

Estudio fitofarmacológico de algunas especies vegetales colombianas con posible actividad anticonvulsivante

Jairo Calle, Mario F. Guerrero*, Elvia Mendoza y Roberto Pinzón

Resumen

Se evaluó la actividad anticonvulsivante de los extractos etanólicos obtenidos de las siguientes plantas: *Bidens laevis* (L.), *Calea prunnifolia* (H.B.K.), *Erythrina poeppigiana* (Walp & Cook), *Galium hypocarpium* (L.), *Lippia alba* (N.E. Browne), *Melissa officinalis* (L.), *Struthanthus subtilis* (Kuijt) y *Valeriana pavonii* (Poepp). Para ello se utilizaron los modelos de convulsión máxima inducida por descarga eléctrica en ratones y de convulsión química inducida con pentilentetrazol en ratas. Tras la administración de 0.5 g/kg v.o., de los extractos se observaron efectos significativos en el caso de *B. laevis* y *V. pavonii* en el modelo de descarga eléctrica (72 y 60% de protección respectivamente). Del tratamiento fitoquímico de *B. laevis* se obtuvo una fracción insoluble en cloroformo con alto porcentaje de protección (78%) de la que a su vez se extrajo una subfracción rica en flavonoides de naturaleza ácida con actividad anticonvulsivante significativa (67%). Los resultados sugieren que compuestos de naturaleza flavonoide parecen ejercer un papel clave en las propiedades anticonvulsivantes detectadas en *B. Laevis*.

Palabras clave: *Bidens laevis* – *Valeriana pavonii* – pentilentetrazol – electroshock - flavonoides

Summary

Fitopharmacological study of some Colombian plants with possible anticonvulsant activity

The anticonvulsant activity of ethanolic extracts obtained from *Bidens laevis* (L.), *Calea prunnifolia* (H.B.K.), *Erythrina poeppigiana* (Walp & Cook), *Galium hypocarpium* (L.), *Lippia alba* (N.E. Browne), *Melissa officinalis* (L.), *Struthanthus subtilis* (Kuijt) and *Valeriana pavonii* (Poepp) was assessed in the electroshock and pentylentetrazole seizure models. After 0.5 g/Kg, oral administration in mice *B. laevis* and *V. pavonii* alcoholic extracts showed a significant protective effect in the maximal electroshock seizure model (72 and 60 % of protection respectively). A phytochemical fractionating of *B. laevis* was performed. A chlorophormic insoluble fraction showed a high percentage protection (78%) from which a sub-fraction rich in flavonoid compounds of acid nature were obtained (67% protection).

Key words: *Bidens laevis* – *Valeriana pavonii* – pentylentetrazole – maximal electroshock seizure – flavonoid

Introducción

La epilepsia constituye uno de los trastornos neurológicos más predominantes y Colombia

figura entre los primeros países de mayor prevalencia, alrededor de 20 por cada mil habitantes

Recibido para evaluación:

octubre 4 de 2004

Aceptado para publicación:

marzo 31 de 2005

* Departamento de Farmacia. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia. AA: 14490.
E-mail: mfguerrerop@unal.edu.co

(1). A este hecho se suma la insatisfactoria respuesta farmacológica que se observa en un notable número de pacientes, por lo que hay consenso general acerca de la necesidad de encontrar nuevas alternativas terapéuticas, una de cuyas fuentes bien podrían ser los productos naturales (2-3). En trabajos previos se documentó la actividad del extracto de los frutos de *Apium graveolens* así como su estudio fitoquímico (4-6). Estos resultados han incentivado el interés por hacer un tamizado más amplio de especies vegetales con posible actividad anticonvulsivante. Con ese fin se evaluaron los extractos etanólicos obtenidos de: *Bidens laevis*, *Calea prunnifolia*, *Erythrina poeppigiana*, *Galium hypocarpium*, *Lippia alba*, *Melissa officinalis*, *Struthanthus subtilis* y *Valeriana pavonii*, varias de ellas utilizadas popularmente por sus efectos tranquilizantes del sistema nervioso central (7). Adicionalmente se presenta en esta investigación la estrategia para el fraccionamiento fitoquímico del extracto de mayor interés farmacológico, *B. laevis*.

Metodología

Extracción del material vegetal

Un ejemplar de cada una de las plantas reposa en el Herbario Nacional Colombiano, donde fueron clasificadas por el botánico Dr. Edgar Linares, obteniendo la siguiente clasificación: *Bidens laevis*, (Fam. Asteraceae) N.V. Botoncillo, Col: 185323; *Calea prunnifolia* (Fam. Asteraceae) N.V. Carrasposa, Col: 468655; *Erythrina poeppigiana* (Fam. Leguminosae) N.V. Chocho, 389822; *Galium hypocarpium* (Fam. Rubiaceae) N.V. Coralito, Col: 171234; *Lippia alba* (Fam. Verbenaceae) N.V. Curalotodo, Col: 432163; *Melissa officinalis* (Fam. Labiateae) N.V. Toronjil, Col: 152171; *Struthanthus subtilis* (Fam. Loranthaceae) N.V. Matapalos, Col: 387695; *Valeriana*

pavonii (Fam. Valerianaceae) N.V. Valeriana de bejuco, Col: 186507.

La parte aérea del material vegetal fresco (flores en el caso de *B. laevis* y *E. poeppigiana*; hojas y tallos en todos los demás) se secó en un horno con aire circulante a 40°C durante tres días y se molvió. El material así obtenido se extrajo por percolación con etanol (96%) y posteriormente se concentró a presión reducida en rotavapor, obteniéndose un extracto total.

Fraccionamiento

El extracto etanólico total de las flores de *B. Laevis*, (el de mayor actividad anticonvulsivante) se trató sucesivamente con éter de petróleo y cloroformo, obteniendo tres fracciones: etérea (FE), clorofórmica (FC) y una insoluble en cloroformo (FIC). Esta última (rendimiento 5.7%) se sometió a cromatografía en columna con gel de sílice (0.063 – 0.200 mm), eluyendo con cloroformo/acetato de etilo (60 + 30) aumentando progresivamente el gradiente de elución con acetato de etilo hasta 100%.

El control de la columna se siguió por cromatografía en capa delgada (CCD). Como reveladores se utilizaron los reactivos de Godín y NP/PEG (difenilboriloxietilamina al 1% en metanol y polietilenglicol 400 al 5% en etanol), observando después las placas al UV de 365 nm. De acuerdo con este procedimiento se reunieron 28 fracciones para luego reagruparlas en dos

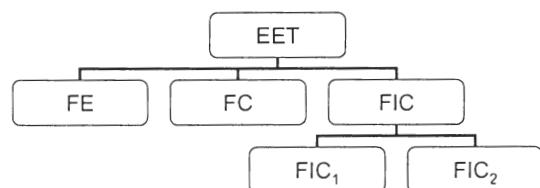


Figura 1. Esquema de fraccionamiento del extracto de *Bidens pilosa*. EET: extracto etanólico total, FE: fracción etérea, FC: fracción clorofórmica, FIC: fracción insoluble en cloroformo, FIC₁: subfracción clorofórmica 1, FIC₂: subfracción clorofórmica 2.

denominadas FIC₁ y FIC₂ que se evaluaron en las pruebas de actividad anticonvulsivante (Fig. 1).

Pruebas biológicas

Convulsión máxima inducida por electroshock (CME)

Las pruebas biológicas se realizaron con ratones albinos machos de seis a ocho semanas procedentes de la colonia ICR del Bioterio del Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia, mantenidos en condiciones controladas de ciclos de luz oscuridad de 12 horas, temperatura 22 °C, humedad 60%, agua y alimento a libre demanda.

Los animales se dosificaron por vía oral con los extractos etanólicos totales de la parte aérea (0.5 g/kg) de las especies vegetales mencionadas, difenilhidantoína (20 mg/kg, como fármaco de control positivo), vehículo [glicerina: propilenglicol: Tween 80: agua (10%: 10%: 1%: 79%)], como control negativo) y las fracciones obtenidas de *B. Laevis* (FE, FC, FIC, FIC₁ y FIC₂). El volumen de administración fue de 0.01 mL/g de peso. Se utilizaron entre 8 y 10 animales por grupo.

Dado que el ayuno prolongado modifica el umbral convulsivo, los animales se dejaron sin alimento únicamente dos horas antes de cada ensayo y se utilizaron una sola vez. Dentro de la primera hora posterior a la administración de las sustancias se les aplicó una descarga eléctrica vía corneal de 50 mA y 60 Hz (8). De acuerdo con pruebas preliminares se fijó la duración de la descarga en 30 milisegundos, tiempo suficiente para provocar la extensión tónica de las extremidades posteriores. Previamente se instiló una gota de solución salina isotónica en cada ojo, para mejorar la conducción eléctrica.

Se catalogó como protegido de la convulsión, aquel animal en el que no se presentó la extensión tónica de las extremidades posteriores (8). Se utilizó un estimulador eléctrico que permite administrar pulsos de corriente o voltaje constante de forma controlada (ref. E13-51, Coulbourn Instruments®).

Convulsiones inducidas químicamente por pentilentetrazol

Se utilizaron ratas Wistar macho, de 7-9 semanas, entre 150-200 g de peso. Se dosificaron por vía oral con 0.5 g/kg de los extractos, clonazepam (0.5 mg/kg, fármaco control positivo) o vehículo (0.2 mL/100 g de peso) y transcurrida una hora se les administró 65 mg/kg, vía IP de pentilentetrazol (PTZ). A partir de ese momento se observaron durante media hora registrando la presencia o ausencia de sacudidas mioclónicas en cabeza, tronco o extremidades (8).

Todos los procedimientos se efectuaron conforme a las especificaciones concernientes a la protección del animal de laboratorio consignadas en la Resolución No. 008430 de 1993 del Ministerio de Salud y en la Ley 84 de 1989.

Análisis de datos y estadística

Se siguió una distribución de tratamientos completamente al azar para cada modelo de convulsión. Los tratamientos correspondientes fueron: los extractos etanólicos totales, las sustancias patrón (fenitoína sódica, clonazepam), el vehículo como control y las fracciones obtenidas de *B. Laevis*. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante la prueba de “Chi²”, indicada cuando la variable de medición es de tipo cuantitativo. El nivel de significancia escogido fue de 0.05. Para el análisis de los datos se utilizaron los programas EXCEL MS-97 y SPSS, v 7.5.

Fármacos y soluciones

Se utilizaron los siguientes productos: difenilhidantoína (Epamín®); clonazepam (Rivotril®), glicerina, tween 80, etanol 96% y los solventes analíticos: cloroformo, metanol, éter de petróleo y acetato de etilo (Merck®).

Resultados

Fraccionamiento fitoquímico

Por análisis fitoquímico se encontró que las flores de *B. Laevis* contienen en mayor proporción terpenoides, esteroides y flavonoides, según las pruebas obtenidas con los reveladores de Godín y NP/PEG (9). Con el primer revelador, al calentar las placas cromatográficas a 110 °C durante 10 minutos los flavonoides aparecen como manchas amarillas. Con el segundo revelador, los flavonoides aparecen como manchas amarillas intensas, anaranjadas, rojas o azules o con fluorescencia verde a 365 nm o a la luz visible.

De la fracción insoluble en cloroformo (FIC) se obtuvieron por cromatografía en columna las subfracciones FIC₁ y FIC₂. Se puso en evidencia, de manera clara y precisa que estas subfracciones contienen una mezcla de flavonoides de naturaleza ácida, mediante las siguientes pruebas: desprendimiento de CO₂ al adicionar NaHCO₃, con cambio de la coloración a rojo intenso. Igualmente al revelar la cromatografía con solución al 1% de verde de bromocresol, las manchas del flavonoide en discusión cambiaron de verde a amarillo. Asimismo, utilizando como revelador el cloruro férrico: ferri-cianuro de potasio, las manchas del flavonoide en la cromatografía tomaron una coloración azul negruzca intensa debido a los OH fenólicos que poseen estos compuestos.

La presencia de flavonoides de naturaleza ácida en la subfracción FIC₁ se puso de presente

al observar el espectro de IR donde se apreciaron bandas características del grupo carboxílico en 3254 cm⁻¹ que corresponde a la tensión del OH y una banda aguda intensa que corresponde a la tensión C=O en 1664 cm⁻¹.

Pruebas biológicas

Convulsión máxima inducida por electroshock

En las figuras 2 y 3 se observan los porcentajes de protección de los extractos de las especies vegetales mencionadas y de las fracciones obtenidas de *B. Laevis*, respectivamente. Los grupos patrón y control (fenitoína y vehículo) arrojaron porcentajes de protección de 82 y 10 % respectivamente. Se observa que los extractos de *B. Laevis* y *V. Pavonii* mostraron los mayores porcentajes (72 y 60%). En la figura 4 se muestran los porcentajes de protección obtenidos de la fracción insoluble en cloroformo (FIC) y de sus subfracciones (FIC₁ y FIC₂): 40, 67 y 29% respectivamente.

Convulsión química inducida con pentilentetrazol

En la figura 4 se observan las respuestas de los extractos en las convulsiones inducidas con pentilentetrazol. Es claro el contraste entre la protección conferida por el patrón (clonazepam) y la generada por los extractos, si bien se detecta algún efecto protector (significativo estadísticamente) en el caso de *B. Laevis*.

Discusión

Este estudio ha permitido detectar la actividad anticonvulsivante de los extractos de las flores de *B. Laevis* (flores) y *V. pavonii* (parte aérea) a la

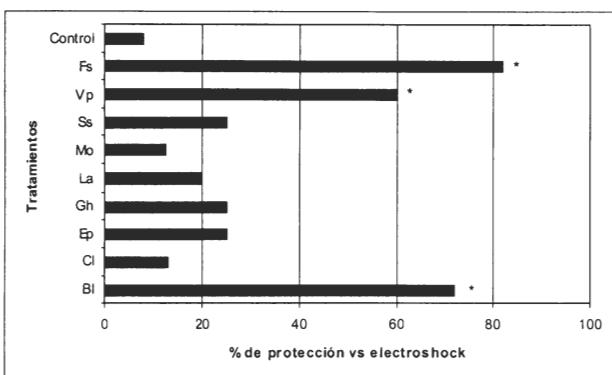


Figura 2. Porcentaje de protección de los extractos etanólicos totales (0.5 g/kg, vo) frente a la convulsión máxima inducida eléctricamente en ratones ICR. Bl: *Bidens laevis*; Cl: *Calea prunifolia*; Ep: *Erythrina poeppigiana*; Gl: *Gaultheria hypocrateum*; La, *Lippia alba*; Mo: *Melissa officinalis*; Ss: *Struthanthus subtilis*; Vp: *Valeriana pavonii*; Fs: fenitoína sódica (fármaco patrón, 20 mg/kg, vo). *p<0.05, respecto del control.

vez que avanzar en la caracterización fitoquímica de la primera especie, en la que se confirma la presencia de terpenoides/esteroides y flavonoides de naturaleza ácida. Por otra parte, pese a que las especies: *E. poeppigiana*, *G. hypocrateum*, *L. alba* y *M. officinalis* se han utilizado etnobotánicamente en nuestro medio con fines hipnóticos y/o anticonvulsivantes, en este estudio no arrojaron resultados positivos en los modelos experimentales de convulsión ensayados (7).

Está documentado que compuestos de tipo flavonoide están implicados en interacciones sobre el receptor GABA-A (10, 11) a la vez que ejercen efectos anticonvulsivantes (12, 13). Habría que considerar la posibilidad de que compuestos flavonoides presentes en *B. laevis* pudieran estar actuando de modo similar. Conviene notar además que la actividad gabaérgica está asociada no solo a efectos anticonvulsivantes, sino también ansi-

líticos, y es posible que subtipos de receptores estén más ligados a uno u otro efecto. (14, 15).

No obstante, el alto porcentaje de protección obtenido frente al modelo de convulsión máxima a la vez que la ausencia de protección frente al modelo de convulsión con pentilentetrazol lleva a plantear que los compuestos activos implicados en la respuesta farmacológica de estas especies podrían tener también un mecanismo vinculado con el antagonismo de canales de sodio. Esto porque existe en general una buena correlación entre la actividad protectora frente a la descarga eléctrica y el antagonismo que de tales canales muestran los fármacos utilizados en clínica para el tratamiento de las crisis tónico clónico generalizadas (8).

Sin embargo, los efectos centrales de los flavonoides aislados suelen ser discretos y distintamente comparables con agentes de síntesis como las benzodiazepinas (16). En cualquier

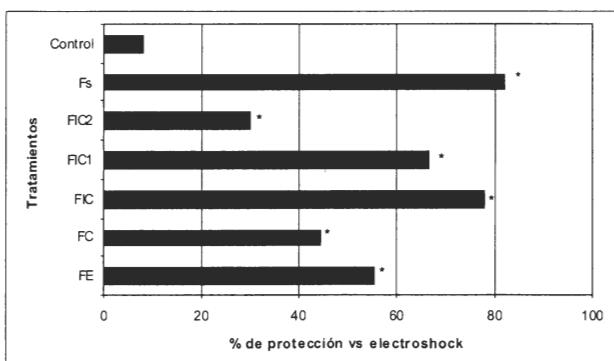


Figura 3. Porcentaje de protección de las fracciones obtenidas de *Bidens laevis* (0.5 g/kg, vo) frente a la convulsión máxima inducida eléctricamente en ratones ICR. FE: fracción etérica; FC: fracción clorofórmica, FIC: fracción insoluble en cloroformo, FIC1: subfracción insoluble en cloroformo 1, FIC2: subfracción insoluble en cloroformo 2, Fs: fenitoína sódica (fármaco patrón, 20 mg/kg, vo). *p<0.05, respecto del control.

caso cabe considerar la posibilidad de que varios de estos compuestos actúen de modo sinérgico entre sí, un hecho frecuentemente documentado con productos naturales (17, 18). Este planteamiento se refuerza a la luz de nuestros resultados, pues se observa que a medida que se avanza en el fraccionamiento de *B. Laevis*, el porcentaje de protección anticonvulsivante, aunque se mantiene, no se incrementa, de modo que es posible que a lo largo del fraccionamiento vayan quedando atrás sustancias que participen en algún grado en la protección observada.

Si se tratara de compuestos de tipo flavonoide como los responsables de la actividad, sería de esperarse un bajo perfil de toxicidad, habida cuenta de los estudios que confirman el bajo perfil tóxico de estos compuestos (19). Paralelamente es necesario considerar la posible participación de compuestos de tipo terpenoide, a los que también se les ha documentado actividad anticonvulsivante, si bien a altas dosis (20, 21).

B. Laevis, ha sido hasta la fecha una especie muy poco estudiada, si se compara con otras especies, en particular *B. pilosa*, que ha mostrado, entre otras, actividad hipotensora y antimarialaria (22, 23). Igual cosa puede decirse de *V. pavonii*, de cuyo género existen muchos estudios, especialmente relacionadas con *V. officinalis*, propia de otras latitudes (24-26). Dados los interesantes resultados encontrados en este estudio, es necesario avanzar en la caracterización fitoquímica y farmacológica de estas dos especies.

En conclusión, el estudio fitoquímico y farmacológico de las especies vegetales mencionadas permite plantear que *B. Laevis* y *V. pavonii* poseen un notable perfil anticonvulsivante en la prueba de convulsión máxima inducida eléctricamente, modelo de las crisis tónicas clínicas

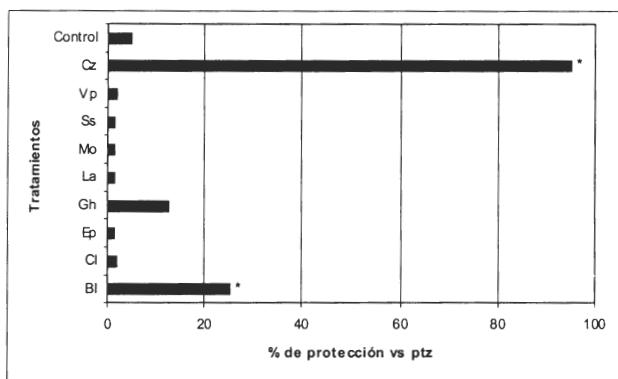


Figura 4. Porcentaje de protección de los extractos etanólicos totales (0.5 g/kg, vo) frente a la convulsión máxima inducida con pentilentetrazol en ratas Wistar. Bl: *Bidens laevis*; Cl: *Calea prunifolia*; Ep: *Erythrina poeppigiana*; Gh: *Galium hypocarpium*; La, *Lippia alba*; Mo: *Melissa officinalis*; Ss: *Struthanthus subtilis*; Vp: *Valeriana pavonii*; Cz: clonazepam (fármaco patrón, 0.5 mg/kg, vo). *p<0.05, respecto del control.

generalizadas, y que el fraccionamiento de *B. Laevis* ha conducido a detectar compuestos flavonoides de naturaleza ácida como los posibles responsables de la actividad. Se adelantan nuevos estudios en este Departamento tendientes a identificar las substancias responsables de la actividad.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Proyecto Búsqueda de Principios Bioactivos en Plantas Medicinales Colombianas, a Colciencias, al Proyecto X-8 del CYTED, a la División de Investigación, Sede Bogotá, (DIB) y al Dpto. de Farmacia, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia.

Referencias

1. G. Pradilla, C.A. Pardo, J.S. Daza y A. Zúñiga, Neuroepidemiología en Colombia. Estudios en 16.032 individuos, *Acta Neurol. Colomb.*, **11**, 129 (1995).

2. J.O. McNamara, Emerging insights into the genesis of epilepsy, *Nature*, **399**, 6738 Suppl. A15 (1999).
3. V.E. Tyler, Phytotherapies: back to the Future, *J. Nat. Prod.*, **62**, 1489 (1999).
4. M.F. Guerrero, C.L. Gracia y B. Meneses, Actividad anticonvulsivante del extracto de *Apium graveolens L.* en ratones, *Rev. Col. Cienc. Quim. Farm.*, **26**, 7 (1997).
5. J. Rincón, M.F. Guerrero, J.A. Cardozo, R. Pinzón, Seguimiento fitoquímico bio-guiado de la actividad anticonvulsivante del extracto etanólico de las semillas de *Apium graveolens*, *Rev. Col. Cienc. Quim. Farm.*, **33**, 141 (2003).
6. M.F. Guerrero, B. Meneses y C.L. Gracia, Registro Electroencefalográfico Computarizado en Ratas para la Detección de Anticonvulsivantes, *Rev. Col. Cienc. Quim. Farm.*, **26**, 59 (1997).
7. H. García-Barriga, "Flora Medicinal de Colombia", Instituto de Ciencias Naturales Universidad Nacional de Colombia, Editorial Tercer Mundo Editores, Bogotá, 1982. Tomo I, p. 370, 423 y 503; Tomo II p. 506, 507; Tomo III, p. 22, 24, 238-240, 249-254, 261, 263, 323.
8. E.A. Swinyard, J.H. Woodhead, H.S. White, M.R. Franklin, En: "Antiepileptic Drugs", Ed. R. Levy, Third Edition, New York, 1989, p. 85-102.
9. K. Hostettmann, "Strategies for isolation of natural products", Workshop documentation, 5-9. November 2002, Panama City, Panama.
10. M. Marder, G. Estiu, L.B. Blanch, H. Viola, C. Wasowski, J.H. Medina y A.C. Paladini, Molecular modeling and QSAR analysis of the interaction of flavone derivatives with the benzodiazepine binding site of the GABA(A) receptor complex, *Bioorg. Med. Chem.*, **9**, 323 (2001).
11. C. Wolfman, H. Viola, A. Paladini, F. Dajas y J.H. Medina, Possible anxiolytic effects of chrysin, a central benzodiazepine receptor ligand isolated from *Passiflora coerulea*, *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **47**, 1 (1994).
12. X.M. Du, N.Y. Sun, N. Takizawa, Y.T. Guo y Y. Shoyama, Sedative and anticonvulsant activities of goodyerin, a flavonol glycoside from *Goodyera schlechtendaliana*, *Phytother. Res.*, **16**, 261 (2002).
13. J.H. Medina, A.C. Paladini, C. Wolfman, M. Levi, D. Calvo, L.E. Diaz y C. Pena, Chrysin (5,7-di-OH-flavone), a naturally-occurring ligand for benzodiazepine receptors, with anticonvulsant properties, *Biochem. Pharmacol.*, **40**, 2227 (1990).
14. C. Wolfman, H. Viola, M. Marder, C. Wasowski, P. Ardenghi, I. Izquierdo, A.C. Paladini y J.H. Medina, Anxiolytic properties of 6,3'-dinitroflavone, a high-affinity benzodiazepine receptor ligand, *Eur. J. Pharmacol.*, **318**, 23 (1996).
15. H. Viola, C. Wasowski, M. Levi, C. Wolfman, R. Silveira, F. Dajas, J.H. Medina y A.C. Paladini, Apigenin, a component of *Matricaria recutita* flowers, is a central benzodiazepine receptors-ligand with anxiolytic effects, *Planta Med.*, **61**, 213 (1995).
16. G. Griebel, G. Perrault, S. Tan, H. Schoemaker y D.J. Sanger, Pharmacological studies on synthetic flavonoids: comparison with diazepam, *Neuropharmacology*, **38**, 965 (1999).
17. J. Chang, Medicinal herbs: Drugs or dietary supplements? *Biochem. Pharmacol.*, **59**, 211 (2000).
18. M. Spinella, The importance of pharmacological synergy in psychoactive herbal medicines. *Altern. Med. Rev.*, **7**, 130 (2002).

19. B.H. Havsteen, The biochemistry and medical significance of the flavonoids, *Pharmacol. Ther.*, **96**, 67 (2002).
20. H. Hosseinzadeh y M. Nassiri, Anticonvulsant, sedative and muscle relaxant effects of carbenoxolone in mice, *BMC Pharmacol.*, **29**, 3 (2003).
21. V.S. Kasture, V.K. Deshmukh y C.T. Chopde, Anticonvulsant and behavioral actions of triterpene isolated from *Rubia cordifolia* Linn, *Indian J. Exp. Biol.*, **38**, 675 (2000).
22. T. Dimo, T.B. Nguelefack, M.P. Yewah, E. Dongo, S.V. Rakotonirina, A. Kamanyi y M. Bopelet, Possible mechanisms of action of the neutral extract from *Bidens pilosa* L. leaves on the cardiovascular system of anaesthetized rats, *Phytother. Res.*, **17**, 1135 (2003).
23. F.Q. Oliveira, V. Andrade-Neto, A.U. Krettli y M.G. Brandao, New evidences of antimalarial activity of *Bidens pilosa* roots extract correlated with polyacetylene and flavonoids, *J. Ethnopharmacol.*, **93**, 39 (2004).
24. P.J. Houghton, The biological activity of valerian and related plants, *J. Ethnopharmacol.*, **22**, 121 (1988).
25. M.S. Santos, F. Ferreira y A.P. Cunha, An aqueous extract of valerian influences the transport of GABA in synaptosomes, *Planta Med.*, **60**, 278 (1994).
26. S. Hadley y J.J. Petra, Valerian, *Am. Fam. Physician*, **67**, 1755 (2003).