



Universidad Nacional de Misiones. Facultad de Ciencias Exactas,
Químicas y Naturales. Departamento de Genética

Tesista

Daniel Benjamín Zeñuka

**Genotoxicidad y actividad antibacteriana de
extractos crudos de “*Croton urucurana* Baill”
sobre *Staphylococcus aureus*.**

**Tesis presentada para obtener el título de
“Licenciada en Genética”**

Director

Severino Bargardi

Posadas, Misiones 2006



Esta obra está licenciado bajo Licencia Creative Commons (CC) Atribución-NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional. <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

UNIVERSIDAD NACIONAL DE MISIONES

Facultad de Ciencias Exactas Químicas y Naturales.

CÁTEDRA: PLANEAMIENTO DEL TRABAJO CIENTÍFICO

**GENOTOXICIDAD Y ACTIVIDAD
ANTIBACTERIANA
DE
EXTRACTOS CRUDOS DE "*Croton urucurana*
Baill"
SOBRE *Staphylococcus aureus*.**

ZEÑUKA, DANIEL BENJAMÍN

Año 2006

Universidad Nacional de Misiones

Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales

**GENOTOXICIDAD Y ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA
DE
EXTRACTOS CRUDOS DE "*Croton urucurana* Baill"
SOBRE *Staphylococcus aureus*.**

**Tesina de Graduación para acceder al título de
Licenciado en Genética**

**Lugar de Trabajo:
Módulo de Farmacia y Bioquímica.
M. Moreno 1375.
Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales.
Universidad Nacional de Misiones**

**Autor:
Daniel Benjamín Zeñuka**

**Directo:
Severino Bargardi**

Posadas-2006

Resumen

Se determinó actividad antibacteriana de extractos crudos por los métodos Kirby-Bauer y Pocillo. Empleando corteza desecada de *Croton urucurana* Baill frente a cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 Met-S y *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 Met-R. Se estudiaron algunos parámetros metabólicos de las colonias resistentes a los extractos, por pruebas bioquímicas y las β -lactamasas por los métodos biológicos y de Sanders. Las bacterias citadas no presentaron alteraciones metabólicas ni modificaciones en la expresión de β -lactamasas y resultaron sensibles a los extractos.

Se estudió la actividad genotóxica del extracto acuoso de *Croton urucurana* Baill, por el test de *Allium cepa* L, empleándose para los datos el test ANOVA y el test de rangos múltiples. Demostrándose por este test, que en las condiciones de prueba, los extractos crudos de *Croton urucurana* Baill poseen efectos citotóxicos sobre las raíces de *Allium cepa* L provocando la muerte celular.

Abstract

Antibacterial activity of crude extracts by the methods Kirby-Bauer and Hole was determined. Using dried crust of *Croton urucurana* Baill in front of stocks of *Staphylococcus aureus* Met-S ATCC 25923 and *Staphylococcus aureus* Met-R ATCC 43300. Some metabolic parameters of the resistant colonies to the extracts, by biochemical tests and β -lactamasas by the biological methods studied and of Sanders. The mentioned bacteria did not present/display metabolic alterations nor modifications in the expression of β -lactamasas and were sensible to the extracts.

The genotóxic activity of the watery extract of *Croton urucurana* Baill studied, by the test of *Allium* L stock, being used for the data test ANOVA and the test of multiple ranks. Demonstrating itself by this test, that in the conditions of test, the crude extracts of *Croton urucurana* Baill have cytotoxic effects on the roots of *Allium* L stock causing the cellular death.

A mi familia

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a Dios pues es en El donde se apoya mi confianza. A mi familia en general y principalmente a mi hermana Maria del Carmen quien siempre me acompaño y aconsejo ayudando para que pueda seguir adelante.

Otro agradecimiento especial a los docentes que tuve a lo largo de la carrera quienes siempre transmitieron sus conocimientos y experiencias y gracia a su trabajo pude incorporar los conocimientos académicos. A mi director de tesina el Prof. Severino Bargardi persona que brindo su apoyo conocimientos y consejos, a la Prof. Gladis, a Karina, Alejandra que estuvieron trabajando y ayudándome en el laboratorio.

A los amigos que son mi segunda familia, mi amigo y compañero Julio que siempre estuvo dispuesto con su amistad y compañerismo, un agradecimiento muy especial a Romina que me ha soportado, los que siempre y en diferentes circunstancias estuvieron y siguen acompañándome, ellos son; Carlos, Luís, Claudia, el Polaco, Tucu, Violeta, Ana, Leo, Emiliano y perdón por todos los que no les nombre y que se que han quedado varios.

A mis vecinos de pensión Ale, Laura, etc. A la señora Maria que por tantos años me alquilo y siempre estuvo dispuesta a ayudar. Y a todos los que han hecho posible ya sea directa o indirectamente que me pueda recibir. A TODOS MUCHISIMAS GRACIAS.

Índice

	Pág.
1 INTRODUCCIÓN.....	1
2 OBJETIVOS.....	8
3 MATERIALES Y MÉTODOS.....	9
3.1. Obtención de los extractos crudos de <i>Croton urucurana</i> Baill.....	9
3.2. Pruebas de sensibilidad de los <i>S. aureus</i> frente a los extractos crudos por los métodos de pocillos y discos.....	10
3.3. Pruebas bioquímicas realizadas a las cepas resistentes a los extractos utilizados.....	13
3.4. Prueba directa de sensibilidad ante el extracto N° 15	14
3.5. Métodos de determinación de β -lactamasas empleadas.....	14
3.5.1. Método biológico de determinación de β -lactamasas.....	14
3.5.2. Método de aproximación de Sanders para la determinación de β -lactamasas inducible.....	15
3. 6. Genotoxicidad.....	17
3.6.1. Test de <i>Allium</i> , descripción.....	17
3.6.2. Parámetros del test.....	19
3.6.3. La prueba de genotoxicidad del extracto por medio del test de <i>Allium cepa</i> L.....	21
4 RESULTADOS.....	25
4.1 Prueba de sensibilidad.....	25
4.2 Resultados de las pruebas bioquímicas realizadas a las cepas resistentes antes los extractos utilizados.....	25
4.3.1. Método biológico para determinación de β -lactamasas.....	26
4.3.2. Método de inducción de β -lactamasas o de aproximación de Sanders ...	26
4.4.1. Genotoxicidad del extracto acuoso.....	26
4.4.2. Análisis estadísticos del ensayo de genotoxicidad.....	33
5 DISCUSIÓN.....	41
6 CONCLUSIONES.....	43
7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	44

INTRODUCCION

1-INTRODUCCION

Los comienzos de la quimioterapia fueron empíricos desde antes de Cristo, pero el tratamiento específico de las infecciones empezó en 1936 con el uso de Sulfanilamida. El descubrimiento de la penicilina en 1941 marcó el comienzo de la llamada edad de oro de la terapia antibacteriana, que provocó una disminución drástica de infecciones y enfermedades de distintas etiologías como ejemplo por *S. aureus*, *T. pallidum*, etc.

Actualmente debido a la presión selectiva ejercida por tratamientos muchas veces inadecuados, automedicación, etc. han generado resistencia a los antibacterianos. Esto condujo a numerosos equipos de investigadores a buscar nuevos antimicrobianos por diferentes métodos para vencer esta dificultad, y conservar aquellos que, aún resultan útiles.

Existe en la actualidad una amplia gama de antibióticos con actividad antibacteriana como también bacterias resistentes. El fenómeno de resistencia varía de un microorganismo a otro, y de una región a otra, cepas de *Staphylococcus aureus* que fueron resistente a penicilina G aparecieron poco después de introducirse este antibiótico, y su frecuencia aumentó a tal punto que el 80% de cepas adquiridas de hospitales y comunidades, actualmente son insensibles a las mismos, por la presión selectiva ejercida por el uso abusivo de antibióticos. La aparición de resistencia en otras especies ha sido y es más lento. (Goodman y Gilman 1986).

Staphylococcus aureus es la bacteria que se utilizó en este trabajo la cual posee las siguientes características. Es la principal especie patógena de su género y causa común de infecciones diversas en el hombre sin respetar edad, sexo y lugar donde éste se encuentre; así, es posible encontrarle en hospitales, pequeñas comunidades, alimentos, etc.

Este microorganismo es un componente normal de la microflora humana autóctona y es transportado en ciertas zonas del cuerpo sin provocar daño alguno. Su transmisión desde estos sitios puede provocar enfermedades endémicas y epidémicas (Joklik y col. 1994).

La patogenicidad de *Staphylococcus aureus* se debe a su gran versatilidad en producir enzimas que pueden hidrolizar un amplio espectro de sustratos (Joklik y col. 1994). Las enzimas que produce son; catalasa, lipasa, hialuronidasa, estafiloquinasa, nucleasa, etc. (Lowy. 1998) y también toxinas citolíticas, enterotoxina exfoliativa, pirógenas, toxina TSST-1 la cual se le atribuye el Síndrome de Shock Tóxico. El género *Staphylococcus* se clasifica dentro de la familia Micrococcaceae, presentándose como cocos agrupados en racimos, Gram (+), cuyo diámetro es de 0,5 a 1,5 μm , anaerobios facultativos. En medios de cultivo algunos *Staphylococcus* producen pigmentos carotenoides y forman colonias de color amarillo-dorado a amarillo-limón, esta pigmentación se observa casi siempre en *Staphylococcus*

aureus. La mayoría de los *Staphylococcus aureus* contienen un factor de agrupamiento o coagulasa sobre la superficie externa, que se une al fibrinógeno del plasma por una reacción no enzimática y hacen que los microorganismos se agreguen. (Hawierg J, Timmons S. 1982). Representa un factor de virulencia y es un marcador genético empleado como pruebas de identificación de especie, posee otros marcadores que posibilitan el diagnóstico entre los que encuentran la fermentación del manitol, la DNasa, actividad fosfatasa alcalina, reacción de β -glucosidasa (positiva), reducción de nitritos y entre otros resistencia a polimixina B (discos 300 μ) (Kloos y Bannerman 1995).

La amplia distribución en la naturaleza, su rápida respuesta adaptativa frente a cambios del medio, así como la continua adquisición de resistencia a los antibióticos, han hecho de éste germen un residente habitual hospitalario principalmente, que genera problemas de multiresistencia a los más variados grupos de antibióticos. Como ejemplo en términos de resistencia a meticilina (Jovens, 1961. Knox, 1961) incluye resistencia a derivados β -lactámicos.

Las penicilinas resistentes a penicilasas (oxacilina, meticilina, cloxacilina, etc.) y las cefalosporinas poseen una estructura molecular que las protege frente a la acción de las β -lactamasas. Sin embargo el género *Staphylococcus* ha desarrollado mecanismos más complejos de resistencia a meticilina frente a este grupo de antibacterianos.

El mecanismo de resistencia a meticilina de *Staphylococcus aureus* se asocia a la síntesis de “novo” de una proteína PBP (PBP2a) de 70 kD con baja afinidad por la meticilina y el resto de los β -lactámicos (De Lencastre y col 1994).

Las bases genéticas de la resistencia se deben a mutación de un gen o por introducción de un plásmido de resistencia en la transducción, mecanismo mediado por bacteriófagos (Joklik y col. 1994).

Dentro de las infecciones por *Staphylococcus aureus* podemos seleccionar algunas de ellas. Infecciones de piel y sus anexos, foliculitis, impétigo, forúnculos y los llamados “antrax”, estas últimas debemos diferenciar del “antrax” o carbunco producido por *Bacillus anthracis*, infecciones de heridas, piodermas de extensión, síndrome de piel escaldada estafilocócica (SPEE), síndrome de shock tóxico (SST), (Gerald y col 1992), mastitis de las madres que amamantan, el 1-3% desarrollan distintas formas de infecciones mamarias, gran parte de ellas por *S aureus* (Navy. 1980), septicemias y endocarditis. Infecciones severas de órganos provocando pericarditis, osteomielitis (Gerald y col 1992). Las neumonías causadas por *S aureus* producen daños importantes debido a su alta tasa de mortalidad 50%. (Joklik y

col. 1994) y son de pronóstico malo. Entre otras, éstas son las enfermedades mas habituales producidas por *S aureus*.

El tratamiento de las infecciones por *Staphylococcus aureus*, se deben realizar siempre partiendo de la identificación de la especie y la realización de un antibiograma para saber que especie o cepa de *Staphylococcus aureus* está afectando, y si es sensible o no, para que en caso de resistencia se busquen otros antibióticos adecuados. Actualmente se esta combinando vancomicina con rifampicina (Michel y Gutman 1997). El “Centers for Disease Control and Prevention” de EE.UU. (CDC) ha documentado el primer caso en EE.UU. de *Staphylococcus aureus* totalmente resistente a la vancomicina. (<http://db.doyma.es/cgi-bin/wdbcgi.exe/doyma/press.plantilla?ident=20721>) 04/07/2002:28. Para las cepas *Staphylococcus aureus* resistente a los aminoglucosidos, quinolonas, clindamicina, se tienen buenos resultados clínicos la asociación de vancomicina con gentamicina (Aubry-Damon y col 1997). Algunas nuevas fluoroquinolonas, como el trovafloxacin y el DU-6859a, estreptograminas como la RP-59500 son nuevos agentes con potente actividad antibacteriana sobre *Staphylococcus aureus* Meticilin Resistente (Michel y Gutman 1997). A causa de la alta plasticidad que poseen estas y otras bacterias en la generación de resistencia a antibacterianos a la medicina se le presenta un desafío, el de buscar nuevos agentes químicos con la capacidad para combatirlos.

Con el fin de contrarrestar los antibióticos, las bacterias a través del tiempo han producido una diversidad de mecanismos de resistencia. Pueden poseer genes de resistencia en el cromosoma bacteriano, en plásmidos transferibles y en transposones. La resistencia se facilita por la transferencia entre especies de este material genético a través de diversos mecanismos como son la conjugación, transformación, transducción, etc.

Desde la introducción de la penicilina hace más de sesenta años, los β -lactámicos han constituido el grupo de antibióticos de mayor relevancia clínica. El grupo de antibióticos β -lactámicos está constituido por: Penicilinas, cefalosporinas, carbapenems y monobactámicos. Todos ellos tienen en su estructura un anillo betalactámico que posee similitud estructural con los sitios de unión de los sustratos bacterianos en la biosíntesis de la pared, que les permite unirse e inactivar enzimas necesarias para la síntesis del peptidoglucano componente que es fundamental en la morfología y vida de la bacteria.

Existen tres mecanismos importantes de resistencia a este grupo de medicamentos: degradación enzimática, imposibilidad de penetración a través de la membrana celular y alteraciones del sitio blanco (PBP). La inactivación por β -lactamasas es el mecanismo de resistencia más común.

Las β -lactamasas son enzimas codificadas a través de la expresión de un gen de tipo cromosómico o transferidos por plásmidos o transposones que tienen un origen bacteriano inducible o constitutivo y que son capaces de hidrolizar el anillo β -lactámico de las moléculas que las posean dejándolo inactivo y suelen actuar a altas concentraciones.

Probablemente estas enzimas se han desarrollado como variantes de las propias enzimas biosintéticas de la pared celular. Las bacterias Gram positivas producen una diversidad de enzimas entre ellas las β -lactamasas, que son secretadas al espacio extracelular, a diferencia de las betalactamasas producidas por bacterias Gram negativas que la vierten en el espacio periplásmico (Morfin-Otero y Rodríguez E. 1999). Las β -lactamasas que inactivan la penicilina pueden ser, a) las llamadas inducidas, por la presión de antibióticos betalactámicos o b) las constitutivas, con producción constante de una betalactamasa sin relación con la presión selectiva. Las β -lactamasas pueden ser producidas por mutantes betalactamasa de amplio espectro (BLEA), presente en la mayor parte de las enterobacterias con hiperproducción, y finalmente pueden ser β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) las que derivan de mutaciones de las primeras.

Las BLEE son enzimas de configuración plasmídica producidas por bacterias que hidrolizan los antibióticos β -lactámico.

Debido a la gran diversidad de β -lactamasas descritas hasta el presente se han adoptado dos modelos de clasificación (Galas y col, 1999).

- a) Clasificación fenotípica: según su perfil de sustrato (penicilinas, cefalosporinas, cloxacilinas, etc.) y a la susceptibilidad a la inhibición por ácido clavulónico, propuesta por Bush K (1989) y actualizada en (1995).
- b) Clasificación molecular: propuesta por Ambler (1980), basada en la secuencia de las β -lactamasas, reconociendo cuatro clases, designadas de A a D, clase A, C y D son serinoproteasa y la B metaloenzimas. (Bush y col. 1995).

En el género *Staphylococcus* se han descrito, al menos, tres mecanismo de resistencia de la especie *Staphylococcus aureus* a los β - lactámicos:

- a) hiperproducción de β - lactamasa.
- b) resistencia por proteínas fijadoras de Penicilina (PBP) modificadas.
- c) resistencia intrínseca a meticilina.

Factores que afectan a la generación de β - lactamasa en *S aureus*:

a) Plasmidios de β - lactamasa estafilocócica: podrían impedir la delección espontánea del *mec* cromosomal o podría inducir a un *pattern* heterogéneo de resistencia si se inserta en receptores homogéneamente resistentes. (Hackbart y Chambers 1989).

b) Factor *fem* o factor *aux*: son genes cromosomales distintos al *mec*, necesario para la completa expresión de resistencia, presente en cepas sensibles y resistentes (Gil. 2000). Otros locus cromosomales: codificación de una proteína hidrofóbica de función aun desconocida, cuya inactivación hace que una cepa de resistencia homogénea produzca un *pattern* heterogéneo de resistencia a meticilina. (Gil. 2000.).

La fitomedicina y la etnomedicina se han abocado al estudio y aplicación de fitoterapicos a distintas patologías. El conocimiento de que las plantas poseen efectos medicinales se halla ampliamente divulgado, tanto en la comunidad científica como en la población general. En nuestra región gran número de especies vegetales nativas son utilizadas para el tratamiento de las más diversas afecciones, enfermedades infecciosas y no infecciosas, un ejemplo es el empleo de la especie conocida vulgarmente como “Sangre de Drago” o “Tuguy`y”.

Entre las distintas especies conocidas como "Sangre de Drago" se han realizado importantes investigaciones químicas, farmacológicas y clínicas en la gran mayoría, pero de todas ellas, la que ha recibido mayor atención es *Croton lechleri*, no así la que consideramos en el presente estudio, *Croton urucurana* Baill, donde si bien hay estudios, no llegan a ser tan numerosos (Alonso y Desmarchelier 2005).

La especie vegetal *Croton lechleri*, contiene entre los principales componentes activos comprobados, la presencia de alcaloides y se ha identificado como uno de ellos, la Taspina, derivados de catequizas, drocianidina, terpenos, estigmasterol, castapreno, vomifoliol, 1,3,5-trimetoxibenceno. 2,4,6-trimetoxifenol (Cay y col. 1993). También se aislaron 3',4-0-dimetilcedrusina y 4-0-metilcedrusina con acción farmacológica en la cicatrización de heridas. El látex que emana de *Croton lechleri* es mas activo que cada uno de los componentes aislados. Ubillas y col. (1994) han aislado del látex de *C. lechleri* una protoantocianidina oligomérica, que han denominado SP-303, producto que en sus investigaciones ha demostrado actividad contra una variedad de virus DNA y RNA. En pruebas in vitro el producto SP-303 ofreció una potente actividad contra cepas de virus respiratorio sincitial (RSV), virus A de la influenza (FLU-A) y virus parainfluenza (PIV). En ensayos paralelos de SP-303 y el fármaco "ribavirin" demostraron una actividad comparable contra esos virus. El SP-303 igualmente exhibió una significativa actividad inhibitoria contra el herpes virus (HSV), incluyendo a los resistentes a los fármacos "acyclovir" y "foscarnet". (Safrin S, McKeough M, y col, 1994). También se observó inhibición contra los virus de la hepatitis A y B. Sobre bacterias la Sangre de Drago de *C. lechleri* es poco activa frente a *Bacillus subtilis* y *Escherichia coli*. El 1, 3,5-trimetoxibenceno y el 2, 4,6-trimetoxifenol son

muy activos frente a *Bacillus subtilis* más potentes que la penicilina y el cloranfenicol. (<http://www.perunatural.es.fm>) . También la Sangre de drago de *Croton lechleri* ha demostrado poseer una potente actividad inmunomoduladora, al actuar sobre el complemento. Ensayos in vitro, demostraron inhibición de las vías clásicas y alternativas del complemento. (Alonso y col C. 2005).

La especie de Sangre de Drago que consideramos en este trabajo, tiene por nombre científico *Croton urucurana* Baill, cuya historia se remonta mucho años antes de la llegada de los españoles a América, los aborígenes de algunas tribus de la cuenca del Amazonas tenían muy en consideración la acción terapéutica de la savia de esta planta y la empleaban tanto para uso interno como externo por su gran poder cicatrizante y regenerador de tejidos. Más adelante hacia fines del siglo XIX y comienzos del siglo XX, los caucheros tuvieron conocimiento de este vegetal usándolo en provecho propio, fue llevado a la civilización donde se empezó a difundir su uso recién a mediados del siglo XX. Esta especie es de distribución muy amplia y conocida en América del Sur, creciendo preferentemente en zona tropical y subtropical. En nuestra provincia es posible encontrarla en cercanías o en la costa de los ríos Paraná, Uruguay y otras áreas vecinas a la ciudad de Posadas (Mnes).

En nuestra región, las personas nativas la emplean por sus propiedades curativas (Sawchuk. Sf).

Crotón urucurana Baill posee las siguientes características;

Familia: Euphorbiaceae.

Porte: Árbol que alcanza los 8 m de altura, monoico. Corteza de color verde claro. Copa alargada. Laticífero. El látex se torna rojo al contacto con el aire.

Follaje: Caduco verde claro, con manchas anaranjadas a medida que llega el otoño.

Hojas: simples, alternas, cordiformes, de 6-12 cm. de largo. Pecíolo de hasta 10 cm. de largo, ápice acuminado, con base obtusa, borde levemente denticulado.

Flores: En espigas de color blanquecino de 12 cm. de largo. Flores femeninas con 3 pistilos, las masculinas ubicadas en parte distal del eje de la inflorescencia, con corola de 5 pétalos y estambres numerosos. Florece en otoño.

Fruto: Cápsula tripoca, vellosa con tres semillas.

La posibilidad de encontrar un antibacteriano de origen vegetal, a partir de extractos crudos de *Crotón urucurana* Baill, y el conocido uso popular de estos en la fito y etnomedicina, nos llevó a realizar un estudio previo de su toxicidad, ya sea citotóxica o genotóxica de los mismos. Para esto empleamos el test de *Allium cepa* L. que se desarrolló mas adelante.

***Croton urucurana* Baill.**



Foto: (<http://micol.fcien.edu.uy/flora/Croton-urucurana.htm>)

2-OBJETIVOS

GENERALES

Adquirir experiencia y destreza en el manejo de gérmenes y materiales de uso en laboratorio de microbiología.

ESPECIFICOS

- A) Verificar la existencia o ausencia de genotoxicidad del extracto por Medio del test de *Allium cepa* L.
- B) Determinación de la sensibilidad de *Staphylococcus aureus*, frente a extractos crudos de *Croton urucurana* Baill
 - 1) Método de difusión en discos Kirby-Bauer
 - 2) Método del pocillo.
- C) Ensayos de actividad de extractos crudos de *Croton urucurana* Baill sobre β -lactamasas producidas por *Staphylococcus aureus* resistentes.

Se aplicarán métodos de determinación de β -lactamasa ya conocidos sobre las cepas en estudios que resulten resistentes a la actividad de los extractos crudos de *Croton urucurana* Baill. Se emplearán como control positivo las cepas de *Bacillus subtilis* y *Enterobacter cloacae*.

3.- MATERIALES Y METODOS

3.1. Obtención de los extractos crudos de *Croton urucurana* Baill.

La obtención de la muestra de Sangre de Drago se realizó en otoño, en la zona aledaña a Villa Laurel, Posadas (Mnes), próxima a la costa del Río Paraná.

La parte empleada de la planta fue la corteza, que se obtuvo por cortes profundos con cuchillo limpio. Se colocó la muestra en una bolsa de plástico limpia. Se trasladó al laboratorio donde se sometió a un desecado a temperatura ambiente, en lugar fresco y seco durante una semana.

Para completar el secado se dejó en estufa a 40 °C de temperatura durante 24 horas.

Con la corteza desecada (Cs), se procedió a la molienda con un molino a cuchilla tipo Wiley y se retuvo por tamiz el grano de un tamaño de 50 Mesh.

De esta manera se obtuvo la droga (D), la que se conservó en un frasco limpio y esteril, bien tapado en lugar fresco y seco hasta su utilización.

Con la D, se procedió a obtener los extractos crudos, mediante los métodos de maceración y decocción, como se detalla a continuación.

Método de maceración

El principio de este método consiste en poner la droga (D) con el grado de finura necesario, en contacto durante un tiempo variable con el solvente apropiado a la finalidad perseguida, se realizan agitaciones frecuentes a lo largo del período de extracción y posteriormente se procede a la filtración. (<http://www.amigus.org/web/archives/001353.php>).

Este método se empleó para obtener los extractos etanólico N° 14 y metanólico N° 28. Para esto se pesaron 10 g de D para 100 ml de etanol 96°, y 10 g de D para 100 ml de metanol respectivamente, se dejaron en maceración a temperatura ambiente durante 72 horas, luego se filtró a través de un embudo de Büchner con papel de filtro Whaman N° 1 al vacío con una trampa de agua. El filtrado se separó en tubos de 10 ml guardándose tapados en lugar fresco y seco a temperatura ambiente hasta su utilización. Las características de los extractos N° 14 y N° 28, se pueden ver en la tabla N° 1.

Método de decocción.

Este método se realiza con solvente agua de la (D), sometida a ebullición durante 20 minutos. El tiempo de decocción depende según algunos autores de la consistencia de la muestra empleada. (<http://www.amigus.org/web/archives/001353.php>).

En nuestro caso se pesaron 10 g de D para 100 ml de agua potable en un erlenmeyer, y se llevo a ebullición durante 15 minutos. Luego se colocó en estufa a 37° C durante 18 h y completado este tiempo, se llevó nuevamente a ebullición durante 5 minutos luego se filtro

con papel de filtro Whaman N° 1 al vacío, constituyéndose de esta manera el extracto acuoso N° 15, cuyas características se detallan en la tabla N° 1.

Los extractos N° 14, N° 15 y N° 28, se llevaron a evaporar para obtener el peso seco y realizar luego suspensiones a una concentración determinada.

Por otra parte el extracto N° 28 se concentró al doble de la concentración inicial y se cambió el solvente por agua destilada estéril. Para lograr esto se tomaron 10 ml del extracto N° 28 y se evaporó su solvente a temperatura ambiente, luego al extracto seco se le agregaron 5 ml de agua destilada estéril y se homogeneizó formando una nueva suspensión, que se denominó extracto N° 29. En todos los extractos se determinó el peso seco en mg/ml de las extracciones realizadas. Ver tabla N° 1

Tabla N° 1 Características de los extractos, solventes, método de obtención y concentración en mg/ml.

N° de Extracto	Parte de la planta	Solvente	Método de extracción	Temperatura de conservación	Concentración de extracto seco mg/ml
14	Cs	Etanol 96°	Maceración	Ambiente	18,3
15	Cs	Agua	Decocción	-18 °c	25
28	Cs	Metanol	Maceración	Ambiente	21,8
29	Cs	Agua	Maceración con cambio de solvente.	Ambiente	40

Referencia: Cs (corteza desecada).

3.2. Pruebas de sensibilidad de los *S. aureus* frente a los extractos crudos por los métodos de pocillos y discos.

Para estas pruebas se prepararon las cepas de *Staphylococcus aureus* Met.-S ATCC 25923 y *S aureus* Met.-R ATCC 43300 proporcionadas por el INEI-ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán”. Previamente se realizaron las pruebas bioquímicas para corroborar la pureza de las cepas, con la finalidad de poder comparar éstas con aquellas que resistieron a la actividad de los extractos y estudiar posteriormente la posibilidad de encontrar algunas alteraciones metabólicas detectadas por pruebas bioquímicas. Estas son marcadores genéticos observables a través de reacciones bioquímicas. Las pruebas realizadas fueron: a) Catalasa, que se puso en evidencia por agregado de agua oxigenada, H₂O₂. b)

Coagulasa, empleando plasma humano. c) Manitol Salado, como medio selectivo para comprobación de pureza y d) Sensibilidad a novobiocina. Estos controles resultaron ser óptimos.

A continuación se desarrolló la prueba de sensibilidad por el método de difusión en disco de Kirby-Bauer y por método de difusión en pocillo de agar (Método PSEDPA), para los *Staphylococcus aureus* Met.-S ATCC 25923 y Met.-R ATCC 43300 frente a los extractos crudos de *Croton urucurana* Baill. N° 14, N° 15, N° 28 y N° 29.

El método de difusión en disco de Kirby-Bauer es un método muy conocido e estandarizado por lo que desarrollaremos muy brevemente.

Desarrollo de las técnicas:

Para dar mayor vigor al crecimiento de las cepas bacterianas, estas se sembraron en Agar Sangre (AS) incubándose a 37° C durante 24 h en estufa. Luego se repicó en tubos conteniendo Agar Nutritivo (AN) solidificado en forma de pico de flauta y se incubó en estufa a 37° C durante 24 h.

Para las pruebas de sensibilidad se partió de la preparación de los medios de cultivos y de la suspensión bacteriana, con cada una de las cepas se realizó una suspensión de concentración de 0,5 del tubo N° 1 de la escala de turbidez de Mc Farland. Con un hisopo de algodón esterilizado se embebió en la suspensión y se sembró en forma homogénea sobre el medio Müller-Hinton (MH) de 4 mm de espesor colocado en placa de Petri preparado y acondicionado previamente.

Los discos empleados con extractos se prepararon con papel de filtro Whatman N° 3 cortados con un sacabocados de 6 mm de diámetro. Estos discos así preparados se impregnaron con 25, 50 y 100 µl de extracto N° 14, 15 y 28; para el extracto N° 29 se impregnó con 25 y 50 µl respectivamente, según las concentraciones mencionadas en la Tabla N° 1, luego se llevaron a sequedad y se guardaron en frascos esterilizados conservándose a temperatura ambiente hasta su empleo.

Los discos preparados se depositaron sobre las placas de Petri sembradas anteriormente con cada una de las cepas en estudio. Luego se incubaron a 37 °C durante 24 horas.

Aquellas cepas que resultaron resistentes a los extractos N° 15 y 28 en discos, se sometieron 15 minutos a la acción directa del extracto N° 15. Ver tabla N° 3. Se realizó esto con la finalidad de observar si aun eran resistentes y por otro lado separar aquellas resistentes que van a ser empleadas para la determinación de β-lactamasa inducible con la prueba de inducción de Sanders.

En el método PSEDPA la preparación del medio de cultivo fue igual al descrito anteriormente, como así también la turbidez de la suspensión bacteriana. La técnica consiste en enfrentar la cepa en estudio con el extracto problema colocado con una micropipeta dentro de los pocillos practicado en el agar. Los pocillos se realizaron con un sacabocados estéril de 6 mm de diámetro.

Luego se sembró sobre el medio MH la suspensión de bacterias con un hisopo y por último se colocó cada extracto en los pocillos ya preparados con una micropipeta en el volumen de 25 μ l, 50 μ l y 100 μ l con excepción del extracto N° 29 que fue de 25 μ l y 50 μ l respectivamente (ver tabla N° 2). Luego se llevó a incubación en estufa de 37 °C durante 24 horas.

Para las pruebas de sensibilidad se emplearon 4 placas de Petri por cada una de las cepas bacteriana en estudio y otras dos se emplearon para control de actividad del solvente empleado en los extractos N° 14 y N° 15 es decir etanol 96° y agua respectivamente. Ver tabla N° 2. Al cabo del tiempo de incubación aquellos discos o pocillo que tenían desarrollo bacteriano alrededor del mismo, se aislaron en Agar Infusión Cerebro Corazón (AICC) para realizar los otros ensayos planificados y detectar las probables modificaciones metabólicas sufridas por las bacterias por la actividad del extracto y comparar éstas con las cepas originales. Una vez desarrolladas se conservaron en heladera a 5 °C hasta su empleo.

Con respecto al extracto N° 28 que posee metanol y considerando que el mismo posee actividad antibacteriana no se llevó a cabo la prueba de sensibilidad por el método del pocillo, ni la prueba de sensibilidad directa frente al extracto.

Tabla N° 2: Esquema de las pruebas de sensibilidad de los *Staphylococcus aureus* Met.-S ATCC 25923 y *Staphylococcus aureus* Met.-R ATCC 43300 frente a los extractos crudos de *Croton urucurana* Baill por los Métodos: difusión en disco y PSEDPA.

Ext. N°	Método de sensibilidad	Carga del Ext. en μ l	N° de Placas por cepas bacterianas.	N° de pocillos y discos por placas.
14	Discos	25, 50 y 100	1	6
	Pocillo	25, 50 y 100		
15	Discos	25, 50 y 100	1	6
	Pocillo	25, 50 y 100		
28	Discos	25, 50 y 100	1	6
29	Discos	25 y 50	1	4
	Pocillo	25 y 50		

3.3. Pruebas bioquímicas realizadas a las cepas resistentes a los extractos utilizados.

A las cepas que resultaron resistentes (Ver tabla N° 3 y 4) se realizaron las mismas pruebas bioquímicas que se efectuaron a las cepas patrones, para verificar como responden las bacterias bajo la acción de los extractos. Los resultados se expresan mas adelante.

Tabla: N° 3 Se observan las colonias resistentes a los extractos N° 15 y 28 que se seleccionaron y se les efectuaron las pruebas bioquímicas, las pruebas directas de sensibilidad ante los extractos N° 15 y los ensayos de β -lactamasas.

<i>S aureus</i>	Denominación	Extracto N°	Resistentes a carga en disco de μ l
Met Sensible ATCC 25923	a	15	100
	b	28	50
	c	28	100
Met Resistente ATCC 43300	I	15	100
	II	28	100

Referencias: a, b y c corresponde a las cepas seleccionadas resistentes de *S. aureus* Met.-Sensible ATCC 25923. I y II corresponden a las cepas de *S. aureus* Met.-Resistente ATCC 43300.

3.4. Prueba directa de sensibilidad ante los extracto N° 15.

Se preparó una suspensión de las bacterias en estudio (ver tabla N° 3 y 4) que previamente habían resultado resistentes en las pruebas de sensibilidad de discos.

Se tomó una ansada de cada una de estas cepas y se pusieron en contacto directo con los extractos N° 15 contenidos en diferentes tubos de ensayos. Transcurrido 15 minutos, de éste contacto, se tomó una ansada de cada tubo y se sembró en una placa de AN luego se llevó a incubar durante 24 h a 37 °C en estufa. Las cepas que resultaron resistentes se emplearon para la prueba de inducción de Sanders.

3.5. Métodos de determinación de β -lactamasas empleadas.

Como se sabe las cepas patrones de *S aureus* ATCC Met-S 25923 y *S aureus* ATCC Met-R 43300 no producen β -lactamasas, pero aún así, se estudió la actividad de los extractos para ver si este comportamiento se modifica en la prueba.

Las colonias seleccionadas para este estudio se detallan en la tabla N° 3 como así también en la N° 4 con sus respectivas denominaciones.

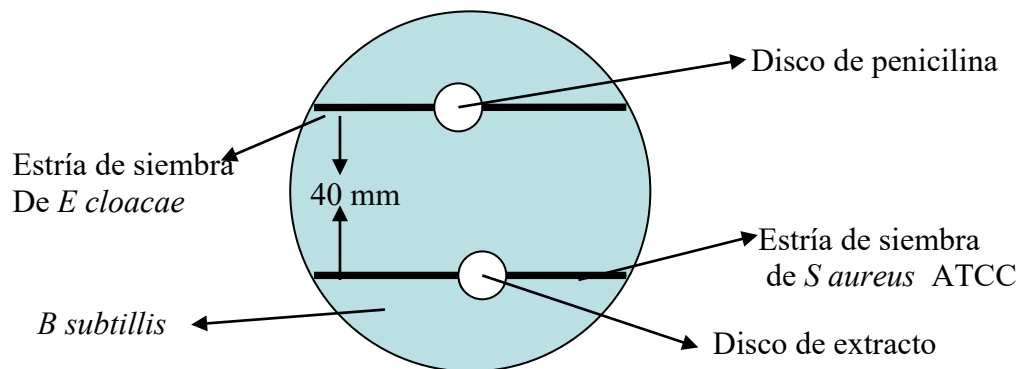
3.5.1. Método biológico de determinación de β -lactamasas.

Técnica que consiste en utilizar medio de cultivo MH contenido en un erlenmeyer aproximadamente a 50 °C es decir semisólido al cual se le agregó 1 ml de una suspensión estandarizada de *B subtilis* de una concentración equivalente al tubo N° 1 de la escala Mc Farland por cada 100 ml de medio. Posteriormente se distribuyó en 5 placas de Petri, una para cada cepa y colonias de las bacterias resistentes seleccionadas en las pruebas de sensibilidad (Ver tabla 3 y 4). Una vez listas las placas, se sembraron sobre cada superficie de ellas dos estrías paralelas de bacterias, una estría de *E cloacae* (control positivo) y otra estría paralela de *S aureus* ATCC (problema), a una distancia de 40 mm de la primera siembra. Ver Fig. N° 1.

A la primera estría (*E cloacae*), se le colocó un disco de penicilina de 10 U, y a la segunda estría un disco impregnado y seco de igual concentración de extracto a la que esta bacteria resultó resistente Ver Fig. N° 1. La finalidad de este ensayo como mencionamos anteriormente fue de observar que comportamiento tendrían las cepas ATCC en ensayo frente a los extractos, ya que estas no producen β -lactamasas.

Las placas una vez listas se llevaron a incubar 24 h a 37 °C. Posteriormente se realizó la lectura.

Fig. N° 1: Representación esquemática del método biológico de verificación de producción de β -lactamasas.



3.5.2. Método de aproximación de Sanders para la determinación de β -lactamasas inducible.

A las bacterias que sobrevivieron al tiempo de exposición directa sobre el extracto, se le realizó la Prueba de Aproximación de Discos Sanders, técnica que sirve para identificar la presencia de β -lactamasas inducibles (Fig. 2 a). La metodología consistió en realizar un antibiograma convencional y se colocó un disco de cefoxitina (FOX) a 20 mm de otro disco de cefotaxima (CTX) y se llevó a estufa para su incubación 24 h a 37 °C. Si el microorganismo produce β -lactamasas inducible se forma un halo de inhibición truncado adyacente al disco inductor que es el de FOX. En la Fig. 2 b está representado un ejemplo positivo.

Fig. N° 2 a: Esquema representativo de la Prueba de Aproximación de Sanders.

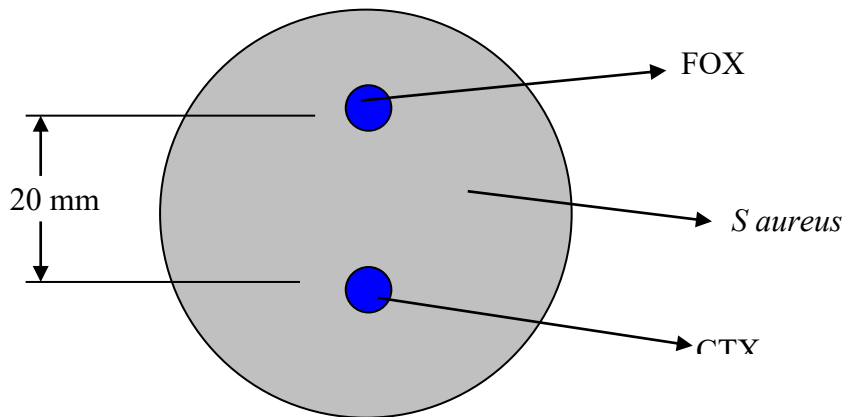
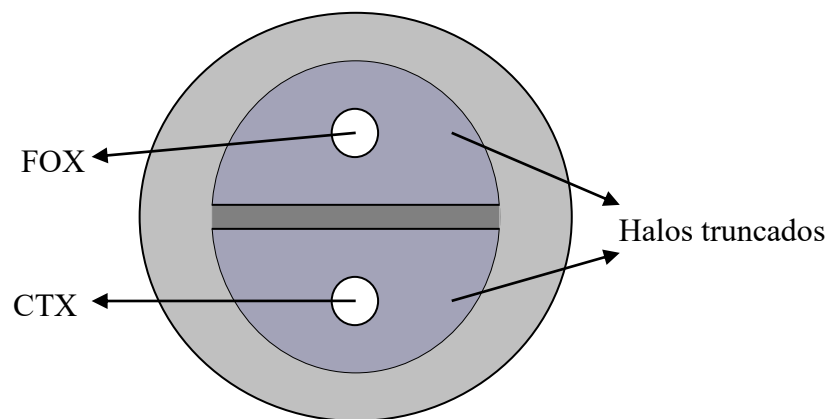


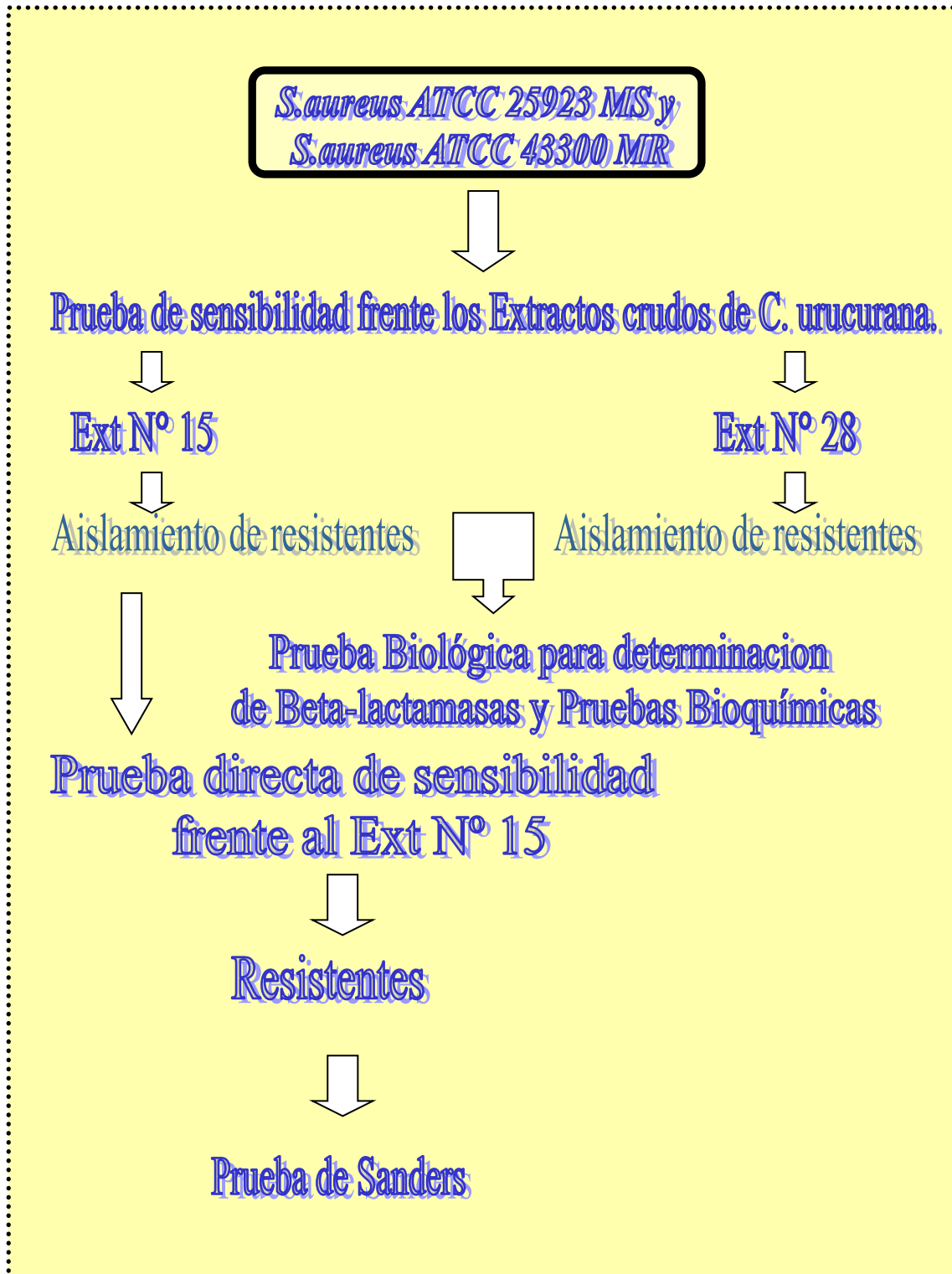
Fig. N° 2 b: Esquema representativo de la Prueba de Aproximación de Sanders, en caso de un resultado positivo, como control. De dar negativo no se forma el truncamiento del halo.



Referencias: gris mas oscuro entre halos significa desarrollo bacteriano.

A continuación (Diagrama N° 1) se representa el desarrollo secuencial de las pruebas realizadas a las cepas de *Staphylococcus aureus* Met.-S ATCC 25923 y *S aureus* Met.-R ATCC 43300, frente los extractos crudos de *Croton urucurana* Baill. Como así también el N° de extracto empleado.

Diagrama N° 1: Esquema del desarrollo de las pruebas de sensibilidad frente a los extractos como así también de las pruebas de β -lactamasa y bioquímicas.



3. 6. Genotoxicidad.

Entre las sustancias con efecto tóxico merecen ser destacadas aquéllas que por su estructura son capaces de interactuar con los ácidos nucleicos, provocando una posible actividad mutagénica y/o carcinogénica. La toxicidad que afecta al material genético y que manifiesta una expresión retardada en el tiempo se denomina genotoxicidad [Hofnung y Quillardet, *Mutat. Res.*, (1984) 132, 141].

La genética toxicológica es una disciplina que combina la citogenética con la toxicología y evalúan los efectos de los agentes químicos y físicos sobre el material genético.

Estos efectos se pueden evaluar directamente midiendo la interacción del agente con el DNA o indirectamente a través de la evaluación de la reparación del DNA, como la producción de mutaciones génicas o alteraciones cromosómicas. (Hoffman 1996).

3.6.1. Test de *Allium*, descripción; el test de *Allium* es un tipo de experimentación básica, cuyo objetivo es detectar anomalías en el mecanismo mitótico de las células meristemáticas de las raíces de *Allium cepa* L, o consecuencias de una mala segregación. (Schvartzman y Moreno Azorero, 1975), por actividad de sustancias químicas o aguas contaminadas etc. ya que las células de *A cepa* L son muy sensibles a las sustancias químicas y sufrir daños genéticos.

La fácil adquisición económica, la disponibilidad del material, el tamaño relativamente grande de las células, la facilidad con que las mismas captan colorantes básicos y el bajo número de cromosomas de la especie ($2n=16$), hacen de la cebolla común, *Allium cepa* L, un organismo ideal para el estudio de la mitosis, y de las anomalías que las mismas puedan presentar. (Schvartzman y Moreno Azorero, 1975).

El test de *Allium* nos permite abordar dos aspectos de la toxicidad.

- a).- Toxicidad general: estimada por la inhibición del crecimiento longitudinal de las raíces.
- b).-Genotoxicidad: documentada por el estudio microscopios de los cromosomas de las células meristemáticas radicales. Demostrando ser un sistema adecuado para probar el potencial cito-genotóxico de cualquier sustancia o complejo de sustancias. (Fiskesjö. 1993).

Un aumento de cualquiera de las fases mitóticas o disminución de otras, es interpretado como un efecto de la sustancia en cuestión sobre el aparato mitótico. Así una

desviación de estas proporciones puede atribuirse a efectos químicos de la sustancia en ensayo. (Schvartzman y Moreno Azorero, 1975).

Además de las desviaciones del índice de fase se puede observar otras alteraciones como ser la presencia de micronúcleos, c-mitosis, anafase múltiple, ruptura de cromosomas, entre otras.

En su forma original la técnica descrita por Levan, 1938; 1943; 1945. (Rank J y Nielsen 1993) consiste en la utilización de una serie de bulbos de cebolla, que luego de la extracción de sus catáfilas externas son ubicadas en agua a fin de que desarrolle raíces de 1-2 cm. de longitud, (Día 0). Luego son expuestas a la solución de prueba durante un tiempo de estudio predeterminado, (Día 1), y se procede a la extracción de los ápices destinados para la observación microscópica, (Día 2). Las observaciones macroscópicas tales como la longitud de las raíces, color etc. se efectúan en Día 3 y 4.

Los preparados microscópicos se efectúan independientemente de la longitud de las raíces.

Basado en que las aberraciones cromosómicas pueden producirse en diferentes fases del ciclo celular. Grant 1982 incluyó períodos de recuperación que cumplan un ciclo celular antes de la fijación. De manera que las aberraciones cromosómicas observadas en metafase y anafase resultarían de las fijaciones hechas en G1, las aberraciones cromatídicas resultarían de las fijaciones en G2, y los micronúcleos podrían ser observados en telofase o interfase/profase del ciclo de división siguiente al tratamiento.

3.6.2. Parámetros del test.

-Macroscópicos.

a).-Longitud de las raíces.

Es la más importante, tomando un valor promedio en la longitud de las raíces por bulbos. (Fiskesjö. 1985).

b).-Cambio de color.

Tanto de los ápices radicales, como de la planta entera. Una coloración parda de las raíces indicaría muerte celular por un efecto tóxico de algún tratamiento. (Robledo 2000).

c).- Forma de las raíces.

La aparición de protuberancias, por lo general es indicativo de c-mitosis, así mismo la aparición de raíces curvadas puede manifestar el efecto tóxico de algún tratamiento. (Fiskesjö. 1985).

d).-Turgencia.

Específicamente al ápice radical, es útil en pruebas donde se estudian efectos de las concentraciones. (Otegui, 1994. Robledo 2000).

-Microscópicos.

Dependiendo del tipo de tratamiento, se pueden considerar diferentes parámetros microscópicos. Pero los que cobran mayor interés y deben ser considerados son los siguientes (Fiskesjö. 1985): índice mitótico, índices de fases, caracterización de las mitosis, caracterización de las células en interfase.

- Índice mitótico: representa el número de células en división por cada 1000 células observadas.
- Índice de fases: representa el número de células de cada fase por cada 100 células en división.
- Caracterización de las mitosis: mediante la observación de 100 células en división en las que se deberán tener en cuenta los siguientes puntos:
 1. Metafases, anafases, anafases tempranos anormales; considerando a estas últimas como aquellas que poseen los grupos anafásicos no completamente separados. Un aumento en número de las anafases tempranas indica baja velocidad de segregación (Otegui, 1994. Robledo 2000).
 2. Cromosomas aglutinados o viscosos. son indicadores de alta toxicidad, la aglutinación puede manifestarse de tres maneras: a) el borde del cromosoma se vuelve indefinido; b) los cromosomas tienden a coalescer en metafase; y c). la adhesión de los extremos cromosómicos causa puentes viscosos que no permiten la segregación normal. (Otegui, 1994. Robledo 2000).
 3. Puentes y fragmentos cromosómicos: como resultado de la ruptura cromosómica o cromatídica.
 4. Cromosomas erráticos: son producidos por un efecto c-mitótico débil, así, los cromosomas en anafase o metafase se esparcen por el citoplasma sin ordenación. Son indicadores de riesgo de aneuploidia. (Otegui, 1994. Robledo 2000).
 5. Anafases multipolares: se produce por un efecto c-miótico débil sobre fibras del huso y centriolos que producen la formación de varios polos durante la anafase. Pueden producir aneuploidia. (Otegui, 1994. Robledo 2000).
 6. Cromosomas bandeados: o como lo llamo Levan en 1938, erosionados.

3.6.3. La prueba de genotoxicidad del extracto por medio del test de *Allium cepa* L

Materiales: Portaobjetos, cubreobjetos, varilla de vidrio punta roma, orceina acética, fijador Carnoy (etanol 96° / ácido acético 5:1), frasco color caramelo, gradilla para tubos de ensayos, bisturí, pinza, ácido acético 1 N. baño termostático, termómetro, reactivo de Schiff, microscopio óptico, aceite de inmersión, 40 bulbos de cebolla, agua mineral* 40 viales, extracto acuoso N° 15, colorante Feulgen, lupa y cámara fotográfica.

*Agua mineral; Marca comercial: Villa del Sur.

Concentración de sales minerales mg/l.

Magnesio	12
Bicarbonatos	450
Calcio	19
Fluoruro	0,7
Potasio	10
Sodio	164

Metodología

El ensayo se llevó a cabo según la técnica original de Levan (1938) con modificaciones que se incluyen en el texto.

Esquema de experimentación

Se adquirieron 40 bulbos de cebolla de un tamaño promedio de 80 g. c/u aproximadamente de estos bulbos se seleccionaron 20 que presentaron un enraizamiento adecuado.

Se trabajó con dos tiempos de exposición al extracto, uno de 24 h (Tiempo I) y otro de 48 h (Tiempo II), a una sola concentración del extracto 10% de extracción p/v. Ver cuadro N° 1.

Cuadro N° 1: expresa los tiempos de exposición de los bulbos al extracto y al testigo (agua mineral).

Tiempos de exposición al extracto.	N° de repeticiones.	
	Testigos	Ensayos
24 h (Tiempo I)	5 bulbos	5 bulbos
48 h (Tiempo II)	5 bulbos	5 bulbos

Protocolo del test *Allium*

El test de *Allium* consta de dos partes: A) Pre-enraizamiento, y B) Ensayo.

Desarrollo:

A) Pre-enraizamiento

Día 0. Al inicio de la experimentación se eliminaron las catáfilas externas de color marrón rojizo, luego se extrajeron los discos basales con el fin de dejar expuestos los primordios radicales. De inmediato los bulbos se colocaron en agua con el fin de evitar la desecación de los primordios.

Posteriormente los bulbos se distribuyeron en viales independientes conteniendo aprox. 40 ml de agua mineral y se dejaron durante 24 h como pre-enraizamiento. Trascurrido este tiempo se evaluó el crecimiento de las raíces, para fijar el día de comienzo del ensayo ya que si la longitud de las raíces es inferior al 1 cm se debe esperar 24h, caso contrario como ocurrió en nuestro trabajo al superar el 1 cm de longitud en promedio y al no haber inhibición de la misma se procedió a la parte B.

B) Ensayo

Día 1.

- a) Se sacaron dos raíces por bulbo correspondiente al periodo de pre-enraizamiento, fijándose en solución de Carnoy.
- b) Se puso 5 bulbos en agua mineral para control (Testigos) Tiempo I y 5 bulbos se dejaron en el extracto N° 15, correspondientes al Tiempo I. Otros 5 bulbos en agua mineral para control Tiempo II y 5 bulbos en contacto con el extracto N° 15 correspondiente Tiempo II.

Día 2.

- a) Se sacaron dos raíces por bulbo correspondiente a control y ensayo Tiempo I y se fijó en solución de Carnoy.
- b) Luego los bulbos del ensayo tiempo I se pusieron en viales con agua mineral para su período de recuperación de 24 h.

Día 3.

- a) Se sacaron dos raíces por bulbo correspondiente a control y ensayo Tiempo II y se fijó en solución de Carnoy.
- b) De los bulbos en recuperación correspondiente a control y ensayo Tiempo I se tomaron dos raíces por bulbo y se fijó en solución de Carnoy.

- c) Se cortaron todas las raíces en recuperación tiempo I (ensayo y testigo) para medir el crecimiento en promedio de su longitud.
- d) De los bulbos en ensayos (punto “a” del Día 3) se colocaron en agua para su periodo de recuperación.

Día 4.

- a) Se sacaron dos raíces por bulbo correspondiente a control y ensayo Tiempo II y se fijó en solución de Carnoy.
- b) Se cortaron todas las raíces en recuperación tiempo II para medir el crecimiento en promedio de su longitud.
- c) Análisis microscópico general de las raicillas mediante coloración de Feulgen.

Parámetros tomados para el estudio.

En nuestro caso tomamos los siguientes parámetros.

Microscópicos:

- a) Índice Mitótico (**IM**) basados en un total de 1000 células.

$$IM = \frac{\text{Nº de células en \%}}{\text{Nº Total de células contadas}} \times 100$$

- b) Índice de Fase (**IF**), medida de proporción relativa de cada fase de la mitosis, Profase (**PF**), Metafase (**MF**), Anafase (**AF**), Telofase (**TF**).

Se determina de la siguiente manera:

$$IF = \frac{\text{Nº de células en una fase}}{\text{Nº total de células en \%}} \times 100$$

- c) Índice de anomalías (**IA**). Este índice es una cuantificación de las células, que presentan anomalías en su ciclo de división, las consideradas fueron: puente anafásico (**PA**), c-mitosis (**CM**), micronúcleo (**MN**), cromosomas rezagados (**CR**), cromosomas adelantados (**CA**), células binucleadas (**CB**).

Se determina de la siguiente manera.

$$IA = \frac{\text{Anomalías consideradas}}{\text{Total de células en \%}} \times 100$$

Metodología para microscopia: Las raíces extraídas de cada bulbo fueron puestas en frascos pequeños y fijadas con solución de Carnoy, estos frascos se rotularon expresando; fecha, tipo de ensayo y N° de cebolla. Fue conservada luego en heladera hasta su utilización.

Para poder realizar la observación microscópica se utilizó una técnica citológica la misma se denomina reacción de Feulgen que consiste en:

- a) reacción ácida 10 minutos en HCL 1 N en baño termostático.
- b) coloración con reactivo de Schiff 15 minutos en cámara oscura.

Posteriormente bajo la lupa y sobre el portaobjeto se extrae la caliptra de la raíz por medio de una aguja, terminado esto se coloca una gota de orceina acética (para dar contraste) y con una varilla de vidrio punta roma se procede al aplastado realizándose luego un squash. El preparado se sella con cera o esmalte para su conservación en heladera. Para la observación es utilizado el microscopio óptico a 100 X en aceite de inmersión

Macroscópicos:

Color. Olor. Turgencia. Crecimiento y forma de la raíz, (tumores o curvaciones).

4-RESULTADOS

4.1- Prueba de sensibilidad.

En la tabla N° 4 se observan los resultados de la prueba de sensibilidad en discos y pocillos frente los extractos crudos de *Croton urucurana* Baill.

Tabla N° 4: Resultados de las pruebas de sensibilidad realizadas de los *Staphylococcus aureus* Met.-S ATCC 25923 y *Staphylococcus aureus* Met.-R ATCC 43300 frente a los extractos crudos de *Croton urucurana* Baill. Por el método en discos y pocillo.

Ext. N°	Método de sensibilidad	Carga en µl.	Diámetro del halo en mm	
			Met.-S	Met.-R
			Con colonias	Con colonias
14	Discos	25	D	D
		50	7	D
		100	10	D
	Pocillo	25	7	9
		50	9	14
		100	15	16
15	Discos	25	D	8
		50	10	9
		100	12(a)	12(I)
	Pocillo	25	8	9
		50	13	12
		100	17	15
28	Discos	25	7	D
		50	12(b)	D
		100	15(c)	14(II)
29	Discos	25	12	11
		50	15	13
	Pocillo	25	12	11
		50	15	13

Referencias: (a), (b), (c), (I), y (II) Colonias resistentes que se aislaron para realizar las pruebas bioquímicas y verificación de β -lactamasas, corresponde a halos con colonias en su interior. D: desarrollo.

4.2 Resultado de las pruebas bioquímicas realizadas a las cepas resistentes ante los extractos empleados.

Como mencionamos anteriormente, se han realizados las siguientes pruebas bioquímicas correspondientes para su comparación: Catalasa (+), Coagulasa (+), Manitol

salado (+) y Novobiocina sensible. El resultado fue el mismo para las cinco colonias resistentes ante los extractos que se aislaron. Ver tabla N° 4.

4.3.1. Método biológico para determinación de β -lactamasas.

Las cepas de *Staphylococcus aureus* Met.-S ATCC 25923 y *Staphylococcus aureus* Met.-R ATCC 43300 que resultaron resistentes en las pruebas de sensibilidad en discos (ver tabla N° 4) no produjeron β -lactamasa tal como se esperaba.

4.3.2. Método de inducción de β -lactamasas o de aproximación de Sanders.

Las cepas de *Staphylococcus aureus* Met.-S ATCC 25923 y *Staphylococcus aureus* Met.-R ATCC 43300 que sobrevivieron a la exposición directa del extracto N° 15 no sufrieron inducción para la expresión de β -lactamasa.

4.4.1 Genotoxicidad del extracto acuoso

Del estudio del test de *Allium cepa* L obtuvimos los siguientes resultados citológicos.

Parte A periodo de pre-enraizamiento 24 h

Correspondiente a los bulbos testigos representados como T0 y bulbos ensayos TI y TII, donde la tabla N° 5 expresan los resultados que se han obtenidos. En el grafico N° 1 está representado de forma circular el índice mitótico promedio de los bulbos ensayos y testigos de la **parte A** período de pre-enraizamiento. En el gráfico N° 2 están expresados los índices promedio de las fases mitóticas de los bulbos destinados a testigo período de pre-enraizamiento. En el gráfico N° 3 se expresan los índices promedios de las fases mitóticas de los bulbos ensayos TI periodo de pre-enraizamiento. Y en el gráficos N° 4 los índices de fase mitóticas correspondientes a los bulbos destinados a ensayos TII periodo de pre-enraizamiento.

Tabla N° 5: Período de pre-enraizamiento 24 h en agua, se ha observado 2 (dos) c-mitosis y 1 (uno) puente anafásico en uno de los bulbos destinados a ensayo (TI), 1 (uno) célula binucleada en un bulbo ensayo (TI) y en otro bulbo ensayo pero TII 1 (uno) célula binucleada.

Tiempo	N ° C.	I M	I M P	I P F	I M F	I A F	I T F	I A
T0	1013	3,35	3,201	0.35	0.23	0.2	0.2	0
T0	1123	3,56		0.45	0.225	0.175	0.15	0
T0	1003	3,75		0.36	0.24	0.2	0.2	0
T0	1105	3,43		0.34	0.26	0.21	0.19	0
T0	1242	3,46		0.3	0.3	0.18	0.21	0
T0	1113	3,14		0.285	0.285	0.22	0.2	0
T0	1312	2,66		0.4	0.2	0.2	0.2	0
T0	1221	4,01		0.32	0.26	0.2	0.22	0
T0	1010	1,28		0.46	0.15	0.3	0.07	0
T0	1215	3,37		0.34	0.31	0.24	0.1	0
T1	1301	5,98	2,978	0.36	0.26	0.17	0.2	0
T1	1007	1,78		0.27	0.38	0.16	0.16	0
T1	1088	1,47		0.43	0.25	0.25	0.0625	0
T1	1276	3,29		0.38	0.24	0.21	0.16	0.02
T1	1085	2,67		0.275	0.20	0.24	0.17	0.1
T2	1077	3,52	3,058	0.368	0.263	0.21	0.157	0
T2	1130	2,21		0.38	0.27	0.23	0.07	0.04
T2	1129	3,01		0.32	0.235	0.235	0.20	0
T2	1321	3,17		0.31	0.38	0.24	0.07	0
T2	1212	3,38		0.36	0.25	0.23	0.15	0

Referencias: N° C: número de células contadas en los diferentes campos ópticos, I M: índice mitótico, I M P: índice mitótico promedio, I P F: índice profase, I M F: índice metafase, I A F: índice anafase, I T F: índice telofase, I A: aberraciones. En I A consideramos todas aquellas aberraciones descritas en materiales y métodos.

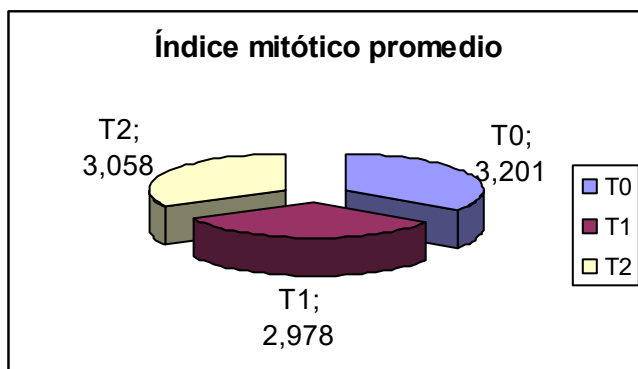


Grafico N° 1: Representación grafica del índice mitótico de los bulbos destinados a testigos e ensayos del período de pre-enraizamiento 24 h.

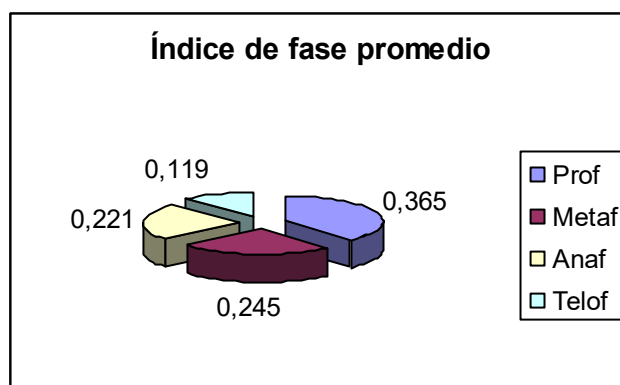


Grafico N° 2: Representación del índice de fase promedio de los bulbos destinado a testigos período de pre-enraizamiento 24 h. (ProF: profase, MetaF: metafase, AnaF: anafase, TeloF: telofase).

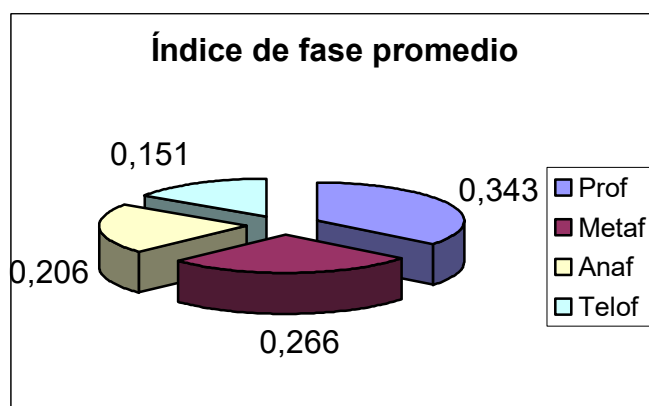


Grafico N° 3: Índice de fase promedio de los bulbos destinados a ensayo TI de período pre-enraizamiento 24 h.

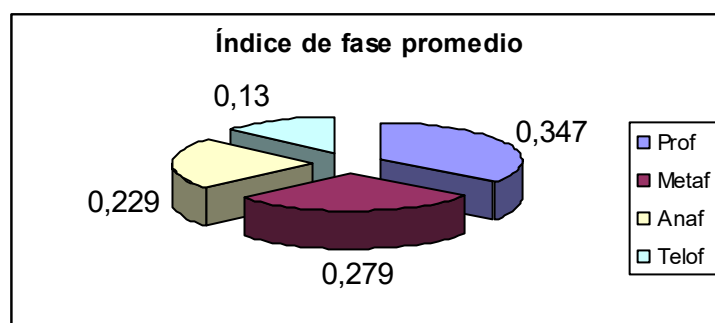


Gráfico N° 4: Índice de fase promedio de los bulbos destinados a ensayo TII período de pre-enraizamiento 24 h.

Parte B, ensayo del problema en estudio.

Se han tomado al azar 5 (cinco) bulbos de los testigos para representar a los testigos TI, los otro 5 (cinco) bulbos restantes representan a los testigos para el ensayo TII. En la tabla N° 6 están los datos brutos, del ensayo tiempo TI, en el gráfico N° 5 se representa el índice mitótico correspondiente al ensayo y testigo TI. No se expresa el índice de fase promedio del ensayo TI y su testigo T0 por razón de que el índice mitótico de los bulbos ensayo es 0 (cero).

Tabla N° 6: Expresa al ensayo TI período de 24 horas de exposición al extracto. Como se puede observar el índice mitótico de los 5 (cinco) bulbos ensayos es 0 (cero), esto quiere decir que no hubo ninguna célula en división, también se ha observado que el núcleo de las células que corresponde al ensayo estaban redondeadas.

Tiempo	N° C	I M	I MP	I PF	I MF	I AF	I TF	I A
T1	1054	0	0	0	0	0	0	0
T1	1075	0		0	0	0	0	0
T1	1071	0		0	0	0	0	0
T1	1084	0		0	0	0	0	0
T1	1261	0		0	0	0	0	0
T0	1055	2,93	3.854	0.29	0.32	0.22	0.16	0
T0	1186	3,54		0.4	0.26	0.17	0.17	0
T0	1226	4,73		0.32	0.28	0.22	0.18	0
T0	1183	3,97		0.34	0.29	0.19	0.17	0
T0	1041	4,1		0.32	0.26	0.19	0.22	0

Referencias: Las abreviaturas ídem a la tabla N° 5. TI: bulbos ensayo. T0: bulbos testigos.

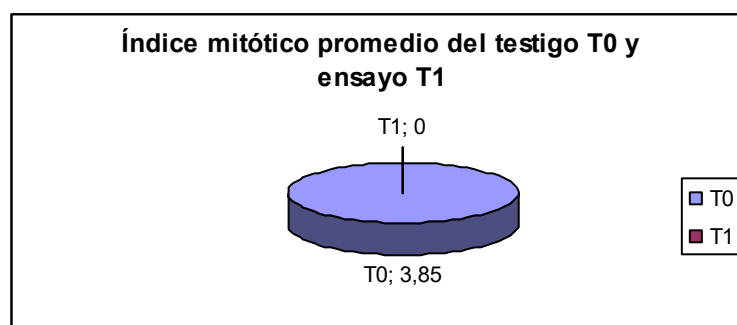


Gráfico N° 5: representación de forma circular del índice mitótico del ensayo TI con respecto a su testigo T0.

A los bulbos correspondientes al ensayo TII no se le pudo realizar la técnica citológica para observación, ya que las raíces estaban totalmente podridas. De manera que se siguió solamente con el ensayo TI.

En la tabla N° 7 están los datos brutos del ensayo TI correspondiente al periodo de recuperación 24 h en agua. En el gráfico N° 6 se representa el índice mitótico del periodo de recuperación 24 h en agua de los bulbos correspondiente al ensayo TI. En el gráfico N° 7 y 8 se expresan los índices de fase promedio del periodo de recuperación 24 h en agua del ensayo TI y del testigo T0 respectivamente.

Tabla N° 7: Corresponde al período de recuperación 24 h en agua del ensayo TI, como se puede apreciar solo se han recuperado 2 (dos) bulbos, los otros quedaron completamente deteriorado. Por otra parte no se observó ninguna alteración en la mitosis de los bulbos ensayos.

Tiempo	N° C	I M	I MP	I PF	I MF	I AF	I TF	I A
T1	1253	2,31	2.42	0.34	0.28	0.24	0.14	0
T1								
T1								
T1	1024	2,53	3.889	0.34	0.27	0.27	0.11	0
T1								
T1								
T0	1390	4,53	3.889	0.32	0.28	0.24	0.14	0
T0	1164	2,92		0.32	0.26	0.21	0.21	0
T0	1208	3,97		0.31	0.25	0.25	0.19	0
T0	1154	3,72		0.29	0.29	0.22	0.19	0
T0	1114	4,3		0.31	0.29	0.2	0.18	0

Referencias: Las abreviaturas son las mismas a las que se expresan en las tablas N° 5 y 6

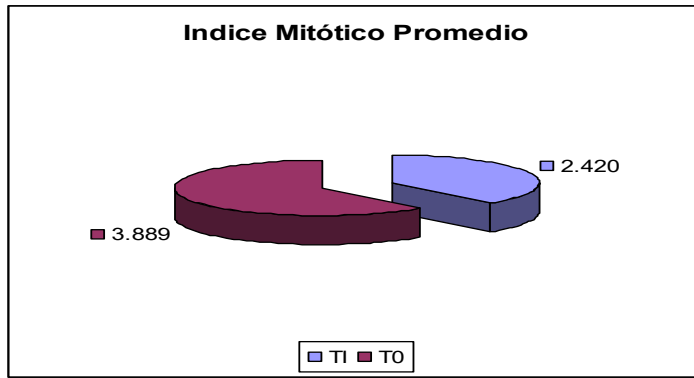


Grafico N° 6: Expresa el índice mitótico promedio del ensayo TI con relación al índice de su testigo T0, correspondiente al período de recuperación 24 h en agua.

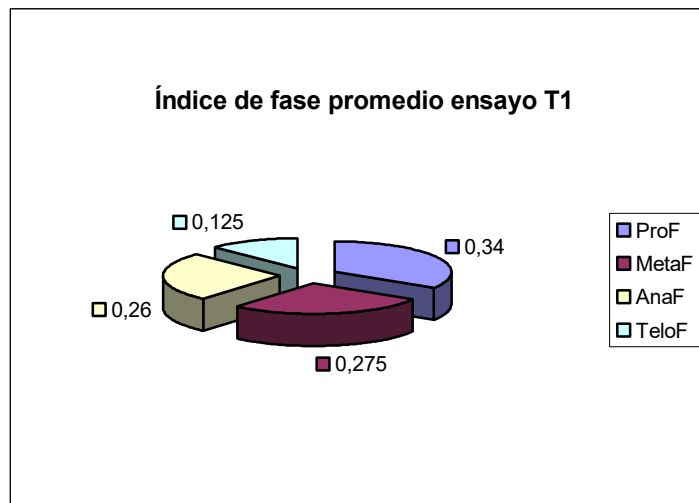


Grafico N° 7: Expresa el índice de fase promedio del ensayo TI, correspondiente al período de recuperación 24 h en agua.

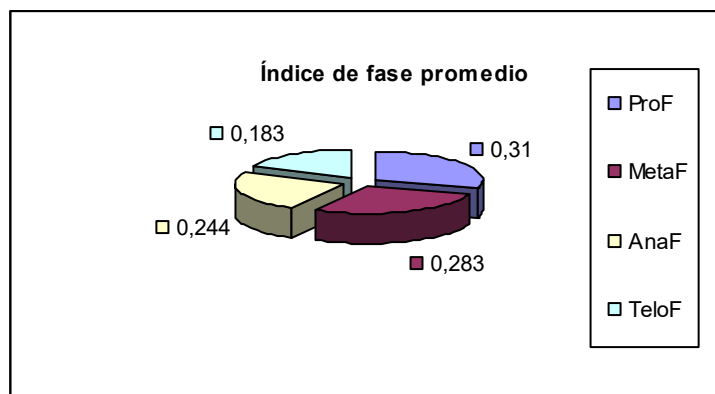


Grafico N° 8: Expresa el índice de fase promedio de los bulbos testigos TI, correspondiente al período de recuperación 24 h en agua.

Para el análisis macroscópico los parámetros tomados fueron; longitud promedio de las raíces, tanto de los bulbos testigo como los bulbos ensayos correspondiente TI, así también la coloración, olor, turgencia, presencia de ganchos y numero de raíces. En la planilla N° 3 se detallan todos estos parámetros, la longitud promedio de las raíces se expresa en cms. En el grafico N° 9 se representa de forma circular el crecimiento promedio de las raíces de los bulbos ensayo TI en comparación a los bulbos testigos.

Tabla N° 8: la representación del número 1 (uno) es de aspecto normal, si aparece el 0 (cero) expresa una anomalía.

Tiempo	Color	Turgencia	Ganchos	N° de raíces	Long Pro	Olor
T1	1	1	1	19	0,7	1
T1						
T1	1	1	1	23	0,5	1
T1						
T1						
T0	1	1	1	36	4,4	1
T0	1	1	1	19	3,9	1
T0	1	1	1	37	4,1	1
T0	1	1	1	24	3,7	1
T0	1	1	1	11	4	1

Referencias: Long Pro: es la abreviatura de longitud promedio en cms de las raíces.

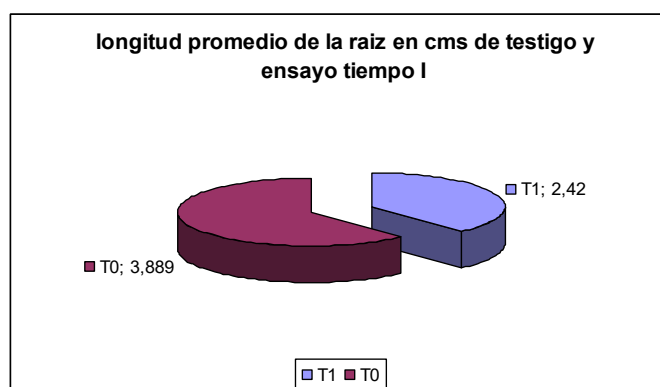


Gráfico N° 9: Representa la comparación de la longitud promedio en cms de las raíces de los bulbos ensayos TI 24 h con relación a sus bulbos testigo, período correspondiente al de recuperación en agua 24 h.

4.4.2 Análisis estadísticos del ensayo de genotoxicidad

Se realizó un estudio estadístico de los datos que se obtuvieron del test de *Allium cepa* L. la misma emplea un análisis de variación unidireccional de la variable que se incorpora construyendo varias pruebas que compara los valores medios de la variable incorporada, lo cual, la prueba-F de la tabla de ANOVA prueba si hay alguna diferencia entre los medios. Si hubiera, el test de rangos múltiples comprueba que medios son perceptiblemente diferentes de otros.

En primera instancia se realizó un estudio estadístico de la **Parte A** del test, la perteneciente al periodo de pre-enraizamiento de los bulbos 24 h en agua.

Resumen del análisis correspondiente al período de pre-enraizamiento del índice mitótico

Nº de observaciones: 20 (correspondiente a los bulbos testigos y ensayos TI y TII).

Variable dependiente: Índice mitótico.

Variable independiente: Tiempo.

Tabla de ANOVA del índice mitótico correspondiente al período de pre-enraizamiento.

Esta tabla descompone la variación del índice mitótico en dos componentes, uno dentro-grupo y otro entre-grupo. El valor de P debe ser mayor o igual a 0,05 para que no existan diferencias estadísticas.

Puesto que el valor-P (0,9492) de la prueba-F es mayor o igual a 0,05, significa que no hay diferencias estadísticas significativas entre el índice mitótico con respecto a los niveles de tiempo (bulbos ensayos TI y TII con respecto a los testigos), tomado un nivel de confianza de 95 %.

Test de rangos múltiples correspondientes al período de pre-enraizamiento.

Tabla que aplica un procedimiento múltiple de comparación para determinarse que medios son perceptiblemente diferentes de otros. La mitad inferior de la tabla muestra la diferencia estimada entre cada par de medios. En este caso, no hay diferencias estadísticas significativas entre cualquier par de medios, con un nivel de confianza de 95%. Es un procedimiento de comparación de los pares, sea que el par 0 – 1 corresponde a los bulbos testigos relacionado con los bulbos ensayo TI y así sucesivamente.

Tabla del test de rangos múltiples:

Test de rangos múltiples para el índice mitótico con relación a los niveles de tiempos.

Contraste	Diferencias	+/- Límites
0 – 1	0,163	1,22772
0 – 2	0,143	1,22772
1 – 2	- 0,02	1,41765

Estudio de los índices de fases correspondientes al período de pre-enraizamiento.

Nº de observaciones: 20 (correspondiente a los bulbos testigos y ensayos TI y TII).

Variable dependiente: Índice fases.

Variable independiente: Tiempo.

Tabla de ANOVA de los índices de fases del período de pre-enraizamiento.

Profase:

Puesto que el valor-P (0.188774) de la prueba-F es mayor o igual a 0,05, significa que no hay diferencias estadísticas significativas entre el índice profase con respecto a los niveles de tiempo (bulbos ensayos TI y TII con respecto a los testigos), tomado un nivel de confianza de 95 %.

Metafase:

Puesto que el valor-P (0.654761) de la prueba-F es mayor o igual a 0,05, significa que no hay diferencias estadísticas significativas entre el índice metafase con respecto a los niveles de tiempo (bulbos ensayos TI y TII con respecto a los testigos), tomado un nivel de confianza de 95 %.

Anafase:

Puesto que el valor-P (0.661403) de la prueba-F es mayor o igual a 0,05, significa que no hay diferencias estadísticas significativas entre el índice anafase con respecto a los niveles de tiempo (bulbos ensayos TI y TII con respecto a los testigos), tomado un nivel de confianza de 95 %.

Telofase:

Puesto que el valor-P (1.24381) de la prueba-F es mayor o igual a 0,05, significa que no hay diferencias estadísticas significativas entre el índice telofase con respecto a los niveles de tiempo (bulbos ensayos TI y TII con respecto a los testigos), tomado un nivel de confianza de 95 %.

Test de rangos múltiples para los índices de fase correspondientes al período de pre-enraizamiento.

Profase:

Tabla del test de rangos múltiples:

Test de rangos múltiples para el índice fase con relación a los niveles de tiempos.

Contraste	Diferencias	+/- Límites
0 – 1	0.0175	0.065369
0 – 2	0.0129	0.065369
1 – 2	-0.0046	0.0754816

No hay diferencias estadística significativas entre cualesquiera par de medios en el nivel de la confianza del 95.0%.

Metafase:

Tabla del test de rangos múltiples:

Test de rangos múltiples para el índice fase con relación a los niveles de tiempos.

Contraste	Diferencias	+/- Límites
0 – 1	-0.02	0.064294
0 – 2	-0.0336	0.064294
1 – 2	-0.0136	0.0742403

No hay diferencias estadística significativas entre cualesquiera par de medios en el nivel de la confianza del 95.0%.

Anafase:

Tabla del test de rangos múltiples:

Test de rangos múltiples para el índice fase con relación a los niveles de tiempos.

Contraste	Diferencias	+/- Límites
0 – 1	0.0065	0.0382267
0 – 2	-0.0165	0.0382267
1 – 2	-0.023	0.0441404

No hay diferencias estadística significativas entre cualesquiera par de medios en el nivel de la confianza del 95.0%.

Telofase:

Tabla del test de rangos múltiples:

Contraste	Diferencias	+/- Límites
0 – 1	0.0235	0.0609052
0 – 2	0.0446	0.0609052
1 – 2	0.0211	0.0703273

No hay diferencias estadística significativas entre cualesquiera par de medios en el nivel de la confianza del 95.0%.

Análisis de la **Parte B**, por razones de inviabilidad de los bulbos (podridos) correspondientes al ensayo Tiempo II y que el índice mitótico sea cero (no se puede evaluar estadísticamente) en los bulbos correspondientes al Tiempo I. No se han realizado los estudios estadísticos. Pero sí se ha podido realizar para el período de recuperación de 24 h en agua a los bulbos correspondientes al TI.

Resumen del análisis correspondiente al ensayo TI, 24 h de recuperación en agua.

Nº de observaciones: 7 (correspondiente a los bulbos testigos y ensayos TI).

Variable dependiente: Índice mitótico.

Variable independiente: Tiempo.

Tabla de ANOVA correspondiente al ensayo TI, 24 h de recuperación en agua.

Puesto que el valor-P (0,0262) de la prueba –F es menos de 0,05, significa que hay diferencias estadísticas significativas entre el índice mitótico con respecto al nivel de tiempo ensayado (bulbos ensayos TI con respecto a los testigos), tomado un nivel de confianza de 95 %. (TI: bulbos ensayo, T0: bulbos testigos).

Por la razón que solo existe un par comparativo no es necesario realizar el test de rangos múltiples, basta simplemente con la tabla de ANOVA.

Tabla de ANOVA de los índices de fases del período de recuperación.

Profase:

Puesto que el valor-P (0,0221) de la prueba–F es menor que 0,05, significa que hay diferencias estadísticas significativas entre el índice de profase de los niveles de tiempo (bulbos ensayos TI con respecto a los testigos T0), tomado un nivel de confianza de 95 %.

Metafase:

Puesto que el valor-P (0.9452) de la prueba-F es mayor o igual a 0,05, significa que no hay diferencias estadísticas significativas entre el índice metafase con respecto a los niveles de tiempo (bulbos ensayos TI con respecto a los testigos T0), tomado un nivel de confianza de 95 %.

Anafase:

Puesto que el valor-P (0.661403) de la prueba-F es mayor o igual a 0,05, significa que no hay diferencias estadísticas significativas entre el índice anafase con respecto a los niveles de tiempo (bulbos ensayos TI con respecto a los testigos T0), tomado un nivel de confianza de 95 %.

Telofase:

Puesto que el valor-P (0.0416) de la prueba-F es menor a 0,05, significa que hay diferencias estadísticas significativas entre el índice telofase con respecto a los niveles de tiempo (bulbos ensayos TI con respecto a los testigos T0), tomado un nivel de confianza de 95 %.

Resumen del análisis macroscópico correspondiente al ensayo TI, 24 h de recuperación en agua.

Nº de observaciones: 7 (correspondiente a los bulbos testigos y ensayos TI).

Variable dependiente: Crecimiento en longitud de las raíces en cms.

Variable independiente: Tiempo.

Tabla de ANOVA correspondiente al análisis macroscópico ensayo TI 24 h de exposición al extracto con respecto al de su testigo.

Puesto que el valor-P (0,000) de la prueba -F es menos de 0,05, significa que hay diferencias estadísticas significativas entre la longitud promedio de las raíces del ensayo con respecto su testigo, tomado un nivel de confianza de 95 %. (TI: bulbos ensayo, T0: bulbos testigos). De la misma manera no es necesario el test de rangos múltiples.

Fotos

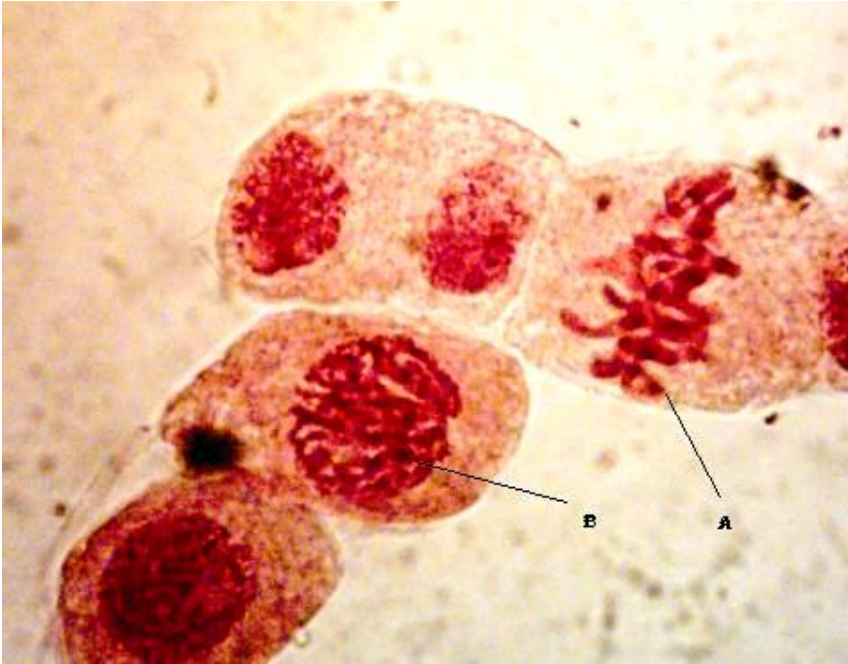


Foto N° 1: A) Metafáse normal. B) Profáse normal. Correspondiente a un bulbo testigo Tiempo I periodo de pre-enraizamiento. 100 X en aceite de inmersión.

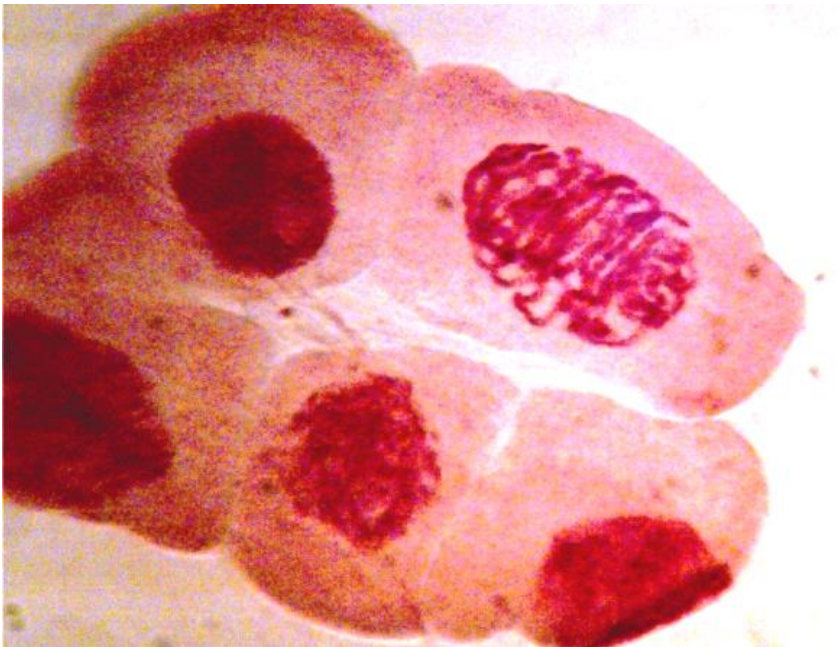


Foto N° 2: Margen derecho superior Profase normal, bulbo perteneciente a un testigo Tiempo II. 100 X en aceite de inmersión.

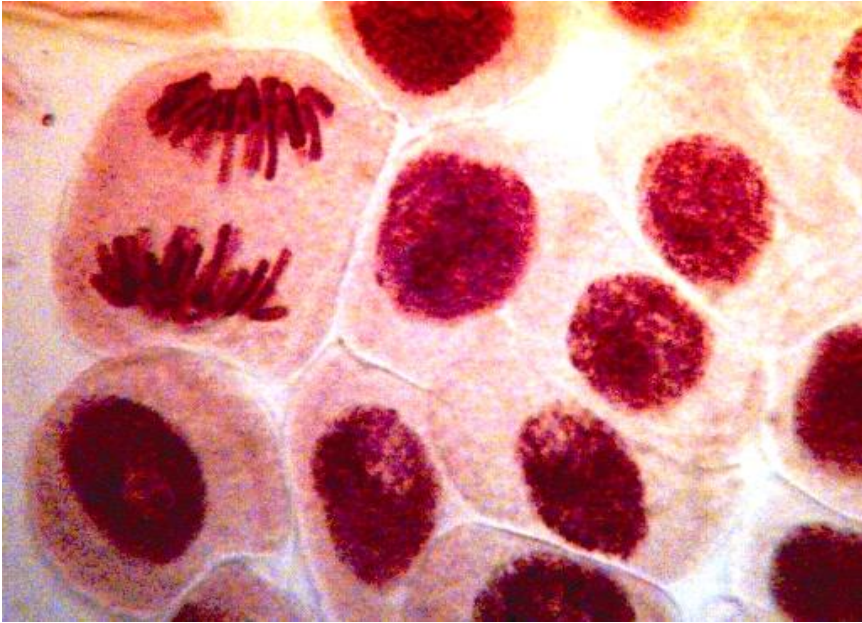


Foto N° 3: Margen izquierdo superior Anafase normal, bulbo perteneciente a testigo Tiempo II. 100 X en aceite de inmersión.



Foto N° 4: A) Telofase normal, bulbo perteneciente al periodo de recuperación testigo Tiempo II. 100 X en aceite de inmersión.

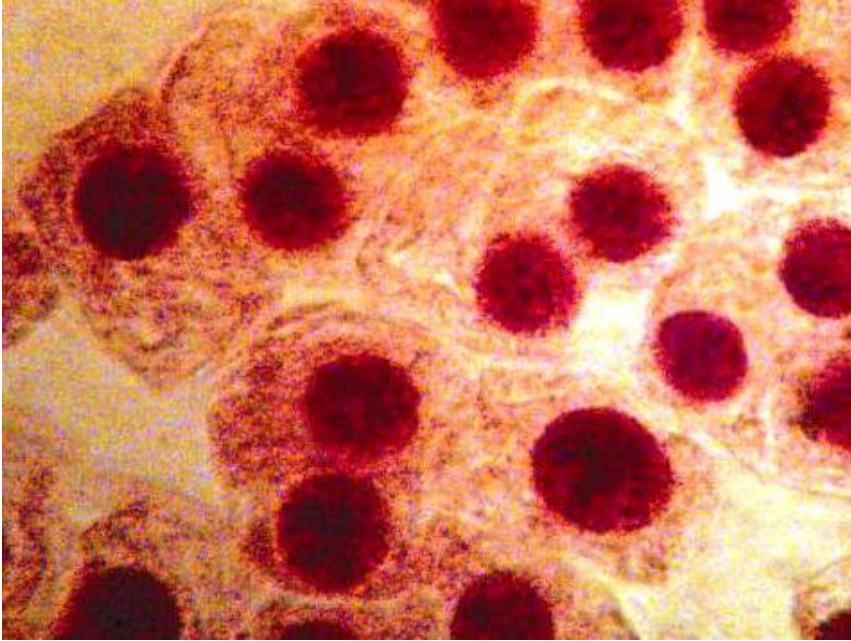


Foto N° 5: Células en interfase, pertenecientes al ensayo Tiempo I 24 h expuestas al extracto acuoso. 100 X en aceite de inmersión.

5-DISCUSSION

Las cepas de *S aureus* Met-R ATCC 43300 y *S aureus* Met-S ATCC 25923 estudiadas en este trabajo, como vimos en los resultados, son sensibles a los extractos crudos de *Croton urucurana* Baill. Lo que sugieren que la extracción realizada por los métodos de maceración y de decocción son factibles de aplicar para obtener principios activos con actividad antibacteriana, en coincidencia con otro trabajo realizado (Kramer y col. 2004).

Otro detalle importante es que el cambio de solvente no afecta a la sensibilidad de las bacterias ensayadas en las condiciones de pruebas, esto nos indicaría que el principio activo es soluble en agua y también en metanol o sea dos solventes polares.

Los resultados obtenidos en la actividad de los extractos crudos de *Croton urucurana* Baill en las condiciones de prueba, sobre *S aureus* Met.-R ATCC 43300 y *S aureus* Met-S ATCC 25923, confirman que éstas bacterias no codifican para la producción de β -lactamasas y que la actividad sobre los marcadores metabólicos bioquímicos estudiados no son afectados.

Seria importante ver que ocurriría si se incluye el extracto en el medio de cultivo empleado en las pruebas bioquímicas, ya que lo que se probó es la acción directa, es decir germen vs. extracto y no el extracto en el medio de cultivo, que según Robledo 2000 puede existir una combinación del extracto con el agar o algún otro componente del medio de cultivo que afecten a la bacteria.

En cuanto a la actividad sobre las β -lactamasas hubiera sido importante ensayar sobre aquellos *S. aureus* obtenidos de pacientes enfermos que produzcan esta enzima y comprobar si inhibe la producción de β -lactamasas o no; ensayamos con unas cepas de *S. aureus* en estas condiciones pero resultó negativa para la producción de esta enzima. No se consiguieron más cepas de *S. aureus* para ensayar.

En lo que respecta a los efectos de los extractos obtenidos por decocción sobre las células meristemáticas de las raíces de cebolla *Allium cepa* L, se comprobó que son tóxicos. El índice mitótico ha dado variaciones estadísticas en los bulbos de recuperación, así también para entrar y salir de mitosis, esto nos indica que algún componente del extracto no pudo ser eliminado generando un efecto retardado. Ahora bien, debe existir un punto en el cual no afecta o sus efectos son mínimos, para lo cual, será necesario realizar nuevos ensayos del test de *Allium cepa* L, realizando una prueba de CIM (concentración mínima inhibitoria) previamente para encontrar el punto de acción antibacteriana, la acción sobre la producción de β -lactamasas y la toxicidad correspondiente. Este punto estaría por debajo de la concentración empleada en la sensibilidad (Kramer y col. 2004), y como el *S.*

aureus resultó resistente sería difícil encontrar que los cuatro parámetros que buscamos coincidan en un solo punto, es decir, sensibilidad, inhibición de producción de β -lactamasa, modificaciones en pruebas bioquímicas y genotoxicidad.

No conocemos realmente la concentración que utilizan los nativos en la preparación de la infusión aunque sospechamos que es más diluida a la que utilizamos en nuestro trabajo.

6-CONCLUSIONES

Del presente trabajo de investigación podemos concluir que;

1. Los extractos crudos de *Croton urucurana* Baill poseen actividad antibacteriana sobre las cepas bacterianas utilizadas de *S aureus* Met.-S ATCC 25923 y *S aureus* Met.-R ATCC 43300.
2. Es factible emplear los métodos de difusión en discos y pocillos para ensayos de sensibilidad de extractos crudos vegetales en las condiciones de este trabajo.
3. Las cepas patrones de *S aureus* Met-R ATCC 43300 y *S aureus* Met-S ATCC 25923 que no son productoras de β -lactamasa, no sufren modificaciones por acción de los extractos crudos de *Croton urucurana* Baill obtenidos por maceración y de decocción, tampoco sufre modificaciones en su funcionamiento bioquímico.
4. Los extractos crudos obtenidos por decocción de *Croton urucurana* Baill en las condiciones de prueba poseen efecto citotóxico marcado que producen inhibición de la mitosis comprobada por el test de *Allium cepa* L y analizados estadísticamente.
5. La permanencia del contacto entre el bulbo y sus raíces con el extracto crudo de *Croton urucurana* Baill muestran que al permanecer 48 h producen muerte celular en las raíces como así también efectos sobre el bulbo de la cebolla.
6. Los períodos de recuperación de 24 h correspondiente en agua en el test de *Allium cepa* L, demostraron que el extracto crudo de *Croton urucurana* Baill en la concentración ensayada son drásticas y letales para las células meristematicas de la cebolla que no permitieron el ensayo de recuperación correspondiente al período TII de 48 h de exposición al extracto.

7- REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

1. Alonso J y Desmarchelier C. 2005. Plantas Medicinales Autóctonas de la Argentina. Bases científicas para su aplicación en la atención primaria de la salud, (Sangre de Drago). Editorial LOLA. 515-519.
2. Aubry-Damon H, Legrand P, Brun-Buisson C, Astier A, Soussy CJ y Leclercq R. 1997. Reemergence of gentamicin-susceptible strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Role of an infection control program and changes in aminoglycoside use. Clin Infect Dis 25:647-653
3. Bush K, Jacoby G.B y Madeiros A, 1995. A functional classification scheme for B-lactamases and its correlation with molecular structure. Antimicrobial agents Chemother 39: 1211-1233
4. Cay Y, Chen P, Phillipson. 1993. Diterpenes from *Croton lechleri*. Phytochemistry. 32(3): 755-760.
5. De Lencastre H, De Jonge BLM, Matthews PR y Tomasz A. 1994. Molecular aspects of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. J Antimicrob Chemother. 33:7-24.
6. Fiskesjö G, 1985. The Allium test as a Standard in environmental monitoring. Hereditas 102:99-112
7. Fiskesjö G, 1993. the *Allium* test in wastewater monitoring environm. Tox. And Water Quality. 8:291-298
8. Galas M, Pasteran F y Rossi A. 1999. Betalactamasas en bacilos gram negativos, características y detección, Boletín del Servicio Antimicrobiano del Departamento de Microbiología, INEI-ANLIS Dr. Carlos G Malbrán: p 1-14.
9. Gerald L, Gordon Douglas RJ y Bennett J, 1992. enfermedades Infecciosas- 3^{ra} edición Editorial Medica Panamericana 173:1572-1590.
10. Gil D. 2000. Staphylococcus aureus: Microbiología y aspectos moleculares de la resistencia a metilina. Rev Chil Infect 17(2):145-152.
11. Goodman J. y Gilman P. 1986. Las bases Farmacológicas de la Terapia 7th edicion Editorial Medica Panamericana. 1019-1022
12. Grant W, 1982. Chromosome aberration in Allium. Mutation Research, 99: 273-291.
13. Hackbart C. y Chambers H. A. 1989. methicillin-resistan Staphylococcie: genetic and mechanism of resistance. Antimicrob agents chemother. 33:991-4.
14. Hawierg J, Timmons S. y Strong DD, 1982. et al. Identification of a region of human fibrinogen interacting with Staphylococcal dumpling factor. Biochemistry. 21:1407
15. Hofnung y Quillardet, *Mutat. Res.*, 1984; 132, 141

16. Hoffmann GR. Toxicology. En: The basic science of poisons. 5 Ed. New York: Mc Graw-Hill, 1996; 86-102.
17. <http://db.doyma.es/cgi-bin/wdbcgi.exe/doyma/press.plantilla?ident=2072104/07/2002:28>.
18. <http://www.perunatural.es.fm>
19. <http://micol.fcien.edu.uy/flora/Croton-urucurana.htm>
20. <http://www.amigus.org/web/archives/001353.php>
21. Jevons MP. 1961 "Celbenin"-resistant staphylococci. Br Med J, 1:124-125.
22. Joklik y Wolfgang K. 1994. Zinsser Microbiología. 20^{ed}. Editorial Panamericana Bs As. 25:520-537.
23. Knox R. 1961 "Celbenin"-resistant staphylococci. Br Med J, 1:126.
24. Kloos WE y Bannerman TL. 1995 *Staphylococcus* and *Micrococcus*. En: Murray PR *et al.* (Eds.). Manual of Clinical Microbiology, 6th ed. American Society for Microbiology Press, Washington D.C. 282-298.
25. Kramer FL, Jordá G, Horianski M, Jerke G y col. 2004. Actividad antibacteriana de extractos crudos de *Croton urucurana* Baill y su relación con la concentración. ANAIS VIII Seminario Anual de Ensino Pesquisa e Extensao do CEFET-PR. Pato Branco-Paraná. ISBN 85-904845-2-1. pp 186-190.
26. Lowy FD. 1998 *Staphylococcus aureus* infections. N Engle J Med; 339:520-532.
27. Michel M. y Gutmann L. 1997. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant enterococci: therapeutic realities and possibilities. Lancet 349:1901-1906.
28. Morfín-Otero R, y Rodríguez-Noriega E. 1999. Enterobacterias con Betalactamasas de espectro extendido: su importancia como patógenos nosocomiales. Enf Infecci Microbiol; 19: 116-32.
29. Navy MJ. 1980. The puerperium. In: Benson RC Ed Current Obstetric and Gynecologic Diagnosis and Treatment. Los Altos: Lange Medical Publications. 781.
30. Otegui M.B. 1994. "Actividad citológica de los extractos de *Phyllitis brasiliensis* (Sw.) O. KTZE. Sobre raíces de *Allium cepa* L." tesina para acceder al grado de licenciado en genética. Facultad de Ciencias Exactas Químicas y Naturales. UNaM.
31. Rank J, y Nielsen 1993. A modified Alliums test as a tool screening of genotoxicity of complex mixtures. Hereditas 118: 49-53.

32. Robledo 2000. Utilización de *Tabernanontana catharicensis* a DC. En medios de cultivos y determinación de genotoxicidad.
33. Safrin S, Mc Keough M, Robinson D, y Spruane SL. 1994. Treatment of acyclovir-unresponsive cutaneous herpes simplex infection. *Antiviral research* ; 25(3-2): 185-192
34. Sawchuk B. Sf. Descripción de Árboles Medicinales de la Selva Misionera. Editorial Lumicop. Posadas. Misiones. 52-53
35. Schwartzman J B. Krimer Y Z. y Moreno Azorero Y R. 1975 *Stevia rebaudiana* Bert. (Ka'a-He'e) del ciclo celular en *Allium cepa* L. *Rev. Soc. Cient. Del Paraguay*. 15:51-59
36. Ubillas R., Jolad S.D. y Bruening R.C. 1994 i wsp. SP-303, an antiviral oligomeric proanthocyanidin from the latex of *Croton lechleri* (Sangre de Drago). *Phytomedicine*, 1: 77-106.

**Formulario de autorización de depósito de tesis/trabajo final integrador en la
 Comunidad Ciencias Exactas, Químicas y Naturales del RIDUNaM
 (Repositorio Institucional Digital de la UNaM)**

Por intermedio de la presente, el abajo firmante, AUTOR de la Tesis/TFI-(Grado) titulada/o
 GENOTOXICIDAD y ACTIVIDAD ANTI-BACTERIANA DE EXTRACTOS CRUOS
 DE Croton urucurana Baill SOBRE Staphylococcus aureus. —

Da FE de la autoría y originalidad de la obra mencionada, que fue dirigida por, Severino,
 BARGARDI

presentada y defendida en la Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales de la Universidad
 Nacional de Misiones (FCEQyN-UNaM), el (fecha) 05/10/2006, Acta/Expdte.
 N°....., con el fin de obtener el título de Licenciado en Genética —

Tildar según corresponda

- Tesis de Posgrado
 Doctorado Maestría Trabajo Final Integrador
 Tesis de Grado

Derechos patrimoniales

Como autor, expreso mi conformidad en cuanto a la cesión gratuita de los derechos de reproducción y circulación de esta obra, en forma NO EXCLUSIVA, a la Facultad de Humanidades y Ciencias Sociales-UNaM. Dicha reproducción y circulación se podrá realizar, una o varias veces, en cualquier soporte, para todo el mundo, con fines sociales, educativos y científicos.





En virtud del carácter no exclusivo de esta cesión, el autor podrá reproducir y comunicar libremente la tesis o trabajo final integrador, a través de los medios que estime oportunos.

Condiciones de acceso en línea

- Autorizo el depósito de la tesis o trabajo final integrador en forma inmediata
 Autorizo el depósito del documento con embargo por el plazo de _____ meses a partir de la defensa de la misma.

Condiciones de uso de la tesis/TFI

Será puesta a disposición pública bajo las siguientes condiciones de uso:

	(BY) Atribución — Debe reconocer los créditos de la obra de la manera especificada por el autor o el licenciante (pero no de una manera que sugiera que tiene su apoyo o que apoyan el uso que hace de su obra).
	(NC) No Comercial — No puede utilizar esta obra para fines comerciales.
	(SA) Permite trabajos derivados — Siempre que se mantenga la misma licencia.
	Reconocimiento - NoComercial - CompartirIgual (by-nc-sa): No se permite un uso comercial de la obra original ni de las posibles obras derivadas, la distribución de las cuales se debe hacer con una licencia igual a la que regula la obra original.

Referencias:

- CC (Licencias Creative Commons).
 BY (Atribución).
 NC (No comercial).
 SA (Compartir igual).

Dados personales (llenar un cuadro por cada autor)

Apellido y Nombres	ZENUKA Daniel Benjamin
Correo electrónico	danizenuka@gmail.com
Apellido y Nombres	
Teléfono/Celular	
Correo electrónico	
Apellido y Nombres	
Teléfono/Celular	
Correo electrónico	

Se firma la presente en la Ciudad de Posadas, Misiones a los...26..... días del mes de Septiembre..... de 2025



Zenuka, Daniel Benjamin
DNI: 25.486.462