

Fotodegradación y fototoxicidad del fármaco clozapina

Franklin Vargas^{1*}, Eleonora Tropper¹ y Jhon Rafael Gavidia²

¹Laboratorio de Fotoquímica, Centro de Química, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas IVIC, Apartado 21827. Caracas 1020-A, Venezuela.

²Instituto Universitario de Tecnología "IUT-Región Capital. Caracas, Venezuela.

Recibido: 26-01-2000 Aceptado: 15-12-2000

Resumen

Los estudios de la clozapina han mostrado que esta droga experimenta fotoreacciones tales como la ruptura homolítica del enlace piperazinil-diazepina produciendo cuatro fotoproductos. La abstracción de hidrógeno por el estado excitado triplete o los radicales libres intermedarios parecen ser el origen de la hemólisis de las células rojas de la sangre fotosensibilizadas por clozapina. El ensayo de fotohemólisis ha sido usado, como una prueba de fototoxicidad *in vitro*, para evidenciar la implicación de los radicales libres en el daño de la membrana celular en el proceso de fotosensibilización de la piel por clozapina.

Palabras clave: Clozapina; fotodegradación; fotoquímica; fototoxicidad.

Photodegradation and phototoxicity of the drug clozapine

Abstract

Photochemical studies on clozapine have shown that this drug undergoes photoreactions such as homolytic rupture of the piperazinil-diazepine bond producing four photoproducts. Hydrogen abstraction by the triplet state or the intermediate free radicals appears to be the cause of the red blood cells hemolysis photosensitized by clozapine. The photohemolysis assay has been used, as an *in vitro* phototoxicity test, to evidence the involvement of radical-mediated cellular membrane damage in the skin photosensitization by clozapine.

Key words: Clozapine; photochemistry; photodegradation; phototoxicity.

Introducción

La fototoxicidad puede definirse como una respuesta cutánea anormal que ocurre como un resultado de la exposición a la luz ultravioleta (UV) o visible y está asociada con la presencia de un xenobiótico, que puede estar presente en forma local en la piel o sistémica en el cuerpo y que, de esta manera, actúa como agente fotosensibilizante (1-4). Existe un gran número de fármacos de estructuras diversas que presentan este

comportamiento, de los cuales hemos tomado como novel estudio a uno de ellos, la droga antipsicótica clozapina (5-8). La finalidad de este trabajo ha sido la de elucidar el mecanismo de fototoxicidad inducida por dicho medicamento, empleando para su logro los ensayos fotoquímicos y de fototoxicidad *in vitro* ya establecidos.

Los resultados *in vitro* expuestos aquí deben tener una alta correlación con los efectos fotobiológicos observados *in vivo* y

* Autor para la correspondencia

podría contribuir así a solucionar los efectos colaterales de este fármaco. Se quiere lograr con esto, hacer un llamado a la reflexión a médicos, farmacéuticos, empresarios productores de fármacos y gerentes de tales industrias para que se realice un estudio más detallado de aquellos fármacos de consumo masivo que de por sí causan tantos efectos adversos no deseables. Así como también se hace un llamado de alerta a los afectados, y a la comunidad, que por ignorancia del tema se expone a dichos riesgos.

Se estudia el fármaco de nombre comercial LEPONEX (Laboratorios Sandoz) cuyo principio activo es la clozapina (Figura 1) (8-cloro-11-(4-metil-1-piperazinil)-5H-dibenzo[b,e][1,4]diazepina, **1**), debido a los estudios clínicos en donde se reportan las reacciones adversas de fotosensibilización en los pacientes a los cuales se les administró el fármaco, además de los otros efectos colaterales como la leucocitosis (sin explicación), granulocitopenia, agranulocitosis, reacciones cutáneas, y de muerte repentina esporádica (9-11). La clozapina pertenece al grupo de fármacos derivados de las benzodiazepinas, las cuales en general causan reacciones de fotodermatitis, como ha sido reportado en muchos estudios clínicos (12-14). Además, la clozapina esta relacionada

con efectos de fotosensibilidad en estos pacientes. Este fármaco se describe como agente antipsicótico, indicado específicamente para el tratamiento de la esquizofrenia, en los pacientes que no responden a neurolépticos clásicos o no los toleran (15-18).

Nuestra atención se centra sobre los procesos fototóxicos, cuyo mecanismo implica absorción de luz por el fármaco, para llegar a un estado excitado, desde el cual puede ocurrir lo siguiente: a) transferencia de energía a sustratos biológicos, b) transferencia electrónica, c) generación de especies activas del oxígeno (oxígeno singlete, anión radical superóxido, radicales hidroxilo, etc.), d) unión covalente a sustratos biológicos (proteínas), e) formación de especies intermediarias de vida media corta (p. ej. radicales libres) que interaccionan con las células en su entorno, o la formación de fotoproductos estables tóxicos. Se hizo una evaluación experimental de cada uno de estos procesos como se describe mas adelante. El último (e) permite proponer un mecanismo para la formación de fotoproductos, implicando diferentes especies intermediarias altamente reactivas, significativas con relación a toda la acción fototóxica del fármaco.

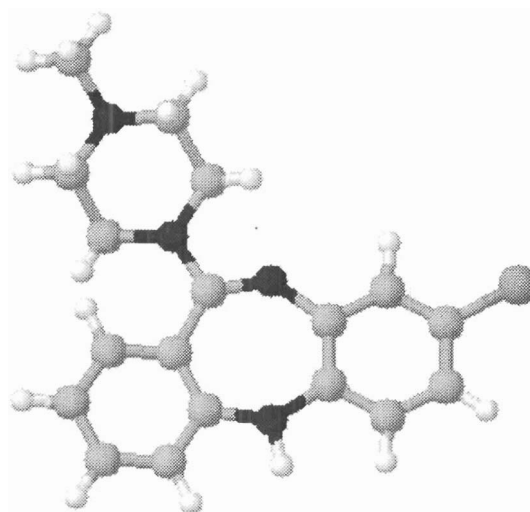
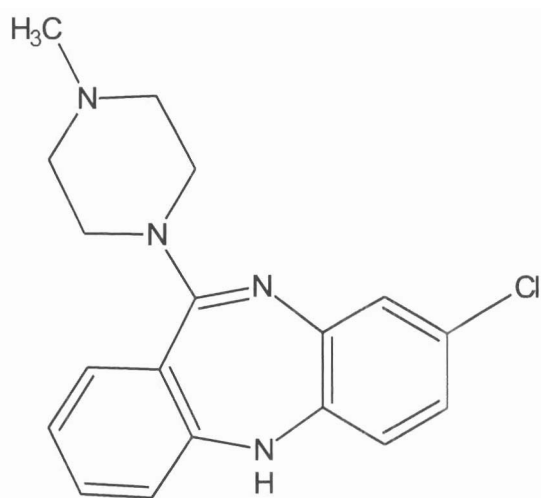


Figura 1. Estructura de la clozapina.

Materiales y Métodos

Tocoferol (vitamina E) y albumina humana fue obtenido de Sigma (St. Louis, MO, USA), azida de sodio (NaN_3), ácido ascórbico (vitamina C), butilato de hidroxianisol (BHA), 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octano (DABCO), glutatión reducido (GSH), histidina, 2,5-dimetilfurano (2,5-DMF) y rosa de bengala fueron obtenidos de Aldrich (Steinheim, Germany). Muestras de sangre completa y de puros eritrocitos aislados fueron obtenidas frescas de la planta de plasma QUIMBIOTEC (IVIC). Todos los solventes analíticos o de grado HPLC fueron obtenidos de Merck (Darmstadt, Germany). Los análisis espectroscópicos de rutina fueron realizados para $^1\text{H-NMR}$ en un equipo Bruker Aspect 3000, 300 MHz, FT IR en un Nicolet DX V 5.07 y masas en un Carlo Erba/Kratos MS25RFA.

Aislamiento del principio activo

La clozapina se extrajo del medicamento comercial LEPOXEX (laboratorios SANDOZ), a través de un extractor soxlet empleando como solvente acetona a 30°C . Luego de agitar la mezcla por un tiempo de 24 h para garantizar la total extracción del principio activo, se filtró una solución amarillenta y se evaporó el solvente a presión reducida. El sólido amarillo residual fue pesado y calculada su pureza utilizando una balanza analítica y la técnica de espectroscopía $^1\text{H-NMR}$ y espectrofotometría de UV-visible.

Ensayos fotoquímicos

Ensayos de fotodegradación: La clozapina se irradia bajo dos condiciones:

- Irradiación en luz visible UV-A (320-400 nm): Se irradia el principio activo disuelto en una mezcla de diclorometano-metanol (80:20) a temperatura ambiente y en condiciones aeróbicas con una lámpara OSRAM HQL de 250W con filtro envoltorio para UV-B por un tiempo de 48 h. Esta mostró una salida espectral entre 320-400 nm con un máximo de 370 nm con una total irra-

diancia de 17 mW/cm^2 , la cual fue medida con un radiómetro digital UVX luego de una hora de continua iluminación. El curso de la reacción fue seguido mediante un equipo espectrofotómetro de UV-Visible MILTON ROY-Spectronic 3000 array (Milton Roy Company-USA).

- Irradiación en UV-B (290-320 nm): La clozapina se irradia a temperatura y en condiciones aeróbicas durante 72 h en una mezcla de diclorometano-metanol mediante un fotorreactor RAYONET (modelo RPR-100, Southern New England Ultraviolet Company-USA) equipado con 8 lámparas fosforescentes de presión media con un máximo de emisión de 300 nm (23 mW/cm^2 de irradiancia). El curso de la fotodegradación se registró a diferentes tiempos de irradiación mediante técnicas de espectrofotometría y cromatografía de capa fina.

La distancia entre las fuentes de luz y las celdas de irradiación de cuarzo fue en ambos casos de 10 cm.

Después de la irradiación, el solvente se evapora a presión reducida (12 torr) a temperatura ambiente. Luego se prepararon soluciones de clozapina sin irradiar y clozapina irradiada de concentraciones molares de 1×10^{-3} y 1×10^{-1} utilizando como diluyente una mezcla de diclorometano y metanol. Estas soluciones fueron analizadas con un equipo de HPLC (HPLC, Waters Delta Prep 4000) equipado con una columna analítica de Porasil 125A usando $\text{MeOH/CH}_2\text{Cl}_2$ en gradiente como fase móvil a una velocidad de flujo de 0.6 mL min^{-1} , con registros a 230 y 280 nm.

Análogamente se prepararon soluciones de clozapina no irradiada e irradiada utilizando como diluyente metanol deuterado. Estas muestras fueron analizadas en equipos de RMN ^1H y cromatografía de gases acoplado a un espectrofotómetro de masas (GC-Masa).

Ensayo de generación de oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$): Para verificar la posible generación y reacción de oxígeno singlete durante la irradiación de la clozapina (concentración 1×10^{-1} molar) con UV-A, esta fue comparada con una solución control de: Rosa de Bengala (eficiente sensibilizador y generador de oxígeno singlete), metanol y 2,5 -dimetilfurano (2,5-DMF atrapador eficiente de oxígeno singlete) y se burbujea oxígeno puro a la solución durante el proceso de irradiación. Este proceso se siguió por cromatografía de gases acoplado a un espectrofotómetro de masas para ambas reacciones (19).

Separación y caracterización de los fotoproductos

Para separar los fotoproductos se utilizó la técnica de cromatografía preparativa en silica gel como fase estacionaria. La fase móvil fue una solución de $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (80:20). La separación de los fotoproductos y su pureza fue seguida por HPLC bajo las condiciones anteriormente mencionadas.

Los fotoproductos aislados fueron analizados por espectroscopía de IR, RMN y cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas.

Ensayos de fototoxicidad *in vitro*

Hemólisis de eritrocitos humanos fotoinducida por el principio activo clozapina: Para el experimento de fotohemólisis se obtuvo una suspensión de eritrocitos (glóbulos rojos), a partir de la centrifugación de sangre humana completa previamente lavados 3 veces con una solución salina de buffer fosfato (PBS) de pH 7,4. El sobrenadante se elimina para poder obtener los glóbulos rojos. Se prepararon soluciones de glóbulos rojos en PBS. Luego se procedió a medir sus valores de absorbancia hasta obtener una lectura entre 0,600 y 0,800 a 650 nm, esto con la finalidad de tener en solución una cantidad aproximada de $3,3 \times 10^6$ células/mL (20).

Se colocaron a irradiar en el rango correspondiente al UV-A tres muestras en celdas de cuarzo, las cuales estaban compuestas por:

- Muestra 1: sangre + PBS.
- Muestra 2: sangre + PBS + clozapina 1×10^{-3} M.
- Muestra 3: idéntica a la anterior pero utilizada como control en la oscuridad.

Se preparan las mismas muestras 1 y 2, y se colocan a irradiar en el rango de longitud de onda correspondiente al UV-B.

Hemólisis de eritrocitos humanos fotoinducida por los fotoproductos de la clozapina: Después de la irradiación de una solución 1×10^{-5} M de clozapina bajo una fuente de UV-B durante 48 h, una mezcla de fotoproductos aislados de ella, fue utilizada para ser evaluada mediante el ensayo de fotohemólisis utilizando un procedimiento similar al anteriormente descrito.

Hemólisis de eritrocitos humanos fotoinducida por la clozapina en presencia de diferentes aditivos: Se realizó el mismo procedimiento anterior pero ahora en presencia de aditivos antioxidantes como:

- Ácido ascórbico (vitamina C) que funciona como antioxidante.
- Glutatión reducido (GSH), atrapador de radicales libres.
- Azida de sodio (NaN_3) atrapador de oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$)
- 1,4 Diazabicyclo(2.2.2)octano (DABCO) atrapador de oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$).
- Tocoferol (vitamina E) atrapador de radicales libres.

Además, se prepararon muestras de control en la oscuridad. Se procedió al análisis espectrofotométrico de manera análoga al procedimiento anterior. Todos los experi-

mentos fueron realizados 3 veces por separado.

Fotodegradación de la clozapina en presencia de albúmina humana: Se estudió la fotorreacción de la clozapina 1×10^{-4} molar en presencia de la albúmina humana de 1×10^{-5} molar. Para ello se utilizó un espectrofluorómetro RF-1501 SHIMADZU. Se detectaron las longitudes de onda de emisión y excitación de la albúmina (21). Análogamente, se realizó la misma experiencia pero, utilizando un control en la oscuridad.

Resultados y Discusión

La fotodescomposición de la clozapina en metanol fue seguida mediante espectrofotometría de UV-Vis. La degradación de esta droga fue notablemente observada bajo irradiación UV-B (290-320 nm). Como se muestra en la Figura 2 un decrecimiento pronunciado de las bandas de máxima absorción de 220, 235, 260 y 300 nm pudo ser registrada a intervalos de irradiación de 5 min. Por el contrario bajo irradiación UV-A (320-400 nm) la fotodegradación fue muy lenta, 78 h para una solución similar.

La fotodegradación bajo irradiación UV-B produjo 4 fotoproductos (Figura 3) caracterizados a continuación:

- Compuesto **2**: (30% rendimiento).-I.R. (KBr)v: 3000, 2900, 2820, 2780, 1550, 1420, 1000, 720. ^1H RMN (CD_3OD) δ : 3,42 (br.s, 1H, NH); 2,50 (t, $J = 2$ Hz, 4H, $-\text{CH}_2$); 2,35 (t, $J = 2$ Hz, 4H, $-\text{CH}_2$); 2,13 (s, 3H, N- CH_3). MS m/z (%): 100 (M^+ , 22), 85 (10), 70 (100), 56 (12), 43 (24), 42 (20).
- Compuesto **3**: (21%).-I.R. (KBr)v: 3400, 3048, 2850, 2810, 1600, 1300, 1220, 1180, 860, 748. ^1H RMN (CD_3OD) δ : 8,06 (s, 1H, H-aromático); 7,90 (d, 2H, H-aromático); 7,82 (m, 1H, H-aromático); 7,40 (d, 1H, H-aromático); 7,32 (m 1H, H-aromático); 7,20 (m, 1H, H-aromático); 3,78 (s, 3H, $-\text{OCH}_3$); 3,20 (br.s, 1H, $-\text{NH}$). MS m/z (%): 274 (M^+ , 30), 243 (60), 239 (100), 149 (14), 91 (25), 52 (8), 39 (6).
- Compuesto **4**: (34%).-I.R. (KBr)v: 3400, 3350, 3050, 3000, 1549, 1290, 1200, 1190, 860, 745. ^1H RMN (CD_3OD) δ : 8,00 (s, 1H, H-aromático); 7,92 (d, 2H, H-aromático); 7,88 (m, 1H, H-aro-

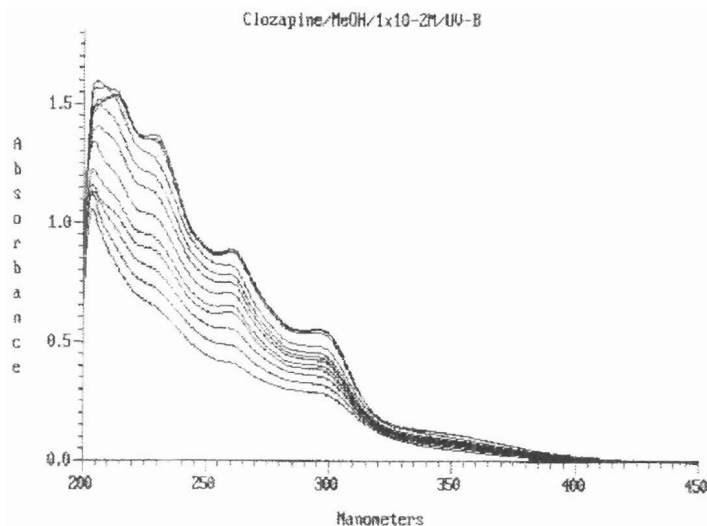


Figura 2. Fotodegradación de clozapina monitoreado por espectrofotometría UV-Vis a intervalos de 5 min.

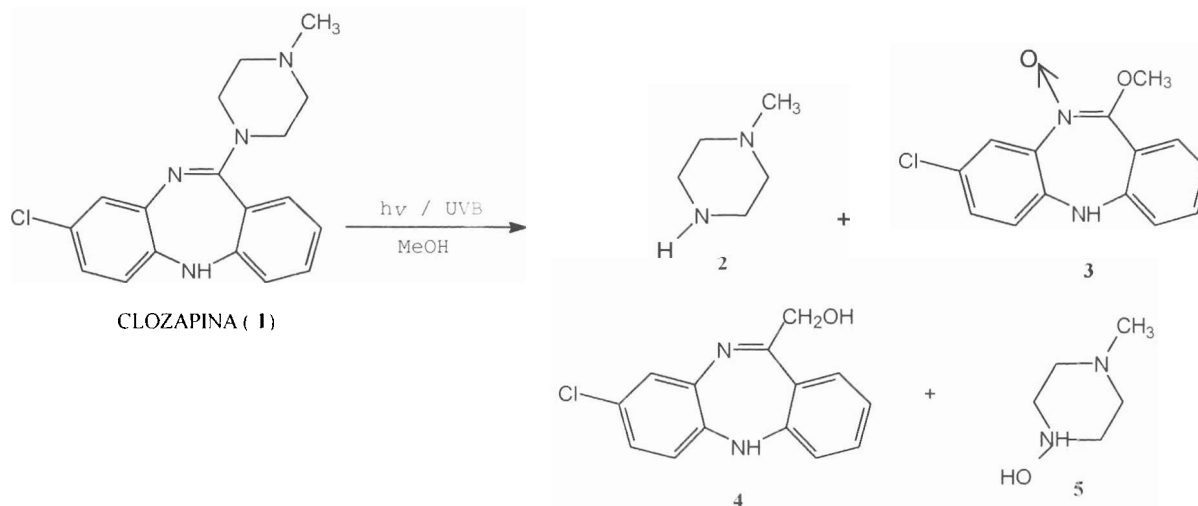


Figura 3. Esquema de la fotodegradación de la clozapina en UVB.

mático); 7,38 (d, 1H, H-aromático); 7,30 (m 1H, H-aromático); 7,15 (m, 1H, H-aromático); 3,50 (s, 3H, -CH₂); 3,16 (br.s, 1H, -NH); 3,02 (br.s, 1H, -OH). MS m/z (%): 258 (M⁺, 38), 227 (42), 223 (100), 136 (23), 91 (12), 51 (23), 42 (10), 39 (6).

- Compuesto **5**: (15%).-I.R. (KBr)v: 3480, 3200, 2910, 2826, 2784, 1412, 1080, 712. ¹H RMN (CD₃OD) δ: 3,20 (br.s, 1H, N-OH); 2,56 (t, J = 2 Hz, 4H, -CH₂); 2,35 (t, J = 2 Hz, 4H, -CH₂); 2,12 (s, 3H, N-CH₃). MS m/z (%): 117 (M⁺, 6), 102 (15), 100 (23), 99 (12), 70 (100), 56 (18), 42 (21).

La fotólisis de la clozapina no mostró la generación de oxígeno singlete. Así fue evidenciado en la irradiación de esta droga en presencia de 2,5-DMF y su comparación en presencia de Rosa de Bengala (excelente generador de oxígeno singlete) usado como muestra control (22).

Los efectos fototóxicos de la clozapina fueron estudiados mediante las pruebas de fotohemólisis en eritrocitos humanos. Los resultados mostrados en la Figura 4 son representación final del promedio de tres experimentos realizados por separado para

cada registro de datos. El efecto fotohemolítico fue pronunciado entre 6 y 8 min (80-90% de hemólisis) de irradiación de los eritrocitos en presencia de clozapina. Las muestras en la oscuridad o irradiadas en ausencia de la droga no mostraron este efecto hemolítico. Para determinar el mecanismo de fotohemólisis inducido por la clozapina, las muestras fueron irradiadas en presencia de desactivadores de oxígeno singlete (¹O₂ quenchers) como azida de sodio y DABCO (22-24). La adición de estos activadores no mostró ningún efecto de protección contra el proceso de fotohemólisis inducido por la clozapina, mostrando un similar comportamiento que sin ellos. Por el contrario en presencia de antioxidantes atrapadores selectivos de radicales libres como el glutatión reducido (GSH) y la vitamina E (tocoferol) hubo un detenimiento de este proceso (Figura 4). El efecto de fotohemólisis producido por la clozapina sobre los eritrocitos fue detenido en un 60 a 70% respectivamente. La adición de vitamina C como antioxidante fue también relevante, siendo su efecto de protección ante este proceso de un 60%.

En ensayos similares los fotoproductos aislados no mostraron ningún efecto fotohemolítico sobre los eritrocitos humanos.

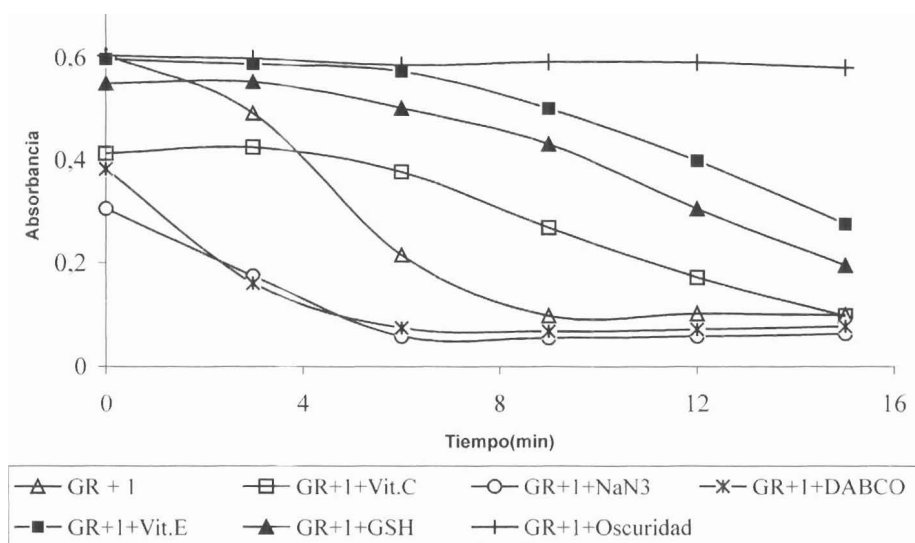


Figura 4. Esquema de fotohemólisis de glóbulos rojos (GR) en presencia de clozapina (1) irradiados en presencia y ausencia de aditivos antioxidantes.

Los ensayos de la fotólisis de la clozapina realizados en presencia de albúmina humana no mostraron ningún efecto de acoplamiento covalente hacia esta proteína. Un cambio esperado en las bandas de emisión en los espectros de fluorescencia de las muestras no fue observado luego de irradiación con luz UV-A o UV-B.

Conclusiones

La clozapina resultó ser fotolábil a las radiaciones UV-B y UV-A. Se identificaron los fotoproductos por medio de las técnicas espectroscópicas de RMN y gases-masa. Se propuso un mecanismo de fotólisis derivado del rompimiento del enlace entre los grupos piperazinil- y dibenzodiazepina, con posterior abstracción de H y OH del solvente para estabilizar los radicales intermediarios formados.

La clozapina resultó ser fototóxica, ya que acelera la hemólisis de los eritrocitos (glóbulos rojos) bajo irradiación UV-B. La clozapina actúa como un agente endógeno promoviendo el daño de las membranas de los glóbulos rojos. No existe evidencia de formación de oxígeno singlete, esto indica, que

muy probablemente el mecanismo de reacción del proceso fototóxico es vía radicales libres. Los desactivadores selectivos de oxígeno singlete, como azida de sodio o DABCO no tuvieron ninguna influencia en el proceso fotohemolítico. Además, se pudo corroborar mediante los ensayos de fotohemólisis llevados a cabo en presencia de antioxidantes selectivos atrapadores de radicales libre, como glutatión reducido y vitamina E (tocoferol), en donde este proceso fue detenido casi en su totalidad.

La Figura 5 esquematiza los procesos alternos de acción fototóxica de una droga fotosensibilizante sobre un medio biológico. En el caso de la clozapina sólo una vía (la de radicales libres) pudo ser comprobada.

Por medio de las técnicas de fluorescencia se comprobó que la clozapina no es capaz de formar una unión covalente a la albúmina humana, lo que indica que no podría producir una especie de hapteno o complejo antígeno-anticuerpo y así inducir a posibles respuestas inmunitarias de tipo fotoalérgica. Nuevos estudios se están desarrollando sobre otro tipo de células como son los linfocitos y los neutrófilos. Estos estudios se están completando y así utilizar

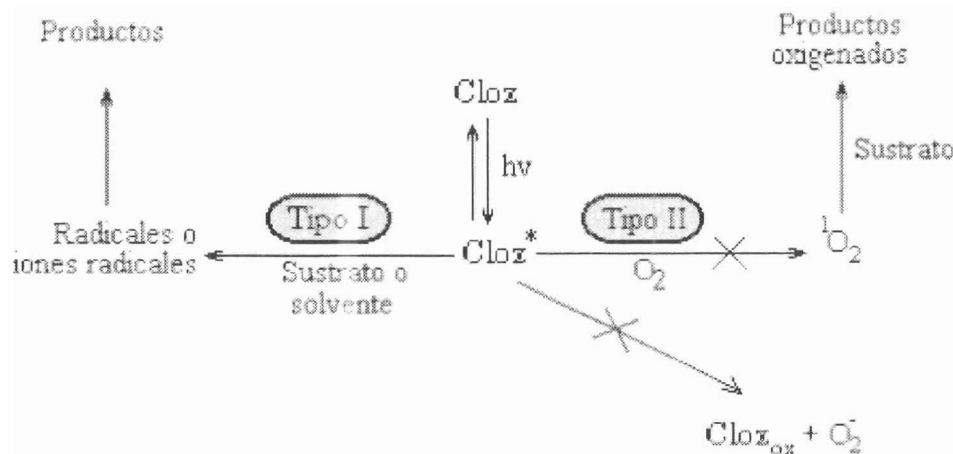


Figura 5. Esquema de los posibles mecanismos de fotodegradación de la droga clozapina (Cloz).

esta útil información para conseguir una formulación adecuada, mejorando el diseño del fármaco, localizando la subestructura responsable de la fototoxicidad e introduciendo modificaciones a este nivel.

El estudio fotoquímico de fármacos permite evaluar su riesgo fotobiológico y, combinado con determinaciones toxicológicas *in vitro*, contribuye al establecimiento de las bases moleculares de la fototoxicidad (25-26). Estos resultados son de mucho interés en la comunidad (consumidores y pacientes clínicos), garantizándole su protección y seguridad mediante el control de la comercialización de nuevos fármacos. Al mismo tiempo tiene el interés de reducir la experimentación animal, validándose como método alternativo a esta experimentación (27).

Agradecimientos

Los autores agradecen a: Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas CONICIT-Venezuela (proyectos S1-2502 y S1-960011724), Embajada Alemana en Venezuela, Fundación Polar, y al Instituto Universitario de Tecnología IUT-Región Capital, por los aportes financieros y académicos proporcionados para el desarrollo de este trabajo.

Referencias Bibliográficas

1. STEMPEL E. *J Am Pharm Assoc* 13: 200-204, 1973.
2. DE GUIDI G., CONDORELLI G., COSTANZO L. L., GIUFFRIDA S., MONTI S., SORTINO S. In ALBINI A., FASANI E. Eds. **Drugs. Photochemistry and Photostability** The Royal Society of Chemistry, Cambridge (U.K.) p. 194-210, 1998.
3. VARGAS F. In Vargas F. Eds. **Modern topics in photochemistry and photobiology**, Reseach Signpost, Trivandrum (India) p. 27-40, 1997.
4. BOSCA F., MIRANDA M. *J Photochem Photobiol B: Biol* 43: 1-26, 1998.
5. SUN C. C. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 5: 42-45, 1988.
6. VARGAS F., CANUDAS N., MIRANDA M. A., BOSCA F. *Photochem Photobiol* 58: 471-476, 1993.
7. VARGAS F., MATSKEVITCH V., SARABIA Z. *Arzneimitt Forsch (Drug Research)* 45: 1079-1081, 1995.
8. VARGAS F., MARTINEZ VOLKMAR I., SEQUERA J., MÉNDEZ H., ROJAS J.K., FRAILE G., VELAZQUEZ M., MEDINA R. *J Photochem Photobiol B: Biol* 42: 219-225, 1998.

9. HOWANITZ E., PARDO M., LOSONCZY M. **J Clin Psychiatry** 56: 589, 1995.
10. DAVIS C. M. **J Fla Med Assoc** 55: 607-610, 1968.
11. HERMAN P. S. **Arch Dermatol** 108: 856-857, 1973.
12. SCHWEDLER S., MEMPEL M., SCHMIDT T., ABECK D., RING J. **Dermatology** 197: 193-194, 1998.
13. KANWAR A. J., RAJEEV G., SWAMI DAS M., SURRENDER K. **Dermatologica** 181: 75, 1990.
14. QUIÑONES D., SANCHEZ I., ALONSO S., GARCIA-ABUJETA J. L., FERNANDEZ L., RODRIGUEZ F., MARTIN-GIL D., JEREZ J. **Contact dermatitis** 39: 84, 1998.
15. JUDGE J. **Psychiatry Serv** 50: 1087, 1999.
16. BROWN T. M. **N Engl J Med** 341: 456, 1999.
17. BARAK Y. **Compr Psychiatry** 40: 320-325, 1999.
18. KELLNER M. **Am J Psychiatry** 150: 985-986, 1993.
19. GOLLNICK K., GRIESBECK A. **Angew Chem Int Ed Engl** 22: 726-728, 1983.
20. VALENZENO D. P., TRANK J. W. **Photochem Photobiol** 4 2: 335-339, 1985.
21. KOCHEVAR I. E., BOUVIER J., LYNCH M., LIN C. W. **Biochim Biophys Acta** 1196: 172-180, 1994.
22. VARGAS F., FUENTES A. **Pharmazie** 52: 328-330, 1997.
23. COSTANZO L. L., De GUIDI G., CONDORELLI G., CAMBRIA A., FAMA M. **Photochem Photobiol** 50: 359-365, 1989.
24. MOORE D. E., CHAPPUIS P. P. **Photochem Photobiol** 47: 173-180, 1988.
25. MIRANDA M. A. Phototoxicity of Drugs In: **Alternative in vitro models to animal experimentation in pharmaco-toxicology**, Castell J. V. Eds.; Farmaindustria: Barcelona. 239-270, 1992.
26. VARGAS F., RIVAS C., CANUDAS N., TORREALBA A., SARABIA Z. **Acta Cientifica Venezolana** 47: 223-230, 1996.
27. INTERNATIONAL CONFERENCE OF HARMONIZATION (ICH), **Tripartite Guideline for the Photostability Testing of New Drug Substances and Products**, Federal Registry, 4th Rev. Draft. Dec. 15, 1994.