

Estudio comparativo de la acción gastroprotectora del *Plantago major* y el omeprazol sobre la gastritis inducida por la administración de ketorolaco

William Henry Chirri Trevejos¹

Información del artículo

Historia del artículo

Recibido: 20/04/2017
 Aprobado: 20/07/2017

Autor corresponsal

William Henry Chirri Trevejos
 whct811@gmail.com

Fuentes de financiamiento

Autofinanciado

Conflictos de interés

Ninguno

Citar como

Chirri Trevejos WH. Estudio comparativo de la acción gastroprotectora del *Plantago major* y el omeprazol sobre la gastritis inducida por la administración de ketorolaco. Rev Peru Med Integrativa.2017;2(2):86-91.

Resumen

Objetivo. Evaluar si el extracto alcohólico de *Plantago major* L. tiene actividad gastroprotectora frente a gastritis experimental inducida por ketorolaco administrado en dosis estomatológicas en comparación al omeprazol, en ratas Wistar. **Materiales y métodos.** Estudio experimental. Se usaron 30 ratas albinas, que fueron divididas en tres grupos de 10 cada uno. El Grupo I recibió ketorolaco a una dosis diaria de 15 mg/kg de peso, el Grupo II recibió 15 mg/kg de ketorolaco + 1 mg/kg de omeprazol, y el Grupo III, recibió los 15 mg/kg de ketorolaco + 500 mg/kg de extracto alcohólico de *Plantago major* L.; por tres días. La evaluación de la actividad gastroprotectora del omeprazol y el extracto alcohólico de *Plantago major* L. se realizaron por medio de conteo de lesiones en los estómagos de las ratas y cortes histopatológicos. **Resultados.** Se encontraron 60 lesiones erosivas en las mucosas gástricas de los animales pertenecientes al Grupo I; 3 lesiones en el Grupo II, y 2 lesiones en el Grupo III. Se encontraron diferencias significativas entre grupos ($p < 0,001$). Entre los grupos II y III no se hallaron diferencias significativas. Con respecto al examen histológico, en el grupo control se observaron soluciones de continuidad calificadas como úlceras gástricas, mientras que en los grupos II y III, solo se encontraron erosiones sin alteraciones morfológicas. **Conclusión.** La administración del extracto alcohólico del *Plantago major* L. a 500 mg/kg, presentó un efecto gastroprotector similar a la administración de omeprazol en gastritis experimental por AINE en un modelo murino.

Palabras clave. *Plantago major* L.; Modelos Animales; Ketorolaco; Plantas Medicinales (Fuente: DeCS)

Comparative Study of Gastroprotection between *Plantago major* L and Omeprazol in Experimentally Induced Gastritis by Ketorolaco

Abstract

Objective. To evaluate if *Plantago major* L alcoholic extract have gastroprotective activity in experimentally induced gastritis by Ketorolac administered in stomatological usual doses and make a comparison between the Omeprazole effect in Wistar rats. **Materials and methods.** Experimental study. Thirty albino rats were divided in three groups of 10: Group I: Ketorolac 15 mg/kg daily; Group II: Ketorolac 15 mg/kg + Omeprazole 1 mg/Kg daily; and Group III: Ketorolac 15 mg/kg daily+ *Plantago major* L. alcoholic extract 500 mg/kg daily; by three days. The evaluation of gastroprotective effect was made by the count of rats' stomachs injuries and histopathological sections. **Results.** Sixty erosive injuries were found in Group I animals; three injuries in Group II and one in Group I. Significantly differences were found between groups ($p < 0.001$). No differences were found between Groups II and III. About histopathological evaluation, solutions of continuity (gastric ulcers) were observed in control group. Meanwhile, in Groups II and III, only erosions without morphological alterations were found. **Conclusion.** The administration of *Plantago major* L alcoholic extract (50 mg/kg) presented a gastroprotective effect similar than administration of Omeprazole in experimentally induced gastritis by NSAIDs in a murine model.

Keywords: *Plantago major* L.; Animal Models; Ketorolac; Medicinal Plants (Source: MeSH).

¹ Facultad de Odontología. Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Introducción

En la práctica odontológica es necesario el hacer uso de diversos fármacos, ya sean antibióticos, antiinflamatorios no esteroideos (AINE), corticoides, etc., durante el posoperatorio o el preoperatorio, pero dentro de este grupo de fármacos, los AINE son los más utilizados, esto, debido a sus propiedades analgésicas y antiinflamatorias⁽¹⁾. Estos fármacos, de acuerdo al tiempo en el cual son consumidos, presentan diferentes efectos adversos, como la hepatotoxicidad o nefrotoxicidad, pero la gastrolesividad es el efecto adverso predominante de estos fármacos; la cual puede presentarse como gastritis y posteriormente como úlceras gástricas⁽²⁾.

Se sugiere que la gastrolesividad de los AINE está relacionada a la inespecificidad de estos para unirse a la enzima ciclooxigenasa-2, lo cual es perjudicial para el paciente tratado con un esquema terapéutico basado en varios días de administración del fármaco; aun así, en muchos casos es necesaria la administración de este por un tiempo prolongado^(3,4).

En odontología los esquemas terapéuticos posoperatorios muchas veces están por dentro de los 3 a 5 días, con la administración de estos fármacos 2 o 3 veces al día, lo cual puede desencadenar en el paciente algún tipo de lesión gástrica, ya sea de manera superficial o profunda^(5,6). Debido a esto, las plantas medicinales se convierten en una posible alternativa para eliminar el efecto adverso gastrolesivo de los AINE.

El *Plantago major* (llantén) es una planta que pertenece a la división Magnoliópsida, clase Magnoliópsida, orden Plantaginales y a la familia Plantaginaceae. Es usada tradicionalmente para facilitar la curación de las heridas y prevenir infecciones⁽⁷⁾. En estudios previos se ha encontrado que sus extractos han mostrado tener efectos inhibitorios de la enzima COX-2 en modelos *in vitro*⁽⁸⁾; así como, efectos cicatrizantes en mucosas debido a la proliferación de células epiteliales en modelos *in vitro* y *ex vivo*^(9,10). Sin embargo, se han encontrado pocos estudios en modelos animales para probar gastroprotección con resultados contradictorios^(11,12).

Por ello, el objetivo de este estudio es determinar la actividad gastroprotectora del extracto de alcohólico de *Plantago major* L a dosis de 500 mg/kg en comparación con el omeprazol, frente a un modelo de gastrolesividad producida por AINE (ketorolaco) en ratas Wistar.

Materiales y métodos

Material vegetal

Las hojas de *Plantago major* L (llantén) fueron obtenidas en noviembre de 2012 y la identificación taxonómica

fue certificada por el Herbario del Instituto de Ciencias Farmacéuticas y Recursos Naturales Terapéuticos de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos-UNMSM (Constancia 002-ICF y RNT-FFB-2012).

Preparación del extracto^(13,14)

Se utilizaron tres kilogramos de hojas de llantén (*Plantago major* L), las cuales fueron licuadas con 4 L de alcohol de 70°, luego se trasladaron a maceración, en un envase de vidrio, por 7 días. Pasado el tiempo de maceración alcohólica, se procedió al filtrado. El primer filtrado se realizó con un colador de cocina, con la cual se separó el líquido de los fragmentos gruesos triturados. Luego se procedió a un segundo filtrado, el cual se realizó con papel filtro rápido, para separar únicamente el líquido.

Posterior al segundo filtrado, se colocó el líquido en una fuente resistente al calor, para pasar a un horno donde permaneció 2 días para la evaporación completa de los componentes líquidos y la cristalización de los elementos activos.

Terminado el proceso de evaporación y posterior enfriamiento de la fuente, se obtuvo una capa escamosa cristalizada de color verde el cual es el extracto alcohólico de *Plantago major* L. Para poder separar la capa cristalizada de la fuente, se usó una espátula con la cual se raspó la superficie de la fuente hasta retirar la totalidad del extracto y colocarlo en un frasco para su posterior pesaje.

De acuerdo al peso obtenido y la cantidad de concentración que tuvo el extracto alcohólico, se agregó el 3% de solvente (polisorbato de sodio), mientras el 97% fue cloruro de sodio al 0,9%, con lo cual se obtuvo una solución para ser administrada por vía oral. La solución final tuvo una concentración final de 100 mg/mL.

Animales de experimentación

Se utilizaron 30 ratas de raza Wistar de 200 ± 20 g de peso, y cuya edad fluctuó entre los 2 a 3 meses. Estas fueron pesadas con una balanza digital Soehnle®. Las ratas fueron alimentadas con comida y agua *ad libitum*, procurándosele un periodo día/noche de 12 h cada uno en un tiempo de ambientación previo al de experimentación de 7 días en los ambientes de la UNMSM. Se cumplió con las directrices establecidas en la Declaración sobre el Uso de Animales en la Investigación Biomédica⁽¹⁵⁾ y bajo la supervisión de docentes especialistas en manejo animal. El autor declara que en el momento de realización del estudio aún no se constituía el Comité de Ética y Bienestar Animal (CEBA) de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Modelo experimental para evaluación de gastroprotección

Para este estudio, se disolvió la cantidad necesaria de ketorolaco para obtener una solución con una concentración de 6 mg/mL y se administró una dosis de 15 mg/kg, la cual, según evidencias, es la máxima dosis con efecto analgésico-antiinflamatorio en ratas ⁽¹⁶⁾. Igualmente, se disolvió la cantidad necesaria de omeprazol para lograr una solución con una concentración de 1 mg/mL y se administró una dosis de 1 mg/kg.

Así, los animales de experimentación fueron separados aleatoriamente en tres grupos: Grupo I (n=10), grupo control al cual solo se le administró ketorolaco vía oral en una dosis diaria de 15 mg/kg; Grupo II (n=10), en el cual, además de administrar ketorolaco a dosis de 15 mg/kg, se les administró simultáneamente omeprazol a dosis de 1 mg/kg, todo esto por vía oral; finalmente, Grupo III (n=10), al cual, además de administrar ketorolaco en dosis de 15 mg/kg, se le administró, simultáneamente, el extracto alcohólico de *Plantago major* L a dosis de 500 mg/kg, vía oral. La administración de estas intervenciones duró tres días en todos los grupos.

El cálculo del tamaño muestral se realizó utilizando la fórmula de Rojo ⁽¹⁷⁾; donde se consideró una tasa de fracaso del modelo experimental de un 30%, una pérdida de datos de un 20%, y un mínimo de cinco animales por grupo, de acuerdo a estudios anteriores, con lo que se obtuvo un número mínimo por grupo de nueve.

El cuarto día, los animales se sacrificaron en ayunas. Fueron puestos uno a uno en una campana de vidrio con éter, con lo que los animales pasaron a estado de anestesia general. Luego, se extrajo el estómago y fueron abiertos por el lado de la curvatura mayor, para realizarse el conteo de las lesiones en cada uno de los estómagos y cortes histológicos posteriores.

Pruebas histológicas

Los cortes histológicos se tomaron a partir de los estómagos de las ratas sometidas a la experimentación, mientras que los cortes se realizaron a nivel de mucosa esofágica y gástrica, los cuales fueron teñidos con hematoxilina-eosina. Se utilizó este tipo de coloración ya que era necesaria la observación de la totalidad de la estructura celular, y esta coloración cumplía con estos requisitos ⁽¹⁸⁾.

Análisis estadístico

El *outcome* elegido para el presente estudio fue el número de lesiones gástricas encontradas en los animales de

experimentación de acuerdo al grupo de estudio, las cuales fueron certificadas con apoyo de un médico patólogo con experiencia en estudios con animales; asimismo, se consideró el porcentaje de gastrolesividad (definido como la proporción de aparición de erosiones gástricas por animal de experimentación). Con ayuda del paquete estadístico SPSS v 22 [®] se realizó la prueba de Kruskal-Wallis para observar si existían diferencias significativas entre las lesiones observadas en los tres grupos de estudio, seguidamente, se realizó la prueba de Dunn para comparaciones múltiples entre pares de grupos. Se consideró estadísticamente significativo un $p < 0,05$ y se trabajó con un nivel de confianza del 95%.

Resultados

Con respecto a la aparición de erosiones gástricas, estas se encontraron en todos los animales de experimentación del Grupo I; en contraste con el hallazgo, en un 33,3 y 20,0% en los grupos II y III, respectivamente.

En dimensiones absolutas, se encontraron 60 lesiones erosivas en las mucosas gástricas de los animales pertenecientes al Grupo I, en comparación con las tres lesiones halladas en el Grupo II y las dos en el Grupo III. Se encontraron diferencias significativas entre grupos ($p < 0,001$); al realizar la prueba de Dunn entre los grupos II y III no se encontraron diferencias significativas.

Al respecto del examen histológico, en el grupo control se observaron soluciones de continuidad en la superficie apical, que corresponde al 15% de la *pars glandularis*, sin figuras inflamatorias (Figura 1a y b). En el grupo II, el diagnóstico fue de solo una disminución de la mucosa gástrica sin alteraciones morfológicas (Figura 1c); mientras que en el Grupo III, se describe una discreta muesca en la mucosa gástrica que ocupa ápices glandulares (Figura 1d).

Discusión

Los datos presentados en este estudio sugieren que el extracto alcohólico de las hojas de *Plantago major* L (llantén) podrían tener un efecto gastroprotector en el daño inducido por AINE. En nuestra región, otras especies de esta familia, como *Plantago lanceolata* L. (llantén menor), ya han mostrado efectos gastroprotectores en úlceras gástricas inducidas por indometacina en modelos animales ⁽¹⁹⁾.

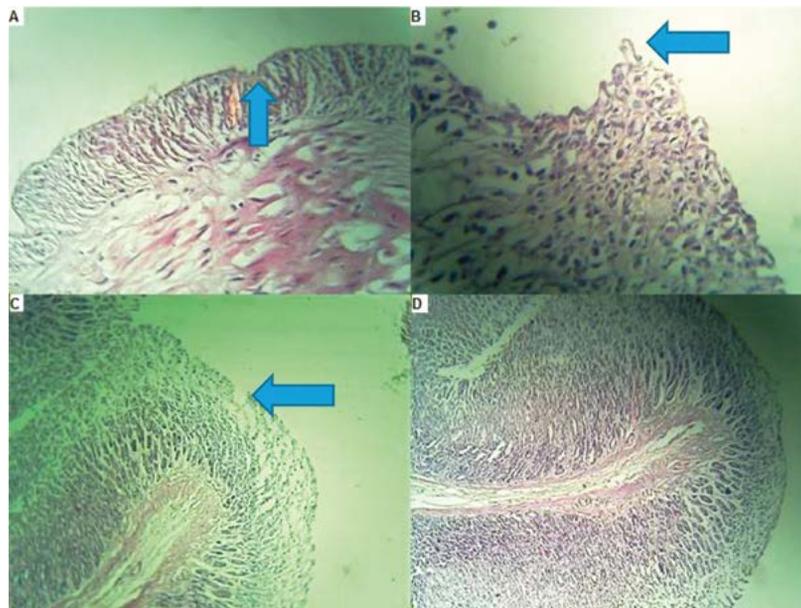


Figura 1. a) Mucosa gástrica con erosiones apicales, señaladas con la flecha azul (Grupo I); b) Acercamiento de la zona señalada en a (Grupo I); c) Muesca en mucosa gástrica señalada con flecha azul (Grupo II); d) Mucosa gástrica normal.

En estudios anteriores se encontraron efectos gastroprotectores a dosis de 400 a 800 mg/kg, dependiendo del tipo de extracto alcohólico usado. Zamalloa y Pfuyo⁽²⁰⁾ encontraron efectos gastroprotectores superiores al omeprazol en modelos animales, en dosis por encima de los 600 mg/kg sin efectos adversos aparentes, usando extractos secos hidroalcohólicos al 70%. Por otro lado, en el uso de extractos metanólicos de hojas de *Plantago major* L, experiencias previas encontraron que la dosis de 400 mg/kg resultaba más efectiva que una dosis de hasta 1180 mg/kg⁽²¹⁾; a diferencia de extractos de las semillas que mostraban porcentajes de inhibición de aparición de úlceras gástricas muy por debajo de los extractos antes mencionados (19 vs 87%, respectivamente)⁽²²⁾. Estos resultados muestran concordancia con lo encontrado en nuestro estudio a una dosis de 500 mg/kg, donde se encontraron diferencias significativas en la aparición de lesiones, incluso, mostrando un desempeño mejor al omeprazol. Sin embargo, los resultados de un estudio del año 2006⁽²³⁾, mostraron que los extractos acuosos podrían tener un mejor resultado inhibitorio en modelos animales de inducción de úlceras gástricas con etanol, incluso comparables con extractos alcohólicos.

Se ha determinado, además, que el *Plantago major* L posee efectos anti-*Helicobacter pylori*^(24,25) lo que se pensaba antes, explicaba los resultados observados en el uso tradicional en la población; la presencia de componentes como mucílagos, pectinas, flavonoides, taninos y glucósidos^(26,27); explican este efecto no solo curativo, sino protector ante lesiones gástricas.

La no diferencia significativa en el presente estudio nos indica, a favor del grupo del extracto alcohólico de *Plantago major*, que tanto las ratas que fueron administradas con omeprazol y con el extracto alcohólico, tuvieron la misma capacidad de protección gástrica y, por lo tanto, el número de lesiones fue menor en ambos grupos de estudio, con esto se evidencia que la variable en prueba es verdadera en el estudio anteriormente mencionado.

Sabag *et al.* plantearon la elaboración de un fitofármaco con acción gastroprotectora en forma de gel, elaborado a partir del extracto etanólico de *Plantago major* L, a una dosis de 50 mg/kg, donde se observaron efectos gastroprotectores similares al extracto puro en animales de experimentación⁽²⁸⁾. Estas experiencias acordes a nuestro estudio, nos permiten recomendar que estudios futuros ya deben orientarse a la elaboración de fitofármacos que sean bien tolerados por la población con una farmacocinética similar a los extractos alcohólicos; si bien es cierto, aún los estudios sobre los efectos gastroprotectores de *Plantago major* L. son escasos⁽¹¹⁾, esta especie vegetal presenta un potencial en investigación científica que no se debería dejar de lado.

Este trabajo podría constituirse como evidencia preliminar para futuros estudios en modelos animales, orientados al desarrollo de un fitofármaco, con un mejor diseño y mejores herramientas de investigación. Una de las limitaciones mayores fue que, por motivos administrativos,

no se pudieron calcular índices de inhibición ulcerogénica que hubieran permitido realizar una mejor comparación de los resultados objetivos presentados. Otra limitación que se pudo observar en este estudio es que el grado de gastrolesividad causado por el ketorolaco administrado en terapia analgésica-antiinflamatoria estomatológica fue de baja intensidad ⁽¹⁶⁾, ya que produjo erosiones superficiales; esto podría deberse a un error en la administración o bien en la elaboración de la solución para provocar las lesiones,

por lo que se recomienda mejorar estos aspectos para lograr resultados más confiables.

Finalmente, se concluye que la administración del extracto alcohólico del *Plantago major* L. (llantén) vía oral a una dosis de 500 mg/kg, posterior a la administración de ketorolaco, presentó una eficacia similar a la administración de omeprazol vía oral posterior a la ingesta de AINE en un modelo murino experimental.

Referencias bibliográficas

- Dionne RA, Gordon SM, Cooper SA. Use of Ibuprofen in Dentistry. En: Rainsford KD, editor. Ibuprofen [Internet]. John Wiley & Sons, Ltd; 2015. p. 346–62. Disponible en: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9781118743614.ch8/summary>
- Melcarne L, García-Iglesias P, Calvet X. Management of NSAID-associated peptic ulcer disease. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 2 de junio de 2016;10(6):723–33.
- Moro MG, Sanchez PKV, Gevert MV, Baller EM, Tostes AF, Lupepsa AC, et al. Gastric and renal effects of COX-2 selective and non-selective NSAIDs in rats receiving low-dose aspirin therapy. *Braz Oral Res*. 28 de noviembre de 2016;30(1):e127.
- Fanelli A, Ghisi D, Fanelli G. Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs (NSAIDs) in clinical practice: managing gastric and cardiovascular risks. *Acta Bio-Medica Atenei Parm*. 1 de septiembre de 2013;84(2):98–101.
- Scheiman JM. Prevention of NSAID-Induced Ulcers. *Curr Treat Options Gastroenterol*. abril de 2008;11(2):125–34.
- Scheiman JM, Hindley CE. Strategies to optimize treatment with NSAIDs in patients at risk for gastrointestinal and cardiovascular adverse events. *Clin Ther*. abril de 2010;32(4):667–77.
- Samuelson AB. The traditional uses, chemical constituents and biological activities of *Plantago major* L. A review. *J Ethnopharmacol*. 1 de julio de 2000;71(1):1–21.
- Ringbom T, Segura L, Noreen Y, Perera P, Bohlin L. Ursolic acid from *Plantago major*, a selective inhibitor of cyclooxygenase-2 catalyzed prostaglandin biosynthesis. *J Nat Prod*. octubre de 1998;61(10):1212–5.
- Zubair M, Ekholm A, Nybom H, Renvert S, Widen C, Rumpunen K. Effects of *Plantago major* L. leaf extracts on oral epithelial cells in a scratch assay. *J Ethnopharmacol*. 14 de junio de 2012;141(3):825–30.
- Zubair M, Nybom H, Lindholm C, Brandner JM, Rumpunen K. Promotion of wound healing by *Plantago major* L. leaf extracts—ex-vivo experiments confirm experiences from traditional medicine. *Nat Prod Res*. 2016;30(5):622–4.
- Abud MA, Molina A, Wendel G, Juan Hikawczuk VE, Pelzer L, María AO, et al. Gastroprotective Effects of *Plantago major* and Metabolites in Rats. *Lat Am J Pharm*. 2012;31(8):1203–6.
- Pinto Dávalos J, Bustamante García Z. Evaluación de la actividad gastroprotectora de los extractos de llantén (*Plantago major*). *BIOFARBO*. /;36.
- Cordeiro CHG, Sacramento LVS do, Corrêa MA, Pizzolitto AC, Bauab TM. Herbal extracts in an experimental mouthwash: pharmacognostics analysis and antibacterial activity. *Rev Bras Ciênc Farm*. septiembre de 2006;42(3):395–404.
- Freitas AG, Costa V, Farias ET, Lima MCA, Sousa IA, Ximenes EA. Atividade antiestafilocócica do *Plantago major* L. *Rev Bras Farmacogn*. 2002;12:64–5.
- The World Medical Association. Declaración de la AMM sobre el Uso de Animales en la Investigación Biomédica [Internet]. 2016 [citado 2 de marzo de 2017]. Disponible en: <https://www.wma.net/es/policias-post/declaracion-de-la-amm-sobre-el-uso-de-animales-en-la-investigacion-biomedica/>
- Granados-Soto V, Flores-Murrieta FJ. Pharmacokinetics of oral ketorolac in the rat. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*. octubre de 1995;17(8):535–8.
- Rojó Amigo A. Cálculo del tamaño muestral en procedimientos de experimentación con animales. Valoración de las incidencias. *Anim Lab*. 2014;62:31–3.
- Neira C, Sedano E, Vilcarromero M. Técnicas microscópicas. Facultad de Medicina. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2002.
- León Vásquez M. Efecto antiulceroso del extracto hidroalcohólico de *Plantago lanceolata* (llantén menor) sobre la úlcera gástrica inducida en ratas [Internet] [Tesis (Mg. en Farmacología)]. [Lima]: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2016 [citado 15 de agosto de

- 2017]. Disponible en: <http://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/cybertesis/5471>
20. Zamalloa Chávez Y, Tuni P, Reyna R. Evaluación del efecto citoprotector gástrico y efecto hepatoprotector del extracto seco hidroalcohólico al 70 % de *Plantago major* L. (llantén) en animales de experimentación [Internet] [Tesis para optar al título profesional de químico farmacéutico.]. [Cusco]: Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco; 2011 [citado 15 de agosto de 2017]. Disponible en: <http://repositorio.unsaac.edu.pe/handle/UNSAAC/1067>
 21. Yesilada E, Sezik E, Fujita T, Tanaka S, Tabata M. Screening of some Turkish Medicinal Plants for their Antiulcerogenic Activities. *Phytother Res U K*. 1993;7(1):263–5.
 22. Atta AH, Nasr SM, Mounair SM. Antiulcerogenic effect of some plants extracts. *Nat Prod Radiance*. 2005;4(4):258–63.
 23. Phipps ME, Mahmood AA. Gastroprotective Activity of *P. Major* in Rats. *Int J Trop Med*. 2006;1(1):36–9.
 24. Castillo-Juárez I, González V, Jaime-Aguilar H, Martínez G, Linares E, Bye R, *et al*. Anti-*Helicobacter pylori* activity of plants used in Mexican traditional medicine for gastrointestinal disorders. *J Ethnopharmacol*. 18 de marzo de 2009;122(2):402–5.
 25. Claros P. M, Bilbao R. P, Damiani M. E, Gonzales D. E, Estensoro C. M, Alvarez A. MT. Actividad anti-*Helicobacter pylori* de *Plantago major*, *Clinopodium bolivianum*, *Caléndula officinalis* y *Piper angustifolium* por el método de difusión de disco. *BIOFARBO*. 2007;15(1):37–42.
 26. Nazarizadeh A, Mikaili P, Moloudizargari M, Aghajanshakeri S, Javaherypour S. Therapeutic Uses and Pharmacological Properties of *Plantago major* L. and its Active Constituents. *J Basic Appl Sci Res*. 2013;3(9):1–10.
 27. Miraj S. A review study of pharmacological properties of *Plantago major* L. *Pharma Chem*. 2016;8(17):21–5.
 28. Sabag Asfura VA, Pinto Dávalos J, Zabalaga Vía S, Camacho Aramayo M. Formulación de un fitomedicamento con actividad gastroprotectora a partir de extractos de llantén (*Plantago major*). *BIOFARBO*. 2010;18(2):44–52.