

Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos

PLECTRANTHUS AMBOINICUS (LOUR.) SPRENG (ORÉGANO FRANCÉS). ESTUDIO TOXICOGENÉTICO DE UN EXTRACTO FLUIDO Y DEL ACEITE ESENCIAL

Lic. Angel Vizoso Parra,¹ Lic. Alberto Ramos Ruiz,² Aymee Edreira Armenteros,³ Dr. José Betancourt Badell⁴ y Dra. Mercedes Décalo Michelená⁵

RESUMEN

Se emplearon 2 sistemas de ensayo de genotoxicidad, uno *in vitro*, la prueba de segregación somática en el hongo diploide *Aspergillus nidulans* D-30, se evaluó el posible efecto genotóxico de un extracto fluido y el aceite esencial del *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng (orégano francés) y el ensayo *in vivo* de inducción de micronúcleos en médula ósea de ratón para evaluar la acción clastogénica o aneugénica del extracto fluido de orégano francés. Las concentraciones ensayadas en el ensayo *in vitro* para el extracto fluido y del aceite esencial fueron de 0,323 a 1,292 mg de sólidos totales/mL y de 0,01 a 0,1 % v/v, respectivamente. En el ensayo *in vivo* para el extracto fluido, se probaron dosis de 193,50 a 773,20 mg/kg de peso corporal (pc). El extracto fluido de orégano francés y el aceite esencial presentaron una acción citotóxica y genotóxica significativa dosis-dependiente en el ensayo de segregación somática frente al hongo *Aspergillus nidulans* D-30, no evidenciándose este efecto en el ensayo de inducción de micronúcleos en médula ósea de ratón para el extracto fluido de *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng.

SUMMARY

We used 2 genotoxic trial systems, one *in vitro*, somatic segregation test in diploid D-30 *Aspergillus nidulans*, to assess potential effect of a fluid extract, and the essential oil from *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng (orégano francés), and the *in vitro* one, micronuclei-induction trial, in mouse bone marrow, to assess clastogenic or aneugenic action of fluid extract of French organ. Concentrations assayed in the *in vitro* trial, to fluid extract and from essential oil, were from 0,323 to 1,292 mg of total solids/mL, and from 0,01 to 0,1 % v/v. In the *in vivo* trial to fluid extract, we assayed dose from 193,50 to 773,20 mg/kg of body weight (B.W.). Fluid extract of French organ and essential oil, showed a significant dose-dependent cytotoxic and genotoxic action in somatic segregation trial versus D-30. *Aspergillus nidulans*, but without effect in micronuclei-induction trial in mouse bone marrow of fluid extract from *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng.

Subject headings: PLANTS MEDICINALS; MICRONUCLEI TESTS; ASPERGILLUS NIDULANS; VOLATILE OILS; BONE MARROW/drug effects; MICE.

En la actualidad se observa un marcado interés en los estudios farmacológicos, toxicológicos y genotóxicos de las plantas medicinales para obtener un basamento científico de su acción terapéutica y del posible efecto toxicológico y

toxicogenético sin abandonar su empleo tradicional tan enraizado en nuestra población, que ofrece así grandes posibilidades de emplearlas como fitofármaco o en la búsqueda de nuevos principios activos. Sin embargo, se debe tener

¹ Licenciado en Ciencias Biológicas. Investigador Agregado.

² Licenciado en Bioquímica. Investigador Agregado.

³ Licenciada en Bioquímica. Investigadora Aspirante.

⁴ Doctor en Medicina. Profesor Asistente.

⁵ Doctora en Medicina. Especialista de I Grado en Microbiología.

presente que algunos de los componentes naturales que por tratarse de mezclas complejas, puedan dañar el material hereditario de las células somáticas o germinales. De ahí la importancia que da nuestro sistema de salud a los estudios toxicológicos y genotóxicos de los fitofármacos comprendidos en el Plan Nacional de Plantas Medicinales. Dentro de nuestras investigaciones se procedió a evaluar al potencial genotóxico de un extracto fluido y su aceite esencial del *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng (orégano francés).

El orégano francés, es ampliamente utilizado como condimento, contra catarrros, como expectorante, antiasmático, contra la cefalea (uso tópico), antimicrobiano y antiepiléptico.¹⁻⁴ Los ensayos fitoquímicos de esta planta detectaron la presencia de flavonoides, taninos, o grupos aminos, esteroides triterpénicos y aceites esenciales, siendo el carvacrol el predominante con un 43,1 %.⁵⁻⁶

Para iniciar los ensayos de genotoxicidad se empleó un ensayo *in vitro* con el hongo diploide *Aspergillus nidulans* D-30 que detecta daño primario en el ADN, y se utilizó el extracto fluido y su aceite esencial.⁷ Para la evaluación *in vivo* se empleó la prueba de inducción de micronúcleos en médula ósea de ratón la cual detecta aberraciones cromosómicas en eritoblastos expuestos al extracto fluido del Orégano francés.⁸

El presente trabajo tiene como objetivo determinar la acción citotóxica y genotóxica del extracto fluido de *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng (orégano francés) y su aceite esencial, evaluándose en 2 sistemas de ensayos a corto plazo: el ensayo de segregación somática con el hongo *Aspergillus nidulans*, tanto para el extracto fluido como para el aceite esencial y el ensayo de inducción de micronúcleos para el extracto fluido de orégano francés.

MÉTODOS

MATERIAL VEGETAL

Los experimentos se realizaron a partir de un extracto fluido y del aceite esencial obtenidos en la Estación Experimental de Plantas Medicinales "Dr. Juan Tomás Roig" ubicada en el Municipio Güira de Melena de la Provincia de La Habana. A partir del material vegetal seco (hojas) se probó un extracto fluido obtenido por los métodos convencionales de percolación en solución hidroalcohólica.^{9,10} Las características físico-químicas del extracto fluido del orégano francés son las siguientes: color, amarillo-verdoso; pH, 6,16; densidad relativa, 0,9047; etanol, 50 % v/v; sólidos totales, 4,43 % y menstruo etanólico 70 %. El extracto provenía del lote 1/95, correspondiéndole a esta planta un número de herbario Roig 4579.

ENSAYO DE SEGREGACIÓN SOMÁTICA

Se empleó el hongo *Aspergillus nidulans* D-30, obtenido de las cepas haploides 593 (a) y 593 (b), procedentes de *Fungal Genetics Center* (FSGS) de Atlanta, USA.¹¹ Esta cepa

diploide es portadora de 4 mutaciones recesivas para el color de los conidios en estado heterocigótico, lo cual permite analizar la inducción de segregación somática (mitótica) por simple inspección ocular de los sectores en estado homocigótico que aparecen sobre un fondo de conidiación verde-amarillo (salvaje) al crecer en medio completo (MC). Las mutaciones presentes en las cepas son: yA2= amarillo; wA2= blanco; fwA2= carmelita y chA1= verde chartré.

El procedimiento experimental se realizó por incorporación en placas de MC^{12,13} del extracto fluido de orégano francés y del aceite esencial, diluido este último en etanol (X10) e inoculando posteriormente conidios al centro de las placas de la cepa diploide de *Aspergillus nidulans* D-30 para evaluar la toxicidad cuantitativa al cabo de las 72 h de incubación a 37 °C. El índice de citotoxicidad (IT), dado por la reducción del diámetro de las colonias con respecto al control negativo (solvente) se determinó transcurrido ese tiempo. La genotoxicidad se evaluó a los 6-10 días de incubación a 30 °C, contando directamente los sectores homocigóticos segregantes de color aparecido en las colonias.¹¹ La frecuencia de sectores segregantes por colonias (FSC) evidencia los eventos genotóxicos que conducen a la segregación somática.

Se ensayaron concentraciones en mg de sólidos totales /mL de MC de 0,393 hasta 1,292 para el extracto fluido de orégano francés y de 0,01 hasta 0,1 % v/v para el aceite esencial, porque a partir de esos valores se observan cambios sustanciales en la morfología y coloración de los conidios que pueden prevenir una correcta visualización y conteo de los sectores segregantes.

El control negativo empleado fue etanol al 50 % y 98 % a la concentración final presente en las máximas dosis del extracto fluido y del aceite 1 % v/v y 0,1 v/v, respectivamente.

El control positivo utilizado fue hidrato de cloral a una concentración final de 6 mM.¹²

Para el análisis estadístico de los datos primarios se normalizaron y se aplicó la transformación $\sqrt{(x + 0,5)}$, a los sectores segregantes presentes en cada colonia analizada, posteriormente se le aplicó un análisis de varianza simple¹⁴ y una prueba de comparación de medidas por medio del estadístico de *Dunnett*.¹⁵

ENSAYO DE MICRONÚCLEOS

Se utilizaron ratones de ambos sexos de la línea no isogénica albina Suizo procedentes del Laboratorio de Control Biológico del CIDEM, los animales tenían entre 6-8 semanas de nacidos y con un peso promedio de 28,9 « 2,37 g.

Antes de ser tratados, los animales se sometieron a un período de adaptación de una semana, bajo condiciones de temperatura y humedad convencionales. La alimentación consistió en ratonina peletizada y agua sin restricción.

El esquema de tratamiento consistió en separar los ratones en sus grupos experimentales de 10 animales, 5 hembras y 5 machos, un control negativo (etanol al 50 %), un control positivo (ciclofosfamida 0,02 g/kg pc), un control espontáneo (agua destilada estéril) y 3 grupos tratados con diferentes dosis del extracto fluido de orégano francés, selecciona-

das sobre la base de la DL_{50} del extracto fluido en el ratón, y correspondió a un valor de 1,104 g/kg pc (Tillán J. Laboratorio de Control Biológico del CIDEM: com.pers) y como máximo una dosis correspondiente al 80-50 % de la DL_{50} .¹⁶ Las dosis restantes correspondieron al 50 % y 25 % de la dosis máxima. La administración fue por vía oral a razón de 1,2 % del peso corporal.

Para que el contenido de etanol no provocara muerte en los animales se estableció un límite que no excediera de 4,74 g/kg pc, y se tuvo presente que la DL_{50} para el etanol en las condiciones de ensayo fue de 7,80 g/kg pc.

El protocolo de tratamiento consistió en 2 administraciones separadas por un intervalo de 24 h y sacrificio por dislocación cervical 24 h después del último tratamiento.¹⁷

Las muestras de médula ósea se recogieron en suero bovino fetal libre de calostro, se extendieron y fijaron con etanol al 95 % (v/v) durante 5 min y se secaron al aire por 24 h. Posteriormente se tiñeron con solución *Giemsa* al 5 % (v/v) en agua corriente durante 20 min.¹⁸

Se contaron 1 000 eritrocitos policromáticos (PCE) por animal y además los eritrocitos normocromáticos (NCE) por cada 250 (PCE). La relación PCE/NCE, indica el índice de citotoxicidad (IT). Los micronúcleos (MN) se identificaron según el criterio establecido por *The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test*.¹⁸

Para la evaluación estadística los valores del IT y el porcentaje de eritrocitos policromáticos micronucleados (% mPCE) se normalizaron de acuerdo a la fórmula $\sqrt{X+1}$. Los valores transformados se procesaron mediante un Anova de 2 vías, y se tuvo en cuenta el sexo y los tratamientos.¹⁴ Se empleó el estadístico de *Cochran-Armitage* con el objetivo de determinar una posible relación dosis-efecto, teniendo como criterio genotóxico: incremento significativo en la fre-

cuencia de PCE micronucleados y que estuvieran relacionados con las dosis empleadas.¹⁹

RESULTADOS

SEGREGACIÓN SOMÁTICA EN EL HONGO *ASPERGILLUS NIDULANS* D-30

Las tablas 1 y 2 muestran los resultados de 2 experimentos para el extracto fluido del orégano francés y su aceite esencial. En todas las concentraciones de las muestras ensayadas se puede apreciar, que tanto el extracto fluido como el aceite esencial afectan significativamente el crecimiento de las colonias demostrado por el incremento del índice de toxicidad (IT), que expresa en por ciento la reducción del diámetro de las colonias con respecto al control negativo.

Con relación a la genotoxicidad se aprecia un incremento significativo dosis-dependiente en el número de sectores segregantes, tanto para el extracto fluido como para el aceite esencial. El análisis de varianza simple realizado a la frecuencia de sectores por colonias (FSC), demostró diferencias significativas entre los tratamientos para ambas muestras ($P < 0,01$). El estadístico de *Dunnnett* mostró diferencias significativas entre las concentraciones ensayadas de ambas muestras con respecto al control negativo ($P < 0,05$; $p < 0,01$). Al analizar la FSC se observa un incremento lineal con relación a las concentraciones del extracto y el aceite ensayados. Del análisis de regresión lineal se obtuvieron las siguientes rectas:

- Para el extracto fluido: $FSC = 20,13 (\text{conc}) + 4,75$ para un coeficiente de regresión de 0,998.
- Para el aceite esencial: $FSC = 21,63 (\text{conc}) + 1,04$ para un coeficiente de regresión de 0,958.

TABLA 1. Resultados del ensayo de segregación somática en *Aspergillus nidulans* D-30 frente a un extracto fluido de *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng (orégano francés) con un menstruo etanólico al 70 %

Concentración mg/mL	Toxicidad			Genotoxicidad			
	Colonias analizadas	Diámetro (mm)	IT ^a (%)	Colonias analizadas	Sectores segregantes	FSC ^b	ISMI ^c
Etanol al 1 % v/v ^d	8	37	-	30	121	4,03	1,00
0,323	8	36	2,70	30	368	12,27*	3,04
0,646	8	31	16,22	30	534	17,80**	4,42
0,969	8	26	29,63	30	729	24,30*	6,30
1,292	8	23	37,84	30	921	30,70*	7,02
Hidrato de cloral* 6 mM	8	13	64,86	30	446	14,86*	3,68

^a Índice de citotoxicidad, ^b Frecuencia de sectores por colonias, ^c Índice de segregación mitótica inducida, ^d Control negativo, ^e Control positivo, ** $p < 0,01$; $p < 0,05$.

Curva de regresión lineal: $FSC = 20,23 (\text{conc}) + 4,75$. $r = 0,998$.

TABLA 2. Resultados del ensayo de segregación somática en *Aspergillus nidulans* D-30 frente al aceite esencial de *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng (orégano francés)

Concentración mg/mL	Toxicidad			Genotoxicidad			
	Colonias analizadas	Diámetro (mm)	IT ^a (%)	Colonias analizadas	Sectores segregantes	FSC ^b	ISMI ^c
Etanol al 0,1 % ^d	8	50	-	10	13	1,3	1,00
0,01	8	50	0	10	18	1,8	1,45
0,025	8	50	6	10	22	2,2	1,70
0,05	8	47	16	10	28	2,8**	2,15
0,08	8	42	30	10	85	8,5**	6,54
0,1	8	35	36	10	104	10,4**	8,00
Espontáneo	8	50	0	10	9	0,9	0,69
Hidrato de cloral 6 mM	8	22	56	10	72	7,2*	5,53

^a Índice de citotoxicidad; ^b Frecuencia de sectores por colonias; ^c Índice de segregación mitótica inducida; ^d Control negativo; ^e Control positivo; **p < 0,01; * p < 0,05.

Curva de regresión lineal: FSC = 21,63 (conc) + 1,04. r = 0,958.

TABLA 3. Resultados del ensayo de inducción de micronúcleos en médula ósea de ratón por un extracto fluido de *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng (orégano francés) con un menstruo etanólico al 70 %

Tratamientos	Animales	IT ± SD ^a	PCE		
			analizados	mPCE ^b	% mPCE ± SD
Control negativo	10	2,21 ± 1,10	10530	28	0,27 ± 0,15
Etanol 4,74 g/kg					
Control espontáneo	10	2,72 ± 0,34	10340	27	0,26 ± 0,12
Dosis mg/kg					
Orégano francés					
193.50	10	2,28 ± 0,44	10530	21	0,20 ± 0,10
386.60	10	2,13 ± 0,90	10300	26	0,25 ± 0,25
773.20	10	1,98 ± 0,81	10290	30	0,30 ± 0,18
Control positivo	10	1,02 ± 0,34**	10250	196	1,83 ± 0,90**
Ciclofosfamida					

^a Índice de citotoxicidad, relación PCE/NCE.

^b Eritrocitos policromáticos micronucleados.

^c Cochran-Armitage (Prueba de tendencia en proporciones lineales).

p < 0,01**; p < 0,05*.

En ambas muestras ensayadas el índice de Segregación Mitótica Inducida es mayor de 2 con respecto al control negativo y es dosis-dependiente.

ENSAYO DE INDUCCIÓN DE MICRÓNÚCLEOS

En la tabla 3, se muestran los resultados y se consideró las dosis empleadas del extracto fluido de orégano francés con etanol al 50 %. Para el índice de citotoxicidad (IT), no se encontraron diferencias significativas en cuanto a sexo

(P = 0,95), dosis (P = 0,74) e interacción sexo X dosis (P = 0,94). Para el porcentaje de MPCE, indicador de daño genético, tampoco se encontraron diferencias significativas en cuanto a sexo (P = 0,21), dosis (P = 0,16) e interacción sexo x dosis (P = 0,55). Tampoco se encontraron diferencias estadísticas en los valores del (IT) y el porcentaje de MPCE entre el control negativo y el espontáneo. Aunque se observa un incremento en los micronúcleos al aumentar las dosis, no hubo diferencias significativas al aplicar la prueba de tendencias en proporciones lineales (Cochran-Armitage; P = 0,31) en relación dosis-respuesta lineal en el rango de tratamientos evaluados.

DISCUSIÓN

Es evidente la acción citotóxica en el ensayo de segregación somática en las concentraciones ensayadas del extracto fluido y del aceite esencial. En particular el aceite esencial del orégano francés contiene un 43 % de carvacrol, un derivado fenólico con una fuerte actividad bactericida y fungicida.^{20,21} Al parecer la toxicidad y genotoxicidad observada frente al *Aspergillus nidulans* D-30 puede deberse en parte, a daños genéticos inducidos que afectan la estructura y transmisión del material hereditario tal y como se ha observado para muchos agentes con actividad fungicida.²² Se puede pensar que el carvacrol sea el inductor de este daño primario al ADN del modelo biológico empleado, aunque no se ha encontrado en la literatura ninguna información en otro sistema de ensayo de genotoxicidad relacionado con este compuesto. En las observaciones realizadas a las colonias se pudieron detectar numerosos sectores amarillos y manchas gemelas, las cuales aparecen como sectores contiguos amarillos-carmelita y verde chartré, estos últimos producto de la recombinación mitótica como evento genético de reparación incorrecta del daño inducido al ADN. La concentración de etanol empleada (1 % v/v para el extracto fluido y 0,1 % v/v para el aceite esencial) se encuentra dentro de los valores admisibles para este ensayo, pues se reporta que pueden emplearse hasta concentraciones de 2 % en el método de incorporación en placa.²³

El daño genético expresado *in vitro*, no se demuestra en el ensayo *in vivo* de inducción de micronúcleos. Entre los factores que influyen en este tipo de respuesta en sistemas con mamíferos, se puede considerar la inactivación preferencial por mecanismos enzimáticos, baja concentración y biodisponibilidad del mutágeno, así como una excreción rápida (detoxificación).

CONCLUSIONES

El extracto fluido de *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng (orégano francés) con un menstruo etanólico al 70 % presentó:

- Actividad citotóxica y genotóxica al presentar un incremento en el (IT) e inducir segregación mitótica en el hongo diploide *Aspergillus nidulans* D-30, y se observó una relación dosis-respuesta significativa en todas las concentraciones ensayadas.
- No indujo de forma significativa la formación de micronúcleos en médula ósea de ratón, por lo cual el extracto fluido no es genotóxico en este sistema de ensayo.
- Su aceite esencial presentó una fuerte actividad citotóxica y genotóxica significativa dosis-dependiente frente al hongo *Aspergillus nidulans* D-30.

RECOMENDACIONES

- Realizar el ensayo Samonella/microsoma tanto al extracto fluido como al aceite esencial del orégano francés.
- Determinar la posible acción clastogénica del aceite esencial mediante el ensayo de micronúcleos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Roig JT. Plantas medicinales, aromáticas y venenosas de Cuba. La Habana: Editorial Científico-Técnica, 1988;693-4.
2. Plantas Medicinales: Fitomed II. La Habana: Editorial Ciencias Médicas, 1993;87.
3. Buznego MT, Perez-Saad H, Carrien L. Efecto antiepiléptico de *Plectranthus amboinicus* (Lour) Spreng (Orégano francés) en diferentes modelos experimentales. Rev Biol 1993;7(2-3):161-3.
4. Quevedo M, Piloto M. Acción antimicrobiana del extracto fluido de *Plectranthus amboinicus* (Lour) Spreng. Informe Técnico de Investigaciones. ISMM. «Dr. Luis Díaz Soto» 1994.
5. Basla K. Phytochemical studies of plants of Coleus genera. Herba Hung 1981;20:1-2.
6. Timor C. Evaluación físico-química del aceite esencial de las hojas de *Plectranthus amboinicus* (Lour) Spreng. Rev Cubana Farm 1991;25(1):63-6.
7. Kafer E, Scott Br, Kappas A. System and results of test for chemical induction of mitotic malsegregation and aneuploidy in *Aspergillus nidulans*. Mutat Res 1986;167:9-34.
8. Garriot ML, Piper CE, Kokino AJ. A simplified protocol for the mouse bone marrow micronucleus assay. J Applied Toxicol 1988;8:11.
9. Norma Ramal. Hojas de Orégano francés. Especificaciones NRSP 352. 1996.
10. Soler B, Mendez G, García M, Miranda M. Normas Ramales. Medicamentos de Origen Vegetal. Tinturas y Extractos Fluidos. Ciudad de La Habana: MINSAP. 1992. P 1-13.
11. Ramos RA, Torre RA de la, Alonso N, Villaescusa A, Vizozo A, et al. Screening of medicinal plants of induction of somatic segregation activity in *Aspergillus nidulans*. J Ethnopharmacol 1996;52:123-7.
12. Käfer E. Test which distinguish induced crossin-over and aneuploidy from secondary segregation in *Aspergillus nidulans* treated with chloral hydrate and gamma rays. Mutat Res 1986;164:145-66.
13. Torre RA de la, Rúa R. de la, Hernández G. Genotoxic effects of niclosamide in *Aspergillus nidulans*. Mutat Res 1989;222:337-41.
14. Sigarroa A. Biometría y diseño experimental. Primera parte La Habana: Ministerio de Educación Superior, 1985:276-337.
15. Dunnett A, Goldsmith H. When and how to do multiple comparison. En: Buchner CR, Tsay JY, eds. Statistic in pharmaceutical industry, New York: Decker, 1981:347-433.
16. Heddle JA, Cimino MC, Hayashi M. Micronuclei as index of cytogenetic damage: past, present and future. Environ Mol Mutag 1991;18:277-91.
17. Schimid W. The micronuclei test for cytogenetic analysis. En: Hollander A, ed. Chemical mutagens. Principles and methods for their detection. New York: Plenum, 1976:31-53.

18. The Collaborative Study Groups for the Micronucleus test. Sex difference in the micronucleus test. *Mutat Res* 1986;172:151-63.
19. Hayashi M, Tice R, McGregor J, Romayana K, Pacchierotti F. In vivo rodent micronucleus assays. *Mutat Res* 1994;312:293-304.
20. Jansenn AM, Scheffer JJC, Parhan-van A, Baertheim SA. Screening of some essential oil their activity on dermatophytes. *Pharm Weekbl Sci* 1988;10:277-80.
21. Jansenn AM, Chin NLJ, Scheffer JJC. Baertheim SA. Screening for antimicrobial activity for some essential oils by the agar overlay technique. Statistics and correlation. *Pharm Weekbl Sci* 1986;8:289-92.
22. Georgopoulos SG, Kappas A, Hasties AC. Inducing sectoring in diploid *Aspergillus nidulus* as a criterion of fungitoxicity by interference with hereditary processes. *Phytopathology* 1976;66:217-20.
23. Kappas A. On the mechanisms of induced aneuploidy in *Aspergillus nidulans* and validation of test for genomic mutation. En: *Mechanisms of chromosomal distribution and aneuploidy. Progress in clinical ambollicial reseich.* 1989:377-84.

Recibido: 13 de mayo de 1998. Aprobado: 17 de marzo de 1999.
Licenciado Angel Vizoso Parra. Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM). Ave. 26 No. 1605 entre Cerro y Boyeros. Plaza. Ciudad de La Habana. CP 10600. Teléfono (537)810818, 810830. Fax(537)33556 e mail:cidem@infomed, sld.cu.