

Análisis Farmacognóstico de *Centella asiatica* (L.) Urban: Aspectos Botánicos, Físico-Químicos y Enfoque Químico Preliminar

Marcia Edilaine LOPES CONSOLARO², Luís Carlos MARQUES¹
y João Carlos PALAZZO DE MELLO*¹

¹ Departamento de Farmácia e Farmacologia,

² Departamento de Análises Clínicas, Universidade Estadual de Maringá;
Avenida Colombo, 5790. BR-87020.900 Maringá. PR. Brasil

RESUMEN. *Centella asiatica* (L.) Urban, Umbelliferae, es empleada en la medicina tradicional de la India y Paquistán en casos de ulceraciones de la piel. En el Brasil se presenta espontáneamente en el litoral de la región Sur, siendo indicada principalmente como anticelulítica. Debido a los datos farmacognósticos insuficientes y a su semejanza con especies de *Hydrocotyle*, en el presente trabajo se propuso estudiar los aspectos botánicos, físico-químicos y fitoquímicos de la droga vegetal. El material fue identificado por los propios autores y especialistas con la manipulación de exsiccata. Estudios de dispersión fueron hechos a través de visitas a los herbarios, por consultas a registros ya realizados y por viajes regionales. La macroscopía fue realizada con el auxilio de microscopio estereoscópico y la microscopía por la confección y observación de cortes histológicos de las diversas partes del vegetal. Después del proceso de secado y trituración, se procedió a la extracción por turbólisis, empleándose agua y mezcla hidroalcohólica. Los ensayos físico-químico y químico preliminares fueron realizados según las metodologías indicadas en las farmacopeas y en otras referencias bibliográficas. Los datos físico-químicos de residuo seco, cenizas totales y cenizas insolubles en ácido fueron importantes en la determinación de la mejor mezcla de disolventes para la extracción y la verificación de la calidad y pureza de la materia prima.

SUMMARY. "Pharmacognostic Analysis of *Centella asiatica* (L.) Urban: Botanical, Physico-Chemical and Preliminary Chemical Evaluation". *Centella asiatica* (L.), Umbelliferae, a folk plant of occurrence in south Brazil, is popularly used in several cases of ulcerations of skin. Owing to insufficient pharmacognostic data about the species and its likeness with *Hydrocotyle* species, the purpose of the present work is to establish botanical, physico-chemical and chemical preliminary analysis parameters. The vegetable drug was identified and its voucher specimen was deposited at Maringá University Herbarium and Museum Herbarium of Curitiba. The microscopic and macroscopic analysis were carried out with the aerial parts of the plant material. For the physico-chemical (pharmacopoeial tests) and chemical preliminary analysis aqueous and hydroalcoholic extracts at 20% (w/V) were prepared. The results for dried residue, total ash and acid-insoluble ash demonstrated that the best hydroalcoholic mixture was at 50% (V/V). The other tests were used to determine the purity of the drug.

INTRODUCCIÓN

Aunque originaria de Asia tropical¹, *Centella asiatica* (L.) es un miembro cosmopolita de la familia Umbelliferae, subfamilia Hydrocotyloideae², con predominancia en el hemisferio Sur. En el Brasil puede ser encontrada principalmente en la región Sur, donde es considerada una maleza¹.

Esta especie posee un gran potencial medicinal por contener un heterósido, el asiaticósido, que ha sido ampliamente empleado en la medicina tradicional de países como India y Paquistán en el tratamiento de insuficiencias venosas, úlceras varicosas, sifilíticas y leprosas, de quemaduras y de enfermedades de la piel³⁻⁹.

tán en el tratamiento de insuficiencias venosas, úlceras varicosas, sifilíticas y leprosas, de quemaduras y de enfermedades de la piel³⁻⁹.

Con poca tradición de uso en el Brasil, fue introducida hace unos 15 años en el mercado farmacéutico nacional, siendo actualmente comercializada como droga vegetal, producto fitoterápico y cosmético, teniendo como principal indicación una acción anticelulítica.

La amplia utilización de esta droga vegetal en el Brasil y su insuficiente conocimiento farmacognóstico, su semejanza con especies de *Hi-*

PALABRAS CLAVE: *Centella asiatica*, Control de Calidad, Plantas Medicinales.

KEY WORDS: *Centella asiatica*, Chemical analysis, Quality control.

* Autor a quien dirigir la correspondencia

drocotyle y la constatación de que la gran mayoría de esta materia prima es importada, fueron hechos que motivaron el presente trabajo, en el que se determinó su distribución, sus aspectos botánicos, físico-químicos y fitoquímicos, pudiendo así subsidiar la elaboración de una monografía farmacopeica.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material Vegetal

El material vegetal fue recolectado en la ciudad de Curitiba, Pr, Brasil, en el barrio "Capão do Imbuia", en el mes de enero de 1991. Esta recolección fue realizada cerca de campos, reserva forestal, orillas de río y caminos.

Identificación botánica

A partir del material colectado se elaboraron algunas exsiccatas según la metodología habitual¹⁰. Estas fueron identificadas por los propios autores, siendo utilizada la clave propuesta por Matthias *et al.*¹¹, consultándose además a los especialistas y habiendo incorporado los ejemplares a dos herbarios de la Provincia del Paraná.

Distribución

Fue establecida la dispersión de esta especie en la Provincia del Paraná a través de visitas a dos herbarios: "Museu Botânico Municipal de Curitiba (MBM)" y "Herbário da Universidade Federal do Paraná (UPCB)", con manipulación de las exsiccata allí depositadas, además de consultas, estudio de registros ya publicados y viajes de campaña.

Macroscopía y microscopía

La caracterización macroscópica fue realizada por medio de análisis del material sin equipamiento y después con microscopio estereoscópico. La caracterización microscópica siguió la metodología convencional utilizada en microtécnica vegetal¹², complementada por el sistema de coloración safranina-azul de astra¹³. Los dibujos de las estructuras fueron hechos a partir de fotos de las mismas.

Secado y almacenamiento

El secado fue hecho en estufa de aire circular con temperatura controlada (40 °C por cuatro días) siendo posteriormente colocada en cilindros de cartón, protegiéndose así de la humedad, insectos, luz y suciedades en general.

Proceso de extracción

Fueron preparados extractos acuoso e hi-

droetanólico por turbólisis a 10.000 rpm (Siemens, LSV-04) durante 15 minutos, estableciéndose la proporción entre la droga vegetal y el líquido extractor al 20%¹⁴. El aceite esencial fue obtenido y cuantificado por arrastre con vapor de agua (aparato de Clevenger)¹³.

Enfoque químico preliminar

Para el desarrollo del análisis químico preliminar fueron realizados ensayos según las metodologías propuestas por Matos¹⁵ y Harborne¹⁶. Todas las experiencias fueron acompañadas por ensayos positivos para auxiliar la interpretación de los resultados.

Evaluación físico-química

El residuo seco fue establecido a partir del extracto acuoso e hidroetanólico a 50 y 70%, por la media de 3 determinaciones^{13,14}. Cenizas, cenizas insolubles en ácido e índice de espuma fueron determinados según la farmacopea brasileña¹³.

RESULTADOS

Distribución, Identificación Botánica y Herborización

Fue verificado que la especie *Centella asiática* (L.) Urban se encuentra en todo el Sur de Brasil, desde la Provincia del Paraná hasta la Provincia de Rio Grande do Sul, de acuerdo a las exsiccata depositadas en los herbarios consultados. Con relación a la fenología se concluyó que la especie florece entre los meses de octubre y marzo.

La identificación del material fue realizada por los propios autores y confirmada por el responsable curador del "Museu Botânico Municipal de Curitiba (MBM)", tratándose sin duda de *Centella asiatica*. El material vegetal fue incorporado al herbario de la "Universidade Estadual de Maringá" (HUM) con el número 1825 y al MBM con el número 144.782.

Descripción macroscópica

Es una planta herbácea de hasta 30 cm, hojas de color pardo rojizo, obtusas a reniformes; de 1,0-6,0 cm de longitud desde el punto de inserción del pecíolo hasta el ápice; de 1,5-7,0 cm de ancho desde el punto más ancho; margen crenado-denticulado. Las nervaduras principales parten del punto de inserción del pecíolo, en número de siete, con ramificaciones principalmente en las extremidades del borde, salientemente reticulados en la porción inferior. Los pecíolos son estrechos y achatados, midiendo 1,0-

2,0 mm de ancho y 1,5-50,0 cm de longitud; tomentosos en toda su longitud, destacadamente en las proximidades de la vaina; se dilatan tanto en la porción superior, donde forma una vaina escariosa, como en la porción inferior, donde se une con el tallo. Tallos estoloníferos, largos, retorcidos en espiral en todo su largo, con estrías numerosas, continuas en toda su longitud; los tallos son pilosos a glabrescentes, blanco-cárdenos; fasciculados y enraizados en los nudos, de donde salen pecíolos, pedúnculos e inflorescencias. Las inflorescencias son del tipo umbela simple, cada nudo con dos o cuatro inflorescencias; cada inflorescencia con dos o tres flores (improbable uno o cuatro), de color blanco amarillento, de 2,5-3,0 mm de ancho y 3,5-4,0 mm de largo; dos brácteas opuestas formando un involucro, orbicular, escariosas, de 3,0-4,0 mm de largo. Los pedúnculos son escasamente pilosos, opuestos, de 1,0-1,6 cm de largo, planos, levemente retorcidos, en número de 2 o 4, insertados en un mismo punto. Los pedicelos son arcaicos, de 0,8-1,0 mm de largo. Frutos pilosos, elipsoide lateralmente, muy achatados dorso-ventralmente, de color verde-musgo a marrón-tierra, formados por 2-3 esquizocarpos bicarpelares; de 2,0-3,0 mm de largo y 3,0-4,0 mm de ancho; salientemente reticulados, longitudinalmente 7 o 8 crestados, con juntura horizontal terminal en medio de las crestas; 2 estilopodios deprimidos; estiletes brevísimos, con 0,3-0,6 mm de largo y 0,08-0,1 mm de ancho.

Descripción microscópica

Las hojas presentan epidermis uniestratificadas, recubiertas por una capa fina cuticular, donde las dos presentan estomas paracíticos; el mesófilo es del tipo heterogéneo asimétrico, con parénquima en empalizada en 2-3 capas y lagunoso en 5-6 capas, presentando algunas drusas de oxalato de calcio y tubos oleíferos (vitas) formados por 5-7 células y situados abajo y arriba de las haces vasculares; en las dos epidermis hay pelos tectores pluricelulares, gruesos, lisos, largo y caducos (Figura 1a).

Los pecíolos presentan también epidermis simple y el mismo tipo de pelos tectores, pero más raros; presencia de 3 capas de colénquima laminar abajo de la epidermis, seguida de 10-15 capas de células parenquimáticas redondeadas, con diámetro creciente de la periferia al interior; haces vasculares del tipo colateral en número de 7, recubiertos externamente por una vaina esclerenquimática (Figura 1b y 1c); presencia también de canales oleíferos dispersos en la región parenquimática, pero particularmente pró-

ximos y en medio de los haces vasculares (Figura 1d); nótase la presencia de algunos granos de almidón simples y pequeños; la médula es hueca.

Los tallos tienen estructura similar a la de los pecíolos. Hay una región cortical extensa, formada por 20 o más capas de células parenquimáticas; tallos de estructura discontinua, con 16-17 haces vasculares colaterales recubiertos igualmente por vaina esclerenquimática en la región externa; médula igualmente hueca; inexistencia de drusas, pero se constató la presencia de granos de almidón idénticos a los existentes en los pecíolos (Figura 1e). Los rizomas contienen gran cantidad de granos de almidón, simples y acumulados, con hilo visible del tipo bisel irregular, con lamelas no visibles (Figura 1f).

Enfoque químico preliminar

Los datos de la Tabla 1 expresan las características de los extractos acuoso e hidroetanólico. Por otra parte la Tabla 2 presenta los datos obtenidos del análisis químico preliminar. El rendimiento en aceite esencial fue del 0,04%.

Características	Extracto Acuoso	Extracto hidroetanólico
Color	verde a grisáceo	verde amarillento
Sabor	casi insípido	nr
Olor	Débilmente silvestre	alcohólico débil
pH	5,0-6,0	6,0-7,0
	nr = no realizado	

Tabla 1. Características de los extractos acuoso e hidroetanólico.

Grupos	Extracto acuoso	Extracto hidroetanólico
Acidos orgánicos	+	nr
Azúcar no reductor	+	+
Azúcar reductor	+	+
Alcaloides	+	nr
Amino grupos	+	+
Esteroides y/o triterpenos	nr	+
Fenoles	+	+
Gomas y mucílagos	+	nr
Heterósidos antocianicos	-	nr
Heterósidos hidroxí-antracénicos	+	nr
Heterósidos cardiotónicos	-	nr
Heterósidos cumarínicos	nr	-
Heterósidos flavonoidicos	nr	+
Heterósidos saponínicos	+	nr
Polisacáridos homogéneos (almidón)	+	+
Taninos	+	nr
	nr = no realizado	

Tabla 2. Análisis químico preliminar de la droga vegetal.

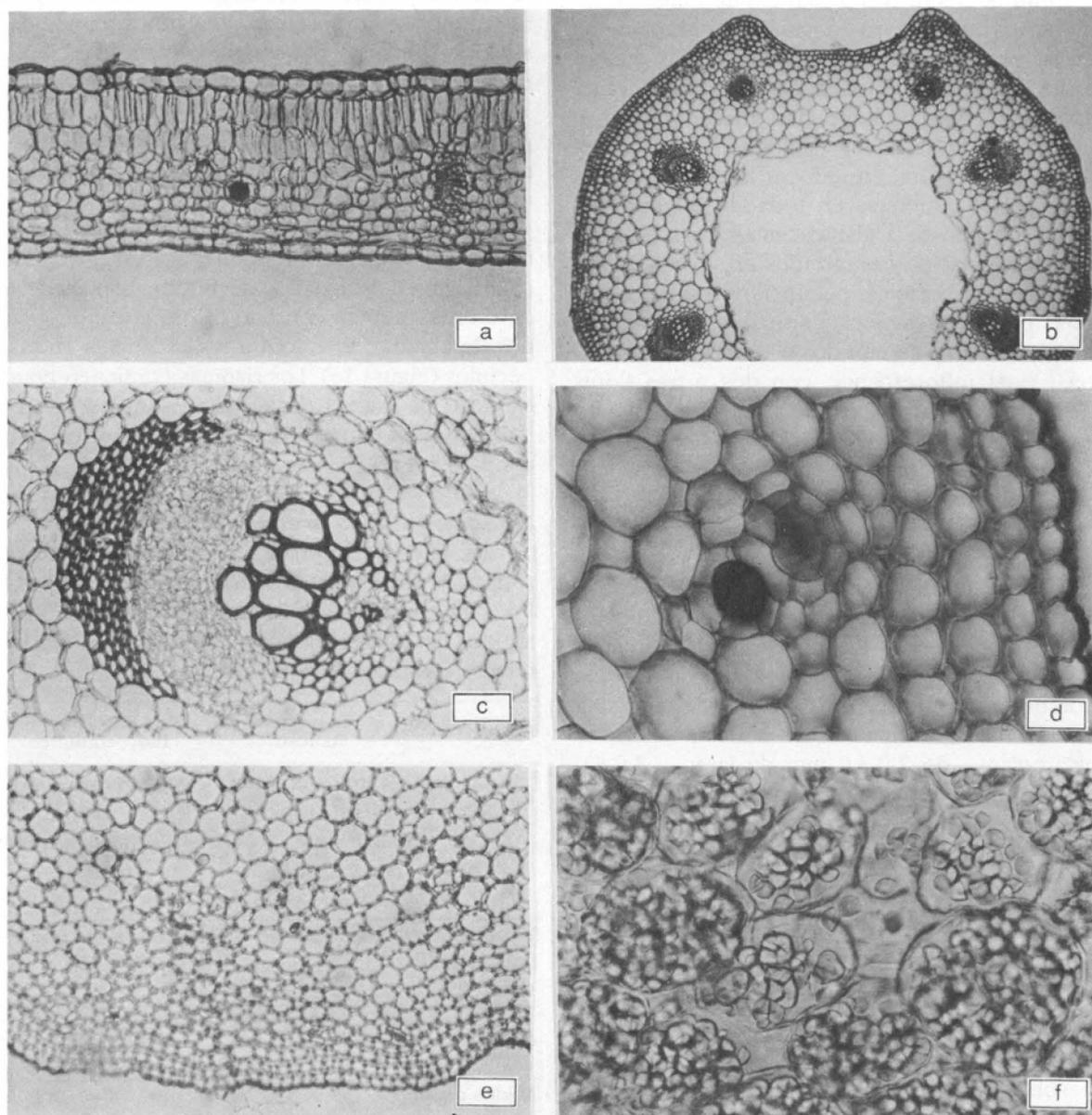


Figura 1. Estudio anatómico de *Centella asiatica* (L.) Urban. **a)** sección transversal de las hojas (aumento 10 X); **b)** aspecto general del pecíolo (aumento 3 X); **c)** detalle de los haces vasculares del pecíolo y del tallo (aumento 40 X); **d)** detalle de los canales oleíferos en la región parenquimática de las hojas, pecíolo y tallo (aumento 40 X); **e)** aspecto general del tallo (aumento 10 X); **f)** aspecto general del parénquima con almidón en el rizoma (aumento 40 X).

Análisis físico-químico

Además de la determinación de saponósidos, que dio resultado positivo, fue calculado el índice de espuma¹⁷ cuyo valor fue de 3333.

Las cenizas totales fueron establecidas en 10,64%, mientras que las cenizas insolubles en ácido fueron de 3, 16%.

La Tabla 3 presenta el porcentaje de residuo seco obtenido con la extracción de la droga vegetal, usando 3 disolventes.

Solución extractiva	Residuo seco
etanol al 50 %	3,14 %
etanol al 70 %	2,65 %
agua destilada	2,64 %

Tabla 3. Residuo seco empleando diferentes líquidos extractivos (n=3).

DISCUSIÓN

El control de calidad de la materia prima vegetal es fundamental en cualquier industria de

medicamentos, pudiendo ser ejecutado, solamente, en caso de que existan las especificaciones respectivas y que además haya técnicas accesibles a las pequeñas y medianas empresas, que componen la gran mayoría, en número, de todo el mercado farmacéutico brasileño.

Los datos que serán discutidos buscan suplir las deficiencias bibliográficas existentes en relación a la droga *Centella asiatica*, incluso haciendo una comparación con la farmacopea británica herbal¹⁸, pues sus especificaciones son pocas e insuficientes para una segura y eficiente ejecución del control pretendido.

Los resultados de presencia y distribución demuestran la existencia frecuente de esta especie en el Sur y Sudeste del Brasil, siendo tal distribución coincidente con la citada por Lorenzi¹. Esto confirma la posibilidad de sustitución de la especie importada por la brasileña, lo que tornaría más accesible su consumo por la población. Se entiende fundamental el desarrollo de estudios agronómicos en una tentativa de estimular el cultivo en escala comercial, evitándose de esa forma aumentar la degradación ambiental y la provisión de la materia prima heterogénea para el sector farmacéutico o cosmético. Esta posibilidad no fue aún señalada en los estudios similares ya ejecutados¹⁹. En consecuencia de esto, se hace presente la necesidad de una evaluación genética, pues trabajos pertinentes han demostrado variaciones significativas en el contenido químico de esa especie, dependiendo de su genoma²⁰. Los resultados llevan a una fácil identificación botánica empleándose la clave de la "Flora Ilustrada Catarinense", que es accesible en Brasil y de buena aplicación y manipulación, a pesar de la relativa semejanza entre *Centella* y las diversas especies de *Hydrocotyle*.

Las caracterizaciones macro y microscópicas, sin embargo, evidenciaron aspectos marcadores de gran ayuda en la diagnosis de la droga, tales como: morfología de la hoja, inserción del pecíolo, tallo retorcido, largo de la inflorescencia, retículos salientes en el fruto; tipo de mesófilo, presencia de pelos toectores, drusas de oxalato de calcio, tubos oleíferos (vitas) y granos de almidón. Estos datos son de gran valor para el control de calidad de esa materia prima vegetal.

Los datos químicos preliminares presentados en la Tabla 2 muestran grupos de sustancias químicas que pueden ser empleadas para la caracterización de la materia prima e incluso del producto terminado. Es el caso de los triterpenos, que se hacen presentes en la *C. asiatica* y son responsables por sus acciones terapéuticas²¹,

pero se extiende también a los flavonoides y a los compuestos antracénicos, grupos frecuentemente utilizados como sustancias marcadoras para estandarización de productos fitoterápicos¹⁴.

Durante el desarrollo de este trabajo se evidenció que la técnica para la determinación de la presencia de alcaloides que emplea directamente el extracto ácido de la droga puede dar falsos positivos en caso de que la droga tenga amino-grupos. Realizándose una purificación del extracto, la técnica se mostró confiable y se confirmó la presencia de alcaloides en la droga²². Este dato no es el mismo presentado por Morelli *et al.*⁸, quienes no encontraron alcaloides en la materia prima vegetal.

Se realizaron ensayos para determinar ácidos orgánicos, ácidos esenciales y ácidos fijos. La discordancia de la técnica empleada para los ácidos esenciales según Moreira²³ es debido a que el extracto es acidificado antes de medirse el pH de los ácidos esenciales.

Las cumarinas no fueron detectadas, a pesar de innumerables ensayos específicos realizados. Este hecho demuestra total discordancia con la acción fotosensibilizante citada por Morelli *et al.*⁸, Bruneton²⁴ y Steinegger y Hänsel²⁵, ya que ésta debe estar relacionada a la presencia de compuestos furano-cumarínicos²⁶. Sin embargo, no se descarta que otros compuestos estén involucrados en este efecto o que factores como clima y suelo sean los responsables por las variaciones en los compuestos investigados²⁷.

Estas variaciones sugieren la necesidad de una investigación fitoquímica de la droga *Centella asiatica*, subespontánea en Brasil, con el aislamiento y cuantificación de los principios activos, particularmente los ácidos asiático, madecásico y asiaticósido. Tal investigación es fundamental, ya que los datos farmacológicos disponibles se basan fundamentalmente en la fracción triterpénica total de *C. asiatica* (TTFCA - Total Triterpenic Fraction)²⁸⁻³⁰.

Los datos de residuo seco, cenizas y cenizas insolubles en ácido son importantes, respectivamente, en la determinación de la mejor combinación de disolventes para la extracción y en la verificación de la calidad y pureza de cualquier materia prima, principalmente tratándose de drogas vegetales³¹. Se ha verificado también que el mayor porcentaje de extracto seco fue obtenido con etanol 50%. Este dato es importante en el control de calidad industrial y de gran utilidad a nivel tecnológico por indicar las mejores condiciones para una extracción más productiva de la droga.

La principal indicación terapéutica de la droga vegetal *Centella asiatica* en casos de celulitis, como ha sido hecho insistentemente en Brasil, está aún poco demostrada³²⁻³⁴, a pesar de que los datos experimentales muestran un claro efecto estimulador de la síntesis de colágeno en cultivo de fibroblastos^{28,35,36}.

CONCLUSIONES

Los datos obtenidos en este trabajo evidencian la abundante dispersión de *Centella asiatica* (L.) Urban en el Sur del Brasil, la que es de fácil identificación botánica. Se agregan sus descripciones macro y microscópicas como los principales puntos de referencia.

La asociación entre las descripciones macro y microscópicas con los datos fitoquímicos y físico-químicos demostrados, facilitan la elaboración de una monografía farmacopeica.

La caracterización de esta droga debe ser complementada con un estudio del perfil cromatográfico de su extracto con el uso simultáneo de patrones.

Agradecimientos. Los autores agradecen a la Farm. Sandra Regina por el auxilio en la realización de la parte química preliminar.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Lorenzi, H. (1991) "*Plantas daninhas do Brasil*", 2ª Ed., Plantarum, Nova Odessa, 406 págs.
2. Hamal, I.A. y A.K. Koul (1989) *Proc. Indian Acad. Sci. (Plant Sci.)* **22**: 161-2
3. Bailey, E. (1945) *Nature* **155**: 601
4. Boiteau, P., A. Buzas, E. Lederer & J. Polonsky (1949) *Nature* **163**: 258-9
5. Paris, R.R. & H. Moyse (1967) "*Précis de matière médicale*" Masson, Paris, Vol. II, pág. 480
6. Viala, A., J.P. Cano, A. Durand, R. Paulin, F. Ruox, M. Placid, H. Pinhas & C. Lefournier (1977) *Thérapie* **32**: 573-84
7. Tenailleau, A. (1978) *Quest Med.* **31**: 919-21
8. Morelli, J., P.E. Tomei & P.L. Cioni (1983) *Sel. Med. Plant.* **23**: 38-45
9. Poiteau, J.P., H. Boccalon, M. Cloarec, C. Lebevehat & M. Joubert (1987) *Angiology* **38**: 46-50
10. Mori, S.A. (1985) "*Manual de manuseio dos herbários fanerogâmicos*" CPC, Ilhéus
11. Matthias, M.E., L. Constance & D. Araújo (1972) "*Umbelíferas: flora ilustrada catarinense*" Herbário Barbosa Rodrigues, Itajaí
12. Oliveira, F. & G. Akisue (1983) "*Farmacobotânica: curso de identificação de drogas vegetais*" Edición de los autores, São Paulo
13. "*Farmacopéia brasileira*" (1988) 4ª Ed., Atheneu, São Paulo
14. Mello, J.C.P. de (1989) "*Desenvolvimento galênico de macerados de Baccharis trimera (LESS.) DC. - compositae-(carqueja)*", Disertación de maestrado. Curso de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 136 págs.
15. Matos, F.J.A. (1988) "*Introdução à fitoquímica experimental*" UFC, Fortaleza
16. Harborne, J.B. (1990) "*Phytochemical methods: a guide to modern techniques of plant analysis*" 2ª Ed. Chapman e Hall, London, 288 págs.
17. World Health Organization (1992) "*Quality control methods for medicinal plant materials*" WHO/PHARM/92.559, págs. 36-7
18. "*British herbal pharmacopoeia*" (1983) British Herbal Medicine Association, Bournemouth
19. Panizza, S., O. Scavone, A.B. Rocha & M. Christodoulou (1982) *Rev. Ciênc. Farm.* **4**: 27-38
20. Das, A. & R. Mallick (1991) *Bot. Bull. Acad. Sin.* **32**: 1-8
21. Allegra, C. (1984) *Clin. Ther.* **110**: 555-9
22. Franz, G & H. Koehler (1992) "*Drogen und Naturstoffe: Grundlagen und Praxis der chemischen Analyse*" Springer Verlag, Berlin, págs. 1-9.
23. Moreira, E.A. (1979) *Trib. Farm.* **47**: 1-35
24. Bruneton, J. (1991) "*Elementos de fitoquímica y de farmacognosia*" Acribia, Zaragoza, págs. 142-8
25. Steinegger, E. & R. Hänsel (1992) "*Pharmakognosie*" 5ª Ed., Springer, Berlin, págs. 376-83
26. Borges, M.F.M. (1987) *Rev. Port. Farm.* **37**: 4-57
27. Von Hertwig, I. F. (1986) "*Plantas aromáticas e medicinais: plantio, colheita, secagem e comercialização*" Ícone, São Paulo
28. Del Vecchio, A. (1984) *Il Farmaco* **39**: 355-64
29. Belcaro, G.V., A. Rulo & R. Grimaldi (1990) *Angiology* **41**: 12-8
30. Cesarone, M.R., G. Laurora, M.T. de Sanctis & G. Belcaro (1992) *Minerva Cardioangiol.* **40**: 137-43
31. Batistic, M.A., M.T. Auricchio, V.R. Hoppen & I.Y. Yamashita (1989) *Rev. Inst. Adolfo Lutz* **49**: 45-9
32. Bourguignon, A. D. (1975) *Gaz. Med. Fr.* **38**: 4579-83
33. Bargheoh, J. (1976) *Vie Med. Can. Fr.* **10**: 597-601
34. Pereira, I.C. (1979) *F. Med.* **79**: 402-4
35. Maquart, F.X., G. Bellon, P. Gillery, Y. Wegrowski y J.P. Borel (1990) *Connect. Tissue Res.* **24**: 10-20
36. Tenni, R., G. Zanaboni, M.P. de Agostini, A. Rossi, C. Bendotti & G. Cetta (1988) *Ital. J. Biochem.* **37**: 69