

Señor Director
NUEVAS CREACIONES
Superintendencia de Industria y Comercio
E. S. D.

Referencia : Expediente No. **NC2017/0003848**
Asunto : Solicitud de patente para: **“COMPOSICIÓN QUE
COMPRENDE EXTRACTOS DE GUADUA ANGUSTIFOLIA”**
Solicitante : UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA Y KOREA INSTITUTE OF
SCIENCE AND TECHNOLOGY
Fecha de solicitud : 20 de abril de 2017

RESPUESTA A EXAMEN PRELIMINAR

ANDRÉS RINCÓN USCÁTEGUI, identificado como aparece al pie de mi firma, en mi condición de apoderado de la sociedad solicitante de la patente de la referencia, doy respuesta al Oficio 5757, notificado por fijación en lista el 24 de abril de 2017.

I. MODIFICACIONES AL PLIEGO REIVINDICATORIO

Con el fin de atender las observaciones realizadas por el examinador de manera preliminar al examen de patentabilidad, el solicitante decide aportar un nuevo capítulo reivindicatorio conformado por 11 reivindicaciones en las que se han incluido las siguientes modificaciones:

1. La reivindicación 1 ha sido modificada de manera que se ha eliminado la referencia al uso.
2. Las reivindicaciones 2 a 8 han sido eliminadas.
3. Las reivindicaciones 15 a 17 han sido eliminadas.
4. La numeración y dependencias de las reivindicaciones han sido modificadas de acuerdo con los cambios realizados.

“EXCELENCIA LEGAL EN UN MUNDO SIN FRONTERAS”

BOGOTÁ - Edificio Siski - Carrera 4 No. 72 - 35 - Código Postal 110221 - Tel. (57-1) 347 3611 - Fax (57-1) 211 8650 - Fax in U.S.A: (1-305) 675 7743 - COLOMBIA
MEDELLÍN - San Fernando Plaza - Carrera 42 A No. 1 - 25 - Torre 4 - Oficina 303 - Código Postal 050021 - Tel: (57-4) 520 4760 - COLOMBIA
BARRANQUILLA - Calle 64 No. 50-22 - Código Postal 080002 - Barrio El Prado - Tel. (57-5) 3 51 64 40 - COLOMBIA

Estas modificaciones se ajustan al artículo 34 de la Decisión 486 de 2000 y no constituyen una ampliación de la protección que correspondería a la divulgación contenida en la solicitud inicial.

A pesar de eliminar materia del pliego reivindicatorio originalmente presentado, mi representada no renuncia a la protección que pueda obtener sobre dicha materia y se reserva el derecho de presentar una solicitud divisional que la contenga durante el trámite de la presente solicitud.

II. EN CUANTO A LAS OBJECIONES DE SUPUESTA FALTA DE CLARIDAD

En relación con la objeción elevada hacia las reivindicaciones 9 y 10 por no ser clara toda vez que no mencionan excipientes ni las cantidades o proporciones de los mismos, mi representada manifiesta amablemente su desacuerdo ya que según la Guía para el Examen de Solicitudes de Patente de Invención y Modelo de Utilidad: *“Si, por ejemplo, la característica técnica esencial de la composición es el compuesto activo, el examinador no deberá requerir que se mencionen también otras características estructurales.”* Así las cosas, debido a que en este caso el ingrediente activo es el extracto de guadua, no es necesario mencionar ingredientes adicionales tales como excipientes, ni sus proporciones. Además, es importante mencionar que en las reivindicaciones dependientes se mencionan las proporciones del ingrediente activo. Por lo tanto, la objeción a este respecto se debe tener por superada.

III. EN CUANTO A LAS OBJECIONES RELACIONADAS CON EXCLUSIONES A LA PATENTABILIDAD

Teniendo en cuenta que las reivindicaciones 15 a 17 relativas a excepciones a la patentabilidad, particularmente, a métodos de tratamiento, han sido eliminadas del capítulo reivindicatorio, la objeción a este respecto se debe tener por superada.

IV. EN CUANTO A LA INCLUSIÓN DE REIVINDICACIONES DE USO

Teniendo en cuenta que las reivindicaciones 2 a 8 relativas a usos que se le pueden dar a la invención han sido eliminadas del capítulo reivindicatorio, la objeción a este respecto se debe tener por superada.

V. EN CUANTO A LA NECESIDAD DE APORTAR CONTRATO DE ACCESO

En relación con la necesidad de aportar el contrato de acceso a recursos genéticos, mi representada se permite presentar el Auto que admite la solicitud del contrato de acceso a recursos genéticos requerido el 28 de octubre de 2016 por la Universidad de Antioquia. El Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible así mismo ha emitido un requerimiento el 2 de febrero de 2017, para que la Universidad aclare o allegue información adicional. Sin embargo, el Ministerio de Medio Ambiente y Desarrollo Sostenible no ha emitido el contrato de acceso a recursos genéticos. Por lo tanto, se presentan como prueba de la solicitud del contrato de acceso a recursos genéticos el Auto que admite la solicitud, el anexo de la solicitud del contrato de acceso a recursos genéticos realizada, la carta y correo electrónico que acompañó dicha solicitud de contrato de acceso en octubre de 2016, y el documento donde el Ministerio requiere información adicional para emitir el contrato de acceso. En consecuencia, la objeción a este respecto se debe tener por superada.

VI. EN CUANTO AL PAGO DE TASA ADICIONAL POR EL NÚMERO DE REIVINDICACIONES

Presento junto con este escrito el comprobante de pago de tasa adicional para el estudio de 1 reivindicación adicional.

VII. PETICIÓN

Teniendo en cuenta que la presente solicitud cumple con los requisitos de los Artículos 26 y 27 de la Decisión 486 de 2000 y considerando que se ha dado respuesta a cada una de

las observaciones de la Dirección de Nuevas Creaciones con respecto a otros aspectos que tienen que ver con la patentabilidad de la invención, solicito a su Despacho continuar con el trámite administrativo correspondiente.

VIII. ANEXOS

1. Nuevo pliego reivindicatorio conformado por 11 reivindicaciones;
2. Pago en línea de tasa por reivindicaciones adicionales;
3. Copia del Auto que admite la solicitud de contrato de Acceso a Recursos Genéticos;
4. Anexo de la solicitud del contrato de acceso a recursos genéticos realizada;
5. Copia de la carta y correo electrónico que acompañó la solicitud de contrato de acceso en octubre de 2016;
6. Copia del documento donde el Ministerio requiere información adicional para emitir el contrato de acceso;
7. Copia del certificado de Prioridad de la solicitud presentada en Corea.

Señor Director,

ANDRÉS RINCÓN USCÁTEGUI

C.C. 79.780.910 de Bogotá

T.P. 114.908

CAPÍTULO REIVINDICATORIO

- 1.** Una composición que comprende un extracto de bambú Guadua como un ingrediente activo.
- 2.** La composición de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el bambú Guadua comprende Guadua angustifolia.
- 3.** La composición según la reivindicación 2, en el que el extracto de bambú Guadua comprende el extracto de partes aéreas de bambú Guadua.
- 4.** La composición según la reivindicación 3, en el que el extracto de bambú Guadua comprende el extracto de hojas de bambú Guadua.
- 5.** La composición de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el extracto se obtiene usando disolventes de extracción que comprende agua, alcohol C₁-C₆, acetona o disolvente mixto de los mismos.
- 6.** La composición según la reivindicación 5, en el que el extracto de bambú Guadua se obtiene usando un disolvente de extracción que comprende metanol o etanol.
- 7.** La composición de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la composición comprende una fracción obtenida por una secuencia del fraccionamiento del extracto de bambú Guadua, en donde al menos uno de los siguientes disolventes; n-hexano, diclorometano, acetato de etilo, n-butanol se utiliza después de la extracción con metanol o etanol y una suspensión en agua.
- 8.** El método de la reivindicación 1, donde la composición es una solución de un producto liofilizado del extracto de bambú Guadua disuelto en un disolvente.
- 9.** El método de la reivindicación 8, en el que el disolvente es dimetil sulfóxido (DMSO).

10. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el extracto de bambú Guadua está comprendido en la composición en una concentración de 5 a 500 $\mu\text{g/ml}$ basado en el peso total de la composición.

11. El método de la reivindicación 10, en el que el extracto de bambú Guadua está incluido en la composición a una concentración de 10 a 250 $\mu\text{g/ml}$ basado en el peso total de la composición.



MINISTERIO DE AMBIENTE Y DESARROLLO SOSTENIBLE

AUTO No. 633

(22 DIC 2016)

"Por el cual se admite una solicitud de Contrato de Acceso a Recursos Genéticos y sus Productos Derivados para el proyecto: "Composición que comprende extractos de Guadua angustifolia para la prevención o el tratamiento de enfermedades de la retina".

EL DIRECTOR DE BOSQUES, BIODIVERSIDAD Y SERVICIOS ECOSISTÉMICOS

En ejercicio de las función establecida en el Numeral 14 del Artículo 16 del Decreto Ley 3570 de 2011 y

CONSIDERANDO:

Que la UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA identificada con Nit 890.980.040-8, a través del Rector; presentó ante este Ministerio mediante radicado E1-2016-028563 del 28 de octubre de 2015, solicitud de contrato marco de acceso a recursos genéticos y sus productos derivados.

Que realizada la revisión inicial de la solicitud, la Dirección de Bosques, Biodiversidad y Servicios Ecosistémicos mediante comunicación radiacada DBD-8201-E2-2016-032095 del 30 de noviembre de 2016 realizó requerimiento a la Universidad para que aportara el certificado de existencia y representación legal de la Universidad y la copia de la cédula de ciudadanía del representante legal.

Que la UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA dió respuesta al requerimiento, mediante comunicación radicada con el número E1-2016-032815 del 16 de diciembre de 2016, aportando los documentos requeridos.

Que la UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA aporta los documentos necesarios para dar inicio al trámite de solicitud de contrato de acceso a recursos genéticos y sus productos derivados.

Que el investigador Freimar Segura Sánchez es el responsable técnico del proyecto.

Que en consecuencia se procederá a ordenar el registro de la solicitud y el inicio de los trámites correspondientes.

CONSIDERACIONES LEGALES

Que el Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible es el organismo rector de la gestión del medio ambiente y de los recursos naturales renovables, encargado de impulsar una relación de respeto y armonía del hombre con la naturaleza y definir en los términos de la Ley 99 de 1993, las políticas y regulaciones a las que se sujetarán la recuperación,

W

"Por el cual se admite una solicitud de Contrato de Acceso a Recursos Genéticos y sus Productos Derivados para el proyecto: "Composición que comprende extractos de Guadua angustifolia para la prevención o el tratamiento de enfermedades de la retina".

conservación y protección, ordenamiento, manejo, uso y aprovechamiento de los recursos naturales renovables con el propósito de asegurar el desarrollo sostenible.

Que el numeral 21, artículo 5 de la Ley 99 de 1993, establece que el Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible tiene como función la de regular, conforme a la ley, la obtención, uso, manejo, investigación, importación, exportación, así como la distribución y el comercio de especies y estirpes genéticas de fauna y flora silvestres, regular la importación exportación y comercio de dicho material genético, establecer los mecanismos y procedimientos de control y vigilancia, y disponer lo necesario para reclamar el pago o reconocimiento de los derechos o regalías que se causen a favor de la Nación por el uso de material genético.

Que la Ley 165 del 9 de noviembre de 1994 "Por medio de la cual se aprueba el "Convenio sobre la Diversidad Biológica", tiene como objetivos la conservación de la diversidad biológica, la utilización sostenible de sus componentes y la participación justa y equitativa en los beneficios que se deriven de la utilización de los recursos genéticos, mediante, entre otras cosas, un acceso adecuado a esos recursos y una transferencia apropiada de las tecnologías pertinentes, teniendo en cuenta todos los derechos sobre esos recursos y a esas tecnologías, así como una financiación apropiada.

Que la Decisión 391 de 1996 de la Comunidad Andina de Naciones estableció el Régimen Común sobre Acceso a los Recursos Genéticos, cuyo objetivo y fines es regular el acceso a los recursos genéticos de los Países Miembros y sus productos derivados.

Que el artículo 16 ibídem establece *"Todo procedimiento de acceso requerirá de la presentación, admisión, publicación y aprobación de una solicitud de la suscripción de un contrato, de la emisión y publicación de la correspondiente Resolución y del registro declarativo de los actos vinculados con dicho acceso."*

Que el Numeral 14 del Artículo 16 del Decreto Ley 3570 del 27 de septiembre de 2011 "Por el cual se modifican los objetivos y la estructura del Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible y se integra el Sector Administrativo de Ambiente y Desarrollo Sostenible" asignó a la Dirección de Bosques, Biodiversidad y Servicios Ecosistémicos, la función de adelantar el trámite relacionado con las solicitudes de acceso a recursos genéticos, aceptar o negar la solicitud, resolver el recurso de reposición que se interponga y suscribir los contratos correspondientes.

Que el artículo 252 de la Ley 1753 de 2015 por la cual se expide el Plan Nacional de Desarrollo 2014-2018 "Todos por un nuevo País" establece que:

"Artículo 252°. Contratos de acceso a recursos genéticos y/o sus productos derivados. Las personas naturales o jurídicas, nacionales o extranjeras, que a la entrada en vigencia de la presente ley hayan realizado o se encuentren realizando actividades de investigación científica no comercial, actividades de investigación con fines de prospección biológica, o actividades con fines comerciales o industriales, que configuren acceso a recursos genéticos y/o sus productos sin contar con la autorización del Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible, tendrán dos (2) años a partir de la entrada en vigencia de la presente ley para solicitar el contrato de acceso a recursos genéticos y sus productos derivados.

Las solicitudes que estén en trámite y que hayan realizado o se encuentren realizando acceso a recursos genéticos y/o sus productos derivados, en las condiciones descritas en el inciso anterior deberán informarlo al Ministerio. Desde la radicación de la solicitud y hasta la celebración y perfeccionamiento del contrato de acceso a recursos genéticos y/o sus

"Por el cual se admite una solicitud de Contrato de Acceso a Recursos Genéticos y sus Productos Derivados para el proyecto: "Composición que comprende extractos de Guadua angustifolia para la prevención o el tratamiento de enfermedades de la retina".

productos derivados o hasta la denegación del trámite, el solicitante podrá continuar accediendo al recurso genético y/o sus productos derivados.

(...)"

Que el citado artículo del Plan Nacional de Desarrollo regula de manera específica y transitoria, las condiciones de materia y tiempo en las cuales las personas naturales o jurídicas que realizaron o están realizando actividades de acceso a recurso genéticos y a sus productos derivados pueden adelantar la solicitud de contrato de acceso a recursos genéticos y sus productos derivados ante el Ministerio.

Que de conformidad con el procedimiento previsto en la Resolución 620 de 1997 y lo dispuesto en el Artículo 252 de la Ley 1753 de 2015, para el trámite de acceso a recurso genético, esta Dirección analizó preliminarmente la solicitud presentada por la UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA y determinó que cumple con los requisitos señalados para dar inicio al trámite de la solicitud.

En mérito de lo expuesto,

DISPONE:

ARTÍCULO 1.- Admitir la solicitud de Contrato de Acceso a Recursos Genéticos y sus Productos Derivados presentada por la UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA identificada con Nit 890.980.040-8, para el proyecto denominado: "Composición que comprende extractos de Guadua angustifolia para la prevención o el tratamiento de enfermedades de la retina".

ARTÍCULO 2.- Iniciar el trámite previsto en la Decisión Andina 391 de 1996, en el artículo 252 de la Ley 1753 de 2015 y en la Resolución 620 del 7 de julio de 1997 expedida por este Ministerio y relacionarla con el procedimiento de las solicitudes de Contrato de Acceso a Recursos Genéticos y sus Productos Derivados.

ARTÍCULO 3.- Inscribir la solicitud presentada por la UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA, para el proyecto denominado "Composición que comprende extractos de Guadua angustifolia para la prevención o el tratamiento de enfermedades de la retina", en el Registro Público de Acceso a Recursos Genéticos. Expediente RGE0184.

ARTÍCULO 4.- La UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA, deberá realizar a su costa y dentro de los cinco (5) días hábiles siguientes a la notificación del presente auto, la publicación de un extracto de la solicitud de contrato de acceso a recursos genéticos y sus productos derivados el cual deberá contener cuando menos el número y la fecha del Auto de inicio, la información del solicitante y el título del proyecto; esta publicación la debe hacer en cualquier medio de comunicación de la localidad en donde se realizaron las actividades de acceso a los recursos genéticos. La publicación se realiza a efectos de que cualquier persona interesada suministre la información que considere pertinente. Copia de la publicación deberá allegarse a este Ministerio, con destino al expediente RGE0184.

ARTÍCULO 5. Dispóngase la publicación del presente Acto Administrativo, en la página web del Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible.

ARTÍCULO 6.- Notificar el contenido del presente acto administrativo a la UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA, a través del representante legal o de su apoderado debidamente constituido.

"Por el cual se admite una solicitud de Contrato de Acceso a Recursos Genéticos y sus Productos Derivados para el proyecto: "Composición que comprende extractos de Guadua angustifolia para la prevención o el tratamiento de enfermedades de la retina".

ARTÍCULO 7.- Contra este acto administrativo no procede por vía gubernativa ningún recurso, por tratarse de un acto administrativo de trámite de conformidad con el artículo 75 de la Ley 1437 del 18 de enero de 2011. "Por la cual se expide el Código de Procedimiento Administrativo y de lo Contencioso Administrativo."

NOTIFÍQUESE, PUBLÍQUESE Y CÚMPLASE

Dada en Bogotá D.C., a los 22 DIC 2016



TITO GERARDO CALVO SERRATO

Director de Bosques, Biodiversidad y Servicios Ecosistémicos

Expediente RGE0184

Revisó: Paula Rojas Gutierrez – Coordinadora Grupo de Recursos Genéticos. DBBS

Proyectó: Luz Helena Escobar M– Abogada – Contratista. MADS. 

ANEXO

SOLICITUD DE ACCESO A RECURSOS GENETICOS

IDENTIFICACION

I. SOLICITANTE O REPRESENTANTE LEGAL

I.1. IDENTIFICACION

Nombre o Razón Social Universidad de Antioquia.....
Nacionalidad.....Colombia.....
Documento de Identidad NIT: 890.980.040-8.....
Domicilio Legal Calle 70 No. 52-21 Medellín, Colombia.....
Teléfono..... 57+4] 219 8332 ... Fax... [57+4] 263 8282.....
Correo Elect.....

II. RESPONSABLE TECNICO DEL PROYECTO

1. IDENTIFICACION

Nombre o Razón Social FREIMAR SEGURA SANCHEZ.....
.....
Nacionalidad Colombiano.....
Documento de Identidad cc. 71339174.....
Domicilio Legal Calle 75 # 73-128 apto 401 Medellín.....
Teléfono...2192310..... Fax Correo Elect.
freimar.segura@udea.edu.co

2. ACTIVIDADES DE ACCESO REALIZADAS EN LOS ULTIMOS 5 AÑOS DEL RESPONSABLE TECNICO

AÑO	ACTIVIDAD	PAIS	CONTRAPARTE

3. CURRICULUM DE ESTUDIOS DEL RESPONSABLE TECNICO

AÑO	ESTUDIOS SUPERIORES	GRADO	INSTITUCION	LUGAR
2002	Química Farmacéutica	Químico Farmacéutico	Universidad de Antioquia	Medellín-Colombia
2005 (diploma en 2006)	Maestría en Ciencias Farmacéuticas	Magister en Ciencias Farmacéuticas	Universidad de Antioquia	Medellín-Colombia
2009 (diploma en 2011)	Doctorado en Farmacotecnia y Biofarmacia	Doctor en Farmacotecnia y Biofarmacia (convalidado y reconocido en Colombia como Doctor en Biofarmacia)	Universidad de Paris XI (Paris Sud)	Francia

4. PUBLICACIONES DEL RESPONSABLE TECNICO (Tres más importantes)

TITULO	AÑO	REVISTA/LIBRO
Synthesis and characterization of functionalized poly(γ -benzyl-L-glutamate) derivates and corresponding nanoparticles preparation and characterization	2010	<i>International Journal of Pharmaceutics</i> 387(1-2): 244-252

Pegylation of poly([gamma]-benzyl-L-glutamate) nanoparticles is efficient for avoiding mononuclear phagocyte system capture in rats	2010	<i>International Journal Of Nanomedicine</i> 2010(5):1103 – 1111
Elucidation of the complexation mechanism between (+)-usnic acid and cyclodextrins studied by isothermal titration calorimetry and phase-solubility diagram experiments	2009	<i>Journal of Molecular Recognition</i> 22(3): 232-241

5. EXPERIENCIAS DEL RESPONSABLE TECNICO (Actividad realizada en los últimos 5 años)

AÑO	ACTIVIDAD O CARGO	CANTIDAD	PAIS
2005-actual	Docente vinculado de tiempo completo adscrito al departamento de Farmacia de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias (llamada antes Facultad de Química Farmacéutica) de la Universidad de Antioquia.	1	Colombia
2012-actual	Coordinador del grupo de investigación Biopolimer de la Universidad de Antioquia.	1	Colombia
2012-actual	Investigador principal o coinvestigador en diversos Proyectos de investigación.	1	Colombia
2012-actual	Tutor de diversos estudiantes de maestría y doctorado.	1	Colombia
2010-actual	Tutor del candidato a Doctor en Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias, Faiber Alexis Jaramillo Yepes quién realizó el trabajo de tesis titulado "Caracterización fisicoquímica, nutricional y funcional de brotes, culmos y hojas de bambú, para la formulación de nuevos alimentos funcionales" a partir del cual se obtuvieron algunos resultados de investigación que se desean patentar y por lo tanto se hace esta solicitud de acceso a recurso genético y/o sus productos derivados.	1	Colombia

6. GRUPO DE TRABAJO A CARGO DE LA ACTIVIDAD DE ACCESO

DOMICILIO	NOMBRE	ESPECIALIDAD	GRADOACADE
Medellín, Carrera 50A # 63-85 Grupo Biopolimer - Universidad de Antioquia	Freimar Segura Sánchez	Farmacotecnia y Biofarmacia, Biotecnología y Nanotecnología	Doctor

Medellín, Carrera 50A # 63-85 Grupo Biopolimer - Universidad de Antioquia	Faiber Alexis Jaramillo Yepes	Alimentos Funcionales, alimentos y bebidas, plantas y productos	Ingeniero de Alimentos, candidato a Doctor en Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias

III. DATOS DEL PROVEEDOR DEL RECURSO

1. IDENTIFICACION

Nombre o Razón Social ...Elizabeth Romero Quiroz

.....

Documento de Identidad ...cc. 43600877

Domicilio Finca Oasis, Vereda Guatemala, Corregimiento de Pueblo Tapao, municipio de Montenegro Quindío

Teléfono Fax Correo Elect.

**IV. DATOS DE LA PERSONA O ENTIDAD NACIONAL DE APOYO
CIENTIFICO O CULTURAL**

1. IDENTIFICACION

Nombre o Razón Social Universidad Nacional de Colombia

Domicilio Legal Carrera 45 # 26-85 Bogotá.....

Teléfono.....3165000 Ext 18552. Fax

Correo Elect.....viceinvest_nal@unal.edu.co.....

V. PROPUESTA DE PROYECTO

1. TÍTULO

Composición que comprende extractos de *Guadua angustifolia* para la prevención o el tratamiento de enfermedades de la retina

2. JUSTIFICACION, OBJETIVOS Y LITERATURA TECNICA

JUSTIFICACIÓN

La muerte celular controlada (apoptosis), la muerte celular patológica (necrosis) que es distinta de la apoptosis espontánea y previsto dentro de la apoptosis celular (muerte celular programada), han sido propuestos como mecanismos de muerte celular. El estrés oxidativo, la alteración de la óxido nítrico sintetasa, inducen la alteración de diversos factores que conducen a la apoptosis celular mediada tanto por las mitocondrias (caspasa independiente), como por las caspasas, denominándose apoptosis caspasa-dependiente. Muchas enfermedades de los ojos son causadas por la muerte celular, por ejemplo, la degeneración macular asociada a la edad (Age-related macular degeneration) y el glaucoma. La inhibición de la enfermedad ocular y el tratamiento o supresión de la muerte celular que puede atenuar la progresión de estas enfermedades es el objetivo constante en las investigaciones con medicamentos en la actualidad.

El glaucoma es una causa importante de la presión intraocular elevada, de la lesión isquémica que se produce al menos a la vista y, finalmente, causa de la muerte de las células nerviosas. El glaucoma se produce a través del daño en el nervio óptico debido a la apoptosis de las células nerviosas de la retina.

El glaucoma se caracteriza por el daño en el campo visual. Las células ganglionares de retina (RGCs, siglas en inglés) son lesionadas con diversos factores, como resultado de la degeneración del nervio óptico. Esto conduce a la pérdida visual y la disfunción. La presión intraocular elevada (IOP, siglas en inglés) y la isquemia son importantes factores de riesgo en el glaucoma.

Además, en el glaucoma, las células nerviosas de la retina, sufren muerte celular causada por daños en el nervio óptico, produciendo la lesión glaucomatosa, característica que conlleva además del daño al nervio óptico, un daño en el campo visual. En el glaucoma, las células experimentan apoptosis y tanto en modelos animales como en pacientes con glaucoma post-mortem se evidencia que la causa es por la presión intraocular elevada. (Garcia-Valenzuela, Shareef et al. 1995, Quigley, Nickells et al. 1995). El mecanismo que induce la apoptosis en las células y el desequilibrio en la célula se determina, entre varios factores, por los niveles de glutamato, citocromo C, factor de necrosis tumoral - alfa (TNF - α), BCL2 - antagonista de la muerte celular o un aumento en la expresión de las proteínas apoptóticas en las células nerviosas, estrés oxidativo intracelular (conocido como una de las principales causas del glaucoma), entre otros. En el glaucoma, las células nerviosas de la retina bajo estrés oxidativo directo experimentan daños en el nervio óptico, así como en las células del canal compuesto por la red o malla trabecular (estructura del ojo que controla el flujo de líquidos), lo que resulta en el deterioro de las células de la malla trabecular, y finalmente en la muerte celular que aumentará la presión intraocular (Zhou, Li et al. 1999, Saccà, Pascotto et al. 2005). El deterioro de las células de la malla trabecular causará un déficit de reabsorción del humor acuoso (pinocitosis), esto inducirá una presión intraocular, especialmente en las células de la malla trabecular, lo que es conocido como la causa principal del aumento de la presión intraocular (IOP), provocando glaucoma primario de ángulo cerrado y glaucoma primario de ángulo abierto, conocidos por ser más vulnerables al estrés oxidativo (Izzotti, Saccà et al. 2003). Como resultado de un análisis del humor acuoso, la capacidad antioxidante total de un paciente fue significativamente menor comparado con los sujetos normales (Ferreira, Lerner et al. 2004), observándose además un aumento en la oxidación de la enzima plasmática que ayuda a controlar el estrés oxidativo, la glutatión - S - transferasa (Yang, Tezel et al. 2001). Recientemente, en los pacientes con glaucoma primario de ángulo abierto, los daños en las células de la malla trabecular,

parecen ser inhibidos por los antioxidantes (He, Leung et al. 2008). Por lo tanto, se ha propuesto la inhibición de la apoptosis causada por el estrés oxidativo en las células nerviosas de la retina y las células de la malla trabecular, como nuevo enfoque de investigación.

Generalidades del Bambú

El bambú es una hierba gigante, leñosa que tiene una distribución tropical y subtropical (cosmopolita), y representa un producto importante. Se utiliza como material de construcción, para la elaboración de artesanías, para la alimentación y la medicina tradicional. Por ejemplo, las hojas de bambú se han utilizado en la medicina tradicional china para tratar la fiebre y la desintoxicación por más de 1000 años. Recientemente, algunos de los componentes biológicamente activos en las hojas de bambú y sus beneficios potenciales para la salud han sido ampliamente estudiados. Un extracto etanólico acuoso de hojas de bambú contiene principalmente glucósidos flavona, ácidos fenólicos, cumarin-lactonas, antraquinonas y aminoácidos. (Lu, Wu et al. 2005).

La *Guadua* pertenece a la subfamilia de las gramíneas Bambusoideae (bambú) del orden de las Poales; es una planta monocotiledónea, es un género neotropical.

A continuación se listan algunas especies del género *Guadua* (*Guadua* sp.).

Guadua amplexifolia, *Guadua angustifolia*, *Guadua calderoniana*, *Guadua chacoensis*, *Guadua chaparensis*, *Guadua glomerata*, *Guadua incana*, *Guadua latifolia*, *Guadua longifolia*, *Guadua macclurei*, *Guadua macrospiculata*, *Guadua maculosa*, *Guadua magna*, *Guadua paniculata*, *Guadua paraguayana*, *Guadua refracta*, *Guadua sarcocarpa*, *Guadua superba*, *Guadua tagoara*, *Guadua trinitii*, *Guadua uncinata*, *Guadua velutina*, *Guadua venezuelae*, *Guadua virgata*, *Guadua weberbaueri*.

La especie de bambú, *Guadua angustifolia* Kunth, pertenece a la subfamilia Bambusoideae de la familia Poaceae (Satya, Bal et al. 2010). Los culmos de bambú, incluida la *Guadua*, se utilizan hace miles de años en un sinnúmero de productos, desde aplicaciones industriales hasta artesanales (Mejía, Gallardo et al. 2009). La *Guadua angustifolia* Kunth en Colombia ha sido tradicionalmente usada en construcción, muebles, artesanías y decoración de interiores, sin embargo, los residuos generados en estas fábricas, como son las hojas, poco o nada han sido aprovechados en productos de valor agregado.

Las hojas de otras especies de bambú también han sido ampliamente estudiadas en países como China, India, Corea del Sur, Japón, entre otros, encontrándose unas actividades biológicas bastante relevantes en áreas afines a los alimentos funcionales y terapéuticos. Hay trabajos enfocados en la elucidación de compuestos con actividad específica para el tratamiento o prevención de enfermedades crónicas en humanos, actividad antimicrobiana contra diversas bacterias y caracterizaciones fisicoquímica y taxonómica.

En la caracterización de los componentes bioactivos en las plantas de bambú, se ha concentrado el interés en las actividades hepatoprotectora, antidiabética y antioxidante. A través de diversas bases de datos de revistas indexadas, nacionales e internacionales, se puede encontrar fácilmente miles de artículos demostrando o validando los usos medicinales de plantas comunes, silvestres y popularmente usadas en muchas regiones del planeta para terapias alternativas y/o complementarias a la medicina tradicional. Parece ser que la caracterización de la biodiversidad a nivel mundial nunca acabará y pese a que algunos investigadores argumentan que todas las plantas poseen compuestos funcionales para el ser humano, nunca se aceptará dicha aseveración, toda vez que la calidad y cantidad de tales compuestos funcionales varía radicalmente entre plantas de diferentes géneros, especies, familias y entre las mismas plantas cuando son cultivadas en diferentes regiones del planeta o simplemente cuando son cosechadas en diferentes estaciones. Por lo tanto, afirmar que todas las plantas poseen compuestos antioxidantes y funcionales para el ser humano, es solo un enunciado más en el mundo de la ciencia que debe ser finamente estudiado, fraccionado, y evaluado con múltiples propósitos investigativos.

Hay una creciente evidencia que algunas enfermedades coronarias, cáncer, inflamación, artritis, deterioro del sistema inmune, disfunción cerebral y daño celular, son ocasionadas o mediadas por radicales libres y los antioxidantes encontrados en las especies vegetales, como el bambú, pueden

prevenir, de forma considerable, estas enfermedades o sus efectos (Park and Jhon). Diversos agentes químico-preventivos exhiben actividad antioxidante a través de su habilidad para captar radicales de oxígeno, incluyendo oxígenos singletes, radicales peróxilos, superperóxidos y radicales hidroxilos. También se ha encontrado tricina en el bambú, compuesto que tiene un gran impacto como agente preventivo del cáncer de seno.

Otros estudios llevados a cabo en ratones, con extractos de bambú, sobre el estrés oxidativo y la expresión genética, reflejan que estos extractos, pueden disminuir los factores de riesgo de enfermedades cardiovasculares, como la hipercolesterolemia (Panee 2009).

Estudios en polisacáridos extraídos de brotes de *Phyllostachys edulis*, mostraron un efecto inhibidor significativo para captar radicales hidroxilo y superóxido, que hace que puedan ser empleados como alimentos funcionales para aliviar el estrés oxidativo en el organismo (Zhang, Wang et al. 2011).

Las principales características estructurales de los compuestos antioxidantes como compuestos bioactivos son una o varias sustituciones de grupos hidroxilos a uno o más anillos aromáticos. Miles de compuestos polifenólicos han sido identificados en plantas superiores y cientos han sido hallados en plantas comestibles (Manach, Scalbert et al. 2004).

Los Polifenoles de plantas son divididos normalmente en dos grupos principales, flavonoides y no-flavonoides. Los flavonoides comparten un esqueleto flavano, formado por 15 átomos de carbono. Este grupo puede a su vez puede dividirse en flavanoles (p.e. Catequinas), flavonoles (p.e. quercetina, miricetina, kamferol), antocianidinas (p.e. cianidina, delphinidina), flavonas (p.e. apigenina, diosmina), flavanonas (p.e. naringenina, hesperitina), y chalconas (p.e. fletina). Los no-flavonoides contienen un anillo aromático con uno o más grupos hidroxilos. En este grupo se encuentran los estilbenos (p.e. resveratrol), ácidos fenólicos (p.e. ácido caféico, ácido gálico), saponinas (p.e. ginsenosido) y otros polifenoles como la curcumina y los taninos. Los polifenoles son sintetizados en las plantas para defenderse contra infecciones y también para proveer efectos protectores contra diferentes factores de estrés, como la luz ultravioleta, los patógenos y el daño físico (Robbins 2003), (Stagos, Amoutzias et al. 2012).

Entre las principales características de los polifenoles se encuentran las diversas actividades terapéuticas y farmacéuticas como: antiinflamatoria, antialérgica, antioxidante, hepatoprotectora, antitrombótica, antiviral y anticarcinogénica. En particular ellos son bastante conocidos por su actividad captadora o secuestradora de radicales libres, moléculas altamente inestables que pueden desencadenar reacciones adversas para el funcionamiento normal de las células y el entorno de éstas (Kim, Kang et al. 2011).

La actividad o calidad de los polifenoles, está directamente relacionada con la estructura química, las sustituciones de grupos hidroxilos, las posiciones de éstos, los azúcares y compuestos relacionados, al igual que sus posiciones en los anillos del esqueleto flavonoide, y también, de acuerdo a las insaturaciones y las posiciones de éstas. En algunos casos la actividad del polifenol también depende de que tan semejante sea su estructura química 3D con algún otro compuesto que lleva a cabo reacciones de acople con otras moléculas en el organismo, como en el caso de los terpenoides y las isoflavonas (Messina and Wood 2008, Martínez-Montemayor, Otero-Franqui et al. 2010).

Durante la última década muchos flavonoides C-glucosilados han sido aislados e identificados de una amplia variedad de especies de plantas. Estos flavonoides naturales C-glucosilados difieren de los O-glucosilados en tener su resto glucosil unido directamente desde el carbono anomérico al esqueleto flavonoide, usualmente en las posiciones C-6 o C-8 del anillo A. Los flavonoides C-glucosilados tienen actividades biológicas adicionales y alta estabilidad a la hidrólisis en comparación con los O-glucosilados. En recientes revisiones de los flavonoides C-glucosilados, algunos autores, como Rauter y Zeng, establecieron una base de datos enfocada a la caracterización y a las bioactividades de dichos compuestos naturales u originados de síntesis orgánica y sus efectos antioxidante, hepatoprotector, antiinflamatorio y antiviral. De acuerdo a sus actividades farmacológicas y los estudios de relación estructura - actividad (SAR: Siglas en inglés: structure-activity relationships), los C-glucosilados pueden ser clasificados en tres categorías: La categoría I incluye los flavonoides C-glucosilados tipo flavona; la categoría II incluye los flavonoides C-glucosilados tipo isoflavona; y una tercera categoría que comprende los flavonoides C-

glucosilados tipo flavanona (Rauter, Lopes et al. 2007), (Zeng, Zhang et al. 2013).

Los radicales libres han sido señalados como causantes de muchas enfermedades, entre ellas la hepatitis, inflamación, cáncer, diabetes mellitus, enfermedades neurodegenerativas y cardiovasculares. Los flavonoides C-glucosilados han mostrado que pueden actuar como eliminadores de estas especies oxidantes, incluyendo el anión superóxido $O_2^{\bullet -}$, el radical hidroxilo $HO^{\bullet}$ y radicales peróxilos (Zeng, Zhang et al. 2013), (Choi, Nurul Islam et al. 2014).

La posición del azúcar en los carbonos C-6 o C-8 no tiene influencia en la actividad captadora de radicales libres. Por ejemplo, Leong y colaboradores, señalaron que dicha actividad era muy similar entre la isoorientina y la orientina, donde obtuvieron valores de la actividad captadora del radical superóxido, SC_{50} (50% of scavenging capacity) de 31 y 38 μM respectivamente y en el caso de la vitexina y la isovitexina los valores fueron de 129 y 135 μM , correspondientemente (Leong, Kinjo et al. 2010). Resultados similares usando los métodos de DPPH y ABTS fueron obtenidos por otros investigadores con igual orden en la actividad antioxidante determinada contra el radical anión superóxido, donde la actividad más alta la presentó la isoorientina, luego la orientina con un valor muy cercano, después la isovitexina y finalmente la vitexina, éstos dos últimos compuestos con igual valor (Zielińska and Zieliński 2011). De esta manera, claramente se indica que las propiedades antioxidantes de estos compuestos son principalmente dependientes en los grupos hidroxilo libres en el anillo B de su estructura.

Estos resultados indicaron que la sustitución de flavonoides C-glucosilados en las posiciones C-6 y C-8 produce actividades similares. De acuerdo con las diferencias entre la isoorientina y la orientina (vitexina e isovitexina), Zeng y colaboradores, concluyeron que los grupos hidroxilo libres en el anillo B, son los responsables, en mayor importancia, de las propiedades antioxidantes, y con menor importancia, la sustitución de la glucosa en las posiciones C-6 o C-8 del anillo A (Zeng, Zhang et al. 2013).

De otro lado, la posición y el número de grupos hidroxilo también tienen un papel fundamental en la actividad captadora de radicales libres. Los flavonoides C-glucosilados con dos grupos hidroxilo en el anillo B tienen actividades antioxidantes más altas que aquellos C-glucosilados con solo un grupo hidroxilo en el mismo anillo. En conclusión, Cheel y sus colaboradores, demostraron que los grupos hidroxilo metilados en la posición C-7 y la metoxilación en la posición C-3' del anillo B reduce la actividad antioxidante, mientras que los grupos hidroxilo en las posiciones C-3' y C-4' del anillo B o los grupos hidroxilo en la posición C-7 del anillo A son claves para la actividad captadora de radicales libres (Cheel, Theoduloz et al. 2005).

Las actividades antioxidantes *in vitro* de los flavonoides han sido reconocidas desde hace décadas, y en general se entiende que los compuestos con alta capacidad antioxidante tienen menor dureza absoluta y electronegatividad absoluta. En cuanto a los C-glicósidos, con la glucosa en C-6 o C-8 la actividad antioxidante disminuye debido al impedimento estérico por la fracción de glucosa. La sustitución de la glucosa en el anillo A, el número de azúcares, y los sustituyentes en el azúcar también puede afectar la actividad antioxidante. Por lo tanto, los grupos hidroxilo en la estructura de los flavonoides son los factores clave para la actividad antioxidante. Recientemente, los SAR basados en la teoría de la dureza química indicó que los grupos hidroxilo en las posiciones C-3' y C-4' del anillo B o un grupo hidroxilo en C-7 del anillo A disminuyen notablemente la dureza absoluta de las flavonas, las cuales tienen una alta actividad captadora de radicales (Waki, Nakanishi et al. 2012).

Estos estudios SAR mostraron que la actividad antioxidante *in vitro* de los C-glicósidos es similar a los O-glicósidos. Sin embargo, se han realizado pocos estudios sobre la actividad antioxidante de los C-glicósidos *in vivo*. Zhang y colaboradores discutieron acerca del metabolismo de las flavonas C-glicósidos obtenidas de los "antioxidantes de las hojas de bambú" (AOB) en ratas: con una única administración oral de AOB, las cuatro flavonas C-glicósidos, isoorientina, orientina, vitexina e isovitexina de los AOB, se absorben mal en el tracto gastrointestinal. Más del 50% de las flavona C-glicósidos se recuperaron a las 12 h en el tracto gastrointestinal, lo que sugiere que el tiempo de paso para estos compuestos en el colon es un tiempo suficiente para ejercer su actividad antioxidante y para eliminar los radicales libres. Además de la excreción en sus formas originales, las flavonas C-glicósidos también fueron hidrolizadas en sus agliconas y degradadas en pequeñas moléculas fenólicas y diversos ácidos aromáticos (Zhang, Tie et al. 2007).

Las hojas de bambú han sido estudiadas por ser un residuo generado fácilmente de la agroindustria y que de no tener una disposición final apropiada, podría generar impactos ambientales de gran

alcance.

Los extractos hidro-alcohólicos de hojas de bambú contienen principalmente flavonas glucosídicas, ácidos fenólicos, cumarin-lactonas, antraquinonas y aminoácidos; metabolitos secundarios de plantas, biológicamente activos y no nutritivos pero que han sido asociados a la protección de la salud humana. Los efectos biológicos importantes son listados como actividad captadora de radicales libres, capacidad antioxidante, efecto antienvjecimiento, antifatiga, acción antibacterial, anti-viral, entre otras propiedades, además de ser empleados para la prevención de enfermedades cardiovasculares y cáncer y ser incluidos como intermediarios farmacéuticos, suplementos dietarios, ingredientes cosméticos y aditivos alimentarios (Hu, Zhang et al. 2000, Lu, Wu et al. 2005, Zhang, Bao et al. 2005, Zhang, Jiao et al. 2008).

En China, los antioxidantes provenientes del bambú, denominados AOB (Siglas en inglés: Antioxidant of Bamboo), pueden ser empleados (según Ministerio de Salud de ese país, 2003) en productos acuáticos, cárnicos, aceites comestibles, cereales, productos de panadería, jugos de vegetales y frutas, bebidas de té y alimentos cocinados (Zhang and Zhang 2008).

Estudios particulares han demostrado la eficiencia de los AOB y otros antioxidantes naturales y sintéticos en la reducción de la formación de acrilamida en alimentos ricos en carbohidratos que son horneados o freídos, dado que este compuesto exhibe propiedades mutagénicas y carcinogénicas en mamíferos experimentales tanto *in vivo* como *in vitro* (Zhang, Chen et al. 2007, Ou, Shi et al. 2010).

Estilbenos glucosídicos, compuestos que poseen propiedades medicinales, también han sido identificados en bambús de México y China (Vastano, Chen et al. 2000); el ácido clorogénico, el ácido cafeico y la luteolina-7-glucosido también fueron identificados en extractos de hojas de bambú, *P. nigra* var. *henonis*, y fueron evaluados la actividad antioxidante y la capacidad captadora de radicales libres *in vitro* (Hu, Zhang et al. 2000) y tres derivados (dos nuevos) del ácido clorogénico también fueron aislados e identificados en hojas de *P. edulis* y mostraron incluso una actividad antioxidante superior al α -tocoferol, ácido ascórbico, ácido ferúlico, ácido cafeico y el mismo ácido clorogénico (Kweon, Hwang et al. 2001, Mu, Uehara et al. 2004).

Keski-Saari y colaboradores (Keski-Saari, Ossipov et al. 2008), estudiaron los compuestos fenólicos en culmos de especies de bambú colectados en China. Todos los culmos contenían ácidos fenólicos y flavonoides en un rango dado de concentraciones y las diferencias observadas eran producto de la edad del bambú y de la variedad. Algunos de los compuestos encontrados fueron ácido neoclorogénico, derivados de ácido clorogénico, isoorientina ramnosida, ácido cinámico, apigenina, entre otros compuestos que en investigaciones posteriores se les ha evidenciado su actividad biológica.

En el artículo de Zielińska y Zieliński (Zielińska and Zieliński 2011), justamente, se midió la actividad antioxidante a una serie de flavonas glucosídicas, orientina, homoorientina, vitexina e isovitexina, y se comparó con la quercetina, molécula que ha mostrado una excelente actividad antioxidante y con la cual se puede determinar que tan efectivo es un compuesto en captar radicales libres. El orden decreciente de actividad antioxidante, medido como TEAC (Siglas en inglés: Trolox equivalent antioxidant capacity) por los métodos de ABTS y DPPH fue quercetina, homoorientina, orientina, isovitexina y vitexina; sin embargo, por el método que medía la capacidad captadora del radical anión superóxido, el orden de mejor actividad fue homoorientina, orientina, quercetina, isovitexina y vitexina. Esto evidenció, y es reportado en diversos artículos, que las propiedades antioxidantes de estos compuestos, son dependientes de la posición de los grupos hidroxilos en el anillo B en la estructura del flavonoide.

Una nueva aplicación también muy importante con las hojas de bambú, *Phyllostachys nigra*, es la desarrollada en el Korea Institute of Science and Technology (KIST), en donde a partir de esta planta y un fraccionamiento sistemático con hexano, diclorometano, acetato de etilo y butanol, aislaron compuestos con estructuras flavonólicas, para posteriormente evaluarlas en células ganglionares de retina *in vitro* e *in vivo*, y así determinar si estos compuestos podrían atenuar el estrés oxidativo en este tipo de células. En conclusión, establecieron que el compuesto luteolin 6-C-(6"-O-trans-cafeoylglucoside), obtenido de la fracción de acetato de etilo, podía ser potencialmente útil para el tratamiento, vía efecto anti-oxidante, en enfermedades oculares, como el glaucoma, y en los casos donde los radicales libres tienen un efecto significativo (Lee, Kim et al. 2010).

El compuesto luteolin 6-C-(6"-O-trans-cafeoylglucoside), también mostró una fuerte inhibición de la

aldosa reductasa y de los productos finales de la glicación avanzada, demostrando por tanto que puede ser empleado como un nuevo medicamento de origen natural para aliviar complicaciones diabéticas (Jung, Lee et al. 2007).

El extracto de hojas de bambú de la especie *Phyllostachys edulis* inhibe la sobre-producción de la interleucina 6 (IL-6), citoquina inflamatoria sobre-expresada en individuos obesos y que contribuye al desarrollo de diversas enfermedades como resistencia a la insulina, diabetes tipo II y enfermedades cardiovasculares, indicando un potencial uso como nutraceutico y alimento funcional (Higa and Panee 2011).

***Guadua angustifolia* Kunth**

La *Guadua* es un bambú espinoso que pertenece a la familia Poaceae, a la subfamilia Bambusoideae y a la tribu Bambuseae ((OAC) 2005). La *Guadua angustifolia* Kunth puede aumentar su altura hasta 21 cm por día (alcanzando hasta 22 m) y emerge desde el suelo con un diámetro constante hasta 22 cm. Es el tercer bambú más grande del mundo. Los culmos alcanzan su altura final en los primeros 6 meses de crecimiento, y llegan a la madurez cuando tienen entre 4 y 5 años de edad. Se alcanza el crecimiento óptimo entre 500 y 1500 m de altitud, con una precipitación de 1200 a 2500 mm por año, temperaturas entre 18 °C y 24 °C, y 80-90% de humedad relativa. Se adapta bien a condiciones de lluvias extremas de las selvas tropicales de Colombia (más de 10,000 mm por año), pero no en condiciones muy secas (<800 mm por año) (Riaño, Londoño et al. 2002) y gracias a esto, en Colombia, puede desarrollarse durante todo el año.

A pesar del gran potencial de Colombia en términos de biodiversidad de Bambusa, hay un extenso trabajo por hacer para innovar y competir con una amplia gama de productos derivados de los mismos, incluyendo brotes comestibles o brotes de guadua, vinagre de guadua, carbón activado y compuestos activos de las hojas para aplicaciones farmacéuticas, cosméticas y alimenticias. Sin embargo, Colombia ya ha dado los primeros pasos hacia la construcción de la Cadena de la Guadua. En 2004 se firmó con éxito el Acuerdo Marco de Competitividad de la Cadena de la Guadua en Colombia, con la participación de las partes interesadas, en representación de los nueve departamentos productores y el gobierno nacional. Este acuerdo tiene como objetivo articular los esfuerzos de todas las regiones en un propósito común, para garantizar la continuidad y el crecimiento en condiciones de competencia y coordinar las directrices y objetivos para la toma de decisiones a corto, mediano y largo plazo ((OAC) 2004).

La *Guadua angustifolia* Kunth es una planta ampliamente usada en Colombia para la construcción, artesanías y muebles; hasta el momento no ha sido reportada en el vademécum de plantas medicinales de Colombia o se le ha dado alguna actividad biológica específica. Algunos compuestos flavonoides y ácidos fenólicos han sido identificados y elucidados en este material vegetal.

No ha habido informes de investigación de cualquier posible efecto potencial de esta planta para tratar enfermedades oculares como el glaucoma. En este proyecto se investigó si las fracciones o compuestos aislados de *G. angustifolia* Kunth podrían atenuar la muerte inducida por estrés oxidativo en las células ganglionares de retina transformadas (RGC-5). Adicionalmente se investigó si las fracciones o compuestos eran capaces de inhibir la producción de las ROS en las RGC-5 y los efectos en el daño retinal inducido *in vivo* por el N-metil-D-aspartato (NMDA) y por la compresión del nervio óptico.

Estrés oxidativo

El concepto de estrés oxidativo surgió en la década de 1970 cuando los pacientes con enfermedad hematológica eran identificados con la glutatión reductasa defectuosa (Paniker, Srivastava et al. 1970). En la misma década la primera evidencia *in vitro* emergió cuando se puso de manifiesto que la cadena respiratoria mitocondrial era capaz de producir superóxido e indirectamente peróxido de hidrogeno (Loschen and Azzi 1975). El estrés oxidativo, se refiere a una situación en la que existe un desequilibrio entre los procesos que generan especies reactivas de oxígeno (ROS) y los responsables de su eliminación. El estrés oxidativo daña macromoléculas incluyendo el ADN, proteínas y lípidos y se cree que contribuye a la patogénesis de una serie de enfermedades neurodegenerativas relacionadas con la edad. A niveles más bajos, las ROS son moléculas de señalización críticos que se generan a partir de una variedad de sitios endógenos y exógenos dentro de la célula. La contribución relativa de estas difiere según el tipo de ROS, el tejido, tipo celular y los estados fisiológicos y patológicos dados (Chrysostomou, Rezanian et al. 2013). Los compartimentos

celulares que más comúnmente contribuyen a la generación de las ROS en células de mamíferos incluyen mitocondrias, retículo endoplasmático, peroxisomas, citosol, el plasma y el espacio extracelular. Muchos sitios diferentes de producción de ROS han sido identificados dentro de la mitocondria; los más activos son los complejos I y III de la cadena de fosforilación oxidativa (Cadenas and Davies 2000, Raha and Robinson 2000).

Disfunción mitocondrial y el estrés oxidativo

Cada vez es más claro que la disfunción mitocondrial juega un papel causal en una serie de enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica y neuropatías ópticas (Lin and Beal 2006). La evidencia reciente también señala que la disfunción mitocondrial está presente en algunos pacientes con glaucoma (Abu-Amero, Morales et al. 2006, Lee, Sheck et al. 2012).

Dos consecuencias perjudiciales de la disfunción mitocondrial incluyen (i) disminución de la síntesis de ATP y (ii) aumento de la producción de ROS. La insuficiencia bioenergética resulta de la disminución de la producción de ATP y esto limita la cantidad de energía disponible para los principales procesos celulares como la reparación después de una lesión. Las terapias orientadas en las mitocondrias pueden promover o restablecer la producción de energía en las células con alteración de la fosforilación oxidativa proporcionando uno de una serie de enfoques terapéuticos potenciales para la protección de las células ganglionares de la retina (Kong, van Bergen et al. 2012).

Glaucoma y daño de retina inducido por el estrés oxidativo

El mecanismo responsable del glaucoma sigue siendo controversial, sin embargo, la apoptosis causada por el aumento en los niveles de especies reactivas del oxígeno (ROS, siglas en inglés), es considerada que desempeña un papel importante en su patogénesis (Kim, Shim et al. 2013).

La retina glaucomatosa se caracteriza patológicamente por la degeneración progresiva de las células ganglionares de la retina (RGCs), así como por el daño en el campo visual. La degeneración de las RGCs parece ser secundaria a la lesión de los axones de estas células, que se proyectan hacia el cerebro (Kalesnykas, Oglesby et al. 2012).

El mecanismo exacto que subyace en el glaucoma sigue siendo controvertido, sin embargo, la presión intraocular elevada (IOP siglas en inglés) y la isquemia son factores de riesgo importantes aceptados (Nucci, Tartaglione et al. 2005, Tataru and Bogdanici 2009). Esto ha llevado a la focalización de los tratamientos farmacológicos y quirúrgicos para el glaucoma en la reducción de la IOP (Toris 2010, Chang and Goldberg 2012).

Sin embargo, un número significativo de pacientes con glaucoma siguen sufriendo la pérdida del campo visual mucho después de la normalización terapéutica de su IOP, y no todos los pacientes con hipertensión ocular desarrollan glaucoma (Brubaker 1996). Esto indica que el glaucoma es el resultado de múltiples factores combinados, más que una consecuencia de la elevación de la IOP en sí misma (Varma, Peebles et al. 2008).

Hay varias hipótesis sobre los mecanismos implicados en la muerte de las RGCs en el glaucoma, tales como lesiones isquémicas a los axones de las células ganglionares (Osborne, Melena et al. 2001), la privación de neurotrofina (Baltmr, Duggan et al. 2010), la disfunción de los componentes no neuronales en la cabeza del nervio óptico (Quigley 1999), el daño mecánico a los axones de las células ganglionares (Morgan 2000) y la disfunción de las células gliales de la retina (Zhong, Leung et al. 2007).

El estrés oxidativo en el glaucoma

Glaucoma, la segunda causa principal de ceguera, es un término usado para describir un grupo de neuropatías ópticas caracterizadas por el deterioro funcional y estructural de las células ganglionares de la retina RGCs resultando en una pérdida progresiva de la visión, inicialmente marcado por la pérdida de la visión periférica con progresión a la ceguera total (Quigley 1996, Quigley and Broman 2006).

El glaucoma causa una serie de desórdenes caracterizados por la pérdida selectiva de las RGCs cuyos cuerpos celulares se encuentran en la superficie interna de la retina y los axones que son proyectados a lo largo del nervio óptico hasta el núcleo geniculado lateral. El patrón característico de la pérdida del campo visual en el glaucoma apunta al sitio primario de la lesión dentro de los axones

en la cabeza del nervio óptico. El aumento de la edad, una historia familiar positiva de glaucoma y la presión intraocular (IOP) elevada se encuentran entre una lista de factores de riesgo reconocidos para el glaucoma (Chrysostomou, Rezania et al. 2013). El glaucoma es así una enfermedad neurodegenerativa con una patofisiología compleja. Hace más de dos décadas desde que el estrés oxidativo fue propuesto que contribuía a la patogénesis del glaucoma. La evidencia que respalda lo anterior viene de estudios tanto en animales como en humanos, donde se ha evaluado la producción de ROS, los niveles de antioxidantes y los marcadores de daño oxidativo a macromoléculas bajo condiciones glaucomatosas (Alvarado, Murphy et al. 1981). Los modelos experimentales de glaucoma se basan en la inducción de la lesión axonal en la cabeza del nervio óptico y un número de enfoques han sido reportados, entre ellos; elevación de la IOP en un corto y mediano plazo; axotomía; compresión del nervio óptico; inhibición de suministro de sangre al nervio óptico y el daño mediado de manera autoinmune. Varios modelos en roedores se han desarrollado para aumentar la IOP en los últimos años, la mayoría de los cuales han demostrado que inducen estrés oxidativo. Por ejemplo, la IOP elevada después de la inyección de ácido hialurónico en la intracamara en ratas resultó en una disminución significativa en antioxidantes de la retina y un aumento en la peroxidación lipídica de la retina (Moreno, Campanelli et al. 2004). La hipertensión ocular en ratas después de la cauterización de las venas episclerales también llevó a un marcado aumento en las ROS y los niveles de nitrito, en combinación con la peroxidación lipídica (Ko, Peng et al. 2005, Ferreira, Lerner et al. 2010). En otro estudio que usó una inyección de solución salina hipertónica en la vena episcleral para elevar la IOP, halló que la oxidación de proteínas se localiza en las capas retinianas internas que contienen las RGCs (Tezel, Yang et al. 2005). La IOP elevada, independientemente del mecanismo o duración de la lesión, parece tener la capacidad de inducir estrés oxidativo en la retina y en el nervio óptico.

Datos clínicos recientes también apoyan un rol para el estrés oxidativo en la patogénesis del glaucoma. En un estudio de casos y controles, los niveles de antioxidantes totales en suero se incrementaron en combinación con la disminución de la 8-hidroxi-20-desoxiguanosina, un marcador de daño oxidativo del ADN, el cual fue reportado en pacientes con glaucoma de tensión normal en comparación con los controles sanos, indicando el estrés oxidativo sistémico (Yuki, Murat et al. 2010).

Contribución del estrés oxidativo a la patogénesis del glaucoma

Las causas de la degeneración de las RGCs en el glaucoma son probablemente multifactoriales y resultantes de lesiones tanto primarias como secundarias (Chrysostomou, Trounce et al. 2010). Las lesiones primarias se discuten con más detalle a continuación, pero el daño secundario, el daño indirecto puede ser ocasionado a través de diversos mecanismos, que incluyen alteraciones vasculares inducidas por el estrés oxidativo que conducen a la alteración de la autorregulación del flujo sanguíneo al nervio óptico, lesión oxidativa a la malla o red trabecular alterando la salida del humor acuoso y elevando la presión intraocular. Además el estrés oxidativo puede provocar daño indirecto a las RGCs mediado por respuestas inmunes aberrantes y disfunción de las células gliales (Izzotti, Bagnis et al. 2006, Tezel 2009).

El estrés oxidativo también puede conducir directamente a la degeneración de las RGCs. Por ejemplo, las ROS son moléculas de señalización críticas que activan las vías de apoptosis cuando están en exceso. Aplicación exógena de ROS ha demostrado que desencadenan apoptosis a las RGCs in vitro a través de las vías independientes de las caspasas (Li and Osborne 2008), mientras que la reducción de la generación de ROS también protegió temporalmente a las RGCs de la apoptosis (Tezel and Yang 2004). El estrés oxidativo altera el ciclo glutamato retinal/ glutamina, lo que lleva a la acumulación de niveles neurotóxicos de glutamato. Las modificaciones oxidativas a la glutamina sintetasa, la enzima responsable para la conversión de glutamato retinal en formas no tóxicas, han sido demostradas en ratas con hipertensión ocular (Tezel, Yang et al. 2005). Además, las reducciones significativas en las proteínas transportadoras del glutamato retinal, la captación de glutamato retinal y la actividad de la glutamina sintetasa han sido identificadas en modelos de ratas de hipertensión ocular (Martin, Levkovitch-Verbin et al. 2002, Moreno, Campanelli et al. 2004).

Antioxidantes para la protección del nervio óptico en el glaucoma

Más evidencia de que el estrés oxidativo está implicado en la patogénesis del glaucoma proviene de estudios que demuestran un beneficio a partir de compuestos con propiedades antioxidantes. Un estudio prospectivo de una cohorte de 3.500 individuos con glaucoma, con una duración de 10 años, reveló una asociación entre la baja ingesta de nutrientes antioxidantes, incluyendo equivalentes de

retinol y vitamina B1, y un mayor riesgo de glaucoma de ángulo abierto (Ramdas, Wolfs et al. 2012). El efecto de la dieta en un modelo de rata de glaucoma también ha demostrado que la deficiencia de vitamina E predispuso a un aumento significativo en la pérdida de las RGCs (Ko, Peng et al. 2010). La brimonidina, un fármaco reductor de la IOP bien conocido, también mejoró la presión intraocular inducida por estrés oxidativo en ratas (Ozdemir, Tolun et al. 2009). Estos efectos neuroprotectores de la brimonidina también se han observado en cultivos de RGCs de rata purificados bajo estrés oxidativo sugiriendo que este compuesto puede tener propiedades antioxidantes adicional a la acción bien establecida en la reducción de la IOP (Lee, Nakayama et al. 2010). Otros estudios recientes han demostrado que la porfirina manganeso y la astaxantina, otros potentes antioxidantes biológicos, alivian la lesión de la retina inducida por la elevada IOP en ojos de rata (Cort, Ozturk et al. 2010, Dogan, Unal et al. 2011).

Aunque estos antioxidantes tienen potencial terapéutico prometedor, carecen de especificidad a las mitocondrias, un generador clave de las ROS celulares. Por lo tanto, los compuestos que se enfocan directamente a las mitocondrias pueden proporcionar un mayor beneficio terapéutico. Los antioxidantes potenciales orientados a mitocondrias incluyen la coenzima Q10 (CoQ10), la N-acetil cisteína (NAC), la acetil-L-carnitina (ALCAR) y el ácido α -lipoico. Muchos de estos compuestos muestran propiedades neuroprotectoras y han demostrado que protegen en condiciones neurodegenerativas relacionadas con la edad como el Alzheimer y las enfermedades de Huntington y Parkinson (Bonda, Wang et al. 2010).

Las investigaciones sobre el efecto de los antioxidantes mitocondriales en la patogénesis de glaucoma muestran resultados alentadores. La CoQ10, un cofactor esencial en la fosforilación oxidativa mitocondrial, ofrece protección retinal después de la isquemia / reperfusión en la rata, en un modelo establecido de glaucoma de ángulo agudo (Russo, Cavaliere et al. 2008). La suplementación con NAC, la cual mejora las actividades específicas de los complejos I y IV en la fosforilación oxidativa mitocondrial, demostrando que disminuye el estrés oxidativo inducido por la hipertensión ocular en ratas (Ozdemir, Tolun et al. 2009). En un estudio de Osborne, el tratamiento de ratas con un ácido α -lipoico, un compuesto ditiol mitocondrial que funciona como una coenzima, proporcionó protección contra las lesiones por isquemia-reperfusión tanto en la retina como un todo, así como específicamente a las RGCs (Osborne 2008).

También se ha sugerido que las ROS desempeñan un papel clave en la patogénesis del glaucoma. Las ROS puede funcionar como moléculas de señalización que activan una serie de vías sensibles al estrés, que causan daño celular y que son en última instancia responsables de la apoptosis de las células (Tezel 2006). En un estudio epidemiológico, los análisis de sangre y de humor acuoso demostraron que en muchos pacientes con glaucoma se había reducido la capacidad oxidativa y se había elevado notablemente los niveles de enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa y la glutatión en el humor acuoso (Ferreira, Lerner et al. 2004).

Por lo tanto, parece plausible que los antioxidantes, que inhiben las ROS, podrían ser terapéuticos en la prevención del glaucoma. De este modo, la neuroprotección, en particular, la prevención de la muerte de las RGCs y sus axones, incluyendo el retraso de la apoptosis a través de la inhibición de las ROS, recientemente ha sido considerado como un nuevo enfoque para la terapia del glaucoma (Weinreb and Levin 1999, Schwartz and Yoles 2000, Marcic, Belyea et al. 2003, Baltmr, Duggan et al. 2010). Para este fin, se ha investigado la eficacia de un número de sustancias, incluyendo los productos naturales para proteger las RGCs (Levin and Peeples 2008).

Rol de la aldosa reductasa en la vía de los polioles que lleva a diversos defectos en la salud

La vía de los polioles es usualmente un proceso metabólico de dos pasos en el cual la glucosa es reducida a sorbitol, el cual a su vez es convertido a fructosa. La vía de los polioles también consiste de dos enzimas. La primera enzima AR, reduce la glucosa a sorbitol con la ayuda de su cofactor NADPH, y la segunda enzima, sorbitol deshidrogenasa (SDH) con la ayuda de su cofactor NAD⁺, convierte sorbitol a fructosa (Chung, Ho et al. 2003). La AR también es responsable de la reducción de diversos aldehídos. Esta vía constituye interesantemente una de las medidas más activas a través de la cual el mecanismo de la retinopatía diabética y la cataratogénesis puede ser explicada. La formación de sorbitol a partir de glucosa, la acumulación de fructosa y la generación o incremento del estrés oxidativo fueron considerados como los principales culpables que conducen a las diversas complicaciones relacionadas con la diabetes, como la catarata. El sorbitol es un alcohol polihidroxilado, fuertemente hidrofílico y además no difunde fácilmente a través de las membranas

celulares, acumulándose intracelularmente con posibles consecuencias osmóticas, particularmente conduciendo a estrés osmótico y finalmente causando las lesiones diabéticas (Gabbay 1973). La acumulación intracelular de sorbitol también conduce a condiciones hiperosmóticas locales, responsables de la pérdida de claridad en los lentes. El uso de NAD por la sorbitol deshidrogenasa conduce a un aumento de la proporción de NADH/NAD⁺, que ha sido denominado "pseudohipoxia" y vinculado a una multitud de cambios metabólicos y de señalización, conocidos para alterar la función celular (Barnett, Gonzalez et al. 1986). Bajo la condición hiperglucémica, cerca del 30% de la glucosa se canaliza en la vía de los polioles causando un agotamiento sustancial de NADPH y en consecuencia una disminución significativa en el nivel de glutatión (GSH). Así, durante la hiperglucemia, la actividad AR disminuye la capacidad antioxidante celular (Cheng and Gonzalez 1986, Koya, Haneda et al. 1998). La oxidación de sorbitol a fructosa por la sorbitol deshidrogenasa (SDH) provoca un estrés oxidativo debido a que su co-factor NAD se convierte en NADH en el proceso, y a que el NADH es el sustrato para la NADH oxidasa para generar especies reactivas de oxígeno (ROS) (Morre, Lenaz et al. 2000). Aunque la vía de los polioles provoca el estrés oxidativo tanto en el lente como en el nervio, su papel en el desarrollo de la lesión diabética en estos dos tejidos parece ser diferente. El estrés osmótico, de la acumulación de sorbitol, es un factor más importante para el desarrollo de las cataratas diabéticas (Lee and Chung 1999). Por lo tanto, se puede observar que la activación de la enzima aldosa reductasa en la vía de los polioles puede conducir a la alteración de varios factores metabólicos, en particular la generación de especies de oxígeno reactivas que provocan estrés oxidativo y que puede ser considerado como el factor inicial y principal que agrava las complicaciones de catarata inducidas por la diabetes. De este modo, el tratamiento con inhibidores de la AR (ARI) ha demostrado ser eficaz en la prevención del desarrollo de diversas complicaciones de la diabetes, incluyendo la formación de cataratas, neuropatía y nefropatías (Oates and Mylari 1999).

OBJETIVOS

- Realizar marcha fitoquímica y análisis bromatológico a hojas de *Guadua angustifolia*.
- Obtener un extracto seco metanólico y realizarle un fraccionamiento con solventes de variada polaridad.
- Evaluar la actividad captadora de radicales libres de las diferentes fracciones del extracto de hojas de *Guadua angustifolia*.
- Obtener un perfil cromatográfico por HPLC de cada una de las fracciones orgánicas e identificar flavonoides.
- Buscar inhibir o mejorar la lesión celular en células ganglionares de retina asociadas a la isquemia, proteger las células del estrés oxidativo, inhibir la apoptosis, proteger las células oculares, tales como las células nerviosas de la retina o las células de la malla trabecular.

LITERATURA TÉCNICA

(OAC), O. A. C. (2004). Documento de trabajo N° 35: La Cadena de la *Guadua* en Colombia. Colombia, Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural: 1-28.

(OAC), O. A. C. (2005). Documento de trabajo N° 65: La Cadena de la *Guadua* en Colombia, una mirada global de su estructura y dinámica 1991- 2005. Colombia, Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural: 1-24.

Abu-Amero, K. K., J. Morales and T. M. Bosley (2006). "Mitochondrial abnormalities in patients with primary open-angle glaucoma." Invest Ophthalmol Vis Sci **47**(6): 2533-2541.

- Alia, M., S. Ramos, R. Mateos, A. B. Granado-Serrano, L. Bravo and L. Goya (2006). "Quercetin protects human hepatoma HepG2 against oxidative stress induced by tert-butyl hydroperoxide." Toxicol Appl Pharmacol **212**(2): 110-118.
- Alvarado, J., C. Murphy, J. Polansky and R. Juster (1981). "Age-related changes in trabecular meshwork cellularity." Invest Ophthalmol Vis Sci **21**(5): 714-727.
- Baltmr, A., J. Duggan, S. Nizari, T. E. Salt and M. F. Cordeiro (2010). "Neuroprotection in glaucoma - Is there a future role?" Exp Eye Res **91**(5): 554-566.
- Barnett, P. A., R. G. Gonzalez, L. T. Chylack, Jr. and H. M. Cheng (1986). "The effect of oxidation on sorbitol pathway kinetics." Diabetes **35**(4): 426-432.
- Bonda, D. J., X. Wang, G. Perry, A. Nunomura, M. Tabaton, X. Zhu and M. A. Smith (2010). "Oxidative stress in Alzheimer disease: a possibility for prevention." Neuropharmacology **59**(4-5): 290-294.
- Brubaker, R. F. (1996). "Delayed functional loss in glaucoma. LII Edward Jackson Memorial Lecture." Am J Ophthalmol **121**(5): 473-483.
- Cadenas, E. and K. J. Davies (2000). "Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging." Free Radic Biol Med **29**(3-4): 222-230.
- Carper, D. A., G. Wistow, C. Nishimura, C. Graham, K. Watanabe, Y. Fujii, H. Hayashi and O. Hayaishi (1989). "A superfamily of NADPH-dependent reductases in eukaryotes and prokaryotes." Exp Eye Res **49**(3): 377-388.
- Cort, A., N. Ozturk, D. Akpinar, M. Unal, G. Yucel, A. Ciftcioglu, P. Yargicoglu and M. Aslan (2010). "Suppressive effect of astaxanthin on retinal injury induced by elevated intraocular pressure." Regul Toxicol Pharmacol **58**(1): 121-130.
- Chang, E. E. and J. L. Goldberg (2012). "Glaucoma 2.0: Neuroprotection, Neuroregeneration, Neuroenhancement." Ophthalmology **119**(5): 979-986.
- Cheel, J., C. Theoduloz, J. Rodriguez and G. Schmeda-Hirschmann (2005). "Free radical scavengers and antioxidants from Lemongrass (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf.)." J Agric Food Chem **53**(7): 2511-2517.
- Cheng, H. M. and R. G. Gonzalez (1986). "The effect of high glucose and oxidative stress on lens metabolism, aldose reductase, and senile cataractogenesis." Metabolism **35**(4 Suppl 1): 10-14.
- Choi, J. S., M. Nurul Islam, M. Yousof Ali, E. J. Kim, Y. M. Kim and H. A. Jung (2014). "Effects of C-glycosylation on anti-diabetic, anti-Alzheimer's disease and anti-inflammatory potential of apigenin." Food and Chemical Toxicology **64**(0): 27-33.
- Chrysostomou, V., F. Rezanian, I. A. Trounce and J. G. Crowston (2013). "Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in glaucoma." Curr Opin Pharmacol **13**(1): 12-15.
- Chrysostomou, V., I. A. Trounce and J. G. Crowston (2010). "Mechanisms of retinal ganglion cell injury in aging and glaucoma." Ophthalmic Res **44**(3): 173-178.
- Chung, S. S., E. C. Ho, K. S. Lam and S. K. Chung (2003). "Contribution of polyol pathway to diabetes-induced oxidative stress." J Am Soc Nephrol **14**(8 Suppl 3): S233-236.

de la Fuente, J. A., S. Manzanaro, M. J. Martin, T. G. de Quesada, I. Reymundo, S. M. Luengo and F. Gago (2003). "Synthesis, activity, and molecular modeling studies of novel human aldose reductase inhibitors based on a marine natural product." J Med Chem **46**(24): 5208-5221.

Dogan, S., M. Unal, N. Ozturk, P. Yargicoglu, A. Cort, I. Spasojevic, I. Batinic-Haberle and M. Aslan (2011). "Manganese porphyrin reduces retinal injury induced by ocular hypertension in rats." Exp Eye Res **93**(4): 387-396.

Dunlop, M. (2000). "Aldose reductase and the role of the polyol pathway in diabetic nephropathy." Kidney Int Suppl **77**: S3-12.

Ferreira, S. M., S. F. Lerner, R. Brunzini, P. A. Evelson and S. F. Llesuy (2004). "Oxidative stress markers in aqueous humor of glaucoma patients." American Journal of Ophthalmology **137**(1): 62-69.

Ferreira, S. M., S. F. Lerner, R. Brunzini, C. G. Reides, P. A. Evelson and S. F. Llesuy (2010). "Time course changes of oxidative stress markers in a rat experimental glaucoma model." Invest Ophthalmol Vis Sci **51**(9): 4635-4640.

Frank, R. N., R. J. Keirn, A. Kennedy and K. W. Frank (1983). "Galactose-induced retinal capillary basement membrane thickening: prevention by Sorbinil." Invest Ophthalmol Vis Sci **24**(11): 1519-1524.

Gabbay, K. H. (1973). "The sorbitol pathway and the complications of diabetes." N Engl J Med **288**(16): 831-836.

Garcia-Valenzuela, E., S. Shareef, J. Walsh and S. C. Sharma (1995). "Programmed cell death of retinal ganglion cells during experimental glaucoma." Experimental Eye Research **61**(1): 33-44.

Guidarelli, A., F. Cattabeni and O. Cantoni (1997). "Alternative mechanisms for hydroperoxide-induced DNA single strand breakage." Free Radic Res **26**(6): 537-547.

He, Y., K. W. Leung, Y.-H. Zhang, S. Duan, X.-F. Zhong, R.-Z. Jiang, Z. Peng, J. Tombran-Tink and J. Ge (2008). "Mitochondrial Complex I Defect Induces ROS Release and Degeneration in Trabecular Meshwork Cells of POAG Patients: Protection by Antioxidants." Investigative Ophthalmology & Visual Science **49**(4): 1447-1458.

Higa, J. K. and J. Panee (2011). "Bamboo extract reduces interleukin 6 (IL-6) overproduction under lipotoxic conditions through inhibiting the activation of NF- κ B and AP-1 pathways." Cytokine **55**(1): 18-23.

Hu, C., Y. Zhang and D. D. Kitts (2000). "Evaluation of Antioxidant and Prooxidant Activities of Bamboo *Phyllostachys nigra* Var. Henonis Leaf Extract in Vitro." Journal of Agricultural and Food Chemistry **48**(8): 3170-3176.

Inokuchi, Y., M. Shimazawa, Y. Nakajima, S. Suemori, S. Mishima and H. Hara (2006). "Brazilian green propolis protects against retinal damage in vitro and in vivo." Evid Based Complement Alternat Med **3**(1): 71-77.

Izzotti, A., A. Bagnis and S. C. Sacca (2006). "The role of oxidative stress in glaucoma." Mutat Res **612**(2): 105-114.

Izzotti, A., S. C. Saccà, C. Cartiglia and S. De Flora (2003). "Oxidative deoxyribonucleic acid damage in the eyes of glaucoma patients." The American Journal of Medicine **114**(8): 638-646.

Jung, H. A., M. D. N. Islam, Y. S. Kwon, S. E. Jin, Y. K. Son, J. J. Park, H. S. Sohn and J. S. Choi (2011). "Extraction and identification of three major aldose reductase inhibitors from *Artemisia montana*." Food and Chemical Toxicology **49**(2): 376-384.

Jung, S. H., B. J. Kim, E. H. Lee and N. N. Osborne (2010). "Isoquercitrin is the most effective antioxidant in the plant *Thuja orientalis* and able to counteract oxidative-induced damage to a transformed cell line (RGC-5 cells)." Neurochemistry International **57**(7): 713-721.

Jung, S. H., J. M. Lee, H. J. Lee, C. Y. Kim, E. H. Lee and B. H. Um (2007). "Aldose Reductase and Advanced Glycation Endproducts Inhibitory Effect of *Phyllostachys nigra*." Biological and Pharmaceutical Bulletin **30**(8): 1569-1572.

Kador, P. F., J. H. Kinoshita, W. H. Tung and L. T. Chylack, Jr. (1980). "Differences in the susceptibility of various aldose reductases to inhibition. II." Invest Ophthalmol Vis Sci **19**(8): 980-982.

Kalesnykas, G., E. N. Oglesby, D. J. Zack, F. E. Cone, M. R. Steinhart, J. Tian, M. E. Pease and H. A. Quigley (2012). "Retinal ganglion cell morphology after optic nerve crush and experimental glaucoma." Invest Ophthalmol Vis Sci **53**(7): 3847-3857.

Kawanishi, K., H. Ueda and M. Moriyasu (2003). "Aldose reductase inhibitors from the nature." Curr Med Chem **10**(15): 1353-1374.

Keski-Saari, S., V. Ossipov, R. Julkunen-Tiitto, J. Jia, K. Danell, T. Veteli, Z. Guiguan, X. Yaowu and P. Niemelä (2008). "Phenolics from the culms of five bamboo species in the Tangjiahe and Wolong Giant Panda Reserves, Sichuan, China." Biochemical Systematics and Ecology **36**(10): 758-765.

Kim, J. A., Y. S. Kang, Y. O. Kim, S. H. Lee and Y. S. Lee (1998). "Role of Ca²⁺ influx in the tert-butyl hydroperoxide-induced apoptosis of HepG2 human hepatoblastoma cells." Exp Mol Med **30**(3): 137-144.

Kim, K. A., S. H. Shim, H. R. Ahn and S. H. Jung (2013). "Protective effects of the compounds isolated from the seed of *Psoralea corylifolia* on oxidative stress-induced retinal damage." Toxicol Appl Pharmacol **269**(2): 109-120.

Kim, S. M., K. Kang, E. H. Jho, Y.-J. Jung, C. W. Nho, B.-H. Um and C.-H. Pan (2011). "Hepatoprotective Effect of Flavonoid Glycosides from *Lespedeza cuneata* against Oxidative Stress Induced by tert-Butyl Hydroperoxide." Phytotherapy Research **25**(7): 1011-1017.

Ko, M. L., P. H. Peng, S. Y. Hsu and C. F. Chen (2010). "Dietary deficiency of vitamin E aggravates retinal ganglion cell death in experimental glaucoma of rats." Curr Eye Res **35**(9): 842-849.

Ko, M. L., P. H. Peng, M. C. Ma, R. Ritch and C. F. Chen (2005). "Dynamic changes in reactive oxygen species and antioxidant levels in retinas in experimental glaucoma." Free Radic Biol Med **39**(3): 365-373.

Kohen, R. and A. Nyska (2002). "Oxidation of biological systems: oxidative stress

phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification." Toxicol Pathol **30**(6): 620-650.

Kong, Y. X., N. van Bergen, B. V. Bui, V. Chrysostomou, A. J. Vingrys, I. A. Trounce and J. G. Crowston (2012). "Impact of aging and diet restriction on retinal function during and after acute intraocular pressure injury." Neurobiol Aging **33**(6): 1126.e1115-1125.

Kovacic, P. and J. D. Jacintho (2001). "Mechanisms of carcinogenesis: focus on oxidative stress and electron transfer." Curr Med Chem **8**(7): 773-796.

Koya, D., M. Haneda, R. Kikkawa and G. L. King (1998). "d-alpha-tocopherol treatment prevents glomerular dysfunctions in diabetic rats through inhibition of protein kinase C-diacylglycerol pathway." Biofactors **7**(1-2): 69-76.

Kweon, M.-H., H.-J. Hwang and H.-C. Sung (2001). "Identification and Antioxidant Activity of Novel Chlorogenic Acid Derivatives from Bamboo (*Phyllostachys edulis*)." Journal of Agricultural and Food Chemistry **49**(10): 4646-4655.

Lam, T. T., A. S. Abler, J. M. Kwong and M. O. Tso (1999). "N-methyl-D-aspartate (NMDA)--induced apoptosis in rat retina." Invest Ophthalmol Vis Sci **40**(10): 2391-2397.

Lee, A. Y. and S. S. Chung (1999). "Contributions of polyol pathway to oxidative stress in diabetic cataract." Faseb j **13**(1): 23-30.

Lee, H. J., K.-A. Kim, K. D. Kang, E. H. Lee, C. Y. Kim, B. H. Um and S. H. Jung (2010). "The compound isolated from the leaves of *Phyllostachys nigra* protects oxidative stress-induced retinal ganglion cells death." Food and Chemical Toxicology **48**(6): 1721-1727.

Lee, J., D. S. Jang, N. H. Kim, Y. M. Lee, J. Kim and J. S. Kim (2011). "Galloyl glucoses from the seeds of *Cornus officinalis* with inhibitory activity against protein glycation, aldose reductase, and cataractogenesis ex vivo." Biol Pharm Bull **34**(3): 443-446.

Lee, K. Y., M. Nakayama, M. Aihara, Y. N. Chen and M. Araie (2010). "Brimonidine is neuroprotective against glutamate-induced neurotoxicity, oxidative stress, and hypoxia in purified rat retinal ganglion cells." Mol Vis **16**: 246-251.

Lee, S., L. Sheck, J. G. Crowston, N. J. Van Bergen, E. C. O'Neill, F. O'Hare, Y. X. Kong, V. Chrysostomou, A. L. Vincent and I. A. Trounce (2012). "Impaired complex-I-linked respiration and ATP synthesis in primary open-angle glaucoma patient lymphoblasts." Invest Ophthalmol Vis Sci **53**(4): 2431-2437.

Leong, A. C.-N., Y. Kinjo, M. Tako, H. Iwasaki, H. Oku and H. Tamaki (2010). "Flavonoid glycosides in the shoot system of Okinawa Taumu (*Colocasia esculenta* S.)." Food Chemistry **119**(2): 630-635.

Levin, L. A. and P. Peebles (2008). "History of neuroprotection and rationale as a therapy for glaucoma." Am J Manag Care **14**(1 Suppl): S11-14.

Li, G. Y. and N. N. Osborne (2008). "Oxidative-induced apoptosis to an immortalized ganglion cell line is caspase independent but involves the activation of poly(ADP-ribose)polymerase and apoptosis-inducing factor." Brain Res **1188**: 35-43.

Lin, M. T. and M. F. Beal (2006). "Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases." Nature **443**(7113): 787-795.

Loschen, G. and A. Azzi (1975). "On the formation of hydrogen peroxide and oxygen radicals in heart mitochondria." Recent Adv Stud Cardiac Struct Metab **7**: 3-12.

Lu, B., X. Wu, X. Tie, Y. Zhang and Y. Zhang (2005). "Toxicology and safety of anti-oxidant of bamboo leaves. Part 1: Acute and subchronic toxicity studies on anti-oxidant of bamboo leaves." Food and Chemical Toxicology **43**(5): 783-792.

Manach, C., A. Scalbert, C. Morand, C. Remesy and L. Jimenez (2004). "Polyphenols: food sources and bioavailability." Am J Clin Nutr **79**(5): 727-747.

Marcic, T. S., D. A. Belyea and B. Katz (2003). "Neuroprotection in glaucoma: a model for neuroprotection in optic neuropathies." Current Opinion in Ophthalmology **14**(6): 353-356.

Martin, K. R., H. Levkovitch-Verbin, D. Valenta, L. Baumrind, M. E. Pease and H. A. Quigley (2002). "Retinal glutamate transporter changes in experimental glaucoma and after optic nerve transection in the rat." Invest Ophthalmol Vis Sci **43**(7): 2236-2243.

Martinez-Montemayor, M. M., E. Otero-Franqui, J. Martinez, A. De La Mota-Peynado, L. A. Cubano and S. Dharmawardhane (2010). "Individual and combined soy isoflavones exert differential effects on metastatic cancer progression." Clin Exp Metastasis **27**(7): 465-480.

Mejía, A. I., C. Gallardo, J. J. Vallejo, G. Ramírez, C. Arboleda, E. S. Durango, F. Jaramillo and E. Cadavid (2009). "Plantas del género bambusa: importancia y aplicaciones en la industria farmacéutica, cosmética y alimentaria." Vitae **16**(3): 396-405.

Messina, M. J. and C. E. Wood (2008). "Soy isoflavones, estrogen therapy, and breast cancer risk: analysis and commentary." Nutr J **7**: 17.

Moreno, M. C., J. Campanelli, P. Sande, D. A. Sanez, M. I. Keller Sarmiento and R. E. Rosenstein (2004). "Retinal oxidative stress induced by high intraocular pressure." Free Radic Biol Med **37**(6): 803-812.

Morgan, J. E. (2000). "Optic nerve head structure in glaucoma: astrocytes as mediators of axonal damage." Eye (Lond) **14** (Pt **3B**): 437-444.

Morre, D. M., G. Lenaz and D. J. Morre (2000). "Surface oxidase and oxidative stress propagation in aging." J Exp Biol **203**(Pt 10): 1513-1521.

Mu, J., T. Uehara, J. Li and T. Furuno (2004). "Identification and evaluation of antioxidant activities of bamboo extracts." Forestry Studies in China **6**(2): 1-5.

Nucci, C., R. Tartaglione, L. Rombola, L. A. Morrone, E. Fazzi and G. Bagetta (2005). "Neurochemical evidence to implicate elevated glutamate in the mechanisms of high intraocular pressure (IOP)-induced retinal ganglion cell death in rat." Neurotoxicology **26**(5): 935-941.

Oates, P. J. and B. L. Mylari (1999). "Aldose reductase inhibitors: therapeutic implications for diabetic complications." Expert Opin Investig Drugs **8**(12): 2095-2119.

Osborne, N. N. (2008). "Pathogenesis of ganglion "cell death" in glaucoma and neuroprotection: focus on ganglion cell axonal mitochondria." Prog Brain Res **173**: 339-352.

Osborne, N. N., J. Melena, G. Chidlow and J. P. Wood (2001). "A hypothesis to explain ganglion cell death caused by vascular insults at the optic nerve head: possible implication

for the treatment of glaucoma." Br J Ophthalmol **85**(10): 1252-1259.

Ou, S., J. Shi, C. Huang, G. Zhang, J. Teng, Y. Jiang and B. Yang (2010). "Effect of antioxidants on elimination and formation of acrylamide in model reaction systems." Journal of Hazardous Materials **182**(1–3): 863-868.

Ozdemir, G., F. I. Tolun, M. Gul and S. Imrek (2009). "Retinal oxidative stress induced by intraocular hypertension in rats may be ameliorated by brimonidine treatment and N-acetyl cysteine supplementation." J Glaucoma **18**(9): 662-665.

Panee, J. (2009). Chapter 9 - Bamboo Extract in the Prevention of Diabetes and Breast Cancer. Complementary and Alternative Therapies and the Aging Population. R. R. Watson. San Diego, Academic Press: 159-177.

Paniker, N. V., S. K. Srivastava and E. Beutler (1970). "Glutathione metabolism of the red cells. Effect of glutathione reductase deficiency on the stimulation of hexose monophosphate shunt under oxidative stress." Biochim Biophys Acta **215**(3): 456-460.

Park, E.-J. and D.-Y. Jhon "Effects of bamboo shoot consumption on lipid profiles and bowel function in healthy young women." Nutrition **25**(7-8): 723-728.

Quigley, H. A. (1996). "Number of people with glaucoma worldwide." Br J Ophthalmol **80**(5): 389-393.

Quigley, H. A. (1999). "Neuronal death in glaucoma." Progress in Retinal and Eye Research **18**(1): 39-57.

Quigley, H. A. and A. T. Broman (2006). "The number of people with glaucoma worldwide in 2010 and 2020." Br J Ophthalmol **90**(3): 262-267.

Quigley, H. A., R. W. Nickells, L. A. Kerrigan, M. E. Pease, D. J. Thibault and D. J. Zack (1995). "Retinal ganglion cell death in experimental glaucoma and after axotomy occurs by apoptosis." Investigative Ophthalmology & Visual Science **36**(5): 774-786.

Raha, S. and B. H. Robinson (2000). "Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing." Trends in Biochemical Sciences **25**(10): 502-508.

Ramdas, W. D., R. C. Wolfs, J. C. Kiefte-de Jong, A. Hofman, P. T. de Jong, J. R. Vingerling and N. M. Jansonius (2012). "Nutrient intake and risk of open-angle glaucoma: the Rotterdam Study." Eur J Epidemiol **27**(5): 385-393.

Rauter, A. P., R. G. Lopes and A. Martins (2007). "C-glycosylflavonoids: Identification, bioactivity and synthesis." Natural Product Communications **2**(11): 1175-1196.

Riaño, N., X. Londoño, Y. López and J. Gómez (2002). "Plant growth and biomass distribution on *Guadua angustifolia* Kunth in relation to ageing in the Valle del Cauca – Colombia." The Journal of the American Bamboo Society **16**(1): 43-51.

Ridnour, L. A., J. S. Isenberg, M. G. Espey, D. D. Thomas, D. D. Roberts and D. A. Wink (2005). "Nitric oxide regulates angiogenesis through a functional switch involving thrombospondin-1." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(37): 13147-13152.

Robbins, R. J. (2003). "Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology." J Agric Food Chem **51**(10): 2866-2887.

Robison, W. G., Jr., M. Nagata, N. Laver, T. C. Hohman and J. H. Kinoshita (1989). "Diabetic-like retinopathy in rats prevented with an aldose reductase inhibitor." Invest Ophthalmol Vis Sci **30**(11): 2285-2292.

Russo, R., F. Cavaliere, L. Rombola, M. Gliozzi, A. Cerulli, C. Nucci, E. Fazzi, G. Bagetta, M. T. Corasaniti and L. A. Morrone (2008). "Rational basis for the development of coenzyme Q10 as a neurotherapeutic agent for retinal protection." Prog Brain Res **173**: 575-582.

Saccà, S., A. Pascotto, P. Camicione, P. Capris and A. Izzotti (2005). "Oxidative dna damage in the human trabecular meshwork: Clinical correlation in patients with primary open-angle glaucoma." Archives of Ophthalmology **123**(4): 458-463.

Sandstrom, B. E. (1991). "Induction and rejoining of DNA single-strand breaks in relation to cellular growth in human cells exposed to three hydroperoxides at 0 degrees C and 37 degrees C." Free Radic Res Commun **15**(2): 79-89.

Satya, S., L. M. Bal, P. Singhal and S. N. Naik (2010). "Bamboo shoot processing: food quality and safety aspect (a review)." Trends in Food Science & Technology **21**(4): 181-189.

Schwartz, M. and E. Yoles (2000). "Neuroprotection: a new treatment modality for glaucoma?" Curr Opin Ophthalmol **11**(2): 107-111.

Stagos, D., G. D. Amoutzias, A. Matakos, A. Spyrou, A. M. Tsatsakis and D. Kouretas (2012). "Chemoprevention of liver cancer by plant polyphenols." Food and Chemical Toxicology **50**(6): 2155-2170.

Taffe, B. G., N. Takahashi, T. W. Kensler and R. P. Mason (1987). "Generation of free radicals from organic hydroperoxide tumor promoters in isolated mouse keratinocytes. Formation of alkyl and alkoxyl radicals from tert-butyl hydroperoxide and cumene hydroperoxide." J Biol Chem **262**(25): 12143-12149.

Tataru, L. C. and C. M. Bogdanici (2009). "[Glaucoma--neurodegenerative disease]." Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi **113**(4): 1120-1125.

Tezel, G. (2006). "Oxidative stress in glaucomatous neurodegeneration: mechanisms and consequences." Prog Retin Eye Res **25**(5): 490-513.

Tezel, G. (2009). "The role of glia, mitochondria, and the immune system in glaucoma." Invest Ophthalmol Vis Sci **50**(3): 1001-1012.

Tezel, G. and X. Yang (2004). "Caspase-independent component of retinal ganglion cell death, in vitro." Invest Ophthalmol Vis Sci **45**(11): 4049-4059.

Tezel, G., X. Yang and J. Cai (2005). "Proteomic identification of oxidatively modified retinal proteins in a chronic pressure-induced rat model of glaucoma." Invest Ophthalmol Vis Sci **46**(9): 3177-3187.

Tomlinson, D. R., E. J. Stevens and L. T. Diemel (1994). "Aldose reductase inhibitors and their potential for the treatment of diabetic complications." Trends in Pharmacological Sciences **15**(8): 293-297.

Toris, C. B. (2010). "Pharmacotherapies for glaucoma." Curr Mol Med **10**(9): 824-840.

Valko, M., H. Morris, M. Mazur, P. Rapta and R. F. Bilton (2001). "Oxygen free radical

generating mechanisms in the colon: do the semiquinones of vitamin K play a role in the aetiology of colon cancer?" Biochim Biophys Acta **1527**(3): 161-166.

Valko, M., C. J. Rhodes, J. Moncol, M. Izakovic and M. Mazur (2006). "Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer." Chem Biol Interact **160**(1): 1-40.

Varma, R., P. Peeples, J. G. Walt and T. J. Bramley (2008). "Disease progression and the need for neuroprotection in glaucoma management." Am J Manag Care **14**(1 Suppl): S15-19.

Vastano, B. C., Y. Chen, N. Zhu, C.-T. Ho, Z. Zhou and R. T. Rosen (2000). "Isolation and Identification of Stilbenes in Two Varieties of Polygonum cuspidatum." Journal of Agricultural and Food Chemistry **48**(2): 253-256.

Veeresham, C., A. Rama Rao and K. Asres (2014). "Aldose reductase inhibitors of plant origin." Phytother Res **28**(3): 317-333.

Waki, T., I. Nakanishi, K.-i. Matsumoto, J. Kitajima, T. Chikuma and S. Kobayashi (2012). "Key Role of Chemical Hardness to Compare 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl Radical Scavenging Power of Flavone and Flavonol *O*-Glycoside and *C*-Glycoside Derivatives." Chemical and Pharmaceutical Bulletin **60**(1): 37-44.

Weinreb, R. N. and L. A. Levin (1999). "Is neuroprotection a viable therapy for glaucoma?" Arch Ophthalmol **117**(11): 1540-1544.

Yang, J., G. I. n. Tezel, R. V. Patil, C. Romano and M. B. Wax (2001). "Serum Autoantibody against Glutathione S-Transferase in Patients with Glaucoma." Investigative Ophthalmology & Visual Science **42**(6): 1273-1276.

Young, R. J., D. J. Ewing and B. F. Clarke (1983). "A controlled trial of sorbinil, an aldose reductase inhibitor, in chronic painful diabetic neuropathy." Diabetes **32**(10): 938-942.

Yuki, K., D. Murat, I. Kimura and K. Tsubota (2010). "Increased serum total antioxidant status and decreased urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine levels in patients with normal-tension glaucoma." Acta Ophthalmol **88**(7): e259-264.

Zeng, P., Y. Zhang, C. Pan, Q. Jia, F. Guo, Y. Li, W. Zhu and K. Chen (2013). "Advances in studying of the pharmacological activities and structure–activity relationships of natural C-glycosylflavonoids." Acta Pharmaceutica Sinica B **3**(3): 154-162.

Zhang, B. and N. N. Osborne (2006). "Oxidative-induced retinal degeneration is attenuated by epigallocatechin gallate." Brain Res **1124**(1): 176-187.

Zhang, Y., B. Bao, B. Lu, Y. Ren, X. Tie and Y. Zhang (2005). "Determination of flavone C-glucosides in antioxidant of bamboo leaves (AOB) fortified foods by reversed-phase high-performance liquid chromatography with ultraviolet diode array detection." Journal of Chromatography A **1065**(2): 177-185.

Zhang, Y., J. Chen, X. Zhang, X. Wu and Y. Zhang (2007). "Addition of Antioxidant of Bamboo Leaves (AOB) Effectively Reduces Acrylamide Formation in Potato Crisps and French Fries." Journal of Agricultural and Food Chemistry **55**(2): 523-528.

Zhang, Y., J. Jiao, C. Liu, X. Wu and Y. Zhang (2008). "Isolation and purification of four flavone C-glycosides from antioxidant of bamboo leaves by macroporous resin column

chromatography and preparative high-performance liquid chromatography." Food Chemistry **107**(3): 1326-1336.

Zhang, Y., X. Tie, B. Bao, X. Wu and Y. Zhang (2007). "Metabolism of flavone C-glucosides and p-coumaric acid from antioxidant of bamboo leaves (AOB) in rats." Br J Nutr **97**(3): 484-494.

Zhang, Y. and Y. Zhang (2008). "Effect of natural antioxidants on kinetic behavior of acrylamide formation and elimination in low-moisture asparagine-glucose model system." Journal of Food Engineering **85**(1): 105-115.

Zhang, Z., X. Wang, S. Yu and M. Zhao (2011). "Isolation and antioxidant activities of polysaccharides extracted from the shoots of *Phyllostachys edulis* (Carr.)." International Journal of Biological Macromolecules **49**(4): 454-457.

Zhong, Y. S., C. K. Leung and C. P. Pang (2007). "Glial cells and glaucomatous neuropathy." Chin Med J (Engl) **120**(4): 326-335.

Zhou, L., Y. Li and B. Y. J. T. Yue (1999). "Oxidative stress affects cytoskeletal structure and cell-matrix interactions in cells from an ocular tissue: The trabecular meshwork." Journal of Cellular Physiology **180**(2): 182-189.

Zielińska, D. and H. Zieliński (2011). "Antioxidant activity of flavone C-glucosides determined by updated analytical strategies." Food Chemistry **124**(2): 672-678.

3. AREA DE APLICACIÓN

La presente invención está relacionada con una composición que comprende un extracto de bambú *Guadua* para usarse en la prevención o mejoramiento de la lesión isquémica. También se puede utilizar para proteger las células de la muerte celular inducida por estrés oxidativo. Las nuevas estrategias de tratamiento con bambú *Guadua* son de facilidad de uso para los pacientes objetivo.

4. TIPO DE ACTIVIDAD Y USOS QUE SE DARÁ AL RECURSO

Las hojas maduras de *guadua angustifolia* recolectadas se secaron y luego fueron molidas hasta un tamaño de partícula adecuado. Posteriormente se les realizó un análisis bromatológico (humedad, grasa, ceniza, fibra dietaria total) y también se les realizaron extracciones alcohólicas y luego fraccionamientos con diversos solventes para separar familias o grupos de compuestos químicos basados en su polaridad. Luego con los extractos o subextractos se hacen pruebas de identificación de algunos tipos de compuestos como por ejemplo alcaloides, flavonoides, glucósidos cianogénicos, azúcares reductores, saponinas, taninos, quinonas, cumarinas, glicósidos cardiotónicos, sesquiterpenlactonas, etc., También se realizaron con los extractos o subfracciones perfiles cromatográficos e identificación de moléculas con posible actividad biológica como por ejemplo algunos flavonoides. Se realizaron igualmente pruebas de captación de radicales libres por DPPH.

Con extractos y subfracciones (subextractos) obtenidos a partir de las hojas secas y molidas en la universidad de Antioquia, también se realizaron algunas pruebas de HPLC con ABTS en línea, y las pruebas de actividad biológica *in vitro* e *in vivo* como los ensayos de viabilidad celular por el ensayo de reducción del MTT,

evaluación de los niveles intracelulares de especies reactivas del oxígeno (ROS) con la prueba radicalaria 2',7' diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCFH-DA), los análisis microscópicos para viabilidad celular por doble tinción con PI y Hoechst 33342; las pruebas de extracción de proteína del tejido retinal o células totales, los análisis de Western blot, los ensayo de lipoperoxidación la evaluación de la inhibición de la aldosa reductasa, las pruebas de Lesión de la retina inducida por NMDA y daño retinal inducido por compresión del nervio óptico.

5. LISTA DE REFERENCIA DE RECURSOS GENÉTICOS, PRODUCTOS DERIVADOS Y COMPONENTES INTANGIBLES ASOCIADOS, A LOS QUE SE PRETENDE ACCEDER (NOMBRE CIENTÍFICO, NOMBRE VULGAR Y NÚMERO DE MUESTRAS)

Nombre Científico: *Guadua angustifolia*

Nombre común: *guadua angustifolia* o simplemente *guadua*.

Se desea acceder a la recolección y uso de hojas maduras de *Guadua angustifolia* y de sus productos derivados con posibles fines de explotación comercial.

Para este trabajo se recolectó un bulto de hojas; pero se desea tener acceso libre siempre y cuando la recolección se realice en fincas privadas y con permiso o venta por parte de sus dueños teniendo en cuenta que aunque la *guadua angustifolia* se considera una planta de nuestra biodiversidad, existen cadenas productivas que estimulan e incentivan su cultivo y la comercialización y que ya existen cultivos tecnificados y controlados de *guadua* en los cuales se hace un manejo responsable y ecológicamente amigable, igualmente se debe considerar que en todos los casos no se desea competir con otras cadenas productivas, las hojas siempre se recolectan después de que quedan como desecho o subproducto cuando los tallos son cortados para ser usados como material para la construcción o para otras aplicaciones.

6. LOCALIZACION DE LAS AREAS DE ACCESO Y DE REALIZACION DE LAS ACTIVIDADES DE ACCESO (COORDENADAS)

a) DE RECOLECCION

Se desea tener acceso a recurso genético en tres áreas principales, escogidas porque agrupan a 10 predios que hacen parte de un núcleo piloto de producción de *Guadua* en el municipio de Montenegro, departamento del Quindío que surge como iniciativa para organizar a diversos productores y comercializadores de *guadua* y que se financia con un proyecto del sistema general de regalías llamado procesos innovadores en la cadena de suministro de la *guadua* en el departamento del Quindío.

Localización Geográfica:

Departamento (s)	Municipio (s)
	Relación de Municipios por cada Departamento. Especifique Vereda y/o Corregimiento
Quindío	Fincas La Tolda y San Diego que quedan en límites entre las veredas Urantia y Buenos Aires.

	Municipio: Montenegro
Quindío	Fincas Rancho la Soledad y La Julia que quedan en la vereda la Julia; y Finca la Esperanza queda en la vereda Santa Rita. Municipio: Montenegro
Quindío	Sector Orinoco, parcelación donde se ubican entre otras las fincas La Primavera, La Germania, El Agrado, El Oasis y Villa Alejandra que quedan ubicadas en la vereda Guatemala. Municipio: Montenegro

b) UBICACION DEL AREA DE ACCESO

In Situ

☐

Ex Situ

☐

Coordenada

☒

Localización Cartográfica. Las Coordenadas de las tres zonas previamente descritas están en Sistema de Proyección Magna Sirgas, usando como definición de origen a Magna-Colombia - Bogotá.

X = ESTE	Y = NORTE
803197,8	991445,9
805004,9	991441,6
803195,6	990520,6
805002,7	990516,2
814406,0	996182,0
815548,6	997170,8
817640,8	995400,7
815427,4	993692,6
803413,0	989078,0
803411,7	988524,8
804337,0	988522,6
804338,4	989075,7

Detalle: Con previa autorización del propietario de un predio o finca, se recolectaron hojas de Guadua angustifolia (En ese predio de carácter privado, la guadua se cultiva con fines de explotación comercial para uso en el sector de la construcción. Cuando se corta una guadua, ésta vuelve y retoña y es un cultivo renovable y sostenible, las hojas son un subproducto o desecho que no tiene ninguna aplicación; se decide trabajar con las hojas precisamente para darle un valor agregado adicional a la cadena productiva de la guadua).

c) LUGAR DE PROCESAMIENTO Y/O USO DEL MATERIAL GENETICO, LOCALIZACIÓN

El procesamiento de las hojas de guadua recolectadas, el análisis

bromatológico, las extracciones y fraccionamientos con solventes para obtener extractos y sub fracciones, las pruebas de identificación de algunos tipos de compuestos, los perfiles cromatográficos por HPLC y las pruebas de captación por radicales libres **se hicieron en las instalaciones de grupo Biopolimer de la Universidad de Antioquia así como en otras instalaciones de la Universidad de Antioquia en la ciudad de Medellín.**

Con algunos de los extractos o subfracciones obtenidos en la Universidad de Antioquia, Faiber Alexis Jaramillo Yepes durante pasantías doctorales, realizó en las instalaciones del Korea Institute of Science and Technology – KIST, algunas pruebas de HPLC con ABTS en línea, y las pruebas de actividad biológica *in vitro* como los ensayos de viabilidad celular por el ensayo de reducción del MTT, evaluación de los niveles intracelulares de especies reactivas del oxígeno (ROS) con la prueba radicalaria 2',7' diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCFH-DA), los análisis microscópicos para viabilidad celular por doble tinción con PI y Hoechst 33342; las pruebas de extracción de proteína del tejido retinal o células totales, análisis Histológicos (Tinción con hematoxilina y eosina), los análisis de Western blot, los ensayo de lipoperoxidación y la evaluación de la inhibición de la aldosa reductasa.

- EN CASO DE RECURSOS EX SITU SE INCLUIRÁ LA INFORMACION RELEVANTE SOBRE EL CENTRO DE COMERCIALIZACION EX SITU.

7. CRONOGRAMA INDICATIVO

ACTIVIDADES	TIEMPO	LUGAR	METODOLOGIA *
EXPLORACION	Febrero del 2011	Departamento del Quindío	Diálogos con personal de la Cadena Productiva de la Guadua del departamento del Quindío.
RECOLECCION	Febrero del 2011	Finca El Oasis, vereda Guatemala, Municipio de Montenegro - Quindío	Se recolectó un bulto de hojas maduras de guadua angustifolia que resultaron como subproducto después de haber sido colectados para construcción tallos de guadua de tres años de edad. La caracterización taxonómica se realizó con la ayuda de personal especializado de la Cadena Productiva de la guadua del departamento del Quindío.
EXTRACCION	Febrero de 2011	Finca El Oasis, vereda Guatemala, Municipio de Montenegro - Quindío	Se extraen las hojas de guadua angustifolia de su ecosistema, empacadas en un bulto de fibra.
MANEJO	Febrero de 2011	Grupo Biopolimer – Universidad de Antioquia	Inmediatamente después de haber sido recolectadas y empacadas las hojas, son transportadas por transporte terrestre hasta la Universidad de Antioquia y para evitar deterioro inmediatamente son puestas a secar en estufas para reducir su contenido de humedad.
INVESTIGACION	Febrero de 2011 – diciembre de 2014	Universidad de Antioquia y Korea Institute of Science and Technology KIST	Tal y como se mencionó en el numeral 6 de este documento, en la Universidad de Antioquia después del secado, se realizaron todas las actividades de molienda y las extracciones y subextracciones. Con los extractos y subfracciones obtenidos, se realizaron diversas pruebas en la Universidad de Antioquia y en el KIST.

Duración aproximada: 47 meses

* Tipo y tamaño de la muestra, diseño de muestreo y tipo de caracterización.

8. MATERIALES Y MÉTODOS

Hojas de *Guadua angustifolia*

Se recolectaron hojas maduras de *Guadua angustifolia* que resultaron como subproducto después de haber sido colectados para construcción tallos de *Guadua* de tres años de edad. La caracterización taxonómica se realizó con la ayuda de personal especializado de la Cadena Productiva de la *Guadua* del departamento del Quindío.

Desecación: El material vegetal colectado se dispone para su secado en estufas de circulación de aire forzado a una temperatura no mayor de 60°C.

Molienda: Luego del secado, todo el material vegetal es molido en un molino de cuchillas para obtener un polvo fino a fin de aumentar el área superficial y optimizar la extracción.

Extracción metanólica: Hojas secas y molidas, fueron depositados en un balón de reflujo de y dispuestos en una manta de calefacción con soporte para condensador, donde se realizó extracción con Metanol (MeOH) durante un periodo de tiempo determinado y por triplicado. El sobrenadante es separado y evaporado a sequedad para luego resuspenderse el residuo en agua desionizada.

Fraccionamiento por solventes: El extracto seco metanólico es resuspendido en agua. Luego se hace una extracción líquida-líquida con un solvente orgánico en embudo de separación. La fase orgánica es separada de la fase acuosa y luego se hace extracción con otro solvente orgánico en las mismas condiciones anteriores. Así sucesivamente se realiza con otros solventes orgánicos en orden según la polaridad, repitiendo cada vez el paso de separación de fases. Finalmente son obtenidos los residuos secos de cada fracción.

Perfiles cromatográficos e identificación de moléculas con posible actividad biológica

De cada fracción obtenida por los métodos de fraccionamiento descritos anteriormente, se prepara una muestra a una concentración apropiada para ser inyectada en el cromatógrafo líquido HPLC.

Métodos cromatográficos analíticos según la muestra a evaluar.

Se emplea un método que consiste en una fase móvil binaria que comprende agua acidificada y metanol. Las proporciones de los solventes se ajustan de manera adecuada para permitir la separación e identificación de los flavonoides o compuestos fenólicos que puedan estar presentes en la muestra.

Pruebas de captación de radicales libres DPPH

En un tubo de ensayo de 5 mL agregar 2250 μ L de una solución de DPPH de 40 ppm, adicionar 225 μ L de Etanol (EtOH) y finalmente añadir 25 μ L de la muestra (a una concentración definida anteriormente). Tapar el tubo con parafilm y aplicar vórtex por cinco segundos.

Luego de treinta minutos en oscuridad y por medio de una curva de calibración de trolox (μ mol/L) previamente construida, se realiza medición de la absorbancia a 517 nm, para obtener finalmente los equivalentes de trolox en μ mol/L de la muestra evaluada.

Pruebas de HPLC con ABTS en línea

Se realizaron pruebas de HPLC pero acopladas simultáneamente a un sistema de reacción con ABTS para determinar la capacidad captadora de radicales libres por ABTS a cada uno de los picos o compuestos aislados en el cromatograma y de esta manera poder determinar la presencia de compuestos antioxidantes en las fracciones o subextractos de *Guadua angustifolia*.

Pruebas in vitro

Cultivo de las células RGC-5 (células ganglionares de retina)

Estas células han mostrado previamente, expresar marcadores de células ganglionares y exhiben un comportamiento similar a las células ganglionares en cultivo.

Las células RGC-5 son cultivadas en medio DMEM que contiene 5 mM Glucosa, 100 u/mL penicilina/estreptomicina, 2mM glutamina, 5mg/mL genitcina activa y 10% de suero fetal bovino (FBS) inactivado por calor, en una incubadora con atmosfera humidificada con 5% de CO₂ a 37°C. Las células son subcultivadas dos veces por semana. Las RGC-5 son subcultivadas cuando han crecido a una confluencia de 70-80%, entonces son usadas para los experimentos

Ensayos de Viabilidad Celular

Fueron llevado a cabo para identificar fracciones o compuestos neuroprotectores de la *Guadua angustifolia* los cuales pueden ser usados para el tratamiento de enfermedades degenerativas de la retina. Se emplearon dos agentes lesionadores, el H₂O₂ y el glutamato más BSO, para causar estrés oxidativo en las células RGC5. La viabilidad celular es evaluada por el ensayo de reducción del MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (Cheng and Gonzalez 1986).

Evaluación de los niveles intracelulares de especies reactivas del oxígeno (ROS)

Para cuantificar las especies reactivas del oxígeno (ROS) intracelulares, es usada la prueba radicalaria 2',7' diclorodihidrofluoresceina diacetato (DCFH-DA). Las especies reactivas (H₂O₂, O₂^{•-}, o •OH) oxidan la dicloro dihidro fluoresceina no fluorescente (DCFH) a diclorodihidro fluoresceina fluorescente (DCF). Esta prueba se hace para medir la capacidad que tiene un compuesto o extracto en quelar o captar diversos radicales libres. La prueba se hace con cada radical independiente y de esta forma se puede verificar la especificidad del compuesto o extracto por cada especie radicalaria evaluada.

Protocolo de coloración con Yoduro de propidio (PI)/Hoechst (Análisis microscópico para viabilidad celular por doble tinción con PI y Hoechst 33342)

El análisis microscópico para evaluar la muerte celular apoptótica o necrótica causada por el BSO más glutamato es caracterizada o diferenciada por una doble tinción de las células con los colorantes fluorescentes, PI y Hoechst 33342. Después de las pruebas experimentales, las células son coloreadas con Hoechst 33342 8µM y PI 1.5µM durante 30 minutos a 37°C. Después se hacen dos lavados con medio libre de suero y luego las células son fotografiadas con un microscopio de fluorescencia (Nikon, Tokio, Japón) como es descrito por Jung y colaboradores (Koya, Haneda et al. 1998). Las células positivas al PI son contadas con un Hemocitómetro bajo un microscopio de fluorescencia a una magnificación de 100 veces, y cuatro imágenes representativas son usadas para estimar el porcentaje de células positivas al PI del total de número de células (mínimamente 200 células por cada pozo son contadas).

Extracción de proteína del tejido retinal o células totales

Las células RGC-5 colectadas o los tejidos de retina, son lavados tres veces con D-PBS frío. Se hace lisis celular a 4°C por 15 minutos en búfer de lisis celular [1 M Tris pH 7,4, 2 M NaCl, 1 M EDTA, 10% de NP-40, inhibidores de proteasa 1X y 1 mM PMSF] o búfer RIPA [150 mM NaCl, 1,0% de IGEPAL CA-630, 0,5% desoxicolato de sodio, 0,1% SDS, Tris 50 mM, pH 8,0, inhibidores de proteasa 1X y 1 mM PMSF]. Después se hace centrifugación a 14000g por 30 minutos a 4°C y luego los sobrenadantes se separan en un nuevo tubo y se analizan para concentración de proteína usando el kit de ensayo de proteínas Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories, Berkeley, CA, EE.UU.). Se adiciona el reactivo de Bradford y se lee la absorbancia a 595 nm. La concentración de proteína se determina en base a la curva estándar usando albúmina de suero bovino (BSA).

Ensayo de lipoperoxidación

La peroxidación lipídica fue evaluada para determinar la cantidad de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS, siglas en inglés) formadas, como es descrito en los estudios (Zhang and Osborne 2006, Jung, Kim et al. 2010). Con este ensayo se mide el efecto inhibitor y secuestrante de las muestras sobre los radicales libres que pueden oxidar lípidos y estructuras de la membrana celular de carácter lipofílico.

Evaluación de la inhibición de la aldosa reductasa

La aldosa reductasa AR (EC 1.1.1.21) es la primera enzima en la vía de los polioles la cual reduce el exceso de D-glucosa en D-sorbitol con concomitante conversión de fosfato de nicotinamida adenina dinucleótido reducido NADPH como cofactor a NADP⁺ (Carper, Wistow et al. 1989, Tomlinson, Stevens et al. 1994, Lee, Jang et al. 2011), lo cual ha demostrado tener roles importantes en las complicaciones diabéticas como la neuropatía, nefropatía, retinopatía, catarata y las enfermedades cardiovasculares (Frank, Keirn et al. 1983, Young, Ewing et al. 1983, Robison, Nagata et al. 1989, Dunlop 2000, Veeresham, Rama Rao et al. 2014). La AR se encuentra en casi todas las células de los mamíferos, pero en altas concentraciones en órganos como el cristalino o lente, la retina y los nervios ciáticos, los cuales son afectados como fue mencionado anteriormente (Jung, Islam et al. 2011). Las complicaciones son debidas al sorbitol y sus metabolitos porque tienen pobre penetración a través de las membranas y el metabolismo es ineficiente (Kador, Kinoshita et al. 1980). Entonces, la reducción del flujo de la vía de los polioles, el cual es inducido por la hiperglicemia, por los inhibidores de la aldosa reductasa, puede tener una oportunidad terapéutica potencial en el tratamiento y prevención de las complicaciones diabéticas (de la Fuente, Manzanaro et al. 2003, Kawanishi, Ueda et al. 2003).

Los radicales libres del oxígeno o, más en general, las especies reactivas del oxígeno (ROS, siglas en inglés), así como las especies reactivas de nitrógeno (RNS, siglas en inglés), son productos del metabolismo celular normal. Las ROS y RNS son bien conocidas por jugar un doble papel, como especies nocivas y beneficiosas, ya que pueden ser perjudiciales o beneficiosas para los sistemas vivos (Valko, Rhodes et al. 2006). Las especies reactivas están implicadas en una variedad de fenómenos biológicos, tales como la mutación, la carcinogénesis, enfermedades degenerativas, inflamación, envejecimiento, entre otros (Kohen and Nyska 2002). El efecto perjudicial de los radicales libres que causa daño biológico potencial se denomina estrés oxidativo y estrés nitrosativo. Esto ocurre en los sistemas biológicos cuando hay una sobreproducción de ROS/RNS en un lado y una deficiencia de antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos en el otro (Kovacic and Jacintho 2001, Valko, Morris et al. 2001, Ridnour, Isenberg et al. 2005).

El efecto antioxidante de los fitoquímicos puede ser identificado en un modelo que utiliza células HepG2 estresadas con terbutilhidroperóxido (t-BHP) (Alia, Ramos et al. 2006). El t-BHP es un hidroperóxido orgánico que puede descomponerse en tertbutilperoxilo, tertbutiloxilo y radical hidroxilo en sistemas de cultivos celulares (Taffe, Takahashi et al. 1987).

La descomposición de t-BHP acelera las reacciones en cadena de peroxidación lipídica, induce toxicidad celular por daño al ADN, y agota el GSH celular y las proteínas tioles, resultando en la alteración de la homeostasis del calcio intracelular y en un daño celular general y finalmente la apoptosis (Sandstrom 1991, Guidarelli, Cattabeni et al. 1997, Kim, Kang et al. 1998).

Pruebas con animales

Animales: Ratas Sprague-Dawley adultos machos (8 semanas de edad) y ratones ICR machos (5 semanas de edad) se obtuvieron de Bio-Medical Science (Seúl, Corea). Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética, Animal Care and Use Committee of Korea Institute of Science and Technology (KIST). Todos los estudios con animales fueron desarrollados en una zona con barrera libre de patógenos en el KIST de Gangneung de acuerdo con el esquema de procedimiento en el Estamento de ARVO para el Uso de Animales en Investigación Oftálmica y Visión (ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research).

Las ratas fueron anestesiadas por inyección intraperitoneal de una mezcla de Zoletil (Verbac Laboratories 06515, Francia) y Rompun (Bayer).

Lesión de la retina inducida por NMDA

Después de la anestesia, una solución de fracción de extracto más 2.5 mM de NMDA en 0.01 M de búfer salino fosfato (PBS) se inyectó en la cámara intravítrea o cuerpo vítreo del ojo izquierdo, usando una jeringa Hamilton de calibre 30 (Inokuchi, Shimazawa et al. 2006). Estudios anteriores han demostrado que la extensión de los cambios morfológicos de los axones del nervio óptico está relacionado con la dosis de NMDA administrada, y que cambios notables podrían ser detectados a una concentración de 2 nmol/ojo de NMDA (Lam, Abler et al. 1999). Una gota de solución oftálmica

al 0.5% de moxifloxacin (Alcon Laboratories Inc., Fort Worth, EE.UU.), como soluci3n antibacteriana para reducir el riesgo de infecci3n, se aplic3 t3picamente en el ojo tratado inmediatamente despu3s de la inyecci3n intrav3treas. Los animales fueron sacrificados un d3a despu3s de la inyecci3n de NMDA (para el an3lisis de Western blot) o a los 7 d3as (para el an3lisis histol3gico) despu3s de la inyecci3n de NMDA como est3 descrito en el art3culo de Kim y colaboradores (Kim, Shim et al. 2013).

An3lisis Histol3gico (Tinci3n con hematoxilina y eosina).

Con el fin de observar los cambios en el espesor de la capa de la retina causada por NMDA, se realiz3 tinci3n con hematoxilina y eosina.

Se realizaron ensayo de compresi3n del Nervio 3ptico (Siglas en ingl3s, ONC – Optic Nerve Crush-) y marcaci3n regresiva de las c3lulas ganglionares de retina (RGCs). Esta prueba se hace con el fin de observar la regeneraci3n del nervio 3ptico promovida por un compuesto o un extracto.

El an3lisis por Western Blot fue llevado a cabo para evaluar el efecto de la Guadua angustifolia en las prote3nas, PARP clivada, caspasa-3 clivada, caspasa-8 y caspasa-9 clivada, inducidas por el NMDA.

9. PROCEDIMIENTO DE EXPLORACION Y RECOLECCION

Despu3s de diversas conversaciones con personal de la cadena productiva de la guadua del departamento del Quind3o se decide desplazarse desde Medell3n en carro particular hasta la zona de recolecci3n en el municipio de Montenegro Quind3o y con acompa1amiento y apoyo de personal de la Cadena Productiva de la Guadua, se conversa con la propietaria de un predio qui3n permite la recolecci3n de un bulto de hojas de Guadua angustifolia, que junto con algunas ramas, son el producto de desecho que se genera a partir de unos tallos de guadua de 3 a1os de edad que est3n siendo cortados con fines de ser utilizados como materiales para la construcci3n. En ese mismo lugar se hace la caracterizaci3n taxon3mica de la planta para verificar que efectivamente se trata de guadua angustifolia aprovechando que se puede observar el h3bitat, y la planta completa (no s3lo sus hojas).

10. MANEJO DE LA MUESTRA

Inmediatamente se recolectan las hojas, son empacadas en un bulto de fibra, y son trasladadas por transporte terrestre hasta la Universidad de Antioquia y para evitar deterioro, inmediatamente son puestas a secar en estufas de circulaci3n de aire forzado a una temperatura no mayor de 60°C para reducir su contenido de humedad. Despu3s del secado, todo el material vegetal es molido en un molino de cuchillas para obtener un polvo fino con tama1o de part3cula apropiado, con el fin de aumentar el 3rea superficial y optimizar los procesos de extracci3n. Todo el material molido es almacenado en contenedores herm3ticos y en un lugar fresco, seco y protegido de la luz.

A partir del material seco y molido se realizan extracciones alcoh3licas y a partir del extracto alcoh3lico se realizan subextracciones con otros solventes, los extractos y subextractos o subfracciones son concentrados por rotaevaporaci3n del solvente y son almacenados bajo refrigeraci3n y/o congelaci3n para su utilizaci3n en posteriores an3lisis.

11. EVENTUALES RESULTADOS ESPERADOS

Caracterizaci3n bromatol3gica de las hojas de Guadua angustifolia, en cuanto a prote3na, grasa, cenizas, y fibra dietaria total.

Con la ayuda de una marcha fitoqu3mica, se determina que los extractos poseen

aminoácidos, flavonoides, leucoantocianinas, compuestos fenólicos y terpenoides.

Se determina el rendimiento de las extracciones y fraccionamientos con los diversos solventes.

Se determinan y cuantifican algunos flavonoides presentes en los extractos.

Se determina la actividad captadora de radicales libres por ABTS y DPPH de las diversas fracciones o subextractos.

Con ensayos de viabilidad celular, evaluación de los niveles intracelulares de especies reactivas del oxígeno (ROS), análisis microscópicos para viabilidad celular por doble tinción con PI y Hoechst 33342, pruebas de extracción de proteína del tejido retinal o células totales, análisis de Western blot, ensayo de lipoperoxidación, evaluación de la inhibición de la aldosa reductasa, pruebas de Lesión de la retina inducida por NMDA y daño retinal inducido por compresión del nervio óptico, se determina el efecto protector de los extractos de *Guadua angustifolia* en la muerte celular de las células ganglionares de retina (RGC-5) inducida por 0.5 mM BSO más 10 mM glutamato (B/G), se determina que uno de los subextractos protege contra la degeneración de la retina por los efectos antiapoptóticos mediante la inhibición de la activación de las proteínas apoptóticas. Se encuentra que algunas fracciones podrían ofrecer una protección parcial a la degeneración de retina por inhibición de la peroxidación lipídica. Se determina que fracciones de *Guadua angustifolia* previnieron significativamente la pérdida de células ganglionares de la retina en el daño retinal inducido por el ensayo de compresión del nervio óptico.

12. PRESUPUESTO INICIAL

Entidad	Dinero fresco	Aporte en especie	Totales
Colciencias (financiación del estudiante de doctorado que fue becario)	216'000.000		216'000.000
Universidad de Antioquia	30'000.000	20'000.000	50'000.000
Korea Institute of Science and Technology (KIST)	20'000.000	40'000.000	60'000.000
Valor total	266'000.000	60'000.000	326'000.000

13. OTROS

VI. CARTA DE ACEPTACION EN PRINCIPIO O CONTRATO DEL PROVEEDOR DE LOS RECURSOS BIOLOGICOS, DE LOS RECURSOS GENETICOS O DEL COMPONENTE INTANGIBLE

VII. CARTA DE COMPROMISO DE LA PERSONA O ENTIDAD NACIONAL DE APOYO

VIII. DECLARACION JURADA O AFFIDAVIT DEL SOLICITANTE, CONSIGNANDO LA VERACIDAD DE LOS DATOS ANOTADOS EN LA SOLICITUD.



UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA
1 8 0 3

20202601-9625

Medellín, 28 de Octubre de 2016

Doctora

PAULA ROJAS GUTIERREZ

Coordinadora Grupo de Recursos Genéticos

Dirección de Bosques, Biodiversidad y Servicios Ecosistémicos

Grupo de Recursos Genéticos

correspondencia@minambiente.gov.co; servicioalc Ciudadano@minambiente.gov.co

Ministerio de Medio Ambiente

Bogotá

Ref. Solicitud contrato marco de acceso a recurso genético

Respetada doctora Paula:

Acogiéndonos a lo establecido en el Artículo 252 de la ley 1753 del 9 de Junio de 2015, anexamos documentación para el tramitar el contrato de acceso a recurso del proyecto titulado "**Composición que comprende extractos de Guadua angustifolia para la prevención o el tratamiento de enfermedades de la retina**", investigador principal: profesor Freimar Segura.

Se adjunta (archivos):

1. Solicitud de contrato de acceso a recursos genéticos
2. Proyecto
3. Hoja de vida del responsable técnico del proyecto y del equipo de trabajo
4. Carta Institución Nacional de Apoyo (Universidad Nacional)
5. Acuerdo de Patente
6. Certificado obtención de las muestras
7. Certificación Ministerio del interior

Quedamos atentos a cualquier información adicional que se requiera.

Cordialmente,

MARÍA PATRICIA ARBELÁEZ M.

Vicerrectora de Investigación.

Transcriptor: Gloria V

VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIÓN

Ciudad Universitaria: Calle 67 N.º 53-108. Bloque 16, oficina 210 ■ **Recepción de correspondencia:** Calle 70 N.º 52-21

Teléfonos: 219 51 90, 219 51 92, 219 51 98 ■ Nit: 890.980.040-8 ■ Apartado: 1226

Correo electrónico: viceinvestigacion@udea.edu.co ■ Medellín, Colombia

Correspondencia

De: Vicerrectora Investigación Universidad de Antioquia
<viceinvestigacion@udea.edu.co>
Enviado el: viernes, 28 de octubre de 2016 14:06
Para: Correspondencia
Asunto: Grupo de Recursos Genéticos-Solicitud contrato marco de acceso a recurso genético
Datos adjuntos: 20202601-9625.pdf; 2012 spanish - Convenio marco de cooperación entre el Kist y la Universidad de Antioquia.pdf; Acuerdo de patente conjunta UdeA - KIST español.pdf; Carta Institución Nacional de Apoyo a UdeA.pdf; Certificado obtención legal de muestras Guadua 2016.pdf; Consulta Previa - Ministerio del Interior Certificacion20160727_0070(1).pdf; Declaración Jurada Freimar Segura Guadua 2016.pdf; Faiber Jaramillo Yepes - Hoja de Vida - Octubre 2016.pdf; Freimar Segura Sánchez - Hoja de Vida corta actualizada 2016.pdf; P-074 - Acta Regalías - Extractos Guadua.pdf; SOLICITUD DE ACCESO A RECURSO GENÉTICO - requisitos - Resolución_414.pdf

20202601-9625

Medellín, 28 de Octubre de 2016

Doctora

PAULA ROJAS GUTIERREZ

Coordinadora Grupo de Recursos Genéticos

Dirección de Bosques, Biodiversidad y Servicios Ecosistémicos

Grupo de Recursos Genéticos

correspondencia@minambiente.gov.co; servicioalciudadano@minambiente.gov.co

Ministerio de Medio Ambiente

Bogotá

Ref. Solicitud contrato marco de acceso a recurso genético

Respetada doctora Paula:

Acogiéndonos a lo establecido en el Artículo 252 de la ley 1753 del 9 de Junio de 2015, anexamos documentación para el tramitar el contrato de acceso a recurso del proyecto titulado “Composición que comprende extractos de Guadua angustifolia para la prevención o el tratamiento de enfermedades de la retina”, investigador principal: profesor Freimar Segura.

Se adjunta (11 archivos):

1. Solicitud de contrato de acceso a recursos genéticos
2. Proyecto
3. Hoja de vida del responsable técnico del proyecto y del equipo de trabajo
4. Carta Institución Nacional de Apoyo (Universidad Nacional)
5. Acuerdo de Patente
6. Certificado obtención de las muestras
7. Certificación Ministerio del interior

Quedamos atentos a cualquier información adicional que se requiera.

Cordialmente,

MARÍA PATRICIA ARBELÁEZ MONTOYA

Vicerrectora de Investigación

viceinvestigacion@udea.edu.co

2195190



"La información aquí contenida es para uso exclusivo de la persona o entidad de destino. Está estrictamente prohibida su utilización, copia, descarga, distribución, modificación y/o reproducción total o parcial, sin el permiso expreso de Universidad de Antioquia, pues su contenido puede ser de carácter confidencial y/o contener material privilegiado. Si usted recibió esta información por error, por favor contacte en forma inmediata a quien la envió y borre este material de su computador. **Universidad de Antioquia** no es responsable por la información contenida en esta comunicación, el directo responsable es quien la firma o el autor de la misma."

Al contestar por favor cite estos datos:

Fecha: 2 de febrero de 2017 09:55
Folios:

Nº Reg. Salida: DD-E2-2017-001829
Anexos: 0

Bogotá, D. C

Doctora

María Patricia Arbeláez M

Vicerrectora de Investigación
UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA
viceinvestigacion@udea.edu.co
MEDELLÍN

Asunto: Solicitud de información, adición del proyecto "proyecto "Composición que comprende extractos de *Guadua angustifolia* para la prevención o el tratamiento de enfermedades de la retina" al contrato No. 126 de 2016.

Cordial Saludo,

Nos encontramos realizando la evaluación técnica y jurídica de la solicitud de contrato de acceso a recursos genéticos y sus productos derivados bajo el Artículo 252 de la ley 1753 del 9 de junio de 2015 para el proyecto "Composición que comprende extractos de *Guadua angustifolia* para la prevención o el tratamiento de enfermedades de la retina" y para continuar con el trámite de contrato es necesario que nos aclare o allegue la siguiente información:

1. Allegar el permiso con el cual se exportaron los extractos de *Guadua angustifolia* al Korea Institute of Science and Technology "KIST" para la realización de ensayos biológicos.
2. Teniendo en cuenta que las actividades de acceso las realizaron entre la Universidad de Antioquia y el Korea Institute of Science and Technology la solicitud de acceso debe ser solicitada por ambas partes, por lo cual deberá incluir al Korea Institute of Science and Technology como solicitante.

F-E-SIG-26-V1. Vigencia 09/02/2016

Calle 37 No. 8 - 40
Conmutador (571) 3323400
www.minambiente.gov.co

Al contestar por favor cite estos datos:

3. Por las características y naturaleza del proyecto de investigación, es posible que el solicitante requiera pedir confidencialidad sobre algunos documentos e información que reposará en el expediente, para solicitar esta confidencialidad la Universidad deberá pedir oficialmente al Ministerio sobre qué tipo de información requerirá confidencialidad, de conformidad con lo establecido en el Artículo 19 de la Decisión Andina 391 de 1996.

“Artículo 19.- La Autoridad Nacional Competente podrá reconocer tratamiento confidencial, a aquellos datos e informaciones que le sean presentados con motivo del procedimiento de acceso o de la ejecución de los contratos, que no se hubieran divulgado y que pudieran ser materia de un uso comercial desleal por parte de terceros, salvo cuando su conocimiento público sea necesario para proteger el interés social o el medio ambiente.

A tal efecto, el solicitante deberá presentar la justificación de su petición, acompañada de un resumen no confidencial que formará parte del expediente público.

La confidencialidad no podrá recaer sobre las informaciones o documentos a los que se refiere el segundo párrafo del artículo 18 de la presente Decisión.

Los aspectos confidenciales figurarán en un expediente reservado, en custodia de la Autoridad Nacional Competente, y no podrán ser divulgados a terceros, salvo orden judicial en contrario.”

El solicitante cuenta con un plazo de quince (15) días a partir del recibo de la presente comunicación, para dar respuesta aclarando la información solicitada y aportando los documentos a través de los correos correspondencia@minambiente.gov.co o servicioalciudadano@minambiente.gov.co especificando en el asunto que el correo va dirigido al Grupo de Recursos Genéticos de la Dirección de Bosques, Biodiversidad y Servicios Ecosistémicos o a través de la ventanilla del Ministerio.

En el evento que durante el plazo establecido por el Ministerio no pueda aportar lo requerido, deberá informarlo de manera anticipada a su vencimiento, indicando el tiempo que necesita y

Al contestar por favor cite estos datos:

los motivos por los cuales no puede dar respuesta a lo requerido; lo anterior a fin de que se adopten las medidas administrativas a que haya lugar.

Cordialmente,

Firmado por: TITO CALVO SERRATO

DIRECTOR TECNICOBOSQUES Y
BIODIVERSIDAD

Fecha firma: 31/01/2017 18:48:40

Proyectó: Carlos Augusto Ospina Bravo

Revisó: Paula Andrea Rojas Gutierrez

F-E-SIG-26-V1. Vigencia 09/02/2016

Calle 37 No. 8 - 40
Conmutador (571) 3323400
www.minambiente.gov.co





별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto is a true copy from the records of the Korean Intellectual Property Office.

출원번호 : 10-2016-0048929
Application Number

출원년월일 : 2016년 04월 21일
Filing Date APR 21 , 2016

출원인 : 한국과학기술연구원 외1명
Applicant(s) KOREA INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, et al.

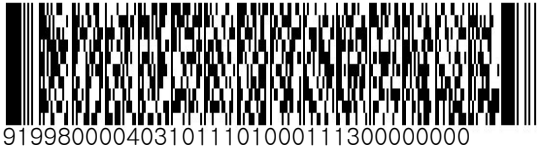
2016년 04월 27일

특 허 청

COMMISSIONER



Patent Application
(Korean Patent Application No. 10-2016-0048929)



특허출원서

【출원구분】 특허출원

【출원인】

【명칭】 한국과학기술연구원

【출원인코드】 3-1998-007751-8

【출원인】

【명칭】 유니버시티드 드 안티오퀴아

【출원인코드】 5-2011-042242-9

【대리인】

【성명】 김영철

【대리인코드】 9-1998-000040-3

【포괄위임등록번호】 2001-021022-3

【대리인】

【성명】 김순영

【대리인코드】 9-1998-000131-1

【포괄위임등록번호】 2001-021026-2

【발명의 국문명칭】 구아두아 앵거스티폴리아 추출물을 포함하는 망막 질환의
예방 또는 치료용 조성물

【발명의 영문명칭】 Composition comprising the extracts of Guadua
angustifolia for prevention or treatment of retinal
diseases

【발명자】

【성명의 국문표기】 정상훈

【성명의 영문표기】 JUNG, Sang Hoon

【주민등록번호】 750907-1018718



【우편번호】 25451

【주소】 강원도 강릉시 사임당로 679

【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 안홍열

【성명의 영문표기】 AHN, Hong Ryul

【주민등록번호】 820613-1274210

【우편번호】 25451

【주소】 강원도 강릉시 사임당로 679

【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 이은하

【성명의 영문표기】 LEE, Eun Ha

【주민등록번호】 770419-2079625

【우편번호】 25451

【주소】 강원도 강릉시 사임당로 679

【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 강석우

【성명의 영문표기】 KANG, Suk-Woo

【주민등록번호】 790408-1320948

【우편번호】 25451

【주소】 강원도 강릉시 사임당로 679

【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 김경아

【성명의 영문표기】 KIM, Kyung A

【주민등록번호】 861109-2346818

【우편번호】 25451

【주소】 강원도 강릉시 사임당로 679

【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 프레이마르 세구라

【성명의 영문표기】 Freimar Segura

【주소】 콜롬비아 메델린 칼레 67 누메로 53-108 유니버시티드 드
안티오quia

【주소의 영문표기】 Universidad de Antioquia, Calle 67 Numero
53-108, Medellin, Colombia

【국적】 CO

【발명자】

【성명의 국문표기】 파이버 자라밀로

【성명의 영문표기】 Faiber Jaramilo

【주소】 콜롬비아 메델린 칼레 67 누메로 53-108 유니버시티드 드
안티오quia

【주소의 영문표기】 Universidad de Antioquia, Calle 67 Numero
53-108, Medellin, Colombia

【국적】 CO

【출원언어】 국어

【심사청구】 청구

위와 같이 특허청장에게 제출합니다.

대리인 김영철 (서명 또는 인)

대리인 김순영 (서명 또는 인)

【수수료】

【기본출원료】 0 면 46,000 원

【가산출원료】 39 면 0 원

【우선권주장료】 0 건 0 원

21 항 1,067,000 원

1,113,000 원

【첨부서류】 1.기타첨부서류[위임장-유니버시티드 드 안티오퀴아]_1통

【발명의 설명】

【발명의 명칭】

구아두아 앵거스티폴리아 추출물을 포함하는 망막 질환의 예방 또는 치료용 조성물{Composition comprising the extracts of *Guadua angustifolia* for prevention or treatment of retinal diseases}

【기술분야】

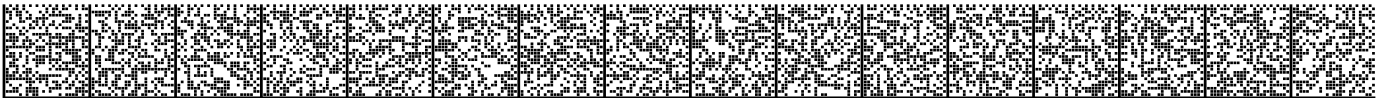
<0001> 본 명세서에는 허혈성 손상을 억제 또는 개선하고, 산화적 스트레스로부터 세포를 보호하며, 세포자살을 억제하는 구아두아 대나무의 신규한 용도가 개시된다.

【발명의 배경이 되는 기술】

<0002> 세포자살(apoptosis)이란, 세포괴사(necrosis)와는 구별되는 세포 내의 자발적이고 계획된 세포사(programmed cell death)이고, 세포자살을 유발하는 다양한 기전들이 제시되어 왔다. 대표적인 유발인자로는 산화 스트레스(oxidative stress), 질소산화물 합성효소(nitric oxide synthase), 미토콘드리아(mitochondria)를 매개로 하는 케스페이즈 의존적(caspase-dependent) 또는 비의존적(caspase-independent) 기전 등이 있다. 특히 많은 안질환들이 특정 세포의 세포자살로 인해 발생하는 것으로 알려져 있으며, 그 대표적인 안질환으로는 연령 관련 황반 변성(age related macular degeneration) 및 녹내장(glaucoma)이 있다. 이러한 안질환의 억제 및 치료를 위하여 세포자살을 억제하거나 그 진행을 늦출 수 있는 약제에 대한 연구가 지속적으로 진행되고 있는 실정이다.



녹내장의 주원인은 안압의 상승, 즉 허혈성 손상이며 결국 신경 세포의 사멸로 인해 시야에 이상이 생긴다. 녹내장은 망막 신경 세포의 세포자살로 인한 시신경의 손상을 통해서 일어나게 되는데, 이러한 시신경의 손상은 특징적인 녹내장성 시야 손상을 동반한다. 녹내장에서 나타나는 망막 신경 세포의 세포사멸은 세포자살(apoptosis)로 알려져 있으며, 안압을 상승시킨 동물 모델뿐만 아니라 녹내장 환자의 사후 부검을 통해서도 녹내장 환자에서 망막 신경 세포의 세포자살이 관찰되었다(Quigley HA et al., Invest Ophthalmol Vis Sci., 36, 774-786, 1995; Garcia-Valenzuela E et al., Exp Eye Res., 61, 33-44, 1995). 세포 내에 세포사멸을 유도하는 기전과 억제하는 기전의 균형에 의하여 세포의 운명이 결정되는데, 녹내장에 있어서는 글루타메이트(glutamate), 사이토크롬 C(cytochrome c), 종양괴사 인자-알파(TNF- α) 및 Bad(BCL2-antagonist of cell death) 단백질의 증가 또는 발현이 망막 신경 세포를 세포자살에 이르게 하는 것으로 알려져 있으며, 세포 내의 산화 스트레스(oxidative stress)도 녹내장의 중요한 원인으로 알려져 있다. 녹내장에서는 망막 신경 세포가 산화 스트레스를 받아 직접적으로 시신경을 손상에 이르게 할 뿐만 아니라, 방수 유출로를 구성하고 있는 섬유주 세포(trabecular meshwork cell)가 산화 스트레스를 받음으로써, 그 결과 섬유주 세포의 기능저하가 일어나게 되고, 궁극에는 세포자살이 일어나게 되어 안압이 상승하게 된다(Sacca' SC et al, Arch Ophthalmol., 123, 458-463, 2005; Zhou L et al., J Cell Physiol., 180, 182-189, 1999). 섬유주 세포의 기능저하는 세포가 고유하게 가지고 있는 방수를 흡수하는 음세포작용(pinocytosis)에 영향을 주게 되어 안압의 상



승을 유발하는데 특히 섬유주 세포의 기능저하가 안압상승의 주원인으로 알려져 있는 원발성 폐쇄 각 녹내장(primary open angle glaucoma) 환자들의 섬유주 세포가 산화 스트레스에 더 취약한 것으로 알려져 있다(Izzotti A et al., Am J Med., 114, 638-646, 2003). 상기 환자의 방수를 분석한 결과, 총항산화역량(total antioxidant potential)이 유의하게 정상인에 비하여 낮은 것으로 나타났고(Ferreira SM et al., Am J Ophthalmol. 137, 62-69, 2004), 혈장에 산화 스트레스를 조절하는 글루타치온-S- 전이효소(Glutathione-S-Transferase)가 증가되어 있음이 관찰되었다(Yang J et al., Invest Ophthalmol Vis Sci., 42, 1273-1276, 2001). 또한 최근에는 원발성 개방 각 녹내장 환자들에 있어서 나타나는 섬유주 세포의 손상이 항산화제에 의하여 억제됨이 알려져 있다(Yuan He et al., Invest Ophthalmol Vis Sci., 49, 1447-1458, 2008). 이처럼 망막 신경 세포와 섬유주 세포의 세포 자살을 억제하고 상기 세포의 산화 스트레스를 억제하는 것이 새로운 접근방법으로 대두되고 있다.

【선행기술문헌】

【비특허문헌】

- <0004> (비특허문헌 1)Quigley HA et al., Invest Ophthalmol Vis Sci., 36, 774-786, 1995; Garcia-Valenzuela E et al., Exp Eye Res., 61, 33-44, 1995
- (비특허문헌 2)Sacca' SC et al, Arch Ophthalmol., 123, 458-463, 2005; Zhou L et al., J Cell Physiol., 180, 182-189, 1999
- (비특허문헌 3)Izzotti A et al., Am J Med., 114, 638-646, 2003



(비특허문헌 4)Ferreira SM et al., Am J Ophthalmol. 137, 62-69, 2004)

(비특허문헌 5)Yang J et al., Invest Ophthalmol Vis Sci., 42, 1273-1276,
2001

(비특허문헌 6)Yuan He et al., Invest Ophthalmol Vis Sci., 49,
1447-1458, 2008

【발명의 내용】

【해결하고자 하는 과제】

<0005> 일 측면에서 본 발명은, 세포의 허혈성 손상을 억제 또는 개선하는 것을 목적으로 한다.

<0006> 다른 측면에서 본 발명은, 산화적 스트레스로부터 세포를 보호하는 것을 목적으로 한다.

<0007> 다른 측면에서 본 발명은 세포자살(apoptosis)을 억제하는 것을 목적으로 한다.

<0008> 다른 측면에서 본 발명은 망막 신경 세포 또는 섬유주 세포(trabecular meshwork cell)와 같은 안세포를 보호하는 것을 목적으로 한다.

<0009> 다른 측면에서, 본 발명은 황반 변성 또는 녹내장과 같은 망막 질환의 예방, 개선 또는 치료를 목적으로 한다.

【과제의 해결 수단】

<0010> 일 측면에서 본 발명은 구아두아 대나무 추출물을 유효성분으로 포함하는 세포의 허혈성 손상의 억제 또는 개선용 조성물일 수 있다.



- <0011> 다른 측면에서 본 발명은 구아두아 대나무 추출물을 유효성분으로 포함하는 산화적 스트레스로부터 세포를 보호하기 위한 항산화용 조성물일 수 있다.
- <0012> 다른 측면에서 본 발명은 구아두아 대나무 추출물을 유효성분으로 포함하는 세포자살(apoptosis) 억제용 조성물일 수 있다.
- <0013> 일 실시예에서 상기 세포는 안세포일 수 있다.
- <0014> 일 실시예에서, 상기 안세포는 망막 신경 세포 또는 섬유주 세포(trabecular meshwork cell)일 수 있다.
- <0015> 일 실시예에서, 상기 조성물은 망막 질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물일 수 있다.
- <0016> 일 실시예에서, 상기 망막 질환은 연령 관련 황반 변성 또는 녹내장일 수 있다.
- <0017> 일 측면에서, 상기 조성물은 망막 질환의 예방 또는 개선용 건강식품 조성물, 또는 망막 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물일 수 있다.
- <0018> 일 측면에서, 상기 구아두아 대나무는 구아두아 앵거스티폴리아(*Guada angustifolia*)일 수 있다.
- <0019> 일 실시예에서, 상기 구아두아 대나무 추출물은 구아두아 대나무의 지상부의 추출물일 수 있다.
- <0020> 일 실시예에서, 상기 구아두아 대나무 추출물은 구아두아 대나무의 잎의 추출물일 수 있다.



- <0021> 일 실시예에서, 상기 구아두아 대나무 추출물은 물, C₁₋₆ 저급 알코올, 아세톤 또는 이들의 혼합 용매로 추출한 추출물일 수 있다.
- <0022> 일 실시예에서, 상기 구아두아 대나무 추출물은 메탄올 또는 에탄올 추출물일 수 있다.
- <0023> 일 실시예에서, 상기 구아두아 대나무 추출물은 메탄올 또는 에탄올로 추출하여 얻어진 추출물을 물에 현탁시킨 후, n-헥산, 염화 메틸렌, 에틸아세테이트, n-부탄올 및 물로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 분획용매로 분획한 분획물일 수 있다.
- <0024> 일 실시예에서, 상기 구아두아 대나무 추출물은 0.004 내지 40mg/kg/일의 투여량으로 투여되는 조성물일 수 있다.
- <0025> 일 실시예에서, 상기 조성물은 국소 투여용 제형일 수 있다.
- <0026> 일 실시예에서 상기 조성물은 안약 제형일 수 있다.
- <0027> 일 실시예에서, 상기 조성물은 구아두아 대나무 추출물의 동결건조물을 용매에 용해시킨 용액일 수 있다.
- <0028> 일 실시예에서, 상기 동결건조물 용해용 용매는 디메틸설폭사이드(Dimethyl sulfoxide; DMSO)일 수 있다
- <0029> 일 실시예에서, 구아두아 대나무 추출물은 조성물 전체 중량을 기준으로 5 내지 500 μg/ml의 농도일 수 있다.
- <0030> 일 실시예에서, 구아두아 대나무 추출물은 조성물 전체 중량을 기준으로 10



내지 250 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도일 수 있다.

【발명의 효과】

<0031>

본 명세서에 개시된 조성물은 세포의 허혈성 손상을 억제 또는 개선할 수 있다. 또한, 산화적 스트레스로부터 세포를 보호할 수 있다. 또한, 세포자살을 억제할 수 있다. 구체적으로 망막 신경 세포와 같은 안세포에 작용하여, 노인성 황반변성, 녹내장 등의 망막질환을 예방 및 치료하는 조성물 또는 기능성 식·의약품 소재로 유용하게 활용될 수 있다.

【도면의 간단한 설명】

<0032>

도 1a 및 도 1b는 구아두아 대나무 추출물, 분획물, 화합물이 세포사멸이 유도된 망막절세포의 생존에 미치는 영향을 MTT 어세이로 측정하여 나타낸 그래프이다.

도 2는 세포염색법을 이용한 세포생존율의 측정한 결과이다.

도 3a 내지 도 3f는 구아두아 대나무 추출물, 분획물, 화합물의 활성산소(Reactive Oxygen Species) 억제 효과를 나타내는 그래프이다.

도 4는 세포사멸의 정도를 나타내는 잘려진 형태의 PARP양을 웨스턴 블롯 분석으로 측정한 사진이다.

도 5는 흰쥐 시신경 부분 압착 손상 모델에 구아두아 앵거스티폴리아(*Guadua angustifolia*) 메탄올 추출물을 처리한 후 형광 염색된 망막을 촬영한 사진이다.

【발명을 실시하기 위한 구체적인 내용】

<0033>

구아두아 대나무는 외떡잎식물 벼목 화본과 대나무아과에 속하는 신열대구



대나무종(neotropical genus)으로, 구아두아속(*Guada sp.*) 식물을 의미한다. 구아두아속(*Guada sp.*) 식물로는 구아두아 앰플렉시폴리아(*Guadua amplexifolia*), 구아두아 앵거스티폴리아(*Guadua angustifolia*), 구아두아 칼더로니아나(*Guadua calderoniana*), 구아두아 차코엔시스(*Guadua chacoensis*), 구아두아 차페렌시스(*Guadua chaparensis*), 구아두아 글로머라타(*Guadua glomerata*), 구아두아 인카나(*Guadua incana*), 구아두아 라티폴리아(*Guadua latifolia*), 구아두아 롱기폴리아(*Guadua longifolia*), 구아두아 마클루레이(*Guadua macclurei*), 구아두아 마크로스피쿨라타(*Guadua macrospiculata*), 구아두아 마크로스타키야(*Guadua macrostachya*), 구아두아 마클로사(*Guadua maculosa*), 구아두아 마그나(*Guadua magna*), 구아두아 패니쿨라타(*Guadua paniculata*), 구아두아 파라과이아나(*Guadua paraguayana*), 구아두아 레프락타(*Guadua refracta*), 구아두아 사르코카르파(*Guadua sarcocarpa*), 구아두아 수퍼바(*Guadua superba*), 구아두아 타고아라(*Guadua tagoara*), 구아두아 트리니이(*Guadua trinii*), 구아두아 언시나타(*Guadua uncinata*), 구아두아 벨루티나(*Guadua velutina*), 구아두아 베네주엘라(*Guadua venezuelae*), 구아두아 비르가타(*Guadua virgata*), 및 구아두아 웨버파우어리(*Guadua weberbaueri*)를 들 수 있다. 예컨대, 구아두아 대나무는 구아두아 앵거스티폴리아(*Guadua angustifolia*)일 수 있다.

<0034> 구아두아 앵거스티폴리아(*Guadua angustifolia*)의 원산지는 아마존강 오리노코강 유역의 열대 우림지역이며 해발 1500미터 이하의 저산지대에 분포하지만 해발 2500까지 발견 된바 있다.



<0035> 본 명세서에서 "추출물"은 용매 등을 이용하여 식물로부터 일부 성분들을 뽑아낸 물질을 의미하며, 1차적으로 물 또는 유기용매 등에 식물을 가하여 얻어진 추출물, 상기 1차적으로 얻어진 추출물에 2차적으로 용매를 가하여 분획하여 얻어진 분획물, 또는 상기 추출물 또는 분획물로부터 뽑아낸, 기능을 나타내는 유효성분인 화합물 자체를 모두 포함하는 개념이다. 또한, 상기 추출 또는 분획 후 발효, 동결 건조 등의 가공을 거친 물질도 포함한다. 또한, 추출용매로 추출한 것이 아니라 식물을 그대로 착즙 또는 분쇄한 것을 포함한다.

<0036> 본 발명의 구아두아 대나무 추출물은 하기와 같은 단계로 제조되는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다;

<0037> 1) 건조한 구아두아 대나무를 추출용매를 가하여 추출하는 단계;

<0038> 2) 단계 1)의 추출물을 여과하는 단계; 및

<0039> 선택적으로(optionally), 3) 단계 2)의 여과한 추출물을 감압농축하여 추출물을 제조하는 단계; 및

<0040> 선택적으로(optionally), 4) 단계 3)의 추출물을 추가적으로 유기용매로 추출하여 분획물을 제조하는 단계.

<0041> 상기 방법에 있어서, 구아두아 대나무는 재배한 것, 채취한 것 또는 시판되는 것 등이 제한 없이 사용될 수 있다. 상기 구아두아 대나무 추출물은 식물 전체를 이용할 수 있고, 잎, 줄기, 지상부, 뿌리 또는 전체를 이용할 수 있지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 예컨대, 잎을 사용할 수 있다.



<0042> 상기 추출 용매는 물, 알코올 또는 이들의 혼합물, 바람직하게는 C₁ 내지 C₆의 저급 알코올, 아세톤 또는 이들의 혼합 용매로부터 선택된 용매를 사용할 수 있다. 예컨대, 100% 메탄올 또는 에탄올로 추출할 수 있지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 메탄올 또는 에탄올 수용액을 사용할 수도 있다. 상기 추출 용매의 양은 구아두아 대나무 건조 중량의 1 내지 30 배, 또는 10 내지 20배일 수 있다. 추출 방법은 가열 추출, 침지 추출, 냉침 추출, 환류 냉각 추출 및 초음파 추출 등의 추출 방법을 사용할 수 있으며, 예컨대, 냉침 추출로 추출될 수 있다. 예컨대, 냉침 추출은 2회 이상 반복될 수 있다. 예컨대, 2회 냉침 추출을 반복할 수 있다. 추출시 온도는 -114℃ 내지 100℃일 수 있지만, 이에 한정되지 않는다. 추출 시간은 30분 내지 7일일 수 있다. 예컨대, 1시간 내지 24시간, 또는 8 내지 16시간일 수 있지만, 이에 한정되지 않는다.

<0043> 상기 추출물을 제조하는 방법은 냉침추출, 초임계추출, 아임계추출, 고온추출, 고압추출 또는 초음파추출법 등의 추출장치를 이용한 방법 또는 XAD 및 HP-20을 포함한 흡착 수지를 이용하는 방법 등 당업계의 통상적인 추출방법을 사용할 수 있다. 상기 추출 회수는 1 내지 5회일 수 있다. 2회 이상 반복 추출할 수 있지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

<0044> 상기 방법에 있어서, 단계 3)의 감압농축은 진공회전증발기를 이용할 수 있지만, 이에 한정하지 않는다. 또한, 건조는 감압건조, 진공건조, 비등건조, 분무건조, 상온건조 또는 동결건조할 수 있으나 이에 한정하지 않는다.



<0045> 상기 방법에 있어서, 분획 단계 4)의 유기용매는 노르말-헥산, 염화 메틸렌, 에틸아세테이트 또는 노르말-부탄올인 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다. 상기 분획물은 구아두아 대나무 추출물을 물에 현탁시킨 후 노르말-헥산, 염화 메틸렌, 에틸아세테이트, 노르말-부탄올 및 물로 순차적으로 계통 분획하여 수득한 노르말-헥산 분획물, 염화 메틸렌 분획물, 에틸아세테이트 분획물, 노르말-부탄올 분획물 또는 물 분획물 중 어느 하나일 수 있다. 예컨대, 에틸아세테이트 분획물 또는 헥산 분획물일 수 있지만, 이에 한정하지 않는다. 상기 분획물은 상기 구아두아 대나무 추출물로부터 분획 과정을 1 내지 5회 반복할 수 있다. 예컨대, 2회 이상 반복하여 수득할 수 있다. 분획 후 감압 농축할 수 있지만, 이에 한정하지 않는다.

<0046> 본 발명의 구체적인 실시예에서, 건조된 *Guadua angustifolia*을 적당한 크기로 분쇄하여 추출용기에 넣고 메탄올(100%)을 가하여 실온에서 방치한 후, 거름종이로 여과한 후, 여과액을 농축 및 동결건조하여 추출물을 얻었고, 상기 *Guadua angustifolia* 추출물을 분별깔때기를 이용하여, 노르말-헥산, 염화 메틸렌, 에틸아세테이트, 노르말-부탄올 및 물 분획물로 순차적으로 계통분획하여 *Guadua angustifolia* 에탄올 추출물 및 이의 분획물, 노르말-헥산 분획물, 염화 메틸렌 분획물, 에틸아세테이트 분획물, 노르말-부탄올 분획물 및 물 분획물을 각각 제조하였다.

<0047> 상기 본 발명의 구아두아 대나무 추출물, 이의 분획물 또는 이로부터 분리한 화합물을 포함하는 조성물은, 조성물 총 중량에 대하여 상기 구아두아 대나무 추출



물, 이의 분획물 또는 이로부터 분리한 화합물을 0.1 내지 100 중량%로 포함할 수 있지만, 이에 한정되지 않는다.

<0048> 본 발명의 조성물은 약제의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다.

<0049> 본 발명에 따른 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 본 발명의 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 본 발명의 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향



제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

<0050>

본 발명의 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구 투여(예를 들어, 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 적용)할 수 있으며, 투여량은 환자의 상태, 체중, 연령, 성별, 식이, 배설율, 질환의 중증도, 약물형태, 투여시간, 투여방법, 투여경로 및 투여기간 등에 따라 그 범위가 다양하다. 1일 투여량은 본 발명에 따른 추출물, 분획물 또는 화합물을 동결건조하였을 때의 양으로 0.0001mg/kg 내지 500mg/kg, 바람직하게는 0.001mg/kg 내지 100mg/kg, 또는 0.004 내지 40mg/kg/일이며, 필요에 따라 일일 1회 내지 수회로 나누어 투여할 수 있다. 투여량은 예컨대, 0.001 mg/kg/일 이상, 0.004 mg/kg/일 이상, 0.01 mg/kg/일 이상, 0.02 mg/kg/일 이상, 0.03 mg/kg/일 이상, 0.04 mg/kg/일 이상, 0.05 mg/kg/일 이상, 0.06 mg/kg/일 이상, 0.07 mg/kg/일 이상, 0.08 mg/kg/일 이상, 0.09 mg/kg/일 이상, 0.1 mg/kg/일 이상, 0.2 mg/kg/일 이상, 0.3 mg/kg/일 이상, 0.4 mg/kg/일 이상일 수 있다. 또한, 투여량은 예컨대, 40 mg/kg/일 이하, 35 mg/kg/일 이하, 30 mg/kg/일 이하, 25 mg/kg/일 이하, 20 mg/kg/일 이하, 15 mg/kg/일 이하, 10 mg/kg/일 이하, 5 mg/kg/일 이하, 4 mg/kg/일 이하, 3 mg/kg/일 이하, 2 mg/kg/일



이하, 1 mg/kg/일 이하, 0.8 mg/kg/일 이하, 0.6 mg/kg/일 이하, 0.4 mg/kg/일 이하일 수 있다. 예컨대, 상기 투여량은 0.4mg/kg/일 일 수 있다.

<0051> 일 측면에서 본 발명에 따른 조성물은 조성물 전체 중량을 기준으로 5 내지 500 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 구아두아 대나무 추출물을 함유할 수 있다. 예컨대, 5 $\mu\text{g/ml}$ 이상, 10 $\mu\text{g/ml}$ 이상, 15 $\mu\text{g/ml}$ 이상, 20 $\mu\text{g/ml}$ 이상, 25 $\mu\text{g/ml}$ 이상, 30 $\mu\text{g/ml}$ 이상, 35 $\mu\text{g/ml}$ 이상, 40 $\mu\text{g/ml}$ 이상, 43 $\mu\text{g/ml}$ 이상, 45 $\mu\text{g/ml}$ 이상, 또는 48 $\mu\text{g/ml}$ 이상일 수 있다. 또는, 500 $\mu\text{g/ml}$ 이하, 450 $\mu\text{g/ml}$ 이하, 400 $\mu\text{g/ml}$ 이하, 350 $\mu\text{g/ml}$ 이하, 300 $\mu\text{g/ml}$ 이하, 250 $\mu\text{g/ml}$ 이하, 200 $\mu\text{g/ml}$ 이하, 150 $\mu\text{g/ml}$ 이하, 100 $\mu\text{g/ml}$ 이하, 90 $\mu\text{g/ml}$ 이하, 80 $\mu\text{g/ml}$ 이하, 70 $\mu\text{g/ml}$ 이하, 60 $\mu\text{g/ml}$ 이하 또는 55 $\mu\text{g/ml}$ 이하일 수 있다. 예컨대, 구아두아 대나무 추출물은 조성물 전체 중량을 기준으로 10 내지 250 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 조성물에 포함될 수 있다. 예컨대, 약 50 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도일 수 있다.

<0052> 또한, 본 발명은 구아두아 대나무 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 망막질환 예방 및 치료용 식의약품을 소재로 제공한다.

<0053> 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 물질을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 드링크제, 육류, 소세지, 빵, 비스킷, 떡, 초코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강 식품을 모두 포함한다.

<0054> 본 발명의 구아두아 대나무 추출물, 이의 분획물 또는 이로부터 분리한 화합



물은 식품에 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효 성분의 혼합량은 그의 사용 목적(예방 또는 개선용)에 따라 적합하게 결정될 수 있다.

<0055> 일반적으로, 건강기능식품 중의 상기 추출물의 양은 전체 식품 중량의 0.1 내지 90 중량%로 가할 수 있다. 그러나 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.

<0056> 본 발명의 건강 기능성 음료 조성물은 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 추출물을 함유하는 외에는 다른 성분에는 특별한 제한이 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상술한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 ml당 일반적으로 약 1 내지 400mg일 수 있다. 예컨대, 10 내지 40mg일 수 있다. 이러한 함량은 구아두아 대나무 추출물의 적정 투여량 범위에 맞게 정해진다. 1일 투여량은 본 발명에 따른 추출물, 분획물 또는 화합물을 동결건조하였



을 때의 양으로 0.0001mg/kg 내지 500mg/kg, 바람직하게는 0.001mg/kg 내지 100mg/kg, 또는 0.004 내지 40mg/kg/일이며, 필요에 따라 일일 1회 내지 수회로 나누어 투여할 수 있다. 투여량은 예컨대, 0.001 mg/kg/일 이상, 0.004 mg/kg/일 이상, 0.01 mg/kg/일 이상, 0.02 mg/kg/일 이상, 0.03 mg/kg/일 이상, 0.04 mg/kg/일 이상, 0.05 mg/kg/일 이상, 0.06 mg/kg/일 이상, 0.07 mg/kg/일 이상, 0.08 mg/kg/일 이상, 0.09 mg/kg/일 이상, 0.1 mg/kg/일 이상, 0.2 mg/kg/일 이상, 0.3 mg/kg/일 이상, 0.4 mg/kg/일 이상일 수 있다. 또한, 투여량은 예컨대, 40 mg/kg/일 이하, 35 mg/kg/일 이하, 30 mg/kg/일 이하, 25 mg/kg/일 이하, 20 mg/kg/일 이하, 15 mg/kg/일 이하, 10 mg/kg/일 이하, 5 mg/kg/일 이하, 4 mg/kg/일 이하, 3 mg/kg/일 이하, 2 mg/kg/일 이하, 1 mg/kg/일 이하, 0.8 mg/kg/일 이하, 0.6 mg/kg/일 이하, 0.4 mg/kg/일 이하일 수 있다. 예컨대, 상기 투여량은 0.4mg/kg/일 일 수 있다.

<0057>

상기 외에 본 발명의 구아두아 대나무 추출물, 이의 분획물 또는 이로부터 분리한 화합물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 구아두아 대나무 추출물, 이의 분획물 또는 이로부터 분리한 화합물은 천연 과일 주스 및 과일 주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 그렇게 중요하진 않지만 본 발명의 구아두아 대나무 추출물 또는 이의 분획



물 100 중량부 당 0.1 내지 약 20 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

<0058> 이하, 본 발명을 실시예, 실험예 및 제조예에 의해 상세히 설명한다. 단 하기 실시예, 실험예 및 제조예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예, 실험예 및 제조예에 의해 한정되지 않는다.

<0059> <실시예 1> 구아두아 앵거스티폴리아(*Guadua angustifolia*)추출물의 제조

<0060> 콜롬비아, 발레 델 카우카, 칼세도니아(Calcedonia, Valle del Cauca, Colombia)에서 채취한 구아두아 앵거스티폴리아(*Guadua angustifolia*)의 잎을 건조시키고, 건조된 잎을 세절한 후 100 g에 2.5 L의 메탄올(100%)을 가하고 12시간 동안 냉침 추출한 후 추출액을 여과하였다. 추출액을 여과한 후 남은 잔사에 다시 2 L의 메탄올을 가하고 12시간동안 냉침추출하는 방법을 추가로 1회 반복하여 총 추출액 5.5 L를 수득하였다. 상기 추출액 5.5 L를 35 °C에서 감압 농축하여 메탄올 추출물 8 g을 수득하였다. 상기 *Guadua Angustifolia* 추출물을 물에 현탁시킨 후 분별깔때기를 이용하여 n-헥산, 염화 메틸렌, 에틸아세테이트, n-부탄올 및 물로 순차적으로 분획하였으며, 그 결과 n-헥산 분획물(0.94g), 에틸아세테이트 분획물(1.74g), n-부탄올 분획물(1.86g) 및 물 분획물(2.2g)을 얻을 수 있었다. 상기 추출물은 디메틸설폭사이드(Dimethyl sulfoxide; DMSO)에 녹인 후, 하기 실험에 이용되었다.

<0061> <실시예 2> 구아두아 앵거스티폴리아(*Guadua angustifolia*)추출물로부터 화합물의 분리

<0062> 상기 실시예1과 같은 방법으로 추출 및 분획된 염화 메틸렌 분획물에서 두



화합물들 (Compound A 및 Compound B)이 분리되었다. 이와 동일 또는 유사한 화합물들은 다른 구아두아속 식물에서도 발견되는 것을 확인할 수 있었다.

<0063> 상기 실시예 1 또는 실시예 2의 추출물, 분획물 또는 화합물을 사용하여 하기와 같이 실험을 수행하였다.

<0064> **실험방법**

<0065> **RGC-5세포 배양**

<0066> 망막절세포(Retinal Ganglion Cells, RGC, Alcone, USA)인 RGC-5 세포는 10% 우태아혈청(FBS)과 100 U/ml penicillin/streptomycin이 포함 된 Dulbecco's modified Eagle's medium 배지(DMEM, Hyclone, USA)를 사용하여 T-75 tissue culture flask에 37℃에서 5% CO₂, 95% 공기 및 포화 습도하의 항온기에서 배양하였다. 2일 내지 3일 후 포화 상태로 자란 세포는 trypsin-EDTA 용액으로 flask로 부터 떼어낸 후 계대 배양하였다.

<0067> **약물처리**

<0068> 세포를 96 well 배양접시에 분주한 후 24시간 동안 배양기에 넣어 세포를 부착시킨 후 배지를 제거하고 나서 혈청 단백질에 의한 항산화효과를 배제하기 위하여 1%의 저농도 우태아혈청이 포함된 DMEM 배지로 교환하였다. 추출물, 분획물 또는 화합물의 최종농도가 50, 10, 1, 0.1 ug/mL 되게 1시간 동안 전처리 한 후 0.5mM 1-buthionine-(S,R)-sulfoximine (BSO)과 10mM L-glutamamic acid (glutamate)를 37℃에서 24시간동안 처리 후 각 측정을 수행하였다.



<0069> <실험예 1> *Guadua Angustifolia* 추출물의 망막 신경 세포(RGC-5) 보호 효과

측정

<0070> 망막절세포(Retinal Ganglion Cells, RGC)인 RGC-5 세포에 BSO (1-buthionine(S,R)-sulfoximine) plus glutamate로 세포사멸을 유도하였을 때, 실시예 1의 구아두아 앵거스티폴리아(*Guadua angustifolia*) 추출물이 세포사멸을 억제하는 지 MTT 방법으로 측정하였다. 구체적으로, RGC-5 세포에 0.5mM BSO와 10mM 글루타메이트를 처리하여 세포사멸을 유도한 후 실시예1의 구아두아 앵거스티폴리아(*Guadua angustifolia*) hexan 분획물, 염화 메틸렌 분획물, 에틸 아세테이트 분획물 및 부탄올 분획물을 각각 50, 10, 1, 0.1 μ g/ml의 농도로 투여하였다. 또한, 실시예2의 화합물 50 μ g/ml의 농도에 대해서도 동일하게 투여하였다. 그 후 MTT 어세이를 통해 세포의 생존율을 측정하였다.

<0071> 사용된 MTT 어세이는 세포생존과 세포독성의 선별 검사로 흔히 이용되고 있는 발색검사의 일종인 세포의 mitochondrial dehydrogenase에 의하여 tetrazolium salt인 MTT가 formazan crystal로 변화하는 것을 이용한 MTT (3-[4,5- α -methylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyltetrazolium bromide, Sigma) 어세이이다. 배지를 제거하고 최종농도가 0.5mg/ml인 MTT를 각 well당 첨가 후 1시간 동안 반응시켰다. dimethylsulfoxide를 각 well당 100 μ l씩 넣어 15분간 흔든 후 Synergy HT Multi-microplate reader(Bio-Tek instruments, Winooski, VT, U.S.A)로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

<0072> 그 결과를 도 1a 및 도 1b에 나타내었다. 도 1a 및 도 1b의 그래프에서 두번



제 막대는 BSO plus glutamate 처리를 한 세포의 결과이다. 도 1에 나타난 바와 같이, 여러 유기용매를 가하여 분획한 분획물들 중 헥산, 염화 메틸렌, 에틸아세테이트를 처리한 분획물이 세포사멸을 보호하는 효과가 있음을 확인하였다.

<실험예 2> 세포염색법을 이용한 세포생존율의 측정

망막절세포(Retinal Ganglion Cells, RGC)인 RGC-5 세포에 BSO (1-buthionine(S,R)-sulfoximine) plus glutamate로 세포사멸을 유도하였을 때, 실시예 1의 구아두아 앵거스티폴리아(*Guadua angustifolia*) 추출물이 세포사멸을 억제하는 지 세포염색법을 이용하여 세포생존율을 확인하였다. Hoechst 33342는 막투과성이 있는 dye로 모든 세포를 염색 할 수 있고, PI (propidium Iodide, PI)는 막투과성이 없기 때문에, 살아있는 세포를 염색 시킬 수 없으나 죽어 있는 세포를 염색 할 수 있는 특징이 있다. 이러한 특징을 가지는 dye를 이용하여 세포생존율을 정성적으로 확인하였다.

분리한 화합물이 세포사멸을 보호하는지 알아보기 위하여 Hoechst 33342/propidium iodide (PI) 이중염색을 한 후 세포분석을 시행하였다. 세포를 96-well 배양 접시에 분주하여 부착시킨 후 배지를 1% 우태아혈청(FBS)로 교환하고 화합물을 1시간 동안 전처리를 하였다. 0.5mM 1-buthionine-(S,R)-sulfoximine (BSO)과 10mM L-glutamamic acid (glutamate)를 24시간 동안 노출 시켰다.

세포를 차가운 D-PBS로 세척하고, 최종농도가 8 μ M의 Hoechst 33342와 1.5 μ M의 PI를 세포에 첨가하여 15분간 37°C에서 염색을 시킨 후 fluorescence microscope를 사용하여 가시화 하였다.



<0077> 그 결과는 도 2에 나타나 있다. 세포사멸을 일으키는 BSO+Glu (0.5mM BSO와 10mM 글루타메이트) 군에서 PI positive 한 세포들이 많이 관찰 되었다. 반면, 상기 실시예1에 따른 구아두아 대나무의 헥산 또는 에틸아세테이트 분획물들을 처리한 결과 PI positive 세포들이 농도 의존적으로 감소되는 것을 확인 할 수 있었다.

<0078> 따라서, 구아두아 대나무 추출물이 세포사멸을 억제하는 효능이 있음을 확인할 수 있었다.

<0079> <실험예 3> 활성산소(Reactive Oxygen Species) 억제 효과 측정

<0080> 망막절세포(Retinal Ganglion Cells, RGC)인 RGC-5 세포에 활성산소를 증가시켰을 때, 실시예 1의 구아두아 앵거스티폴리아(*Guadua angustifolia*) 분획물 실시예 2의 화합물들이 활성산소를 억제하는지 DCFH-DA 방법으로 측정하였다.

<0081> 활성산소종의 생성은 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA, Sigma, USA) 가 세포 내로 들어가 활성산소종에 의하여 형광물질인 dichlorofluorescein(DCF)로 산화되는 것을 이용한 dichlorofluorescein diacetate(DCFH-DA) assay로 조사하였다. 96 well 배양접시에서 5.0×10^3 cells/well 의 농도로 세포를 37℃에서 24시간 동안 배양하였다. 1% 우태아혈청(FBS)이 포함된 DMEM 배지로 교환하여 1시간동안 약물을 처리한 후 10 μ M의 DCFH-DA를 15분간 처리하였다. 배지를 제거하고 각각의 활성 산소종인 hydrogen peroxide (H_2O_2), hydroxyl radical ($OH^\cdot$), superoxide ($O_2^{\cdot-}$)를 유도하기 위하여 1mM H_2O_2 (H_2O_2



radical), 1mM H₂O₂ 와 100 μM iron(II) perchlorate hexahydrate(OH[•] radical), 1mM KO₂ (O₂^{•-} radical)를 세포에 30분 간 노출시켜 산화된 dichlorofluorescein (DCF)을 excitation 485 nm, emission 535 nm의 파장에서 형광도를 측정하였다.

<0082>

실시에 1의 분획물로는 에틸아세테이트 분획물을 50 μg/ml의 농도로 사용하였다. 상기 에틸아세테이트 분획물을 RGC-5 세포에 먼저 처리한 후 BSO+Glu (0.5mM BSO와 10mM 글루타메이트) 처리하였다. 그 후 활성산소, H₂O₂, O₂^{•-}, OH[•]량을 측정하였다. 양성대조군으로서 항산화 활성이 알려진 EGCG를 50mM 사용하였다. 그 결과는 도 3a 내지 3f에 나타내었다. 첫번째 막대는 아무런 처리를 하지 않은 음성 대조군이고, 두번째 막대는 BSO+Glu (0.5mM BSO와 10mM 글루타메이트) 처리군이고, 세번째 막대는 실시예1의 에틸아세테이트 분획을 미리 처리한 후 BSO+Glu (0.5mM BSO와 10mM 글루타메이트)을 처리한 군이다. 도 3a 내지 3f에 나타난 바와 같이, 대나무 분획물 및 대나무 화합물들이 활성산소 소거 효과가 있음을 알 수 있었다.

<0083>

<실험예 4> 세포사멸관련 단백질인 PARP의 활성 측정

<0084>

망막절세포(Retinal Ganglion Cells, RGC)인 RGC-5 세포에 BSO (1-buthionine(S,R)-sulfoximine) plus glutamate로 세포사멸을 유도하였을 때, 실시예 1의 구아두아 앵거스티폴리아(*Guadua angustifolia*) 추출물이 세포사멸관련 단백질인 PARP의 활성에 어떠한 영향을 미치는지를 확인하기 위하여, 웨스턴 블롯 분석 방법을 이용하였다.



<0085> DMEM/10% FBS 용액을 망막신경절세포 배양액과 혼합하여 세포의 수를 1×10^5 cells/ml로 조제한 후에 60 mm dish에 5 ml씩 처리하여 5% CO₂/37℃의 조건에서 배양하였다. 세포가 안정화 된 후에 세포가 안정화 된 후를 분리된 화합물을 1시간 동안 전처리 한 후 0.5mM 1-buthionine-(S,R)-sulfoximine (BSO)과 10mM L-glutamatmic acid (glutamate)를 18시간 동안 처리하였다. 차가운 D-PBS (1x, pH 7.4)로 3회 세척 한 후 세포를 수득을 하였다. 수득한 세포를 cell lysis buffer [1M Tris pH 7.4, 2M NaCl, 1M EDTA, 10% NP40, protease inhibitor cocktail (Sigma, St. Louis, MO, U.S.A.)]를 가하여 10분 동안 얼음에 박아놓은 다음 소니 케이션을 하고, 4℃, 10,000g 에서 30분 동안 원심분리하여 단백질을 추출하였다. 단백질의 농도를 Bio-Rad Protein 분석방법을 사용하여 정량하고 4x sample buffer [200mM Tris-HCl (pH 6.8), 40% glycerol, 8% SDS, 400mM DTT, 0.4% bromophenol blue]와 1:4의 비율로 섞은 후, 5분 동안 끓여 10% 또는 12% polyacrylamid gel을 사용하여 SDS-PAGE를 실행하였다. 전기영동 후, PAGE gel의 단백질을 polyvinylidene difluoride (PVDF) 멤브레인 (Hybond-P; Amersham Biosciences, GE Healthcare, U.K)에 이동시키고 Ponceau S (Sigma, St. Louis, USA)로 염색하여 동량의 단백질들이 전기영동 되었는지, transfer가 잘 되었는지 확인하였다. 멤브레인을 PBST buffer (8g/L NaCl, 0.2g/L KCl, 1.44g/L NaH₂PO₄, 0.1% Tween-20)로 세척하고, PBST buffer에 녹인 5% skim milk로 1시간 30분 동안 실온에서 blocking한 뒤, 1:500 희석 배수의 rabbit anti-PARP (catalog no. 9542; Cell Signaling)로 1



시간 동안 실온에서 반응시킨 후 4℃에서 밤새 반응시켰다. 일차항체 처리 후, 멤브레인을 15분씩 3회 세척 후 1:3,000 희석 배수의 이차항체(Santa Cruz Biotechnology, CA)로 2시간 동안 반응시켰다. 발현되는 단백질의 양은 Las-4000 image reader와 Multi Gauge 3.1 software(Fuji Photo Film, Japan)을 사용하여 측정하였다.

<0086> 세포사멸이 일어나게 되면 PARP의 형태가 잘려져 cleaved PARP 형태로 나타나게 되는데, BSO+Glu(0.5mM BSO와 10mM 글루타메이트)를 처리한 결과 cleaved PARP의 활성이 증가한 것이 관찰 되었다. 실시예1의 구아두아 대나무의 hexan 분획물 10 μ g/mL에서 cleaved PARP의 활성이 억제되는 것이 확인되었다. 결과는 도 4에 나타나 있다.

<0087> <실험예 5> *Guadua Angustifolia* 추출물의 시신경 압박손상모델에서 흰쥐의 망막퇴화 보호효과

<0088> 상기 <실시예 1>에서 추출한 메탄올 추출물의 시신경 압박손상모델에서 흰쥐의 망막퇴화 보호효과를 확인하였다. 먼저 흰쥐인 ICR 마우스 (수컷, 15-18g, 6주령)를 준비하였다. 2% 럼폰 주사액과 졸레틸을 혼합하여 상기 흰쥐에 1ml/kg 근육 주사 하여 마취시킨 후 상이측 결막을 열고, 결막조직을 박리하여 안구후부 직근들 사이의 시신경을 노출시켰다. Forceps를 이용하여 쥐 안구 후부로부터 2 mm 떨어진 위치의 시신경에 5초 동안 압박 손상을 주었다. 실시예 1의 *Guadua angustifolia* 추출물은 4 μ g/eye 용량으로 안구내 유리체 투여를 1회 시행하였고 대조군에서는 같은 용량의 0.01 M PBS를 주입하였다. 시신경 손상 6일 후, 다시 쥐를 마취시킨



후 두피를 절개하였다. 시신경 세포 염색을 위해 시신경과 연결되어 있는 뇌의 상구부위에 수술용 드릴을 이용하여 타공하고 3% FluoroGold를 주입하였다. 절개부위를 봉합하고, 항생연고를 발라주어 감염을 예방하였다. 시신경 손상 12일 후 안구를 적출하여 4% paraformaldehyde 에 4시간 동안 고정하였다. 고정한 안구는 맥락막으로 부터 망막을 분리하여 4개의 방사상 절개를 하고, 슬라이드 위에 클로버 잎 모양으로 마운트하였다. 각 실험군 슬라이드는 형광현미경을 이용하여 형광을 띄는 시신경 세포를 확인하고 40배, 200배 촬영 하였다.

<0089> 그 결과, 시신경압박은 세포사멸을 유도하여 세포생존율이 감소하였으며, *Guadua angustifolia* 추출물을 투여하였을 때, 유의적으로 망막세포의 사멸을 보호하여 세포생존율을 증가시킴을 확인하였다 (도 5).



【청구범위】

【청구항 1】

구아두아 대나무 추출물을 유효성분으로 포함하는 세포의 허혈성 손상의 억제 또는 개선용 조성물.

【청구항 2】

구아두아 대나무 추출물을 유효성분으로 포함하는 산화적 스트레스로부터 세포를 보호하기 위한 항산화용 조성물.

【청구항 3】

구아두아 대나무 추출물을 유효성분으로 포함하는 세포자살(apoptosis) 억제용 조성물.

【청구항 4】

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포는 안세포인 조성물.

【청구항 5】

제4항에 있어서, 상기 안세포는 망막 신경 세포 또는 섬유주 세포(trabecular meshwork cell)인 조성물.

【청구항 6】

제5항에 있어서, 상기 조성물은 망막 질환의 예방, 개선 또는 치료용인 조성물.

【청구항 7】

제6항에 있어서, 상기 망막 질환은 연령 관련 황반 변성 또는 녹내장인 조성



물.

【청구항 8】

제6항에 있어서, 상기 조성물은 망막 질환의 예방 또는 개선용 건강식품 조성물, 또는 망막 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물인 조성물.

【청구항 9】

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 구아두아 대나무는 구아두아 앵거스티폴리아(*Guada angustifolia*)인 조성물.

【청구항 10】

제9항에 있어서, 상기 구아두아 대나무 추출물은 구아두아 대나무의 지상부의 추출물인 조성물.

【청구항 11】

제10항에 있어서, 상기 구아두아 대나무 추출물은 구아두아 대나무의 잎의 추출물인 조성물.

【청구항 12】

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 구아두아 대나무 추출물은 물, C₁₋₆ 저급 알코올, 아세톤 또는 이들의 혼합 용매로 추출한 추출물인 조성물.

【청구항 13】

제12항에 있어서, 상기 구아두아 대나무 추출물은 메탄올 또는 에탄올 추출물인 조성물.



【청구항 14】

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 구아두아 대나무 추출물은 메탄올 또는 에탄올로 추출하여 얻어진 추출물을 물에 현탁시킨 후, n-헥산, 염화 메틸렌, 에틸아세테이트, n-부탄올 및 물로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 분획용매로 분획한 분획물인 조성물.

【청구항 15】

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 구아두아 대나무 추출물은 0.004 내지 40mg/kg/일의 투여량으로 투여되는 조성물.

【청구항 16】

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물은 국소 투여용 제형인 조성물.

【청구항 17】

제16항에 있어서, 상기 조성물은 안약 제형인 조성물.

【청구항 18】

제16항에 있어서, 상기 조성물은 구아두아 대나무 추출물의 동결건조물을 용매에 용해시킨 용액인 조성물.

【청구항 19】

제18항에 있어서, 상기 용매는 디메틸설폭사이드(Dimethyl sulfoxide; DMSO)인 조성물.

【청구항 20】



제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 구아두아 대나무 추출물은 조성물 전체 중량을 기준으로 5 내지 500 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 조성물에 포함된 조성물.

【청구항 21】

제20항에 있어서, 구아두아 대나무 추출물은 조성물 전체 중량을 기준으로 10 내지 250 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 조성물에 포함된 조성물.



【요약서】

【요약】

본 명세서에는 구아두아 대나무의 추출물, 이의 분획물 또는 이로부터 분리된 화합물의 신규한 용도로서, 세포의 허혈성 손상을 억제 또는 개선하고, 활성산소로부터 세포를 보호하며 세포자살을 억제하는 용도가 개시된다. 특히 안세포에 대해 작용하여, 녹내장, 노인성 황반변성 등의 망막 질환 예방 및 치료에 이용될 수 있다. 이러한 용도에 사용하기 위한 약제학적 조성물 또는 기능성 식품 조성물 또한 제공된다.

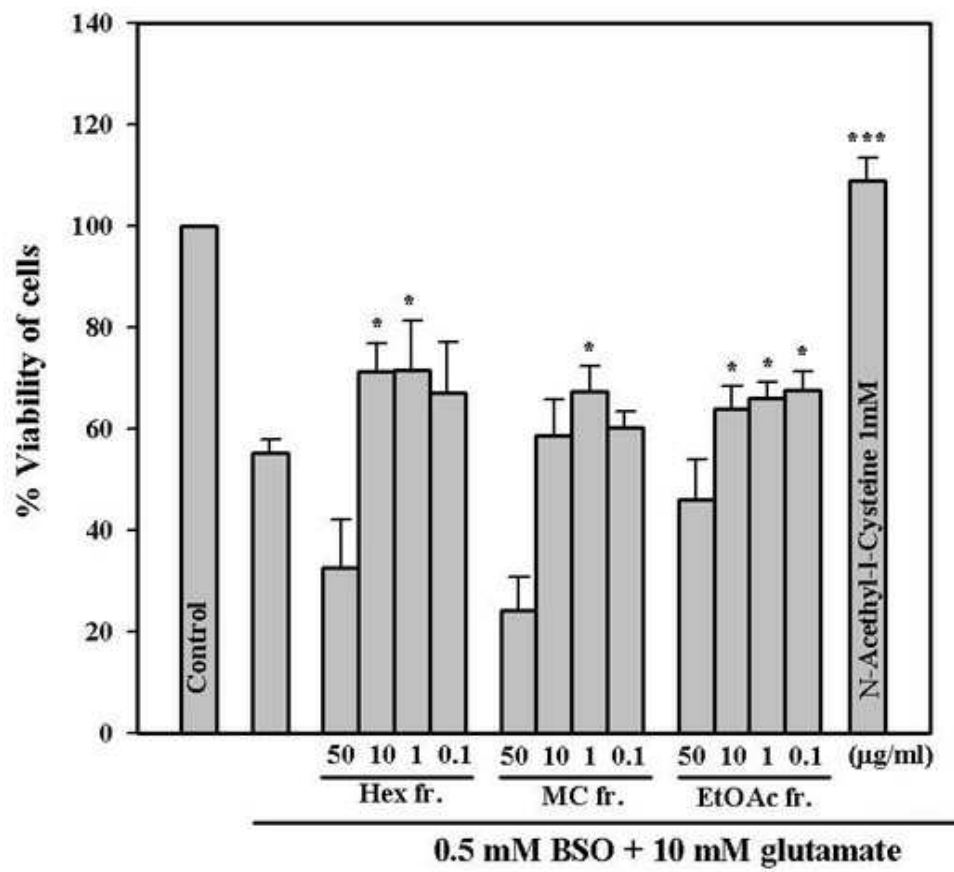
【대표도】

도 1a

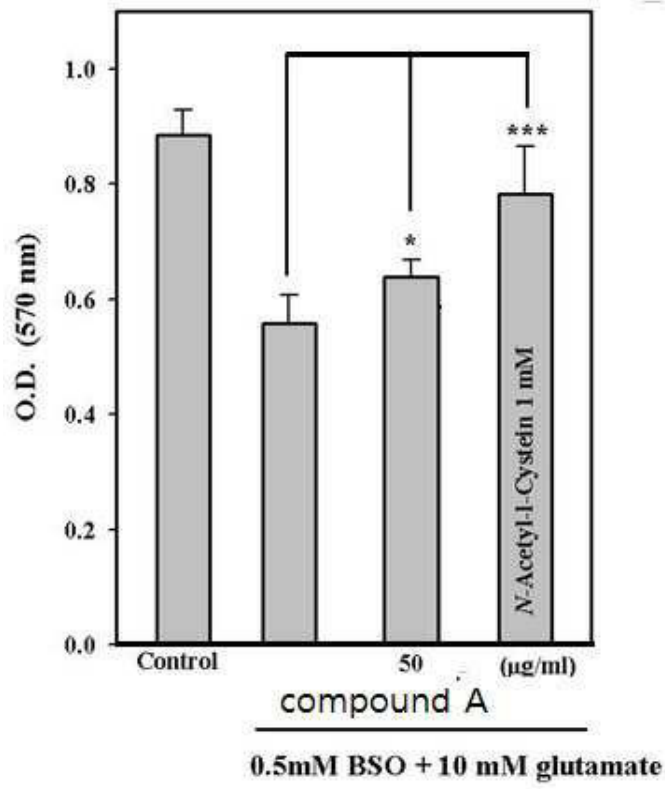


【도면】

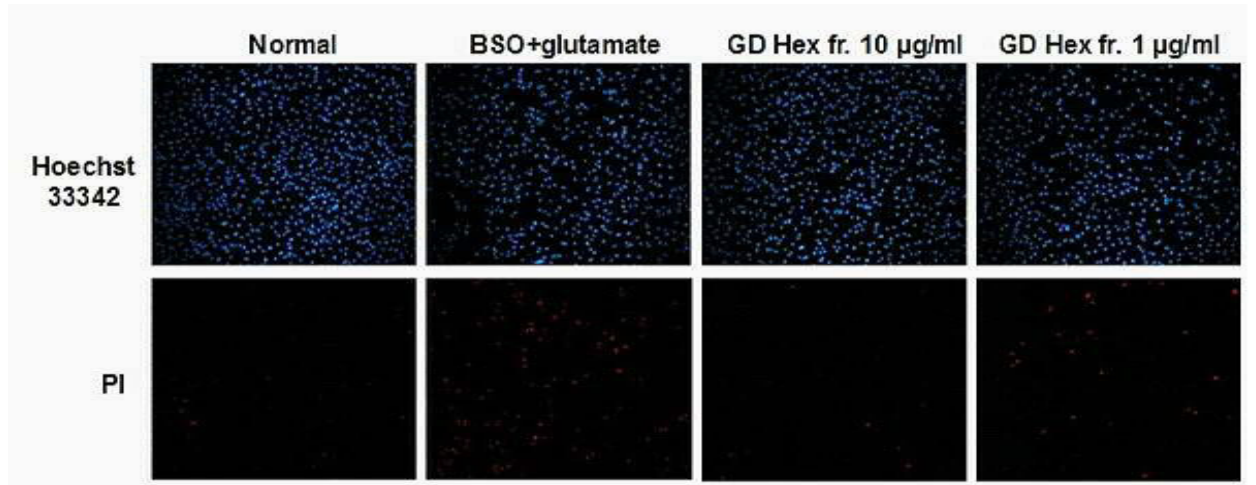
【도 1a】



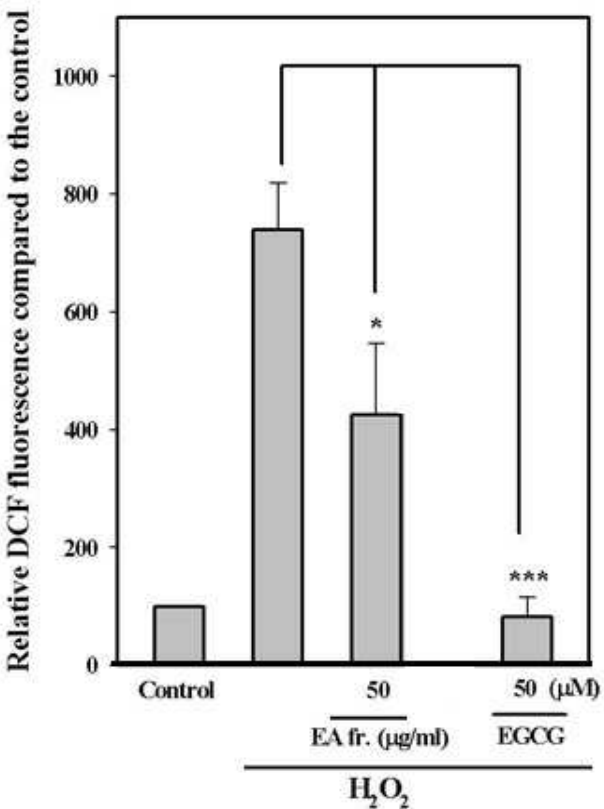
【도 1b】



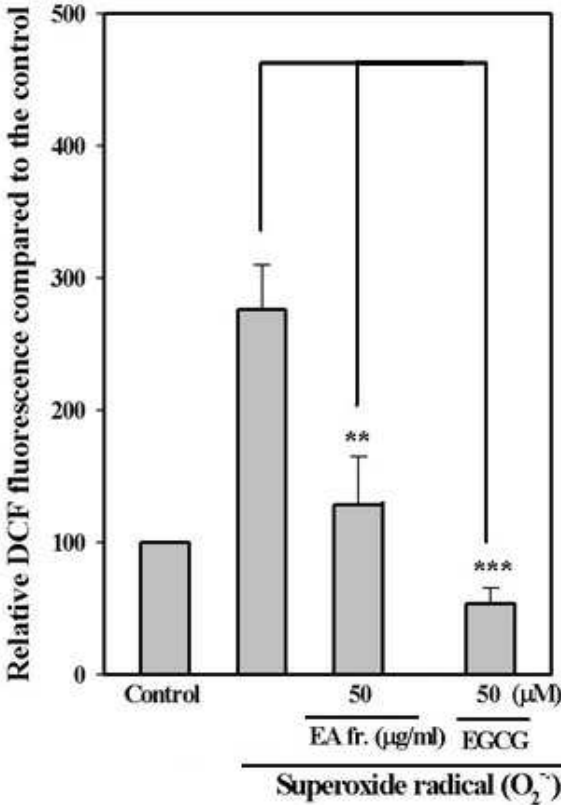
【도 2】



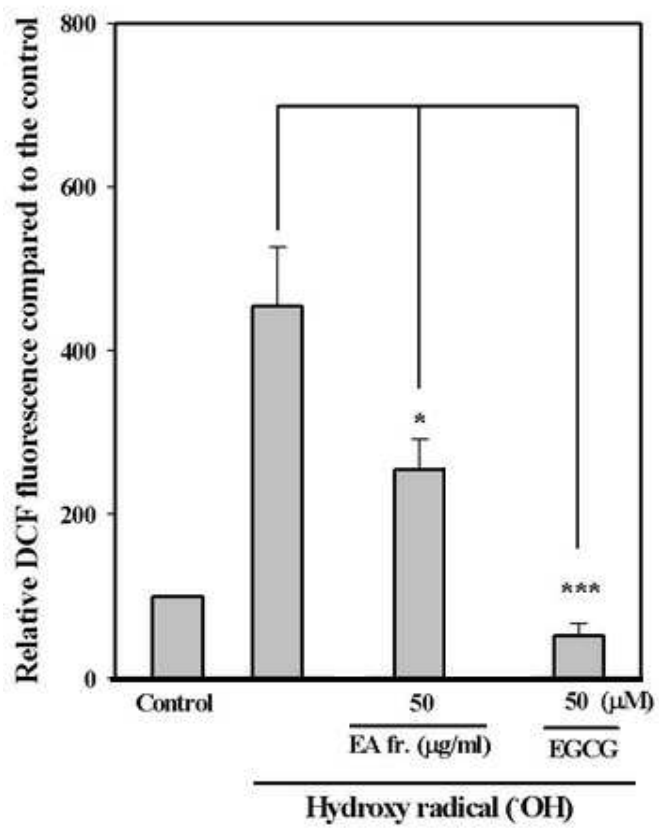
【도 3a】



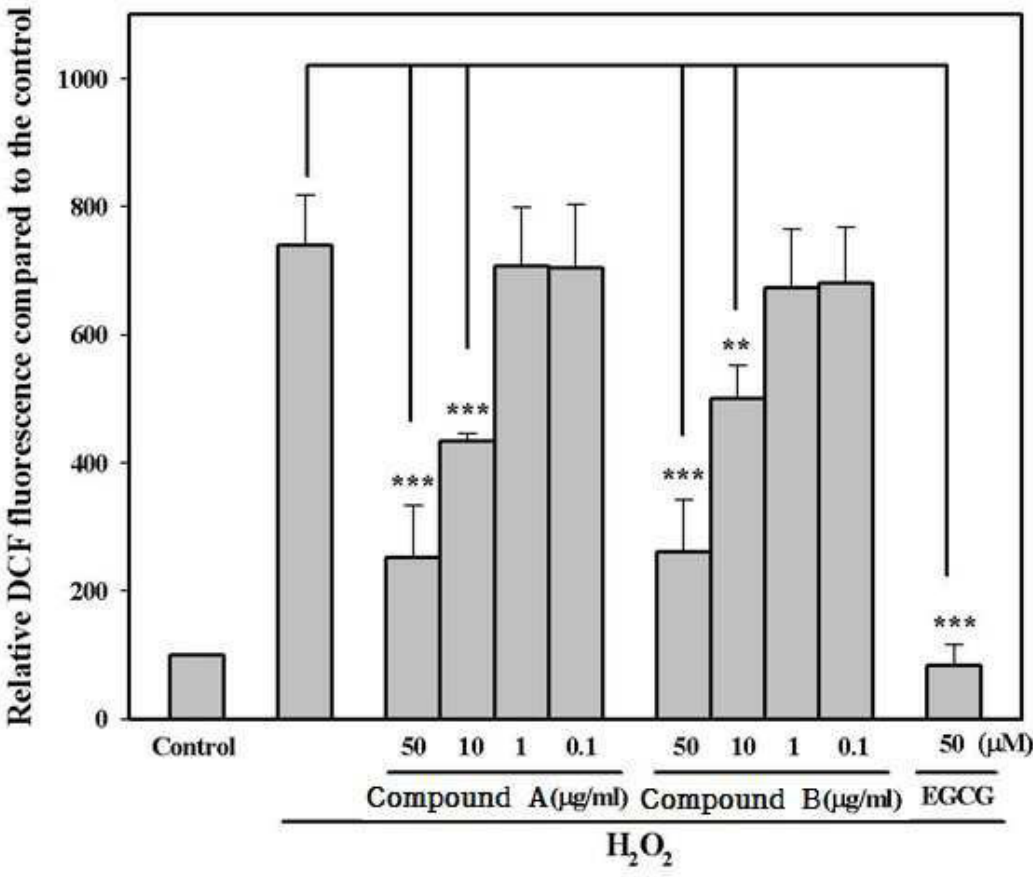
【도 3b】

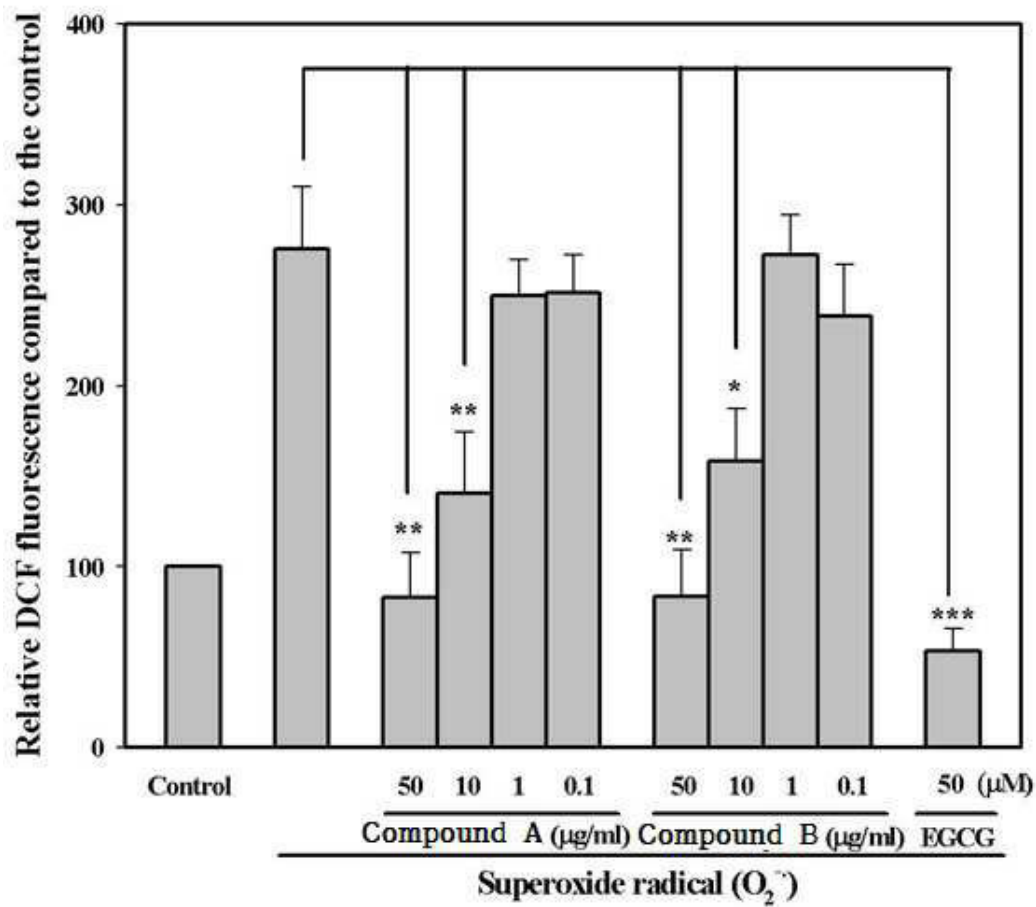


【도 3c】

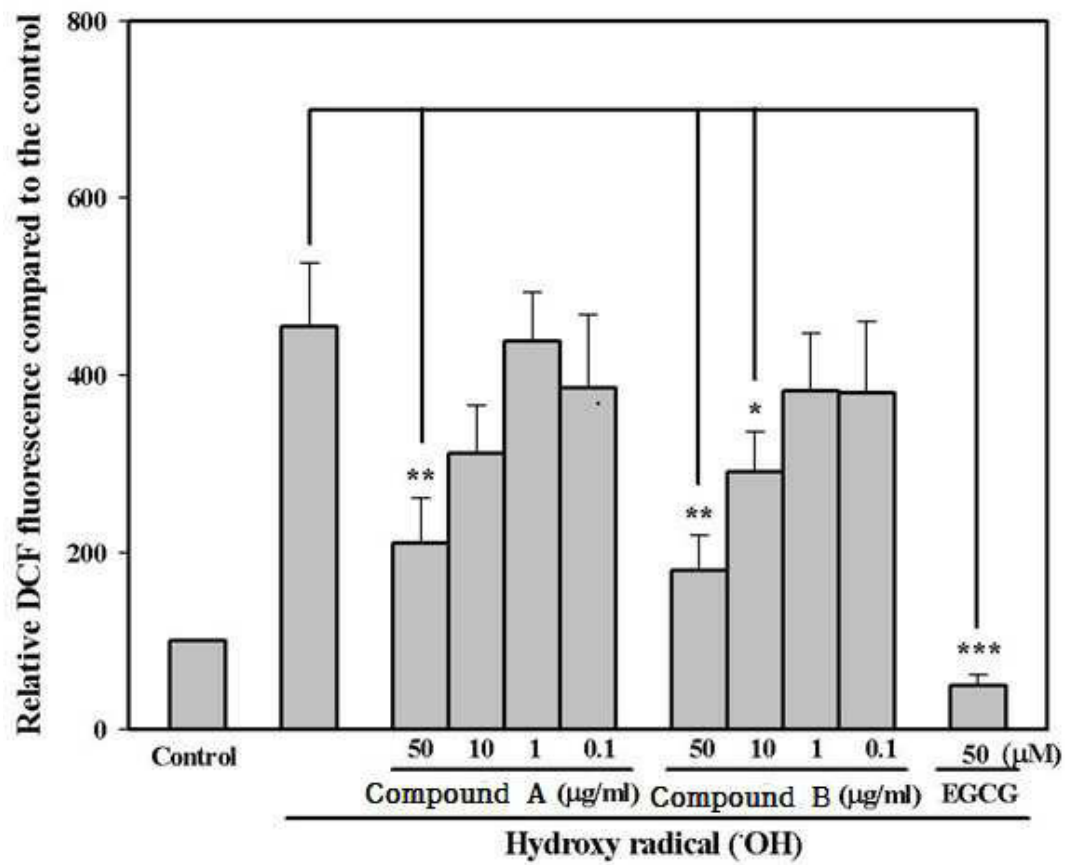


【도 3d】

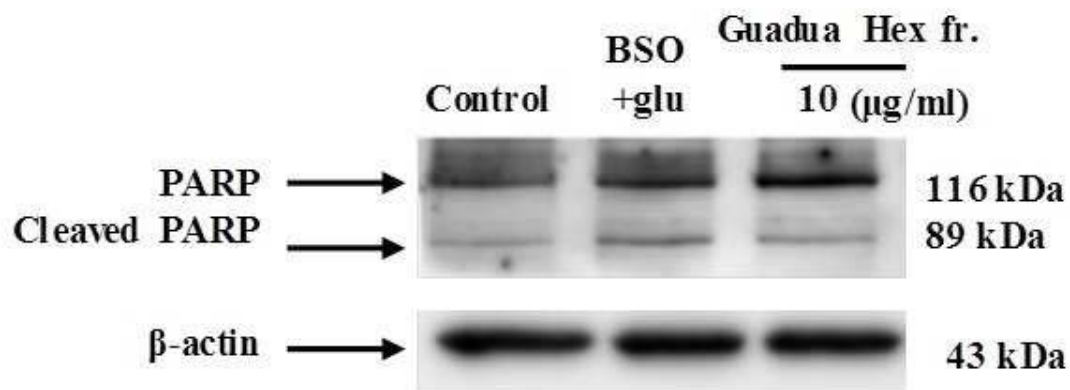




【도 3f】



【도 4】



【도 5】

