de los gérmenes en el contenido completo (un frasco por cada germen) de las dispersiones de lágrimas artificiales preservadas siguiendo el procedimiento de la USP 30 (2007). Posteriormente se procedió a seguir lo establecido para los productos de categoría I, ya que dentro de ellos se encuentran los productos oftálmicos. Se realizaron los recuentos a los 7, 14, y 28 días. Para ello fue necesario neutralizar previamente las muestras inoculadas con cada germen mezclando 1 mL de la muestra con 9 mL de la solución neutralizante correspondiente. Esta mezcla se mantuvo en contacto por 5 minutos y seguidamente, se prepararon diluciones seriadas. A partir de cada dilución se sembró en los agares Lethen y Sabouraud para la dispersión que contenía cloruro de benzalconio. Paralelamente se utilizaron los agares Trypticase Soya y Sabouraud Dextrosa con adición de 1% de piruvato de sodio para las formulaciones que contenían perborato de sodio.

PIRÓGENOS

La dispersión de HPMC al 2% fue diluida al 50% con solución estéril de las mismas sales (Tabla I) y en condiciones asépticas. Esta modificación se realizó con base en la *Farmacopea Británica* (1998), donde permite para la prueba de pirógenos, diluciones de muestras en solución de albúmina, agua para inyección o solución de cloruro de sodio al 0,9% libre de pirógenos.

A la formulación diluida se le determinó la respuesta febril siguiendo el método descrito por la USP 30 (2007).

Toxicidad ocular. Irritabilidad de la mucosa ocular del conejo (método de DRAIZE modificado)

Las formulaciones estériles de HPMC al 2% y al 0,5%, fueron evaluadas por el método de Draize (Draize, 1994), el cual fue modificado por Conquest y colaboradores en 1977, y es el que se aplica en el Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel, organismo contralor sanitario en Venezuela,

Se seleccionaron tres conejos albinos aptos para el ensayo (con características de ojo normal: sin enrojecimiento, ni descarga entre otros). Se tomó 0,1 mL de la dispersión esterilizada y se instiló en uno de los sacos conjuntivales de cada conejo. El otro ojo se tomó como control. El tratamiento se aplicó sin posterior lavado con solución fisiológica. Se observó el desarrollo de la lesión a los diferentes tiempos: t0, t24h, t48h, t72h, t96h, t7 días después de la aplicación; esto se hizo a simple vista y en presencia de fluoresceína al 2%. Se evaluaron: daños corneales (opacidad), inflamación en el iris, deterioro de la conjuntiva o mucosidad en los párpados (enrojecimiento o quemosis), así como el tiempo de duración de los daños. Las evaluaciones se realizaron en forma individual a cada animal de experimentación.

Este método logró cuantificar mediante la asignación de valores numéricos arbitrarios, las reacciones fisiológicas observadas en partes del ojo (córnea, conjuntiva e iris). Este ensayo modificado por Conquest en 1997, parámetros como enrojecimiento, quemosis, descarga, opacidad corneal.

Resultados y Discusión

La formulación viscoelástica (HPMC al 2% libre de agente de conservación antimicrobiana) que fue sometida a esterilización por calor húmedo, así como las formulaciones de HPMC al 0,5% que fueron sometidas previamente a esterilización con posterior llenado bajo condiciones asépticas, demostraron la ausencia de microorganismos viables; es decir,

cumplen con los requisitos de esterilidad establecidos por la USP 30 (2007).

Existe evidencia que indica que el proceso de esterilización por autoclave (120 °C por 15 minutos) no modifica la estabilidad física de las dispersiones de HPMC al 2% en solución de sales y se logra además la obtención de productos estériles (Fechner, 1985 y Andueza, 2002). Se sabe que al someter el polímero a esterilización en autoclave, éste evidencia cambios físicos dentro de la dispersión, que se manifiestan con aparición de una turbiedad o separación del medio dispersante (Andueza, 2002). Esto se debe a que el aumento de la temperatura disminuye la hidratación del polímero, éste se hace menos soluble y la fuerte interacción polimérica aumenta separándose del disolvente. Para recuperar completamente la estructura polimérica dentro de la dispersión, es necesario mantenerla en reposo por al menos 72 horas después de haberse sometido a este proceso.

Debido a la termosensibilidad del perborato de sodio presente en las lágrimas artificiales, que se descomponen a temperaturas superiores a 60 °C con liberación de oxígeno, fue necesario modificar el proceso de esterilización (*The Merck Index*, 2001). Por

ello se procedió a emplear el método de esterilización por calor húmedo para las dispersiones concentradas de HPMC al 2% y la filtración esterilizante para las soluciones diluyentes que contenían los agentes antimicrobianos.

Al evaluar la efectividad antimicrobiana se puede observar en la Tabla III que el contacto inicial de los gérmenes con los productos produce una reducción de los mismos, expresados como los números de unidades formadoras de colonias por mL que se encontraron inicialmente en cada una de las suspensiones microbianas empleadas para el ensayo, así como el recuento inicial de cada uno de los frascos inoculados. Esta reducción observada es similar entre ambos preservativos, a excepción del *Staphylococcus aureus* que en presencia de cloruro de benzalconio con EDTA manifiesta una drástica disminución de 5 unidades logarítmicas; esto indica que este agente de conservación antimicrobiana es muy efectivo para este microorganismo. Confirmando la buena efectividad de este preservativo frente a las bacterias grampositivas (Mamoru, 2003).

Los resultados de la efectividad antimicrobiana de las dispersiones evaluadas a diferentes tiempos se detallan en las Tablas IV y V. Se puede observar

Tabla III
Recuento de las suspensiones de gérmenes y de las dispersiones al tiempo inicial (t=0).

| Microorganismos | Suspensión UFC*/mL | HPMC al 0,5% en fórmula 1 ^a UFC/mL | Reducción log. | HPMC al 0,5% en fórmula 1B UFC/mL | Reducción log. |
|----------------------|-----------------------|---|----------------|-----------------------------------|----------------|
| <i>E. coli</i> | 1,1 x 10 ⁶ | 7,6 x 10 ⁴ | 1,16 | 4,7 x 10 ⁴ | 1,42 |
| <i>P. aeruginosa</i> | 2,0 x 10 ⁶ | 8,0 x 10 ⁴ | 1,39 | 1,3 x 10 ⁵ | 1,18 |
| <i>S. aureus</i> | 1,3 x 10 ⁶ | <10 | 5,11 | 8,0 x 10 ⁴ | 1,2 |
| <i>C. albicans</i> | 1,5 x 10 ⁶ | 1,2 x 10 ⁵ | 1,09 | 8,3 x 10 ⁴ | 1,25 |

* UFC = Unidades Formadoras de Colonias

Tabla IV
Ensayo de efectividad de la dispersión de HPMC al 0,5% en la fórmula 1A

| Germen | Recuento t=0 UFC**/mL | Log. t=0 | Recuento t=7 días UFC/mL | Reducción logarítmica | Recuento t=14 días UFC/mL | Recuento t=28 días UFC/mL | Reducción logarítmica total |
|----------------------|-----------------------|----------|--------------------------|-----------------------|---------------------------|---------------------------|-----------------------------|
| <i>E. coli</i> | 7,6 x 10 ⁴ | 4,88 | <10 | 3,88 | <10 | <10 | 3,88 |
| <i>P. aeruginosa</i> | 8,0 x 10 ⁴ | 4,9 | <10 | 3,9 | <10 | <10 | 3,9 |
| <i>S. aureus</i> | <10 | 1 | <10 | 5,11* | <10 | <10 | 5,11* |
| <i>C. albicans</i> | 1,2 x 10 ⁵ | 5,08 | <10 | 4,08 | <10 | <10 | 4,08 |

* Se tomó el valor del inóculo

** UFC = Unidades Formadoras de Colonias

Tabla V
Ensayo de efectividad de la dispersión de HPMC al 0,5% en la fórmula 2A

| Germen | Recuento t=0 UFC*/mL | Log. t=0 | Recuento t=7 días UFC/mL | Reducción logarítmica | Recuento t=14 días UFC/mL | Recuento t=28 días UFC/mL | Reducción logarítmica total |
|----------------------|----------------------------|-------------|--------------------------------|--------------------------|---------------------------------|---------------------------------|-----------------------------------|
| <i>E. coli</i> | 4,7x 10 ⁴ | 4,67 | <10 | 3,67 | <10 | <10 | 3,67 |
| <i>P. aeruginosa</i> | 1,3 x 10 ⁵ | 5,11 | <10 | 4,11 | <10 | <10 | 4,11 |
| <i>S. aureus</i> | 8,0 x 10 ⁴ | 4,9 | <10 | 3,9 | <10 | <10 | 3,9 |
| <i>C. albicans</i> | 8,3 x 10 ⁴ | 5,17 | <10 | 4,17 | <10 | <10 | 4,17 |

* UFC = Unidades Formadoras de Colonias

que los recuentos de todos los microorganismos ensayados a tiempos superiores al inicial, fueron menores a 10 UFC/mL; de esta misma manera, al comparar las reducciones logarítmicas entre el tiempo inicial y los siete días de incubación, los valores fueron mayores a tres unidades. Para las bacterias, la reducción logarítmica calculada con respecto al recuento inicial mostró unidades logarítmicas mayores de 1 a los 7 días de incubación y 3 unidades logarítmicas a los 14 días. A partir de los 14 días no se observó ningún incremento. En el caso de *Candida albicans* no se observó ningún aumento durante los 7, 14 y 28 días de incubación con relación al recuento inicial.

Nuestros resultados indican que las formulaciones evaluadas cumplen con el criterio establecido por la USP 30, no presentándose diferencias entre los agentes de conservación antimicrobiana, por lo que se sugiere el empleo del perborato de sodio por no tener demostrado hasta los momentos efecto tóxico sobre las células oculares.

Se ha determinado que el Caldo Lethen tiene la capacidad para neutralizar desinfectantes, debido a la presencia de lecitina de soya, que actúa como agente emulsificante y neutraliza compuestos de amonio cuaternario como el cloruro de benzalconio (Lethen Caldo, 2008; Langsrud, 1998). Para el perborato de sodio, la literatura no reporta un neutralizante específico. Basándonos en el trabajo de Ohresser y col. (2004), en el que demuestra que la incorporación de una solución de piruvato de sodio al 1% en Caldo Tripticase Soya fue capaz de neutralizar los peróxidos mediante una simple reacción estequiométrica, se sugirió el empleo de este método para neutralizar el perborato de sodio en concentración preservante de 0,053%. Estos resultados preliminares sugieren realizar a futuro la validación correspondiente.

Reacción estequiométrica

Piruvato + Peróxido ↔ Acetato + Dióxido de Carbono + Agua

Así mismo, para las soluciones neutralizantes empleadas fue necesario evaluar su capacidad y toxicidad. Los tiempos evaluados (5, 10, 15 minutos), presentaron igual efecto neutralizante, por lo que se seleccionó el menor tiempo de contacto para realizar la prueba de efectividad antimicrobiana.

En el ensayo de toxicidad se demostró que la solución neutralizante no afecta las células microbianas, es decir, durante el ensayo de efectividad la reducción logarítmica fue debida a la acción letal del preservativo y no de la solución neutralizante.

Todos estas consideraciones demuestran que el perborato de sodio también puede ser empleado como agente de conservación antimicrobiana en las lágrimas artificiales de HPMC, y por sus características al reaccionar con la catalasa ocular se descompone en agua y oxígeno, lo que indica una menor toxicidad que el cloruro de benzalconio asociado con el EDTA. La efectividad fue demostrada en cuatro de las cinco cepas establecidas por la USP 30 (2007), no empleándose el *Aspergillus niger*; sin embargo, en reportes anteriores ya se ha demostrado su efectividad (Grant, 1996). Es importante resaltar que los ensayos se realizaron en lotes piloto (60 frascos de 30 mL), por lo que se continuará con la estandarización y validación de los métodos para mayor cantidad de muestras y diferentes lotes de producción, así como todas las cepas exigidas por la USP 30 (2007).

Con relación a los ensayos de pirógenos, la medida del aumento de la temperatura corporal del conejo cumple con los requisitos de la USP 30 (2007), ya que ninguno de ellos mostró un incremento de 0,5 °C o más de la temperatura inicial.

Ahora bien, debido a la alta viscosidad de la dispersión viscoelástica (alrededor de 4000 cps), impidió su administración directa en la vena marginal de la oreja del conejo. En vista de este inconveniente y basándose en la *Farmacopea Británica* (1998), donde se permiten diluciones de muestras en solución de albúmina, agua para inyección o solución de

cloruro de sodio al 0,9% libre de pirógenos, se procedió a diluir en condiciones asépticas el producto en un 50%, empleando la solución estéril que contenía las mismas sales con que se preparó la dispersión, esto con la finalidad de conservar la isotonía y modificar la formulación sólo en relación con la viscosidad y concentración del polímero. Es importante resaltar que el método exige calentar las muestras a $37^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ antes de proceder a la inyección. Esto favorece la fluidez del producto ya que se ha demostrado que al aumentar la temperatura de las dispersiones poliméricas de HPMC, la viscosidad se ve disminuida (Andueza, 2002); esto favorece aún más su administración y evita la formación de trombos o abscesos en el conejo que puedan influir en los resultados finales del ensayo. Esta modificación al método requiere ser validada y será objeto de estudio en el futuro.

Los valores obtenidos de irritabilidad en la mucosa ocular de conejo según la escala de DRAIZE para la dispersión isotónica de HPMC al 2%, reportaron un promedio total diario de 0,66 en las primeras 24 horas, lo que indica que el producto es levemente irritante, con un efecto de duración leve, no observándose lesión en córnea o en iris. Este resultado se consideró satisfactorio. Por su parte, las fórmulas de HPMC al 0,5% estériles reportaron un promedio total diario de cero (0) en las primeras 24 horas, lo que indica que los productos no son irritantes, no observándose lesiones en córnea o en iris. Este resultado también se consideró satisfactorio.

Se conoce que existen diferencias entre el ojo del conejo y el humano (Sharpe, 1985). En efecto, el conejo posee un tercer párpado, produce menos lágrimas, el pH de la lágrima es más alcalino y la capa córnea es más delgada que la humana. Esto permite sugerir que la superficie ocular del conejo es más sensible que la humana y por lo tanto el método de Draize sobreestima la capacidad irritante de un producto en el ojo del humano (Freeberg, 1984). Es por ello que nos atrevemos a afirmar que las pre-formulaciones evaluadas en los conejos presentarán un efecto irritante igual o menor sobre la conjuntiva y córnea humana, cumpliendo así con el requisito de atoxicidad.

Conclusiones

Los resultados preliminares obtenidos en cuanto a calidad microbiológica, toxicidad ocular y efectividad antimicrobiana de las formulaciones evaluadas, empleando procedimientos previamente establecidos y tomando en consideración las buenas prácticas de manufactura, señalan que estas formulaciones

pueden llegar a ser seguras y confiables realizando la validación de los procesos de manufactura, así como de los ensayos respectivos. Esto a su vez nos permitirá seguir evaluando y considerando diferentes parámetros, a fin de obtener las formulaciones definitivas y posteriormente corroborar su eficacia con estudios de farmacología clínica.

Agradecimientos

A Laboratorios Farma S.A. por el suministro de algunos insumos y permitirnos el uso de sus instalaciones para realizar esta investigación. Al Instituto Nacional de Higiene «Rafael Rangel», por su colaboración en la realización de los ensayos. Al Instituto de Investigaciones Farmacéuticas de la Universidad Central de Venezuela, por su aporte económico bajo el proyecto N° IIF 01/2001.

Referencias bibliográficas

- Abelson M, Washburn S. 2002. The Downside of Tear Preservatives. *Review of Ophthalmology* 9(5): 102-104, 106.
- Allowood G. 1998. *Principles and Practices of Desinfection, Preservation and Sterilization*, 3th edition. Editado por AD Russell. WB Hugo & GAJ Ayliffe, pp. 657-665.
- Andueza I, Ávila G, Attías D. 2000. Caracterización Física de hidroxipropilmetilcelulosa con potencial aplicación oftalmológica: pH, Tensión Superficial, Característica de la película. *Rev Soc Quím Méx* 44(3): 224-228.
- Andueza I, Ávila G, Attías D. 2002. Efecto de la esterilización por calor húmedo sobre algunas propiedades físicas de una dispersión isotónica de hidroxipropilmetilcelulosa. *Rev Fac Farm* 65(2):46-55.
- Andueza I, Avila G, Attias D. 2004. Influencia de la esterilización sobre el comportamiento reológico y pH de una dispersión isotónica de hidroxipropilmetilcelulosa. *Rev Soc Quím Méx* 48: 220-224.
- Andueza I, Ávila G, Attías D. 2002. Caracterización reológica de hidroxipropilmetilcelulosa con potencial aplicación oftalmológica. *Rev Soc Quím Méx* 44 (3): 229-232.
- Australian Government, Dep. of Health and Ageing Therapeutic Goods Administration. TGA guidelines for sterility testing of therapeutic goods. (En línea). 2006. (Consultado en enero 2007). Disponible en: www.tga.gov.au/docs/pdf/sterilit.pdf.
- Bapatla K, Lorenzetti O. 1993. 2nd ed. *Development of Ophthalmic Formulations*. In: *Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications*, vol. 2. Avis KA, Liberman HA, Lachman L, editors. Marcel Dekker, Inc; New York, pp. 541-582.
- British Pharmacopoeia. 1998. *Test for Pyrogens*. London The Stationery Office. Vol. II, pp. A172 – A173.

- Conquest P, Durand G, Laillier J, Blazonnet B. 1977. Evaluation of ocular irritation in the rabbit: objective versus subjective assessment. *Toxicol Appl Pharmacol* 39:129-139.
- Draize J, Woodwatd G, Calvery H. 1944. Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes. *J Pharmacol Exp Ther* 82:377 – 389.
- Fechner PU. 1985. Preparation of 2% HPMC for viscous surgery. *Am Intraocular Implant Soc J* 11: 606-607.
- Freeberg F, Griffith J, Bruce R, Bay P. 1984. Correlation of animal test methods with human experience for household products. *J Tox Cutaneous and Ocular Tox.* 1: 53-64.
- Grant R, Ajello M, Vlass E. 1996. Salt mater or high tech? A look at to new rinsing solutions for lenses. *Optician* 212:38 – 41.
- Hedqvist B. (En línea). 1999. Dry eyes – remarks on local therapy (Citado en Oct. 2007) Disponible en la web: www.sjogrensyndrom.se/100_site/spdfs/s24.pdf
- Kaufman P, Alm A. 2004. Adler, fisiología del ojo. Aplicación clínica. 10° edición, Editado por Elsevier España S.A. pp. 96-97.
- Langsrud S, Sundheim G. 1998. Factors influencing a suspension test methods for antimicrobial activity of disinfectants. *J Ap Micro* 85:1006-1012.
- Lee V. 1993. Mitra AK, editor. Precorneal, corneal, and Postcorneal Factors In: *Ophthalmic Drug Delivery Systems*. Marcel Dekker, Inc; New York, pp. 59-69.
- Lethen Caldo (En línea). 1998. (Citado en Oct. 2007). Disponible en la web: <http://www.britanialab.com.ar/esp/productos/b02/letheencaldo.htm>
- Liesegang T, Bourne W. 1986. The use of HPMC in extracapsular cataract extraction with intraocular lens implantation. *Am J Ophthalmol* 12: 723-726.
- López B, Ubel J. 1991. Quantitative evaluation of the corneal epithelial barrier. Effect of artificial tears and preservatives. *Curr Eye Res* 10(7):645-656.
- Mamoru S, Reiko U, Nobuhiro I, Naoaki H, Eiichi O. 2003. Studies of antibacterial Activity of Benzalkonium Chloride as preservative for Ophthalmic solutions Against Gram positive cocci and negative rods. *Jap J Phar Health Care Sci* 29 (3): 341-345.
- Ohresser S, Griveau S, Schann C. 2004. Validation of microbial recovery from hydrogen peroxide-sterilized air. *PDA J Pharma Sc Tech* 58(2): 75-80.
- Pflug I, Evans K. 2000. Carrying Out Biological Qualification, the Control Operation of Moist-Heat (Steam Sterilization) Processes for Producing Sterile Pharmaceuticals and Medical Devices. *PDA J Pharma Sc Tech* 54(2):117-135.
- Sharpe R. 1985. The Draize test- motivation for change *Food Chem Tox* 23:139-143.
- Sterilizers. 2000. The authorized persons group UK. Moist-Heat Sterilization in the UK Pharmaceutical Industry. *PDA J Pharm Sc Tech* 54 (5): 413-420.
- The Merck Index. 2001. Thirteenth ed. An Encyclopedia of chemicals, drugs and biological. Whitehouse Station (NJ): Merck & Co., Inc.: pp. 283, 1544-1545, 8725, MISC-32-42.
- Toda I, Shinosaki N, Tsubota K. 1996. HPMC for the treatment of severe dry eye associated with sjogren's syndrome. *Cornea* 15 (2): 120-128.
- Turco S. 1994. 4th ed. *Ophthalmic Preparation*. In: *Sterile Dosage Forms. Their preparation and clinical application*. Brown M, Klass F, editors. US: Williams & Wilkins Press; Philadelphia pp. 344-371.
- USP 30-NF 22. 2007. United States Pharmacopeia convention, Inc., Rokville, MD. pp. 85-87, 105-110. Hypromellose (Sup.1;
- Versura P, Maltráelo MC, Stecher F, Camarazza R, Lashci R. 1989. Dry eye before and after therapy with HPMC Ultrastructural and Cytochemical study in 20 patients. *Ophthalmologica* 198:152-162.

Antagonismo entre la angiotensina II y el péptido natriurético auricular en la generación del GMPc en la oliva inferior de la rata

Angiotensin II and atrial natriuretic peptide antagonism in the cGMP generation in rat inferior olive

MARÍA DEL ROSARIO GARRIDO* y ANITA ISRAEL

Resumen

La angiotensina II (ANG II) y el péptido natriurético auricular (PNA) son péptidos vasoactivos con acciones biológicas ampliamente conocidas y otras emergentes, como son el control del crecimiento y la diferenciación neuronal. Estos dos sistemas peptidérgicos son antagonistas fisiológicos y se postula que su interacción puede ocurrir a nivel de las vías de señalización intracelular. Se ha propuesto la participación de mecanismos de fosforilación y desfosforilación en dicho antagonismo. En el presente trabajo evaluamos las acciones que ejercen la ANG II y el CGP 41221A (CGP), dos ligandos del receptor AT_2 , sobre la síntesis de GMPc basal o la inducida por el PNA, en la oliva inferior de ratas de 12 días de nacidas. Nuestros hallazgos apoyan la interacción, ya que demuestran que cuando se añaden ligandos como la ANG II y el CGP a la preparación de la oliva inferior de ratas de 12 días de nacidas se reduce la producción de GMPc, tanto basal como estimulada por el PNA. Desde que estos efectos fueron inhibidos tanto por el ortovanadato de sodio como por el ácido okadaico, se sugiere que mecanismos de desfosforilación mediada por fosfatasa, tanto del tipo PTPasas como PP2A, pueden estar involucrados.

Palabras clave: Péptido natriurético auricular, angiotensina II, receptor AT_2 , GMPc.

Abstract

Angiotensin II (ANG II) and the atrial natriuretic peptide (PNA) are vasoactive peptides with a broad and well established diversity of biological actions and other emergent ones such as the control of the growth and the neuronal differentiation. These two peptidergic systems are physiological antagonists and it is postulated that the interaction among them could be at the level of their intracellular signaling pathways. It has been proposed that phosphorylation and dephosphorylation reactions mediate this antagonism. In the present work we evaluate the actions of ANG II and the CGP 41221A, two ligands which selective bind AT_2 receptor, on the basal or PNA-induced cGMP synthesis, in the inferior olive of the 12 days born rats. Our results are in favor of this interaction since when the ligands are added to the inferior olive preparation, a reduction in basal and PNA-stimulated cGMP production is observed. Since these effects were inhibited by sodium orthovanadate and by okadaic acid, it is suggested the involvement of phosphatases of the PTPasas and PP2A type.

Key words: Atrial natriuretic Peptide, Angiotensin II, AT_2 receptor, cGMP.

INTRODUCCIÓN

La angiotensina II (ANG II), el octapéptido biológicamente activo del sistema renina-angiotensina, posee una amplia variedad de acciones en los sistemas biológicos. Aunque la mayoría de las acciones conocidas de la ANG II están relacionadas con el

control de la secreción hormonal, de la presión arterial y la homeostasis de fluidos, la evidencia reciente sugiere que las acciones centrales de la angiotensina II abarcan aspectos relacionados con la modulación del estrés, del comportamiento sexual, del aprendizaje y la memoria, de la migración celular y de la

Laboratorio de Neuropeptidos, Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela.

* A quién debe dirigirse la correspondencia: e-mail: mrgarrido11@hotmail.com

sinaptogénesis neuronal (Pan, 2004; von Bohlen y Albrecht, 2006; Daniels y col., 2007).

La ANG II ejerce sus diferentes acciones en los tejidos blancos mediante la interacción con receptores de membrana. La heterogeneidad de los receptores de la ANG II tiene importantes implicaciones fisiológicas y farmacológicas. Los dos subtipos de receptores de la ANG II, el AT₁ y el AT₂, pertenecen a la superfamilia de receptores heptahelicales (Bumpus y col., 1991), y ambos unen a la angiotensina II con igual afinidad; sin embargo, los residuos homólogos entre ellos son de apenas 30% y difieren significativamente en sus mecanismos de señalización (von Bohlen y Albrecht, 2006; Metha y Griendling, 2006; Daniels y col., 2007).

La mayoría de los efectos centrales conocidos de la ANG II están mediados por el subtipo de receptor AT₁, localizado en áreas relacionadas con la regulación de la presión arterial, la homeostasis de los fluidos y electrolitos y la liberación de hormonas (Saavedra y col., 1992; Daniels y col., 2007). Del mismo modo existe evidencia substancial de que la ANG II, vía este subtipo de receptor, actúa como factor de crecimiento, mediado por diferentes vías de señalización (Bedecs y col., 1997; Ishida y col., 1998).

Asimismo se han atribuido a la estimulación del receptor AT₁ mecanismos de señalización tales como la estimulación de la fosfolipasa C (mediada por proteínas G), la producción de inositol 1,4,5-trifosfato y diacilglicerol, la movilización de Ca⁺⁺ intracelular (Alexander y col., 1985), la inhibición de la actividad de la adenilil ciclasa, el incremento del GMPc intracelular, la liberación de ácido araquidónico y prostaciclina, y la activación de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) (Timmermans y col., 1993).

La función de los receptores AT₂, sin embargo, permanece elusiva y controversial. Los receptores AT₂ han sido señalados como responsables de la diferenciación celular, de la regeneración neuronal y tisular (Stroth y col., 1998), promueven la regeneración axonal (Lucius y col., 1998) y su activación resulta en la inhibición del crecimiento y promoción de la apoptosis (Schmitz y Berk, 1997).

Los receptores AT₂ están ampliamente expresados en áreas del cerebro adulto relacionadas con el aprendizaje y el control de la actividad motora (Tsutsumi y Saavedra, 1991; Wright y Harding, 1995). Se ha reportado la presencia de inmunorreactividad a la ANG II en las neuronas cerebelosas (Erdmann y col., 1996), así como la presencia de ambos subtipos de receptores en ratas de dos semanas de nacidas (Tsutsumi y col., 1993, Jöhren y col., 1996). Adicio-

nalmente, Nuyt y col. (1999) demostraron que el ARNm para el AT₂ persiste hasta la madurez cerebral en núcleos relacionados con las funciones motoras y con la integración sensorial. Mientras que estudios recientes han demostrado la presencia de mutaciones del receptor AT₂ localizadas en el cromosoma X de pacientes masculinos con retraso mental (Vervoort y col., 2002), y la presencia de anomalías neurológicas centrales en ratones AT₂KO, deficientes en el receptor AT₂ (Ichiki y col., 1995), sugiriendo que el gen del receptor AT₂ está involucrado en el desarrollo cerebral y el desarrollo neuronal.

Los receptores AT₂ de la angiotensina II se expresan abundantemente en el cerebro fetal, donde probablemente contribuyen al desarrollo cerebral. Igualmente, éstos receptores son capaces de expresarse en condiciones patológicas con el fin de proteger al cerebro de accidentes cerebrovasculares; sin embargo, los mecanismos subyacentes a estas acciones no están claramente dilucidados (Li y col., 2006).

Poco se conoce sobre la señalización intracelular del receptor AT₂ específicamente en relación al crecimiento y diferenciación, sin embargo la evidencia reciente apoya un papel en la fosforilación/desfosforilación proteica (Marrero y col., 1995; Nahmias y col., 1995; Ciuffo y col., 1998; Zielinski y col., 2001; Álvarez y col., 2003). Varios reportes sugieren que el receptor AT₂ está asociado con la modulación de los niveles de GMPc. Así, en cultivos de células neuronales del cerebro de ratas de un día de nacidas, y en células PC12W, se ha demostrado que la ANG II, vía la estimulación del receptor AT₂, disminuye la actividad de la guanilil ciclasa particulada, postulándose que este efecto es debido a la estimulación de la actividad de fosfotirosina fosfatasa y sugiriendo una posible interacción entre el receptor AT₂ de la ANG II y los receptores de los péptidos natriuréticos (PNs) (Bottari y col., 1992; Brechler y col., 1993).

Adicionalmente a sus acciones inhibitorias sobre el sistema renina-angiotensina-aldosterona, los estudios recientes han ampliado el conocimiento sobre el papel homeostático de los PNs. Se sabe que estos péptidos modulan las acciones de diversas hormonas, citoquinas y factores de crecimiento. Más aún, los PNs contrarrestan los estímulos fibróticos e inflamatorios responsables de las respuestas de remodelación cardíaca (Molketin, 2003; Holtwick y col., 2003), promueven el crecimiento óseo (principalmente el PNC) (Chusho y col., 2001; Tamura y col., 2004; Maack, 2006), juegan un papel importante en el desarrollo del sistema reproductor (Schulz, 2005) y poseen un potente efecto lipolítico en los humanos (Lafontan y col., 2005).

Las diversas acciones biológicas de los péptidos natriuréticos son mediadas por la unión a sus receptores/guanilil ciclasas A y B, también designados NPR-A o GC-A y NPR-B o GC-B, mientras que el receptor NPR-C ha sido descrito como un receptor de aclaramiento. El PNA se une selectivamente a la GC-A, y la identificación de los sitios de unión para este péptido en el sistema nervioso central ha sido muy relevante en cuanto al entendimiento de sus funciones. En la rata se presenta una alta densidad de receptores para el péptido natriurético auricular en diversos núcleos relacionados con el control cardiovascular y neuroendocrino (Kurihara y col., 1987; Brown y Zuo, 1993; Herman y col., 1996). Adicionalmente, mediante métodos de hibridación *in situ* se ha reportado la presencia de ARNm para NPR-A y NPR-B en el cerebelo de la rata (Wilcox y col., 1991) y el mono (Abdelalim y col., 2007), así como la presencia de inmunorreactividad al PNA en neuronas y astrocitos del cerebelo y del complejo de la oliva inferior en el humano (McKenzie y col., 2001).

Adicionalmente a sus bien establecidas funciones en la regulación cardiovascular, neuroendocrina y del balance electrolítico (Imura y col., 1992; Gutkowska y col., 1997; Levin y col., 1998), los PNs pueden estar involucrados en varios tipos de plasticidad neuronal y no neuronal a nivel del sistema nervioso central. Así, estos péptidos inhiben la proliferación de astrocitos inducida por las MAPKs, vía su receptor NPR-C (Prins y col., 1996), e inhiben la apoptosis de células PC12 y de las células embrionarias cerebrales (Fiscus y col., 2001).

Más aún, se ha demostrado que transcritos para el PNA y el NPR-A, pueden ser regulados hacia arriba por períodos prolongados en la corteza cerebral de la rata, en casos de depresión cortical aguda (Wiggins y col., 2003), y que el ARNm y los sitios de unión para el PNA están diferencialmente distribuidos durante el desarrollo pre y postnatal en el cerebro de la rata (Brown y Zuo 1993, 1995; Ryan y Gundlach, 1998), sugiriendo un papel para el PNA en la plasticidad neuronal.

Es bien conocido que el PNA actúa como un antagonista funcional del sistema renina angiotensina, inhibiendo la secreción de renina por el riñón y la secreción de aldosterona por la glándula suprarrenal. El PNA también antagoniza todos los efectos conocidos de la ANG II, incluyendo la vasoconstricción periférica, la actividad mitogénica y los efectos dipsogénicos centrales (Maack y col., 1984; Burnet y col., 1984; Maack, 1986). Muchas son las vías y los mecanismos implicados en este antagonismo, entre los cuales se postula la interacción a nivel de los segundos mensajeros.

Se ha demostrado que los niveles de GMPc pueden incrementar o disminuir en diferentes tipos celulares en respuesta a la activación de los receptores AT₂. Así, estudios sobre la señalización mediada por el receptor AT₂ resulta en una reducción de los niveles de GMPc en oocitos de *Xenopus* (Pulakat y col., 2002; 2005), en la neointima de ratas posterior a angioplastia (Moroi y col., 1997), en las células PC12W (Brechler y col., 1994) y en las células cromafines suprarrenales (Ishii y col., 2001). En las células PC12W se demostró que la activación del receptor AT₂ resulta en inhibición de la guanilil ciclasa particulada (Bottari y col., 1992; Brechler y col., 1994). En contraste, en las células NG108-15 (Chaki e Inagami, 1993) y en las células de neuroblastoma neuro-2A, la activación de este subtipo de receptor por acción de la angiotensina II resulta en una activación de la guanilil ciclasa soluble vía la síntesis del óxido nítrico. Así, mientras está clara la capacidad del receptor AT₂ de influenciar los niveles de GMPc, la dirección del cambio de los niveles de este nucleótido cíclico o las moléculas efectoras varía dependiendo del tipo celular.

Con el fin de esclarecer aún más la posible señalización del receptor AT₂, así como la regulación de dicha señalización, en el presente estudio evaluamos si la angiotensina II y un ligando del receptor AT₂, el CGP 41221A, afecta la producción de GMPc basal o la inducida por el péptido natriurético auricular, en una estructura cerebral rica en receptores AT₂ como lo es la oliva inferior de ratas de 12 días de nacidas.

Materiales y Métodos

Ratas Sprague-Dawley, macho, de doce días de nacidas (20-23 g), fueron mantenidas bajo períodos alternativos de luz y oscuridad, con libre acceso a la leche materna. Los animales fueron sacrificados por decapitación entre las 09:00 y las 10:00 h y los cerebros inmediatamente removidos. Se obtuvieron secciones coronales de cerebro (20 µm) a 4 °C. La oliva inferior fue obtenida mediante la técnica del *punch* utilizando una aguja con un diámetro interno de 0,75 mm. El tejido fue rápidamente homogeneizado en buffer Tris HCl, 50 mM, pH 7,5, conteniendo 1 mM EDTA, 250 mM de sacarosa, 1,6 mM de teofilina y 50 µg/ml de leupeptina. Se determinaron las proteínas utilizando albúmina sérica de bovino como patrón (Lowry y col., 1951) y el contenido proteico fue ajustado a 10-20 µg proteína/10 µl. La actividad de guanilil ciclasa y la cantidad de GMPc formada fue determinada por radioinmunoensayo (Steiner y col., 1972) usando un kit comercial de Amersham Corp.

(Arlington Heights, IL). El análisis estadístico de los datos se realizó mediante análisis de variancia de una vía (ANOVA) y la prueba de Newman Keul. Los resultados fueron expresados como la media \pm EEM. La actividad de guanilil ciclasa es reportada como pmoles de GMPc formados/5 min/mg de proteína.

Resultados

EFFECTOS DE LA ANGIOTENSINA II O DEL CGP 42112A SOBRE LA FORMACIÓN DE GMPc, BASAL Y ESTIMULADO POR EL PÉPTIDO NATRIURÉTICO AURICULAR EN LA OLIVA INFERIOR DE LA RATA

Como se muestra en la figura 1, en el homogeneizado de la oliva inferior de las ratas de 12 días de nacidas, la adición al medio de incubación del péptido natriurético auricular (PNA) (10^{-7} M) incrementó significativamente la formación de GMPc (56%) ($p < 0,01$). Por el contrario, la estimulación con ANG II (10^{-7} M) o con CGP 41221A (10^{-8} M) redujo significativamente la formación del GMPc basal (40% y 50%, respectivamente, $p < 0,01$). Aún mas, la adición simultánea de la ANG + CGP, produjo una disminución en la producción basal del GMPc de magnitud similar a la que se observa al adicionar cada uno de los ligandos en forma individual.

La adición de la ANG II (10^{-7} M) o del CGP 42112A (10^{-8} M) al medio de incubación, redujo el incremento en la formación de GMPc inducido por el PNA en un 73% y 40%, respectivamente ($p < 0,01$ y $p < 0,05$).

Finalmente, la adición del bloqueante del receptor AT_1 , el losartan (10^{-7} M), al medio de incubación no afectó el nivel basal del nucleótido cíclico, ni la reducción de los niveles de GMPc inducidos por la ANG II ($p < 0,05$).

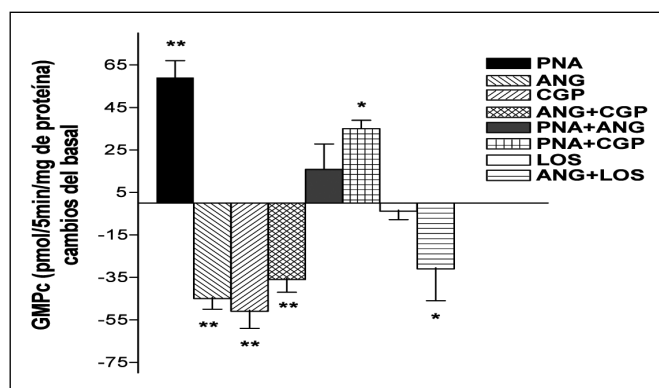


Figura 1. Efectos de la angiotensina II o del CGP 42112A sobre la formación de GMPc basal o estimulada por el péptido natriurético auricular en la oliva inferior de la rata. La producción del GMPc fue medida en homogeneizados de oliva inferior de ratas de 12 días de nacidas. Los valores son expresados como cambio promedio sobre el basal \pm EEM. PNA (10^{-7} M, n=20); ANG II (10^{-7} M, n=17); CGP 42112A (10^{-8} M, n=10); LOS (10^{-7} M, n=6); * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ comparado con el basal.

EFFECTO DEL ORTOVANADATO DE SODIO SOBRE LA ACCIÓN INHIBITORIA INDUCIDA POR LA ANG II O EL CGP 42112A, SOBRE LA FORMACIÓN DE GMPc BASAL O ESTIMULADA POR EL PNA

Con el fin de evaluar la posibilidad de que procesos de desfosforilación estén involucrados en la disminución inducida por la ANG II de la producción de GMPc, estudiamos el efecto del ortovanadato de sodio (10^{-4} M), un inhibidor selectivo de las fosfotirosina fosfatasas (PTPasas). Así observamos que la acción inhibitoria de la ANG II y del CGP 42112A sobre la formación de GMPc tanto basal como la inducida por el PNA, fue completamente revertida por la adición del ortovanadato de sodio (figura 2). El ortovanadato de sodio no afectó el efecto estimulador del PNA sobre la producción de GMPc.

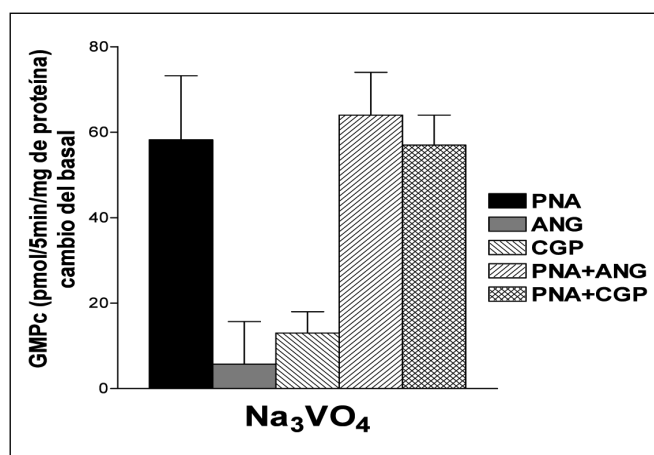


Figura 2. Efecto del ortovanadato de sodio sobre la acción inhibitoria inducida por la ANG II o el CGP 42112A, sobre la formación de GMPc basal o estimulada por el PNA. La producción de GMPc fue medida en homogeneizados de oliva inferior de ratas de 12 días de nacidas. Las muestras fueron preincubadas por 10 min a 37°C en presencia de Na_3VO_4 (10^{-4} M). Los resultados son expresados como la media \pm EEM del GMPc formado (n=4-7).

EFFECTO DEL ÁCIDO OKADAICO SOBRE LA ACCIÓN INHIBITORIA INDUCIDA POR LA ANG II SOBRE LA FORMACIÓN DE GMPc BASAL O ESTIMULADA POR EL PNA

A fin de establecer la posible participación de otros tipos de fosfatasas en la acción de los ligandos de angiotensina II, se incubó la preparación en presencia del ácido okadaico, un inhibidor selectivo de fosfatasas tipo 2A (figura 3). El ácido okadaico, potenció ligeramente la producción de GMPc inducida por el PNA ($P > 0,05$). La adición del inhibidor previno la disminución en la síntesis del nucleótido cíclico inducida tanto por la ANG II como por la adición simultánea de PNA + ANG II.

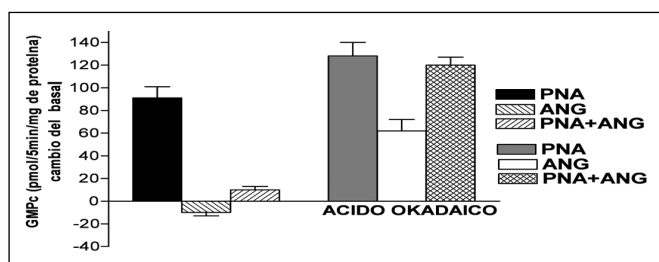


Figura 3. Efecto del ácido okadaico sobre la acción inhibitoria inducida por la ANG II sobre la formación de GMPc basal o estimulada por el PNA. La producción de GMPc fue medida en homogeneizados de oliva inferior de ratas de 12 días de nacidas. Las muestras fueron preincubadas por 10 min. a 37 °C en presencia de ácido okadaico (10^{-7} M). Los resultados son expresados como la media \pm EEM del GMPc formado (n=4-7).

Discusión

La angiotensina II es un péptido vasoactivo potente que presenta una gran variedad de funciones en el sistema nervioso central, entre las cuales podemos citar el crecimiento, la diferenciación y la maduración neuronal. Se ha sugerido un papel de la ANG II en el desarrollo neurobiológico, en el cual resulta de importancia la regulación de la ordenación espacial de las conexiones (von Bohlen y Halbach, 2006). La evidencia apunta a un papel del receptor AT_2 cerebral en estos procesos neurobiológicos. En efecto, se ha demostrado que ratones deficientes en el receptor AT_2 presentan un incremento en la densidad celular en regiones cerebrales tales como la corteza, el hipocampo, la amígdala y el tálamo (Bohlen y Halbach, 2001), efectos que parecen ser consecuencia de alteraciones en los mecanismos de inhibición del crecimiento, disminución de la apoptosis y/o defectos en la migración celular (Gendron y col., 2003).

Específicamente en relación al cerebelo, se ha establecido que la neurogénesis de esta región encefálica ocurre en el período postnatal, y que durante las primeras tres semanas del nacimiento se establece el 97% de las células del cerebelo adulto (Altman, 1972). En este proceso, la conexión olivo-cerebelar tiene gran relevancia funcional (Sotelo y Chedotal, 1997; Goldwitz y Hamre, 1998). En efecto, la oliva inferior constituye la fuente principal, si no única, de las fibras trepadoras que se proyectan y hacen sinapsis en las células de Purkinje en la corteza cerebelosa y han sido implicadas en funciones tales como el aprendizaje y el control de los movimientos (Welsh y Harvey, 1998).

Varias líneas de evidencia han demostrado la existencia en la oliva inferior de sistemas péptidérgicos tales como la angiotensina II y el péptido natriurético auricular, sugiriendo que esos péptidos

podrían participar en la función fisiológica de esta estructura cerebelar. Así, se ha demostrado la presencia de inmunorreactividad a la ANG II en neuronas cerebelosas (Erdmann y col., 1996), y de ambos subtipos de receptores de la angiotensina II en secciones del cerebelo (De Gasparo, 1994; Jöhren y Saavedra, 1996). En la oliva inferior del cerebelo de la rata se ha demostrado la expresión del ARNm y los receptores AT_2 , la cual hace pico a los 12 días de nacidas (Jöhren y col., 1996; Tsutsumi y Saavedra, 1991a). Aún mas, un estudio ontogénico sobre la expresión del ARNm para el receptor AT_2 de la ANG II determinó que este receptor persiste hasta la madurez cerebral en núcleos involucrados con las funciones motoras y la integración sensorial (Nuyt y col., 1999).

Debido a que la máxima expresión de los receptores AT_2 en la OI ocurre durante el establecimiento de las conexiones entre las fibras trepadoras y las células de Purkinje, se ha propuesto la participación de los receptores AT_2 en la diferenciación de este sistema relacionado con las funciones motoras y sensoriales. En apoyo a esto, diversos estudios han mostrado la participación de dichos receptores en la inducción de cambios morfológicos tales como la elongación y la ramificación neuronal (Laflamme y col., 1996; Dehmelt y Halpain, 2004; Plouffe y col., 2006). Así, las lesiones químicas en la oliva inferior reducen la unión de la ANG II a sus receptores AT_2 , tanto en la OI como en el cerebelo de ratas jóvenes, sugiriendo que los receptores AT_2 presentes en la capa molecular del cerebelo son producidos por neuronas de la OI y transportados por las fibras trepadoras (Jöhren y col., 1998). De manera coincidente, Arce y col. (2001) detectaron la presencia de receptores AT_2 en los pedúnculos cerebelosos; y debido a que éstos están constituidos principalmente por fibras, se sugiere la existencia de transporte axonal de receptores.

Por otra parte, se demostró mediante hibridización *in situ* que el ARNm para el PNA está altamente expresado en la oliva inferior (Langub y col., 1995). Asimismo, mediante técnicas autorradiográficas se encontraron receptores para el PNA en la oliva inferior de mamíferos (Quirion y col., 1986) y se ha detectado inmunorreactividad para el receptor NPR-A en regiones del tallo cerebral no relacionadas con funciones cardiovasculares tales como el núcleo rojo y el núcleo oculomotor en monos (Abdelalim y col., 2007). Asimismo se ha reportado hibridización *in situ* del ARNm para los receptores A y B de los PNs en el cerebelo del mono (Wilcox y col., 1991). El núcleo rojo posee conexiones con el cerebelo y el núcleo de la oliva inferior, lo que sugiere que el receptor NPR-A

ejerce un papel en la modulación de la función cerebelar. La presencia de receptores para el PNA en las neuronas de los núcleos oculomotor e hipogloso, sugiere su posible papel en la regulación de la función motora. De modo interesante, se ha descrito la presencia de los PNs y de sus receptores en estructuras oculares (Fernández-Durango y col., 1995; Kuriyayashi y col., 2006), pudiendo estar relacionados con la función ocular.

Diversos reportes han demostrado la existencia de la mutua regulación entre la ANG II y los sistemas generadores de GMPc (Kim y col., 2005; Yan y col., 2003); estos sistemas están presentes en la OI, sin embargo, se desconoce cómo ellos coordinan sus actividades a fin de mantener el balance entre sus vías de señalización. Al respecto, se ha reportado la existencia de reacciones de fosforilación/ desfosforilación en ambos sentidos.

La evidencia apunta a un papel del PNA en la inhibición del crecimiento inducido por la ANG II en diversos tipos celulares. En efecto, Hannken y col. (2001) demostraron que el PNA atenúa la hipertrofia inducida por la ANG II en las células de los túbulos renales, a través de la fosforilación de las quinasas activadas por mitógenos (MAPKs), inducida por este péptido, previniéndose el pico de la fosforilación con el incremento de la expresión de la fosfatasa MKP-1, enzima que se encuentra involucrada en la desfosforilación de las ERK 1/2. Un efecto similar fue demostrado por Hayashi y col. (2004) en cultivos de cardiomiocitos. En ambos estudios los efectos del PNA fueron mimetizados por el 8-Br-GMPc, un análogo no hidrolizable del GMPc, sugiriendo un papel para este nucleótido cíclico en los efectos del PNA. Al respecto, se ha demostrado la existencia de una interacción directa entre los receptores AT₂ de la ANG II y el receptor/GC-A del PNA en las células de la zona glomerulosa de la glándula suprarrenal de la rata y en las células PC12W, a través de la acción de fosfatasas del tipo fosfotirosina fosfatasas (PTPasas) (Bottari y col., 1992).

En forma similar, nuestros resultados sugieren esta interacción entre la señalización peptidérgica, ya que muestran una reducción en la producción de GMPc basal y estimulada por el PNA cuando se añaden ligandos como la ANG II y el CGP 42112A en la oliva inferior de ratas de 12 días de nacidas. Desde que estos efectos fueron inhibidos tanto por el ortovanadato de sodio como por el ácido okadaico se infiere que, a diferencia de lo reportado por Bottari y col. (1992), en esta interacción participan tanto las PTPasas como las PP2A, coincidiendo con los reportes en cultivos de podocitos de rata donde la ANG II

suprime la síntesis de GMPc inducida por el PNA (Golos y col., 2002; Lewko y col., 2006).

Nuestros resultados sugieren la mediación del receptor AT₂ en el efecto antagónico de la ANG II sobre la producción de GMPc basal y estimulada por el PNA. En efecto, en primer lugar este receptor se expresa casi exclusivamente en la oliva inferior de la rata recién nacida, y en segundo lugar, el bloqueo del receptor AT₁ con losartán no afectó la acción del PNA y fue incapaz de revertir las acciones inhibitorias de la ANG II sobre la producción de GMPc basal o estimulado por el PNA. Esto difiere de lo observado en cultivos de podocitos, donde fue reportado que la acción inhibitoria de la ANG II ocurre a través de la estimulación de ambos subtipos de receptores de la angiotensina II, el AT₁ y el AT₂ (Golos y col., 2002; Lewko y col., 2006).

El mecanismo mediante el cual el receptor AT₂ podría mediar la desfosforilación del receptor de PNA no se ha esclarecido completamente. Se sabe que el receptor para el PNA (guanilil ciclase A) existe en forma altamente fosforilada, y la adición de su agonista, el PNA, induce una desfosforilación y como consecuencia, desensibilización del receptor. Diversos autores involucran en este proceso de desfosforilación a fosfatasas tipo 2A, sensibles al ácido okadaico, en especial en preparaciones de células embrionarias 293 (Potter y Garbers, 1992) y en la fracción soluble de homogeneizado del cerebro de la rata (Dautzenberg y col., 1993).

Se ha reportado que la estimulación del receptor AT₂ induce la desfosforilación de las tirosinas en numerosas proteínas con pesos moleculares asociados a los receptores tirosina-kinasa en las células de neuroblastoma N1E-115 (Nahmias y col., 1995). Asimismo, se ha observado que la estimulación del receptor AT₂ inhibe la proliferación celular estimulada por el factor de crecimiento básico de fibroblastos en cultivos de células R3T3 que expresan el receptor AT₂, vía la activación de una proteína-tirosina fosfatasa (Tsuzuki y col., 1996). Aún más, varias fosfatasas, del tipo PP2A y particularmente la tirosina fosfatasa-1 que contiene el dominio homólogo a Src 2 (SHP-1), se asocian a menudo con las cascadas de señalización del receptor AT₂ (Cui y col., 2001; Shibasaki y col., 2001; Fen y col., 2002; Plouffe y col., 2006).

Aunado a la evidencia anterior, recientemente se ha descrito un nuevo mecanismo de señalización en la diferenciación neuronal inducida por el receptor AT₂, mediado por la formación de un complejo entre las proteínas recientemente descubiertas que interactúan con el receptor AT₂ (ATIP) (Nouet y col., 2004)

y la SHP-1, el cual se traslada al núcleo para inducir la expresión de la MMS2, una variante de las enzimas que conjugan a la ubiquitina. La interrupción de este proceso mediante técnicas genéticas o el uso del ortovanadato de sodio conduce a alteraciones en el crecimiento de neuritas y de la formación de las sinapsis (Li y col., 2006).

En resumen, la alta expresión de receptores para el PNA y los receptores AT₂ de la angiotensina II en la oliva inferior del cerebro de la rata de dos semanas de nacida, momento crítico para el desarrollo del cerebelo y el establecimiento de las conexiones neuronales, así como su desaparición en el adulto, sugiere un posible papel para estos péptidos en la migración celular y las interacciones neuronales. El papel del receptor AT₂ en estos procesos está avalado por nuestros resultados en la oliva inferior de ratas de 12 días de nacidas, los cuales demuestran que la angiotensina II inhibe la formación del GMPC, tanto basal como la inducida por el péptido natriurético auricular; y estos efectos parecen estar relacionados con procesos de desfosforilación a través de la estimulación de varios tipos de fosfatasa, principalmente PP2A y PTPasas.

Agradecimientos

Este trabajo fue subvencionado por el Instituto de Investigaciones Farmacéuticas y por el Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico, Proyecto Institucional Tipo A N° CDCH N° 06.30.2006.

Referencias bibliográficas

- Abdelalim EM, Osman AHK, Takada T, Torii R, Tooyama I. 2007. Immunohistochemical mapping of natriuretic peptide receptor-a in the brainstem of macaca fascicularis. *Neuroscience*. 145:1087-1096.
- Alexander RW, Brock TA, Gimbrone MA Jr, Rittenhouse SE. 1985. Angiotensin increases inositol trisphosphate and calcium in vascular smooth muscle. *Hypertension*. 7:447-451.
- Altman J. 1972. Postnatal development of the cerebellar cortex in the rat: I. Phases in the maturation of Purkinje cells and of the molecular layer. *J Comp Neurol*: 145:399-463.
- Álvarez SE, Fuentes LB, Ciuffo GM. 2003. Angiotensin II mediates Tyr-dephosphorylation in rat fetal kidney membranes. *Mol Cell Biochem*. 254:137-143.
- Arce ME, Sánchez S, Seltzer A, Ciuffo GM. 2001. Autoradiographic localization of angiotensin II receptors in developing rat cerebellum and brainstem. *Regulatory Peptides* 99:53-60.
- Bedecs K, Elbaz N, Sutren M, Masson M, Susini C, Strosberg AD, et al. 1997. Angiotensin II type 2 receptors mediate inhibition of mitogen activated kinase cascade and functional activation of SHP-1 tyrosine phosphatase. *Biochem J*. 325:449-454.
- Bottari SP, King IN, Reichlin S, Dahlström I, Lydon NA, de Gasparo M. 1992. The angiotensin AT₂ receptor stimulates protein tyrosine phosphatase activity and mediates inhibition of particulate guanylate cyclase. *Biochem Biophys Res Commun* 183:206-211.
- Brechler V, Levens NR, de Gasparo M, Bottari SP. 1994. Angiotensin AT₂ receptor mediate inhibition of particulate guanylate cyclase: a link with protein tyrosine phosphatase stimulation? *Receptors Channels* 2:79-87.
- Brechler V, Reichlin S, de Gasparo M, Bottari SP. 1994. Angiotensin II stimulates protein tyrosine phosphatase activity through a G-protein independent mechanism. *Receptors Channels* 2:89-98.
- Brown J, Zuo Z. 1993. C-type natriuretic peptide and atrial natriuretic peptide receptors of rat brain. *Am J Physiol* 264:R513-R523.
- BROWN J, ZUO Z. 1995. Natriuretic peptide receptors are expressed during cerebral growth in the fetal rat. *Am J Physiol* 269(2 Pt 2):R261-R273.
- Bumpus FM, Catt KJ, Chiu AT, de Gasparo M, Goodfriend T, Husain A, Peach MJ, Taylor DG Jr., Timmermans PBMW. 1991. Nomenclature for angiotensin receptors. *Hypertension*. 17:720-721.
- Burnett JC Jr, Granger JP, Opgenorth TJ. 1984. Effects of synthetic atrial natriuretic factor on renal function and rennin release. *Am J Physiol* 247:F863-6.
- Chaki S, Inagami T. 1993. New signaling mechanism of angiotensin II in neuroblastoma neuro-2A cells: activation of soluble guanylyl cyclase via nitric oxide synthesis. *Mol Pharmacol* 1993 43:603-608.
- Chusho H, Tamura N, Ogawa Y, Yasoda A, Suda M, Miyazawa T y col. 2001. Dwarfism and early death in mice lacking C-type natriuretic peptide. *Proc Natl Acad Sci USA*. 98:4016-4021.
- Ciuffo GM, Álvarez SE, Fuentes LB. 1998. Angiotensin II receptors induce tyrosine dephosphorylation in rat fetal membranes. *Reg. Peptides* 74: 129-135.
- Cui T, Nakagami H, Iwai M, Takeda Y, Shiuchi T, Daviet L, Nahmias C, Horiuchi M. 2001. Pivotal role of tyrosine phosphatase SHP-1 in AT₂ receptor mediated apoptosis in rat fetal vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc Res* 49:867-871.
- Daniels D, Yee DK y Fluharty SJ. 2007. Hydromineral Neuroendocrinology: Angiotensin II receptor signaling. *Exp Physiol* 92:523-527.
- Dautzenberg FM, Müller D, Richter D. 1993. Dephosphorylation of phosphorylated atrial natriuretic peptide by protein phosphatase 2A. *Eur J Biochem*. 21:485-90.
- De Gasparo M, Levens NR, Kamber B, Furet P, Whitebread S, Brechler V y col. 1994. In: Saavedra JM, Timmermans PBMWM, editors. *Angiotensin Receptors*. New York: Plenum, pp. 95-117.

- Dehmelt L, Halpain S. 2004. Actin and microtubules in neurite initiation: are MAPs the missing link? *J Neurobiol* 58:18-33.
- Erdmann B, Fuxe K, Ganten D. 1996. Subcellular localization of angiotensin II immunoreactivity in the rat cerebellar cortex. *Hypertension* 28:818-824.
- Feng YH, Sun Y, Douglas JG. 2002. G-beta gamma-independent constitutive association of G-alpha-s with SHP-1 and angiotensin II receptor AT₂ is essential in AT₂-mediated ITIM-independent activation of SHP-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:12049-12054.
- Fernández-Durango R, Núñez DJ, Brown MJ. 1995. Messenger RNAs encoding the natriuretic peptides and their receptors are expressed in the eye. *Exp Eye Res* 61:723-729.
- Fiscus RR, Tu AW, Chew SB. 2001. Natriuretic peptides inhibit apoptosis and prolong the survival of serum-deprived PC12 cells. *Neuroreport* 12:185-189.
- Gendron L, Côté F, Payet MD, GALLO-PAYET N. 2002. Nitric oxide and cyclic GMP are involved in angiotensin II AT₂ receptor effects on neurite outgrowth in NG108-15 cells. *Neuroendocrinology* 75:70-81.
- Goldwitz D, Hamre K. 1998. The cells and molecules that make a cerebellum. *Trends Neurosci* 21:375-382.
- Golos M, Lewko B, Bryl E, Witkowski JM, Dubaniewicz A, Olszewska A y col. 2002. Effect of angiotensin II on ANP-dependent guanylyl cyclase activity in cultured mouse and rat podocytes. *Kidney Blood Press Res* 25:296-302.
- Gutkowska J, Antunes-Rodrigues J, McCann SM. 1997. Atrial natriuretic peptide in brain and pituitary gland. *Physiol Rev* 77:465-515.
- Hannken T, Schroeder R, Stahl R, and Wolf G. 2001. Atrial natriuretic peptide attenuates ANG II-induced hypertrophy of renal tubular cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 281:F81-90.
- Hayashi D, Kudoh S, Shiojima I, Zou Y, Harada K, Shimoyama M, Imai Y, Monzen K, Yamazaki T, Yazaki Y, Nagai R, Komuro I. 2004. Atrial natriuretic peptide inhibits cardiomyocyte hypertrophy through mitogen-activated protein kinase phosphatase-1. *Biochem Biophys Res Commun* 322:310-319.
- Herman JP, Dolgas CM, Rucker D, Langub MC. 1996. Localization of natriuretic peptide-activated guanylate cyclase mRNA in the rat brain. *J Comp Neurol* 369:165-187.
- Holtwick R, Van Eickels M, Skryabin BV, Baba HA, Bubikat A, Begrow F, Schneider MD, Garbers DL, Kuhn M. 2003. Pressure-independent cardiac hypertrophy in mice with cardiomyocyte-restricted inactivation of the atrial natriuretic peptide receptor guanylyl cyclase-A. *J Clin Invest* 111:1399-1407.
- Ichiki, T, Labosky PA, Shiota C, Okuyama S, Imagawa Y, Fogo A, Niimura F, Ichikawa I, Hogan BLM, Inagami T. 1995. Effects on blood pressure and exploratory behavior of mice lacking angiotensin II type-2 receptor. *Nature* 377:748-740.
- Imura H, Nakao K, Itoh H. 1992. The natriuretic peptide system in the brain: implications in the central control of cardiovascular and neuroendocrine functions. *Front Neuroendocrinol* 13:217-49.
- Ishida M, Ishida T, Thomas SM, Berk BC. 1998. Activation of extracellular signal-regulated kinases (ERK1/2) by angiotensin II is dependent on c-Src in vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 82:7-12.
- Ishii, K. Takekoshi, K. Shibuya, S. Kawakami, Y. Isobe, K. Nakai, T. 2001. Angiotensin subtype-2 receptor (AT₂) negatively regulates subtype-1 receptor (AT₁) in signal transduction pathways in cultured porcine adrenal medullary chromaffin cells. *J Hypertens* 19:1991-9.
- Jöhren O, Haüser W, Saavedra JM. 1998. Chemical lesion of the inferior olive reduces [¹²⁵I]sarcosine¹-angiotensin II binding to AT₂ receptors in the cerebellar cortex of young rats. *Brain Res.* 793:176-186.
- Johren O, Inagami T, Saavedra JM. 1996. Localization of AT angiotensin 2 II receptor gene expression in rat brain by in situ hybridization histochemistry. *Mol Brain Res* 37:192-200.
- Johren O, Saavedra JM. 1996. Gene expression of angiotensin II receptor subtypes in the cerebellar cortex of young rats. *NeuroReport.* 7:1349-52.
- Kim D, Aizawa T, Wei H, Pi X, Rybalkin SD, Berk BC et. al. 2005. Angiotensin II increases phosphodiesterase 5A expression in vascular smooth muscle cells: a mechanism by which angiotensin II antagonizes cGMP signaling. *J Mol Cell Cardiol* 38:175-184.
- Kuribayashi K, Kitaoka Y, Kumai T, Munemasa Y, Kitaoka Y, Isenoumi K, Motoki M, Kogo J, Hayashi Y, Kobayashi D, Ueno S. 2006. Neuroprotective effect of atrial natriuretic peptide against NMDA-induced neurotoxicity in the rat retina. *Brain Res* 1071:34-41.
- Kurihara M, Saavedra JM, Shigematsu K. 1987. Localization and characterization of atrial natriuretic peptide binding sites in discrete areas of rat brain and pituitary gland by quantitative autoradiography. *Brain Res* 408:31-39.
- Laflamme L, Gasparo M, Gallo JM, Payet MD, Gallo-Payet N. 1996. Angiotensin II induction of neurite outgrowth by AT₂ receptors in NG108-15 cells. Effect counteracted by the AT₁ receptors. *J Biol Chem* 271:22729-22735.
- Lafontan M, Moro C, Sengenès C, Galitzky J, Crampes F, Berlan M. 2005. An unsuspected metabolic role for atrial natriuretic peptides. The control of lipolysis, lipid mobilization, and systemic nonesterified fatty acids levels in humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25:2032-2042.
- Langub MC Jr, Watson RE Jr, Herman JP. 1995. Distribution of natriuretic peptide precursor mRNAs in the rat brain. *J Comp Neurol* 356:183-99.

- Levin ER, Gardner DG, Samson WK. 1998. Natriuretic peptides. *N Engl J Med* 339:21-218.
- Lewko B, Golos M, Latawiec E, Angielski S, Stepinski J. 2006. Regulation of cGMP synthesis in cultured podocytes by vasoactive hormones. *J Physiol Pharmacol* 57:599-610.
- Li JM, Mogi M, Tsukuda K, Tomochika H, Iwanami J, Min LJ, Nahmias C, Iwai M y Horiuchi M. 2006. Angiotensin II-induced neural differentiation via AT₂ receptor-MMS2 Cascade Involving Interaction between AT₂ Receptor-interacting Protein (ATIP) and SHP-1. *Molecular Endocrinology* 21:499-511.
- Lowry O, Rosebrough N, Farr A, Randall R. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275.
- Lucius R, Gallinat S, Rosenstiel P, Herdegen T, Sievers J, Unger T. 1998. The angiotensin II type 2 (AT₂) receptor promotes axonal regeneration in the optic nerve of adult rats. *J Exp Med* 188:661-670.
- Maack T, Marion DN, Camargo MJ, Kleinert HD, Laragh JH, Vaughan EDJr, y col. 1984. Effects of auriculin (atrial natriuretic factor) on blood pressure, renal function, and the renin-aldosterone system in dogs. *Am J Med* 77:1069-75.
- Maack T. 1986. Renal clearance and isolated kidney perfusion techniques. *Kidney Int* 30:142-151.
- Maack T. 1996. Role of atrial natriuretic factor in volume control. *Kidney Int* 49:1732-1737.
- Maack, T. 2006. The Broad Homeostatic Role of Natriuretic Peptides. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 50:198-207.
- Marrero MB, Schieffer B, Paxton WG, Duff JL, Berk BC, Bernstein KE. 1995. The role of tyrosine phosphorylation in angiotensin II-mediated intracellular signalling. *Cardiovasc Res* 30:530-536.
- McKenzie JC, Juan YW, Thomas CR, Berman NE, Klein RM. 2001. Atrial Natriuretic Peptide-like Immunoreactivity in Neurons and Astrocytes of Human Cerebellum and Inferior Olivary Complex, *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 49: 1453-1467.
- Mehta PK, Griendling KK. 2007. Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *Am J Physiol Cell Physiol* 292: C82-C97.
- Molkentin JD. 2003. A friend within the heart: Natriuretic peptide receptor signaling. *J Clin Invest* 111:1275-1277.
- Moroi M, Fukazawa M, Ishikawa M, Aikawa J, Namiki A, Yamaguchi T. 1997. Stimulation of angiotensin subtype 2 receptor reduces basal cGMP levels in the neointima of rat aorta after balloon injury. *Gen Pharmacol* 28:113-117.
- Nahmias C, Cazaubon SM, Briend-Sutren MM, Lazard D, Villageois P, Strosberg AD. 1995. Angiotensin II AT₂ receptors are functionally coupled to protein tyrosine dephosphorylation in N1E-115 neuroblastoma cells. *Biochem J* 306:87-92.
- Nouet S, Amzallag N, Li JM, Louis S, Seitz I, Cui TX, Alleaume AM, Di Benedetto M, Boden C, Masson M, Strosberg AD, Horiuchi M, Couraud PO, Nahmias C. 2004. Trans-inactivation of receptor tyrosine kinases by novel angiotensin II AT₂ receptor-interacting protein, ATIP. *J Biol Chem*. 279:28989-28997.
- Nuyt AM, Lenkei Z, Palkovits M, Corvol P, Llorens-Cortes C. 1999. Ontogeny of angiotensin II type-2 receptor mRNA expression in fetal and neonatal rat brain. *J Comp Neurol*. 407:193-206.
- Pan HL. 2004. Brain angiotensin II and synaptic transmission. *Neuroscientist*. 10:422-431.
- Plouffe B, Guimond MO, Beaudry H, y Gallo-Payet N. 2006. Role of tyrosine kinase receptors in angiotensin II AT₂ receptor signaling: Involvement in neurite outgrowth and in p42/p44mapk activation in NG108-15 cells. *Endocrinology* 147:4646-4654.
- Potter LR y Garbers DL. 1992. Dephosphorylation of the guanylyl cyclase-A receptor causes desensitization. *J Biol Chem*. 267:14531-14534.
- Prins BA, Weber MJ, Hu RM, Pedram A, Daniels M, Levin ER. 1996. Atrial natriuretic peptide inhibits mitogen-activated protein kinase through the clearance receptor: potential role in the inhibition of astrocyte proliferation. *J Biol Chem* 271:14156-14162.
- Pulakat L, Gray A, Johnson J, Knowle D, Burns V, Gavini N. 2002. Role of C-terminal cytoplasmic domain of the AT₂ receptor in ligand binding and signaling. *FEBS Lett*. 524:73-78.
- Pulakat L, Rahman S, Gray A, Knowle D, Gavini N. 2005. Roles of the intracellular regions of angiotensin II receptor AT₂ in mediating reduction of intracellular cGMP levels. *Cell Signal* 17:395-404.
- Quirion R, Dalpé M, Dam TV. 1986. Characterization and distribution of receptors for the atrial natriuretic peptides in mammalian brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:174-178.
- Ryan MC, Gundlach AL. 1998. Ontogenic expression of natriuretic peptide mRNAs in postnatal rat brain: implications for development? *Dev Brain Res*. 105:251-268.
- Saavedra JM, Correa FM, Seltzer A, Pinto JE, Viglione P, Tsutsumi K. 1992. Enhanced angiotensin converting enzyme binding in arteries from spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 10:1353-1359.
- Schmitz U y Berk BC. 1997. Angiotensin II signal transduction: Stimulation of multiple mitogen-activated protein kinase pathways. *Trends Endocrinol Metab* 8:261-266.
- Schulz S. 2005. C-type natriuretic peptide and guanylyl cyclase B receptor. *Peptides* 26:1024-1034.
- Shibasaki Y, Matsubara H, Nozawa Y, Mori Y, Masaki H, Kosaki A, Tsutsumi Y, Uchiyama Y, Fujiyama S, Nose A, Iba O, Tateishi E, Hasegawa T, Horiuchi M, Nahmias C,

- Iwasaka T. 2001. Angiotensin II type 2 receptor inhibits epidermal growth factor receptor transactivation by increasing association of SHP-1 tyrosine phosphatase. *Hypertension* 38:367-372.
- Sotelo C, Chedotal A. 1997. Development of the olivocerebellar projection. *Perspect Dev Neurobiol* 5:57-67.
- Steiner A, Parker C, Kipnis DM. 1972. Radio-immunoassay for cyclic nucleotides. *J Biol Chem* 247:1106-1113.
- Stroth U, Meffert S, Gallinat S, Unger T. 1998. Angiotensin II and NGF differentially influence microtubule proteins in PC12W cells: role of the AT₂ receptor. *Brain Res Mol Brain Res* 53:187-195.
- Tamura N, Doolittle LK, Hammer RE, Shelton JM, Richardson JA, Garbers DL. 2004. Critical roles of the guanylyl cyclase B receptor in endochondral ossification and development of female reproductive organs. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:17300-17305.
- Timmermans PBMW, Wong PC, Chiu AT, Herblin WF, Benfield P, Carini DJ, Lee RJ, Wexler RR, Saye JAM, Smith RD. 1993. Angiotensin II receptors angiotensin II receptor antagonists. *Pharmacol Rev* 45:205-251.
- Tsutsumi K, Saavedra JM. 1991. Characterization and development of angiotensin II receptor subtypes (AT₁ and AT₂) in rat brain. *Am J Physiol* 261:R209-R216.
- Tsutsumi K, Seltzer A, Saavedra JM. 1993. Angiotensin II receptor subtypes and angiotensin converting enzyme in the fetal rat brain. *Brain Res.* 631:212-220.
- Tsuzuki S, Eguchi S, Inagami T. 1996. Inhibition of cell proliferation and activation of protein tyrosine phosphatase mediated by angiotensin II type 2 (AT₂) receptor in R3T3 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 228:825-830.
- Vervoort VS, Beachem MA, Edwards PS, Ladd S, Miller KE, de Mollerat X, Clarkson K, DuPont B, Schwartz CE, Stevenson RE, Boyd E, Srivastava AK. 2002. AGTR2 mutations in X-linked mental retardation. *Science* 296:2401-2403.
- Von Bohlen und Halbach O, Walther TB, Albrecht D. 2001. Genetic deletion of angiotensin AT₂ receptor leads to increased cell number in different brain structures of mice. *Regul Pept* 99: 209-216.
- Von Bohlen, Halbach O, Albrecht D. 2006. The CNS renin-angiotensin system. *Cell Tissue Res* 326: 599-616.
- Welsh JP, Harvey JA. 1998. Acute inactivation of the inferior olive blocks associative learning. *Eur J Neurosci* 10:3321-32.
- Wilcox JN, Augustine A, Goeddel DV, Lowe DG. 1991. Differential regional expression of three natriuretic peptide receptor genes within primate tissue. *Mol Cell Biol* 11:3454-3462.
- Wiggins AK, Shen PJ, Gundlach AL. 2003. Atrial natriuretic peptide expression is increased in rat cerebral cortex following spreading depression: possible contribution to sd-induced neuroprotection. *Neuroscience.* 118: 715-726.
- Wright JW, Harding JW. 1995. Brain angiotensin receptor subtypes AT₁, AT₂, and AT₄ and their functions. *Regul Pept* 59:269-295.
- Yan C, Kim D, Aizawa T, Berk BC. 2003. Functional interplay between angiotensin II and nitric oxide. Cyclic GMP as a key mediator. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23:26-36.
- Zielinski B, Berdowska I, Seweryn E, Ceremuga I, Banas T. 2001. Effect of angiotensin II on protein phosphorylation in PC12 cell line. *Folia Histochem Cytobiol.* 39 Suppl 2:156-157.

Síntesis de 4-cloro-3-(2-cloroetil)2-metilquinolinas. Evaluación de su potencial actividad antimalárica *in vitro*

Synthesis of 4-chloro-3-(2-chloroethyl)2-methylquinolines. Evaluation of their potential antimalaric activity *in vitro*

GRICELA LOBO¹, JOSÉ CAMACHO¹, NEIRA GAMBOA², JUAN RODRIGUES², YVES BLACHE³,
REINALDO ATENCIO⁴, TERESA GONZÁLEZ⁴ y JAIME CHARRIS*¹

Resumen

Se sintetizó una serie de 4-cloroquinolinas y se evaluaron *in vitro* como inhibidores de la formación de la β -hematina. Sólo el derivado 6g resultó ser efectivo a una concentración de 10 μ M; la prueba como inhibidores de la degradación de la hemoglobina resultó ser débil. A través del estudio por cristalografía de rayos-X se pudo establecer la configuración geométrica (E) de los derivados del tipo 5.

Palabras clave: Síntesis, 4-cloroquinolina, antimalárica, b-hematina.

Abstract

A serie of 4-chloroquinolines was synthesized and evaluated as inhibitors of β -hematin formation *in vitro*. Only one derivative 6g was effective at a concentration of 10 μ M; the proof as inhibitors of hemoglobin degradation for all compounds was marginal. By X-ray crystallography we established the geometric configuration (E) of type 5 derivatives.

Key Words: Synthesis, 4-chloroquinolines, antimalaric, β -hematin.

Introducción

La malaria es la enfermedad parasitaria más importante desde el punto de vista del número de individuos enfermos y su impacto socioeconómico. Es considerada un problema de salud pública en más de noventa países, habitados por un total de 2.400 millones de personas; más de un 40% de la población mundial. La prevalencia de la enfermedad se estima en unos 300-500 millones de casos clínicos anuales, más de 90% de los casos de malaria se encuentran en África sub-sahariana y la mortalidad es de aproximadamente 1-2 millones de muertes al año (WHO 2005).

Existen cuatro especies de *Plasmodium* que producen la malaria en humanos, a saber: *ovale*, *vivax*,

falciparum y *malariae*; pero sin duda la infección causada por *Plasmodium falciparum* es la más peligrosa. Los parásitos se transmiten por mosquitos del género *Anopheles* y tras la picadura se establece una infección asintomática en las células hepáticas. Después de un período de incubación de aproximadamente una semana, se liberan las formas sanguíneas del parásito que se desarrollan y multiplican en el interior de los eritrocitos, generándose las diferentes manifestaciones de la enfermedad, características de cada especie. En la malaria cerebral, una complicación severa causada por el *P. falciparum*, el secuestro de los eritrocitos infectados en los vasos sanguíneos, se asocia con pérdida del conocimiento y la afección resulta letal si no es tratada. Los parásitos de las especies *P. vivax* y *P. ovale*, se caracterizan

¹ Laboratorio de Síntesis Orgánica; ²Unidad de Bioquímica. Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela. Aptdo. 47206, Los Chaguaramos, 1041-A, Caracas, Venezuela. jaime.charris@ucv.ve. ³Laboratoire MFS EA 3838 - groupe «biofouling et produits naturels marins» UFR Sciences et Techniques Université du Sud Toulon-Var, Francia. ⁴Laboratorio de Síntesis y Caracterización de Nuevos Materiales, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, Caracas, Venezuela.

por presentar la fase de hipnozoíto, que puede persistir durante años en el hígado y causar recidivas (WHO 2005).

El tratamiento ha sido posible durante muchos años gracias a la existencia de un número restringido de fármacos, presentando cada uno de ellos una serie de limitaciones de tipo farmacológico, aunque el problema más apremiante de carácter reciente es la aparición de resistencia; a ello se debe –en parte– la progresión actual de la enfermedad (Wellems, 2002). Los fármacos de mayor utilización, como son la cloroquina (4-aminoquinolina), la quinina y la mefloquina (aril amino alcoholes), la asociación de sulfadoxina-pirimetamina, presentan beneficios limitados y en determinados casos son de una eficacia cuestionable, debido a los fenómenos de resistencia (Fidock y col., 2000, White, 1992). La artemisinina y sus derivados (endoperóxidos) constituyen una clase de fármacos que se vienen utilizando desde hace mucho tiempo para el tratamiento de la enfermedad. Recientemente, se ha venido sintetizando una serie de derivados de elevada eficacia, que constituyen alternativas prometedoras en cuanto a su posible utilización en clínica a corto plazo (Borsnik y col., 2002). Entre otro grupo de compuestos de utilización habitual, cabe destacar determinados antibióticos desarrollados como antibacterianos, que también exhiben acción antibacteriana y tienen aplicaciones profilácticas (Foth y col., 2003).

No obstante, recientemente se han producido una serie de avances que abren nuevas expectativas en el desarrollo de antimaláricos. El advenimiento del Proyecto Genoma (Gardner, 2002), junto al conocimiento cada vez mayor del mecanismo de acción de ciertos fármacos y de las bases moleculares de la resistencia, constituyen el punto de partida para identificar nuevos compuestos. En relación con las estrategias utilizadas en la identificación de nuevos compuestos aplicables al control de la malaria, existen dos tendencias actuales. Por una parte se están utilizando combinaciones nuevas de fármacos ya conocidos o derivados de clases de compuestos de eficacia reconocida, con el fin de generar análogos que sean activos, incluso frente a cepas resistentes; en segundo lugar se ha identificado una serie de blancos terapéuticos potenciales, esenciales para la viabilidad que resulta del conocimiento del parásito y que desde la perspectiva racional se estudian para desarrollar inhibidores específicos, a partir de la información funcional y estructural. Ambas estrategias están generando un conjunto de moléculas prometedoras, que unidas a la existencia de iniciativas a escala mundial para financiar estudios en el área, abren la posibilidad de que en un futuro próximo se

disponga de agentes quimioterapéuticos nuevos para controlar la enfermedad.

Como parte de nuestro programa relacionado con el diseño, síntesis y evaluación biológica de aza-análogos de alcaloides con actividad biológica, se presentan en este trabajo los resultados concernientes a la preparación y evaluación biológica preliminar como antimaláricos *in vitro* de una serie de quinolinas 1, diaza-análogos fenantrenos 2 (figura 1), de reconocida actividad antimalárica *in vitro* (Blache y col., 2000).

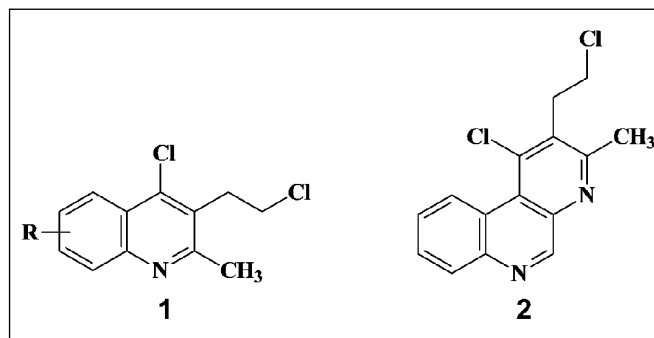


Figura 1. Quinolinas 1, diaza-análogos fenantrenos 2.

Materiales y métodos

QUÍMICO

Los puntos de fusión fueron tomados en un aparato Fischer Johns y no están corregidos. Los espectros de infrarrojo fueron determinados como discos de KBr, utilizando un espectrofotómetro Shimadzu modelo 470. Los espectros de resonancia magnética nuclear fueron determinados en un equipo marca JEOL Eclipse 270 MHz, usando como solvente CDCl_3 y reportados en ppm, empleando como estándar interno CHCl_3 residual. Las pruebas de análisis elemental fueron realizadas por el Servicio Central de la Universidad de Málaga, Málaga, España, cuyos resultados están en el rango del $\pm 0.4\%$ de los valores calculados. La cromatografía analítica de capa fina se realizó sobre placas de silica gel-60F₂₅₄ y fue visualizada por UV. Los datos de rayos X fueron colectados en un difractómetro Rigaku provisto con un detector CCD.

PROCEDIMIENTO GENERAL PARA LA SÍNTESIS DE DERIVADOS (E) 3-(1-(FENILAMINA SUSTITUIDO) ETILIDEN)4,5 DIHIDROFURAN-2-ONA 3A-I

Una mezcla de 2-acetilbutirolactona (0.5 g, 4 mmol) y la anilina respectiva (4 mmol) en tolueno recién destilado (20 mL), ácido *p*-toluensulfónico en cantidad catalítica se dejó en reflujo por 12 h bajo atmósfera de nitrógeno y equipado con una trampa

Dean Stark. Finalizada la reacción, el solvente se eliminó a presión reducida, se agregó agua (10 mL) y se neutralizó con una solución de carbonato de sodio al 10%; la mezcla se extrajo con acetato de etilo. La fase orgánica se lavó con una solución saturada de cloruro de sodio y se secó sobre sulfato de magnesio, se filtró y evaporó a presión reducida. El aceite resultante se trató con n-hexano caliente y al dejar enfriar se formó un sólido, éste se recristalizó en etanol caliente.

(E) 3-(1-(FENILAMINO)ETILIDEN)
4,5-DIHIIDROFURAN-2-ONA 5A.

Rto. 82%; P.f. 74-75 °C; IR (KBr) cm^{-1} : 3260, 1687; ^1H RMN : 2.03 (s, 3H, CH_3), 2.89 (t, 2H, H_4 , J: 7.8 Hz), 4.35 (t, 2H, H_5 , J: 7.8 Hz), 6.51 (dd, 1H, H_2 , J: 7.4, 1.9 Hz), 6.52 (t, 1H, H_4 , J: 7.7 Hz), 6.71 (m, 2H, $\text{H}_{4,3}$), 6.91 (dd, 1H, H_6 , J: 7.6 Hz), 9.97 (sa, 1H, NH).

(E) 3-(1-(m-METILFENILAMINO)ETILIDEN)
4,5-DIHIIDROFURAN-2-ONA 5B.

Rto. 85%; P.f. 70-72 °C; IR (KBr) cm^{-1} : 3200, 1692; ^1H RMN : 2.00 (s, 3H, CH_3), 2.31 (s, 3H, CH_3), 2.88 (t, 2H, H_4 , J: 8.1 Hz), 4.33 (t, 2H, H_5 , J: 8.1 Hz), 6.84 (m, 2H, Ar), 6.94 (d, 1H, H_3 , J: 7.4 Hz), 7.19 (d, 1H, H_5 , J: 7.4 Hz), 9.92 (sa, 1H, NH).

(E) 3-(1-(p-METILFENILAMINO)ETILIDEN)
4,5-DIHIIDROFURAN-2-ONA 5C.

Rto. 88%; P.f. 80 °C; IR (KBr) cm^{-1} : 3200, 1676; ^1H RMN : 1.93 (s, 3H, CH_3), 2.32 (s, 3H, CH_3), 2.88 (t, 2H, H_4 , J: 7.9 Hz), 4.32 (t, 2H, H_5 , J: 7.9 Hz), 6.93 (d, 2H, $\text{H}_{3,5}$, J: 8.2 Hz), 7.10 (d, 2H, $\text{H}_{2,6}$, J: 8.2 Hz), 9.87 (sa, 1H, NH).

(E) 3-(1-(o-METOXIFENILAMINO)ETILIDEN)
4,5-DIHIIDROFURAN-2-ONA 5D.

Rto. 85%; P.f. 118-120 °C (d); IR (KBr) cm^{-1} : 3264, 1680; ^1H RMN : 1.99 (s, 3H, CH_3), 2.89 (t, 2H, H_4 , J: 7.7 Hz), 3.85 (s, 3H, OCH_3), 4.33 (t, 2H, H_5 , J: 7.7 Hz), 6.72 (t, 1H, H_5 , J: 7.4 Hz), 6.89 (d, 1H, H_3 , J: 8.3 Hz), 7.04 (d, 1H, H_6 , J: 8.1 Hz), 7.11 (t, 1H, H_5 , J: 7.6 Hz), 9.87 (sa, 1H, NH).

(E) 3-(1-(m-METOXIFENILAMINO)ETILIDEN)
4,5-DIHIIDROFURAN-2-ONA 5E.

Rto. 91%; P.f. 72-74 °C; IR (KBr) cm^{-1} : 3273, 1687; ^1H RMN : 2.00 (s, 3H, CH_3), 2.88 (t, 2H, H_4 , J: 7.9 Hz), 3.88 (s, 3H, OCH_3), 4.32 (t, 2H, H_5 , J: 8.0 Hz), 6.78 (m, 2H, Ar), 6.94 (d, 1H, H_3 , J: 7.2 Hz), 7.21 (d, 1H, H_5 , J: 7.2 Hz), 9.90 (sa, 1H, NH).

(E) 3-(1-(p-METOXIFENILAMINO)ETILIDEN)
4,5-DIHIIDROFURAN-2-ONA 5F.

Rto. 80%; P.f. 80-82 °C; IR (KBr) cm^{-1} : 3264, 1675; ^1H RMN : 1.89 (s, 3H, CH_3), 2.88 (t, 2H, H_4 , J: 7.7 Hz), 3.73 (s, 3H, OCH_3), 4.33 (t, 2H, H_5 , J: 7.7 Hz), 6.83 (d, 2H, $\text{H}_{3,5}$, J: 8.1 Hz), 6.98 (d, 2H, $\text{H}_{2,6}$, J: 8.1 Hz), 9.76 (sa, 1H, NH).

(E) 3-(1-(m-CLOROFENILAMINO)ETILIDEN)
4,5-DIHIIDROFURAN-2-ONA 5G.

Rto. 76%; P.f. 60-62 °C; IR (KBr) cm^{-1} : 3273, 1691; ^1H RMN : 2.03 (s, 3H, CH_3), 2.88 (t, 2H, H_4 , J: 7.5 Hz), 4.32 (t, 2H, H_5 , J: 7.5 Hz), 6.59 (m, 2H, Ar), 7.03 (m, 1H, H_3), 7.28 (d, 1H, H_5 , J: 7.2 Hz), 9.89 (sa, 1H, NH).

(E) 3-(1-(m-FLUORFENILAMINO)ETILIDEN)
4,5-DIHIIDROFURAN-2-ONA 5H.

Rto. 79%; P.f. 62-63 °C; IR (KBr) cm^{-1} : 3267, 1672; ^1H RMN : 2.00 (s, 3H, CH_3), 2.88 (t, 2H, H_4 , J: 7.9 Hz), 4.34 (t, 2H, H_5 , J: 7.9 Hz), 6.78 (m, 2H, Ar), 6.94 (m, 1H, H_3), 7.21 (d, 1H, H_5 , J: 6.9 Hz), 9.87 (sa, 1H, NH).

(E) 3-(1-(m-TRIFLUORMETILFENILAMINO)ETILIDEN)
4,5-DIHIIDROFURAN-2-ONA 5I.

Rto. 95%; P.f. 186 °C; IR (KBr) cm^{-1} : 3264, 1689; ^1H RMN d: 2.05 (s, 3H, CH_3), 2.91 (t, 2H, H_4 , J: 8.1 Hz), 4.36 (t, 2H, H_5 , J: 8.1 Hz), 7.20-7.28 (m, 2H, Ar), 7.36-7.44 (m, 2H, Ar), 10.07 (sa, 1H, NH).

PROCEDIMIENTO GENERAL PARA LA SÍNTESIS
DE DERIVADOS DE 4-CLORO-3-(2-CLOROETIL)-
-2-METILQUINOLINA 6A-I

Cada uno de los compuestos 5a-i (1 mmol) en oxiclورو de fósforo (POCl_3 , 20 mL), se dejó en reflujo por 24h. El exceso de oxiclورو de fósforo fue removido a presión reducida, se añadió agua y la mezcla fue neutralizada con una solución saturada de carbonato de sodio. Se extrajo con acetato de etilo. La capa orgánica se lavó con solución saturada de cloruro de sodio, se secó sobre sulfato de magnesio. Se eliminó el solvente a presión reducida y el aceite obtenido en cada caso fue purificado mediante una columna de alúmina neutra, utilizando diclorometano como eluyente para dar sólidos de colores característicos para cada quinolina sintetizada.

4-CLORO-3-(2-CLOROETIL)-2-METILQUINOLINA 6A.

Polvo beige, Rto. 93%; P.f. 56-58 °C; IR (KBr) cm^{-1} : 2960, 1552; ^1H RMN : 2.81 (s, 3H, CH_3), 3.47 (t, 2H, CH_2 , J: 7.1 Hz), 3.74 (t, 2H, CH_2 , J: 7.1 Hz), 7.56 (t, 1H, H_6 , J: 7.9 Hz), 7.69 (t, 1H, H_7 , J: 7.8 Hz), 7.98 (d,

1H, H₅, J: 8.0 Hz), 8.15(d, 1H, H₈, J:8.0 Hz). C₁₂H₁₁NCl₂. Anal. Elemen. Calcu. C 60.01%, H 4.63%, N 5.83%; Anal. Elemen. Deter. C 59.78%, H 4.63%, N 5.93%.

4-CLORO-3-(2-CLOROETIL)-2,6-DIMETILQUINOLINA 6B.

Sólido marrón, Rto. 94%; P.f. 80-82 °C; IR (KBr) cm⁻¹: 2940, 1574; ¹H RMN : 2.56 (s, 3H, CH₃), 2.84 (s, 3H, CH₃), 3.47 (t, 2H, CH₂, J: 7.4 Hz), 3.76 (t, 2H, CH₂, J: 7.4 Hz), 7.22 (d, 1H, H₈, J: 8.2Hz), 7.56 (dd, 1H, H₇, J: 8.2, 1.9 Hz), 7.94 (s, 1H, H₅). C₁₃H₁₃NCl₂. Anal. Elemen. Calcu. C 61.43%, H 5.17%, N 5.51%; Anal. Elemen. Deter. C 61.26%, H 5.23%, N 5.74%.

4-CLORO-3-(2-CLOROETIL)-2,7-DIMETILQUINOLINA 6C.

Sólido beige, Rto. 90%; P.f. 50-52 °C; IR (KBr) cm⁻¹: 2960, 2352, 1580, 1552, 739; ¹H RMN : 2.56 (s, 3H, CH₃), 2.84 (s, 3H, CH₃), 3.45 (t, 2H, CH₂, J: 7.4 Hz), 3.73 (t, 2H, CH₂, J: 7.4 Hz), 7.86 (d, 1H, H₈, J: 1.6 Hz), 8.24 (d, 1H, H₅, J: 8.5 Hz), 8.69 (dd, 1H, H₆, J: 8.5, 1.9 Hz). C₁₃H₁₃NCl₂. Anal. Elemen. Calcu. C 61.43%, H 5.17%, N 5.51%; Anal. Elemen. Deter. C 61.70%, H 4.96%, N 5.49%.

4-CLORO-3-(2-CLOROETIL)

-2-METIL-6-METOXIQUINOLINA 6D.

Sólido marrón, Rto: 87%; P.f. 112-114 °C; IR (KBr) cm⁻¹: 2944, 1568; ¹H RMN : 2.79 (s, 3H, CH₃), 3.47 (t, 2H, CH₂, J: 7.4 Hz), 3.75 (t, 2H, CH₂, J: 7.4 Hz), 3.96 (s, 3H, OCH₃), 7.35 (dd, 1H, H₇, J: 8.7, 2.4 Hz), 7.39 (d, 1H, H₅, J: 2.4), 7.93 (d, 1H, H₈, J: 8.7 Hz). C₁₃H₁₃NOCl₂. Anal. Elemen. Calcu. C 57.79%, H 4.86%, N 5.19%; Anal. Elemen. Deter. C 58.03%, H 4.91%, N 5.07%.

4-CLORO-3-(2-CLOROETIL)

-2-METIL-7-METOXIQUINOLINA 6E.

Sólido marrón, Rto: 93%; P.f. 68-70 °C; IR (KBr) cm⁻¹: 2944, 1573; ¹H RMN : 2.77 (s, 3H, CH₃), 3.44 (t, 2H, CH₂, J: 7.3 Hz), 3.72 (t, 2H, CH₂, J: 7.3 Hz), 3.94 (s, 3H, OCH₃), 7.24 (dd, 1H, H₆, J: 8.7, 2.4Hz), 7.56 (d, 1H, H₈, 2.4Hz), 8.02 (d, 1H, H₅, J: 8.7 Hz). C₁₃H₁₃NOCl₂. Anal. Elemen. Calcu. C 57.79%, H 4.86%, N 5.19%; Anal. Elemen. Deter. C 57.76%, H 4.91%, N 5.23%.

4-CLORO-3-(2-CLOROETIL)

-2-METIL-8-METOXIQUINOLINA 6F.

Cristales violeta, Rto: 87%; P.f. 150 °C; IR (KBr) cm⁻¹: 2944, 1568; ¹H RMN : 2.86 (s, 3H, CH₃), 3.46 (t, 2H,

CH₂, J: 7.4 Hz), 3.73 (t, 2H, CH₂, J: 7.4 Hz), 4.06 (s, 3H, OCH₃), 7.05 (d, 1H, H₅, J: 7.1 Hz), 7.47 (t, 1H, H₆, J: 7.5), 7.73 (dd, 1H, H₇, J: 7.7, 1.9 Hz). C₁₃H₁₃NOCl₂. Anal. Elemen. Calcu. C 57.79%, H 4.86%, N 5.19%; Anal. Elemen. Deter. C 58.02%, H 4.86%, N 5.33%.

4,7-DICLORO-3-(2-CLOROETIL)

-2-METILQUINOLINA 6G.

Sólido marrón, Rto: 79%; P.f. 40-41 °C; IR (KBr) cm⁻¹: 2940, 1578; ¹H RMN : 2.79 (s, 3H, CH₃), 3.48 (t, 2H, CH₂, J: 7.6 Hz), 3.74 (t, 2H, CH₂, J: 7.6 Hz), 7.91 (dd, 1H, H₆, J: 8.4, 2.0Hz), 7.97 (d, 1H, H₈, 2.0Hz), 8.08 (d, 1H, H₅, J: 8.4 Hz). C₁₂H₁₀NCl₃. Anal. Elemen. Calcu. C 52.51%, H 3.68%, N 5.10%; Anal. Elemen. Deter. C 52.63%, H 3.66%, N 4.93%.

4-CLORO-3-(2-CLOROETIL)

-2-METIL-7-FLUOROQUINOLINA 6H.

Sólido marrón, Rto: 86%; P.f. 90-92 °C; IR (KBr) cm⁻¹: 2937, 1562; ¹H RMN : 2.69 (s, 3H, CH₃), 3.45 (t, 2H, CH₂, J: 7.2 Hz), 3.79 (t, 2H, CH₂, J: 7.2 Hz), 7.91 (m, 1H, H₆), 7.97 (m, 1H, H₈), 8.08 (d, 1H, H₅, J: 8.7 Hz). C₁₂H₁₀NFCl₂. Anal. Elemen. Calcu. C 55.83%, H 3.91%, N 5.43%; Anal. Elemen. Deter. C 56.01%, H 3.93%, N 5.57%.

4-CLORO-3-(2-CLOROETIL)

-2-METIL-7-TRIFLUORMETILQUINOLINA 6I.

Sólido púrpura, Rto. 83%; P.f. 58-60 °C; IR (KBr), cm⁻¹: 2950, 1630; ¹H RMN : 2.83 (s, 3H, CH₃), 3.50 (t, 2H, CH₂, J: 7.7 Hz), 3.78 (t, 2H, CH₂, J: 7.7 Hz), 7.73 (dd, 1H, H₆, J: 1.6 Hz), 8.28 (m, 2H, H_{5,8}). C₁₃H₁₀NF₃Cl₂. Anal. Elemen. Calcu. C 50.67%, H 3.28%, N 4.55%; Anal. Elemen. Deter. C 50.71%, H 3.45%, N 4.76%.

ANÁLISIS POR RAYOS-X

Los datos cristalográficos se reportan en la Tabla I. El cristal fue obtenido a través de una evaporación lenta en etanol; el mismo, con tamaño 0.27x 0.26x0.20 mm, fue utilizado para el estudio de difracción por rayos-X. Los datos fueron recolectados en un difractor Rigaku provisto con un detector CCD (Crystal Clear, Rigaku/MS, Inc., 2000). Los datos fueron reducidos y procesados usando el programa Crystal Structure 3.6.0 (Rigaku/MS, Inc., 2004). La estructura fue resuelta usando métodos directos SHELXTL-NT V5.1 (Bruker AXS, 1998). Todos los átomos diferentes al hidrógeno fueron refinados anisotrópicamente. Los átomos de hidrógeno

Tabla I
 Datos cristalográficos para 5b.

| | |
|--|---|
| Fórmula molecular | C ₂₆ H ₃₀ N ₂ O ₄ |
| Forma /color | Bloque amarillo |
| Peso molecular | 434.52 |
| Temperatura (°K) | 293 |
| Sistema cristalino | Monoclínico |
| Grupo espacial | P21/n |
| Dimensiones de la celda unidad | $a = 12.741(3)$, $a = 90.000^\circ$ $b = 7.6659(17)$, $b = 103.070(5)^\circ$ $c = 24.295(6)$, $g = 90.000^\circ$ |
| Volumen (Å ³), Z | 2311.4(10), 4 |
| Densidad (g.cm ⁻³) | 1.249 |
| Coefficiente de absorción, mm ⁻¹ | 0.084 |
| F(000) | 928 |
| Dimensiones del cristal (mm) | 0.27x0.26x0.2 |
| N de reflexiones colectadas | 26061 |
| Reflexiones independientes | 4800 |
| Bondad del ajuste en F2 | 1.196 |
| R1, wR1 Indices R final ($I > 2s(I)$) | 0.1254, 0.3764 |
| R2, wR2 (all data) | 0.2064, 0.3312 |
| Máx. y min. densidad residual (e. Å ³) | 0.341/-0.333 |

fueron incluidos en sus posiciones calculadas, excepto para el átomo de hidrógeno del grupo NH, el cual fue considerado en la posición encontrada. Todos esos átomos fueron refinados usando el método SHELXTL-NT V5.1 (Bruker AXS, 1998). Los datos cristalográficos reportados en este trabajo están depositados en la base de datos Cambridge Crystallographic Data Centre bajo el número CCDC 686939. Copia de este material podrá ser obtenida libre de cargo al aplicar a la dirección CCDC, 12 Union Road, Cambridge CB2 1EZ, UK (fax: (44) 01223 336033); e-mail: deposit@ccdc.ac.uk

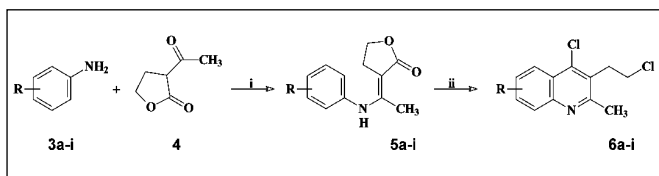
BIOLÓGICO

El ensayo de inhibición de la formación de β -hematina se realizó de acuerdo con el método descrito por Baelmans y col., 2000. Brevemente, una solución de clorhidrato de hemina (50 μ L), disuelta en DMSO (5,2 mg/mL), se distribuyó en microplacas de 96 pozos. Diferentes concentraciones de los compuestos disueltos en DMSO (100 μ M-1mM) se añadieron por triplicado en la microplaca (50 μ L), con una concentración final por pozo de 2,5 mM-125 μ M. Los controles de solvente contenían H₂O (50 μ L) o DMSO (50 μ L) y el control positivo cloroquina (2,5 mM-125 μ M/pozo, 50 μ L). La formación de β -hematina se inició con la adición de buffer acetato (100 μ L 0,2M, pH 4,4). Las microplacas se incubaron para

permitir la reacción (37 °C x 48 h). Luego de centrifugar (4000 rpm x 15 min, IEC-CENTRA, MP4R), se descartó el sobrenadante (hemina no cristalizada) y el sedimento (β -hematina formada) se lavó dos veces (DMSO 200 μ L) a fin de eliminar totalmente la hemina libre. Finalmente, se disolvió en NaOH (200 μ L, 0,2 N) para hidrolizar la β -hematina a hemina. Los agregados disueltos se diluyeron 1:2 con NaOH (0,1 N) y se les determinó la absorbancia a 405 nm (Microplate Reader, BIORAD-550). Los resultados se expresaron como % de inhibición de formación de β -hematina (%IFbH) 95.71 \pm 0.39% para el compuesto 6g, comparado con la cloroquina 96.61 \pm 0.26% que se empleó como patrón de actividad conocida como inhibidor de la polimerización del hemo.

Resultados y discusión

La 2-acetilbutirolactona 4 es un reactivo útil para la síntesis de muchos N-heterociclos (Wamhoff, 1972). El uso de este reactivo para la síntesis de algunas quinolinas sustituidas, como las 4-cloro-3-(2-cloroetil)2-metilquinolinas, fue primero descrita por Ozawa y col., 1955; y por Badawey, 1997. Mediante esta reacción, en el presente trabajo se obtuvieron los compuestos propuestos en el esquema 1. Los intermediarios (*E*)-dihidro-2-(3H)-furanonas fueron obtenidos en excelente rendimiento a través de la condensación de las 2-acetilbutirolactona 4 con la



Esquema. Síntesis de 4-cloro-3-(2-cloroetil)2-metilquinolinas 6a-i.

i. Tolueno, APTS, reflujo, 12h. ii. POCl₃, reflujo, 24h.

anilina respectiva en tolueno, ácido toluenosulfónico como catalizador a reflujo, recogiendo el agua generada en una trampa Dean Stark. La configuración de los compuestos 5a-i fue determinada a través de resonancia magnética de protón RMN ¹H y confirmada por cristalografía de rayos-X (figura 2). Para estos compuestos se pudo observar en los espectros de infrarrojo un patrón característico en las señales, alrededor de 3200 y 1670 cm⁻¹ correspondiente a los grupos aminos y carbonilo de la lactona respectivamente. A través de los espectros de RMN de protón se pudo observar señales alrededor de 1.9, 2.4 y 4.3 ppm asignadas a los grupos metil y sistema alifático de cinco miembros respectivamente; además de las señales en la región aromática con patrones característicos para cada sistema. Tal como se muestra en la figura 2, el puente de hidrógeno intramolecular le confiere una configuración (*E*) a las estructuras. La unidad asimétrica de la estructura cristalina consiste de dos moléculas cristalográficamente independientes que se encuentran en posiciones generales. Estas moléculas exhiben enlaces de hidrógeno intramolecular del tipo N-H...O, donde cada molécula forma un anillo de seis miembros descrito como *S*(6) según la teoría de grafos (Bernstein y col., 1995). Estos anillos de seis miembros generados por la interacción intermolecular adoptan una conformación casi planar, donde la desviación máxima de los planos medios son: 0.107Å para C20 y 0.05Å para C7. Detalles de la geometría de los enlaces de hidrógeno se dan en la Tabla II. Los grupos metil-fenil (A/C) de las dos moléculas independien-

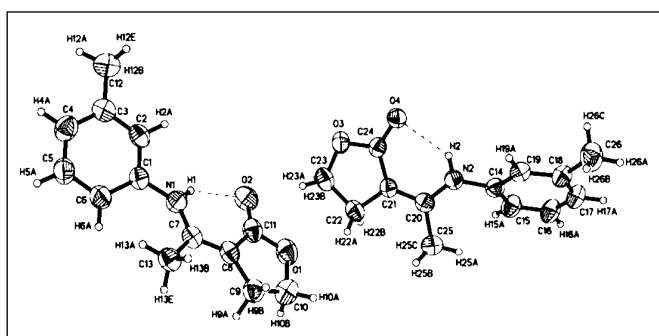


Figura 2. Diagrama ortep de la estructura molecular 5b, donde se muestran las interacciones intramoleculares N-H...O que se generan en las dos moléculas independientes. Los elipsoides se dibujaron con el 35% de probabilidad.

tes se encuentran rotados con respecto a los planos medios de los anillos de seis miembros generados por el enlace de hidrógeno. Los ángulos diédricos entre los planos medios entre los anillo de seis (A/C) y los anillos de cinco (B/D) son 27.1(2)° y 49.6(2)° respectivamente.

En la estructura cristalina (figura 3a y b) se observan capas paralelas al plano *ab* conformadas por dos tipos de columnas, donde la molécula 1 forma columnas moleculares relacionadas por un eje de tornillo 21 y la molécula 2 forma una columna de dímeros relacionados por un centro de inversión; estos dímeros están sostenidos principalmente por interacciones intermoleculares del tipo: N-H...O, C-H...p y p...p. Finalmente, estas capas se apilan a través de interacciones débiles del tipo C-H...p y p...p. Los valores de las distancias y ángulos de enlaces seleccionados se dan en la Tabla III. Estas distancias se relacionan con valores promedios reportados en la literatura para este tipo de compuestos (Speck, 2003).

Caracterizados estos intermediarios, fueron sometidos a ciclación regioselectiva, con subsiguiente clorinación en un sólo paso de reacción en las posiciones 4 del anillo quinolínico y la cadena lateral sobre la posición 3, al ser tratados con oxiclورو de fósforo a reflujo. A pesar de que los dos pasos envueltos en el proceso de obtención de estos compuestos pudiesen ser reducidos a sólo un paso de reacción, encontramos que es preferible aislar los intermediarios 5a-i antes de la ciclación, con la finalidad de incrementar el rendimiento final, tal como se describe en la parte experimental. Los compuestos finales fueron purificados a través de columna cromatográfica, usando como soporte alúmina neutra y como eluyente diclorometano. Los detalles experimentales, los datos de IR, RMN ¹H, análisis elemental

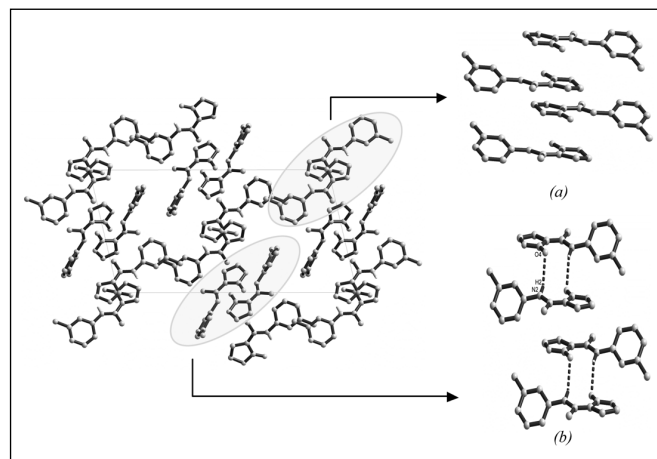


Figura 3. (a) Vista de las capas paralelas al plano *ab* conformadas por dos tipos de columnas moleculares relacionadas por un eje de tornillo 21. (b) Molécula 5b, se observa la formación de una columna de dímeros relacionados por un centro de inversión.

Tabla II
Geometría de los enlaces de hidrógeno (Å, °) 5b.

| D-H...A | D-H | H...A | D...A | D-H...A |
|--------------------------------|--------|--------|----------|---------|
| N(1)-H(1) ...O(2) | 0.9361 | 2.0092 | 2.733(6) | 132.85 |
| N(2)-H(2) ...O(4) | 0.9474 | 2.2641 | 2.844(5) | 118.80 |
| N(2)-H(2) ...O(4) ⁱ | 0.9474 | 2.4641 | 3.322(5) | 150.51 |
| C(23)-H(23B) ...O(2) | 0.9303 | 2.5163 | 3.481(6) | 173.07 |

i = 4-X, -1-y, 1-Z

Tabla III
Distancias (Å) y ángulos de enlaces (°) seleccionados 5b.

| | | | |
|---------------------|----------|----------------------|----------|
| C(1) - C(2) | 1.377(6) | C(21) - C(22) | 1.505(6) |
| N(1) - C(7) | 1.347(6) | N(2) - C(20) | 1.361(5) |
| C(7) - C(13) | 1.498(6) | C(20) - C(25) | 1.516(7) |
| C(11) - O(1) | 1.364(6) | C(24) - O(3) | 1.352(5) |
| C(11) - O(2) | 1.215(6) | C(24) - O(4) | 1.232(5) |
| C(11) - C(8) | 1.450(7) | C(24) - C(21) | 1.428(6) |
| C(10) - O(1) | 1.438(7) | C(23) - O(3) | 1.443(6) |
| C(7) - N(1) - H(1) | 117.8(4) | C(20) - N(2) - H(2) | 121.7(4) |
| N(1) - C(1) - C(6) | 124.0(5) | N(2) - C(20) - C(21) | 121.4(4) |
| N(1) - C(7) - C(13) | 120.6(4) | N(2) - C(20) - C(25) | 120.0(4) |
| N(1) - C(7) - C(8) | 120.0(5) | N(2) - C(14) - C(19) | 117.8(4) |

de los compuestos sintetizados, son descritos en la parte experimental, donde podemos observar en los espectros de infrarrojo la desaparición de las señales correspondientes a los grupos amino y lactona presentes en los materiales de partida, con la aparición de señales alrededor de 1560 cm^{-1} , asignadas al estiramiento C=C del anillo de la quinolina. Por su parte, los espectros de resonancia magnética de protón muestran las señales características de los grupos metil y etilidén alrededor de 2.3, 3.4 y 3.7 ppm respectivamente, además del patrón característico, relacionado con el tipo de sustitución para el sistema del anillo quinolínico.

Todos los compuestos sintetizados fueron sometidos a evaluación *in vitro*, para medir su capacidad inhibitoria sobre la formación de β -hematina. En dicho ensayo se somete bajo condiciones ácidas a la hemina, para que se genere la β -hematina. Todos los compuestos sintetizados fueron sometidos a dicha prueba, sin embargo, sólo el compuesto 6g fue capaz de inhibir la formación de β -hematina hasta un $95.71 \pm 0.39\%$, comparado con la cloroquina $96.61 \pm 0.26\%$ que se empleó como patrón de actividad conocida como inhibidor de la polimerización del he-

mo, a una concentración final por pozo de entre 2,5 mM y 125 μM . Los compuestos fueron sometidos a evaluación como inhibidores de la degradación de la hemoglobina; sin embargo, el resultado mostrado por los mismos fue negativo a una concentración de 10 μM .

Conclusiones

En conclusión, hemos encontrado un método fácil y eficiente para la síntesis de 4-cloroquinolinas derivadas, que pueden ser de gran valor en química medicinal para el desarrollo de agentes quimioterapéuticos en los caso de afección con malaria. Se pudo deducir, a través de los estudios de rayos, que la configuración de los intermediarios del tipo 5 es (E) favorecida por la formación del puente de hidrógeno intramolecular. En las pruebas preliminares realizadas *in vitro* sobre la inhibición de la polimerización de la β -hematina; se pudo observar que sólo un derivado presentó actividad excelente, al ser comparado con la cloroquina, sin embargo, la evaluación como inhibidor de la degradación de la hemoglobina resultó poco efectiva para cada compuesto sintetiza-

do. Para finalizar, podemos indicar que el compuesto 6g se puede seleccionar como una importante estructura líder, que nos permitirá el desarrollo en el futuro de agentes efectivos para el tratamiento de la malaria.

Agradecimientos

Al Instituto de Investigaciones Farmacéuticas y al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad Central de Venezuela, proyectos N° IIF-03.2006 y PG. CDCH 06-6502-2006 respectivamente, así como al programa PCP Venezuela-Francia, por los financiamientos otorgados para la ejecución de este proyecto.

Referencias bibliográficas

- Badawey E, Kappe T. 1997. Potential antineoplasics. Synthesis and cytotoxicity of certain 4-chloro-3-(2-chloroethyl)-2-methylquinolines and related derivatives. *Eur J Med Chem* 32:815-822.
- Baelmans R, Deharo E, Muñoz V, Sauvain M, Ginsburg H. 2000. Experimental conditions for testing the inhibitory activity of chloroquine on the formation of β -hematin. *Exp Parasitol* 96:243-24.
- Bernstein J, Davis RE, Simon L, Chang NL. 1995. Patterns in hydrogen bonding: Functionality and graph set analysis in crystals. *Angew Chem Int Ed Engl* 34: 1555-1573.
- Borsnik K, Paik I, Shapiro T, Posner G. 2002. Antimalarial chemotherapeutic peroxides: Artemisin, Yinghaosu A and related compounds. *Int Parasitol* 432:1661-1667.
- Brandenburg, K. 1996-1998. Diamond, Version 2.0h, Crystal Impact, Gbr.
- Bruker. 1998. SHELXTL-NT. Version 5.1. Bruker AXS Inc., Madison, Wisconsin, USA.
- Crystal Clears 1.3.6. 2005. Rigaku/MSC, Inc., 9009 New Trails Drive, The Woodlands, TX 77381.
- Crystallographic software package. 1998. SHELXTL-NT V5.1. PC version, Bruker Analytical X-Ray Systems. Madison, WI, USA.
- Fidock D, Nomura T, Talley A, Cooper R, Dzekunov S, Ferdig M. 2000. Mutations in the *P. falciparum* digestive vacuole transmembrane protein PfCRT and evidence for their role in chloroquine resistance. *Mol Cell* 6:861-871.
- Foth B, McFadden G. 2003. The apicoplast: A plastid in *P. falciparum* and other apicomplexan parasites. *Int Rev Cytol*, 224: 57-110.
- Gardner M, Hall N, Fung E, White O, Berriman M, Hyman, R, Carlton J. 2002. Genome sequence of the human malaria parasite *P. Falciparum*. *Nature* 419: 498-511.
- Ozawa T, Nagaoka S, Mitsuno K, Tsukiyama T. 1956. Synthesis of 3-aminomethylenedihydrofuran-2-ones. *J Pharm Soc Jpn* 75:1407-1410.
- Spek AL. 2003. Syngle-crystal structure validation with the program PLATON. *Apl Cryst* 36:7-13.
- Wamhoff H, Korte F. 1972. The synthesis of heterocyclic compounds starting from lactones, lactams and thio-lactones. *Synthesis* 151-175.
- Wellems TE. 2002. Plasmodium chloroquine resistance and search for a replacement antimalarial drug. *Science* 298: 124-126.
- White NJ. 1992. Antimalarial drug resistance: The pace quickens. *J Antimicro Chemother* 30: 571-585.
- WHO World Malaria Report 2005. (<http://rbm.who.int/wmr> 2005).
- Yapi A, Mustofa M, Valentin A, Chavignon O, Teulade J, Mallie M, Chapat J, Blache Y. 2000. New potential anti-malarial agents: Synthesis and biological activities of original diaza-analogs of phenanthrene. *Chem Pharm Bul* 48:1886-1889.

Efecto analgésico y antiinflamatorio del extracto acuoso de *Cestrum buxifolium* kunth

Analgesic and anti-inflammatory effect of *Cestrum buxifolium* Kunth aqueous extract

JUAN VICENTE GÓMEZ-BARRIOS^{1*}, CARLOS CIANGHEROTTI², MARÍA G MATOS¹,
MARIELLA PASTORELLO², DIOLIMAR BUITRAGO³, ANITA ISRAEL²
y MARGARITA SALAZAR-BOOKAMAN¹

Resumen

El *Cestrum buxifolium* Kunth es una planta perteneciente a la familia Solanaceae, la cual incluye especies con un amplio potencial toxicológico y farmacológico. En el presente trabajo se evaluó la posible actividad analgésica y antiinflamatoria del extracto acuoso de las hojas de *C. buxifolium*. La dosis tóxica 50 (DT₅₀) fue determinada por el cálculo de dosis-efecto a través del método gráfico de Litchfield y Wilcoxon. El efecto analgésico fue evaluado a través del ensayo de retirada de la cola por inducción de nocicepción térmica a través de un analgesímetro digital, mientras que la actividad antiinflamatoria fue determinada empleando un modelo de edema agudo de pata en ratas, inducido por λ -carragenina tipo IV, utilizando un pletismómetro digital. Para las pruebas de toxicidad y analgesia se emplearon ratones macho *balb-c*, y para la actividad antiinflamatoria se utilizaron ratas macho de la cepa Sprague-Dawley. La DT₅₀ determinada fue de 45 mg/kg. El extracto de *C. buxifolium*, a una dosis de 22,5 mg/kg.i.p. produjo un efecto analgésico estadísticamente significativo, comparado con el grupo control ($p < 0,01$), similar al observado en el grupo tratado con morfina (3 mg/kg, i.p), opiáceo de potente efecto antinociceptivo. Asimismo, este extracto inhibió significativamente el edema de pata de la rata, en comparación con el grupo control ($p < 0,05$), tanto a los 30 (70%), 60 (25%) y 180 min. (36.97%), postcarragenina. Este efecto es comparable con el de la fenilbutazona (AINES usado de referencia). Nuestros resultados demuestran que el extracto acuoso de *C. buxifolium* posee un importante efecto analgésico y antiinflamatorio. Se requieren estudios adicionales para establecer el o los compuestos presentes en este extracto, así como los posibles mecanismos de acción involucrados en estos efectos.

Palabras clave: *Cestrum buxifolium*, analgesia, inflamación, toxicidad aguda.

Abstract

Cestrum buxifolium Kunth is a plant from the Solanaceae family, which includes species with wide range toxicological and pharmacological activities. The aim of the present study was to evaluate the possible analgesic and anti-inflammatory activity of the aqueous extract of *C. buxifolium* leaves. Litchfield and Wilcoxon dose-effect method was used to determine TD₅₀. To evaluate analgesic and anti-inflammatory effects, the tail-flick and inhibition of carrageenin-induced edema were used, respectively. Analgesic and anti-inflammatory effects were studied in mice and rats, respectively. TD₅₀ value was 45mg/kg. *C. buxifolium* aqueous extract (22.5 mg/kg) i.p. produced statistically significant analgesic effect respect to control group ($p < 0.001$) and a similar effect to that observed in morphine treated group (3 mg/kg). In carrageenanin test, it was observed that *C. buxifolium* aqueous extract (22.5 mg/kg) suppressed inflammatory response at 30, 60 and 180 min post treatment respect to control ($p < 0.05$). On the basis of these results we can conclude that *Cestrum buxifolium* Kunth aqueous extract has analgesic and anti-inflammatory effects. A possible mechanism to explain these effects warrants additional studies.

Key words: *Cestrum buxifolium*, analgesia, inflammation, acute toxicity.

¹ Laboratorio de Farmacología y ²Laboratorio de Neuropeptidos. Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela. ³Instituto de Investigaciones. Facultad de Farmacia, Universidad de Los Andes. Mérida, Venezuela.

* Correspondencia a: Juan V. Gómez-Barrios, Postgrado de Farmacología, Facultad de Farmacia, piso 7, Universidad Central de Venezuela. e-mail: gomezjv@hotmail.com

Introducción

Las plantas pertenecientes a la familia Solanaceae han sido ampliamente estudiadas desde el punto de vista farmacológico y toxicológico (Grunberg, 2007; Khalil y col., 2000; Pérez-Saad y Buznego, 2008). De esta familia se han encontrado en Venezuela algunos géneros de importancia biológica, tales como *Datura*, *Solanum*, *Nicotiana* y *Cestrum* (Benítez de Rojas y D'Arcy, 1998; Jáuregui y col., 2001), cuyas especies, contienen algunos metabolitos secundarios de reconocida actividad tóxica, como la escopolamina de *Datura stramonium* L. (Halpern, 2004), la solanina del *Solanum tuberosum* L. (Dalvi y col., 1983), la nicotina del *Nicotiana tabacum* L. (Buisson y Bertrand, 2002; Picciotto y col., 2000) y algunos glicósidos de varias especies del *Cestrum* (Chennaiah y col., 2007; Mimaki y col., 2002).

La familia Solanaceae se divide en dos subfamilias: Solanoideae, formada por siete tribus, 36 géneros y cerca de 1.400 especies, y la Cestroideae, formada por cinco tribus, 24 géneros y aproximadamente 413 especies (Hunziker, 1976). En Venezuela, el género *Cestrum* está representado por 32 especies distribuidas en los estados Amazonas, Aragua, Apure, Barinas, Bolívar, Carabobo, Cojedes, Distrito Capital, Falcón, Guárico, Lara, Mérida, Miranda, Nueva Esparta Portuguesa, Sucre, Táchira, Trujillo, Monagas, Yaracuy y Zulia (Benítez y William, 1998; Ciangherotti y col., 2004). *Cestrum buxifolium* está distribuida en los páramos andinos de Venezuela, donde es conocida como «uvito morado» (Benítez y William, 1998). Los miembros del género *Cestrum* tienen en común la presencia de numerosas saponinas esteroidales y triterpenos de importancia toxicológica y farmacológica (Begum y Goyal, 2007). Es conocido que muchos compuestos que poseen este tipo de estructura química han exhibido potencial actividad analgésica y/o antiinflamatoria (Pastorello y col., 2007; Moharram y col., 2007; Gepdiremen y col., 2007; Kim y col., 1999; Safayhi y col., 1997). El *C. diurnum* contiene derivados de la vitamina D3 como el glicósido 1,25-dihidroxi, de conocida actividad calcinogénica (Wasserman y col., 1976; Prema y Raghuramulu, 1994); y el *C. nocturnum* contiene saponinas esteroidales citotóxicas (Mimaki y col., 2001), sin embargo los extractos acuosos y orgánicos de esta especie ha mostrado significativa actividad analgésica en modelos murinos (Buznego y col., 2005a,b). Otras especies son empleadas en la medicina popular, tales como *C. Auriculatum*, cuyas hojas son utilizadas para el tratamiento de infecciones y alergias cutáneas (Rojas y col., 2003), se ha empleado como agente antihemorroidal y antirreumático

(De Feo, 1992), y para aliviar el dolor de cabeza (Hammond y col., 1998). Asimismo, el *C. parqui* ha sido utilizado como antifebril y antiinflamatorio (Backhouse y col., 1996).

En años recientes se estudiaron los componentes químicos de las hojas de *Cestrum buxifolium* Kunth, aislándose el ácido *epi*-ursólico a partir del extracto isopropanólico (Ciangherotti y col., 2004). Un estudio posterior demostró que esta molécula posee una importante actividad antiinflamatoria (Pastorello y col., 2007). Sin embargo, aún no se conocen los componentes químicos presentes en el extracto acuoso del *C. buxifolium*, y tampoco si éste posee alguna actividad biológica de importancia terapéutica. Por esta razón, en el presente trabajo se evaluó la posible actividad analgésica y antiinflamatoria del extracto acuoso de *C. buxifolium* Kunth (Cb), como un aporte a la caracterización farmacológica del género *Cestrum*, que a su vez nos conduzca al aislamiento de nuevas moléculas con potencial actividad terapéutica.

Materiales y métodos

MATERIAL BOTÁNICO

La especie *C. buxifolium* Kunth fue recolectada en el páramo de «La Culata», estado Mérida, Venezuela. Un ejemplar *voucher* fue depositado bajo el número N° DBB007 en la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela. El material botánico fue secado en una estufa a 60 °C por siete (7) días y posteriormente se realizó la decocción en agua a 70 °C durante una hora. Luego, el extracto acuoso fue liofilizado para la realización de las pruebas farmacológicas.

ANIMALES

Para los ensayos de toxicidad aguda y analgesia se emplearon ratones macho de la cepa *Balb-c*, con un peso de 22 ± 2 g. Para la prueba de actividad antiinflamatoria se emplearon ratas macho de la cepa Sprague-Dawley, con un peso entre 150 ± 20 g. Ambas especies provenientes del Bioterio del Instituto Nacional de Higiene «Rafael Rangel», Caracas-Venezuela. Los animales se mantuvieron con libre acceso al alimento y agua antes de los experimentos.

DETERMINACIÓN DE LA DT₅₀ DEL EXTRACTO ACUOSO DE *CESTRUM BUXIFOLIUM* KUNTH

Para determinar la dosis tóxica 50 (DT₅₀) del extracto acuoso de *C. buxifolium* se utilizó el método observacional descrito por Irwin (1962) y Campbell

y Ritcher (1967). Los animales fueron divididos en seis grupos (N=6) y se les aplicaron los siguientes tratamientos: control (NaCl al 0,9%, i.p.), y *C. buxifolium* (Cb) (4, 16, 64, 128, 256 mg/kg, i.p.). Seguidamente, los ratones fueron observados a los 10, 30, 60 y 90 minutos, con el fin de identificar el efecto tóxico más frecuente. La DT₅₀ fue calculada a través del método gráfico de curva dosis-efecto tóxico de Litchfield y Wilcoxon (1949).

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANALGÉSICA DEL EXTRACTO ACUOSO DE *CESTRUM BUXIFOLIUM* KUNTH

Para determinar el posible efecto analgésico del Cb se empleó la prueba de la retirada de la cola en ratones (Davies y col., 1946). Los animales de experimentación fueron seleccionados de acuerdo con el tiempo de respuesta (retirada de la cola) al estímulo de calor radiante, descartándose aquellos animales que tenían un tiempo de respuesta mayor que seis (6) segundos. Los animales seleccionados se dividieron en cuatro grupos (N=7 c/u) y recibieron los siguientes tratamientos: 1. Control (NaCl 0,9%, i.p.); 2. extracto acuoso de *C. buxifolium* (1/2DT₅₀ (22,5 mg/kg, i.p.)); 3. Ácido acetilsalicílico (ASA) (Bayer, Venezuela; CAS A 3160) (200 mg/kg, p.o.); y 4. Morfina (MOR) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) (3 mg/kg, i.p.). El estímulo nociceptivo de tipo térmico fue aplicado en la cola de los ratones utilizando un analgesímetro (LETICA, Scientific Instruments, LE 7106, España), para determinar el tiempo que tarda el animal en retirarla (período de latencia) (Davies y col., 1946). El ASA, un analgésico y antiinflamatorio no esteroideo (AINE) y la MOR, un opioide, se utilizaron como analgésicos de referencia. El período de latencia fue medido a los 10, 30, 60 y 90 minutos después de la administración de los tratamientos. El tiempo máximo de exposición al estímulo térmico fue de 15 segundos.

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA DEL EXTRACTO ACUOSO DE *CESTRUM BUXIFOLIUM* KUNTH

Para determinar la posible actividad antiinflamatoria de extracto acuoso del *Cestrum buxifolium* Kunth se empleó el método de inducción del edema por carragenina en la pata de la rata (Winter, 1962; Bhatt, 1977). Para ello, los animales fueron divididos en tres (3) grupos experimentales: Control (carboximetilcelulosa al 2%, p.o.), fenilbutazona (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO; 80 mg/Kg, p.o.), usada como antiinflamatorio de referencia; y extracto acuoso de Cb (22,5 mg/Kg, p.o.). El edema fue inducido por 0,1 mL de λ-carragenina tipo IV al 1% (en solución salina, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)

inyectada en la aponeurosis plantar de la pata trasera de la rata. Una vez transcurrido el tiempo de efecto pico para cada tratamiento (30 min. para el *C. buxifolium* y 1h para la FBZ), el edema desarrollado fue medido por desplazamiento de volumen de la pata, usando un pletismómetro digital (Ugo Basile 7140, Italia) antes, 30, 60 y 180 min. después de la administración de la carragenina.

Análisis estadístico

Los resultados de la prueba de la actividad analgésica fueron expresados como la media ± el error estándar de la media (EEM), y los resultados fueron analizados mediante el análisis de varianza de una vía (ANOVA), seguido de la prueba de Newman-Keul para determinar la significancia estadística. Los resultados de la actividad antiinflamatoria fueron expresados como la media ± el error estándar de la media (EEM) del volumen desplazado y como porcentaje de inhibición del edema, calculado mediante la fórmula $(1-V_t/V_c) \times 100$, donde V_t y V_c son el volumen medio de la pata de los animales tratados y control, respectivamente. La diferencia entre el grupo control y los tratados fueron analizados utilizando una prueba de *t de student* no pareada; un valor de $p < 0,05$ fue considerado como estadísticamente significativo.

Resultados

OBTENCIÓN DE LA DT₅₀

Las alzas fueron el signo tóxico más frecuentemente observado en los animales tratados con el extracto acuoso del *C. buxifolium*. Este efecto se observó a partir de la dosis de 16 mg/kg y se presentó en el 50% de los ratones estudiados a la dosis de 64 mg/kg; encontrándose que el tiempo de efecto pico para el extracto fue 30 min y la DT₅₀ del *C. buxifolium* determinada fue de 45 mg/kg.

ACTIVIDAD ANALGÉSICA

El tiempo de latencia de retirada de la cola en los animales tratados con el extracto de *C. buxifolium* fue significativamente mayor en todos los tiempos evaluados, con respecto al control (Fig. 1), y comparables con los obtenidos en los grupos tratados con ASA y MOR, sin observarse diferencias estadísticamente significativas entre los resultados obtenidos con el *C. buxifolium* y la MOR, demostrando así que este extracto posee una potente actividad analgésica.

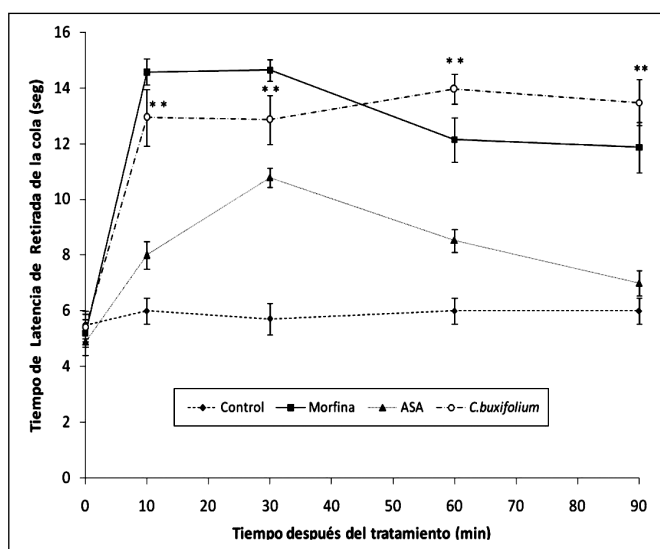


Figura 1. Efecto analgésico del extracto acuoso de *C. buxifolium* en ratones. La nocicepción térmica fue determinada por el ensayo de retirada de la cola. Los animales fueron pre-tratados con solución fisiológica (Control) (NaCl al 0,9%, i.p.), sulfato de morfina (3 mg/kg, i.p.), ácido acetilsalicílico (ASA) (200 mg/kg, i.p.) y extracto acuoso de *C. buxifolium* (22,5 mg/kg i.p.). Los resultados se expresan como la media \pm EEM de un N=7 para cada grupo (**p<0,001 comparado con el grupo control).

ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA

La inyección intraplantar de la carragenina provocó un edema significativo en la pata de la rata del grupo control. La administración i.p. del extracto acuoso de *C. buxifolium* suprimió significativamente la respuesta inflamatoria a los 30, 60 y 180 minutos posteriores a la inducción del edema comparados con el grupo control (Fig. 2); mostrando una potente y temprana inhibición del edema del 70% a los 30 min, la cual se mantiene a los 60 (25%) y 180 min (37%). El efecto antiinflamatorio observado a los 30 min en el grupo tratado con el extracto fue superior al obtenido con la FBZ (droga de referencia), sin embargo no hubo diferencias estadísticamente significativas entre estos dos grupos en los tiempos de estudio restantes. Estos resultados demuestran que el extracto acuoso del *C. buxifolium* Kunth posee una importante actividad antiinflamatoria.

Discusión

Los estudios realizados en las plantas del género *Cestrum* han mostrado una amplia gama de efectos farmacológicos, entre los cuales destacan la actividad antiinflamatoria, antipirética, citotóxica, antioxidante, antimalárica, antibiótica, entre otras (Begum y Goyal, 2007). Asimismo, las plantas de este género son consideradas tóxicas, en parte por los compuestos aislados de algunas especies como el 1 α , 25-dihidrocolecalfiferol presente en *C. diurnum*,

cuyo consumo produce calcinosis (Wasserman y col., 1976; Prema y Raghuramulu, 1994); o la parquina y la carboxiparquina, kaurenos tóxicos aislados de las hojas de *C. parqui* (McLennan y Kelly, 1984; Pearce y col., 1992). Nuestros resultados muestran que el extracto acuoso de las hojas de *C. buxifolium* Kunth, al igual que otras especies de *Cestrum* (Van der Lugt y col., 1992), induce un efecto tóxico agudo que se manifiesta a nivel de la locomoción, principalmente por enlentecimiento de los movimientos y dificultad para la marcha.

El uso etnobotánico como antiinflamatorio es el más común, entre las especies pertenecientes al género *Cestrum*, tales como el *C. nocturnum*, *C. parqui*, *C. auriculatum* y *C. laevigatum* (Begum y Goyal, 2007). A pesar de no haber estudios etnofarmacológicos de *C. buxifolium* Kunth, recientemente en nuestro laboratorio se demostró que el principal componente de la hoja de esta especie, el ácido *epi*-ursólico, produce un potente efecto antiinflamatorio en el modelo del edema agudo de la pata de la rata inducido por carragenina, sugiriendo la inhibición de la enzima fosfolipasa A₂ como el mecanismo antiinflamatorio responsable de este efecto (Pastorello y col., 2007). Cabe destacar que el extracto acuoso también produjo un importante efecto antiinflamatorio (figuras 2 y 3). Al tratarse del extracto acuoso, el efecto antiinflamatorio no podría ser atribuido al ácido *epi*-ursólico, ya que éste es insoluble en agua.

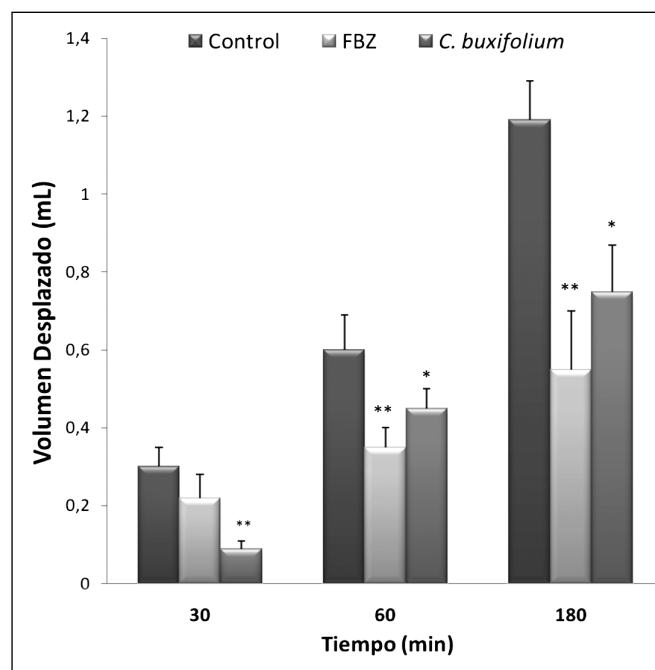


Figura 2. Edema inducido por carragenina en la pata de las ratas. Desplazamiento de volumen medido a través del ple-tismómetro en los diferentes grupos de tratamiento: control (CMC al 2%, p.o.), fenilbutazona (FBZ) y *C.buxifolium*, a los 30, 60 y 90 min postcarragenina. Los resultados se expresan como la media \pm EEM de un N=6. (*p<0,05 y **p<0,01 comparado con el grupo control).

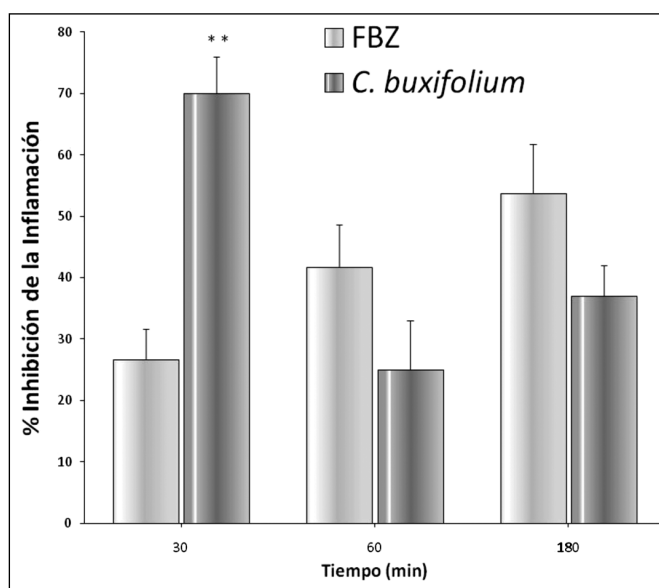


Figura 3. Efecto inhibitorio del extracto del *C. buxifolium* y la fenilbutazona (FBZ) sobre el edema de pata inducido a los 30, 60 y 180 min postcarragenina. Los resultados son expresados como la media \pm EEM del porcentaje de inhibición de la inflamación. (* $p < 0.01$ comparado con la FBZ).

Otras moléculas hidrosolubles estarían involucradas en este efecto, tal como se observa en otras especies de *Cestrum*. El *C. parqui* ha mostrado actividad en este mismo modelo de inflamación, y ésta ha sido atribuida a los paquinósidos A y B presentes en las hojas de la planta (Backhouse y col., 1996; Shehnaz y col., 1999). Asimismo, tanto el *C. parqui* como el *C. diurnum* y el *C. kunthii* contienen ácido ursólico (Bianchi y col., 1963; Catalan y col., 1992; Begum y Goyal, 2007), el cual se ha descrito como un potente antiinflamatorio (Recio y col., 1995a; Recio y col., 1995b).

Al igual que lo reportado para la especie *C. nocturnum* (Buznego y col., 2005; Pérez-Saad y Buznego, 2008), también el *C. buxifolium* Kunth posee actividad analgésica. Interesantemente, los efectos obtenidos con este extracto son comparables con la morfina en este modelo de nocicepción térmica de retirada de la cola en ratones. Estos resultados sugieren que posiblemente estemos en presencia de uno o varios compuestos de alto valor farmacológico, desde el punto de vista analgésico. Se hacen necesarios entonces, estudios adicionales a fin de obtener y caracterizar los compuestos responsables de esta actividad.

En conclusión, el extracto acuoso del *C. buxifolium* Kunth posee un importante efecto analgésico y antiinflamatorio, de forma comparable con diversos fármacos de referencia, sugiriendo la presencia de compuestos hidrosolubles de relevancia farmacológica que deberían ser aislados e identificados para su mejor aprovechamiento terapéutico.

Referencias bibliográficas

- Backhouse NC, Delparte R, Salinas P, Pinto A, Aravena S, Cassels BK. 1996. Antiinflammatory and antipyretic activities of *Cuscuta Chilensis*, *Cestrum Parqui*, and *Psorela glandulosa*. *Inter J Pharmacog* 34(1): 53-57.
- Begum M, Goyal M. 2007. Research and Medicinal Potential of the genus *Cestrum*. *Pharmacog Rev* 1: 320-332.
- Benítez de Rojas C, D'Arcy WG. 1998. The Genera *Cestrum* and *Sessea* (Solanaceae: Cestreae) in Venezuela. *Ann Missouri Bot Gard* 85:273-351.
- Benitez C, William G. 1998. The General *Cestrum* and *Sessea* (Solanaceae: Cestreae) in Venezuela. *Ann Missouri Bot Gard* 35: 273-351.
- Bhatt KR, Mehta RK, Shrivastava PN. 1977. A simple methods for recording anti inflammatory effects on rat paw edema. *Indian J Physiol Pharmacol* 21:399-400.
- Bianchi E, Girardi F, Díaz F, Sandoval R, Gonzales M. 1963. Components of the leaves and fruit of *Cestrum parqui*: tigogenin, digallogenin, digitogenin and ursolic acid. *Ann Chim* 53:1761-78.
- Buisson B, Bertrand D. 2002. Nicotine addiction: the possible role of functional upregulation *Trends Pharmacol Sci* 23:130-136.
- Buznego MT, Cuba A, Garriga E, Cuéllar A, Pérez-Saad H. 2005a. Efecto de los extractos de cloroformo y tolueno de *Cestrum nocturnum* L. sobre la conducta exploratoria y pruebas de analgesia. *Rev Cub Plant Med.* 10 (2):1-8.
- Buznego MT, Cuba A, Garriga E, Cuéllar A, Pérez-Saad, H. 2005b. Efecto de los extractos acuoso y etanólico de *Cestrum nocturnum* L. sobre la conducta exploratoria y pruebas de analgesia *Rev Cubana Plant* 10 (2):1-9.
- Campbell D, Richter W. 1967. An observational method estimating toxicity and drug actions in mice applied to 68 reference drugs. *Acta Pharmac Toxicol* 25:345-363.
- Catalan CAN, Tomasini SP. 1992. Triterpenoids and sterols from *Cestrum kunthii*. *Fitoterapia* 63:551-555.
- Chennaiah S, Qadri SSSHC, Reddy VK, Rama Rao SV, Shyamsunder G, Raghuramulu N. 2007. Incorporation of *Cestrum diurnum* leaf improves intestinal Ca^{+2} transport in broilers. *J Steroid Biochem Mol Biol* 103:645-650.
- Ciangherotti C, Buitrago D, Morales A. 2004. Estudio de los componentes químicos de las hojas y tallos de *Cestrum buxifolium* Kunth. *Rev Fac Far* 46:31-33.
- Dalvi R, Bowie W. 1983. Toxicology of solanine: an overview. *Vet Hum Toxicol.* 25:13-15.
- Davies O, Raventos J, Walpole L. 1946. A method for the evaluation of analgesic activity using rats. *Bri J Pharmacol* 1:255-256.
- De Feo V. 1992. Medicinal and magical plants in the northern Peruvian Andes. *Fitoterapia* 63: 417-440.
- Gepdiremen A, Mshvildadze V, Süleyman H, Elías R. 2007. Steroidal saponins from *Smilax china* and their anti-inflammatory activities. *Phytochemistry* 68:623-630.
- Grunberg NE. 2007. A neurobiological basis for nicotine withdrawal. *Proc Natl Acad Sci USA.* 104:17901-17902.

- Halpern JH. 2004. Hallucinogens and dissociative agents naturally growing in the United States. *Pharmacol Therap.* 103: 131-138.
- Hammond GB, Fernández ID, Villegas LF, Vaisberg AJ. 1998. A survey of traditional medicinal plants from the Callejón de Huaylas, Department of Ancash, Perú. *J Ethnopharmacol* 61:17-30.
- Hunziker A. 1976. South American Solanaceae: A Sinoptic Survey. En: *The Biology and Taxonomy of the Solanaceae*. Editor: Hawkes, J. Eds: Linnean Society Symposium, Serie N°7. Academic Press. New York, pp. 49-85.
- Irwin S. 1962. Drug screening and evaluative procedures. *Science.* 136:123-128.
- Jáuregui D, Ríos N, Benítez de RC. 2001. Estudios anatómicos foliares en Solanaceae de Venezuela. *Anatomía foliar de diez especies de Cestrum L.* *Acta Cient Venezol* 52:248-260.
- Khalil AA, Steyn S, Castagnoli N Jr. 2000. Isolation and characterization of a monoamine oxidase inhibitor from tobacco leaves. *Chem Res Toxicol.* 13:31-5.
- Kim SY, Son KH, Chang HW, Kang SS, Kim HP. 1999. Inhibition of mouse ear edema by steroidal and triterpenoid saponins. *Arch Pharm Res.* 22:313-6.
- Litchfield J, Wilcoxon F. 1949. A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *J Pharmacol Exp Therap* 96:99-113.
- McLennan MW, Kelly WR. 1984. *Cestrum parqui* (green cestrum) poisoning in cattle. *Austral Veter J* 61: 289-91.
- Mimaki Y, Watanabe K, Ando Y, Sakuma C, Sashida Y, Furuya S, Sakagami H. 2001. Flavonol glycosides and steroidal saponins from the leaves of *Cestrum nocturnum* and their cytotoxicity. *J Nat Prod.* 64(1): 17-22.
- Moharram FA, El-Shenawy SM. 2007. Antinociceptive and anti-inflammatory steroidal saponins from *Dracaena ombet*. *Planta Med* 73(10):1101-6.
- Pastorello M, Ciangherotti C, Colman T, Amesty A, Buitrago D, Israel A. 2007. Actividad antiinflamatoria del ácido epi-ursólico y docking a la fosfolipasa A₂. *Rev Fac Far* 70: 47-52.
- Pearce CM, Skelton NJ, Naylor S, Kanaan R, Kelland J, Oelrichs P, Sanders JKM, Williams DH. 1992. Parquin and carboxyparquin, toxic kaurene glycosides from the shrub *Cestrum parqui*. *J Chem Soc Perkin Trans.* 1:593-600.
- Pérez-Saad H, Buznego MT. 2008. Behavioral and antiepileptic effects of acute administration of the extract of the plant *Cestrum nocturnum* Lin (lady of the night). *Epilepsy Behav* 12(3):366-372.
- Picciotto MR, Caldarone BJ, King SL y Zachariou V. 2000. Nicotinic Receptors in the Brain: Links between molecular biology and behavioural Neuropsychopharmacol. 22(5):451-465.
- Prema TP, Raghuramulu N. 1994. Free Vitamin D₃. Metabolites in *Cestrum diurnum* Leaves. *Phytochemistry* 37(3): 677-681.
- Recio M, Giner R, Mañes S, Ríos L. 1995a. Structural requirements for the anti-inflammatory activity of natural triterpenoids. *Planta Med* 61:182-5.
- Recio M, Giner R, Mañes S, Ríos L. 1995b. Investigations on the steroidal anti-inflammatory activity of triterpenoids from *Diospyros leucomelas*. *Planta Med* 61:9-12.
- Rojas R, Bustamante B, Bauer J, Fernandez I, Alban J y Lock O. 2003. Antimicrobial activity of selected Peruvian medicinal plants. *J Ethnopharmacol* 88: 199-204.
- Safayhi H, Sailer ER. 1997. Anti-inflammatory actions of pentacyclic triterpenes. *Planta Med* 63:487-93.
- Shehnaz D, Hamid F, Baqai FT, Ahmed VU. 1999. Effect of crude extract of *Cestrum parqui* on carageenin induced rat paw edema and aggregation of human blood platelets. *Phytother Res* 13(5): 445-7.
- Van der Lugt JJ, Nel PW, Kitching PH. 1991. The pathology of *Cestrum laevigatum* (Schlechtld.) poisoning in cattle. *Onderstepoort J Veteri Res* 58(3): 211-221.
- Wasserman R, Corradino R, Krook L, Hughes M, Haussler M. 1976. Studies on the 1a, 25-dihidroxycholecalciferol activity in a calcinogenic plant, *Cestrum diurnum*, in the chick. *J Nutrition* 106: 457-465.
- Winter A, Risley E, Nuss G. 1962. Carrageenin-induced Edema in Hind paw as an Assay for Anti-inflammatory Drugs. *Proc Soc Exp Biol.* 111:554-547.

Jahonin and asimicin acetogenins from *Annona jahnii* (Annonaceae)

Jahonin y Asimicin Acetogenins de *Annona jahnii* (Annonaceae)

Trina Colman-Saizarbitoria¹, Ángel Amesty¹,
María I Amaro¹, Mary I Cordero y Ali Bahsas²

Resumen

Una nueva acetogernina citotóxica, Jahonin (**1**) y la llamada asimicin (**2**) fueron aisladas a partir de las ramas de *Annona jahnii* Saff. (Annonaceae) usando fraccionamiento dirigido por ensayos de letalidad sobre camaroncitos de salina. **1** representa una acetogernina del tipo C-35, con ausencia de anillos de tetrahidrofurano (THF) y de epóxido, con un grupo ceto en C-10 y con un doble enlace, separado por dos metilenos de un diol vecinal. La estructura y la configuración relativa del diol vecinal en **1**, fueron establecidas mediante ¹H-RMN, ¹³C-RMN, COSY, HMBC, HMQC y mediante un derivado químico. El acetónido derivado (**3**) fue preparado a partir del compuesto **1**, por reacción de **1** con una mezcla de HCl-acetona. Jahonin (**1**) mostró citotoxicidad frente a tres líneas de células tumorales humanas mediante un ensayo MTT de 24 h (Fadu, Hep-2, SVKO3 y HeLa).

Palabras clave: *Annona jahnii*; jahonin; acetogernin; citotoxicidad.

Abstract

A new cytotoxic Annonaceous acetogenin, jahonin (**1**) and asimicin (**2**), were isolated from the twigs of *Annona jahnii* Saff. (Annonaceae) by bioactivity-directed fractionation using lethality to brine shrimp. The known acetogenin, asimicin (**2**) is the first time has been reported from this species. **1** represents an unusual type of C-35 Annonaceous acetogenin, lacking either tetrahydrofuran (THF) or epoxide rings, bearing a keto group at C-10, and possessing a double bond located two methylenes away from a vicinal diol. The structure and relative configuration of vicinal diol in **1** were elucidated by ¹H and ¹³C-NMR, COSY, HMBC, HMQC and from chemical derivatives. The acetone derivative (**3**) was prepared from **1** by reactions with HCl-acetone mixture. Jahonin (**1**) showed cytotoxicities, among three human solid tumor cell lines in our 24 h MTT human solid tumor panel (Fadu, SVKO3, and Hep-2 and HeLa).

Key words: *Annona jahnii*; jahonin; acetogenin; cytotoxicity.

Introduction

Annonaceous acetogenins are bioactive plant secondary metabolites found only in several genera of the Annonaceae family. They are a unique class of long-chain fatty acids derivatives with potent *in vivo* and *in vitro* anticancer, apoptotic, pesticidal antimicrobial, antimalarial, antileishmanial activities (Bermejo, 2005; Zeng, 1996; Raynaud-LeGrandic, 2004; Chiu, 2003; Motoyama, 2002). Most of the 350 acetogenins, until now reported, contain a α - β -unsaturated γ -lactone ring and a mono or bis tetrahydrofuran

(THF) core. Only few of them lack the THF ring (Zeng, 1996; Bermejo, 2005).

Annonaceous acetogenins are powerful inhibitors of glutamate-dependent mitochondrial respiration, in both mammalian and insect systems, where they inhibit mitochondrial NADH: CoQ oxidoreductase activity (Zeng, 1996; Motoyama, 2002; Bermejo, 2005; Barrachina, 2007; Cavé, 1997); they also are powerful inhibitors of the plasma membrane NADH oxidase of tumor cells (Murai, 2006; Morrè, 1995). They show selectivity for tumorous vs. normal cell

¹ Laboratorio de Bioensayos y Productos Naturales. Facultad de Farmacia. Universidad Central de Venezuela. Fax: 58-212-6052707. colmant@camelot.rect.ucv.ve Apartado de Correos 40109. Caracas, Venezuela.² Laboratorio de RMN. Facultad de Ciencias. U.L.A.

(Oberlies, 1995); and they are equally effective against multidrug resistant tumor cells (Oberlies, 1997, (Oberlies, 1997).

The twigs of *Annona jahnii* Saff. (Annonaceae), collected in the state of Monagas (Venezuela), using brine shrimp lethality (BST)-directed fractionation (Meyer, 1982) of the ethanol extract, have yielded a new linear acetogenin jahonin (**1**) and the known acetogenin, asimicin; this is the first time that asimicin has been reported from this species. We already have reported the isolation of annojahnin (Colman-Saizarbitoria, 1998), annodienin and janhnonacin (Colman-Saizarbitoria, 1999) from the same species. Others linear acetogenins have been recently isolated (Liw, 2005) Jahonin (**1**) is a new keto-acetogenin with a double bond and with neither a tetrahydrofuran (THF) nor an epoxide rings are present.

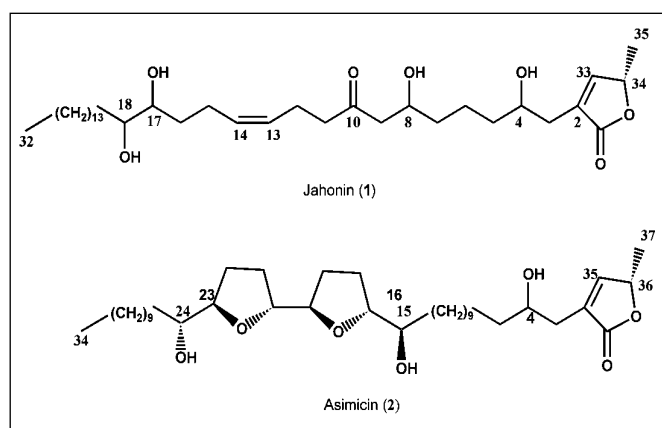


Figure 1. Structures of Jahonin (**1**) and Asimicin (**2**)

Materials and Methods

PLANT MATERIAL

Twigs of *Annona jahnii* Saff. Were collected in state Monagas of Venezuela, and authenticated by Professor Stephen Tillet at the Herbario Ovalles, Universidad Central de Venezuela, where a voucher specimen of twigs is deposited.

CELL LINES

The Human larynx carcinoma (Hep-2), Human pharynx carcinoma (Fadu), human ovary carcinoma (SVKO3), Human fibroblast and Human uterus carcinoma (HeLa) lines cells were grown in monolayer culture in Minimum Essential Medium (MEM) complemented with the addition of 10% of bovine fetal serum and 1% of a mixture (1:1) of penicillin/streptomycin. Medium was changed every 2 days and the cells cultivated at 37 °C, in a humidified atmosphere containing 5% of CO₂.

GENERAL PROCEDURES

Melting points were determined on a Mel-Temp apparatus and are uncorrected. IR spectra (film) were recorded on a Perkin-Elmer 1420 spectrometer. UV spectra were taken on a Beckman DU-7. ¹H-NMR and ¹³C-NMR spectra were recorded in CDCl₃ solutions in a Bruker AV-400 MHz. The mass spectra were taken at 70 eV (probe) in a Shimadzu QP-2000, and in a VARIAN Saturn 2000. Silica Gel (200-300 mesh) was used for Column chromatography (CC) and silica HF-254 for TLC. Spots were detected on TLC by heating after spraying with 5% phosphomolybdic acid in EtOH.

PRODUCTS, EXTRACTION AND ISOLATION.

The pulverized twigs (4.0 kg) were extracted with EtOH in a soxhlet for 24 h, and partitioned, as described above, to obtain FOO5. The bioactive (BST LC₅₀ 194 ppm) (Meyer, 1982) residue of FOO5 (60 g) was subjected to column chromatography over silica gel (2 kg) eluted with a gradient of hexane-EtOAc-MeOH. Fractions (F₁-1 to F₁-92) were combined based on TLC analysis. The active pool P6 (F₁-8 - F₁-15) (4 g, BST LC₅₀ 23 ppm) (Meyer, 1982) was further resolved on another silica gel (160 g) column, eluted with 33% of acetone in hexane and re-chromatographed on reverse phase column eluted with MeOH: H₂O (gradient) to afford compounds **1** and asimicin (**2**) (Rupprecht, 1989).

The vicinal diol structure and relative configuration in **1**, where established by ¹H-RMN, ¹³C-RMN, COSY, HMBC, HMQC and a chemical derivative. The acetonido derived **3** was a result of the reaction of compound **1** with HCl-acetona mixture.

Jahonin (1): White waxy solid (17 mg); mp: 70-72 °C; UV (1 max, MeOH, nm): 220, log e 3.31; IR (film) cm⁻¹: 3360, 2918, 2897, 1737, 1703, 1648, 1467, 1282, 1199, 669. CIMS m/z (MH)⁺ 595 (50%), EIMS m/z M⁺ 594 (15%) and fragmentation (figure 2); HREIMS m/z 594.450008 (MH)⁺ (calcd 594.449555 for C₃₅H₆₂O₇). ¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz δ ppm). 2.35 (ddd, 1H, H_{3a} J: 15; 3.3; 1.1 Hz), 2.21 (ddd, 1H, H_{3b} J: 15; 8.6; 1.1 Hz), 3.83 (m, H₄), 1.49 (m, H₅), 1.22-1.54 (m H₆, H₇), 3.55 (m, H₈), 2.4(m, H₉), 2.38 (m, 1H, H₁₁), 2.39 (m, 1H, H₁₂), 5.35 (ddd, 1H, H₁₃ J: 11.0; 7.0; 6.4 Hz), 5.34 (ddd, 1H, H₁₄ J: 11.0; 7.0; 6.5 Hz), 2.25(m, 1H, H₁₅), 1.5 (m, 1H, H₁₆), 3.45 (m, 1H, H₁₇), 3.45 (m, 1H, H₁₈), 1.22-1.74 (m, 1H, H₁₉), 1.22-1.74 (m, 2H, H₂₀ and H₃₀), 0.90 (t, 1H, H₃₂ J: 7.0), 7.12 (q, 1H, H₃₃), 4.96 (qd 1H, H₃₄) H-34, 1.39 (d, 1H, H₃₅, J: 7.0 Hz).

¹³C-NMR (CDCl₃; 125 MHz, δ ppm): 175(C-1), 130.9 (C-2), 31.9 (C-3), 69.9 (C-4), 37.4 (C-5), 25.7-

32.0 (C-6-C-7), 75.5(C-8), 209(C-10), 128.8(C-13), 130.6(C-14), 74.3 (C-17), 74.1 (C-18), 33.4-33.5 (C-19), 25.5-32.0 (C-20-C-30), 22.7 (C-31), 14.2 (C-32), 151.1 (C-33), 78.0 (C-34), 19.2 (C-35).

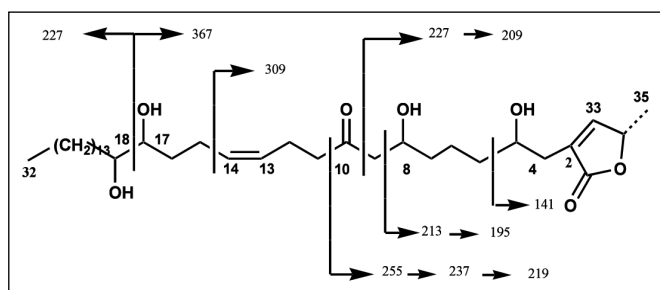


Figure 2. Diagnostic eims fragmentation ions of Jahonin (1).

Asimicin (2): White waxy solid (8 mg); CIMS m/z $(MH)^+$ 622 (50%), $C_{37}H_{66}O_7$. IR (film) cm^{-1} : 3425, 2920, 2837, 1737, 2643, 1455, 1314, 1073, 667. 1H -NMR ($CDCl_3$, 400 MHz, δ ppm): 2.53 (m, 1H, H_{3a}), 2.40 (m, 1H, H_{3b}), 3.86 (m, 1H, H_4), 1.49 (m, 1H, H_5), 1.22-1.74 (m, 2H, H_6 and H_{13}), 1.41 (m, 1H, H_{14}), 3.39 (m, 1H, H_{15}), 3.86 (m, 1H, H_{16}), 1.65 and 1.98 (m, 2H, H_{17} and H_{18}), 3.86 (m, 1H, H_{19}), 3.86 (m, 1H, H_{20}), 1.65 and 1.98 (m, 2H, H_{21} and H_{22}), 3.85 (m, 1H, H_{23}), 3.39 (m, 1H, H_{24}), 1.22-1.74 (m, 2H, H_{25} and H_{33}), 0.88 (t, 1H, H_{34}), 7.19 (q, 1H, H_{35}), 5.06 (qd, 1H, H_{36}), 1.44 (d, 1H, H_{37}); ^{13}C -NMR ($CDCl_3$; 125 MHz, δ ppm): 174.6 (C-1), 131.0 (C-2), 33.4 (C-3), 69.9 (C-4), 37.4 (C-5), 25.7 (C-6), 29.7-29.3 (C-7-C-13); 33.4 (C-14), 74.0 (C-15), 83.1 (C-16), 28.4 (C-17), 29.0 (C-18), 81.8 (C-19), 81.8 (C-20), 28.8 (C-21, C-22), 83.1 (C-23), 74.0 (C-24), 33.4 (C-25), 25.6 (C-26), 29.3-29.7 (C-27-C-33), 14.1 (C-34), 151.7 (C-35), 78.0 (C-36), 19.1 (C-37).

Acetonide derivative 3. To **1** (1.5 mg) was added 0.5 ml of HCl-acetone (0.7 mg HCl in 1 ml acetone), and the solution was left overnight; the mixture was then dried at rt in vacuum (Colman-Sazarbitoria, 1999) to yield compound **3**. 1H -NMR ($CDCl_3$, 500 MHz, δ ppm): 2.54 (dddd, 1H, H_{3a} , J : 15; 3.3; 1.1 Hz), 2.40 (dddd, 1H, H_{3b} , J : 15; 8.6; 1.1 Hz), 3.5 (m, H_4), 1.49 (m, 1H, H_5), 1.22-1.54 (m, 2H, H_6 , H_7), 3.55 (m, 1H, H_8), 2.4 (m, 2H, H_9 and H_{11}), 2.15 (m, 1H, H_{12}), 5.34 (ddd, 1H, H_{13} J : 11.0; 7.0; 6.5), 2.25 (m, 1H, H_{15}), 3.62 (m, 1H, H_{17}), 3.58 (m, 1H, H_{18}), 0.90 (t, 1H, H_{32} , J : 7.0), 7.12 (q, 1H, H_{33}), 4.96 (qd, 1H, H_{34}), 1.39 (d, 1H, J : 7.0) and acetyl methyl protons 1.375 and 1.382 ppm.

Bioassays

The cytotoxicity was determined by dye reduction assay, 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl

tetrazolium bromide (MTT). Cells were seeded at 5×10^3 cells per well in MEM, complemented with 10% of bovine fetal serum, 1% of a penicillin/streptomycin mixture. Following a 48 h incubation period, at $37^\circ C$ and 5% CO_2 , for all the cells, the culture medium was changed and the cells were treated with extract at 10, 100 and 1000 mg/ml. After 24 hours incubation, medium was replaced by the one containing 100 μ l MTT (2 mg/ml) in phosphate buffer (PBS) and pH 7.2. The cells were incubated for another 4 h and then, the medium was removed and the formazan crystals (Colored fiber mesh is characteristic of the presence of living cells) were dissolved in DMSO. After 30 minutes absorbance at 570 nm was measured using Micro-plate Reader. Results were expressed as a percentage of viable cells compared with control (unexposed cells) (Denizot, 1986; Mosmann, 1983).

The cytotoxicities of the Jahonin (**1**) (BST LC_{50} 23) (Meyer, 1982) are summarized in Table I. Jahonin (**1**) showed cytotoxicities against the four human tumor cells lines in 24 h MTT human solid tumor panel.

Results and Discussion

The dried twigs were extracted with ethanol. The ethanol residue (FOO1) was partitioned between water (FOO2) and chloroform (FOO3), and the residue of FOO3 was partitioned between hexane (FOO6) and 10% water in methanol (FOO5). The most bioactive extract, as tested by the BST (Meyer, 1982), was the residue of FOO5 (LC_{50} = 194 ppm). FOO5 was submitted to successive fractionations by CC normal and reverse phase and preparative TLC, directed by the BST assay (Meyer, 1982), to yield two compounds, jahonin (**1**) (Figure 1) and asimicin (**2**); the latter was identified by IR, MS, 1H and ^{13}C data analysis and by comparison with those reported (Rupprecht., 1989). Jahonin (**1**) was isolated as a waxy solid with MP $70-72^\circ C$. The CIMS of **1** gave an MH^+ at 595, and EIMS an M^+ 594. The molecular formula was established to be $C_{35}H_{62}O_7$ on the basis of HREIMS and CIMS and RMN spectroscopy.

The existence of four OH groups in compound **1** was indicated by an IR OH absorption at 3360 cm^{-1} and four successive losses of H_2O (m/z) from the MH^+ in the CIMS and EIMS. As with most other acetogenins, the presence of a methyl substituted α , β -unsaturated γ -lactone was suggested by the IR (ν_{max} 1737 cm^{-1}), UV (ν_{max} 218 nm), and the corresponding resonances (δ) in the 1H and ^{13}C -NMR spectra: 1H -RMN at δ 7.12 ppm, q (H_{33}), 4.96 ppm, dq (H_{34}), 1.39 ppm (H_{35}), 2.35 ppm, dd and 2.00

Table I
Bioactivity of Extract F005 of the seeds of *Annona jahnii*

| Fraction | BST ^a DE ₅₀ g/ml | Hep-2 ^b LC ₅₀ ppm | SVKO3 ^b LC ₅₀ ppm | Fadu ^b LC ₅₀ ppm | HELA LC ₅₀ ppm | Fibroblastos ^b LC ₅₀ ppm |
|----------|--|---|---|--|---------------------------------|--|
| (1) | 11.45 | < 40 | <20 | <20 | <40 | 66.80 |

^aBrine shrimp lethality (Meyer, 1982). ^bCytotoxicities (Denizot, 1986; Mosmann, 1983) in human larynx carcinoma (Hep-2), Human pharynx carcinoma (Fadu), human ovary carcinoma (SVKO3), Human uterus carcinoma (HeLa) lines cells and human fibroblast.

ppm, dd (H-3a) and 3b) and 3.83 ppm, m (H-4), and carbons resonances at δ 175 ppm (C-1), 151.1 ppm (C-33), 130.9 ppm (C-2), 78.0 ppm (C-34), 19.2 ppm (C-35), γ 69.9 ppm (C-4). Two olefinic protons, coupled to each other, were discerned in the ¹H-NMR spectrum at δ 5.35 ppm (ddd, J=11.0; 7.0; 6.4 Hz) and 5.34 ppm (ddd, J=11.0; 7.0; 6.4 Hz), suggesting the presence of an isolated *cis*-double bond; this group was further confirmed by two carbon resonances at δ 130.6 ppm and 128.8 ppm. The position of the double bond was determined by the EIMS fragmentation (Figure 2) and from the COSY and HMBC spectra, to be at C-13 and C-14. The COSY spectrum of **1** showed coupling correlation of H-13, H-14, H-12, and H-11. HMBC correlation cross peaks between H-17 (δ 3.45)/ C-15 (δ 27.3), H-16 (δ 1.5); C-16 (δ 33.5)/ C-18 (74.1), H-15 (δ 2.3 C-13 (δ 128.8) and C-17 (74.3), also cross peaks between C-10 (δ 209)/ H-11 (δ 2.40); C-11 (δ 42.7 ppm)/H-13 (δ 5.34 ppm); H-11 (δ 1.50 ppm)/ C13 (δ 128.8 ppm) were clearly shown in the spectrum. Examination of the ¹H-¹H COSY spectrum revealed that the double bond and vicinal diol moieties are separated by two methylene units, and double bond and keto group are separated by two methylene units.

Analyses of the EIMS fragmentation of compound **1** demonstrated that the four OH groups were located at C-4, C-8, C-17 and C-18 as shown in Figure 2. The presence of the vicinal diol moiety (C-17/18) was also evidenced in the ¹H and ¹³C-NMR spectra by a proton signal at δ 3.49 ppm for two carbinol methine protons and signals for two oxygenated carbons at δ 74.3 ppm and 74.1 ppm, similar to others linear acetogenins with vicinal diol (Liaw, 2005). To determine the relative configuration at C-17/18 of the vicinal diol, the acetonide derivative (**2**) was prepared (Figure 1). The ¹H-NMR signals for H-17 and H-18 at δ 3.49 ppm and the signals for the acetyl methyl protons, showing two separate singlet peaks at δ 1.375 ppm and 1.382 ppm, suggested the *trans* assignment for

the dioxolane ring; the methyl protons of *cis* dioxolane rings show two singlet peaks, at δ 1.43 ppm and 1.33 ppm, and the methine protons are at δ 3.62 ppm and δ 3.58 ppm (Colman-Saizarbitoria, 1999); thus, the configuration of the diol was determined to be *threo*, since the *trans* configuration at C-17/18 in **2** could only be derived from a vicinal diol with a *threo* configuration (Colman-Saizarbitoria, 1999).

The presence of an additional carbonyl signal at 1703 cm⁻¹ in the IR spectrum suggested that compound **1** is a keto-acetogenin compound. The ¹H-NMR data also suggested the location of the keto group at C-10 since two additional two-proton triplets (J=7.5 Hz) are shown in the spectrum of **1**, at δ 2.38 ppm and 2.39 ppm, consistent with two methylene groups at C-9 and C-11, flanking the keto group. The location of the keto group was then clearly confirmed on the basis of EIMS fragmentation (Figure 3).

The cytotoxicities of the fraction P6 (BST LC₅₀ 23) (Meyer, 1982) are summarized in Table I. P6 showed cytotoxicities against the four human tumor cell lines in 24 h MTT human solid tumor panel.

Conclusion

A new cytotoxic against the four human tumor cell lines in 24 h Annonaceous acetogenin, jahonin (**1**) and asimicin (**2**), were isolated from the twigs of *Annona jahnii* (Annonaceae). The structure and relative configuration of vicinal diol in **1** were elucidated by spectroscopy methods and chemical derivative type acetonide (**3**).

Acknowledgments

This investigation was supported, in part, by SECAB-CYTED 2003-EP0358 and CONICIT project S1-95000495, CDCH 06.00.6994.2007. Thanks are expressed to Dr. S. Tillett for the identification of the plant material.

References

- Bermejo A, Figadere B, Zafra-Polo MC, Barrachina I, Estornell E, Cortes D. 2005. Acetogenins from annonaceous: recent progress in isolation, synthesis and mechanisms of action. *Nat Prod Rep* 22:269-303.
- Colman-Sazarbitoria T, Johnson H, Alali FQ, Hopp DC, Roberts LL, McLaughlin J. 1998. Annojahnin from *Annona Jahnnii*: a possible precursor of mono-Tetrahydrofuran Acetogenins. *Phytochemistry* 49:1609-1616.
- Colman-Sazarbitoria T, Liu X, Hopp C, Johnson H, Alali FQ, Rogers LL, McLaughlin J. 1999. Annondienin and Jahnnonacin new bioactive nontetrahydrofuran Annonaceous Acetogenins from the twigs of *Annona Jahnnii*. *Nat Prod Letters* 14:65-75.
- Denizot F, Lang R. 1986. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. *J. Immunol. Methods* 89:271-275.
- Glye C, Raynaud S, Fourneaus C, Laurens A, Lprévote O, Serani L, Fournet A, Hocquemiller R. 2000. Cohibin C and D, two important metabolites In the biogenesis of Acetogenins From *Annona Muricata* and *Annona Nutans*. *J Nat Prod* 63:1192-1196.
- Hui-Fen Chiu H-F, Tsai-Tung Chih, Yun-Mei Hsian, Chih-Hua Tseng, Ming-Jung Wu, Yang-Chang Wu. 2003. Bullatacin a potent antitumor Annonaceous acetogenin, induces apoptosis through a reduction of intracellular camp and cGMP levels in human hepatoma 2.2.15 Cells. *Biochem Pharmacol.* 65:319-327.
- Ichimaru N, Abe M, Murai M, Senoh M, Nishioka T, Miyoshi H. 2006. Function of the side chains of D-lac-acetogenin in the inhibitory effect on mitochondrial complex I (NADH-Ubiquinone Oxidoreductase). *Biorg Med Chem* 16: 3555-3558.
- Liaw C-C, Chang F-R, Chen S-L, Wu C-C, Lee K-H, Wu Y-C. 2006. Novel Cytotoxic Monotetrahydrofuranic Acetogenins from *Annona Montana*. *Biorg Med Chem* 13: 4767-4776.
- Meyer BN, Ferrigni NR, Putnam JE, Jacobsen LB, Nichols DE, McLaughlin JL. 1982. Brine shrimp: convenient general bioassay for active constituents. *Planta Medica* 45: 31-34.
- Morré DJ, De Cabo R, Farley C, Oberlies NH, McLaughlin JL. 1995. Mode of action of bullatacin, a potent antitumor acetogenin: Inhibition of NADH oxidase of HeLa and HL-60, but not liver, plasma membranes. *Life Sci* 56: 343-347.
- Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65:55-59.
- Motoyama T, Yabunaka H, Miyoshi H. 2002. Essential Structural Factors Of Acetogenin, Potent inhibitors of mitochondrial tumor cell growth inhibition by several Annonaceous Acetogenins in an *in vitro* disk diffusion assay complex I. *Biorg Med Chem* 12: 2089-2092.
- Murai M, Ichimaru N, Abe M, Nishioka T, Miyoshi H. 2006. Mode of inhibitory action of D-lac-Acetogenin, a new class of inhibitors of bovine heart mitochondria complex I. *Biochemistry* 45:9778-9787.
- Oberlies NH, Jones JL, Corbett TH, Fotopoulos SS, McLaughlin JL. 1995. Tumor cell growth inhibition by several Annonaceous acetogenins in an *in vitro* disk diffusion assay. *Cancer Letters* 96: 55-58.
- Oberlies NH, Croy VL, Harrison M L, McLaughlin JL. 1997. The Annonaceous acetogenin bullatacin is cytotoxic against multidrug-resistant human mammary adenocarcinoma cells. *Cancer Letters* 115: 73-79.
- Oberlies NH, Chang C-J, McLaughlin JL. 1997. Structure-activity relationships of diverse Annonaceous acetogenins against multidrug resistant human mammary Adenocarcinoma (MCF-7/Adr) cells. *J Med Chem* 40: 2102-2108.
- Raynaud-LeGrandic S, Foureau C, Laurens A, Bories C, Hocquemiller R, Loiseau PM. 2004. *In vitro* antileishmanial activity of Acetogenins from Annonaceae. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 58: 388-392.
- Royo B, Baldoni H, Chaboune N, Uvire F, Depedro N, Zafra-Polo C, Bermejo A, El Aoud N, Cabedo N, Saez J, Toño J, Enriz RD, Cortes D. 2007. New antitumoral Acetogenin «Guanacone Type» derivatives: isolation and bioactivity. molecular dynamics simulation of diacety-guanacone. *Biorg Med Chem* 15: 4369-4381.
- Rupprecht J, Chang C, Cassady J, McLaughlin J, Mickolajczak K, Weisleder D. 1989. Asimicin a new cytotoxic and pesticidal acetogenin from the pawpaw. *Asimina triloba* (Annonaceae). *Tetrahedron* 45: 6941-6946.
- Zeng L, Ye Q, Oberlies NH, Shi G, Gu Z-M, He K, McLaughlin J. 1996. Recent advances in annonaceous Acetogenins. *J Nat Prod Rep.* 13: 275-280.

ÍNDICE DE DESCRIPTORES

Vol. 71 - Nº 1 - 2008

Acetogenina
Actividad antioxidante
Analgésia
Angiotensina II
Annona jahnii
Antimalárica
Brosimum utile
Cestrum buxifolium
Citotoxicidad
4-cloroquinolina
Efectividad antimicrobiana
Esterilidad
Flavonoides
GMPc
 β -hematina
Inflamación
Jahonin
Methocel
Péptido natriurético auricular
Pirógenos
Podocalyx loranthoides
Protium neglectum
Receptor AT₂
Reología
Síntesis
Toxicidad aguda
Viscosidad

ÍNDICE DE AUTORES

Vol. 71 - Nº 1 - 2008

A

Amaro M I
Amesty A
Andueza I
Atencio R
Attias D
Ávila G

B

Bahsas A
Bou Rached L
Buitrago Di
Buonanno MJ

C

Camacho J
Carvajal A
Charris J
Ciangherotti C
Colman-Saizarbitoria T
Cordero MI

D

De Castro N

G

Gamboa N
Garrido MR
Gómez-Barrios JV
González T

I

Israel A

L

Lobo G

M

Matos MG

P

Padilla AFC
Pastorello M

R

Rincón M
Rodrigues J

S

Salazar-Bookaman M
Suárez A

Y

Yves Blache J

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 diskette 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.



CDCH-UCV
1958 - 2008

50 AÑOS

fomentando, financiando
y promocionando
la investigación, la formación
de recursos humanos
y la difusión
del quehacer científico

PUBLICACIONES 2007

Alvar, Yara
LA PESTIFICACIÓN POPULAR Y LA REPRODUCCIÓN DE LA DIVERSIDAD
(2.ª Edición)

Armas, Nelly y Lidia Gómez Ochoa
POBLADOS AUTÓNTICOS Y TRANSICIÓN POLÍTICA EN VENEZUELA 1974-2002
Coedición con el CENDES

Banco, Carlos Eduardo
EN RESERVA: DESOLUCIÓN Y CONOCIMIENTO EN LA INVESTIGACIÓN EDUCATIVA
Coedición con el Viceministerio Académico

Cabrero Almazán, Aitor
VENEZUELA Y EL PROBLEMA DE SU IDENTIDAD ARQUITECTÓNICA
Coedición con la Facultad de Arquitectura y Urbanismo

Carvajal, Miguel
EL MÉTODO DE LOS ELEMENTOS FINITOS PARA INGENIERÍA Y CIENCIAS APLICADAS

Espinoza, Miriam
**LA ENFERMEDAD ORIENTADA EN EL DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO
DE LAS COMPLICACIONES LOCALES EN CIRUGÍA BUCAL**

Pacheco, José Gerardo
**AGRICULTURA, MODERNIZACIÓN Y CIENCIAS AGRÍCOLAS EN VENEZUELA
DE LA ILUSTRACIÓN EUROPEA A LOS ILUSTRADOS DEL GOBIERNO 1774-1834**

Parícuti, Francisco
LAS ECONOMÍAS DE OPCIÓN COMO INSTRUMENTOS DE CONTROL DE RIESGO FISCAL

Nuestro publicaciones pueden ser adquiridas en el Departamento de Ediciones y Publicaciones
del Consejo de Desarrollo Científico y Humano, UCV,
Urb. La As. Principal de La Florida, Quesada 2164, La Florida, Caracas.
Teléfono: 294.8448 (Dirección) 294.7877 - 294.7566
Fax: Ext. 344
E-mail: publico@ucv.ve

Igualmente, están a la venta en la Biblioteca Central PB, Ciudad Universitaria, UCV.

Toda la información referente al Programa de Publicaciones puede ser consultada en www.cdch-ucv.org.ve



REVISTA FACULTAD DE FARMACIA N° 71-1

Se imprimió en los talleres tipográficos de Miguel Ángel García e Hijo, s.r.l.
en la Ciudad de Caracas
Sur 15 • N° 107 - El Conde • Teléfono: 576.13.62

Tiraje: 500 ejemplares