



UNIVERSIDAD NACIONAL DE MISIONES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, QUÍMICAS Y NATURALES

• CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO TECNOLÓGICO DR. ROGELIO S. STAMPELLA (CIDET)

Director: Ing. Miguel Schmalko

• REVISTA DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA

COMITÉ EDITORIAL

Directora/Editora: Dra. María Cristina Area. (m_c_area@fceqyn.unam.edu.ar).

Área Bioquímica y Farmacia: Dr. Severino Bargardi. (sebarces@escenf.unam.edu.ar).

Área Ingeniería y Tecnología: Dra. Alicia Ares. (aares@fceqyn.unam.edu.ar).

Área Genética y Biología: Dr. Sergio Andrés Tonón. (labimap@mbf.unam.edu.ar).

COMITÉ DE REVISIÓN ÁREA GENÉTICA Y BIOLOGÍA

Prof. Ing. Fernando Dulout. U.N. La Plata. Genotoxicidad y genética general.

Ing. Aveliano Fernández. U.N.N.E. Genética vegetal.

Dr. Juan L. Santos. U. Comp. de Madrid. Biología general.

Dr. Carlos M. Abatte. PROIMI. Tucumán. Microbiología industrial.

Dr. Marcelo Cabada. U.N. Rosario. Biología del Desarrollo.

Dr. Alfredo Recca. Sec. Rec. Nat. y D.S. Medio ambiente.

Lic. Beatriz A. de Avanza. U.N.N.E. Herpetología, Anatomía Comparada.

Dr. Edgardo Romero. U.B.A. Palinología, paleobotánica, paleofitogeografía.

Dr. Mario A. Poli. CNIA-INTA. Castelar. Genética de bovinos, caprinos y ovinos. Genética de poblaciones.

Dr. Vilardi, Juan César. UBA. Genética vegetal y de poblaciones.

Dra. Mónica Martella. Universidad Nacional de Córdoba. Ecología.

Prof. Dr. Eduardo A. Ceccarelli. Universidad Nacional de Rosario. Biología molecular.

Dra. Maria del C. Corigliano. Universidad Nacional de Río Cuarto, Córdoba. Biología Animal.

COMITÉ DE REVISIÓN ÁREA BIOQUÍMICA Y FARMACIA

Dra. Regina de Wikinski. U.B.A. Metabolismo de lípidos y bioquímica clínica.

Dr. Eduardo Ercoli. U.N. Cuyo. Microbiología industrial.

Dra. María M. Elías. U.N. Rosario. Bioquímica clínica.

Dra. Clara E. López. U.N. Rosario. Micología.

Dr. Alfredo Zurita. U.N.N.E. Parasitología.

Guillermo von Ellenrieder. Univ. Nac. de Salta. Biotecnología de alimentos.

Carlos Mario Cuevas. Univ. Nac. de Salta. Microb. Industrial. Alimentos.

Carlos Bregni. U.B.A. Farmacia.

Aída van Gelderen. Univ. Nac. de Tucumán. Microbiología.

Rubén Manzo. Univ. Nac. de Córdoba. Farmacia.

Dra. Mabel E. Valsecia. U.N.N.E. Corrientes. Farmacología.

Dra. Virginia Susana Martino. UBA. Farmacología. Farmacognosia.

Dra. Graciela E. Ferraro. UBA. Farmacognosia. Fisiología Vegetal.

Dra. Susana María Sicardi. UBA. Doctora en Farmacología Experimental.

Dra. Laura Beatriz López. UBA. Bromatología. Toxicología. Alimentos. Nutrición. Celíacos.

Dra. Nora Escuidero. Universidad Nac. de San Luis. Biología Vegetal.

Esta Revista es un servicio del CIDeT. Está prohibida su venta a terceros como también la reproducción total o parcial con fines comerciales. Los trabajos presentados han sido aceptados para su publicación por el Consejo de Dirección y el Consejo de Edición. La Revista no se hace responsable de las opiniones contenidas en los artículos, siendo de responsabilidad exclusiva de los autores de los mismos. La edición de la Revista cuenta con el apoyo económico de la Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales y de la Secretaría General de Ciencia y Tecnología de la UNaM. Toda correspondencia relacionada a la Revista debe ser dirigida a: Sr. Director del CIDeT. Félix de Azara 1552, 3300, Posadas, Misiones, Rep. Argentina. Teléfono: 54-3752 - 422186, Fax: 54-3752-425414, E-mail: cidet@fceqyn.unam.edu.ar.

EQUIPO EDITORIAL

Diseño de Maquetas: Sergio Manela

Armado de interiores y cubierta: Francisco A. Sánchez

Revisión de texto: Amelia E. Morgenstern

Revisión de texto en inglés: Cristina E. Mayol, M. A.

Colaboradora Técnica: Zulma Achar

Revista de Ciencia y Tecnología on line: www.fceqyn.unam.edu.ar/recyt

Hecho el depósito de la Ley 11723

Impreso en Argentina

ISSN: 0329-8922

Revista de Ciencia y Tecnología

Genética y Biología / Bioquímica y Farmacia

AÑO 8 / N° 8 / 2006

ÍNDICE

- 5** Extractos crudos de *Polygonum punctatum* Elliot con actividad antimicrobiana / Amer, Lidia S.; Jerke, Gladis; Horiński, Marta A.; Kramer, Fernando L.; Jordá, Graciela B.; Bargardi Severino; Guida, Adriana M.
- 12** Caracterización de Aminopeptidasa N de *Streptococcus thermophilus* TW43 / Marguet, Emilio R.; Vallejo, Marisol; Pescuma, Micaela.
- 18** Presencia de *Aedes aegypti* Linneo, 1762 (Culicidae, Diptera, Insecta) en el cementerio "La Piedad", Posadas, Misiones, Argentina. (2003-2004). / Tricio, Aída E.; Morawicki, Patricia M.; Tolosa, Ezequiel; Martina, Pablo; Sarlej, María I.; Walantus, Horacio L.; Fernández Díaz, Cecilia I.
- 23** Valoración microbiológica y control higiénico-sanitario de medicamentos comercializados sin fiscalización en Posadas. / Ybarra, Liliana R.; Bordenave, Sylvia A.; Semczuk, Rosaura I.; Duce, Jorge A.; Von Specht, Martha H.
- 31** Actividad antimicrobiana de *Celtis spinosa* Spreng / Jordá, Graciela B.; Amer, Lidia S.; Horiński, Marta A.; Jerke, Gladis; Guida, Adriana M.; Kramer, Fernando L.; Bargardi, Severino.
- 35** Evaluación de la flora fúngica presente en la yerba mate estacionada en galpones calefaccionados / Marucci, Raúl S.; Kanzig, Rodolfo G.; Sartori, Patricia.
- 39** Farmacoepidemiología del uso de Taxanos para cáncer de mama en la seguridad social de la provincia de Misiones, Argentina / Falkowski, Juan C.; Oviedo, Patricia; Duarte, Alicia; Bañay, Eduardo; Blariza, José M.
- 46** Actividad de extractos crudos de *Croton urucurana* Baill sobre *Escherichia coli* / Kramer, Fernando L.; Bargardi, Severino.
- 51** Guía para autores.
- 54** Guide for contributors.

In memoriam:

Sergio Andrés Tonón

Rev. Cienc. Tecnol.

Año 8 / Nº 8 / 2006 / 5-11

EXTRACTOS CRUDOS DE *POLYGONUM PUNCTATUM* ELLIOT CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

Amer, Lidia S.; Jerke, Gladis; Horianski, Marta A.; Kramer, Fernando L.; Jordá, Graciela B.; Bargardi Severino; Guida, Adriana M.

Cátedra de Microbiología e Inmunología (C. Lic. Genética), Farmacotecnia I y II (C. Farmacia).

Módulo de Farmacia y Bioquímica. Av. M. Moreno 1375. Cod. 3300. Posadas, Misiones. Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales. Universidad Nacional de Misiones.

sebarces@fceqyn.unam.edu.ar

RAW EXTRACTS OF *POLYGONUM PUNCTATUM* ELLIOT WITH ANTIMICROBIAL ACTIVITY

ABSTRACT

Polygonum punctatum Elliot is an abundant species in the Province of Misiones used in popular medicine for wound antiseptics, as cicatrizing, etc. The objective of this work was to determine the antimicrobial activity of crude extracts obtained by different methods and with different parts of the plant against different bacterial and fungal genera. The antibacterial activity was determined by diffusion and minimum inhibitory concentration by dilution in agar against *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, methicillin resistant *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis*, *Salmonella enteritidis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Acinetobacter lwoffii*, *Klebsiella pneumoniae* and antifungal activity by diffusion in plates and paper disks against *Candida albicans*, *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum* Thom and *Penicillium citrinum* Thom.

The extracts resulted active by diffusion against Gram positive and Gram negative strains. By minimum inhibitory concentration the tested bacteria proved to be resistant, except *Bacillus subtilis*. The antifungal effect was observed in the *Penicillium* genera and *Aspergillus parasiticus* species.

KEYWORDS: *Polygonum punctatum* Elliot, vegetable antimicrobial, antifungal extracts, phytomedicines.

RESUMEN

Polygonum punctatum Elliot es una especie abundante en la provincia de Misiones y es utilizada en medicina popular en la antisepsia de heridas, como cicatrizante, etc. Nuestro objetivo fue determinar la actividad antimicrobiana de extractos crudos obtenidos por diferentes métodos, y con distintas partes de la planta, frente a una serie de diversos géneros bacterianos y fúngicos. Se determinó la actividad antibacteriana por difusión y concentración inhibitoria mínima por dilución en agar frente a *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* meticilino resistente, *Streptococcus faecalis*, *Salmonella enteritidis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Acinetobacter lwoffii*, *Klebsiella pneumoniae* y la actividad antifúngica por difusión en pocillos y discos de papel frente a *Candida albicans*, *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum* Thom y *Penicillium citrinum* Thom.

Por difusión los extractos resultaron activos frente a cepas Gram positivas y Gram negativas mientras que por concentraciones inhibitorias mínimas las bacterias ensayadas resultaron resistentes, excepto *Bacillus subtilis*. Efectos antifúngicos fueron observados en el género *Penicillium* y la especie *Aspergillus parasiticus*.

PALABRAS CLAVES: *Polygonum punctatum* Elliot; antimicrobianos vegetales; extractos antifúngicos; fitomedicamentos.

INTRODUCCIÓN

El uso de los vegetales como fuente de compuestos fitomedicinales pasa por un momento de absoluta vigencia. Actualmente, las plantas se pueden usar con mayor rigor científico al contar con técnicas de microanálisis químico, que permiten el conocimiento de muchos compuestos de los que se sospechaba un poder curativo, pero que no había podido ser confirmado más que por el uso tradicional.

La OMS ha presentado públicamente una estrategia válida hasta el año 2005 cuyo objetivo es el de apoyar las medicinas tradicionales en todos los rincones del orbe [1]. Entre otros conceptos destaca la necesidad de llevar la medicina tradicional a la científica, pensando en los países en vías de desarrollo [2].

En la provincia de Misiones el uso de las plantas medicinales como alternativa terapéutica para diferentes aspectos de la salud humana forma parte de una cultura arraigada en la gente. Este hecho no se circunscribe solamente a las comunidades guaraníes, una gran parte de la población no indígena también las utiliza. Es por ello necesario frenar el vertiginoso ritmo de deforestación de selvas tropicales, ya que existe la posibilidad de que con cada especie vegetal que se pierda, no se puedan disponer de valiosos principios activos contra enfermedades de importancia en salud pública.

En el año 2005 cobró notoriedad a nivel provincial y nacional el caso de un niño aborigen con tumores en el corazón, presumiblemente de origen infeccioso. El choque de dos culturas diferentes puso en riesgo su vida [3]. Ello evidencia la necesidad de considerar también a la medicina alternativa y el trabajo interdisciplinario e integral en la curación del paciente.

Frente a esta realidad insoslayable es que la provincia puso en marcha el Programa Provincial de Desarrollo Integral de Plantas Medicinales con el fin de revalorizar y de introducir a la Atención Primaria de Salud, algunos medicamentos a base de plantas medicinales, preferentemente autóctonas. Misiones cuenta con la habilitación para realizar convenios con otras provincias o países interesados en esta temática y los fitomedicamentos misioneros son los únicos reconocidos en el país [4,5].

La Asociación Argentina de Fitomedicina resalta que la obtención de un buen fitomedicamento implica una serie de cuidadosos pasos que comienzan en las buenas prácticas de cultivo hasta la venta del mismo en el comercio, advirtiendo que las plantas mal usadas pueden hacer mucho daño [5]. Un riguroso control es necesario porque es falso que todo lo natural sea bueno.

Nuestro objetivo, desde la Universidad, es el de cola-

borar en la búsqueda de nuevos principios activos antimicrobianos de las plantas, garantizar su eficacia, seguridad y calidad que se adecuen a las normativas de las disposiciones del Instituto Nacional de Medicamentos (INAME), reglamentadas en junio de 1999 por medio de metodologías y técnicas estandarizadas.

Para este estudio la especie vegetal elegida fue *Polygonum punctatum* Elliot. El género *Polygonum* posee una distribución mundial, se encuentra desde Estados Unidos hasta el sur de la Argentina. Se desarrolla en los campos de terrenos bajos, inundables, húmedos, a orillas de ríos, arroyos, arrozales, aunque muchas veces forman malezales conocidos con el nombre de "cataysales".

Este género se ubica dentro de la familia de las polygonáceas. En la Argentina se encuentran entre 20 y 30 especies. *Polygonum punctatum* Elliot se conoce con el nombre vulgar de "catay" o "caá-tay", "kaa-tay", "yerba picante", "picantilla", "sanguinaria" y abunda especialmente en la provincia de Misiones. Hierba anual, hasta de 1,5 metros de altura. Es utilizada en la medicina popular, para el tratamiento de la sarna y hongos, machacando y triturando toda la planta en agua fría. El cocimiento de la planta en agua o decocción se la utiliza como diurética, abortiva, anticonceptiva y antihelmíntica [6,7].

Existen antecedentes sobre el uso popular de la planta en la antisepsia de las heridas. Además, el estudio fitoquímico y los resultados alentadores de la actividad antibacteriana realizados en un trabajo anterior, nos alentaron a profundizar su estudio [8].

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras y preparación de extractos vegetales

Se recolectaron tallos (T), hojas (H), flor (Fl), rama (R), fruto (Fr) y raíz (Rz) de *Polygonum punctatum* en las localidades de San Vicente y Santa Rita, Provincia de Misiones.

El material fue clasificado y depositado para su conservación en el Herbario de la Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales de la Universidad Nacional de Misiones [8]. Se emplearon en forma natural verde (v) y desecada (s) a temperatura ambiente $\pm 25^\circ \text{C}$, en lugar ventilado y a la sombra. Posteriormente se efectuó la molienda con un molino a cuchillas tipo Viley obteniéndose partículas por tamizado, de 5 a 10 mesh. El material fue envasado en frascos adecuados y conservados en un ambiente seco y fresco. A este polvo se le llamó droga.

Para obtener los extractos crudos se pesaron diversas cantidades de droga a razón de 100, 150 y 200 g/l de solvente respectivamente, se usaron métodos de extracción conocidos como decocción, maceración, soxhlet y

solventes de distinta polaridad como el alcohol etílico, metanol, acetato de etilo y hexano.

Acción antibacteriana

El estudio de la determinación de la sensibilidad antimicrobiana por difusión con discos y de la concentración inhibitoria mínima (CIM) de los extractos se realizó siguiendo las Normas del Clinical And Laboratory Standards Institute (CLSI) / National Committee For Clinical Laboratory Standards (NCCLS).

Método de difusión: se llevaron a cabo en dos experiencias en diferentes tiempos de acuerdo a la disponibilidad de droga y de cepas bacterianas [9].

EXPERIENCIA 1

Muestras: se emplearon 17 extractos crudos de *Polygonum punctatum* Elliot (Tabla N°1).

TABLA N° 1: Obtención de extractos crudos de *Polygonum punctatum* Elliot.

Ext N°	Parte de la planta	Solventes	Método de extracción
1	THFr/v	Agua	Decocción
2	T/v	Agua	
3	Fr/v	Agua	
4	THFr/s	Agua	
5	Rz/s	Agua	
6	THFr/s	Metanol	Maceración
7	Rz/s	Metanol	
8	T/s	Metanol	
9	TH/s	Metanol	
10	THFr/s	Acetato de etilo	
11	Fl/v	Acetato de etilo	
12	H/v	Acetato de etilo	
13	THFr/s	Acetato de etilo	
14	THFr/s	Acetato de etilo	
15	T/v	Acetato de etilo	
16	THFr/s	Hexano	
17	H/v	Etol 96°	

Todas las muestras procedieron de San Vicente y se utilizaron en una concentración de 100 g/l.

Cepas: *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923,

Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853, *Enterobacter cloacae* ATCC 202 y *Escherichia coli* ATCC 35218.

Discos de Prueba: se utilizaron discos de papel Whatman N°3 de 6 mm de diámetro, embebidos con 25µl, 50µl y 100µl de extracto crudo con una carga correspondiente a 2,5 mg, 5 mg y 10 mg, secados a 37° C durante 24 horas.

EXPERIENCIA 2

Muestras: se emplearon 6 extractos crudos de *Polygonum punctatum* Elliot (Tabla N° 2).

TABLA N° 2: Obtención de extractos crudos de *Polygonum punctatum* Elliot.

Ext N°	Parte de la planta	Conc. g/l	Método de extracción
18	Fl/s	200	Maceración
19	Fr/s	200	
20	R/s	200	
21	H/s	100	
22	HFIFr/s	150	Soxhlet
23	THFIFr/s	100	

Referencias: ver texto. Todas las muestras procedieron de Santa Rita y el solvente utilizado fue el metanol.

Cepas: se incluyeron además *Staphylococcus aureus* metilino resistentes ATCC 43300, *Streptococcus faecalis* ATCC 29232, *Salmonella enteritidis* EB 1874/88, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Acinetobacter lwoffii* cepa remitida por el INEI-ANLIS "Dr Carlos Malbrán", *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603.

Discos de Prueba: los discos fueron impregnados con 50 µl de extracto pero de carga variable según la concentración del extracto en cada caso.

Técnica: se sembraron placas de Agar Mueller Hinton (AMH) con un hisopo a partir de una suspensión estandarizada de cada microorganismo. Luego de colocar los discos embebidos con los extractos sobre la superficie del agar, se procedió a la incubación a 35 °C durante 16-18 h y a la lectura de las placas observando la presencia de los halos de inhibición medidos en mm.

En las dos experiencias se utilizó la misma técnica y se efectuaron los controles que se detallan a continuación.

a) De contaminación de extractos: cultivo en estrías con un ansa de los mismos en placas de AMH y posterior incubación a 35 °C debiendo observarse ausencia de desarrollo.

b) De viabilidad de cepas: cultivo de los microorganismos en placas de AMH para obtener cultivos frescos y para detectar contaminación.

c) De inactividad de los solventes: con discos embebidos con cada solvente y sometidos a las mismas condiciones que los discos de prueba. Al cultivarse en el AMH no debe observarse inhibición del desarrollo de ninguna de las cepas de prueba.

d) De metodología: con discos de gentamicina (10 µg) y ampicilina (10 µg) frente a *P. aeruginosa* ATCC 27853 y *E. coli* ATCC 35218 respectivamente.

Concentración inhibitoria mínima: se realizó el método de dilución en agar [10].

Muestra: extracto de Fl y Fr obtenido por soxhlet y con solvente acetato de etilo. Para la prueba se empleó la fracción acuosa del extracto seco, solubilizándose en el momento de realizar el trabajo, a una concentración

final de 50 mg/ml.

Concentraciones probadas: el rango utilizado estuvo entre 78 a 2.500 µg/ml.

Cepas: se emplearon todas las cepas utilizadas en el método de difusión.

Técnica: el extracto se incorporó dentro del medio AMH, de manera tal que cada placa contenía una concentración de extracto diferente. Los inóculos de los distintos microorganismos se aplicaron por triplicado simultáneamente sobre la superficie del agar utilizando un replicador de Stern.

Controles: a) De método: como antibiótico de referencia se usó cefalotina, frente a *S. aureus* ATCC 29213.

b) De viabilidad de las cepas 1: cultivo de los microorganismos en placas de AMH sin extracto, para obtener cultivos frescos y para detectar mezcla de gérmenes.

c) De viabilidad de las cepas 2: se procedió de la misma manera pero al finalizar la inoculación de todas las placas (efecto “carry over”).

Acción antifúngica

En el estudio de la determinación de la sensibilidad se emplearon dos métodos:

Método 1. Prueba de sensibilidad al extracto por difusión en discos de papel de filtro (PSEDDi) [9].

Muestras: se emplearon 6 extractos crudos de *Polygonum punctatum* Elliot (Tabla 2).

Cepas: hongos levaduriformes: *Candida albicans* CDC B385 (cedida por la división Micología del INEI “Dr Carlos G. Malbrán). Hongos filamentosos: *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum* Thom y *Penicillium citrinum* Thom aisladas e identificadas de té negro cultivado en Misiones [11].

Discos de prueba: se prepararon los discos de la misma manera que en el estudio de la acción antibacteriana y fueron embebidos con 100 µl del extracto crudo.

Preparación del Inóculo de hongos filamentosos: cada especie fúngica fue cultivada en pico de flauta con Agar papa dextrosa (PDA, Oxoid), durante 10 días a 25 ± 2 °C. Luego se preparó una suspensión madre de conidias, agregando a cada tubo 10 ml de solución fisiológica 0,85% con 0,1% de Tween 80 (Polisorbato 80, Sigma), para prevenir la aglomeración y la rápida precipitación de las conidias. Las suspensiones conteniendo las conidias desprendidas fueron recogidas en frascos de vidrio estériles color caramelo y se realizó su recuento en cámara de Neubauer, constituyendo la suspensión madre de conidias (SME). A partir de la SME se preparó la suspensión de trabajo, ajustando la concentración de conidias a 1×10^6 UFC/ml con solución fisiológica [12].

Preparación del Inóculo de *Candida albicans*: cultivo

del mismo en agar Sabouraud 40 (AS40) durante 24 h a 37 °C. Se preparó una suspensión en solución fisiológica y se ajustó al tubo N° 1 de la escala de Mc Farland.

Técnica: se utilizó la misma técnica descripta, adaptada a las cepas fúngicas [9]. Con un hisopo se distribuyeron uniformemente las células levaduriformes y/o conidias por toda la placa de AS40. Luego se colocaron 6 discos embebidos con los extractos. Se incubaron las placas sembradas con *C. albicans* a 37°C, se observó la presencia o ausencia de desarrollo a las 24 horas y hasta 10 días.

Las placas sembradas con los hongos filamentosos se incubaron a 28°C, se observó a partir del tercer día y hasta 20 días. Todas las determinaciones se realizaron por duplicado.

Método 2. Prueba de sensibilidad al extracto por difusión en pocillos de agar (PSEDPA) [13].

La preparación de las placas y la siembra del inóculo se llevaron a cabo como en el método anterior.

Preparación y carga de los pocillos: con un sacabocado se realizaron pocillos de 6 mm de diámetro. Se cargaron los mismos con 50 µl del extracto crudo.

Incubación: se tomaron los mismos parámetros que en el Método 1.

Controles: a) De contaminación de extractos: se sembró cada extracto crudo en AS40 y se incubó a 28 °C durante 15 días.

b) De viabilidad de las cepas: cultivo de *C. albicans* y de los hongos filamentosos en AS40 y posterior incubación a 37°C durante 24 a 48 h y a 28°C durante 5 días respectivamente.

c) De inactividad del solvente: con discos embebidos con el solvente y sometidos a las mismas condiciones que los discos de prueba. Al cultivarse en AS40 no debe dar inhibición del desarrollo.

Se definió la sensibilidad (S) o resistencia (R) por la presencia o ausencia de halos de inhibición respectivamente, medidos en mm.

RESULTADOS

a) Resultados de la actividad antibacteriana

Se registraron en tablas solo aquellos extractos que mostraron actividad antibacteriana en las condiciones de prueba.

MÉTODO DE DIFUSIÓN

En la experiencia 1 (Tabla 3).

Los extractos obtenidos de distintas partes de las plantas verdes y secadas, cuando se utilizó como solvente el acetato de etilo, mostraron actividad antibacteriana

sobre *S. aureus* y *B. subtilis*.

Cuando la obtención de los extractos se realizó con solventes como el hexano y etanol 96°, la actividad se observó sobre *S. aureus*.

Con las bacterias Gram negativas *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter cloacae* los extractos no resultaron activos.

Los extractos obtenidos por maceración con metanol de THFr/s, Raíz/s, T/s y TH/s no tuvieron actividad inhibitoria sobre las bacterias Gram positivas y Gram negativas.

No tuvieron efecto inhibitorio los extractos obtenidos por decocción usando como solvente el agua de THFr/v, T/v, Fr/v, THFr/s y Raíz/s de la planta, no resultaron activos.

TABLA Nº 3: Actividad antibacteriana de extractos crudos obtenidos por maceración de *Polygonum punctatum* Elliot.

Resultados (diámetro del halo en mm)						
Ext. Nº	<i>Staphylococcus aureus</i>			<i>Bacillus subtilis</i>		
	Carga por disco en µl			Carga por disco en µl		
	25	50	100	25	50	100
10	9	R	R	R	R	R
11	13	13	12	8	10	11
12	R	R	10	8	9	10
13	11	12	12	8	10	13
14	R	8	R	8	10	11
15	R	R	9	R	8	8
16	9	R	R	R	R	R
17	R	R	8	R	R	R

Referencias: R = resistente

En la experiencia 2 (tabla 4).

TABLA Nº 4: Actividad antibacteriana por difusión de extractos crudos de *Polygonum punctatum* Elliot.

Resultados (diámetro del halo en mm)								
Ext. Nº	Conc. g/l	Mét. ext.	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus met-r</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. cloacae</i>	<i>A. lwoffii</i>
18	200	Mac.	16	R	R	9	9	10
19	200		11	R	9	R	R	10
20	200		15	9	R	R	R	R
22	150	Sox	R	R	R	R	R	R
23	100		R	11	R	R	R	R

Referencias: Mac. = maceración; Sox = soxhlet; *S. aureus met-r.* = *Staphylococcus aureus* meticilino-resistente; M = metanol; R = resistente.

En los extractos obtenidos por maceración y utilizando como solvente el metanol los resultados fueron variables, dependiendo de la parte de la planta utilizada. El extracto de H/s obtenido por maceración con metanol no mostró actividad antibacteriana alguna.

Con el método de soxhlet tuvo efecto antibacteriano el extracto de THFrFl/s sobre *S. aureus* meticilino-resistente.

No se observó actividad de los extractos sobre los bacilos Gram negativos aerobios *Salmonella enteritidis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae*. Tampoco fueron activos sobre las bacterias Gram-positivas *Streptococcus faecalis* y *Staphylococcus epidermidis*.

Controles de metodología: los halos de inhibición se observaron en el rango esperado.

CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA

La CIM de *Bacillus subtilis* resultó igual a 625 µg/ml. Las otras cepas fueron resistentes.

La CIM del control coincidió con el rango esperado (0,12-0,5. µg/ml)

b) Resultados de la actividad antifúngica

Se registraron en tabla solo aquellos extractos que mostraron actividad antifúngica (Tabla Nº 5).

Con el método por difusión en discos de papel, y en las condiciones de prueba no se observó inhibición sobre todas las cepas ensayadas con los extractos crudos de *Polygonum punctatum* Elliott.

No se observó actividad de los extractos sobre *Candida albicans* y *Aspergillus niger* por ninguno de los métodos de difusión empleados

Los extractos obtenidos de fruto y rama desecados por maceración con metanol no presentaron actividad en las condiciones de prueba.

TABLA Nº 5: Actividad antifúngica por difusión en pocillos de extractos crudos de *Polygonum punctatum* Elliot.

Ext. Nº	Conc. g/l	Mét. ext.	Partes de la planta	<i>Aspergillus parasiticus</i>	<i>Penicillium chrysogenum</i>	<i>Penicillium citrinum</i>
18	200	Mac.	Flor/s	R	9	9
21	200		Hoja/s	R	R	10
22	150	Soxhlet	Hoja, Flor y Fruto/s	9	R	R

Referencias: R = resistente.

DISCUSIÓN

El espectro de actividad de los extractos de *Polygonum punctatum* Elliot abarcó a bacterias Gram positivas y Gram negativas. Se observó actividad frente a las cepas *S. aureus*, *S. aureus* meticilino-resistente, *B. subtilis*, *A. lwoffii*, *E. coli* y *E. cloacae*.

No se observó actividad de los extractos frente a *S. epidermidis* y *S. faecalis* en las condiciones de prueba. Ello difiere de otros autores que emplearon procedimientos diferentes y resultaron sensibles. En forma coincidente con ellos, hubo inhibición frente a *A. lwoffii* y fueron inactivos con *P. aeruginosa* y *S. enteritidis* [8].

Se observó distinta distribución de los principios activos en las diferentes partes de la planta y con solven-

tes de polaridad variable. Los extractos de flor y fruto mostraron inhibición sobre bacterias Gram negativas y Gram positivas, y se amplió el espectro de acción de otros vegetales que se circunscriben únicamente a las bacterias Gram positivas [13].

En los extractos obtenidos con acetato de etilo el efecto inhibitorio se observó frente a el *S. aureus* y *B. subtilis*. La incapacidad de los principios activos de atravesar la membrana externa de los bacilos Gram negativos podría explicar la resistencia.

La falta de actividad antibacteriana de los extractos acuosos de *Polygonum punctatum* Elliot es coincidente con los encontrados con otras plantas obtenidos por decocción con agua y la atribuimos a diversas causas, entre ellas a la escasa solubilidad del o de los principios activos, al poco poder de extracción o a la inhibición de los principios activos por el calor al realizar la decocción [14].

Las altas cargas de los discos embebidos con los extractos crudos, cuando se lleva a cabo el método de difusión en nuestra experiencia y de otros estudios realizados con otras plantas, difieren sustancialmente con la de los antimicrobianos de uso clínico en donde es mucho menor [8, 13, 14, 15,16]. El mismo razonamiento podría aplicarse a los resultados obtenidos con la concentración inhibitoria mínima. La obtención de los principios bioactivos podría modificar esta situación.

La amplia variación de los efectos antifúngicos es difícil de dilucidar, porque no contamos con datos sobre la composición química de los extractos.

CONCLUSIONES

La actividad de los extractos crudos de *Polygonum punctatum* Elliot es amplia y variable. Está sujeta a cambios importantes tales como: parte de la planta empleada, método de extracción y polaridad del solvente.

Es posible seleccionar la actividad sobre bacterias Gram positivas o Gram negativas o ambas u hongos solamente.

Los resultados obtenidos justifican una propuesta a acotar las variables para obtener mayores logros.

AGRADECIMIENTOS

A las Dras. Marta Vergara y Marina Quiroga de la Cátedra de Bacteriología (C. Bioq.) Fac. Cs. Ex. Qcas. y Nat. UNaM, por el préstamo del multiinoculador Stern.

A las autoridades del Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico (Cidet). Fac. Cs. Ex. Qcas. y Nat. UNaM por el apoyo y atención brindados al proyecto de investigación.

REFERENCIAS

1. Cuesta, T. Medicina Tradicional. La apuesta de la OMS. The Ecologist para España Latinoamérica. Enero, 2003.
2. Plantas medicinales. Fitoterapia. [http: www. elergonomista.com/fitoterapia/ fitoterapia.htm](http://www.elergonomista.com/fitoterapia/fitoterapia.htm)
3. Si no tiene agua potable Julián no volvería a su comunidad. El Territorio. Misiones. 28 de setiembre de 2005.
4. Continúa el proyecto de plantas medicinales. [http: //www.territorioidigital.com/nota](http://www.territorioidigital.com/nota). 28 de setiembre de 2004.
5. Los fitomedicamentos misioneros son los únicos reconocidos en el país. El Territorio Misiones. p. 6. 26 de noviembre de 2005.
6. Gatusso, S. J. Las especies del Género *Polygonum* L (Polygoneaceae), presentes en la Argentina, utilizadas en medicina popular. Rojasiana. 4 (2): p. 118-245. 1998.
7. Ratera, E. L.; Ratera, M. O. Plantas de la Flora Argentina utilizadas en la medicina popular. Ed. Hemisferio Sur. p. 143. Buenos Aires. 1980.
8. De Battista, G.; Guida, A.; Bargardi, S. Estudio fitoquímico y actividad antibacteriana de *Polygonum punctatum* Elliot. Rev. Mexic. de Cs. Farmacéuticas. 35 (3): p 11-14. 2004.
9. Clinical And Laboratory Standards Institute (Formerly NCCLS). Publication M100-S15). Disk diffusion, Vol. 25 N° 1: p. 23-92. January 2005.
10. Clinical And Laboratory Standards Institute (Formerly NCCLS). Publication M100-S15). Disk diffusion, Vol. 25 N° 2: p. 94-170. January 2005.
11. Jerke, G. Microflora del té (*Camellia sinensis* L) O. Kutze en las distintas etapas de su procesamiento y expendio. Tesis de la maestría en Tecnología de los alimentos. Universidad Nacional de Misiones, 2005.
12. Pitt, J. L.; Hocking, A. D. Fungi and Food spoilage. 2° Ed. London-Wienheim-New York-Tokyo-Melbourne-Madras: Blackie Academic & Professional. 1997.
13. Negroni, R. Actividad inhibitoria "in vitro" de algunos antisépticos frente a cultivos de *Prototheca wickerhamii*. Revista Argentina de Micología. 22: p. 5-7. 1998.
14. Bargardi, S.; Kramer, F. L.; Medvedeff, M.; Jordá, G.; Guida, A. Actividad antibacteriana de *Peschiera australis* (Müell) Miers sobre *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*.

Rev. de Ciencia y Tecnología 4a . Año 4/ N° 4a / 2001:
p. 6-11. Fac. de Cs. Ex., Qcas y Nat. Univ.Nac. de
Misiones.

15. Arambewela, A.; Perera, A; Wijesundera, R. L. C.
The Volatile And Microbiological Studies On
Kaempheria Galanga, Hibiscus Abelmoschus, and

Piper Longum. Acta Horticulturae Número 501. Second
World Congress On Medicinal and Aromatic Plants For
Human Welfare Wocamp-2: p. 297-300. 1997.

16. Rossi, M. A.
Antimicrobianos. Módulo 4. Asociación Argentina de
Microbiología, p. 79- 85.

Rev. Cienc. Tecnol.

Año 8 / Nº 8 / 2006 / 12-17

CARACTERIZACIÓN DE AMINOPEPTIDASA N DE *STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS* TW43

Marguet, Emilio R.; Vallejo, Marisol; Pescuma, Micaela.

Facultad de Ciencia Naturales, Sede Trelew. Universidad Nacional de la Patagonia. Roca 115. (9100) Trelew. E-Mail: rmarguet@tw.unp.edu.ar

CHARACTERIZATION OF AMINOPEPTIDASE N FROM *STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS* TW43

ABSTRACT

Biochemical and kinetic characteristics of the general Aminopeptidase N (PepN) from *Streptococcus thermophilus* TW43 were studied. Maximal activity of the enzyme was determined at pH 6.8 and 40°C. Pep N was strongly inhibited by EDTA and o-phenanthroline. Therefore, it was considered to be a metallopeptidase. Imidazole partially inhibited enzyme activity suggesting histidine is one of the amino acids related to metal binding in the active site. Among the bivalent cations only Cu⁺⁺ exhibited slight inhibition while Co⁺⁺ increased enzymatic activity nearly fivefold. PepN remained active under ripening condition (pH 5.0 and 15°C) suggesting that *Streptococcus thermophilus* TW43 may contribute to flavor cheese development through its role in production of free amino acids.

KEYWORDS: Aminopeptidase N, *Streptococcus thermophilus*.

RESUMEN

Se estudiaron las características bioquímicas y cinéticas de Aminopeptidasa N (PepN) de *Streptococcus thermophilus* TW43. La máxima actividad de la enzima fue determinada a pH 6,8 y 40°C. El EDTA y la o-fenantrolina inhibieron fuertemente a PepN, en consecuencia se la consideró una metallopeptidasa. El imidazol inhibió parcialmente la actividad enzimática sugiriendo que la histidina es responsable de la unión del ión metálico en el sitio activo. Dentro de los cationes divalentes solo el Cu⁺⁺ exhibió una leve inhibición, mientras que el Co⁺⁺ aumentó la actividad enzimática aproximadamente cinco veces. La PepN se mantuvo activa bajo las condiciones de maduración sugiriendo que *Streptococcus thermophilus* TW43 puede contribuir al desarrollo del flavor en quesos a través de su función en la producción de aminoácidos libres.

PALABRAS CLAVE: Aminopeptidasa N, *Streptococcus thermophilus*.

INTRODUCCIÓN

Las bacterias ácido lácticas (BAL), en especial aquellas que se emplean en la elaboración de productos lácteos, exhiben numerosas auxotrofias para aminoácidos, que varían entre 4 y 14 dependiendo de la cepa [1]. Las caseínas, que constituyen más del 80% de las proteínas lácteas, contienen todos los aminoácidos esenciales exigidos por el metabolismo de las BAL, sin embargo, la concentración en forma libre que se encuentra en la leche solo permite alcanzar un 10-15 % de la máxima población [2, 3]. En consecuencia, para lograr en este medio un crecimiento óptimo, este grupo de bacterias depende de la capacidad de su sistema proteolítico para degradar las caseínas y proveerlas de los aminoácidos necesarios [4, 5].

Sobre la base de su función se puede separar al sistema proteolítico de las BAL en 3 componentes estructurales: a) una proteinasa asociada a la pared, responsable de la degradación inicial de las caseínas [6, 7], b) un sistema de transporte que importa al citoplasma los productos de la hidrólisis proteica a través de la membrana [8, 9, 10] y c) un grupo de peptidasas intracelulares [1].

El sistema de peptidasas intracelulares está involucrado en la hidrólisis de los péptidos exógenos derivados de la actividad enzimática de la proteinasa y posteriormente transportados al citoplasma por el sistema Opp [8]. Hasta la actualidad se logró la caracterización bioquímica y/o genética de al menos 16 peptidasas de BAL [1]. Estas enzimas exhiben una variada capacidad catalítica destacándose las aminopeptidasas generales por su amplia especificidad, característica que les permite proveer a la célula de aminoácidos esenciales para su posterior utilización en la síntesis de proteínas, generación de energía metabólica y recuperación de cofactores reducidos. En todas las especies de BAL, la Aminopeptidasa N (PepN) se considera la aminopeptidasa general más importante ya que cataliza más del 90% de la hidrólisis de los aminoácidos del extremo amino de los oligopéptidos que se originan por la degradación de la caseína [11, 12].

Streptococcus thermophilus es una BAL que se utiliza, en combinación con cepas del género *Lactobacillus*, en la elaboración de quesos duros, yogur y quesos blandos. La gran velocidad de acidificación de esta especie se considera una característica excluyente, pero posterga la posibilidad de estudiar otras propiedades fisiológicas que se aplican a la elaboración de productos lácteos. Debido a su particular estructura, la proteinasa de esta especie es poco activa [13], pero presenta una alta actividad de peptidasas intracelulares, especialmente de aminopeptidasas generales [14]. Se ha descrito en esta especie la

presencia de aminopeptidasas adicionales cuando se la compara con las exhibidas por el género *Lactococcus*, característica fisiológica que se comienza a estudiar en profundidad debido a la influencia que ejerce en la elaboración de quesos [15]. Se vincula su alta actividad degradativa de péptidos con la aceleración de la maduración [16, 17], la eliminación de sabores amargos [15] y el aumento de aminoácidos libres que actúan como sustratos para la formación de compuestos que influyen en el *flavor* [18].

En los últimos años se hacen intentos por combinar cepas de *St. thermophilus* con cepas de *Lactococcus* en fermentos que se destinan a la elaboración de quesos Cheddar y semiduros, buscando en estas experiencias complementar las características proteolíticas de ambas especies [16, 18, 19]. No obstante haber logrado resultados alentadores, aún falta resolver algunos problemas derivados de usar una combinación de cepas termófilas y mesófilas como la evolución de las poblaciones parciales durante la maduración, y el destino de la galactosa que se origina por el metabolismo de *St. thermophilus* [16].

En este trabajo se determinaron características bioquímicas y cinéticas de PepN de *St. thermophilus* TW43, cepa seleccionada por la alta actividad enzimática de peptidasas intracelulares exhibida [19]. El conocimiento de las características de esta enzima, particularmente en las condiciones de maduración, tiene por objetivo proveer información sobre una cepa que podría ser utilizada para conformar fermentos con cepas mesófilas en la elaboración de quesos semiduros.

MATERIALES Y MÉTODOS

Condiciones de cultivo y determinación de la actividad enzimática

La cepa de *St. thermophilus* TW43 utilizada en este estudio pertenece al cepario de bacterias ácido lácticas de la Cátedra de Biología Celular y Molecular (Facultad de Ciencias Naturales, sede Trelew, Universidad Nacional de la Patagonia). Luego de un período de incubación de 18 hs a 35°C en caldo MRS [20], el medio fue sometido a una centrifugación de 5000 g durante 5 min. Las células obtenidas fueron tratadas con cuentas de vidrio y vórtex durante 10 min, con el objeto de liberar su contenido citoplasmático. Luego de este tratamiento se centrifugaron los extractos celulares a 5000 g durante 5 min, y se determinó la actividad enzimática de los sobrenadantes utilizando leucina-*p*-nitroanilina como sustrato [11].

La mezcla de reacción contenía 100 µl de sustrato (10 mg/ml), 100 µl de sobrenadante y 700 µl de buffer fosfato de Na 0,1 M, pH 6,8. Luego del período de incu-

bación, la reacción se detuvo con 100 μ l de ácido acético. La densidad óptica fue determinada en espectrofotómetro a 405 nm y los cálculos se realizaron utilizando una curva patrón de *p*-nitroanilina [12].

Determinación del pH óptimo

La actividad enzimática de los sobrenadantes fue ensayada desde pH 5,0 hasta 8,6 y se utilizó buffer acetato de Na 0,1M en el rango 5,0-6,4; buffer fosfato de Na 0,1M en el rango 6,8-7,6 y buffer Tris-HCl 0,1M en el rango 7,8-8,6.

Determinación de la temperatura óptima

La actividad enzimática de los sobrenadantes fue ensayada, a pH óptimo, a 15, 20, 25, 30, 35, 40 y 45°C.

Determinación de K_m y Velocidad Máxima (V_{max})

El K_m y la V_{max} se determinaron en las condiciones óptimas de pH y temperatura, utilizando la gráfica de Lineweaver-Burk [21]. Los cálculos de los parámetros cinéticos se realizaron utilizando la ecuación de la recta obtenida en la línea de tendencia. La V_{max} se expresó como la cantidad de μ moles de *p*-nitroanilina producidos por minuto por miligramo de proteína.

Estudios de inhibición

Los sobrenadantes se incubaron durante 10 min a 37°C en presencia de EDTA, *o*-fenantrolina y fenilmetilsulfonil fluoruro (PMSF) a una concentración final de 1 mM. Luego del período de incubación con los inhibidores, se determinó la actividad enzimática como se describió previamente en un rango de pH 5-8,6.

La influencia de cationes metálicos se estudió bajo las mismas condiciones y a concentraciones finales de 0,1 mM y 1 mM.

El efecto inhibitorio del imidazol se realizó a una concentración de 0,1 M. y la actividad se determinó en el rango de pH 6,4-7,8.

Determinación de la concentración de proteínas

La concentración de proteínas de los sobrenadantes se determinó por el método de Bradford utilizando albúmina bovina como estándar [22].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como se observa en la Figura 1, PepN de *St. thermophilus* TW43 se mantuvo activa dentro del rango de pH 5,0 y 8,6; exhibiendo la máxima actividad a pH 6,8. Este valor revela una leve diferencia con respecto a otros trabajos donde la máxima capacidad catalítica fue deter-

minada a pH 6,5 [23] y 7 [11, 24]. Se observa, en este caso en particular, una marcada reducción de la actividad de la enzima cuando los ensayos se realizan aumentando o disminuyendo levemente el pH óptimo.

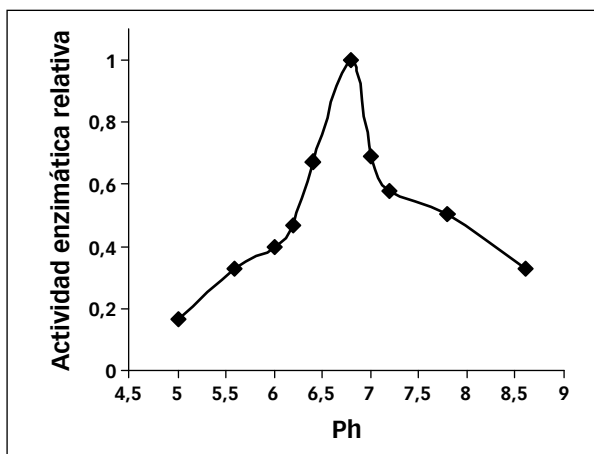


FIGURA 1. Efecto del pH sobre la actividad de Aminopeptidasa N de *Streptococcus thermophilus* TW43.

La enzima se mantuvo activa a pH 5, propiedad importante desde el punto de vista biotecnológico ya que esta es una de las condiciones impuestas durante la maduración de quesos. En este proceso, el número de células viables de BAL atrapadas en la masa casearia comienza a declinar y se produce, después de la muerte celular, una autólisis que permite a las peptidasas citoplasmáticas difundir dentro de la estructura del queso y continuar la degradación de los péptidos originados por la acción de las proteinasas [25].

La temperatura óptima de la enzima, determinada a pH 6,8, fue 40°C (Figura 2), este resultado coincidió con lo descrito en trabajos previos [11, 23, 24]. A 15°C, desarrolló una actividad remanente de 16%, lo que significa que PepN puede llevar a cabo su acción degradativa a

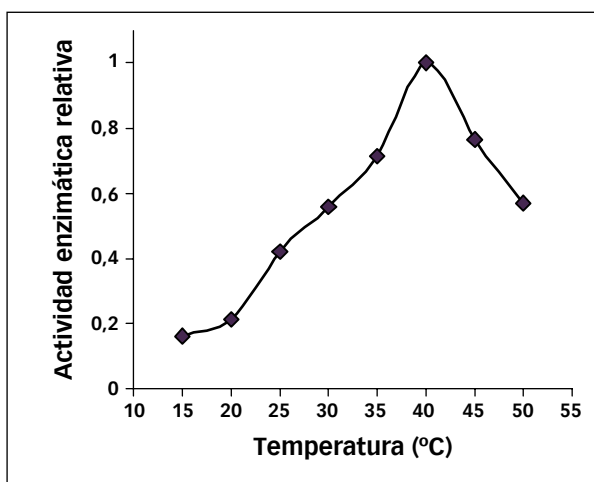


FIGURA 2. Efecto de la temperatura sobre la actividad de Aminopeptidasa N de *Streptococcus thermophilus* TW43.

la temperatura habitualmente seleccionada en la cámara de maduración. La actividad relativa a 50°C superó el 50%, característica significativa teniendo en cuenta que *St. thermophilus* es utilizado en la elaboración de quesos duros; variedad que, luego del desuerado, es sometida a un proceso de cocción a la temperatura citada [26].

Los parámetros cinéticos, determinados a pH y temperatura óptimos, dieron como resultados para K_m y V_{max} valores de 1,49 mM y 1.31 $\mu\text{moles/min}\cdot\text{mg}$ respectivamente. El valor de K_m obtenido es comparable con los hallados por otros autores y denota una afinidad más baja por el sustrato utilizado que la manifestada por otros representantes de BAL [12, 19]. Sin embargo la V_{max} bajo las mismas condiciones de ensayo, resultó superior a las determinadas en otras cepas de *St. thermophilus* y especies de BAL [19].

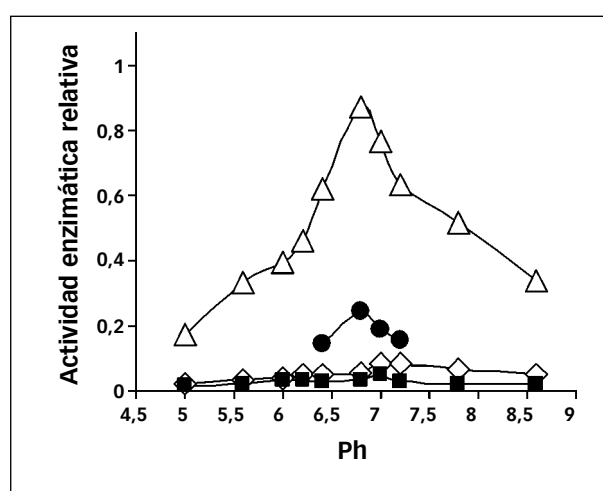


FIGURA 3. Efecto de inhibidores sobre la actividad de Aminopeptidasa N de *Streptococcus thermophilus* TW43. Referencias: ■ = EDTA, ● = Imidazol, △ = PMSF, ◇ = o-Fenantrolina.

La actividad enzimática no fue alterada en el rango de pH 5-8,6 cuando los ensayos se realizaron en presencia de PMSF (Figura 3), resultado que indica que no se trata de una serino-proteasa. Por el contrario o-fenantrolina y EDTA, ambos agentes quelantes, inhibieron la capacidad catalítica de la enzima en el rango de pH ensayado y, en consecuencia, PepN puede clasificarse como aminopeptidasa metalodependiente.

También se estudió la influencia de imidazol sobre PepN, a pesar de no ser considerado un inhibidor específico de proteasas o peptidasas. La experiencia se realizó entre pH 6,4-7,2, rango cercano al pKa (6,95) y como se observa en la Figura 3 se produce un descenso significativo de la actividad enzimática. Este fenómeno se debe a que el imidazol se comporta como un análogo de la histidina y, en consecuencia, interfiere en la función de este aminoácido que, como sucede en otras metaloenzimas, está comprometido con la unión de Zn^{++} en el

sitio activo.

La influencia de los cationes divalentes se estudió a concentraciones 0,1 mM y 1 mM, en condiciones óptimas de pH y temperatura. Como se observa en la Tabla 1, el Cu^{++} fue el único catión que exhibió una inhibición parcial de la capacidad catalítica, resultado que coincide con lo expuesto por otros autores, aunque en estos casos el efecto se manifestó en forma más evidente [11, 23, 24]. Los cationes Zn^{++} , Mg^{++} , Fe^{++} , Mn^{++} y Ca^{++} cuando la experiencia se realizó a 0,1 mM, aumentaron la actividad enzimática de PepN, este fenómeno se repitió, a excepción de Ca^{++} , cuando los ensayos se llevaron a cabo a 1mM.

TABLA Nº 1: Efecto de cationes divalentes sobre la actividad de Aminopeptidasa N de *Streptococcus thermophilus* TW43.

Cación	Actividad Relativa (%)	
	0,1 mM	1 mM
Control	100	100
Zn^{++}	143,2	99,7
Co^{++}	472,2	540,1
Mg^{++}	111,5	105,6
Cu^{++}	80,1	79,4
Fe^{++}	126,9	120,1
Mn^{++}	120,2	111,2
Ca^{++}	115,9	83,38

El Co^{++} exhibe resultados contradictorios según los distintos autores; mientras que para Motoshima y col. [23] actúa aumentando levemente la actividad enzimática, para Rul y col. resulta un potente inhibidor [24]. En el caso particular de PepN de *St. thermophilus* TW43, el Co^{++} aumentó la actividad de la enzima aproximadamente 5 veces en las 2 concentraciones ensayadas.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo indican que PepN de *St. thermophilus* TW43 se trata de una enzima con características bioquímicas similares a las descritas por otros autores [11, 23, 24]. Sin embargo, su alta actividad enzimática, comparada con la obtenida en otras cepas y especies [19], resulta un rasgo de interés para su aplicación en la elaboración de quesos. Además manifiesta, en las condiciones de maduración (pH 5,0 y 15 °C), una actividad remanente suficiente como para continuar con el proceso degradativo de sustratos específicos e influyendo en la calidad final del producto.

La presencia del ión Co^{++} ejerce una gran influencia en la actividad de la enzima estudiada. La alta afinidad de la proteína por el catión y/o la influencia que este ejerce en el sitio activo sugiere algunos cambios en su secuencia de aminoácidos [23].

Este trabajo fue realizado en el marco del proyecto

PICTR 2002 n° 00063 financiado por la Agencia de Promoción Científica y Tecnológica.

BIBLIOGRAFÍA

1. Christensen, J. E.; Dudley, E. G.; Pedersen J. A.; Steele, J. L. 1999. Peptidases and catabolism in lactic acid bacteria. *Antonie Leeuwenhoek*, 76:217–246.
2. Juillard, V.; Guillot, A.; Le Bars D.; Gripon, J. C. 1998. Specificity of milk peptide utilization by *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 1230–1236.
3. Juillard, V.; Le Bars, D.; Kunji, E. R. S.; Konings, W. N.; Gripon, J. C.; Richard, J. 1995a. Oligopeptides are the main source of nitrogen for *Lactococcus lactis* during growth in milk. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:3024–3030.
4. Poolman, B.; Kunji, E. R. S.; Hagting, A.; Juillard, V.; Konings, W. N. 1995. The proteolytic pathway of *Lactococcus lactis*. *J. Appl. Bacteriol. Symp. Suppl.* 79:65–75.
5. Pritchard, G. G.; Coolbear, T. 1993. The physiology and biochemistry of the proteolytic system in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 12:179–2.
6. Kok, J.; de Vos, W. M. 1994. The proteolytic system of lactic acid bacteria en: *Genetics and biotechnology of lactic acid bacteria*. M. J. Gasson y W. M. de Vos (ed.), Chapman & Hall, Ltd., London. P. 169–210.
7. Kok, J. 1990. Genetics of the proteolytic system of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 87:15–42.
8. Kunji, E. R. S.; Hagting, A.; de Vries, C. J.; Juillard, V.; Haandrikman, A. J.; Poolman, B. 1995. Transport of β -casein-derived peptides by the oligopeptide transport system is a crucial step in the proteolytic pathway of *Lactococcus lactis*. *J. Biol. Chem.* 270:1569–1574.
9. Kunji, E. R. S.; Smid E. J.; Plapp, R.; Poolman, B.; Konings, W. N. 1993. Di-tripeptides and oligopeptides are taken up via distinct transport mechanisms in *Lactococcus lactis*. *J. Bacteriol.* 175:2052–2059.
11. Chavagnat F.; Casey, M. G.; Meyer J. 1999. Purification, characterization, gene cloning, sequencing, and overexpression of Aminopeptidase N from *Streptococcus thermophilus* A. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:3001–3007.
12. Niven G.; Holder, S. A.; Stroman, P. 1995. A study of substrate specificity of aminopeptidase N from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* Wg2. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 44:100–105.
13. Fernandez-Espla M.; Garault P.; Monnet, V.; Rul, F. 2000. *Streptococcus thermophilus* cell-wall anchored proteinase: release, purification, and biochemical and genetic characterization. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 4772–4778.
14. Letort C.; Nardi, M.; Garault, P.; Monnet, V.; Juillard, V. 2002. Casein utilization by *Streptococcus thermophilus* results in a diauxic growth in milk. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:3162–3165.
15. Rul F.; Monnet, V. 1997. Presence of additional peptidase in *Streptococcus thermophilus* CNRZ 302 compared with *Lactococcus lactis*. *J. Appl. Microbiol.* 82:695:704.
16. Michel V.; Martley, F. 2001. *Streptococcus thermophilus* in Cheddar cheese. Production and fate of galactose. *J. Dairy Res.* 68:317–325.
17. Wilkinson, M. G. 1996. Acceleration of cheese ripening en: *Cheese: chemistry, physics and microbiology*, vol. 1, P. F. Fox ed. London. P. 523–555.
18. Gomez, M. J.; Gaya, P.; Nunez, M; Medina, M. 1998. *Streptococcus thermophilus* as adjunct culture for a semi-hard cows' milk cheese. *Lait* 78:501–511.
19. Marguet, E. R. 2004. Actividad enzimática de proteinasas lácticas sobre caseínas ovinas. Tesis doctoral.
20. De Man J.; Rogosa, M; Sharpe, M. E. 1960. A medium for the cultivation of lactobacilli. *J. Applied Bact.* 23:130–135.
21. Philips, A. T. 1994. Enzymatic activity en *Methods for general and molecular bacteriology*. P. Gerhardt, R. G. E. Murray, W. A. Wood, N. R. Krieg ed. Washington D. C., P.555–605.
22. Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248–254.
23. Motoshima H.; Shiraishi, T.; Tsukasaki, F.; Kaminogawa, S. 2003. Purification, characterization, and gene cloning of lisyl aminopeptidase from *Streptococcus thermophilus* YRC001. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67(4):772–782.
24. Rul F.; Monnet, V.; Gripon, J. C. 1994. Purification and characterization of a general aminopeptidase (St-PepN) from *Streptococcus*

salivarius ssp. *thermophilus* CNRZ 302. J. Dairy Sci. 77:2880–2889.

25. McSweeney P.; Sousa, J.

2000. Biochemical pathway for the production of flavour compounds in cheese during ripening: A review.

Lait 80:293-324.

26. Battistotti, B.; Corradini, C.

1996. Italian cheese en Cheese: chemistry, physics and microbiology, vol. 2, P. F. Fox ed. London, p. 221-245.

Rev. Cienc. Tecnol.

Año 8 / Nº 8 / 2006 / 18-21

PRESENCIA DE *Aedes aegypti* LINNEO, 1762 (CULICIDAE, DIPTERA, INSECTA) EN EL CEMENTERIO "LA PIEDAD", POSADAS, MISIONES, ARGENTINA. (2003-2004).

^{1,2}Tricio, Aída E.; ¹Morawicki, Patricia M.; ¹Tolosa, Ezequiel; ¹Martina, Pablo; ²Sarlej, María I.; ¹Walantus, Horacio L.; ^{1,2}Fernández Díaz, Cecilia I.

¹Programa de Investigación Entomología de Misiones; CIDEt, F.C.E.Q. y N., U.Na.M. ²Cátedra de Ecología General, F.C.E.Q. y N., U.Na.M. Laboratorio Nº 20. Facultad de Ciencias Exactas Químicas y Naturales, Félix de Azara Nº 1552, Posadas, CP (3300), Misiones. Universidad Nacional de Misiones, Argentina. ecologia@fceqyn.unam.edu.ar.

PRESENCE OF *Aedes aegypti* (LINNEO, 1762) AT THE MUNICIPAL CEMETERY IN THE CITY OF POSADAS, MISIONES, ARGENTINA

ABSTRACT

The purpose of this work was to determine the presence and seasonal variation of *Aedes aegypti* in a specific area of the city of Posadas, Misiones, Argentina. Sampling was conducted in the municipal cemetery (La Piedad) from August 2003 to September 2004.

The methodology consisted of systematic sampling of three different areas once a month. These areas were carefully selected on the basis of diverse habitats for the development of mosquitoes. The three sampling areas, designated as A; B; and C, were: 1) under-roof; 2) direct sun exposure; and 3) under tree shade. Water containers were placed in each area and the evaporated water was replaced only in the containers placed under-roof. Larvae were collected in the 4th state of development and transported immediately to the lab where they were identified using taxonomic keys (Rossi, 2000 and Consoli & Laurenço de Olivera, 1994).

Aedes aegypti was recorded during 13 months out of 14. It was completely absent during September 2003. Along the course of the experiment, pH in the water containers, ranged from 4.6 to 10.5 and temperatures from 6.5 °C to 37.5 °C.

The area with best development of *Aedes aegypti* was area C which accounted for 51.2% of the total *Aedes aegypti* and 48.7% of the total larvae collected.

KEYWORDS: *Aedes aegypti*, larva, cemetery, dengue.

RESUMEN

Esta investigación se realizó en el cementerio municipal "La Piedad" de la ciudad de Posadas desde agosto de 2003 a septiembre de 2004, con el propósito de determinar la presencia y la variación estacional de *Aedes aegypti*.

La metodología empleada fue el muestreo sistemático, seleccionando 3 zonas del lugar por presentar características de hábitat diferenciales: bajo techo, a sol directo y a la sombra denominadas A, B y C respectivamente.

Fueron colectadas larvas de 4° estadio de los diversos recipientes y trasladadas al laboratorio, donde se identificaron taxonómicamente usando claves dicotómicas.

De los 14 meses estudiados, *Aedes aegypti* fue registrado durante 13 meses (93%), ausente en septiembre del 2003. El rango de pH en los recipientes positivos (aquellos que contenían larvas) fue de 4.6 a 10.5 y las temperaturas desde 6.5°C a 37.5°C.

El área con más éxito reproductivo para el vector fue la zona "C" (con sombra) con el 51,2 % del total de larvas de *Aedes aegypti* y el 48,73 % del total de larvas colectadas.

PALABRAS CLAVES: *Aedes aegypti*, larvas, cementerio, Dengue, Misiones, Argentina.

INTRODUCCIÓN

La Ciudad de Posadas, capital de la Provincia de Misiones, está situada a los 27° 23' latitud Sur y a los 55° 53' longitud Oeste. El clima que caracteriza a esta región es subtropical y sin estación seca. Las precipitaciones son abundantes (1.500 a 2.000 mm anuales). Dada su posición geográfica posee una temperatura promedio entre 20 y 30 grados centígrados, en la mayor parte del año. [1]

Estas características hacen del lugar el hábitat ideal para la presencia y desarrollo de innumerables artrópodos, entre los cuales podemos destacar Dípteros de importancia sanitaria, tales como *Aedes aegypti*. Este puede transmitir (en forma natural o experimental) 5 especies de protozoos, 20 especies de filarias y 103 tipos de arbovirus. Entre los virus que transmite esta especie se encuentran el de la Fiebre amarilla urbana y el Dengue clásico o hemorrágico. [2]

Aedes aegypti es nativo del viejo mundo y probablemente fue introducido a América desde África occidental durante el tráfico de esclavos entre los siglos XV y XVII. Hoy es considerado un mosquito cosmopolita, con ocurrencia principalmente en regiones tropicales y subtropicales. [3]

Como consecuencia de un Programa continental de erradicación coordinada por la Organización Panamericana de la Salud, en la década del 40 la Región Austral de nuestro continente fue considerada libre de la presencia del mosquito *Aedes aegypti*. Entre 1954 y 1957 la Argentina certificó la ausencia del vector. Hasta su nueva detección en la Provincia de Formosa (Clorinda y Pilcomayo) y en Misiones (Posadas y Puerto Iguazú) en 1986. En 1991 fue hallado en Quilmes, provincia de Buenos Aires, 1994 en las Provincias de Jujuy, Salta y Tucumán; en 1995 en Córdoba y en las Provincias de Corrientes, Chaco, Santa Fe y entre Ríos en 1998. [4]

Epidemias de Dengue clásico y hemorrágico se han registrado en varios países de América Central y del Sur en las últimas tres décadas, inclusive en la Argentina se comprobaron casos de dengue clásico desde 1997 [5].

Debido a los hábitos antropofílicos del vector es encontrado en cascos urbanos generalmente dentro de recipientes artificiales (neumáticos, botellas, canaletas, latas y floreros) o naturales (huecos de árboles, axilas de las plantas).

El hábito cultural de la población humana de colocar floreros hacen de los cementerios lugares propicios para el desarrollo de mosquitos, entre ellos *Aedes aegypti*.

Las hembras son en general de hábitos diurnos, preferentemente oviponen en las paredes de los recipientes, pudiendo llegar a 100 huevos por postura. Prefieren las

aguas quietas y limpias; el ciclo dura de 7 a 15 días dependiendo de las temperaturas, los huevos pueden resistir periodos desfavorables. [3].

El trabajo se realizó en el predio del Cementerio municipal "La Piedad" de la ciudad de Posadas, Chacra 60, delimitado por las Avenidas: Santa Catalina (E), Tomás Guido (O), Almirante Brown (N) y Cabred (S), que se halla incluido en el casco urbano de dicha ciudad.

El objetivo de este trabajo fue observar la presencia y variación estacional de *Aedes aegypti* a partir de la búsqueda sistemática de larvas en floreros de distintas características y lugares.

MATERIALES Y MÉTODOS

El Cementerio Municipal consta de un área de 16 hectáreas, rodeada de muros de aproximadamente 4 metros de alto, con nichos periféricos, tumbas y panteones en la zona central.

La gran cantidad de floreros y las fluctuaciones del nivel de agua de los mismos brindan las condiciones óptimas para el desarrollo del vector. El agua de los recipientes es provista naturalmente por las precipitaciones o de forma artificial por los visitantes.

Se eligieron 3 subunidades de muestreo por presentar particularidades distinguibles:

Zona A: comprende los nichos en los paredones ubicados hacia el oeste y el norte, protegido por una galería o techo, el único aporte de agua a los recipientes es de forma artificial.

Zona B: abarca un sector de tumbas a cielo abierto, en el centro del cementerio.

Zona C: constituye otro sector de tumbas cubiertas por árboles de mediana altura que las protegen de la incidencia del sol directo ubicada más al este y sur con respecto a las otras dos zonas.

En las zonas B y C la reposición de agua son de forma natural y artificial.

Durante el período que abarcó agosto de 2003 a septiembre de 2004, se realizó un muestreo mensual sistemático, registrándose solamente floreros que contenían agua.

Durante cada una de las visitas sistemáticas realizadas al lugar de estudio, se revisaron entre 105 a 205 recipientes, de los que se evaluaron y registraron las siguientes características: tipo de recipiente, presencia de materia orgánica, turbidez del agua, sedimento, temperatura ambiente. En los floreros positivos, es decir los que contenían larvas, se registró además: temperatura del agua y pH (Testr3-Oakton resolución 0.01). Se colectaron las larvas de 4to estadio, mediante el uso de coladores

y pipetas plásticas. La turbidez del agua se registró observando la mano del colector a través de un recipiente transparente y asumiendo una escala de valores de 1 a 4, 1 transparente, 2 y 3 valores intermedios y 4 opaco. Se denominó recipientes oscuros a todos aquellos que con agua limpia no dejaban ver la mano del colector.

Las muestras fueron fijadas en el laboratorio con A.G.A (alcohol, ácido acético, agua destilada y glicerina en una proporción 9:1:4:1 respectivamente); y se identificaron utilizando las claves diseñadas por Rossi G. C. [6] y Consoli & Laurenço de Olivera R. [3].

Las larvas clasificadas se agruparon en dos categorías: *Aedes aegypti* y "otras larvas" que involucraban a otros géneros y especies. Los individuos del género *Culex* se determinaron hasta el nivel de género.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El total de larvas colectadas entre agosto del 2003 y septiembre del 2004 fue de 1163; de las cuales 551 *Aedes aegypti* (47.37 %) y 612 "otras larvas" que fueron determinadas como *Culex sp.* y *Ochlerotatus fluviatilis*.

La presencia de *Aedes aegypti* se registró de manera casi continua a excepción de septiembre del 2003 (Figura N° 1). El número de larvas de *Aedes aegypti* para las 3 zonas en conjunto tiene una tendencia a disminuir en el periodo de mayo a julio del 2004, colectándose solamente una larva en este último mes. Desde octubre del 2003 hasta abril del 2004 se registró un aumento en su número, con una leve disminución en marzo de 2004 y alcanzando su registro máximo de 102 individuos en abril del mismo año.

La presencia estacional restringida de *Aedes aegypti* descrita en trabajos similares realizados en otros pun-

tos geográficos del país por investigadores, tales como: Campos, R. E. en Quilmes, Bs. As.; Domínguez, M. C. en Córdoba capital; y García, J. J. en La Plata. [7], [5], [8], no coincide con la dinámica observada para el mismo vector en el presente trabajo dado que registramos la presencia de larvas a lo largo de todo el periodo de muestreo, no observándose diapausa invernal ni estival. Las temperaturas registradas fueron desde 6.5° C a 37.5° C.

El comportamiento de esta población no coincide con lo registrado en las poblaciones de otras especies. En ningún momento se observó que *Aedes aegypti* y la categoría "otros" coincidieran en su máxima expresión. *Aedes aegypti* aparece en mayor número en abril del 2004, mientras que las larvas de la categoría "otros" muestran su mínima expresión.

En el lugar de estudio las temperaturas mínimas no serían el factor limitante para el desarrollo de los Culicidos. Sin embargo, las temperaturas máximas provocando evaporación elevada y las escasas precipitaciones sí influirían reduciendo el número de criaderos posibles y con ello el número de mosquitos encontrados.

En los meses de enero a marzo y coincidiendo con las mayores temperaturas, la zona A y C muestran números elevados de larvas, no así la zona B con sol directo, esto se debería a que ocurre una mayor evaporación a causa de las temperaturas elevadas. (Figura N° 2).

El total de recipientes con agua analizados fueron 1990, de estos 210 (10,55%) contenían larvas, 126 (60%) fueron positivos para *Aedes aegypti*, mientras que en los 84 restantes se identificaron otras especies de Culicidos.

Se encontraron asociados en el mismo recipiente (8) *Aedes aegypti* y *Culex sp.* en un 3,8%; *Aedes aegypti* y *Ochlerotatus fluviatilis* en el 2,4% (5) y solamente en una ocasión se encontró una triple asociación (*Aedes ae-*

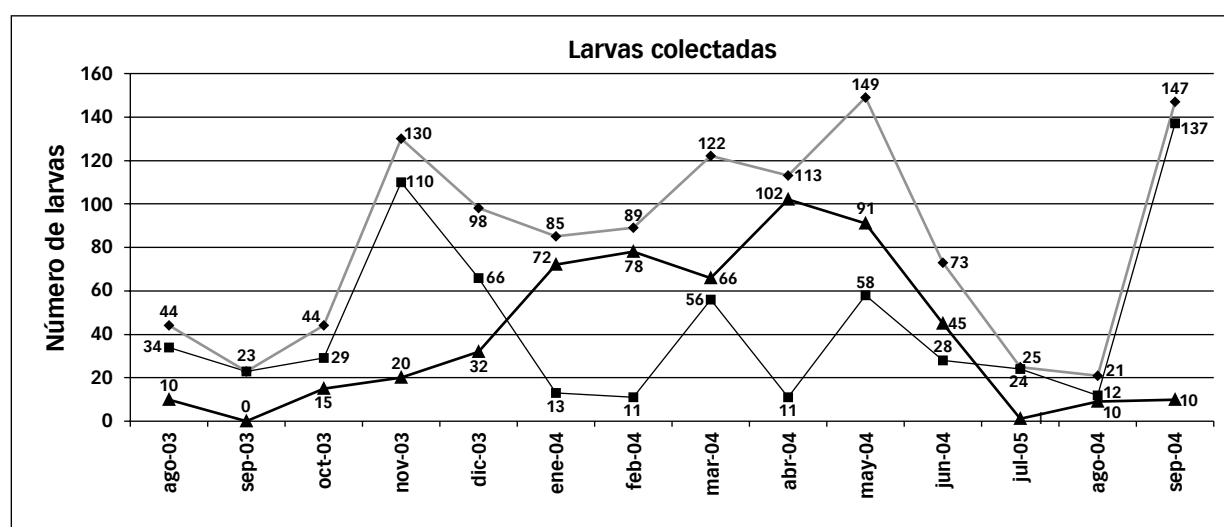


FIGURA 1. Número total de larvas colectadas entre agosto/03 y septiembre/04. ▲ = larvas *Aedes Aegypti*, ■ = otras larvas, ● = larvas totales.

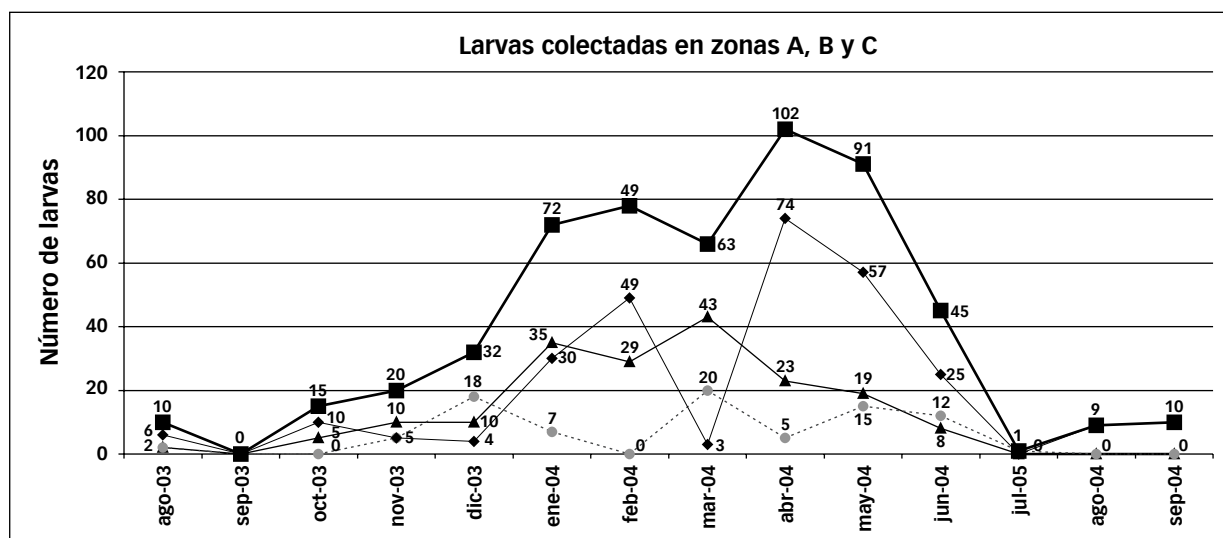


FIGURA 2. Distribución de larvas de *Aedes aegypti* colectadas en las tres zonas. ▲ = Zona A, ● = Zona B, ◆ = Zona C, ■ = larvas totales *Aedes aegypti*.

gypti, *Ochlerotatus fluviatilis* y *Culex sp.*). No se registró que *Ochlerotatus fluviatilis* y *Culex sp* compartieron el mismo florero.

Las larvas de *Culex sp.*, encontradas en 76 recipientes representan el 36%.

Aedes aegypti mostró una marcada preferencia por los recipientes oscuros (Tipo 4) con el 64,2% de los casos sin tener en cuenta el tipo de material. (Tabla N° 1).

Teniendo en cuenta la distribución total del número de larvas según las zonas se encontraron 184, 85 y 282 en A, B y C respectivamente.

En la zona A (bajo techo) los meses de mayor registro de *Aedes aegypti* fueron de noviembre a mayo, siendo significativa la presencia del vector *Aedes aegypti* con relación a las otras zonas en los meses de noviembre/03 y marzo/04.

En la zona B (bajo la incidencia de sol directo) los máximos registros se observaron en diciembre/03, marzo, mayo y junio/04. En comparación con la zona A y C predomina en el mes de Diciembre/03 coincidiendo con el aumento de las precipitaciones.

En la zona C se registraron los mayores números en el período entre Enero a Junio/04, con excepción de Marzo. En los meses febrero, abril y mayo/04 se registraron los picos máximos. (Figura N° 2).

Aedes aegypti mostró preferencias por ambientes sombríos y recipientes oscuros, siendo más abundante en la zona de tumbas cubiertas por árboles de mediana altura protegidos del sol directo (Zona C) y con reposición de agua natural y artificial.

CONCLUSIONES

Las lluvias renuevan los reservorios de agua y el

hábito cultural de los visitantes en la utilización de floreros con agua colaboran con el mantenimiento de los criaderos.

Dadas las diferencias de hábitat dentro del cementerio municipal "La Piedad", *Aedes aegypti* encuentra las condiciones que permiten su reproducción durante el año. Al presentarse como desfavorable alguna de las zonas, el vector posee otro hábitat alternativo para mantenerse presente.

TABLA N° 1: Comparación de recipientes positivos oscuros y transparentes para *Aedes aegypti*.

Mes	Recipientes Transparentes			Recipientes Oscuros		
	Zona A	Zona B	Zona C	Zona A	Zona B	Zona C
ago-03	0	0	0	1	1	2
sep-03	0	0	0	0	0	0
oct-03	1	0	0	0	0	1
nov-03	1	0	0	1	2	3
dic-03	0	3	1	1	0	1
ene-04	2	0	3	4	4	6
feb-04	2	0	7	3	0	4
mar-04	2	0	1	1	4	1
abr-04	4	0	3	2	3	9
may-04	3	1	7	0	4	8
jun-04	2	0	1	0	3	7
jul-04	0	1	0	0	0	0
ago-04	0	0	0	0	0	2
sep-04	0	0	0	0	0	3
Totales	17	5	23	13	21	47
TOTAL	45			81		

Teniendo en cuenta estos resultados, la distribución temporoespacial del mosquito y las condiciones ambientales para el desarrollo del vector del Dengue sería conveniente que se refuercen los programas de monitoreo, vigilancia y control propuestos por la OPS en 1988, 1990 y 1998 [4].

AGRADECIMIENTOS

Se agradece la colaboración de la Directora del Área Descentralizada de la Municipalidad de Posadas Sra. Itatí Leguizamón por posibilitarnos el desarrollo de la investigación.

Y a las siguientes instituciones: a) Servicio Meteorológico Nacional por brindarnos los datos meteorológicos del Aeropuerto Posadas, b) Estación Experimental INTA Cerro Azul por facilitarnos los datos meteorológicos de la Regional Misiones en el campo Zaimán de Posadas. ●

Culicidae) en Córdoba capital. Revista de la Sociedad Entomológica Argentina. ISSN 0373-5680, volumen 59 (1-4). P 41-50. 2000.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Margalot, J. A.

Geografía de Misiones. Industria Gráfica El Libro, Buenos Aires. Pág. 27-33. 1994.

2. Schweigmann, N.; Orellano, P.; Curu, C. J.; Vera, T. M.; Vezzani, D.; Mendez, A.

Distribución y abundancia de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) en la Ciudad de Buenos Aires. Enfermedades transmisibles. Publicación monográfica 2. ISBN 987 – 2042 -0-1.

3. Consoli, R.; Olivera, R.

Principais mosquitos de importancia sanitaria no Brasil. Editora Fiocruz. Rio de Janeiro - Brasil. ISBN 85-85676-03-5. 1994C.

4. Curto, S. I.; Boffi, R.; Carbajo, A. E.; Plastina, R.; Schweigmann, N.

Reinfestación del territorio argentino por *Aedes aegypti*. Distribución geográfica (1994 – 1999). Enfermedades transmisibles. Publicación monográfica 2. ISBN 987 – 2042 -0-1.

5. García, J. J.; Micieli, M. V.; Achinelly, M. F.; Gerardo, A. M.

Establecimiento de una población de *Aedes aegypti* L. en La Plata, Argentina. Serie Enfermedades transmisibles Publicación monográfica 2. ISBN 987 – 20421 – 0- 1. P. 149 – 153. 2002.

6. Rossi, G. C.

Clave para larvas de cuarto estadio. Modificada de Zavortink, 1979, Darsie, 1985 y Service, 1993. CEPAVE (16- 10-2000).

7. Campos, R. E.; Macia, A.

Observaciones biológicas de una población natural de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) en la provincia de Buenos Aires, Argentina. Revista de la Sociedad Entomológica Argentina. ISSN 0373-5680, volumen 55 (1-4). P 67-72. 1996.

8. Domínguez, M. C.; Ludueña, Almeida F.; Almirón, W. R.

Dinámica poblacional de *Aedes aegypti* (Diptera:

Rev. Cienc. Tecnol.

Año 8 / Nº 8 / 2006 / 23-30

VALORACIÓN MICROBIOLÓGICA Y CONTROL HIGIÉNICO-SANITARIO DE MEDICAMENTOS COMERCIALIZADOS SIN FISCALIZACIÓN EN POSADAS

Ybarra, Liliana R.; Bordenave, Sylvia A.; Semczuk, Rosaura I.; Duce, Jorge A.; Von Specht, Martha H.
lybarra@fceqyn.unam.edu.ar; sab@fceqyn.unam.edu.ar; rosses24@yahoo.com.ar; joduce@fceqyn.unam.edu.ar; marthatovs@yahoo.com.ar.

Cátedra de Microbiología de Farmacia. Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales. UNaM.
Félix de Azara 1552. Posadas, Misiones.

MICROBIOLOGICAL EVALUATION AND HYGIENIC-SANITARY CONTROL OF MEDICINES MARKETING WITHOUT CONTROL IN POSADAS

ABSTRACT

The aim of this work was to determine the hygienic quality of drugs by means of the enumeration of mesophilic aerobes, total coliforms, molds and yeast, and to detect pathogen microorganisms in pharmaceutical products following techniques of the Food and Drugs Administration (FDA). These products come from Paraguay, Brazil and Uruguay and are purchased by poor people at street stands.

Medicines from a manufacturing plant in Posadas- Misiones, delivered at the public hospital and health centers were also analysed.

Pharmaceutical products from categories 1, 2 and 3 from ANMAT (National Administration of Medicines, Food and Technology) were also evaluated.

The results obtained showed that such products did not exceed the microbiological standards established by the National Institute of Drugs (INAME) and by ANMAT. No pathogens microorganisms were detected in the analyzed products.

KEYWORDS: pharmaceutical products, hygienic quality, microbiological controls, antibiotic evaluation.

RESUMEN

El propósito de este trabajo fue determinar la calidad higiénica a través de la enumeración de aerobios mesófilos, coliformes totales, hongos y levaduras, la detección de microorganismos patógenos en productos farmacéuticos siguiendo técnicas de la Administración de Alimentos y Drogas (FDA) y la valoración de antibióticos obtenidos del comercio ilegal y del sistema provincial de salud. Estos productos provienen de Paraguay, Brasil y Uruguay y son adquiridos por la población de escasos recursos en puestos callejeros, se analizaron además productos de una planta elaboradora local.

Productos farmacéuticos de las categorías 1, 2 y 3 dispuestas por la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT), también fueron evaluados. Los resultados hallados no superaron los estándares microbiológicos establecidos por el Instituto Nacional de Medicamentos (INAME) y la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT). No se detectó presencia de patógenos en ninguno de los productos analizados.

PALABRAS CLAVES: productos farmacéuticos, calidad higiénica, controles microbiológicos, valoración de antibióticos.

INTRODUCCIÓN

Los agentes conservantes se incorporan a los medicamentos y a los cosméticos para garantizar la seguridad desde el punto de vista microbiológico, durante su distribución y utilización.

En efecto, bacterias, hongos y levaduras son capaces de crecer en los medicamentos si se encuentran en presencia de nutrientes y de agua. Este desarrollo de microorganismos supone una alteración de las propiedades físicas y organolépticas de la forma farmacéutica y un riesgo para la salud del paciente. Pero además, las enzimas formadas por estos microorganismos pueden producir la degradación de las sustancias activas y aumentar la toxicidad de la forma farmacéutica.

Por lo tanto resulta imprescindible la utilización de los conservantes en:

- ♦ Medicamentos estériles envasados en recipientes multidosis, ya que una vez abierto el envase se pierde la condición de esterilidad.

- ♦ Medicamentos no estériles y cosméticos: líquidos, semisólidos, con una fase acuosa y aquellos en estado sólido que, o bien tienen un elevado contenido en humedad, o bien se regeneran con agua antes de su utilización.

Los agentes conservantes solo resultan totalmente eficaces para evitar la contaminación microbiana de los medicamentos y cosméticos si se acompañan de otras medidas, como la utilización de materias primas con una carga microbiana mínima y el mantenimiento de buenas prácticas de fabricación que reduzcan el riesgo de contaminación microbiana durante el procesamiento [1].

La valoración microbiológica de medicamentos se realiza comparando en idénticas condiciones de ensayo, la inhibición de la multiplicación de microorganismos sensibles producida por concentraciones conocidas de una sustancia de referencia frente a la inhibición producida por diluciones del antibiótico que se está valorando [2].

Para determinar si un antibiótico cumple con los requisitos de potencia especificada en el producto debe repetirse la valoración y combinarse los resultados estadísticamente hasta lograr la precisión requerida. Esta debe ser tal que los límites de confianza ($P=0,95$), expresados porcentualmente, se encuentren dentro del intervalo de potencia especificado.

Se emplean dos métodos generales: método de difusión en agar en placa y método turbidimétrico o en tubo. El primero se basa en la difusión del antibiótico desde un punto de aplicación sean estos reservorios o cuentas de porcelanas, cilindros de metal o discos de papel, a través de una capa de agar inoculado con el microorganismo de

ensayo. La difusión origina zonas o halos de inhibición del crecimiento de microorganismo; y la medida de halos (diámetro) está en relación con la concentración de antibiótico; siendo este el método seleccionado en este trabajo [2].

Ciertos productos farmacéuticos pueden ser esterilizados en su envase sin presentar alteraciones posteriores, presentando una calidad higiénico-sanitaria según normas INAME-ANMAT, para estos fines es indispensable emplear en el proceso materia primas estériles y técnicas de asepsia adecuadas [3].

En la ciudad de Posadas y sus alrededores, zona de frontera, se comercializan productos medicinales en lugares no habilitados para tal fin, expuestos a factores ambientales adversos y polvo. Se suma a esto el desconocimiento de los procesos de elaboración de los mismos y si son sometidos o no a controles higiénicos sanitarios, la posibilidad de deficiencias en el envasado y cierre de envases que pudieran alterar su calidad.

En vista de que no tenemos conocimiento de la existencia de trabajos similares, ni antecedentes o publicaciones disponibles al respecto en nuestra región se realizó este trabajo con la finalidad de efectuar un aporte en el control de calidad de medicamentos para la salud de nuestra población.

El primer objetivo de este trabajo fue investigar la calidad higiénico sanitaria de estos medicamentos. Como segundo objetivo realizar el control higiénico sanitario de medicamentos producidos por una planta de elaboración local, y distribuidos dentro del sistema de Salud de nuestra provincia.

El tercer objetivo fue realizar la valoración de antibióticos correspondientes a este segundo grupo de fármacos.

MATERIALES Y MÉTODOS

A- Control Higiénico de Medicamentos

Las muestras fueron tomadas por duplicado y procesadas a su vez por ensayos duplicados, siguiendo técnicas recomendadas por FDA [4].

En cada muestra se ensayó inicialmente la actividad bacteriostática del producto, empleando para ello cepas de colección *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, las cuales fueron incubadas por 24-48 hs a 35°C en caldo nutritivo [2, 5, 6, 7].

A los productos se le realizaron pruebas de desarrollo de microorganismos por dos métodos: a) inhibición del conservante, empleando Tween 80 como inhibidor y b) método de dilución; los ensayos se realizaron empleando Plate Count Agar (Merck), Agar Malta (Merck), Agar Sa-

bouraud (Merck) y Agar Czapeck (Merck); incubándose en estufa de cultivo durante 24-48 hs y 4-5 días a 35°C y 30°C respectivamente [2, 5, 6, 7, 8].

Con aquellos que presentaron actividad bacteriostática negativa, se investigó la presencia de anaerobios y *Staphylococcus* en caldo tioglicolato; recuento de aeróbicos mesófilos totales y recuento de hongos y levaduras.

En los medicamentos que presentaron recuentos de aerobios mesófilos totales positivos se investigó la presencia de los siguientes microorganismos patógenos: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas* spp. y *Salmonella* spp. [9].

TÉCNICA UTILIZADA PARA PATÓGENOS [9]

Staphylococcus aureus:

Diluyente agua peptonada al 0,1%.

Medio de cultivo: Agar Baird Parker (Merck).

Método de siembra: en superficie.

Incubación: 24-48h, a 37°C

Recuento de UFC/gr, colonias negras rodeadas de zonas claras de 2 a 5 mm.

Pseudomonas aeruginosa:

Diluyente agua de peptona al 0,1%.

Medio de cultivo: Agar Cetrimide (Merck).

Método de siembra: en superficie

Incubación: 24-48 h. 35°C.

Determinación de UFC/gr colonias verdosas.

Salmonella spp:

Precultivo: caldo lactosado- 24 h. 35°C

Medio para enriquecimiento selectivo: caldo Selenito Cistina y Medio Fluido Tetratiónato (Merck).

Bismuto sulfito (Merck): medio diferencial y selectivo para aislamiento de colonias negras o verdes.

Xilosa lisina dexosicolato (Merck): colonias transparentes o rosadas con halos claros.

Incubación: 24-48 h. 35°C.

Escherichia coli:

Diluyente: caldo lactosado

Medio de cultivo: Agar Mac Conkey (Merck).

Método de siembra: en volumen.

Incubación: 24-48 h. 35°C

Pruebas confirmatorias: siembra para aislamiento en EMB. Colonias negras verdosas con brillo metálico.

B- Valoración de Antibióticos

Método Utilizado para la evaluación estadística: ANOVA.

CONDICIONES GENERALES DE ENSAYO

La potencia de los antibióticos se expresó en Unidades o µg de actividad. En cada caso, la Unidad o µg de actividad antibiótica se establece y define internacionalmente.

Se consideraron los siguientes conceptos:

Potencia declarada o en etiqueta: en el caso de un producto formulado, es un valor nominal asignado a partir del conocimiento de la potencia del material a granel; en el caso de material a granel, es la potencia estimada por el elaborador.

Potencia supuesta o asumida: es la potencia provisoriamente asignada de una preparación muestra que forma la base del cálculo de las dosis que podrían ser *Staphylococcus* con las dosis a emplear de la preparación patrón.

Potencia asignada: es la potencia de la preparación estándar.

Relación de Potencias: es la razón de dosis equipotentes de la preparación patrón y la preparación muestra, bajo las condiciones del ensayo.

Potencia estimada: es la potencia a partir de los datos del ensayo.

Para la valoración de antibióticos se utilizó la técnica de difusión en placa [1, 4].

Antibiótico ensayado: Cefalexina 500 mg comprimidos.

Estandarización del Patrón: se trabajó con el antibiótico puro: Cefalexina con fecha de vencimiento conocida y potencia valorada; como patrón *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 [3, 9].

Para obtener el intervalo de concentraciones de trabajo se realizó previamente una curva dosis respuesta y se aplicó el método estadístico apropiado.

Medios de Cultivo:

- Los medios de cultivo empleados fueron Agar nutritivo (Merck, Alemania).

- Agar semilla (preparado a partir de los componentes: peptona 6 g; digerido pancreático de caseína 4 g; extracto de levadura 3g; extracto de carne 1,5g; dextrosa 1 g; agar 15g; agua destilada 1000 ml; pH final: 6,5-6,6).

Reactivos: solución reguladora (solución 1): Fosfato de potasio 1%; fosfato dibásico de potasio 2 g; fosfato monobásico de potasio 8 g; agua destilada 1000 ml, pH: 6.

PROCEDIMIENTO

Preparación del Estándar

Se pesó una determinada cantidad del estándar (Cefalexina con fecha de vencimiento conocida y potencia valorada), 10 mg y se calculó su potencia multiplicando el peso por la potencia declarada para dicho estándar, y

se preparó la solución madre (10mg/100ml).

Posteriormente, se prepararon tres diluciones en progresión geométrica (114µg/ml, 76 µg/ml y 45µg/ml). Se empleó como diluyente la solución reguladora 1 [3].

Preparación de la Muestra

El tratamiento inicial al que deben someterse las muestras depende de su forma farmacéutica. Se asumió una potencia por unidad de peso o volumen de acuerdo con la información disponible de la preparación muestra. Bajo esta hipótesis se preparó una solución madre de la muestra y tres o más diluciones en progresión geométrica equipotentes con las preparadas de estándar como se especifica para cada antibiótico (Cuadro 3). Se emplearon los mismos diluyentes que se indican para la sustancia de referencia [3].

Para la realización de la curva dosis-respuesta se partió de una solución conocida de concentración 228,7 µg/ml, obteniéndose las concentraciones finales de trabajo [3].

Preparación del Inóculo

Suspensión de 24 h de crecimiento

El microorganismo a usar se replicó en dos tubos de ensayo que contenían el medio agar nutritivo en forma de pico de flauta y se incubó 18 h a temperatura adecuada. La estría del microorganismo así obtenido se suspendió con agregado de solución fisiológica estéril y la ayuda de perlas de vidrio estériles.

El volumen de la suspensión original a agregar al medio de cultivo se estandarizó en un espectrofotómetro Shimadzu UV-240, a una longitud de onda de 580 nanómetros, llevando a una transmitancia del 25%. Se utilizó solución fisiológica como blanco. Se ajustó el volumen de esta suspensión original a agregar a 100 ml de medio de cultivo (siembra en volumen).

Preparación del medio de cultivo

Se fundió una cantidad suficiente de medio de cultivo estéril (Agar Semilla), se enfrió a 45°C, se inoculó el medio con el microorganismo de prueba y se agitó por rotación hasta lograr una suspensión homogénea. Sobre una superficie nivelada y en placas de Petri de 9 cm de diámetro, se vertieron 18 ml del medio ya inoculado para formar una capa uniforme de 2 a 5 mm de espesor, por cada muestra se prepararon 4 placas: placas A, B, C y D.

La inoculación del microorganismo se realizó al momento del vertido del medio en las placas [1].

Difusión en Placa

Se utilizó como reservorio del antibiótico, discos de

papel de filtro, previamente esterilizados, Wattman N° 2 de 6 mm de diámetro [2].

Los discos fueron ubicados sobre la superficie de cada placa con la ayuda de pinzas de metal esterilizadas a la llama, y ubicados según una distribución pre-establecida, para tener tres discos de las diluciones de muestra y tres discos de las diluciones del estándar.

Aplicación del antibiótico a procesar

Los discos fueron impregnados utilizando pipeta automática, con 0,25 µl de cada dilución de antibiótico, para el estándar y para la muestra. Las concentraciones utilizadas se observan en el Cuadro 3. Los discos se distribuyeron sobre la superficie del agar en forma aleatoria, siguiendo los vértices de un hexágono regular.

Predifusión

Se dejó difundir el antibiótico durante una hora a temperatura ambiente, en condiciones asépticas antes de llevarlos a la estufa [3].

Incubación

Las placas Petri se incubaron como lo indica la técnica, sin invertir a temperatura 35°C ± 0,5°C durante 18 horas aproximadamente, además se adosó una hoja de papel de filtro estéril en la cara interior de las tapas, a fin de evitar la condensación por humedad sobre el medio [2,3].

Medición

Al cabo de la incubación, empleando calibre, se midió el diámetro de cada halo producidos por las diluciones del estándar (S) y de la muestra (U) con una precisión de hasta la décima de mm. (Cuadro 3).

RESULTADOS

A) Control Higiénico-Sanitario de Medicamentos:

Se analizaron 33 muestras por duplicado de la Planta de Elaboración local y 21 muestras tomadas de la venta callejera, las que se detallan en los Tablas 1 y 2.

De los productos investigados 1 (uno) perteneció a la categoría 1; 3 (tres) a la categoría 2 y los restantes correspondieron a la categoría 3 del Boletín Oficial de Salud Pública de la República Argentina.

B) Valoración de Antibióticos

Los resultados de la valoración de antibióticos ensayados se detallan en la Tabla 3 y en la Figura 1, como lectura de los diámetros de halos de inhibición de desarrollo y gráfico de regresión respectivamente.

TABLA N° 1: Control higiénico-sanitario de medicamentos, Posadas, Misiones.

Producto	Ensayos de actividad bacteriostática, <i>E. coli</i> ; <i>S. aureus</i>	Recuento de hongos en agar malta, Czapek y Sabouraud	Recuento de microorg. Aerobios mesófilos PCA	Recuento anaerobios microaerofílicos Caldo tioglicolato	Identif. presencia de microorganismos patógenos*	Conservante del Medicamento
Aspirineta (A)	Positivo	-----	-----	Negativo	-----	-----
Jarabe Miracle (P)	Positivo	-----	-----	Negativo	-----	Benzoato de sodio
Olina gotas (B)	Positivo	-----	-----	Negativo	-----	-----
Memo Vital B12 jarabe (P)	Positivo	-----	-----	Negativo	-----	-----
Calmol Comp. (P)	Negativo	Negativo	25 colonias por ml	Negativo	Negativo	Acetil p aminofenol
Calmol comp. (P)	Negativo	Negativo	20 colonias por ml	Negativo	Negativo	Acetil p aminofenol
Z-Cal comp. (P)	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	-----	-----
Bionalgina comp. (P)	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	-----	-----
Mento Vick jarabe (P)	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	-----	-----
Caramelos Miracle (P)	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	-----	Benzoato de sodio
Ketoconazol suspensión (L)	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	-----	-----
Sulfato ferroso gotas (L)	Positivo	-----	-----	Negativo	-----	-----
Mebendazol pastillas (L)	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	-----	-----
Salbutamol gotas (L)	Positivo	-----	-----	Negativo	-----	-----
Homatropina metil bromuro (L)	Negativo	Negativo	12 colonias por ml	Negativo	Negativo	-----
Homatropina metil bromuro (L)	Negativo	Negativo	10 colonias por ml	Negativo	Negativo	-----
Suspensión antiácida (L)	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	-----
Suspensión antiácida (L)	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	-----
Metoclopramida comprimidos (L)	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	-----	-----
Acido fólico comprimidos (L)	Negativo	Negativo	6 colonias por ml	Negativo	Negativo	-----
Acido fólico comprimidos (L)	Negativo	Negativo	5 colonias por ml	Negativo	Negativo	-----
Acido fólico comprimidos (L)	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	-----	-----
Allopurinol 300 mg tabletas (L)	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	-----	-----
Metronidazol suspensión (L)	Positivo	-----	-----	-----	-----	-----
Piroxican comprimidos (L)	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	-----	-----
Lactato de calcio tabletas (L)	Positivo	-----	-----	-----	-----	-----
Biperideno CLH 2mg (L)	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	-----
Rheumazin forte comp. Recubiertos (P)	Positivo	Positivo en agar malta	Negativo	Negativo	-----	-----
Vitamina A crema (L)	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	-----	-----
Crema Dr. Selby (U)	Negativo	Positivo en agar malta y agar Czapek	Positivo	Negativo	Negativo	-----
Nervigenol jarabe (A)	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	-----	-----

Dolanet tabletas (A)	Negativo	Positivo en agar malta y agar Czapek	Negativo	Positivo	Negativo	-----
Butazona cálcica Grageas(B)	Negativo	Positivo en agar malta y agar Czapek	Negativo	Negativo	-----	-----
Broncofar jarabe (P)	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	-----	-----
Broncoline jarabe (P)	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	-----	-----
Calmadentol tabletas (P)	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	-----	-----
Regental N.A.T comp. (P)	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	-----	-----
Amoxicilina 250 jarabe (L)	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	-----	-----
Cefalexina 250 jarabe (L)	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	-----	-----
Lascamicetina jarabe (P)	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	-----	-----
Teofilina tabletas (L)	Positivo	Positivo en agar Czapek	Negativo	Negativo	-----	-----
Mentolina jarabe (P)	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	-----	-----
Cefalexina 500 comp. (L)	Negativo	Positivo en agar malta y agar Czapek	Positivo	Negativo	Negativo	-----
Amoxicilina 500 comp. (L)	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	-----	-----
Rifampicina 300 cápsulas (L)	Negativo	Positivo en agar malta y agar Czapek	Negativo	Positivo	Negativo	-----
Teofilina jarabe (L)	Negativo	Positivo en agar malta y agar Czapek	Negativo	Negativo	-----	-----
Penicrom comp. (P)	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	-----	-----
Paracetamol 100 comp. (L)	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	-----	-----
Paracetamol 500 comp. (L)	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	-----	-----
Prednisona comp.(L)	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	-----	-----
Cotrimoxazol comp. (L).	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	-----	-----
Betametasona valerato crema al 0,1% (L)	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	-----	-----
Enalapril maleato comp. (L)	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	-----	-----
Cotrimoxazol suspensión (L)	Positivo	Positivo en agar Czapek	Negativo	Negativo	-----	-----
Paracetamol gotas (L)	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	-----	-----

Referencias: A= Argentina, B= Brasil, L =Planta de Elaboración Local, P= Paraguay, U= Uruguay.

* Estas pruebas fueron realizadas a los medicamentos que presentaron recuentos de aerobios mesófilos positivos en Agar Plate Count.

Nota: los medicamentos que se encuentran repetidos corresponden a análisis de diferentes números de lotes.

TABLA N° 2: Prueba de crecimiento por inhibición del conservante*.

PRODUCTO	METODO DILUCIÓN	MÉTODO INHIBICIÓN CONSERVANTE
Calmol (P)	Positivo PCA	Positivo PCA
Calmol (P)	Positivo PCA	Positivo PCA
Homatropina (L)	Positivo PCA	Positivo PCA
Homatropina (L)	Positivo PCA	Positivo PCA
Suspensión antiácida (L)	Positivo agar Malta	Positivo agar Malta
Suspensión antiácida (L)	Positivo agar Malta	Positivo agar Malta
Acido fólico (L)	Positivo PCA	Positivo PCA
Acido fólico(L)	Positivo PCA	Positivo PCA
Biperideno CLH 2mg (L)	Positivo PCA	Positivo PCA
Rheumazin forte (P)	Positivo en agar malta	Positivo en agar malta

Crema Dr. Selby (U)	Positivo en agar malta	Positivo PCA
Dolanet (P)	Positivo en agar malta	Positivo en agar malta
Butazona cálcica (B)	Positivo en agar malta	Positivo en agar malta
Broncoline (P)	Negativo	Negativo
Calmadentol (P)	Negativo	Negativo
Regental (P)	Positivo agar Malta	Positivo agar Malta
Aspirinetas (A)	Negativo	Negativo
Miracle (P)	Negativo	Negativo
Olina (B)	Negativo	Negativo
Memo vital B12 (P)	Negativo	Negativo
Sulfato ferroso (L)	Negativo	Negativo
Salbutamol (L)	Negativo	Negativo
Metronidazol (L)	Negativo	Negativo
Lactato de calcio (L)	Negativo	Negativo

Positivo= crecimiento microbiano en Agar Plate Count (PCA) o en Agar Malta respectivamente. Negativo= ausencia de desarrollo.
Referencias: A= Argentina, B= Brasil, L =Planta de Elaboración Local, P= Paraguay, U= Uruguay.
*Pruebas PCA: recuento aerobios mesófilos. *Pruebas de crecimiento de hongos en Agar Malta.

Se valoraron muestras correspondientes a diferentes lotes y concentraciones de Cefalexina elaborada en la provincia de Misiones.

Las lecturas de los halos presentaron valores tales, que permitieron el cálculo de valoración con datos correlativos.

Las potencias en las muestras investigadas caen en valores mayores o iguales a 81,84%, los cuales son considerados aceptables.

TABLA Nº 3: Valoración de Cefalexina. Planta de Elaboración local. Posadas, Misiones.

Dosis de la muestra						
	Diluciones del estándar			Diluciones de la muestra		
	114 µg/ml	76 µg/ml	45 µg/ml	32,7 µg/ml	22,8 µg/ml	11,4 µg/ml
Placa A	22	17	10	9	9	6
Placa B	20	20	11	6	6	6
Placa C	21	21	20	15	8	6
Placa D	23	21	15	14	14	6
Promedio de la respuesta	21,5	19,75	14	11	9,25	6

Referencias: los números expresan los halos de inhibición en mm.

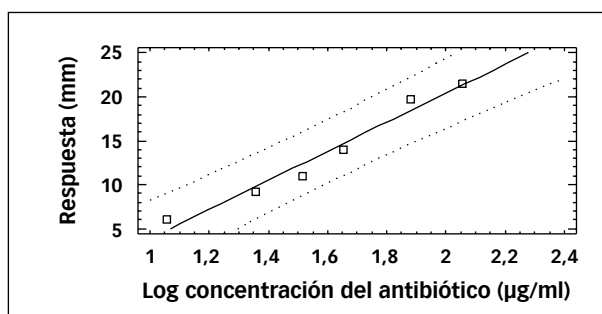


FIGURA 1. Curva de regresión: valoración del antibiótico cefalexina proveniente de una planta de elaboración local. Posadas, Misiones. (Ordenada al origen: 12,62; pendiente: 16,55).

Se presenta en la figura la línea de regresión y sus límites de confianza al 95%, de diámetros de halos en función del logaritmo de la concentración del antibiótico evaluado.

DISCUSIÓN

A) Control higiénico

En coincidencia con otros autores [10], en todas las muestras estudiadas los recuentos obtenidos en las diferentes categorías de medicamentos presentaron valores aceptables, ajustándose a los estándares microbiológicos establecidos por el INAME-ANMAT [5].

Por otra parte, y a pesar de tratarse de sustancias sin fiscalización, no se detectó la presencia de microorganismos patógenos.

B) Valoración de antibióticos

Los hallazgos de este estudio (Tabla 3, Fig. 1) demostraron que la concentración de Cefalexina evaluada, coincidió con lo declarado en la monografía.

En esta etapa solo se evaluó Cefalexina, siendo el único antibiótico para el cual se obtuvieron los patrones de droga pura y patrón microbiológico de prueba recomendados [2,3].

CONCLUSIONES

La coincidencia de resultados implica que la técnica desarrollada para este trabajo se ajustó a los requerimientos de la metodología que se emplea comúnmente.

A partir de los análisis realizados, en cuanto a la calidad higiénico- sanitaria y la valoración de antibióticos, se concluyó que los valores hallados se ajustaban a las normas legales vigentes como aptos para el consumo desde el punto de vista microbiológico.

Al no ser fiscalizados por los organismos oficiales del país, no debería permitirse su comercialización [5].

Consideramos que los hallazgos de este trabajo constituyen un aporte para el sistema de salud de nuestra región, tanto en el control como para la comercialización fiscalizada.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Vila Jato, J. L.

Tecnología Farmacéutica. Volumen I. Parte II. Editorial Síntesis. Págs. 262-263. Año 2001.

2. Farmacopea Nacional Argentina. Comisión Permanente: Limeres, M.; Chiale, C.; Sexta Edición. Segunda parte. Págs.1157-1159. Año 1979.

3. Christopolous, M.; Cinto,O.; Décima de Wolf, Cristina; Frade, A.; Maffé, Z.; Mercado, E.; Moro, Alfredo; Raffo Palma, M.; Rivas, M.; Rosetti, F.; Torrado, S.; Varsavsky, E. Bacteriología analítica para Alimentos y Medicamentos. INFyB. Cap. XV. P. 99-112. 1980. Ministerio de

Bienestar Social y Salud Pública. República Argentina.

4. Food and Drugs Administration. (FDA). 7° Edición. 1992.

5. Boletín Oficial de la República Argentina N° 29.310 1ra. Sección. Disposición de Salud Pública 7452/99 sobre "Límites microbiológicos para productos farmacéuticos no obligatoriamente estériles de acuerdo con la vía de administración". 1999.

6. Diagnóstica Merck. Control microbiológico de calidad de productos farmacéuticos y materias primas. 1ra. Parte- E Merck. Darmstadt. Alemania. 1975.

7. Remington, Farmacia. 17° Edición; Editorial Médica Panamericana. Argentina, 1992.

8. Faulii, C.

Tratado de Farmacia Galénica. 1ra. Edición. Luzáns. S.A. Ed. Madrid. Copyright. 1993.

9. United States Pharmacopeia USP XXIII. Microbiological Test. Págs. 1478-1495.

10. Marenales, A.; Fernández, J.; Cristar, R.

"Control Microbiológico de Productos Farmacéuticos en Uruguay". Asociación de Química y Farmacia del Uruguay. Revista N° 21. 1998.

Rev. Cienc. Tecnol.

Año 8 / Nº 8 / 2006 / 31-34

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE *CELTIS SPINOSA* SPRENG

Jordá, Graciela B.; Amer, Lidia S.; Horiński, Marta A.; Jerke, Gladis; Guida Adriana M.; Kramer, Fernando L.; Bargardi, Severino.

Cátedras de Microbiología General y Farmacotecnia I y II. Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales. Universidad Nacional de Misiones. Módulo Farmacia y Bioquímica. Av. M. Moreno 1375, (3300), Posadas, Misiones. gracielajorda@fceqyn.unam.edu.ar.

ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF *CELTIS SPINOSA* SPRENG

ABSTRACT

The antimicrobial activity of raw extracts from *Celtis spinosa* Spreng obtained by maceration and soxhlet with different polarity solvents was assayed. The extracts were confronted to Gram-positive and Gram-negative bacteria, filamentous fungi and yeasts. To determine antibacterial activity, the Kirby-Bauer method was used, meanwhile two methods were used for the antimicrobial action, one by diffusion in paper discs and the other by addition of plant extracts in holes made to the agar. In testing conditions, the antibacterial activity was scanty, while the antifungal effect was demonstrated in a single method with different results.

KEYWORDS: *Celtis spinosa* extracts; antimicrobial activity.

RESUMEN

Se ensayó la actividad antimicrobiana de extractos crudos de *Celtis spinosa* Spreng obtenidos por maceración y soxhlet con solventes de distinta polaridad. Estos fueron enfrentados a bacterias Gram positivas y Gram negativas y a hongos filamentosos y levaduriformes. Para determinar la acción antibacteriana se utilizó el método de Kirby-Bauer, mientras que para la acción antimicótica se usaron dos métodos, uno por difusión en discos de papel y otro por agregado del extracto vegetal en pocillos efectuados en el agar. En las condiciones de prueba, la actividad antibacteriana fue escasa mientras que el efecto antifúngico fue demostrado en un solo método con resultados variables.

PALABRAS CLAVES: *Celtis spinosa*, actividad antimicrobiana, extractos.

INTRODUCCIÓN

Desde sus comienzos el hombre aprendió a reconocer diferentes plantas y así discernir entre las que le servían para su alimentación, las que podían usarse como plantas medicinales y también conocer aquellas que eran tóxicas.

En la Provincia de Misiones, asentamiento de los guaraníes, el líder espiritual “ñande ru” y su ayudante “Tembigwa’i Añetenguá” [1, 2], tenían a su cargo la salud del pueblo con un total conocimiento de las plantas medicinales locales para utilizarlas terapéuticamente.

En la actualidad, esta costumbre continúa en gran parte de la población, por la cultura transmitida por generaciones y también porque son más accesibles económicamente.

En virtud de ello, la Organización Mundial de la Salud, desde la reunión de Alma Ata (Kazajstán, ex URSS), ha instado a los diferentes gobiernos de todo el mundo a reconocer y validar aquellas prácticas tradicionales insertas en el acervo cultural de los diferentes países que integran el planeta, en aras de llegar a los sectores más desprotegidos y carenciados, que constituyen los denominados *grupos de riesgo sanitario* [3].

El objetivo general de nuestro trabajo es adquirir un conocimiento amplio de las plantas medicinales, sus principios activos, usos, aplicaciones, efectos adversos o tóxicos e interacciones con otros fitomedicamentos o productos de síntesis.

El objetivo específico es hallar actividad antimicrobiana de extractos obtenidos por diferentes métodos, a partir de diferentes partes de la planta y llegar a una identificación del principio activo.

El hecho de seleccionar plantas autóctonas o nativas de la región procura validar lo nuestro, la tradición y lo cultural.

La especie seleccionada para este trabajo fue *Celtis spinosa* Spreng, perteneciente a la familia Ulmaceas. Vulgarmente se la conoce como tala y/o talera. Su hábitat son los montes ribereños y serranos en todo el país. Es un árbol bajo, con copa globosa, generalmente tortuoso y espinoso. Las flores son pequeñas, dispuestas en inflorescencias cimosas. El fruto es una drupa lisa, pequeña, de forma ovoidal, poco carnosa.

Popularmente se usan las hojas para tratar la diarrea y el cólera. La corteza para heridas y el envés de la hoja, que es un poco áspera, para raspar el eczema [4, 5, 6].

MATERIALES Y MÉTODOS

I- Obtención de extractos vegetales

a) Muestreo: se realizó la recolección de las plantas en diferentes períodos de los años 2003 y 2004, en las localidades de 25 de Mayo y Santa Inés. Se recolectaron hojas, tallos, pedúnculos, ramas y frutos.

b) Métodos extractivos: las distintas partes de la planta fueron secadas durante 10-15 días a temperatura ambiente, llevándose posteriormente 40°C en estufa por 72 hs para completar el mismo. Al término del secado se sometieron a una molienda con un molino a cuchillas y posterior tamizado (mesh50) para homogeneizar el material. Se pesaron 50, 100, 150 y 200 gramos de material vegetal por litro de solvente para obtener distintas concentraciones de extractos crudos, realizándose la extracción por medio de los procesos de maceración y soxhlet con solventes de distinta polaridad como se indica en la Tabla N° 1.

TABLA N° 1. Obtención de extractos. Métodos, concentración, solventes.

Ext. N°	Parte de la planta	Conc. g/l	Mét. de extracción	Solvente
09/03	Hoja y tallo	200	Maceración	Metanol
10/03	Hoja seca y tallo	100	Maceración	Metanol
11/03	Hoja y tallo	100	Maceración	Sol. hidroalc. 35°
12/03	Hoja y tallo	100	Maceración	Sol. hidroalc. 60°
13/03	Hoja y tallo	100	Maceración	Sol. hidroalc 90°
32/03	Hoja y tallo	50	Soxhlet	Metanol
1/04	Hoja	150	Soxhlet	Metanol
2/04	Hoja	150	Soxhlet	Metanol
3/04	Hoja y Pedúnculos	150	Soxhlet	Metanol
4/04	Hoja	150	Soxhlet	Metanol
6/04	Rama	150	Soxhlet	Metanol
8/04	Hoja y tallo	150	Soxhlet	Metanol
10/04	Fruto	100	Maceración	Metanol
13/04	Hoja	150	Soxhlet	Metanol

II- Ensayos para antimicrobianos

a) Acción antibacteriana: el método empleado fue el de difusión de Kirby Bauer [6, 7]. Se utilizaron placas con agar Mueller Hinton (Britania), y discos de papel de filtro Watman N° 3 de 6 mm de diámetro impregnados con 50 µl del extracto crudo y luego secados a 37°C durante 24 hs. Se aplicaron los discos en el cultivo y se incubó a 37°C durante 18-24 hs. Se midieron los halos de inhibición en mm.

b) Controles: se impregnaron los discos con 50 µl de los distintos solventes, solución hidroalcohólica al 35%, 60% y 90% y metanol. Se probaron en paralelo con los discos impregnados con extractos.

También se controló el agar Mueller Hinton con cepas

(frente a algunos antibióticos) para las cuales los halos de inhibición son conocidos. Así se evalúa la calidad de los discos, medios y metodología usada. Estas cepas son: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

Las cepas bacterianas utilizadas fueron: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis* ATCC 66300, *Staphylococcus aureus* meti R ATCC 43300, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Enterobacter cloacae* ATCC 202, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella* Enteritidis EB 1874/88, *Acinetobacter lwoffii*, y *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228.

c) Acción antimicótica. Se emplearon dos métodos:

El Método Prueba de sensibilidad al extracto por difusión en discos de papel de filtro (PSEDDi) [7,8]. Se emplearon discos de papel de filtro Watman N° 3 con un diámetro de 6 mm que fueron cargados con 100 µl del extracto a ensayar. Se secaron en estufa a 37°C. Se probaron frente a las cepas inoculadas en agar Sabouraud controlando a las 72 hs. de incubación, la inhibición del desarrollo fúngico en las inmediaciones del disco impregnado.

El Método Prueba de sensibilidad al extracto por difusión en pocillos de agar (PSEDPA) [9]. Se inocularon las placas de agar Sabouraud con las cepas fúngicas y se hicieron pocillos en el agar, agregando en ellos 50 µl del extracto vegetal.

Las cepas fúngicas utilizadas fueron, hongos filamentosos como *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum* Thom, *Penicillium citrinum* Thom, y hongos levaduriformes como *Candida albicans*.

RESULTADOS

En las condiciones de prueba se observó actividad antibacteriana frente a algunas bacterias Gram positivas y no sobre las Gram negativas.

Se observó actividad antibacteriana cuando se usó el extracto 3/04 frente a *Staphylococcus epidermidis* y el extracto 6/04 frente a *Staphylococcus aureus*.

Las cepas bacterianas restantes resultaron resistentes a los otros extractos ensayados.

En cuanto a la actividad antifúngica cabe aclarar que al usar el método PSEDDi no se obtuvo efecto inhibitorio. En lo que respecta al método PSEDPA los resultados se observan en la Tabla N° 2.

TABLA N° 2. Actividad antimicótica de extractos de *Celtis spinosa* Spreng.

Ext. N°	Resultados método PSEDPA (50µl)				
	<i>C. albicans</i>	<i>A. parasiticus</i>	<i>A. niger</i>	<i>P. chrysogenum</i>	<i>P. citrinum</i>
09/03	R	S	-	S	-
10/03	R	R	-	S	-
11/03	S	R	-	R	-
12/03	R	S	-	S	-
13/03	S	R	-	S	-
32/03	R	R	-	R	-
01/04	S	R	R	S	S
02/04	S	S	R	S	S
03/04	R	S	R	S	S
04/04	R	S	R	S	S
06/04	R	R	R	R	S
08/04	S	S	R	R	R
10/04	R	R	R	S	R
13/04	S	S	S	S	S

Referencias: R = resistentes; S = sensibles; (-) = no se realizó.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

En las condiciones de prueba la actividad antibacteriana fue casi nula ya que solamente dos extractos metanólicos mostraron actividad, el extracto N° 03/04 frente a *Staphylococcus epidermidis* y el N° 06/04 frente a *Staphylococcus aureus*. Sería necesario aumentar el número de experiencias y modificar variables que aseguren la ausencia de principios activos con actividad antibacteriana.

Coincidiendo con otro trabajo de los autores [2], nuevamente se demostró sensibilidad en bacterias Gram positivas y no en las Gram negativas. Esto podría deberse a las diferencias estructurales de las paredes bacterianas y/o los mecanismos de resistencia de cada una de ellas.

No se observó actividad antimicótica sobre los hongos filamentosos y levaduriformes, en las condiciones ensayadas, cuando el método empleado fue el PSDDI. En cambio hubo significativa actividad inhibitoria al usar el método PSEDPA especialmente en las cepas de *Penicillium chrysogenum* Thom y *Penicillium citrinum* Thom. Las diferencias observadas entre estos dos métodos puede deberse a que en el método de pocillos hay menos pérdida de extracto por encontrarse los compuestos con mayor libertad para difundir. En cambio en el método PSDDI, que es una adaptación del método de Kirby Bauer, el extracto se encuentra atrapado en el papel de filtro resultando así con menor capacidad de difusión más aún si se trata de moléculas grandes.

Llama la atención la variabilidad en los resultados obtenidos, se podría pensar en la variables muestra o época de mayor actividad metabólica de la planta, lo cual será necesario comprobar. Por este motivo se propone incre-

mentar el estudio de la toma de muestra en diferentes épocas, ajustar las concentraciones y realizar estudios fitoquímicos para identificar los compuestos responsables de la actividad antimicrobiana

AGRADECIMIENTOS

Al Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico (CIDET), por la ayuda y la atención brindada.

9. Negroni, Ricardo

“Actividad inhibitoria *in vitro* de algunos antisépticos frente a cultivos de *Prototheca wickerhamii*. Revista Argentina de Micología 22: 5-7. Año 1998.

10. De Batista, Gabriela; Guida, Adriana; Bargardi Severino

“Estudio fitoquímico y actividad antibacteriana de *Polygonum punctatum* Elliot”. Rev. Mexicana de Ciencias Farmacéuticas. Vol. 35. N°3, pág 11-14. Jul/Set. 2004.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kramer, A. G. M. y colbs.

“Plantas medicinales usadas por los Mbya (Guaraníes). Dpto. Guaraní. Informe Ecosur. Versión N° 1. 1993/94. Pcia. Misiones.

2. Bargardi, S.; Kramer, F. L.; Medvedeff, M.; Jordá, G.; Guida, A.

“Actividad antibacteriana de *Peschieria australis* (Müell) Miers sobre *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*”. Revista de Ciencia y Tecnología. Año 4. Número 4. Pág: 6-11. Diciembre 2001. Editorial Universitaria, Universidad Nacional de Misiones.

3. Alonso, J.; Desmarchelier, C.

“Plantas Medicinales Autóctonas de la Argentina” 1ª Edición. Buenos Aires. Editorial LOLA. 2005.

4. Martínez Croveto, R.

“Plantas utilizadas en medicina popular en el Noroeste de Corrientes. (Rep. Arg.)” *Celtis spinosa* Spreng. Fund. Miguel Lillo. Pag 34 Tucumán 1981.

5. Sawchuk, B.; Galeano, H.

“Descripción de árboles medicinales de la Selva Misionera” *Celtis spinosa* Spreng. Pág 144-145. Año 1981, Editorial GTZ.

6. González Torres, D. M.

“Catálogo de Plantas Medicinales (alimenticias y útiles) usadas en Paraguay”, pág. 376-377.

7. Bauer, A. W.; Kirby, W. M. M.; Sherris, J. C.; Turck, M.

1966. Antimicrobial Investigations American Journal of Clinical Pathology 45: 493-496.

8. “Método de la OMS” Documento M2-A7

del National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) año 2000. XVI Curso Intensivo de Actualización en Antimicrobianos “Dra. Alicia Rossi”. X Curso Latinoamericano de Actualización en Antimicrobianos. Servicio Antimicrobianos. Depto. Bacteriología. Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas. ANLIS- “Dr. Carlos Malbrán”. Bs.As. Abril de 2002.

Rev. Cienc. Tecnol.

Año 8 / Nº 8 / 2006 / 35-38

EVALUACIÓN DE LA FLORA FÚNGICA PRESENTE EN LA YERBA MATE ESTACIONADA EN GALPONES CALEFACCIONADOS

Marucci, Raúl S.; Kanzig, Rodolfo G., Sartori, Patricia

Laboratorio de Análisis Micológico y Micotoxinas en Alimentos, Facultad de Ciencias Exactas,
Químicas y Naturales, UNaM. Av. Mariano Moreno 1375, CP: 3300, Tel/Fax: 54-3752-427687
Posadas, Misiones, Argentina. rmarucci@fceqyn.unam.edu.ar

EVALUATION OF YERBA MATE FUNGAL FLORA, WITH MATURATION IN CALEFACTIONATED PLACES

ABSTRACT

The aim of this work was to identify fungal flora in yerba mate at different periods of time in the process of storing carried out in heated storehouses with mechanical air circulation, to study the evolution of contaminating microorganisms under the influence of temperature and humidity controlled by means of electronic systems. These places have a capacity of 2,500 tons and are built on a foundation of masonry 1 m high and pipes for hot air distribution in their interior produced by a sanitary boiler. Walls are 7 meters high, and ceilings are built of galvanized foil with inner insulation.

Moisture and temperature control showed a strong decrease in microbiological counts compared with those taken from studies carried out with traditional storing. So, 50 % of the samples showed yeast belonging to *Rhodotorula* and predominantly *Saccharomyces*. The other 50% corresponded to *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Fusarium*, *Mucor* and *Penicillium*.

KEYWORDS: fungal, yerba mate, maturity.

RESUMEN

En el presente trabajo se aisló e identificó la flora fúngica contaminante de la yerba mate con distintos períodos de estacionamientos en galpones calefaccionados con circulación mecánica del aire, controlando la temperatura y humedad mediante sistemas electrónicos. Estos galpones están contruidos sobre una base de material de 1 m de altura y en su interior se distribuye la cañería por la que circula el aire caliente producido por una caldera sanitaria. Las paredes y techos de los mismos son de chapa galvanizada con aislamiento interior. El control sobre la humedad y temperatura mostró una marcada disminución en los valores del recuento con respecto a los obtenidos en estudios realizados en el estacionamiento tradicional. El 50% de las muestras desarrollaron levaduras de los géneros *Rhodotorula* y de *Sacharomices* con predominio de esta última, el 50% restante y en orden decreciente correspondieron a los géneros: *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Fusarium*, *Mucor* y *Penicillium*.

PALABRAS CLAVES: Hongos, yerba mate, estacionamiento.

INTRODUCCIÓN

La yerba mate produce una bebida estimulante, largamente consumida en Argentina como en Brasil, Paraguay y Uruguay. La forma más difundida es el mate (infusión de yerba mate en mate de madera o porongo).

La elaboración tradicional del *Ilex paraguariensis* requiere una serie de transformaciones que involucran cambios fisicoquímicos y organolépticos a través de un lapso de tiempo. El procesamiento clásico de este producto involucra generalmente etapas como: 1) Tarefa: cosecha manual de la hoja verde. 2) Sapecado: tratamiento térmico brusco de la hoja verde a temperaturas de 350-450°C durante aproximadamente dos minutos. 3) Se enfría a temperatura ambiente durante dos horas. 4) Prosecado: nuevo calentamiento de la hoja sapecada y enfriada a una temperatura de 100 a 110°C durante tres minutos. 5) Secado: la yerba mate es sometida a temperatura de 110°C por circulación de aire caliente hasta alcanzar una humedad al menos de 5%. 6) Canchado: fragmentación grosera de las hojas y ramas secas colocadas en bolsas de aproximadamente 50 kgr, de arpillera natural o sintética. 7) Estacionamiento: almacenamiento en amplios locales convenientemente ventilados de seis a veinticuatro meses. 8) Molienda: transformación y acondicionamiento por trituraciones, zarandeos, mezclas y envasado

Grupos de investigación han estudiado los cambios fisicoquímicos en relación con las distintas etapas del proceso, en especial el estacionamiento, con el fin de acelerarlos y reducir el tiempo total de la elaboración del producto. Estos estudios han demostrado que la acción microbiana directa no aporta a las cualidades de una buena yerba mate ya que los mecanismos actuantes son de origen enzimático foliar [1;2]. Las condiciones de almacenamiento no son controladas en forma minuciosa por lo que, dadas las características climatológicas imperantes en la zona noreste del país, es frecuente observar en las hojas un aumento de la humedad que, con las altas temperaturas, favorecen la proliferación de microorganismos contaminantes [3;4]. En esta etapa del proceso existe mayor riesgo de desarrollo fúngico, lo que ha obligado a mejorar el sistema de estacionamiento, incorporando nuevas tecnologías en lo que se refiere a construcción de los locales y control de estas dos variables para que el producto adquiera las características organolépticas, color y sabor deseado.

MATERIALES Y MÉTODOS

El muestreo se realizó al azar de distintos galpones y sectores de las estibas totalizando 38 muestras que se

colocaron en bolsas de papel de 1 kg.

Para determinar el contenido de humedad en las muestras previa homogeneización se pesaron 10 gr empleando un Desecador Infrarrojo "Mettler LP 16" a 130°C durante 10 minutos

En la preparación de las diluciones se tomaron alicuotas de 10 g de cada uno de los paquetes, se adicionaron 90 ml de agua peptonada al 0,1% realizando una homogeneización manual durante 5 minutos. Se filtraron los homogenatos a través de gasa estéril obteniéndose una dilución de 10^{-1} , a partir de la cual se preparó la de 10^{-2} .

Las muestras se procesaron utilizando técnicas y medios de cultivos recomendados por especialistas en el tema. Se sembraron por duplicado, 100 µl de cada dilución en medios de cultivo OGYE (Agar Oxytetraciclina-Glucosa-Extracto de Levadura) y DRBC (Agar Dichloran-Rosa de Bengala- Cloramfenicol); mediante diseminación en superficie con espátula de Drigalski. Las placas se incubaron en estufa a $26 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 3 a 5 días [5].

A los 5 días se procedió al recuento total de las colonias y la caracterización de los principales géneros de hongos filamentosos y levaduras desarrollados. El conteo de colonias se realizó a "ojo desnudo" y para la identificación de las cepas se observaron características macro-microscópicas de las colonias. Se promediaron los duplicados obtenidos del recuento en OGYE y DRBC expresándose los resultados en Unidades formadoras de Colonias por gramo (UFC/g).

La identificación genérica de las cepas de hongos filamentosos se realizó en base a la macro-micromorfología de las colonias comunicadas por diversos investigadores dedicados al estudio de la taxonomía fúngica. Sus cuerpos de fructificación se clasificaron por las características que presentaban; los cuales se observaron directamente de las placas de OGYE y/o DRBC mediante el empleo del objetivo de 10X de un microscopio, enfocando los bordes de las colonias donde el micelio está más distendido. Las cepas que no fructificaron a los 3-5 días se dejaron crecer hasta que se constató la presencia de micelio aéreo adulto. En estos casos, la identificación se realizó mediante la observación microscópica por el método de la cinta adhesiva [6].

Para la clasificación genérica de las levaduras contaminantes de alimentos se empleó la metodología de identificación basada en características de crecimiento de las cepas aisladas en diversos medios de cultivo. Las cepas de levaduras aisladas en medios de mantenimiento, se repicaron en: 1) Agar Extracto de Malta (MEA), incubado a 25°C, para la observación de la macro-micromorfología de las colonias; 2) Agar MEA, incubado

a 37°C, mide el crecimiento a temperaturas elevadas; 3) Agar MEA+Acido acético para cepas resistentes; 4) Agar MEA+ 50% Glucosa, para medir crecimiento a actividad acuosa reducida; 5) Agar harina de Maíz, para cepas del género *Cándida* ; 6) Agar Czapeck, para medir la habilidad de utilizar al nitrato como única fuente de nitrógeno. El examen de las placas se realizó a los 3-7 días. Se registraron la presencia o ausencia de crecimiento, el tamaño el y color de la colonia en los diversos medios de cultivo [7, 8].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La contaminación fúngica de cereales, oleaginosas y demás productos agrícolas se observa principalmente durante el período de almacenamiento donde las condiciones de humedad y temperatura favorecen el desarrollo de los hongos saprófitos contaminantes; alterando las características organolépticas de los productos estacionados y frecuentemente imposibilitan la comercialización ocasionando graves daños económicos.

En el proceso de elaboración de la yerba mate los aspectos técnicos no varían sustancialmente salvo en los distintos tipos de estacionamiento: tradicional y acelerado [1]. En el estacionamiento tradicional el producto se coloca en bolsas de arpillera de cincuenta kilogramos de capacidad en galpones comunes por un período no menor a ocho meses. El estacionamiento acelerado acorta los tiempos a uno o dos meses y se realiza en galpones con control de temperatura y humedad. [8, 9, 10]. Con el propósito de mejorar las condiciones del almacenamiento y lograr un producto de calidad, se diseñaron galpones con paredes de chapa, cubiertos en su parte interior con material aislante y circulación mecánica de aire caliente generado por una caldera sanitaria. Para el control de la humedad y temperatura se instalaron sensores electrónicos. En la Tabla N° 1 se puede observar los valores del recuento que son significativamente menores a los encontrados en los otros tipos de estacionamiento, con la característica de que no guarda relación directa con los contenidos de humedad y tiempo de estacionamiento. La distribución por género de la flora contaminante fue la siguiente: en el 50% de las muestras desarrollaron levaduras de los géneros *Rhodotorula* y de *Sacharomices* con predominio de esta última, el 50% restante y en orden decreciente correspondieron a los géneros: *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Fusarium*, *Mucor* y *Penicillium*. Los valores de los recuentos para ambos medios de cultivo de cada una de las muestras se promediaron y son los que se detallan en la siguiente tabla.

TABLA N° 1: Tiempos de estacionamiento, contenido de humedad y el recuento fúngico de las muestras estudiadas.

Muestra N°	Días de Estacionamiento	Humedad %	Unidades Formadoras de Colonias(UFC/g)
1	16	6,71	200
2	160	4,10	600
3	16	6,86	1000
4	160	6,01	200
5	16	4,79	500
6	16	6,75	200
7	16	4,76	1000
8	78	6,68	200
9	78	6,67	1200
10	648	6,21	1000
11	648	7,03	400
12	830	7,51	300
13	830	7,61	300
14	682	7,10	800
15	317	4,44	200
16	317	6,04	200
17	54	4,82	200
18	317	5,36	900
19	134	4,49	200
20	134	4,42	200
21	317	5,25	200
22	287	4,27	700
23	103	5,08	700
24	287	5,42	100
25	226	5,64	200
26	226	5,47	100
27	226	5,40	100
28	78	6,39	600
29	230	4,58	700
30	47	5,81	1000
31	38	6,08	1500
32	290	5,17	800
33	290	4,96	400
34	47	7,13	400
35	106	6,16	1500
36	137	6,09	300
37	137	6,25	1200
38	137	6,50	1000

CONCLUSIONES

El presente estudio trata de demostrar que, controlando la variables temperatura y humedad, se mejoran las condiciones del estacionamiento y disminuye el desarrollo de microorganismos contaminantes que alteran la calidad del producto con la consiguiente pérdida económica [9].

Los valores de los recuentos son inferiores a los obtenidos en los trabajos realizados en los otros tipos de estacionamiento [10,11]. Se destaca el desarrollo en un número importante de muestras de levaduras con contenido de humedad inferior al 5,50% y elevados días de

estacionamiento como también la presencia de dimorfismo celular en algunas de ellas, esto se puede atribuir a influencia de los valores de temperatura y humedad dentro de los galpones.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kanzig, R.; Novo, M.; Schmalco, M.

Métodos de procesamiento de yerba Mate (*Ilex paraguariensis*). Revista del CIDET, UNaM II: p. 15-28. 1985.

2. Fanti, O.; Kohan, T.

Fijación de oxígeno en la yerba mate canchada sin estacionar. Rev. Invest. Agrop, 7: p. 185-199. 1970.

3. Spegazzini, C.

Hongos de la Yerba Mate. Anales Mus. Nac. de Hist Nat. XVIII, p. 111-141. 1908.

4. Nowacki, M.

Algunos hongos parásitos de erva mate no Parana. Arqu. Biol. e Tec. IX, p. 83-85. 1954.

5. Pitt, J. I.; Hocking, A. D.

Methods for isolation, Enumeration and Identification (Cap. 4), in Fungi and Food Spoilage, Academic Press, London. P. 21-55. 1997.

6. Pitt, J. I.; Hocking, A. D.

Primary Keys and Miscellaneous Fungi (Cap. 5), in Fungi and Food Spoilage, Academic Press, Cambridge, London. P. 59-170. 1997.

7. Pitt, J. I.; Hocking, A. D.

Yeasts (Cap 10), in Fungi and Food Spoilage, Blackie Academic & Professional, Cambridge, London. P. 439-465. 1997.

8. Pitt, J. I.; Hocking, A. D.

The ecology of Fungal Food spoilage (Cap 2), in Fungi and Food Spoilage, Academic Press, Cambridge, London. P. 3. 1997.

9. Vaamonde, G.; Cabral, D.

Micología de Alimentos. Universidad de Buenos Aires. Buenos Aires, 1995.

10. Tonón, S. A.; Marucci, R.

Flora fúngica contaminante de Yerba Mate estacionada. Presencia de hongos productores de aflatoxinas. La Alimentación Latinoamericana, 206, p. 23-32. 1995.

11. Marucci, R. S. y col.

Evolución de la micoflora contaminante de la Yerba mate durante el proceso de estacionamiento acelerado en cámara piloto, en el XIV Congreso Latinoamericano de Microbiología. Asunción, Paraguay, 1998.

Rev. Cienc. Tecnol.

Año 8 / Nº 8 / 2006 / 39-45

FARMACOEPIDEMIOLOGÍA DEL USO DE TAXANOS PARA CÁNCER DE MAMA EN LA SEGURIDAD SOCIAL DE LA PROVINCIA DE MISIONES ARGENTINA

Falkowski, Juan C.; Oviedo, Patricia; Duarte, Alicia; Bañay, Eduardo; Blariza, José M.

Universidad Nacional de Misiones, Facultad de Ciencias Exactas, Qcas. y Naturales, Módulo de Bioquímica y Farmacia, Cátedras de Química Medicinal y Fisiopatología. Mariano Moreno Nº 1375, Posadas, Misiones, C.P. 3300. valproat@hotmail.com.

PHARMACOEPIDEMIOLOGY OF USE OF TAXANES FOR BREAST CANCER IN THE SOCIAL SECURITY OF MISIONES, ARGENTINA

ABSTRACT

Taxanes is a new group of antineoplastic agents which is active in several types of cancer. In view of the fact that paclitaxel has a specific prescription, high cost and potentially severe adverse effects, its use was studied in the light of the guidelines established by the American Association of Hospital Pharmacists. The criteria and standards were derived from the literature. A review of the clinical histories of 55 patients treated with paclitaxel between 2000 and 2004 was carried out. The results show a clear trend toward considering including the results of clinical trials in daily practice, which explains deviations in the use of paclitaxel for this prescription (patients had ovarian, breast or lung cancers) and in dosage (only 40% received the current dosages). Paclitaxel was shown to be an effective medication, with a response rate of 48% and moderate toxicity. Nonetheless, pharmaeconomic studies would be interesting because it may greatly increase the cost of treating breast cancer if used without proper patient selection.

KEYWORDS: Paclitaxel, Docetaxel, cost-effectiveness, Pharmacoepidemiology.

RESUMEN

Los taxanos son un nuevo grupo agentes antineoplásicos con actividad en muchos tipos de cáncer. Al ser un medicamento con una indicación específica, elevado costo y efectos adversos potencialmente graves. Se revisaron las historias clínicas de 54 pacientes que recibieron paclitaxel entre el año 2000 y 2004. Los resultados del estudio destacan que existe una clara tendencia a incorporar a la práctica diaria los resultados de los ensayos clínicos, lo que explica las desviaciones del índice encontradas para la indicación (los enfermos tenían cáncer de ovario, de mama y de pulmón). El paclitaxel se demuestra como un fármaco eficaz con una tasa de respuestas del 48 por 100 y toxicidad moderada. No obstante, sería deseable la realización de estudios de relación costo/beneficio, puesto que el alto precio de este medicamento puede disparar el costo de tratamiento del cáncer de mama si se utiliza sin criterios de selección de pacientes.

PALABRAS CLAVES: Paclitaxel, Docetaxel, costo efectividad, farmacoeconomía.

INTRODUCCIÓN

Uno de los objetivos en política sanitaria es conseguir un uso racional de los medicamentos, es decir, proporcionar la mejor terapéutica al menor costo y con los mínimos riesgos. Ello redundará en una mejor calidad de vida relacionada con la salud de los individuos. La utilización de medicamentos se considera un indicador sociosanitario, siendo los estudios de farmacoepidemiología (EFE) la herramienta que nos permite su evaluación y posterior diseño de estrategias de intervención. La OMS definió los estudios de utilización de medicamentos como aquellos que se ocupan de “la comercialización, distribución, prescripción y uso de los medicamentos en una sociedad, haciendo especial énfasis en sus consecuencias médicas, sociales y económicas” [1]. En esta definición se plasma la variedad de aspectos que se pueden abarcar con este tipo de estudios, de los cuales son parte los EFE.

En 1969 se formó el Drug Utilization Research Group (DURG), vinculado formalmente a la OMS desde 1979, para la estandarización de la metodología de los EUM. Sus conclusiones se publicaron bajo el nombre de *Studies in Drug Utilization*, y en 1974 se creó el Nordic Council on Medicines Working Group on Drug Statistics con el objetivo de lograr una armonización en materia de medicamentos en el área de los países nórdicos [2].

Los objetivos del presente trabajo se encuadran dentro de las características de un estudio farmacoepidemiológico descriptivo, transversal y retrospectivo del consumo de especialidades farmacéuticas que contengan drogas derivadas de taxanos (paclitaxel y docetaxel). Son objetivos particulares: determinar la frecuencia de diagnósticos para los cuales se utiliza el tratamiento con taxanos y su característica de tratamiento de protocolo o de rescate, Determinar en función del seguimiento el tipo de protocolo farmacológico utilizado en cada caso; si el taxano se utiliza previa o posteriormente a otros protocolos quimioterápicos, correlacionar los protocolos aplicados con los diferentes estadios de los pacientes. Determinar la proporción representada por los tratamientos con taxanos en la cápita oncológica total.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los estudios de utilización de medicamentos constituyen un instrumento eficaz para conocer el uso de los medicamentos, teniendo en cuenta que se llevan a cabo con una metodología establecida y por lo tanto comparable. Estos estudios permiten analizar el estado actual, el perfil de uso en el tiempo y las tendencias de consumo. Se requiere establecer el sistema de clasificación a

utilizar, así como las unidades de medida, para realizar comparaciones en tiempo y espacio. Existen varios sistemas de clasificación, aunque la clasificación ATC (Anatomic, Therapeutic, Chemical) es la recomendada por la OMS. En cuanto a las unidades de medida, la Dosis Diaria Definida (DDD) es la unidad técnica de medida universalmente aceptada para la evaluación del uso de los medicamentos. La DDD se define como la dosis diaria de mantenimiento de un medicamento, cuando se usa en su principal indicación, en adultos. La evaluación del uso de medicamentos es el proceso que cierra el círculo natural del consumo, que empieza con la prescripción y sigue con la dispensación y el cumplimiento. Debe separarse la evaluación de la calidad de la prescripción [3]. Los taxanos (paclitaxel y docetaxel) son fármacos que cumplen la mayoría de estas razones (son fármacos de reciente comercialización, con una indicación muy específica, un elevado costo y graves efectos adversos), por lo que se decidió realizar con el un EFE siguiendo la línea marcada por la ASHP.

Para evaluar el uso de taxanos en nuestra institución se procedió a la revisión retrospectiva de las historias clínicas de todos los pacientes a los que le fue administrado en el período comprendido. Para evaluar las historias clínicas se diseñaron unas hojas que facilitan la recogida de datos (Figura 1). En estas hojas se recoge información sobre el tipo y estadio del tumor, situación del paciente al comienzo del tratamiento con taxanos, esquemas de quimioterapia recibidos previa y posteriormente por el paciente, régimen posológico. El estadio tumoral se determinó siguiendo las clasificaciones generales expresadas en materiales de la OMS y el Manual de la American Cancer Society [13]. La población a estudiar correspondió a 140.000 afiliados del Instituto de Previsión Social de la Provincia de Misiones y un total de 646 pacientes oncológicos. Registrados en el Sistema Informático de Auditoría Oncológica (AUDONC); siendo los criterios de inclusión presentar diagnóstico oncológico de cáncer y que presentaron protocolos de uso de taxanos durante los años 2002, 2003 y primer semestre del 2004. Los criterios de exclusión corresponden a historias clínicas de pacientes sin anatomía patológica o con falta de integridad en los registros de consumo.

Con respecto al sistema propuesto de utilización del sistema de DDD, se mantiene con el fin de cumplir los aspectos formales antes detallados de los estudio de farmacoepidemiología de acuerdo a ecuación clásica –Expresión 1 [2]. Se ha comprobado la coherencia de los conceptos aplicados si bien desde el punto de vista específico de los taxanos (paclitaxel y docetaxel) no se ha determinado la DDD a nivel mundial, se escoge a tales

fines la utilización del mgr.

$$\text{Ecuación DDD} = \text{UP}_N \times \text{mgr ff} / \text{mgr DDD}$$

Siendo:

UP_N = unidades por presentación comercial

mgr f.f. = mgr por forma farmacéutica

mgr DDD = mgr por dosis diaria definida.

Expresión 1

La cantidad de medicamento vendido se obtiene multiplicando el número de envases vendidos por el número de unidades de cada envase (p ej. 30 compr/envase) y por la cantidad de principio activo contenido en cada unidad (p. ej. 2,5 mg/compr). Las unidades serán las mismas que las utilizadas para la DDD. Aunque en la fórmula se hace referencia a la cantidad vendida en un año, también se puede utilizar otro periodo de tiempo siempre que en el denominador quede reflejado el número de días correspondientes al periodo elegido. El número de habitantes se refiere a los de la población de estudio.

Los resultados dan un dato de porcentaje de uso de un medicamento referido a la población total, pero este puede estar siendo utilizado por grupos determinados de población. Al hacer comparaciones habría que tener en cuenta factores en el uso de medicamentos, como edad, sexo, factores sociodemográficos.

$$\text{DDD}/1000 \text{ hab}/\text{día} =$$

$$= \frac{\sum \theta_i \times \text{UPNI} \times \text{mgr fff}}{\text{mgr} / \text{DDD}_i \times 365 \text{ días} \times n \text{ Hab}} \times 1000 \text{ hab}$$

El presente trabajo tiene por objeto realizar el estudio farmacoeconómico sobre el tratamiento oncológico del cáncer de mama, siendo el factor en estudio la elección de quimioterápicos de última generación como el paclitaxel y docetaxel, ambos de un costo muy superior a los protocolos tradicionales indicados para cada tipo de enfermedad neoplásica; no existiendo aun bases de información de resultados clínicos a largo plazo que avalen su resultado efectivo, más allá del concepto de "mayor porcentaje de respuesta". Teniendo en cuenta que la financiación para el caso de estos fármacos se realiza con una cobertura del 100% la Obra Social Provincial. El punto de observación es la prescripción de la droga. Cabe mencionarse que como variables de dosificación se utilizaron las formulas relativas expresadas como mgr/m² referidas a la superficie corporal. Para la codificación de los protocolos quimioterápicos se utilizaron las tablas de MERCK INDEX 12 Ed.

Se definieron las indicaciones aprobadas y protocolos de utilización de paclitaxel y docetaxel para el cáncer de mama, para lo cual se ha utilizado como orientación los definidos como Protocolos Nacionales Convencionales en Oncología y Oncopediatría incorporado al Programa Nacional de Garantía de Calidad de la Atención Médica Resolución 435/2001 -MS.

Para el análisis cualitativo de la prescripción se definieron las indicaciones citadas para el uso de taxanos en cáncer de mama presente en los Protocolos Nacionales Convencionales en Oncología y Oncopediatría definen como indicaciones de segunda línea "con dosificaciones de Paclitaxel 135 mg/m² o Docetaxel 75-100 mg/m². oncológica.

Para el análisis estadístico, partiendo de los bancos citados anteriormente, se estableció un flujo de datos sobre aplicación de Access y Visual Basic que analiza un total de 646 pacientes, y su consumo histórico de prescripción farmacéutica.

Se informan también dentro de los componentes epidemiológicos del estudio: Gráfico de frecuencia de diagnósticos y estadios bajo tratamientos de taxanos, Gráfico de frecuencia de dosificación y esquema utilizados, Gráfico de relación de costo farmacéutico directo de tratamientos con taxanos y costo farmacéutico directo de tratamientos oncológicos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se han evaluado utilizando el flujo de datos y tareas los registro correspondientes al año 2002, 2003 y primer semestre del año 2004. El total de pacientes con cáncer que recibieron paclitaxel o docetaxel en el periodo considerado fue de cincuenta y cuatro (54) pacientes. La edad media de las pacientes fue de cincuenta y cuatro años, con un intervalo de treinta y dos a setenta. Los diagnósticos corresponden a doce (12) casos de tratamientos por cáncer de ovario (22 por ciento) y 33 casos de tratamiento

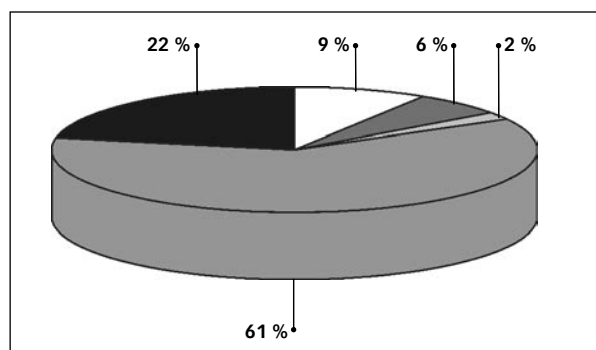


FIGURA 1. Farmacoepidemiología del uso de taxanos por diagnóstico.

Referencias: ■ = ca mama, ■ = ca ovario, □ = ca pulmón, ■ = ca cuello, □ = otro.

por cáncer de mama (61 por ciento) Figura 1. También aparecen cinco (5) casos (9 por ciento) de cáncer de pulmón de células no pequeñas y tres (3) casos de cáncer de cuello (6 por ciento).

USO DE TAXANOS EN TRATAMIENTO DEL CÁNCER DE MAMA

Los diagnósticos de cáncer de mama corresponden a 33 casos del total de los casos (61 por ciento). La frecuencia de protocolos de taxanos utilizada correspondió a un setenta y cinco por ciento de protocolos de monoterapia, siendo un cincuenta y siete por ciento paclitaxel y dieciocho por ciento docetaxel. El veinticinco restante de los casos corresponden a protocolos de asociación de paclitaxel con otros quimioterápicos. El número total de ciclos de Paclitaxel administrados a cada paciente varió entre dos y nueve, siendo el número medio de cinco ciclos por paciente para tratamientos con ciclos convencionales de 21 o 28 días.

Se registraron también tres casos de tratamientos con ciclos semanales en un promedio de 11 ciclos. En general una serie de estudios clínicos [11] de fase III demostraron en forma preliminar que un régimen de 80 mgr/m² semanales presentaría un menor índice de efectos adversos que los protocolos ortodoxos de paclitaxel 175 mgr/m² con similar eficacia en términos de respuesta y estabilización de la enfermedad. No obstante, globalmente estos regímenes semanales implican un mayor consumo en dosis de los quimioterápicos.

Se ha constatado de los casos revisados que en general los taxanos son utilizados en casos de cáncer de mama avanzado, dado que el cincuenta y dos por ciento corresponden a casos de estadio III y IV (caracterizados por metástasis linfáticas o a distancia) y un treinta y nueve por ciento de los casos no presentan una estadificación expresada en la historia clínica (dado el tipo de estudio retrospectivo existen casos con datos incompletos como

el TNM exacto o el porcentaje de receptores hormonales); en esta porción de los casos no obstante, como se ve más adelante, las pacientes ya habían recibido otros tratamientos quimioterápicos previos, por lo que pueden interpretarse como casos de cáncer de mama metastático o avanzado.

En un noventa por ciento de las pacientes se habían administrado otros regímenes quimioterápicos previos al tratamiento con taxanos como tratamientos adyuvantes hormonales de tamoxifeno y anastrozol o UFT o ciclos previos de CMF ciclofosfamida, metotrexato, fluoruracilo o FAC ciclofosfamida, doxorubicina, fluoruracilo.

En el cincuenta y un por ciento de las pacientes se recurrió a regímenes quimioterápicos posteriores a la administración de taxanos. En la mayoría de los casos este hecho respondió a una progresión de la enfermedad durante el tratamiento con taxanos. En este caso los citostáticos más comunmente utilizados fueron ciclos accesorios de FAC, CMF o capecitabina.

En un caso se observó el uso subsiguiente de docetaxel al uso inicial de 6 ciclos de paclitaxel. Un veinticuatro por ciento de pacientes utiliza tratamiento hormonal posteriormente a la quimioterapia con taxanos.

ASPECTOS GENERALES REFERIDOS AL COSTO IMPONIBLE AL USO DE TAXANOS

Una variable *output* de estudio farmacoeconómico metodológicamente adecuada es el valor de DDD/1.000 habitantes/día –ecuación –para estudios realizados en el medio comunitario. Los resultados indican la proporción de población que recibe el tratamiento estándar diariamente.

Se determinó el indicador antes descripto, para el uso de taxanos en los años 2002 a 2004 (Tabla 1).

Por lo tanto se comprueba un incremento anual variable si bien presenta tendencia a estabilizarse el consumo, ver Figura 3. La interpretación más probable de este tipo de variación puede darse en función de una condición de demanda retenida durante el año 2002 (consecuencia de la situación económica reinante en ese año). Si bien no se ha incluido en este estudio el consumo de taxanos en el año 2001 por falta de integridad del archivo de datos, algunos meses considerados presentaron una demanda

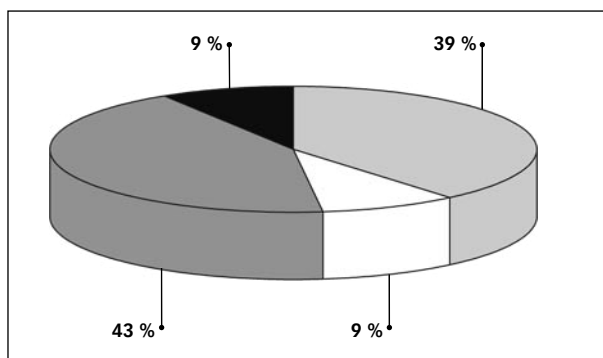


FIGURA 2. Distribución de estadios de cancer de mama al inicio del tratamiento con taxanos. Referencias: ■ = estadio II, □ = estadio III, ■ = estadio IV, ■ = estadio V.

TABLA Nº 1: Indicadores cuantitativos de consumo DDD/1000 habitantes día para los taxanos.

Año	DDD/1000 hab/día paclitaxel	DDD/1000 hab/día docetaxel
2002	0.0136	0.00194
2003	0.0205	0.0029
2004	0.0215	0.0025

en unidades mayor que las del año 2002, demostrando un principio de retracción en el uso de taxanos, presumiblemente por el alto costo.

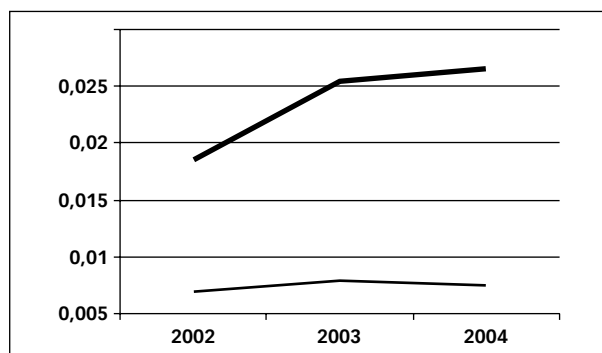


FIGURA 3. Variación de DDD/1000 hab/día años 2002 a 2004.

Referencias: — DDD/1000 hab/día paclitaxel, — DDD/1000 hab/día docetaxel.

El costo de los protocolos de taxanos es superior a todos los protocolos elegibles para el tratamiento de enfermedades oncológicas, si bien esto no debería afectar su utilización en las indicaciones de primera elección como el carcinoma de ovario o el carcinoma de pulmón a células no pequeñas, si debe considerarse y tenderse a reducir en otros tratamientos de segunda elección como el carcinoma de mama avanzado, para los cuales su eficacia comparada solo se basa en observaciones preliminares de porcentaje de respuesta pero no en término de supervivencia global. Este tipo de regulación debe establecerse en función de una adecuada función de auditoría y comunicación con el profesional prescriptor, buscando un mínimo de confrontación y el beneficio de la condición terapéutica del paciente. Con el fin de graficar este concepto (Figura 4), se ha comparado el costo de protocolos utilizables en el tratamiento quimioterápico del cáncer de mama avanzado por ciclo (se utilizaron para los cálculos las dosificaciones más frecuentes para ciclos iv separados por 21 a 28 días: Ciclofosfámid 600 mgr/m² Metotrexato 40 mgr/m² Fluorouracilo 600 mgr/m² -CMF; Fluorouracilo 500-600 mgr/m² Adriamicina 50-60 mgr/m² Ciclofosfámid 500-600 mgr/m² -FAC; Adriamicina 60 mgr/m² Ciclofosfámid 600 mgr/m² -AC; Fluorouracilo 500-600 mgr/m² Epirrubicina 50-60 mgr/m² Ciclofosfámid 500-600 mgr/m² -FEC; docetaxel 80 mgr/m²; paclitaxel 150 mgr/m² y los costos promedios extraídos de las listas de precios al mes de julio 2004).

Este tipo de disquisición es importante si se tiene en cuenta que un sesenta y un por ciento de los pacientes bajo este tipo de tratamiento correspondieron al tratamiento del cáncer de mama, para el cual no está adecuadamente determinada su eficacia en términos de supervivencia global.

En términos de costo general se ha determinado la

proporción general de estos protocolos en el gasto total de la prestación farmacéutica oncológica. Encontrándose en promedio que el veinte por ciento del costo total de la prestación farmacéutica oncológica corresponde al consumo de docetaxel y paclitaxel (32.229 pesos mensuales promedio para el año 2003). Sin embargo, la cantidad de pacientes es mínima con respecto al resto del universo considerado de casos. Desde el punto de vista de variables como la equidad en la asignación de recursos esto determina un dilema dado que analizados los costos de la prestación farmacéutica en forma global: los recursos asignados a estos pacientes son similares al consumo total de insulina para seiscientos pacientes (30.000 pesos mensuales promedio para el año 2003) o para el tratamiento antirretroviral del HIV de 25 pacientes (27.000 pesos mensuales promedio para el año 2003).

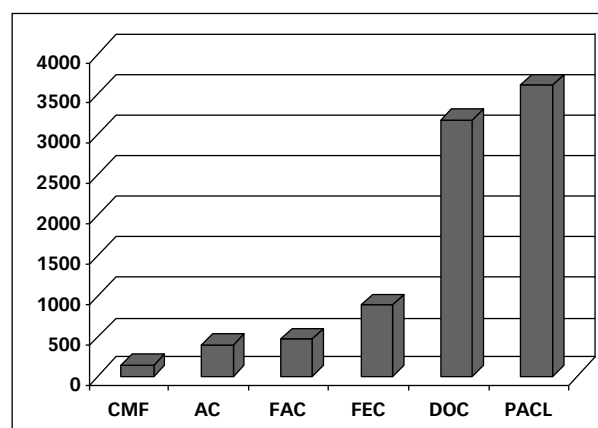


FIGURA 4. Costo comparativo de protocolos de tratamiento de cáncer avanzado de mama (por ciclo).

Con el fin de determinar las diferencias eficacias e indicaciones de los protocolos utilizados se ha recurrido a la referencias de metanálisis y estudio estudios clínicos de uso de taxanos aplicados al tratamiento de cáncer de mama. Se ha seguido como estrategia una búsqueda predefinida usando como bases Medline, Cáncerlit, NCI Cáncer Net (USA), IDIS (Iowa Drug Information Service), LMS alerts and PharmacoEconomics (ADIS International) y The Cochrane Library. Los resultados del estudio de utilización de taxanos muestran que:

Existe una tendencia clara a incorporar a la práctica clínica los resultados de los ensayos clínicos, aún cuando estos sean parciales, lo que explica un número elevado de casos sin indicación específica, si bien se observan escasas desviaciones de los índices encontrados en cuanto a régimen posológico.

Teniendo en cuenta que todavía quedan muchas facetas de la utilización de los taxanos por estudiar, sería deseable la realización de estudios farmacoecónomicos que ayuden a situar a este fármaco en el tratamiento del

cáncer avanzado de mama, teniendo en cuenta su alto precio que puede disparar el costo de tratamiento de esta patología si se utiliza de forma indiscriminada. En el tratamiento del cáncer avanzado numerosos ensayos clínicos indican que los taxanos constituyen la mejor alternativa para pacientes que no responden a las antraciclinas, pero queda la pregunta de si los taxanos son imprescindibles en esquemas de primera línea para enfermedad metastásica. Ensayos clínicos han demostrado que al aplicar estos fármacos se obtienen respuestas superiores a las que generan otros productos y que también se logra mayor supervivencia. El ensayo del Intergroup- CALGB 9344 que con 3170 pacientes [11] demuestra una superioridad del protocolo Adriamicina Ciclofosfamida -Paclitaxel (AC-T) frente a Adriamicina Ciclofosfamida (AC), aunque la actualización del ensayo solo demuestra una superioridad en el subgrupo de pacientes con receptores de estrógeno negativos. Estos datos se encuentran actualmente en revisión dado que otros dos ensayos [11] como son el NSABP B-28 con gran cantidad de pacientes (3060) que compara AC-T frente a AC, sin encontrar diferencias y otro ensayo con menos pacientes, (524) del MD Anderson, que tampoco encuentra diferencias comparando 8 FAC frente 4T-4FAC. En casos de tratamientos de cáncer de mama metastásico, el uso de taxanos se encuentra más estudiado desde el punto de vista clínico (dado que los taxanos presentan su inicial aprobación para los casos de estadios avanzados). Refiriéndonos a un reciente metanálisis [12]. Se identificaron 20 ensayos elegibles y de 17 de ellos se habían publicado al menos algunos resultados, mientras que en 12 se habían publicado datos con respecto al tiempo transcurrido hasta el evento. En general, no se describió la calidad de la asignación aleatoria. Una estimación de 2659 muertes en 3643 mujeres asignadas de forma aleatoria demuestran una diferencia estadísticamente significativa a favor de los regímenes que contienen taxanos, con un odds ratio (OR) para la supervivencia general de 0,90 (IC del 95%: 0,84; 0,97; $p = 0,009$) y ninguna heterogeneidad significativa. Si se restringe el análisis a los ensayos de quimioterapia de primera línea, el OR cambia a 0,92 y deja de ser estadísticamente significativa (IC del 95%: 0,84; 1,02; $p = 0,12$). También hubo una diferencia significativa a favor de los taxanos con relación al tiempo para la progresión (OR general 0,87; IC del 95%: 0,81; 0,93; $p < 0,0001$) y la respuesta general (OR general 1,29; IC del 95%: 1,13; 1,47; $p < 0,0001$); sin embargo, hubo pruebas estadísticas sólidas de heterogeneidad ($P < 0,00001$), la cual probablemente reflejó la eficacia variable de los regímenes de comparación utilizados en los ensayos. Cuando se consideran todos los ensayos, los regímenes que contie-

nen taxanos parecen mejorar la supervivencia general, el tiempo para la progresión y la respuesta general en mujeres con cáncer de mama metastásico. El grado de heterogeneidad encontrada indica que los regímenes que contienen taxanos son más efectivos que algunos, pero no todos, los regímenes que no contienen taxanos.

CONCLUSIONES

La supervivencia y la calidad de vida son las dos variables finales con las que se debe evaluar cualquier tratamiento anticanceroso. En un conjunto de situaciones de alto impacto en cuanto a la proporción del gasto farmacéutico, dado que menos a un cinco por ciento de los pacientes requiere un veinte por ciento del gasto oncológico y con un alto consumo de recursos en aumento vertiginoso por introducción de nueva tecnología, la optimización de estos recursos nos obliga a ofrecer alta calidad a bajo costo, usando los conceptos de eficacia, seguridad, efectividad y eficiencia. Ejemplos paradigmáticos los encontramos en el uso de taxanos en tanto el agente financiador (Seguridad Social) no discrimina estos aspectos en sus tareas de auditorías.

El análisis de la inversión realizada y proyectada en salud en la Argentina expresada como gasto en salud, en porcentaje del producto bruto interno (PBI), indica que esta ha aumentado en forma consistente en las últimas décadas, sin embargo, no se ha visto reflejada cabalmente en la mejoría de varios de los indicadores del área. Claramente, los medicamentos tienen una relación menor costo-efectiva que otros procedimientos terapéuticos. El considerar el análisis farmacoeconómico en cualquiera de sus facetas (minimización de costos, costo-efectividad, costo-utilidad y costo-beneficio) muchas veces se contraponen con el pensamiento volcado en la práctica y educación médicas en las cuales se prioriza la aplicación del tratamiento o procedimiento más eficiente sin importar su costo. Sin embargo, al analizar la definición de costo como aquello que hay que sacrificar como consecuencia de tomar una decisión, se desprende que esta elección priva a otros pacientes de esos recursos con las consecuencias adversas esperadas. En el caso particular del uso de taxanos, los resultados a largo plazo o en términos estrictos de supervivencia no demuestran una superioridad o efectividad definida (si bien presentan resultados relativos positivos en estudios clínicos), no obstante, se incorpora rápidamente a las prestaciones oncológicas usuales, respetando la indicación primaria de uso en cáncer de mama avanzado. Los esquemas de utilización en quimioterapia adyuvante o en casos tempranos presentan una casuística limitada, constatándose

en general un adecuado criterio de utilización de estas drogas de alto costo.

El análisis farmacoeconómico y los estudios farmacoepidemiológicos fueron incorporados al proceso de investigación, desarrollo y seguimiento de uso de nuevos fármacos, por lo que estos no solamente deben demostrar ventajas en cuanto a la eficacia y seguridad respecto de los tratamientos estándares, sino que también deben poseer una mejor relación de costo-efectividad. Es decir, que deben demostrar un espectro total de beneficios más allá de los estudios de eficacia y seguridad.

Las conclusiones de amplios estudios farmacoepidemiológicos sobre situaciones de alta prevalencia como el cáncer de mama avanzado nos pueden ayudar a confeccionar guías clínicas que contemplen el tratamiento específico de mejor eficacia en términos globales, en este sentido el uso de taxanos en el tratamiento del cáncer de ovario o de pulmón no presenta controversias en cuanto a su uso, otros casos como el del tratamiento del cáncer de mama avanzado (sin embargo, con una casuística importante) debería establecerse pautas de tratamiento limitadas a los protocolos de costo más eficiente en beneficio de las utilidades bajo un principio económico de restricción presupuestaria [2]. Desde el punto de vista del cálculo de costo por proceso, los estudios de farmacoeconomía y calidad de vida, nos permitirán desmitificar posturas tópicas de “criterio médico hegemónico” [2] o de encarnizamiento terapéutico.

El componente de ahorro generado por este tipo de análisis puede permitir la disminución de la cápita oncológica de las prestaciones, respecto a otras prestaciones especiales como diabetes, atención primaria, etc. ●

REFERENCIAS

1. WHO Technical Report Series. The selection of essential drugs: report of a WHO Expert Committee. 1977; 615.
2. Laporte, J. R.; Baksaas, I.; Lunde, P. K. M. General background. En Drug Utilization Studies. Methods and uses. WHO Regional Publications. European Series. 1993; 45: 5-10.
3. Wade, O. Concept of drug utilization studies. En Bergman U, Grimsson A, Wahba AHW, Westerholm B, eds. Studies in drug utilization. Copenhagen: WHO Regional Office for Europe, 1979; 3-15.
4. Provencio, R. M. Estudios de utilización de medicamentos Rev Neurol (Barc) 1996; 24 (128): 397-399.
5. Ferguson, J. S. J.; Summerhayes, M.; Masters, S.; Schey, S.; Smith, I. E. New treatment for advanced cancer: and approach to prioritization. Br J Cancer. 2000; 83: 1268-1273.
6. Greco, F. A.; Hainsworth, J. D. Tratamiento Basado en Paclitaxel del Cáncer Pulmonar no microcítico: Perfeccionamiento de la Quimioterapia de Tercera generación Oncology, 1997; 1:27-36.
7. ASHP. ASHP guidelines on the pharmacist's role in drug-use evaluation. Am J Hosp Pharm. 1988; 45: 385-6.
8. Martí, Bernal C.; Bécares Martínez, F. J.; Ortega Gómez, J. M.; Piedra Sánchez, F. Costos del Hospital de Día. Gestión y Evaluación de Costos Sanitarios Vol. 3 - Número 1 - Enero-marzo 2002.
9. Sevilla, E. y cols. Perspectivas actuales y futuras de los taxanos en terapéutica oncológica. El Farmacéutico Hospital. 1997; nº 85: 44-52.
10. Pearce, S.; Kelly, D.; Stevens, W. “More than just money”—widwning the understanding of the cost involved in cancer care. J. Adv. Nurs. 2001; 33 (3): 371-9.
11. Nabholz, Jm.; Reese, D. Combination Chemoterapy for metastatic breast cancer Exper. Rev. Anticanc. Ther. 2 (2) 169-80, 2002.
12. Gherzi, D.; Wilcken, N.; Simes, J.; Donoghue, E. Regímenes con taxanos para el cáncer de mama metastático. The Cochrane Library, 2005 Issue 2. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd.).
13. Murphy, G.; Lawrence, W.; Lenhard, R. Oncología Clínica Manual de la American Cancer Society ED 2 Pub. Cientif N 559 OPS. Washington. 1996.

Rev. Cienc. Tecnol.

Año 8 / Nº 8 / 2006 / 46-50

ACTIVIDAD DE EXTRACTOS CRUDOS DE *CROTON URUCURANA* BAILL SOBRE *ESCHERICHIA COLI*

Kramer, Fernando L.; Bargardi, Severino.

Cátedras de Microbiología e Inmunología y Farmacotecnia I y II, Fac. de Cs.Ex. Qcas. y Nat, UNaM, (Módulo Fcia y Bioq.). Av. M. Moreno 1375, 3300, Posadas, Misiones, Argentina. Correos electrónicos: fkramer@faceqyn.unam.edu.ar o sebarces@fceqyn.unam.edu.ar.

ACTIVITY OF *CROTON URUCURANA* BAILL RAW EXTRACTS ON *ESCHERICHIA COLI*

ABSTRACT

The objective of this research work was the study of the effect of ethanolic extracts, metabolic and aqueous extracts of dried bark of *Croton urucurana* Baill at different concentrations over *Escherichia coli* ATCC 25922.

Results showed that raw extracts are active on *E. coli* depending on their concentration; at higher concentrations they have a lethal effect and at low concentration they do not.

The replacement of ethanol for physiological solution does not affect the sensitivity of *Escherichia coli* ATCC 25922 assayed.

The activity of ethanolic extract concentrated seven times as much, incorporated to the culture medium of agar infusion brain heart, has a lethal effect for this bacterium.

Croton urucurana Baill is known as "sangre de drago" in the ethnomedicine of Misiones. Popular use mentions it in different treatments, from small injuries to more severe infectious diseases; and other non-infectious ones as a healing medicine in ulcers, injuries, snakes bites, etc.

KEYWORDS: *E. coli* sensitivity, plant extracts concentrations, *Crotón urucurana* Baill extract.

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de los extractos etanólicos, metanólicos y acuosos de corteza desecada de *Croton urucurana* Baill a distintas concentraciones sobre *Escherichia coli* ATCC 25922.

Los resultados demostraron que los extractos crudos son activos sobre *E. coli* dependiendo de la concentración, a mayor concentración tienen un efecto letal y baja concentración no tiene esta actividad.

El cambio del etanol por solución fisiológica no afecta la sensibilidad de *E. coli* ATCC 25922 ensayada.

La actividad del extracto etanólico seis veces concentrado incorporado al medio de cultivo de agar infusión cerebro corazón, tiene un efecto letal para esta bacteria.

Croton urucurana Baill se conoce en la etnomedicina misionera como sangre de drago. El uso popular la cita para diversos tratamientos, desde pequeñas heridas hasta enfermedades infecciosas más severas, y otras no infecciosas como cicatrizante en úlceras, heridas, mordeduras de víboras, etc.

PALABRAS CLAVES: Sensibilidad de *E. coli* a extractos; Diferentes concentraciones de extractos vegetales; *Croton urucurana* Baill.

INTRODUCCIÓN

La OMS [1] estima que el 80% de la población mundial utiliza hierbas medicinales, o popularmente llamadas “yuyos”, en la atención primaria de la salud. Se avanzó mucho en este sentido, mejorando los márgenes de seguridad de las especies empleadas debido a la investigación científica, los estudios toxicológicos, nuevos métodos extractivos y ensayos *in vitro* e *in vivo* puestos en práctica en los centros de producción científicos a nivel de grandes laboratorios, pero se está lejos de llegar a las comunidades rurales en países en vía de desarrollo.

A través del Ministerio de Salud Pública de la Provincia de Misiones, se empieza a emplear en forma oficial las hierbas medicinales, especialidades medicinales derivados de ellas, en las farmacias, según lo publicado en un matutino local [1] [2].

La actividad farmacológica citada en la bibliografía que se dispone, se refiere mayormente a *C. lechleri*, que no se encuentra en nuestra región, y a la cual mayormente se hacen referencias aquí, pero solamente como antecedentes. *Croton urucurana* Baill, fue confundida durante muchos años [3] con otras especies derivadas de otros géneros y familias como por ejemplo *Calamus*, *Pterocarpus draco*, *Dracaena draco*. A todas ellas y algunas otras, se las menciona como “sangre de drago”.

Safrín y cols. en 1994 [4] mencionan la actividad inhibitoria sobre virus herpes tipo 1 y 2, incluyendo los resistentes a drogas antivirales conocidas como el aciclovir y foscarnet. Al zumo “rojo vinoso” extraído por incisión en la corteza del árbol le atribuyen una actividad inmunomoduladora muy grande o potente acción inhibidora del complemento, tanto en la vía clásica como en la vía alternativa; además sobre la proliferación de células T, la fagocitosis y actividad antioxidante.

Otros autores [5] hacen referencias a que facilita y ayuda en la cicatrización de heridas, tanto en piel como mucosas debido al alcaloide taspina, 3'-4-O-dimetilcedrusina, catequisas y a las proantocianidinas.

El uso popular [4] [5] [6] [7], lo relaciona con el tratamiento de enfermedades de naturaleza infecciosas de origen bacteriano y viral. También con otras enfermedades no infecciosas como hemostático, astringente y para obturar caries dentales calmando el dolor, para curar llagas bucales de los niños en forma de buches, cicatrizante en úlceras, heridas externas, bronquitis, asma, hemorragias internas, anemia, trastornos renales, disenterías, lavados vaginales.

Existen numerosos trabajos de investigación sobre la actividad antimicrobiana de extractos vegetales de diversas especies vegetales, tanto de nuestro país como

del extranjero [8] [9] [10] [11] [12] [13] [14], señalando esta actividad en aceites esenciales de frutos, semillas, hojas, y otras partes de la planta.

La especie que empleamos en este trabajo fue *Croton urucurana* Baill que pertenece a la familia de las *Euphorbiaceae*, y al género *Croton*.

En nuestro país esta especie se desarrolla en forma natural principalmente en islas y costas de los ríos Uruguay, Paraná y Paraguay en las provincias de Misiones, Formosa, Chaco, Corrientes, Entre Ríos y Santa Fe pero también en los países limítrofes como Brasil, Paraguay y Uruguay. Aunque se menciona que el área de dispersión de esta especie se ubica en zonas tropicales y subtropicales de América del Sur [5].

El árbol que encontramos en nuestra región llega a una altura de 7-8 metros de altura y presenta una copa redondeada, tronco recto cilíndrico, de corteza gris-verdosa.

El objetivo de este trabajo fue determinar la actividad de extractos crudos de *Croton urucurana* Baill sobre *E. coli*, que es una bacteria aeróbica de desarrollo rápido cuya presencia es causa reconocida de enfermedades e infecciones. Esta y otras bacterias [11] [15] aparecen en alta frecuencia en pacientes intra y extra hospitalarios.

En el presente trabajo se estudió la actividad antibacteriana *in vitro* de extractos crudos de la corteza desecada de *Croton urucurana* Baill, frente a la cepa patrón de *E. coli* ATCC 25922, suministrada por INEI- ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán”.

Se empleó con este propósito el método conocido y estandarizado de Kirby-Bauer [16]. También se ensayó el extracto etanólico concentrado de la corteza de *C. urucurana* Baill, como un componente básico del Agar infusión cerebro corazón [17].

MATERIALES Y MÉTODOS

Las muestras de corteza se obtuvieron por incisión y cortes de la corteza de árboles en pie ubicados en la zona costera del Río Paraná próxima a la ciudad de Posadas (Misiones). Esto se realizó de acuerdo a las costumbres de los lugareños. Una vez recolectadas se colocaron en bolsas plásticas y se transportaron al laboratorio.

La corteza recolectada se sometió a un secado natural en lugar fresco y seco durante 15 días y posteriormente en estufa a 45°C durante 48 hs, se llevó a molienda en un molino a cuchillas tipo Willey. Se conservó en recipientes apropiados en lugar seco.

Para la obtención de los extractos, se sometieron 10 gramos de corteza seca molida (Cs) a maceración en 100 ml de etanol de 96° a temperatura ambiente, durante 72

horas con agitaciones periódicas; también se obtuvieron extractos metanólico al 10%, con el mismo procedimiento.

Se filtró por papel Whatman N°1 en un embudo Büchner y el filtrado se conservó fraccionado en tubos estériles, a -20°C , hasta su empleo.

Con estos extractos se realizaron los siguientes ensayos:

A) Sensibilidad por el método de Kirby-Bauer.

B) Actividad de extractos etanólicos con cambio de solvente.

C) Ensayos con extractos concentrados al séxtuplo como componente de medio de cultivo en agar infusión cerebro corazón (AICC).

D) Extractos concentrado al séxtuplo con cambio de solvente.

A) Para realizar las pruebas de sensibilidad se empleó el método de Kirby-Bauer de difusión en discos. Se aplicó este método tanto para extracto etanólico conservado a -20°C de 0,123 mg/ml de concentración, como para extracto metanólico de 0,210 mg/ml, determinados en 10 ml de cada uno de ellos llevados a sequedad hasta peso constante.

Se emplearon discos de papel de filtro Whatman N° 3 de 6 mm de diámetro impregnados con 25 μl , 50 μl , 100 μl y 200 μl de extractos etanólicos, colocados sobre una lámina de papel metalizado puesta sobre una plancha térmica graduable, a una temperatura de 80°C . El mismo procedimiento se empleó con los extractos metanólicos. El uso de esta plancha térmica nos permitió eliminar el solvente de los discos en forma rápida y conservarlos en frascos estériles a temperatura ambiente.

Se empleó como cepa de prueba el cultivo joven de 24 horas de *E. coli* ATCC 25922. a una concentración equivalente a 0,5 Mc Farland N°1. Se dispersó esta suspensión sobre una placa de Agar Müller Hinton (AMH) previamente preparada y se dispusieron sobre ella cada uno de los discos preparados con extractos etanólico y metabólico, y se incubó todo en estufa a 37°C durante 18 horas. Al cabo de este tiempo se obtuvo como resultado el desarrollo de *E. coli* ATCC 25922 alrededor del disco sin formación de halo de inhibición, para ambos extractos.

A raíz de este resultado de sensibilidad se decidió continuar el trabajo utilizando solamente extractos etanólicos y la *E. coli* que resultó resistente que de ahora en adelante se la llamó *E. coli* R.

Para esto se sembraron dos tubos de agar nutritivo pico flauta (ANPF), para la cepa resistente, *E. coli* R, y la *E. coli* ATCC 25922 (=patrón).

Con los extractos etanólicos se realizaron los siguientes ensayos:

A) Con un tubo (T1) conteniendo extracto etanólico se realizó el primer ensayo para determinar la sensibilidad de la cepa patrón *E. coli* ATCC 25922 por el método de Kirby-Bauer ya descrito. Como resultó resistente al mismo (= *E. coli* R), se separó para realizar el ensayo B). Para esto se sembró la misma cepa en otro ANPF como control de viabilidad de la cepa, y la cepa patrón *E. coli* ATCC 25922 en ANPF. Posteriormente se incubaron a 37°C por 18 horas. Se observó desarrollo en ANPF de los dos controles.

B) Para este segundo ensayo se empleó otro tubo (T2) de extracto etanólico conservado a -20°C . Se evaporó el etanol y llevó a sequedad, luego se reemplazó el etanol por solución fisiológica estéril. Se sembró la cepa *E. coli* R obtenida en (A) directamente en el extracto y en un ANPF para control de viabilidad de la cepa, no se observó desarrollo en el extracto y si en ANPF.

C) En el tercer ensayo se empleó otro tubo (T3) de extracto etanólico se llevó a baño María hasta concentrar 6 veces en valor inicial. Posteriormente en una placa esterilizada se mezcló este extracto concentrado con Agar infusión cerebro corazón (AICC), y una vez solidificado el medio y evaporada el agua de condensación, se sembró en ella la cepa *E. coli* R y la cepa patrón *E. coli* ATCC 25922. Se incubó a 37°C durante 18 horas. No se observó desarrollo de ninguna de las bacterias sembradas.

E) En el cuarto ensayo se usó otro tubo (T4) con extracto conservado a -20°C , se llevó a sequedad en baño María y se redisolvió en solución fisiológica estéril, con lo cual se cambió el solvente. La cepa *E. coli* R se sembró directamente: 1) en el extracto rediseñado, 2) en AICC y 3) en caldo nutritivo (CN). La cepa *E. coli* ATCC 25922 se sembró en CN y AICC. Se incubaron a 37°C durante 18 horas y se obtuvo como resultado la falta de desarrollo de *E. coli* R en el extracto concentrado pero si hubo desarrollo en CN y AICC. Con la cepa *E. coli* patrón hubo desarrollo en CN y AICC, que actuó como control de viabilidad de la cepa.

RESULTADOS

En las condiciones de pruebas se obtuvieron los siguientes resultados:

Con el método de Kirby-Bauer, la prueba difusión en agar con discos de diferentes concentraciones la sensibilidad la cepa de *E. coli* ATCC 25922 resultó resistente al extracto crudo sin concentrar.

En los ensayos restantes se pudo observar que la cepa *E. coli* R y la cepa *E. coli* ATCC 25922 resultaron sensibles en presencia extracto con y sin cambio de solvente a solución fisiológica.

Las cepas *E. coli* R y la cepa *E. coli* ATCC 25922 resultaron sensibles al extracto seis veces más concentrado, tanto por acción directa del extracto sobre la cepa, como en el medio AICC+ extracto concentrado al séxtuplo.

DISCUSIÓN

Observamos que *E. coli* ATCC 25922, tiene un comportamiento de sensibilidad variable según cual sea la concentración del extracto y en las condiciones en que este se encuentra.

Esto se observó cuando la bacteria se enfrentó a extractos crudos de *C. urucurana* en distintas condiciones de trabajo:

a) La resistencia de *E. coli* a extracto colocado en disco, aún cuando estos contengan 200 µl, casi 8 veces más concentrado, nos resultó paradójico ya que no sucede lo mismo cuando colocamos la bacteria directamente en extracto crudo sin concentrar (B) o concentrado 6 veces (E) o mezclado como componente del medio AICC (C) donde tampoco desarrolla.

También podemos decir que él o los agentes activos no sufren cambios de actividad al cambiar el solvente orgánico por solución fisiológica, lo que nos indicaría que la solubilidad es la misma tanto en etanol y metanol como en el agua o solución fisiológica.

Notamos también que la variación de comportamiento del extracto puede estar en el momento de la obtención de la muestra que difiere de otros estudios sobre el tema [3] [4], pero aquí debemos observar que el uso popular es del zumo y no la corteza como se empleó en este trabajo.

Debemos señalar que se debe seguir investigando debido a que según otros trabajos [7] [10] los extractos de *Croton* tienen actividad antifúngica.

CONCLUSIONES

En las condiciones de prueba los extractos de corteza desecada de *Croton urucurana* Baill, obtenidos por el método de maceración con metanol o etanol 96° tuvieron actividad sobre *E. coli* ATCC 25922 y el cambio de etanol por solución fisiológica no modifica este comportamiento. Estos nos sugiere que los extractos poseen agentes bioactivos que son solubles en los tres solventes polares ensayados.

Para realizar un medio selectivo e inhibidor, empleamos el Agar Infusión Cerebro Corazón que normalmente es un medio enriquecido que favorece el desarrollo de bacterias exigentes. Fue posible transformar este medio, de nutritivo a selectivo e inhibidor, cuando se incorporó el extractos de corteza desecada de *C. urucurana* Baill, como constituyente del medio de cultivo, al inhibir total-

mente a *E. coli* ATCC 25922.

Es necesario profundizar los estudios sobre esta especie vegetal para encontrar los componentes activos de los extractos y ampliar los ensayos a otras bacterias y hongos.

AGRADECIMIENTOS

A las autoridades del Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico (CIDET), por el apoyo brindado.

A Cintia Crudeli y Marcos G. Juárez por la colaboración en tareas técnicas. ●

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Mónica Santos.

Fitoterapia: Una alternativa saludable que se oficializa en Misiones. Primera Edición. Pág. 8-9. 2004. Panam. S.A. 1976.

2. Alonso, Jorge; Desmarchelier, Cristian.

Sangre de Drago. Plantas medicinales autóctonas de la Argentina. Base científica para su aplicación en la atención primaria de la salud. Monografía, pág. 515-519. Ed. Lola. 2005.

3. <http://www.herbotecnia.com.ar/7autsangredragon.tml> (verif. 17/02/2005).

4. <http://www.perunatural.es.fm>, mayo 2000.

5. <http://micol.fcien.edu.uy/flora/Croton--urucurana.html>, marzo de 1998.

6. Martínez Croveto, Raúl.

Plantas utilizadas en medicina popular en el nordeste de Corrientes. Fundación Miguel Lillo. Tucumán. P. 87.

7. La casa Naturista "El Norteño la Perla del Ciira o Citra. Marbete frasco, 2004.

8. Jordá, Graciela; Jerke, Gladis; Horianski, Marta; Kramer, Fernando L.; Crudeli, Cintia; Juárez, Marco G.; Salvatierra, Karina; Amer, Lidia; Guida, Adriana; Bargardi, Severino.

"Actividad antibacteriana de extractos crudos de *Croton urucurana* Baill y su relación con la concentración".

Annais. Pág. 186-190. Pato Branco Brasil. 19/11/2004.

9. Bargardi, Severino; Kramer, Fernando L.; Medvedeff, Martha G.; Jordá, Graciela B.; Guida, Adriana M.

"Actividad antibacteriana de *Peschieria australis* (Müell.) Miers. sobre *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*" Rev. Ciencia y Tecnología. Fac. de Cs. Ex. Qcas. y Nat. UNaM. Año 4n.4, p.6-11. 2001.

10. Machado, J. Octavio; Dos Santos, Edamir; Lefèvre, D.V. Ana.

"Actividade antibacteriana de extractos de *Biden pilosa* L.". Rev. Ciénc. Farm. 10: p 55-62. Sao Paulo. Brasil. 1988.

11. Guida, A. M.; Kramer, F. L.; Jordá, G. B.; Amer, L. S.; Medvedeff, M. G.; Bargardi, S. C.

“*Staphylococcus aureus* Meticilino Resistentes, sensibles a extractos de *Tabernaemontana catharinense* A.DC.” *Acta Farmac. Bonaerense*. y.20 n.3.P.205-208. 2001.

12. Stauffer, B. Alfredo; Orrego, F., Aida; Aquino, J. Alicia. Selección de extractos vegetales con efecto funguicida y/o bactericida. *Rev. C.y Tecnología. Direc.de Invest. UNA*. Vol.1 N°2, 29-33. 2000.

13. Perez Perdueles, Ángel; Hurftado, Adán Tania. Actividad antimutagénica de extractos vegetales sobre la aflatoxina B1. *Rev. Cubana de Nutrición*. 11 (1): Pág.1-4. 1997.

14. Van Beek, T. A.; Deelder, A. D.; Verpoorte, R.; Svendsen Baerheim, A.

Antimicrobial, antiamoebic antiviral screening of some *Tabernaemontana* species. *Planta Médica*. Pág. 180-185. 1984.

15.- De Battista, G. A.; Guida, A. M.; Bargardi, S. C.

“Estudio fitoquímico y actividad antibacteriana de *Polygonum punctatum Elliot*”. *Rev. Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. V. 35. n .3. P. 11-14. 2004.

16. Balows, Albert.

Prueba de susceptibilidad a los antibióticos. Cap.2. P. 16-25. Ed. Méd.

17. Robledo, M. G.

“Extractos de *Tabernaemontana catharinense* A.DC como potencial componente en medios de cultivo bacteriano”. Inédito. 2000.

GUÍA PARA AUTORES

I. ALCANCE DE LA REVISTA

1) La Revista de Ciencia y Tecnología (Rev. cienc. tecnol.) publica artículos originales que representan una contribución para el desarrollo científico-tecnológico. Incluye trabajos de investigación básica y aplicada y de desarrollo tecnológico, revisiones bibliográficas de alto impacto, notas técnicas y, eventualmente, estudios de casos que por su relevancia ameriten publicarse¹.

2) Las áreas de incumbencia de la revista son las ciencias exactas, químicas y naturales con su correspondiente tecnología. La decisión última sobre la incumbencia de un artículo presentado, quedará a cargo del Consejo de Dirección (CD).

3) Los autores interesados en publicar artículos en la Rev. cienc. tecnol., deberán enviar sus trabajos de acuerdo con las normas que se estipulan más abajo.

4) Los artículos sometidos para publicación no deberán tener "Derechos de Autor" otorgados a terceros, a la fecha de envío del artículo. Caso contrario, el autor deberá gestionar, ante quien corresponda, la autorización por escrito para su nueva publicación en la Rev. cienc. tecnol.

5) Los conceptos y opiniones vertidos en los artículos publicados y del uso que otros puedan hacer de ellos, son de exclusiva responsabilidad de los autores, la cual se asume con la sola presentación del artículo enviado por los autores para su publicación. Los artículos se publicarán en castellano o inglés, con resúmenes, títulos y palabras clave en ambos idiomas.

II. PRESENTACIÓN Y REVISIÓN DE ARTÍCULOS

6) Los idiomas oficiales de la Rev. cienc. tecnol. son castellano e inglés. Los manuscritos en castellano deberán ajustarse a las normas y usos gramaticales que establece el Diccionario y la Gramática de la Lengua Española de la Real Academia Española en sus últimas ediciones. Se debe evitar el uso de términos en otros idiomas, si existe

uno equivalente en castellano. Los manuscritos en inglés deberán ajustarse a las normas y usos gramaticales que establece el Longman Dictionary of Contemporary English 4th Edition, aplicándose, aquí también, lo expresado respecto del español.

7) El manuscrito se presentará en 1 (una) copia impresa y en formato electrónico como archivo tipo Word (en disco o anexo por correo electrónico) en las oficinas del Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico (CIDEt)².

8) Los trabajos presentados para publicar serán sometidos a una primera evaluación interna de incumbencia, calidad general y categoría a cargo del CD y posteriormente a una evaluación externa de pertinencia y calidad científica por miembros del Consejo de Edición, (CE). El CE está integrado por reconocidos especialistas en los temas de incumbencia de la Rev. cienc. tecnol.

9) El proceso general de evaluación consiste en una exhaustiva revisión crítica de los contenidos y la estructura del artículo, la recomendación, o no, de su publicación y eventuales correcciones.

10) El CD se reserva el derecho de rechazar el trabajo por no ajustarse a las áreas involucradas, no cumplir las normas establecidas o no poseer la calidad científica requerida. También se reserva el derecho de realizar modificaciones menores de edición para una mejor presentación final del trabajo.

11) El CD notificará al autor la aceptación o rechazo del artículo. De ser necesario, le solicitará que realice las modificaciones recomendadas para proceder a los trámites pertinentes previos a su publicación.

12) Los autores deberán realizar las correcciones y modificaciones requeridas por el CD y el CE en el plazo de 30 días. Los autores podrán solicitar al CIDEt aclaraciones a las correcciones. El CD decidirá sobre el particular, y realizará la revisión del trabajo modificado.

13) La aceptación del trabajo en su forma definitiva será comunicada por escrito a los autores. A partir de este momento no se aceptarán modificaciones, salvo solicitud

1- Un artículo se considera trabajo cuando representa el resultado y las conclusiones de una investigación completa. Este tendrá categoría de nota técnica cuando trate de cuestiones como calibraciones, propuestas metodológicas, opiniones sobre normas, resolución de problemas operativos, etc.

2- Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico, Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales - Universidad Nacional de Misiones, Félix de Azara 1552 (3300) Posadas, Misiones, Argentina.

explícita y fundamentada al CD.

14) Los trabajos originales quedarán en poder del CIDeT, se publiquen o no.

II. NORMAS DE ELABORACIÓN DE ORIGINALES

15) Los artículos completos deberán tener como máximo 6.000 palabras, 12 figuras y hasta 20 páginas. El CD podrá aceptar trabajos de mayor extensión en casos especiales. Las notas técnicas no deberán superar las 10 páginas. En todos los casos deberá utilizarse letra tipo Arial tamaño 11 puntos, y formato de hojas tipo A4, numeradas en el margen inferior derecho, con interlineado doble, sin separación automática de sílabas al fin de línea y con los cuatro márgenes de 2,5 cm.

16) Las tablas y figuras deberán insertarse en el texto del artículo y deberán ubicarse lo más cerca posible del sitio en el que son mencionadas. De acuerdo con su tamaño, podrán presentarse por separado, correctamente identificadas. Las figuras escaneadas deberán estar en formato TIFF y EPS, con 300 dpi de resolución. El CD podrá pedir a los autores, una vez aceptado el trabajo, que entregue las imágenes y los gráficos del artículo, con el formato, tamaño, dimensiones, resolución, etc. necesarios para la edición.

17) Los artículos científico-técnicos se organizarán siguiendo el esquema general en orden sucesivo: título en castellano, nombres del (los) autores, nombres y direcciones de la institución a la que pertenecen, título en inglés, resumen y palabras clave en inglés, resumen y palabras clave en castellano. Posteriormente, en el idioma que corresponda, introducción, materiales y métodos, resultados y discusión, (juntos o separados), conclusiones, lista de abreviaturas (si corresponde), agradecimientos, referencias y apéndices o anexos (si corresponde).

18) Título en castellano: Deberá ser breve (no mayor de 15 palabras), conciso y reflejar aspectos específicos del trabajo. Deberá corresponderse con el título en inglés.

19) Autores: Se colocarán los autores separados por punto y coma, situando primero el o los apellidos seguidos de una coma, y a continuación, el primer nombre e inicial del segundo con un punto.

20) Dirección: Debajo de los autores se indicará la institución a la que pertenecen o dónde fue llevado a cabo el trabajo. Si los autores pertenecen a distintas instituciones, luego de cada nombre se colocará un número entre paréntesis, estableciéndose así la referencia a las instituciones y sus respectivas direcciones. Se sugiere

incluir los nombres de las secciones y dependencias imprescindibles. Señalar, entre paréntesis, las direcciones electrónicas personales.

21) Título en inglés: Deberá ser breve (no mayor de 15 palabras), conciso y reflejar aspectos específicos del trabajo. Deberá corresponderse con el título en castellano.

22) Resumen en inglés (abstract): Deberá ser una condensación de todas las partes del trabajo en 150 palabras como máximo, sintetizando los objetivos, los métodos, los resultados y las conclusiones. Debe corresponderse al contenido del Resumen en castellano.

23) Palabras clave en inglés (Key words): El artículo deberá contener 5 palabras clave en idioma inglés, que servirán para catalogarlo en las bases de datos.³

24) Resumen en castellano: Deberá ser una condensación de todas las partes del trabajo en 150 palabras como máximo, sintetizando los objetivos, los métodos, los resultados y las conclusiones. Debe corresponderse al contenido del Resumen en inglés.

25) Palabras clave en castellano: El artículo deberá contener 5 palabras clave en idioma castellano, que servirán para catalogarlo en las bases de datos.³

26) Introducción: Debe presentar claramente el tema, haciendo solamente referencia a los antecedentes bibliográficos de interés. Los objetivos y las hipótesis deberán estar adecuadamente explicados.

27) Materiales y Métodos: El trabajo deberá describir en forma completa los materiales y metodologías utilizados. Las normas reconocidas deberán ser citadas pero no explicadas. Las técnicas publicadas deberán presentar en forma resumida sus características principales y las referencias correspondientes. Deberán detallarse todas las modificaciones efectuadas a cualquier norma o técnica.⁴

28) Resultados y Discusión: Estas dos secciones podrán incluirse juntas o separadas. Los resultados se expondrán con estilo conciso y fácilmente entendible. La discusión de los resultados incluirá la comparación con resultados previos (propios o de otros autores, con las referencias correspondientes). Se deberá evitar la duplicación de información en tablas y gráficos.

29) Conclusiones: Deben presentarse en párrafos cortos y concretos. No deben hacer referencia a trabajos futuros ni a hipótesis no incluidas en el trabajo.

30) Agradecimientos: Podrán incluirse a los organismos que financiaron el trabajo, así como a los colaboradores y al personal técnico o especializado, especificando las tareas realizadas por cada uno. Como referencia ins-

3- Si la disciplina que trata el artículo posee tesauros publicados, se sugiere utilizarlos para la definición de las palabras clave.

4- El criterio general es que con los datos de este ítem se pueda replicar correctamente el trabajo experimental.

titucional de los autores se colocará el nombre completo de la entidad y la sigla entre paréntesis, por ejemplo, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

31) Referencias: Las citas bibliográficas deberán consignarse con números correlativos colocados entre corchetes o paréntesis, de tamaño igual al del texto. El texto puede incluir nombres de autores, pero conjuntamente figurar el número de referencia bibliográfica correspondiente. En el ítem correspondiente, se consignarán según el orden en que aparezcan en el texto. No se incluirán referencias que no figuran en el texto. Las referencias se colocarán según el estilo de la disciplina correspondiente, figurando, en todos los casos: apellido e iniciales de los nombres de los autores en ese orden; nombre de la publicación periódica completo o con las abreviaturas oficiales; volumen; número, páginas inicial y final, año de publicación⁵. En el caso de libros: nombre; capítulo; editorial, páginas y año de edición. Las páginas web deberán tener la fecha de consulta.

Ejemplos orientativos:

1. Atanassov, Z; Zheringe, P.; Wharton, D. *Evaluation of Wheat Response to Fusarium Head Blight Bases on Seed Set*. Appl. Environm, Chem. 48. P. 993-998.1994.

2. Cole, R.J. y Cox R.H. *Handbook of Toxic Fungal Metabolites*. Assoc.Press, New York. P. 356-379.1981.

3. Cotty, P.J. *Agriculture, Aflatoxins and Aspergillus in The genus Aspergillus*. K.A. Powll, Editor. Plenum Press, New York. P. 1-27.1994.

4. National Agricultural Statistics Service (1997) Crops county data [Online]. Available at <http://usda.mannlib.cornell.edu/data-sets/crops/9X100> (verified 30 Nov. 1998).

32) Apéndices o Anexos: Se reservan para detallar técnicas originales utilizadas o análisis teóricos que impedirían seguir fluidamente el trabajo si se incluyeran en el texto. Las tablas de los apéndices pueden llevar números correlativos con los del texto o comenzar otra numeración.

33) Figuras: Las figuras (gráficos, cuadros, fotografías, otros) deberán numerarse correlativamente en orden de aparición en el texto y deberán incluir un breve título explicativo en la parte inferior de la figura. Las imágenes y fotografías se designarán como figuras.

34) Tablas: Las tablas deberán numerarse correlativamente según su orden de aparición en el texto y en forma independiente de las figuras. Deberán incluir un título explicativo en su parte superior. De ser necesario se agregarán al pie notas explicativas para detallar abreviaturas, signos, medidas, otros, de tal manera que el lector pueda comprender su contenido sin recurrir al texto.

35) Fórmulas: Las fórmulas y expresiones matemáticas deberán ser escritas dejando dos espacios sobre, debajo y entre cada una de ellas. Las fórmulas se ajustarán al margen izquierdo y serán numeradas correlativamente y entre paréntesis sobre el margen derecho. Debe quedar definido el significado y las unidades utilizadas en cada término de las expresiones.

36) Unidades: Debe utilizarse el sistema internacional de unidades (SI).

37) Presentar además: Un título resumido del trabajo, de 9 palabras como máximo.

Datos de los autores: Apellido y Nombres; Título de Grado; Estudios de Posgrado; Cargo / Posición en el lugar de trabajo; Categoría en el Sistema de Incentivos a los Docentes-Investigadores (si es argentino) o similar.

5- Además de las que poseen signatura, se podrán colocar referencias inéditas o en prensa (indicando la revista en que se publicarán), comunicaciones personales y páginas web.

GUIDE FOR CONTRIBUTORS

I. SCOPE OF THE JOURNAL

1) The Science and Technology Journal (Rev. cienc. tecnol.) publishes original articles which represent a contribution to scientific and technological development. It includes basic and applied research and technological development works, bibliography reviews of high impact, technical notes, and occasionally, case studies deserving being published because of their relevance¹.

2) The areas of coverage of the Journal are the exact, chemical and natural sciences with their corresponding technology. The ultimate decision about the pertinence of an article submitted, will be in charge of the Board of Director (BD).

3) Contributors interested in publishing articles in the Rev. cienc. tecnol. will submit their work in accordance with the norms specified below.

4) The articles submitted for publication should not have "copyright" granted to third party, to the date of submission of the article. If so, the contributor will have to obtain, before whom it may concern, the written authorization for this new publication in the Rev. cienc. tecnol.

5) The concepts and opinions expressed in the articles published and the use others could make of them are of exclusive responsibility of the contributors, which is assumed from the contributors solely submitting the article for its publication. The Journal will be published in Spanish and English, with titles, abstracts and keywords in both languages.

II – SUBMISSION AND REVIEW OF ARTICLES

6) The official languages of the Journal are Spanish and English. The manuscripts in Spanish will follow the grammar rules and usage established by the latest edition of the Diccionario de la Real Academia Española. Terms in foreign languages must be avoided, if an equivalent expression in Spanish exists. The manuscripts in English

will follow the grammar rules and usage established in the Longman Dictionary of Contemporary English 4th Edition, being applied here what is mentioned about the Spanish language.

7) The original will be submitted in 1 (one) printed copy and in electronic format as a Word file (in a disk or as an attachment by e-mail) in the office of CIDeT².

8) The works for publication will be submitted to a first internal evaluation of pertinence, general quality and category in charge of the BD, and subsequently to an external evaluation of relevance and scientific quality by members of the Editing Board (EB). The EB is made up of well-known specialists in their corresponding fields from the Rev. cienc. tecnol.

9) The general process of evaluation consists of a detailed critical review of the contents and the structure of the article, the recommendation or not of its publication, and occasional corrections.

10) The BD reserves the right to reject the work which does not belong to the areas involved, does not follow the norms established or does not have the scientific quality required. Also, it reserves the right to carry out minor modifications of edition for a better final presentation of the work.

11) The BD will notify al author the acceptance or rejection of the article. If necessary, they will be requested to carry out the modifications suggested to proceed to the pertinent procedures prior to publication.

12) Contributors will carry out the corrections and modifications required by the BD and the EB within 30 days. Contributors will be able to request explanations for the corrections to the CIDeT. The BD will decide in this case, and will carry out the review of the rewritten work.

13) The acceptance of the work in its definitive form will be communicated to the contributors in written form. Since then, modifications will not be accepted, except explicit and justified request before the BD.

14) The original works will remain at the CIDeT,

1- An article is considered a piece or work when it presents the result and the conclusions of a complete research work. This will have the category of technical article when it treats issues like calibrations, methodological proposals, opinions on norms, resolution of operative problems, etc.

2- Center for Research and Technological Development. School of Exact, Chemical and Natural Sciences, National University of Misiones. 1552 Felix de Azara St. (3300) Posadas, Misiones, Argentina

whether published or not.

II – MANUSCRIPT WRITING RULES

15) The maximum number of words for each article is 6.000 words, 12 figures and up to 20 pages. The BD could accept longer contributions in special cases. The technical notes should not be over 10 pages. In all cases, Arial font 11, and sheet size A4 should be used, numbered on the right lower margin, double spaced and the four margins of 2.5 cm.

16) Tables and figures will be inserted in the text and located as close as possible to the place where they are mentioned. According to their size, they could be presented separately, appropriately identified. The scanned figures will be in TIFF and EPS, and with 300 dpi of resolution. The BD could ask contributors, once the work has been accepted, to submit the figures and the graphs of the article, with the format, size, dimensions, and resolution, etc., necessary for editing.

17) The scientific-technical articles will be organized following the general plan in successive order: title, names of contributor/s, names and addresses of their institution, title, abstract, summary, keywords in English, summary and keywords in Spanish. Afterwards, in the corresponding language: introduction, materials and methods, results and discussion (together or separate), conclusions, list of abbreviations (if pertinent), acknowledgements, references and appendices or attachments (if pertinent).

18) Title in Spanish: It will be brief, (no longer than 15 words), concise and it will reflect specific aspects of the work. It will correspond to the title in English.

19) Contributors: Names of contributors will appear separated by semicolons, mentioning surname/s first followed by a comma, next the first name and initial of the middle name followed by a stop.

20) Address: Under the name of the author, the name of the institution of the contributor or the place where the work was carried out will appear. If they belong to different institutions, a number between brackets after each name will indicate their institutions and their respective addresses. The inclusion of the names of essential departments/organizations is recommended. Also, personal e-mail addresses will be included between brackets.

21) Title in English: It will be brief (no more than 15 words), concise and will reflect specific aspects of the

work. It will correspond to the title in Spanish

22) Abstract in English: The abstract will reflect the content of the work written in English.

23) Key words: Key words must be expressed in English.³

24) Summary in Spanish (resumen): All parts of the work will be condensed into no more than 150 words, summarizing the objectives, the methods, the results and the conclusions. It will correspond to the abstract in English

25) Key words in Spanish (palabras clave): The article will include 5 key words in English and Spanish which will make it possible to catalogue it in the databases³.

26) Introduction: It will clearly present the topic, making reference only to bibliographic references of interest. The objectives and hypotheses of the work will be properly described.

27) Materials and Methods: The contribution will thoroughly describe materials and methods used. Well-known rules will be cited only but not explained. The published techniques must briefly present the main characteristics and the corresponding references. Modifications made to any technique will be fully detailed.⁴

28) Results and Discussion: Both sections can be included together or separately. The results will be shown with a concise and easily comprehensible style. The discussion of the results will include the comparison with previous results (own or of other authors' results, with the corresponding references). Duplication of information in charts and graphs will be avoided.

29) Conclusions: They will be presented in concrete short paragraphs. They will refer neither to future works nor to hypotheses not included in the work.

30) Acknowledgements: Organisms financing the work may be included, as well as collaborators, and specialized or technical personnel, specifying the task performed by each of them. In the contributor's affiliations, the full name of the entity with its acronym between brackets, for example, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) will be admitted.

31) References: The bibliography will be mentioned and numbered with the number between round or square brackets, with the same font of the text. Names of authors may be included in the text but together with the corresponding bibliographic reference number. In the corresponding item, they will be mentioned in the order of appearance in the text. References not used in the text

3- If the article belongs to a discipline with publisher tesauro, they should be used for the definition of key words

4- General criteria assumes with data from this item experimental work could appropriately replicated

will not be included. As regards the reference format, they will appear according to the corresponding disciplines, appearing in all cases, the surname and the initials of the names of the authors will be mentioned in this order; full name of the journal or their official abbreviations; issue, number, first and last pages, year of publication⁵. In the case of books: name; chapter; publisher, page number and editing year. Web pages will contain date of access.

Guiding examples:

1. Atanassov, Z.; Zheringe, P.; Wharton, D. *Evaluation of Wheat Response to Fusarium Head Blight Bases on Seed Set*. Appl. Environm, Chem. 48. P. 993-998. 1994.
2. Cole, R. J. and Cox, R.H. *Handbook of Toxic Fungal Metabolites*. Assoc. Press, New York. P. 356-379. 1981
3. Cotty, P. J. *Agriculture, Aflatoxins and Aspergillus in The genus Aspergillus*. K. A. Powll, Editor. Plenum Press, New York. P. 1-27. 1994.
4. National Agricultural Statistics Service (1997) Crops county data [Online]. Available at <http://usda.mannlib.cornell.edu/data-sets/crops/9X100> (verified 30 Nov. 1998)

32) Appendices or Attachments: they are reserved to give details on original techniques used or theoretical analyses which could hamper understanding of the work, should they be included in the text. The tables in the appendices can follow the numbering of the text or they can have a different numbering.

33) Figures: (diagrams, graphs, photographs and others) will have a running numbering in the order they appear in the text and they should include a brief explanatory title below. Photographs will be considered figures.

34) Tables: they will have running numbers according to the order in which they appear in the text and independently from the figures. They will include an explanatory title above them. If necessary, footnotes will appear to give more details about abbreviations, signs, measures and others, in such a way that the reader can understand their content without going to the text.

35) Formulae: formulae and mathematical expressions will be written leaving double space over, below and between them. Formulae will be on the left margin and they will have running numbering between brackets on the right margin. The meaning and the units used will

be clearly defined in every term of the expressions.

36) Units: the international system of units (IS) must be used.

37) Also submit:

-A summarised title of the work in no more than nine words.

-Contributors' details: Surname and Names; Graduate Degree; Post-Graduate Studies; Place of Work; Position; Category in the Incentive System – Researchers (if he/she is Argentinean) or alike.

5- Besides the ones having catalogue number, unpublished references or in press (indicating the journal where they will be published), personal communications and web pages will possibly be added.

