

HEREDIA MARTIN, JUAN

Extractos de Achyro

73980

2015

73980



Universidad Nacional de Río Cuarto
Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales
Departamento de Microbiología e Inmunología
Departamento de Química

Extractos de *Achyrocline satureioides* (marcela) como alternativa natural para el control de *Pseudomonas syringae*, fitopatógena de soja y *Paenibacillus larvae*, agente causal de Loque Americana en *Apis mellifera*

Trabajo final para optar al título de Magister en Biotecnología
Lic. Juan Pablo Heredia Martín
Año 2015

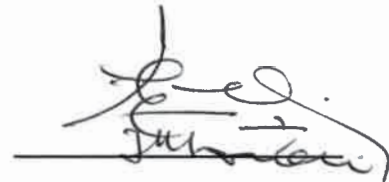
Director: Dr. Juan Miguel Marioli
Co-directora: Dra. María de las Mercedes Oliva

75980

MFN:
Clasif:
T.947

El siguiente trabajo final fue realizado en la orientación Microbiología en el Departamento de Microbiología e Inmunología y en el Departamento de Química, escrito y presentado como requisito para optar al título de Magister en Biotecnología, en la Facultad de Ciencias Exactas, Físico – Químicas y Naturales de la Universidad Nacional de Río Cuarto.

Director: Dr. Juan Miguel Marioli



Firma

Co – Directora: Dra. María de las Mercedes Oliva



Firma

Miembros del jurado

Dra. Sandra Fuselli



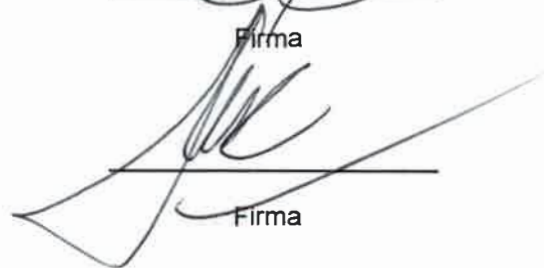
Firma

Dr. Edgardo Durantini



Firma

Dra. Marisa Rovera



Firma

Tesista: Lic. Juan Pablo Heredia Martín



Firma



Dicen los sabios.... Y los que ya han vivido lo suficiente, que todos los sueños se hacen realidad. Muy posiblemente no necesitamos tener 100 años para llegar a un momento de nuestra vida y comprobar al mirar atrás que muchas de esas cosas que visualizamos siendo niños, ya se han hecho o se están haciendo realidad.

Nos atreveríamos a decir que cuando un sueño no se hace realidad tal como lo imaginamos es porque lo que viene es impensablemente superior a lo modestamente deseado.

Las cosas llegan en el momento en que deben llegar. Cuando perdemos la paciencia porque el futuro no está en el presente nos salimos sin quererlo de la realidad y perdemos la confianza. No podemos traer el futuro al presente, es imposible. El presente que vivimos, lo vivimos porque sin él, no llegaríamos al mañana.

Una vez que sembramos un sueño, lo único que debemos hacer es creer y seguir el recorrido para llegar hasta él. Ciertamente, el recorrido puede ser más largo de lo que esperábamos, pero si el camino se torna difícil, lo menos recomendado es dar vuelta atrás, porque aunque retrocedamos, el objetivo final se quedara al otro lado. Rendirse significará dejar abandonado en el camino un sueño con todo el potencial para hacerse realidad.

La vida y los sueños son como las estaciones. Recuerda que justo después del invierno llega la primavera y con ella, la época para recoger los frutos que alguna vez sembramos.

“... con paciencia la hierba se convertirá en leche”... Proverbio chino...

La producción de insumos de importante valor nutricional y de interés agropecuario como las leguminosas y la miel y sus subproductos, se ven diezmados año tras año por las crecientes enfermedades que puedan sufrir los organismos de los que derivan debido a la proliferación de microorganismos que causan sus patologías y que se propagan indiscriminadamente. En el caso de la soja, su monocultivo y su siembra directa, entre otros, son factores que generan las condiciones apropiadas para la multiplicación y supervivencia de patógenos causantes de enfermedades de fin de ciclo (EFC) entre los que se encuentra el tizón bacteriano causado por *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*; en el caso de la miel, la mala manipulación e inadecuada gestión de colmenas contaminadas contribuye a la dispersión de la loque americana, una de las enfermedades más serias e infecciosas de las abejas (*Apis mellifera*), con alto grado de patogenicidad y virulencia que afecta a sus larvas, causada por la bacteria *Paenibacillus larvae* cuya esporulación es su única forma infectiva.

Estudios previos han demostrado que diferentes extractos de *Achyrocline satureioides*, poseen actividad antibacteriana frente a un amplio número de patógenos incluidas bacterias Gram positivo y Gram negativo. Asimismo, el empleo de productos de origen natural para el tratamiento de microorganismos patógenos evitaría el uso indiscriminado de antibióticos convencionales, con la consecuente aparición de cepas resistentes y la contaminación del medio ambiente causada por metales pesados. Es así que se propone determinar la actividad antimicrobiana de las fracciones del extracto hidro – alcohólico (EHA) de *A. satureioides* sobre *P. syringae* y *P. larvae*, a partir de un estudio con enfoque bioguiado.

Se obtuvieron cuatro fracciones del EHA mediante extracciones líquido – líquido sucesivas en disolventes de polaridad creciente (Hexano, Benceno, Éter etílico y Acetato de etilo); se evaluó la actividad antibacteriana de cada fracción mediante técnica de difusión en disco, contra 8 cepas de bacterias fitopatógenas de soja y 13 cepas de *P. larvae* de diferentes orígenes geográficos de Argentina; a las fracciones en hexano y éter etílico, que presentaron mayor inhibición, se les determinó la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) y la Concentración Bactericida Mínima (CBM); estas dos fracciones fueron separadas por Cromatografía en Capa Delgada (CCD) y por Cromatografía en Columna (CC), obteniéndose 5 bandas a las cuales se les determinó CIM y CBM, previa separación, se evaluó su actividad antibiótica por bioautografía.

Las fracciones de *A. satureioides* presentaron *in vitro* actividad inhibitoria contra cepas de *P. larvae*, sin embargo, las cepas de *P. syringae* no fueron inhibidas. Los resultados constituyen una evidencia del uso de *A. satureioides* como agente antibacteriano, corroborando la alta sensibilidad de *P. larvae* frente a productos naturales derivados de esta especie vegetal. Las fracciones resultantes del EHA mostraron menores valores de CIM y presentaron CBM contra un alto porcentaje de la población microbiana evaluada a comparación de sus respectivas bandas, los resultados sugieren que existe un efecto sinérgico entre sus constituyentes que permite mayor efectividad de las fracciones al ser aplicadas sin separar.

The production of highly nutritious agricultural supplies, which have a high agricultural importance, like leguminous plants, honey and honey products, are affected every year by the diseases that suffer the organisms that derive due to the proliferation of pathogenic microorganisms which produce pathologies and propagate indiscriminately. The monoculture and direct sowing of the soybean cause the special conditions needed for the increase and survival of pathogens which produce end-of-cycle diseases (ECD), like *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* the causal agent of bacterial blight of soybean. For honey, inappropriate handling and inadequate management of the contaminated beehives contribute to the American foulbrood dispersion, one of the most serious and contagious diseases for honeybees (*Apis mellifera*). The high level of pathogenicity and virulence of this disease affect the honeybee larvae due to its causal agent, the gram-positive bacteria spore form *Paenibacillus larvae*.

Extracts from *Achyrocline satureioides* have been the target of numerous studies, demonstrating antibacterial activity against gram-positive and gram-negative bacteria. Additional, the use of non-toxic natural products for the treatment of pathogenic strains avoid the contamination and dissemination of conventional antibiotics and heavy metals spread to the environment. Hence, the goal of this research was to obtain the hydro-alcoholic extract (HAE), fractions and bands from *A. satureioides* (Marcela) and determine the antimicrobial activity against *P. syringae* and *P. larvae* by a bioguided analysis.

Four fractions were obtained from HAE by liquid-liquid successive extraction in solvents of increasing polarity (Hexane, Benzene, Ethyl ether and Ethyl acetate). The antibacterial activity was tested for all of them by disk diffusion against 8 phytopathogenic bacteria of soybean and 13 *P. larvae* strains from different geographical origins of Argentina. The higher antibacterial activity was presented by hexane and ethyl ether fractions and their Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) were determined. These fractions were analyzed by Thin Layer Chromatography (TLC) and further fractioned by Flash Column Chromatography (FCC), where five bands of each of them were obtained, which were determined MIC and MBC. Besides, their antibiotic activity was tested by autobiography, too.

The *A. satureioides* fractions showed inhibitive in vitro activity against all *P. larvae* strains compared to *P. syringae* strains which not showed effectiveness in inhibiting. These results are an evidence to use *A. satureioides* extracts like antimicrobial agent and to verify the *P. larvae*'s susceptibility to natural products obtained from this plant. Furthermore, the not separated bands showed higher MIC values and presented MBC against all of the susceptible strains compared to the bands separated of each other. The results let suggest that a synergistic effect between the components of the mix exist, which allows greater effectiveness to apply the fractions completely (not separated).

La production d'intrants agricoles à forte valeur nutritionnelle, comme les légumineuses, le miel et ses sous-produits, est décimé annuellement par l'augmentation de la prévalence des maladies qu'ils peuvent souffrir des organismes dont proviennent en raison de la prolifération des micro-organismes qui provoquent des infections et ils se propagent sans discrimination. Au soja, son monoculture et ensemencement direct, ils génèrent des bonnes conditions pour une large multiplication et de survie de pathogènes des maladies de fin de cycle (MFC) comme la nécrose bactérienne due à *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*; au miel, une mauvaise manipulation et la gestion inadéquate des colonies d'abeilles (ruches) malades aident à la propagation de la Loque Américaine, elle s'agit d'une maladie grave et affecte uniquement au couvain (larves) des membres de la famille *Apis*, ce qui inclus les abeilles *Apis Mellifera*, c'est une maladie causée par le bacille *Paenibacillus larvae* capable de sporuler et c'est sous cette forme qu'elle est disséminée.

Etudes préalables sur différents extraits d'*Achyrocline satureioides* ont démontré qu'exercent leur effet antibactérien sur la plus part des micro-organismes pathogènes comme les bactéries Gram positifs ainsi que le Gram négatifs, en outre le traitement des souches pathogènes avec la utilisation de produits naturels évite la pollution et la dissémination d'antibiotiques conventionnels et la distribution des métaux lourds dans l'environnement ainsi que l'apparition de souches résistants. Le but de ces travaux c'est la détermination de l'activité antibactérienne qu'ont les fractions de l'extract hydro alcoolique (EHA) d'*Achyrocline satureioides* à la fois sur *P. syringae* et *P. larvae*, dans une perspective bio-guidée.

De l'extraction liquide-liquide successive de l'EHA a été obtenu quatre fractions à partir de solvants de croissante polarité (Hexane, Benzène, Éther éthylique et Acétate d'éthyle); on a essayé l'activité antibactérienne de chaque fraction par la méthode de diffusion sur disque contre 8 souches de *P. larvae* toutes qu'elles venant des parties différentes de l'Argentine; des fractions qui ont eu une activité grande, fraction hexane (FH) et fraction éther éthylique (FE), leurs Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) et leurs Concentrations Minimales Bactéricides (CMB) ont été déterminées; FH et FE ont été séparées par Chromatographie sur Couche Mince (CCM) et par Chromatographie sur Colonne (CC) étant obtenu 5 bandes de chacune, ainsi qu'ont trouvé leurs CMI et CMB, avant le séparation, on a essayé leur activité antibiotique par bio-autographie.

On a été démontré que fractions d'*A. satureioides* exercent effet inhibitoire sur souches de *P. larvae*, contrairement à les souches de *P. syringae* que n'ont pas été inhibées. Ces résultats constituent d'une évidence de l'utilisation d'*A. satureioides* comme l'agent antimicrobien contre *P. larvae* comme d'autres aux produits naturels de cette espèce. En outre, des fractions complètes (non séparées) ont eu plus bas CMI et ont montré CMB à la fois sur un pourcentage élevé de souches essayées contrairement à leurs bandes séparées; les résultats suggèrent que peut avoir un effet de synergie entre les constituants de chaque fraction qui augmente son efficacité lorsqu'elles sont appliquées intégrées (non séparées).

ÍNDICE

I – INTRODUCCIÓN

1. Plantas medicinales	13
2. Obtención de extractos derivados de plantas medicinales	14
2.1. Aislamiento de compuestos químicos de EV	16
2.2. Determinación de actividad antimicrobiana de EV	17
3. <i>Achyrocline satureioides</i>	19
4. Tizón bacteriano en soja	22
5. Loque Americana en abeja melífera	24

II – HIPÓTESIS

28

III – OBJETIVOS

1. General	28
2. Específicos	28

IV – MATERIALES Y MÉTODOS

1. Soluciones, medios de cultivo y reactivos	29
1.1. Soluciones	29
1.2. Medios de cultivo	29
1.3. Otros reactivos	30
2. Extractos vegetales (EV)	31
2.1. Recolección y procesamiento del material vegetal	31
2.2. Obtención de extracto hidro – alcohólico (EHA) y de diferentes fracciones	31
3. Cromatografías	33
3.1. Cromatografía en capa delgada (CCD)	33
3.2. Cromatografía en columna flash	33
4. Cepas bacterianas	35
4.1. <i>Pseudomonas syringae</i>	35

4.1.1. Conservación y propagación de cepas	35
4.2. <i>Paenibacillus larvae</i>	35
4.2.2. Mantenimiento y conservación de cepas	36
5. Actividad antibacteriana de oxitetraciclina (OTC) y extractos naturales	37
5.1. Determinación de la actividad antibacteriana de las fracciones del EHA de <i>A. satureioides</i>	37
5.1.1. Técnica de difusión en disco	37
5.1.2. Concentración Inhibitoria Mínima (CIM)	37
5.1.3. Concentración bactericida mínima (CBM)	38
5.1.4. Bioautografía	39

V – RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Especie vegetal	40
1.1. Recolección y procesamiento de <i>Achyrocline satureioides</i>	40
1.2. Obtención de las fracciones del Extracto Hidro – Alcohólico (EHA) de <i>A. satureioides</i>	40
2. Microorganismos	41
2.1. <i>Pseudomonas syringae</i>	41
2.2. <i>Paenibacillus larvae</i>	42
2.2.1. Prueba de la catalasa	42
3. Determinación de la actividad antibacteriana de extractos obtenidos de <i>A. satureioides</i>	43
3.1. Técnica de difusión en disco	43
3.1.1. <i>Pseudomonas syringae</i>	43
3.1.2. <i>Paenibacillus larvae</i>	44
3.2. Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) por la técnica de microdilución en caldo	47
3.3. Determinación de la Concentración Bactericida Mínima (CBM)	50
4. Fraccionamiento bioguiado de la FH y FE	51
4.1. Cromatografía en Capa Delgada (CCD) para la FH y FE	51

4.2. Determinación de la actividad antimicrobiana de bandas obtenidas de la FH y FE por Bioautografía	53
4.3. Cromatografía en columna (CC) para la FH y la FE	54
4.4. Ensayo de la actividad antibacteriana para las fracciones de <i>A. satureioides</i> obtenidas en la CC	56
4.4.1. Bandas de la fracción hexano (FH)	57
4.4.1.1. Técnica de difusión en disco	57
4.4.1.2. Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) por la técnica de microdilución en caldo	58
4.4.1.3. Determinación de la Concentración Bactericida Mínima (CBM)	59
4.4.2. Bandas de la fracción éter etílico (FE)	60
4.4.2.1. Técnica de difusión en disco	60
4.4.2.2. Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) por la técnica de microdilución en caldo	62
4.4.2.3. Determinación de la Concentración Bactericida Mínima (CBM)	63
VI – CONCLUSIONES	66
VII – BIBLIOGRAFÍA	69
VIII – ANEXOS	78

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Métodos de obtención de AE y EV a partir de plantas medicinales	14
Figura 2. Clasificación general de los métodos cromatográficos de acuerdo a la naturaleza de las fases móvil y estacionaria	16
Figura 3. Clasificación de las distintas técnicas cromatográficas según la disposición de la fase estacionaria	16
Figura 4. Clasificación de los métodos microbiológicos de determinación de actividad antimicrobiana	17
Figura 5. <i>Achyrocline satureioides</i> – “Marcela”	20
Figura 6. Obtención de extractos con solventes de polaridad creciente: a. Maceración con etanol:agua (EtOH:H ₂ O) (1:1) y filtración; b. Concentración a presión reducida	32
Figura 7. Obtención de extractos con solventes de polaridad creciente: a. Extracto acuoso; b. Extractor líquido – líquido para solventes menos densos que el agua	32
Figura 8. Armado de la columna de cromatografía flash: a. Esquema; b. Columna cromatográfica	34
Figura 9. a. y b. Colonias de <i>P. syringae</i> repicadas en medio AKB; c. Coloración de Gram de <i>P. syringae</i> observada al microscopio óptico (100x)	41
Figura 10. a. Colonias de <i>P. larvae</i> repicadas en medio AMYPGP; b. Coloración de Gram de <i>P. larvae</i> observado al microscopio óptico (100x)	42
Figura 11. Actividad antibacteriana de las fracciones del EHA de <i>A. satureioides</i> , (1 mg/mL), sobre las cepas <i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> DC3000 y <i>P. syringae</i> VT2	43
Figura 12. Halos de inhibición producidos por las fracciones del EHA de <i>A. satureioides</i> , a concentración de 1 mg/mL, contra cepas de <i>P. larvae</i>	45
Figura 13. Actividad antibacteriana FH de <i>A. satureioides</i> frente a cepas de <i>P. larvae</i> 2, 4, 6, 7, 8, 9 y 10	48
Figura 14. Actividad antibacteriana de la FE de <i>A. satureioides</i> frente a cepas de <i>P. larvae</i> 2, 4, 6, 7, 8, 9 y 10.	49
Figura 15. Bandas observadas en TLC de FH y FE con sus respectivos R _f s	52
Figura 16. Bioautografías para las bandas de a. FH y b. FE	53
Figura 17. Perfil de las bandas obtenidas luego de la CC de la FH con sus respectivos R _f s	54



Figura 18. Perfil de las bandas obtenidas luego de la CC de la FE con sus respectivos Rf's	55
Figura 19. Halos de inhibici6n producidos por las fracciones de las bandas de la FH de <i>A. satureioides</i> contra dos de las cepas de <i>P. larvae</i> m1s susceptibles	58
Figura 20. Actividad antibacteriana de las bandas de la FH de <i>A. satureioides</i>	59
Figura 21. Halos de inhibici6n producidos por las fracciones de las bandas de la FE de <i>A. satureioides</i> contra dos de las cepas de <i>P. larvae</i> m1s susceptibles	61
Figura 22. Actividad antibacteriana de las bandas de la FE de <i>A. satureioides</i>	63

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición fitoquímica de <i>Achyrocline satureioides</i>	21
Tabla 2. Actividad antibiótica de <i>Achyrocline Satureioides</i>	22
Tabla 3. Cepas de <i>P. syringae</i> utilizadas en los ensayos microbianos	35
Tabla 4. Cepas de <i>P. larvae</i> utilizadas en los ensayos microbianos	36
Tabla 5. Diámetro de los halos de inhibición (en cm) producidos por las fracciones del EHA de <i>A. satureioides</i> contra cepas de <i>P. larvae</i>	45
Tabla 6. CIM y CBM de FH y FE del EHA de <i>A. satureioides</i> y de OTC contra cepas de <i>P. larvae</i>	47
Tabla 7. Resultados de los ΔR_f para cada una de las fracciones en distintos sistemas de solventes	52
Tabla 8. R_f 's para cada una de las fracciones obtenidas por TLC	52
Tabla 9. Cantidades de cada una de las bandas obtenidas de la FH por CC	55
Tabla 10. Cantidades de cada una de las bandas obtenidas de la FE por CC	56
Tabla 11. Diámetro de los halos de inhibición (en cm) producidos por las bandas de la FH de <i>A. satureioides</i> contra cepas de <i>P. larvae</i>	57
Tabla 12. Concentración Inhibitoria Mínima (en mg/mL) de las bandas de la FH del EHA de <i>A. satureioides</i> contra cepas de <i>P. larvae</i>	58
Tabla 13. Diámetro de los halos de inhibición (en cm) producidos por las bandas de la FE de <i>A. satureioides</i> contra cepas de <i>P. larvae</i>	60
Tabla 14. Concentración Inhibitoria Mínima (en mg/mL) de las bandas y mezclas de la FE del EHA de <i>A. satureioides</i> contra cepas de <i>P. larvae</i>	62

I – INTRODUCCIÓN

1. Plantas medicinales

Las plantas medicinales se definen como "todo vegetal que tiene, en uno o más de sus órganos, sustancias que pueden ser utilizadas con fines terapéuticos o preventivos o que son precursores de hemisíntesis quimiofarmacéutica" (Fernández, 2005). Producen "principios activos", los cuales son sustancias que ejercen una acción farmacológica, beneficiosa o perjudicial, sobre el organismo vivo al que se aplique (Muñoz, 1996).

Las plantas medicinales se utilizan comúnmente en forma de infusión, extracto o como fuente de aceite esencial o resina, las cuales se componen de mezclas complejas que contienen un gran número de constituyentes. El estudio de las plantas medicinales no solo se limita al conocimiento de la actividad de dichas plantas sino que también se enfoca en la purificación de sus constituyentes para así determinar y nombrar las moléculas que poseen una actividad específica y así comprender su acción (Fernández, 2005).

A nivel mundial, especialmente en países de Sur y Centro América, el uso de plantas medicinales tiene un aporte significativo en el cuidado primario de la salud. Se cree que existen en el planeta alrededor de 250.000 a 500.000 especies de plantas de las cuales solo entre el 1 al 10% son usadas como alimento para humanos y animales (Cowan, 1999). Se han aislado alrededor de 12.000 compuestos procedentes de organismos vegetales y se estima que constituyen tan solo el 10% de los metabolitos secundarios (Domingo y López – Brea, 2003). Las plantas tienen una capacidad ilimitada de sintetizar compuestos, entre los que se encuentran fenoles, flavonas, aceites esenciales y compuestos relacionados, lo que las hace fuente natural importante de sustancias que poseen propiedades biológicas.

Los aceites esenciales (AE) y extractos de plantas han sido ampliamente usados para una variedad de propósitos durante varios años y recientemente se ha generado un interés generalizado como una fuente de antimicrobianos natural alternativa. Los AE y extractos de plantas son particularmente interesantes ya que son relativamente seguros, incrementan la vida útil de los alimentos, son aceptados por los consumidores y tienen un potencial por sus múltiples usos (Rakholiya y col., 2013). Entre los compuestos que sintetizan la mayoría de las plantas, que poseen actividad biológica y que han sido ampliamente estudiados están los AE, constituidos

principalmente de una mezcla compleja de compuestos orgánicos (Demo y col., 2005); otras sustancias sintetizadas por plantas medicinales con actividad biológica relevante y de manera comparable a los AE son los compuestos fenólicos, de los cuales los más simples consisten en un anillo fenólico sustituido y los flavonoides que constituyen la familia más amplia de fenoles naturales, éstos son ubicuos en las células fotosintéticas y comúnmente son encontrados en frutos, vegetales, semillas, flores, té, vinos, propóleos y miel (Arredondo y col., 2004). En la actualidad se conoce que los metabolitos secundarios de naturaleza flavonoide poseen actividad antifúngica, antiviral y antimicrobiana, aislándose muchos grupos, identificando sus estructuras y demostrando, para ciertos casos, que existe sinergia entre los flavonoides activos presentes en una planta, así como entre estos y los quimioterápicos existentes (Cushnie y Lamb, 2005).

2. Obtención de extractos derivados de plantas medicinales

Existen diferentes técnicas para la extracción de productos naturales a partir de plantas medicinales, como los AE y extractos vegetales (EV). Los más empleados se resumen en el siguiente esquema (Figura 1).

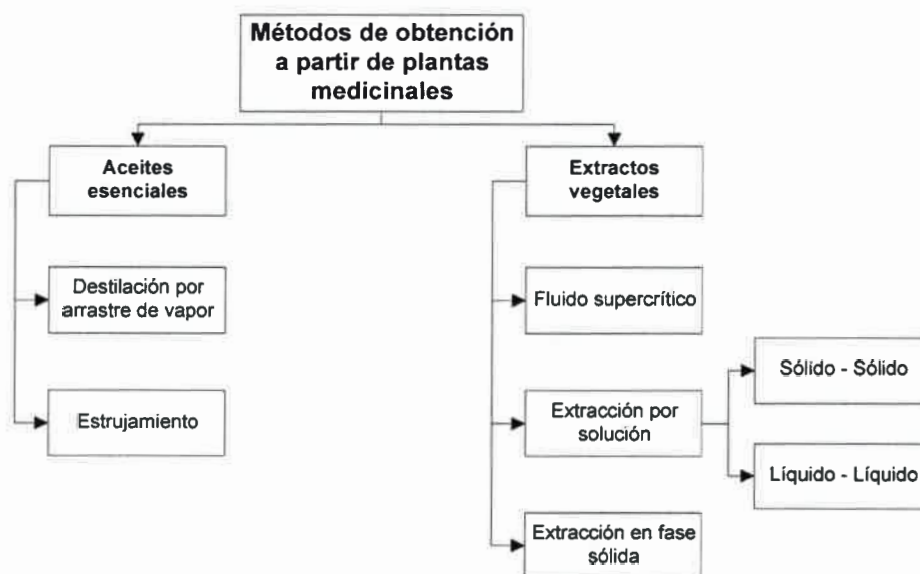


Figura 1. Métodos de obtención de AE y EV a partir de plantas medicinales



La obtención de extractos es recomendable en plantas que contienen baja concentración de AE o en las que estos no están presentes pero si lo están otros compuestos activos. Mientras que los AE constituyen la fracción volátil de los principios activos de una planta, y por tanto, su principal medio de obtención son las técnicas de destilación en la que se volatilizan los principios activos por calor, los extractos consisten en la fracción no volátil de estos, es decir, son los compuestos no volatilizables o inestables a la temperatura, que no se pueden obtener mediante destilación, sino que se obtienen mediante diversas técnicas de extracción (Raaman, 2006).

La extracción se considera como una operación de transferencia de materia basada en la disolución de uno o varios de los componentes de una mezcla (líquida o que forma parte de un sólido) en un disolvente selectivo (Costa, 2004). La distinción entre extracción sólido – líquido y extracción líquido – líquido, radica en si el material a extraer se encuentra en fase sólida o líquida, caso en el cual el disolvente debe ser inmiscible en la fase que contiene el extracto. En general, se denomina extracción sólido – líquido al procedimiento consistente en poner en contacto un sólido triturado (material vegetal) con un líquido (disolvente de extracción) en el que son solubles algunas de las sustancias de las que se compone el sólido, del proceso se obtiene un sólido agotado y una disolución o extracto formado por el disolvente y las sustancias disueltas en él (Ortuño, 2006).

La tintura alcohólica, tintura madre, tintura o simplemente extracto hidro – alcohólico (EHA) se obtiene de la maceración de la planta, generalmente seca y con un tamaño de partícula no muy pequeño, con una disolución de alcohol:agua del 25 al 50%. El macerado o mezcla hidro – alcohólica se conserva en un recipiente hermético en un lugar fresco y oscuro, agitando periódicamente el recipiente para homogenizar la mezcla. Dependiendo de la planta y otros factores, se cambia la mezcla alcohol – agua y luego de un tiempo de maceración o extracción conveniente se cuele la mezcla, se filtra el extracto, se envasa y se almacena en forma adecuada (Ortuño, 2006).

La extracción líquido – líquido se utiliza para separar los constituyentes de una solución acuosa y suele realizarse luego de la maceración del material vegetal una vez obtenida la tintura alcohólica o el EHA. La extracción líquido – líquido puede aplicarse cuando uno o más de los constituyentes de la tintura son solubles en un líquido orgánico, prácticamente inmiscible con el agua, mientras que los restantes son mucho menos solubles (Glasstone y Sesonkske, 2005).

2.1. Aislamiento de compuestos químicos de EV

Los métodos cromatográficos son por excelencia utilizados en el aislamiento de mezclas complejas como los EV; son métodos físicos de análisis basados en el principio de retención selectiva que busca la separación de los diferentes componentes de una mezcla para lograr identificarlos y cuantificarlos. La cromatografía comprende un grupo de métodos para separar mezclas moleculares que dependen de las afinidades diferenciales de los solutos entre dos fases no miscibles, una de las fases es un lecho fijo de gran área superficial, denominada fase estacionaria, mientras que la otra es un líquido el cual se mueve a través de la superficie de la fase fija o sobre ella, denominada fase móvil (Remington, 2003).

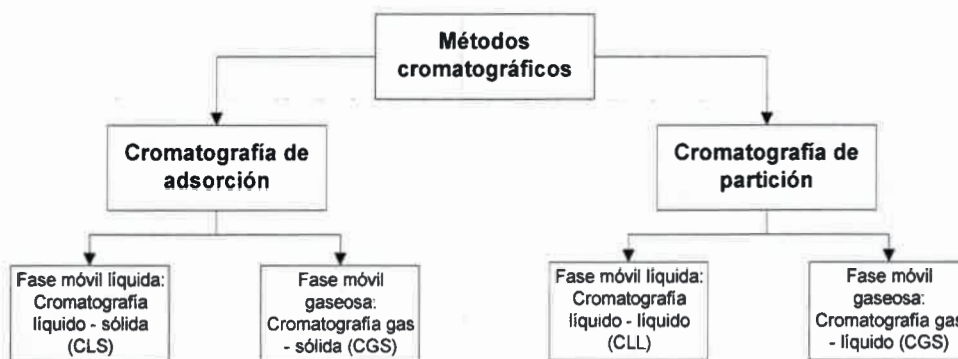


Figura 2. Clasificación general de los métodos cromatográficos de acuerdo a la naturaleza de las fases móvil y estacionaria

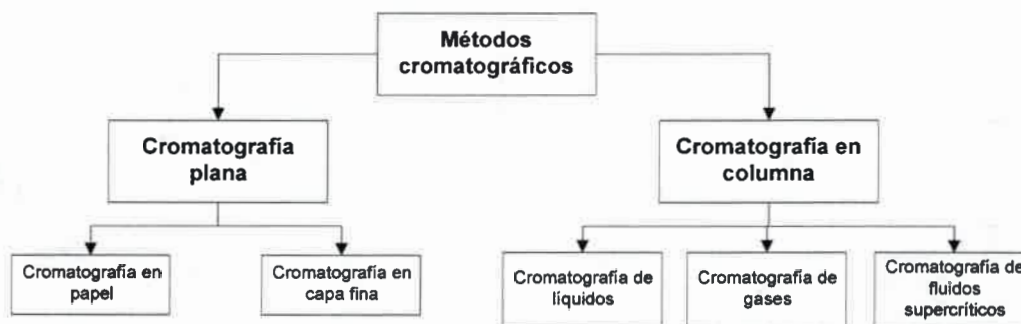


Figura 3. Clasificación de las distintas técnicas cromatográficas según la disposición de la fase estacionaria

La cromatografía en capa fina o delgada y la cromatografía en columna son métodos simples y eficientes que sirven para identificar y cuantificar metabolitos

secundarios tanto de sustancias vegetales como de extractos naturales, tinturas e incluso formulaciones farmacéuticas. Son técnicas muy utilizadas para la identificación y determinación de pureza de compuestos y pueden utilizarse como técnica de separación (cromatografía de capa fina – CCD preparativa) a muy pequeña escala y como etapa previa en donde se requiera identificar la presencia de un metabolito secundario de interés farmacológico o principio activo. A partir de 1906 se empieza a utilizar la cromatografía en columna para separar EV coloreados, proceso por el cual se le asigna este nombre. Para trabajar en una separación con columna en general es necesario realizar primero un análisis del comportamiento cromatográfico en placa de la mezcla a separar. Se prueba dicho comportamiento en distintos solventes y mezclas de solventes, resultando adecuado para la separación aquel en el cual el componente que tenga mayor movilidad no supere un $R_f = 0,6$ (Kimbrough y col., 1992).

2.2. Determinación de actividad antimicrobiana de EV

Es conveniente determinar la actividad antimicrobiana de un extracto completo antes de separar sus constituyentes o parte de ellos, los cuales podrían o no presentar dicha actividad, para esto existen varios métodos microbiológicos de screening que ayudan en la detección de la actividad antimicrobiana de extractos de productos naturales, tales como los que se muestran en el esquema (Figura 4).

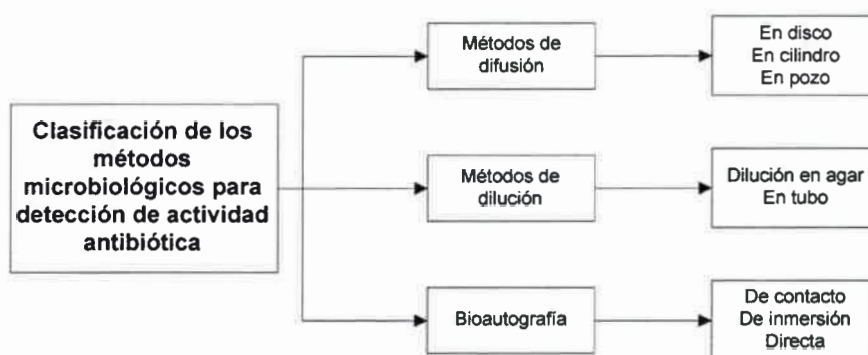


Figura 4. Clasificación de los métodos microbiológicos de determinación de actividad antimicrobiana (Choma y Grzelak, 2011)

Los métodos de difusión son frecuentemente utilizados para medir la susceptibilidad de los microorganismos en presencia de sustancias puras con potencial acción antibiótica, preferiblemente polares más que apolares. En el método

de difusión en disco, discos de papel filtro (de alrededor de 6 mm de diámetro) conteniendo el compuesto a analizar, son colocados en la superficie de agar previamente inoculado con el microorganismo a evaluar, el agente antimicrobiano difunde en el agar e inhibe el crecimiento del microorganismo produciendo zonas de inhibición las cuales pueden ser medidas utilizando un calibre. El antibiograma por difusión en disco está basado en el trabajo de Bauer y colaboradores (1966) y es uno de los métodos que el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) recomienda para la determinación de la sensibilidad bacteriana a los antibióticos (Kiehlbauch y col., 2000). En la técnica de difusión en pozo, se hacen pozos poco profundos y de diámetro pequeño en el agar previamente inoculado con el microorganismo a analizar y se llenan con las soluciones de las muestras a ensayar, estas difunden en el medio agarizado causando inhibición de crecimiento del microorganismo y una vez incubadas a las condiciones de crecimiento adecuadas se miden los halos de inhibición producidos. La Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) es determinada visualmente como la concentración más baja de compuesto en la cual se haya producido una zona reconocible de inhibición de crecimiento. Sin embargo, los métodos de difusión son menos susceptibles para determinar la CIM respecto a los de dilución en medios líquidos, debido a que es imposible medir la cantidad difundida de compuesto en el medio agarizado (Choma y Grzelak, 2011).

La mayor ventaja de los métodos de dilución es la posibilidad para estimar la concentración de los compuestos analizados en el medio agarizado o suspendidos en un caldo, por esta razón son comúnmente utilizados para determinar la CIM (Hostettmann y col., 2001); su campo de aplicación incluye extractos complejos, sustancias puras y muestras polares como no polares. En el procedimiento de dilución en agar, varias soluciones del compuesto a ensayar son mezcladas con el agar nutritivo, el agar se inocula con el microorganismo y luego se incuban. La concentración más baja de sustancia antimicrobiana a la cual no se detecta crecimiento del microorganismo se asigna como la CIM (Choma y Grzelak, 2011).

Tanto en los ensayos de dilución o difusión la medida del efecto bacteriostático del agente sobre la bacteria se denomina como la concentración mínima del antimicrobiano que no muestra crecimiento manifiesto o Concentración Inhibitoria Mínima (CIM). Sin embargo solo en los ensayos de dilución en caldo (macro y micro dilución), se logra determinar la Concentración Bactericida Mínima (CBM) es decir el efecto bactericida de un antimicrobiano, el cual se define como la menor concentración

de compuesto, sustancia o extracto que produce la muerte de más del 99.9% de las bacterias (Mendoza, 2008).

La bioautografía como un método para determinar la actividad antibacteriana en un cromatograma ha sido ampliamente utilizada en la investigación de nuevos antibióticos. La técnica se basa en la metodología de difusión en agar en la que los compuestos se transfieren de un cromatofolio (con la muestra sembrada y desarrollada) al medio previamente sembrado e inoculado en una placa, a través del proceso de difusión. Las zonas de inhibición son visualizadas por tinciones vitales apropiadas, por ejemplo una sal de tetrazolio, que al haber actividad metabólica de la bacteria se transforma en formazan, su correspondiente forma reducida coloreada, así los componentes antibacterianos aparecen como manchas claras contra un fondo coloreado (Hamburger y Cordell, 1987).

3. *Achyrocline satureioides*

Achyrocline satureioides (Lam.) DC, popularmente conocida como “Marcela”, es un arbusto perteneciente a la familia de las asteráceas, originario de América y distribuido por Europa y África. Existen más de 40 especies de *Achyrocline* spp., muchas de las cuales son de América tropical y subtropical (25 fueron descritas en Brasil) y muy pocas de África tropical y Madagascar. La palabra *Achyrocline* viene del griego *achyros* que significa maleza y *kline* que significa cama, refiriéndose probablemente a su receptáculo fimbriado. Es originaria del sureste de Sudamérica y crece en suelos arenosos y pedregosos, en terrenos montañosos o planos. Es común en Brasil – a partir de Minas Gerais hasta Rio Grande do Sul – Uruguay, norte y centro de Argentina (Lorenzo y col., 2000; De Souza y col., 2007). En Argentina se encuentra mucho en áreas húmedas y suelos arenosos; crece en las sierras de Córdoba, San Luis y en Buenos Aires (Tandil y en las dunas de las costas de la provincia de Buenos Aires). Se encuentra también en Venezuela, Colombia, en el centro y sur de Bolivia donde puede crecer a altitudes de 3900 m.s.n.m., Paraguay y también Perú (Retta y col., 2012).

A. satureioides (Lam.) DC, es un subfrutice perenne que alcanza por lo general un poco más de medio metro de alto; de flores amarillo rojizas, de alrededor de 2 cm de diámetro, floreciendo en pequeños racimos (Figura. 5). En el hemisferio sur suele hacerlo en primavera y verano, fructificando a fines del verano y durante el otoño. Las

hojas son delgadas y de color verde oscuro, a gris medio con pubescencia blanca en toda la planta (Gattuso y Gattuso, 1998).



Figura 5. *Achyrocline satureioides* – “Marcela”

La marcela tiene un uso tradicional de varios años existiendo información etnobotánica sobre sus aplicaciones medicinales en prácticamente todos los países en los cuales crece. Como planta medicinal ha sido estudiada por sus propiedades digestivas, sedativas, antiinflamatorias, antiespasmódicas, antidiabéticas y antiasmáticas (Ratera y Ratera, 1980; Heinzen y col., 2005). También se la menciona como estimulante, emenagoga, antipirética y antihelmíntica al ser usada como tónico (Parodi, 1979). Hay informes de su utilización para el tratamiento de enfermedades, intestinales, cólicos, diarrea e irregularidades menstruales (Lorenzi y Matos, 2002). En Venezuela la planta es utilizada en infusiones antidiabéticas, para regular la presión sanguínea, la artritis y como agente antipirético, mientras que en Bolivia es utilizada como agente antipirético y sudorífico además de expectorante e inclusive en niños para aliviar la tos. En Colombia se ha utilizado para el tratamiento de tumores (Gupta, 1995).

Los AE de *A. satureioides* suelen obtenerse por hidrodestilación, mientras que sus extractos se pueden obtener por medio de fermentaciones, decocciones, maceraciones e infusiones. Un método bastante difundido es la realización de una maceración hidro – alcohólica de la planta y sucesivas extracciones líquido – líquido

con solventes de polaridad creciente para obtener sus respectivas fracciones (Retta y col., 2012).

Se han referenciado una gran cantidad de compuestos pertenecientes a varios grupos fitoquímicos encontrados en el AE y/o extractos de las partes aéreas e inflorescencias de *A. satureioides* y se han identificado numerosos polifenoles y flavonoides los cuales se describen en la Tabla 1. Otros compuestos encontrados en esta planta incluyen cumarinas, polisacáridos, achyrofurano (Carney y col., 2002), lactonas y poliactinelidos (Dembitsky y col., 2003).

Tabla 1. Composición fitoquímica de *Achyrocline satureioides*

Compuestos	Autores
Ácido cafeico, dos ésteres de calerianina (3,4 – dihidroxibenzil alcohol – 4 – glucósido) con ácido cafeico y ácido protocatecuico, respectivamente, galangina, galangin – 3 –metil éter, quercetina, quercetin – 3 – metil éter.	Ferraro y col., 1981; Broussalis y col., 1989; Dellacassa y col., 1993.
Gnagfalina e iso – gnafalina, quercetagetina y quercetin – 3 metil éter 7 – glucósido, tamarixetina, tamarixetina 7 – glucósido, ácido 3 – cafeoilquinico, ácido 4 – cafeoilquinico, ácido 5 – cafeoilquinico, ácido 3,4 – dicafeoilquinico, ácido 3,5 – dicafeoilquinico, ácido 4,5 – dicafeoilquinico.	Broussalis y col., 1988; Marques y Farah, 2009.
Luteolina y escoparol.	Petrovick y Knorst, 1992.
5,8 – dihidroxi – 3,7 – dimetoxiflavona	Haensel y Ohlendorf, 1971; Wagner y col., 1971.
3 – methoxyquercetin	Simoës y col., 1988.
3,5,7,8 – tetrametoxiflavona	Mesquita y col., 1986.
5,7,8 – trimetoxiflavona	
7 – hidroxí – 3,5,8 trimetoxiflavona	
Achyrobichalcona	Holzschuh y col., 2010.

El AE se obtiene por hidrodestilación, se sabe que su contenido puede variar según el origen del material utilizado y que el componente más abundante en este es el α – pineno (41 – 78%) (Retta y col., 2012). Basándose en la composición de otros compuestos, se clasifica en 3 grupos homogéneos con base en su componente principal: (a) los que tienen un alto contenido de (Z) y (E) β – ocimeno (3 – 12 %) y β – cariofileno; (b) los que carecen de isómeros de ocimeno, bajo porcentaje de β – cariofileno y presencia de terpenos oxigenados, principalmente pinocarveol y verbenona; y (c) los que poseen un bajo contenido de α – pineno pero alto de β – ocimeno (27%) y 1,8 cineol (12%) (Lamaty y col., 1991).

En las dos últimas décadas esta especie ha sido objeto de investigación científica utilizando modelos *in vitro* y modelos de animales *in vivo*, proporcionando evidencia experimental de un amplio espectro de propiedades farmacológicas y terapéuticas, entre las que se destacan: actividad hematoprotectora, asociada a sus propiedades antioxidantes y captadora de radicales libres, actividad antihiperglicémica, antiinflamatoria e inmunomoduladora. Existen datos de actividad insecticida, tripanocida, antiherpética y frente a VIH – 1, actividad citotóxica frente a células de carcinoma hepático humano, así como actividad antibacteriana frente a especies Gram positivo y negativo (Alonso y Desmarchelier, 2005). En la Tabla 2 se resumen algunos trabajos en los que se ha estudiado la actividad antibiótica de esta planta.

Tabla 2. Actividad antibiótica de *Achyrocline satureioides* (Retta y col., 2012)

Actividad	Extracto	Observación
Larvicida	Extractos etanólicos de partes aéreas	<i>In vivo</i>
Moluscicida	Etanólico	<i>In vivo</i>
Insecticida y tripanocida	Extracto hexánico y etanólico de flores y hojas	<i>In vivo</i>
Antiparasítica	Acuoso	<i>In vivo</i>
Antimicrobiana	Decocción	<i>In vitro</i>
Antimicrobiana	Extracto alcohólico y aceites esenciales	<i>In vitro</i>
Antimicrobiana	Extracto acuoso	<i>In vitro</i>
Antiviral	Extracto alcohólico	<i>In vitro</i>
Antifúngica		<i>In vitro</i>

4. Tizón bacteriano en soja

Las bacterias son habitantes comunes de la superficie y del interior de la mayoría de las plantas, pudiendo favorecer, perjudicar o simplemente convivir con la planta. Un ejemplo claro donde la asociación de bacterias con una planta es favorable lo encontramos en los nódulos del cultivo de soja. Desafortunadamente, también encontramos ejemplos de asociaciones perjudiciales entre bacterias y plantas en el cultivo de soja: las bacterias *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*, *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* y *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* causan las enfermedades

conocidas como pústula bacteriana, quemazón y tizón bacteriano respectivamente (Cracogna, 2008).

El “tizón bacteriano” es una enfermedad difundida en toda el área de cultivo de soja. Las lesiones foliares son al principio pequeñas, oscuras, angulosas, de aspecto húmedo. Alcanzan 1 – 2 mm, se oscurecen adquiriendo centro seco de color castaño, un margen pardo húmedo y halo amarillo estrecho. Al confluir forman grandes manchas irregulares. El centro de las lesiones se desprende al envejecer y deja a las hojas desgarradas. Las lesiones presentan en el envés de las hojas una zooglea gris, mucoide, que al secarse forma una costra plateada. El agente causal es *P. syringae* pv. *glycinea* (Coerper) Young, Dye and Wilkie, actualmente conocida como *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea*, del cual se ha comprobado su transmisión por semilla (Cabrera y col., 2003; Formento y col., 2007). Es una bacteria epífita, es decir que coloniza la superficie de la epidermis y los espacios intercelulares del mesófilo sin ingresar al interior de las células de la hoja. Es capaz de crecer rápidamente en la plántula pre – emergente y luego coloniza las hojas cuando la planta crece. Este bacilo Gram negativo, aerobio estricto, perteneciente a la subclase gamma de Proteobacterias, es oxidasa y arginina dehidrolasa negativos, posee flagelo polar y en la mayoría de los casos produce pigmentos fluorescentes. Actualmente, en la provincia de Córdoba se registra la presencia de tizón bacteriano desde los primeros estadios vegetativos y durante casi todo el ciclo del cultivo, con niveles de incidencia del 100% y de severidad de hasta un 20% (Distefano, 2013).

P. syringae puede causar enfermedades de manchas, puntos y tizón en plantas tales como porotos (fríjoles), remolachas, manzanas, pepino, lechuga, avena, tomate, ornamentales, entre otros. Por esto, los aislamientos de la bacteria son subdivididos taxonómicamente en patovares, los cuales son variedades patogénicas basadas principalmente en el huésped de aislamiento (Hwang y col., 2005).

La estrategia más común para el control de las enfermedades producidas por *P. syringae* ha sido, por más de 5 décadas, rociar bactericidas. Estos incluyen principalmente una variedad de compuestos de cobre o metales pesados, con o sin combinaciones con varios fungicidas u otros químicos controladores de plagas. La aspersion de antibióticos u otros compuestos bactericidas también ha sido usada pero durante los últimos años se han detectado globalmente cepas patógenas resistentes. En la actualidad se utilizan como estrategias alternativas para el tratamiento de estos patógenos, aunque poco difundidas: a) rociar las plantas infectadas con compuestos antibacteriales naturales y b) varias técnicas de agricultura sustentable sin el uso de

agroquímicos en granjas orgánicas (Bashan, 1997). En los primeros ensayos en los que se usaron compuestos antibacteriales naturales sobre plantas con bacteriosis, tizón y/o pústulas se demostró la actividad antibacteriana de residuos de té y café contra *P. syringae* pv. *phaseolicola* y *P. syringae* pv. *pisi*, evaluadas en laboratorio e invernadero, sugiriendo que diferentes componentes de estos residuos pueden controlar estos dos patógenos (Alström, 1992). En un ensayo de screening de AE de diferentes plantas aromáticas se demostró que estos exhibieron alto nivel de actividad antibacteriana incluso mayor que el antibiótico estreptomycinina.

Cantore y col., (2003) ensayaron los AE extraídos de frutos de comino, alcaravea, hinojo y cilantro contra 10 patovares de *P. syringae*, demostrando que hubo actividad antibacteriana significativa con los AE de comino, alcaravea y cilantro. Estos resultados preliminares indican el uso potencial de los AE anteriores en el control de enfermedades causadas por patovares de *P. syringae* en cultivos de importancia económica y agrícola.

De acuerdo a Balestra y col., (2008) ensayos *in vitro* e *in vivo* de extractos acuosos de frutos de *Allium sativum* y *Ficus carica* reducen la sobrevivencia y el daño causado (incidencia de la enfermedad y severidad del daño) por bacterias patógenas del kiwi como *P. syringae* pv. *syringae*, *P. viridiflava* y del tomate *P. syringae* pv. *tomato*.

5. Loque Americana en abeja melífera

Las abejas melíferas son uno de los animales más importantes empleados por el hombre debido a su papel como polinizadoras de cultivos y frutas, ya que lo hacen en un amplio rango de plantas de vida salvaje. Son importantes no solo para la proliferación y sustentación de ecosistemas agrícolas sino también ayudan en el mantenimiento de muchos ecosistemas no agrícolas.

Las abejas adultas son huésped de una amplia diversidad de patógenos para las larvas (Yue y col., 2008) y estas pueden transmitir enfermedades de una colmena a otra como la Loque Americana o American Foolbrood (AFB) la cual solo afecta al estado larval de la abeja melífera. Esta patología es muy contagiosa y una de sus principales vías de diseminación se produce por el transporte de las esporas del patógeno en las abejas adultas, las cuales son inmunes al patógeno (Wilson, 1971; Hitchcock y col, 1979; Luna y col., 2002). El agente causal de la AFB es la bacteria Gram positivo, flagelada, formadora de esporas *Paenibacillus larvae*; sus esporas son

extremadamente persistentes y son la única forma infecciosa del microorganismo (Alippi, 1990; Heyndrickx y col., 1996). El poder infectivo de *P. larvae* es severo ya que solo requiere 10 esporas para hacer daño a la larva de menos de 24 horas de edad (Bambrick, 1964).

Hay efectos importantes asociados a la AFB tales como disminución en la población de abejas y la producción de miel, causando un impacto negativo en la apicultura mundial. El problema principal en la prevención y control de esta enfermedad es la resistencia de las endosporas, las cuales pueden sobrevivir por más de 35 años en miel y/o materiales apícolas soportando altas temperaturas y la acción de la mayoría de los desinfectantes comúnmente utilizados (Bambrick y Rotherbuhler, 1961; Hasemann, 1961).

P. larvae es una bacteria esporulada que en medio MYPGP (Müller – Hinton, Extracto de levadura, Fosfato, Glucosa, Piruvato) forma colonias de color blanquecino o grisáceo, chatas, con superficie rugosa y borde irregular, Gram positivo y catalasa negativa, que hidrolizan el almidón, producen diacetilo y reducen el nitrato a nitrito. Algunas cepas producen ácido a partir de manitol y no se desarrollan en caldo nutritivo (Nordstrom y Fries, 1995). Es un aerobio facultativo que se desarrolla mejor en presencia de bajas concentraciones de oxígeno (Dingman y Stahly, 1983). La tiamina (vitamina B1) y algunos aminoácidos se requieren para el crecimiento de *P. larvae*. Los medios de cultivo rutinarios tales como caldo nutritivo no permiten el crecimiento de este organismo. El buen crecimiento vegetativo ocurre en medio infusión cerebro – corazón fortificado con 0,1 mg de clorhidrato de tiamina y magnesio por litro de solución (BHIT) y a pH 6,6 ajustado con HCl, sin embargo, la esporulación no ocurre. El crecimiento y la esporulación satisfactorios ocurren en el extracto de levadura, en almidón soluble y en los medios de glucosa recomendados por Bailey y Lee (1962). El medio puede ser líquido, semisólido (0,3% agar) o sólido (2% agar). Las esporas de *P. larvae* también se desarrollan en la hemolinfa de las larvas, de las crisálidas y de los adultos de la abeja melífera cuando son introducidas por la inyección en forma artificial (Michael 1960; Wilson y Rothenbuhler 1968; Wilson 1970). De acuerdo a Shimanuki (1963), no se conocían métodos de confianza para hacer conteo en placa de *P. larvae* porque menos de 10 por ciento de las esporas producirán el crecimiento visible en los medios disponibles a la fecha. Usando métodos estándares para conteo de esporas en placa se ha determinado que un mínimo de 100 esporas de *P. larvae* se requieren para producir el crecimiento visible en BHIT; se han desarrollado otros medios de

cultivo para el crecimiento de *P. larvae*, dentro de los cuales el agar MYPGP produce el más alto porcentaje de recuperación de esporas (Graaf y col., 2013).

P. larvae fue aislado primero en Argentina en 1989, en Uruguay fue aislado en provincias adyacentes a Argentina y actualmente está ampliamente distribuida en ambos países (Alippi, 1992; Piccini y Zunino, 2000; Antúnez y col., 2007). Una de las medidas de control más empleadas en Nueva Zelandia y el Reino Unido es quemar las colmenas de abejas infectadas. Sin embargo, en Estados Unidos y Canadá, se utilizan antibióticos como medidas más extendidas, especialmente oxitetraciclina (OTC), lo que ha generado cepas resistentes (Alippi, 1996; Miyagi y col., 2000; Evans, 2003). Además, los antibióticos no son efectivos contra las esporas infecciosas, por lo tanto, solo suprimen los síntomas clínicos y enmascaran la enfermedad sin curar la AFB (Genersch, 2010).

Los compuestos naturales de baja toxicidad, pueden ser una alternativa para evitar el uso de antibióticos en el control de AFB y disminuir considerablemente la resistencia de patógenos como así también la cantidad de residuos en productos apícolas (Sabaté y col., 2012). Varios estudios han reportado que productos naturales como el propóleo, los AE y otros compuestos derivados de plantas, tienen actividad antagónica contra *P. larvae* (Albo y col., 2003; Antúnez y col., 2004; Antúnez y col., 2008; Bastos y col., 2008; Gende y col., 2009; Flesar y col., 2010).

Delgado (2012) estudió los extractos de canela (*C. zeylanicum*), sábila (*A. vera*), manzano (*M. domestica*), ajo (*A. sativum*), ruda (*R. graveolens*) y romero (*R. officinalis*), demostrando que estos controlaban el crecimiento de *P. larvae* inhibiendo la bacteria, siendo el de canela el más efectivo para controlar la enfermedad sin afectar la ecología de la colmena. Gende y col., (2008a) demostraron el uso efectivo del AE de canela (*C. zeylanicum*) y sus componentes principales cinamaldehído y eugenol contra el patógeno *P. larvae* los cuales presentaron efecto bacteriostático y bactericida a bajas concentraciones.

González y Marioli (2010) evaluaron la efectividad de los extractos acuosos y los AE de 10 plantas diferentes – *A. satureioides*, *C. ambrosioides*, *E. cinerea*, *G. gaudichaudianum*, *L. turbinata*, *M. vulgare*, *M. verticillata*, *O. vulgare*, *T. minuta* y *T. vulgaris* – como inhibidores del crecimiento de *P. larvae*, siendo los AE los que tuvieron menor actividad antagónica.

En síntesis, son pocas las medidas efectivas contra bacterias Gram negativo fitopatógenas como *P. syringae* pv. *glycinea*, y aunque existen más opciones para el tratamiento de *P. larvae*, bacteria Gram positivo, estos no son efectivos para destruir su forma esporulada, de hecho los tratamientos convencionales contra ambos microorganismos elevan la carga residual tóxica de antibióticos y metales pesados en el ambiente y se corre el riesgo de ser propagadas en el producto final destinado al consumo humano. Por tanto, el desarrollo de estrategias de control debe ser considerado una actividad prioritaria en sectores de interés agroindustrial, a lo cual una alternativa es la búsqueda de productos naturales bioactivos derivados de vegetales.

Achyrocline satureioides (Marcela) al ser una planta de la zona serrana del sur de Córdoba (Argentina) ha sido estudiada ampliamente en el área por atribuírsele varias propiedades tanto medicinales y antibióticas como profilácticas, se ha estudiado su AE y sus extractos acuosos, todos estos han presentado efectos antimicrobianos contra diversos patógenos de interés clínico como agroindustrial. De hecho, en estudios previos realizados por este grupo de investigación, la fracción en hexano obtenida a partir del EHA de la planta ha mostrado la mayor actividad antimicrobiana contra *P. larvae*, sin embargo, no ha sido reportado informe alguno de la actividad de extractos de *A. satureioides* contra *P. syringae*. La realización de estudios desde un enfoque bioguiado de las fracciones más activas de *A. satureioides* contra estos patógenos proporcionará más detalles de las interacciones de la actividad antibiótica de los constituyentes que componen los extractos de la planta. Estos reducirían o eliminarían la contaminación ambiental y la resistencia a antibióticos convencionales; además son de bajo costo y podrían ser utilizadas para el control de bacteriosis de soja y Loque Americana en *Apis mellifera*.

II – HIPÓTESIS

Extractos derivados de *Achyrocline satureioides* (marcela) poseen actividad antimicrobiana contra *Pseudomonas syringae*, fitopatógenas de soja y *Paenibacillus larvae*, patógeno de *Apis mellifera*.

III – OBJETIVOS

1. GENERAL

Evaluar la actividad antimicrobiana de las fracciones de extractos de *Achyrocline satureioides* (marcela) para el control de *Pseudomonas syringae*, fitopatógena de soja y *Paenibacillus larvae*, agente causal de “Loque Americana” en *Apis mellifera*.

2. ESPECÍFICOS

- a. Recolectar la planta aromática medicinal *Achyrocline satureioides*.
- b. Obtener el extracto hidro – alcohólico (EHA) y las fracciones en solventes de diferente polaridad.
- c. Determinar la actividad antimicrobiana de las fracciones del EHA de *Achyrocline satureioides* sobre cepas de *Pseudomonas syringae* y *Paenibacillus larvae*, por:
 - i. Técnica de difusión en disco.
 - ii. Técnica de microdilución en caldo (Concentración Inhibitoria Mínima y Concentración Bactericida Mínima).
- d. Separar las bandas que componen las fracciones activas mediante técnicas cromatográficas:
 - i. Cromatografía en capa Delgada (CCD).
 - ii. Cromatografía en columna tipo “Flash Chromatography” (CCF).
- e. Determinar la actividad antimicrobiana de las bandas mediante:
 - i. Bioautografía.
 - ii. Técnica de difusión en disco.
 - iii. Técnica de microdilución en caldo (Concentración Inhibitoria Mínima y Concentración Bactericida Mínima).

IV – MATERIALES Y MÉTODOS

1. Soluciones, medios de cultivo y reactivos

1.1. Soluciones

- **Solución de resazurina al 0,01%**

Sal de resazurina sódica _____ 0,01 g

Agua destilada c.s.p. _____ 100 mL

Se disolvió 0,01 g de sal de resazurina sódica en 100 mL de agua destilada estéril en un frasco de vidrio color caramelo (ámbar). La solución se disolvió por agitación y se conservó a 4 °C con tapón de goma y en oscuridad.

- **Mezclas de Hexano:Acetona de diferentes concentraciones**

Solvente	Volúmenes establecidos para volumen final de 1 L				
Hexano proanálisis	600	700	750	800	850
Acetona proanálisis	400	300	250	200	150
Proporción	6:4	7:3	7,5:2,5	8:2	8,5:1,5

Se mezclaron los dos solventes en las proporciones establecidas, se agitaron para homogenización y se conservó la solución en refrigeración a 4 °C en botella de 1 L color caramelo.

- **Soluciones de Oxitetraciclina (OTC)**

A partir de una solución stock de concentración 1 mg/mL, se llevaron a cabo 9 diluciones seriadas factor 2 en dimetilsulfoxido (DMSO).

1.2. Medios de cultivo

- **Caldo King B (CKB): para *Pseudomonas* sp.**

Tripteína soya _____ 10 g

Peptona de carne _____ 10 g

Fosfato dipotásico _____ 1,5 g

Sulfato de magnesio _____ 1,5 g
Agua destilada _____ 1000 mL
Glicerina _____ 10 mL

- **Agar King B (AKB):** para *Pseudomonas* sp.

Se preparó con los mismos componentes indicados para CKB más el agregado de 15 g de agar/litro.

- **Caldo MYPGP:** para *Paenibacillus larvae*

Müller – Hinton _____ 10 g
Extracto de levadura _____ 15 g
Fosfato dipotásico _____ 3 g
Glucosa _____ 2 g
Piruvato de sodio _____ 2 mL
Agua destilada _____ 1000 mL

- **Agar MYPGP:** para *Paenibacillus larvae*

Se preparó con los mismos componentes indicados anteriormente más el agregado de 15 g de agar/litro, de acuerdo a los requerimientos del experimento.

Todos los medios se esterilizaron en autoclave a 121 °C a 1 atm de presión durante 15 minutos. Se conservaron a 4°C hasta el momento de su uso.

1.3. Otros reactivos

- **Colorantes para la coloración de Gram**

Violeta de genciana o Cristal Violeta
Lugol (KI₃)
Alcohol
Fuscina básica o safranina

- **Reactivo para la prueba de la catalasa**

Peróxido de hidrógeno (H₂O₂) al 10%

2. Extractos vegetales (EV)

2.1. Recolección y procesamiento del material vegetal

A. satureioides se recolectó de forma manual en época de floración en la zona rural de la localidad serrana de Santa Mónica (32° 5' 28,21" S y 64° 36' 31,66" O), provincia de Córdoba. Una muestra del material vegetal fue identificada y comparada con muestras del herbario de la Facultad de Agronomía y Veterinaria (Número de voucher: RIOC 4865) de la Universidad Nacional de Río Cuarto. En el laboratorio se seleccionaron hojas, tallos finos y flores de la especie vegetal las cuales se dejaron secar a temperatura ambiente sobre papel grafito y removiéndolas periódicamente para favorecer el aireamiento. Una vez secos se los conservó en condiciones adecuadas de temperatura y humedad hasta la obtención de los diferentes extractos.

2.2. Obtención de extracto hidro – alcohólico (EHA) y de diferentes fracciones

- Fracción en hexano (FH), en benceno (FB), en éter etílico (FE) y en acetato de etilo (FAE)

Se pesaron 370 g de vegetal seco y se maceraron en una mezcla etanol:agua (EtOH:H₂O) 1:1 hasta agotar el material vegetal, renovando el extractante periódicamente. El macerado se filtró por papel Whatman N° 2 obteniendo un extracto hidro – alcohólico (EHA) (Figura 6, a), el que posteriormente fue concentrado a presión reducida para evaporar el etanol (Figura 6, b), así se obtuvo un extracto acuoso (EA) (Figura 7, a). Finalmente, a dicho extracto se le realizó una extracción líquido-líquido en forma sucesiva (Figura 7, b) con solventes de polaridad creciente (hexano, benceno, éter etílico y acetato de etilo), durante una semana cada extracción. Una vez evaporado el solvente de extracción, se obtuvieron las fracciones en hexano (FH), en benceno (FB), en éter etílico (FE) y en acetato de etilo (FAE). A partir de cada una de estas fracciones se realizaron soluciones a concentración de 1 mg/mL en DMSO.

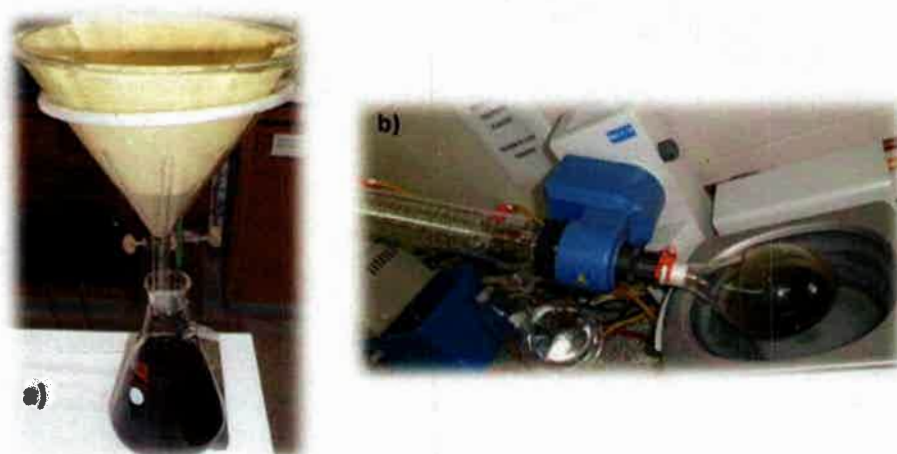


Figura 6. Obtención de extractos con solventes de polaridad creciente: a. Maceración con etanol:agua (EtOH:H₂O) (1:1) y filtración; b. Concentración a presión reducida

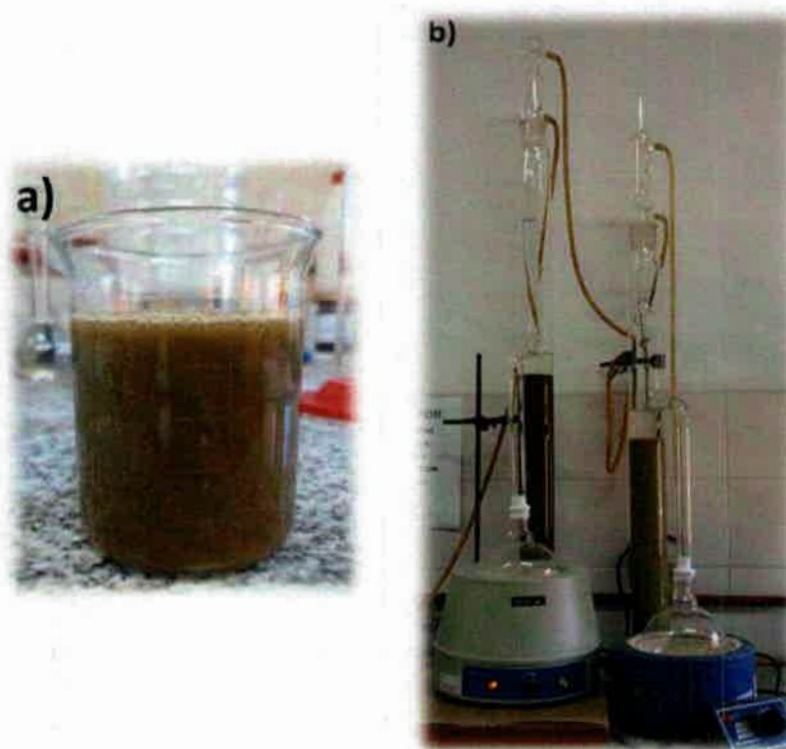


Figura 7. Obtención de extractos con solventes de polaridad creciente: a. Extracto acuoso; b. Extractor líquido-líquido para solventes menos densos que el agua

3. Cromatografías

3.1. Cromatografía en capa delgada (CCD)

Se cortaron cromatofolios de gel de sílice¹ de 3 cm de ancho por 7 cm de alto, a los cuales se les marcó con lápiz la línea de siembra a 0,70 cm de la base. Con un capilar se realizó la siembra del extracto a probar. La siembra se realizó en banda, en este caso de un 1 cm de ancho. Los cromatofolios se corrieron en una cámara de desarrollo previamente saturada con los vapores de la fase móvil la cuál fue una solución de Hexano:Acetona en proporción adecuada.

Una vez que los cromatofolios fueron corridos con la fase móvil, se retiraron de la cámara de desarrollo, se dejaron secar y se observaron bajo luz ultravioleta (UV) a 254 nm. Posteriormente se seleccionaron aquellas cromatografías donde se visualizaban bandas separadas y definidas, correspondientes a diferentes compuestos presentes en el extracto y se midieron los Rf de las mismas.

Por esta técnica se determinó la proporción de solventes adecuada para la realización de la cromatografía en columna ya que se debe buscar la separación de compuestos que corren muy cerca entre ellos, ajustando la proporción de solventes y consiguiendo un punto medio entre las bandas cercano a 0,35 o un ΔR_f de 0,35 (Furniss y col., 1989).

3.2. Cromatografía en columna flash

Luego de encontrar un sistema de solventes de baja polaridad adecuado y seleccionar una columna de vidrio apropiada, se realizó la cromatografía en columna flash (CCF) por la técnica de Still y col., (1978). El sistema se armó de acuerdo a la Figura 8.

¹Tamaño de partícula de 2 a 25 μm , tamaño de poro de 60 Å, indicador de fluorescencia 254 nm (Merck – láminas de aluminio: Número de producto 105554 TLC Silicagel 60 F₂₅₄ y láminas de plástico: Número de producto 105735 TLC Silicagel 60 F₂₅₄).

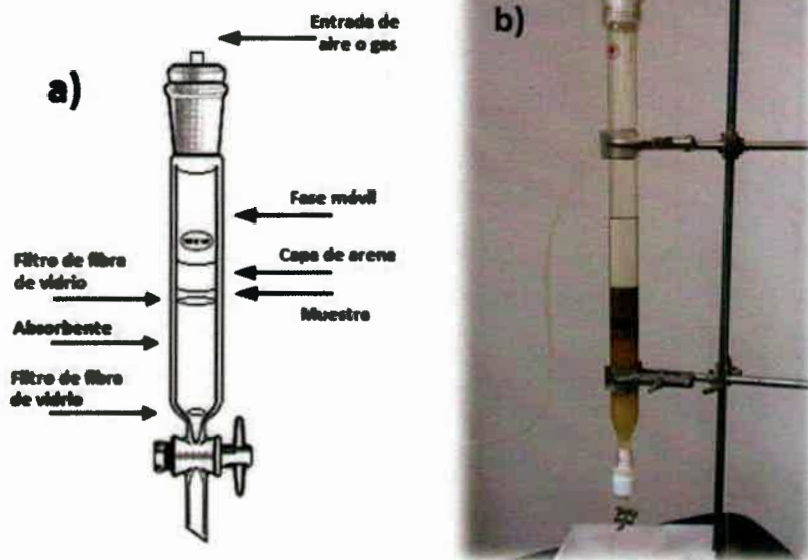


Figura 8. Armado de la columna de cromatografía flash: a. Esquema; b. Columna cromatográfica

Se colocó un filtro de fibra de vidrio en la parte inferior de la columna con la llave de salida cerrada, seguida de 30 a 35 gramos de gel de sílice² (absorbente) embebido en la fase móvil, otro filtro de fibra de vidrio, la muestra mezclada con una pequeña proporción de gel de sílice y una capa de arena fina lavada. Se procedió a llenar la columna con la fase móvil, se cerró la columna y se ejerció presión positiva abriendo la llave del cilindro o tubo que contenía el gas o aire sobre la parte superior de la columna; se controló el flujo de salida y se recolectaron 100 alícuotas de 3 mL cada una, que iban eluyendo por la parte inferior de la columna. Estas alícuotas se sembraron en puntos en un cromatofolio para identificar los R_f de las mismas y poder determinar a qué bandas pertenecían las diferentes alícuotas recolectadas. Una vez identificadas las alícuotas que tenían los mismos R_f fueron mezcladas y el solvente evaporado en frío con nitrógeno, para posteriormente determinar la actividad antibacteriana de cada banda.

²Tamaño de partícula de 35 a 75 μm y tamaño de poro de 60 Å. FLUKA 60738.

4. Cepas bacterianas

4.1. *Pseudomonas syringae*

Se utilizaron cepas de referencia (*P. syringae* pv. *tomato* DC3000 y *P. syringae* pv. *syringae* P61) y cepas aisladas de hojas de soja con sintomatología característica de tizón durante las campañas 2009/2010 y 2010/2011. Fueron caracterizadas según propiedades fisiológicas y bioquímicas en el Laboratorio de Microbiología del Departamento de Microbiología e Inmunología de la U.N.R.C. y genéticamente por secuenciamiento parcial del gen ARNr 16S (servicio de Macrogen, Korea) (Tabla 3).

Tabla 3. Cepas de *P. syringae* utilizadas en los ensayos microbianos

Cepa	Nº de acceso	Origen
<i>P. syringae</i> A5	KJ569376	Alcira Gigena (A)
<i>P. syringae</i> C13LS	KJ569375	Los Cisnes (LS)
<i>P. syringae</i> EM1	KJ569377	Alejandro Roca (EM)
<i>P. syringae</i> LS3	KJ569373	LS
<i>P. syringae</i> Q	KJ569372	Quines (Q)
<i>P. syringae</i> VT2	KJ569374	Venado Tuerto (VT)

4.1.1. Conservación y propagación de cepas

Las cepas utilizadas se conservaron en AKB inclinado a 4 °C, se repicaron mensualmente incubándolas a 28 °C por 24 a 48 horas. Para el almacenamiento de cepas a largo plazo se repicaron en CKB con el agregado de glicerol al 20% y se conservaron a – 80 °C.

4.2. *Paenibacillus larvae*

Las cepas bacterianas utilizadas se aislaron de cuadros de colmenas de la zona sur de la provincia de Córdoba con síntomas de Loque Americana durante el periodo 2006/2007 y algunas fueron provistas por el INTA Balcarce, provincia de Buenos Aires. Estas fueron caracterizadas según propiedades fisiológicas y bioquímicas en el Laboratorio de Microbiología del Departamento de Microbiología e Inmunología de la U.N.R.C. y secuenciamiento parcial del gen ARNr 16S (servicio de Macrogen, Korea). En la Tabla 4 se muestran las cepas estudiadas. Las cepas numeradas como *P. larvae* 12, 13, 14 y 17 (PI XII, PI XIII, PI XIV y PI XVII) no fueron

caracterizadas genotípicamente pero presentan fenotipo de *P. larvae* de acuerdo a su caracterización bioquímica (Gram +; catalasa –; Voges Proskauer –; Hidrólisis de almidón –; Hidrolisis gelatina y caseína +; Producción de ácido por glucosa + y crecimiento en NaCl 2% +); sus lugares de procedencia fueron: Salta (12 y 13), Entre Ríos (14) y Mar del Plata (17).

Tabla 4. Cepas de *P. larvae* utilizadas en los ensayos microbianos

Cepa	N° de acceso	Origen
<i>P. larvae</i> 1 (PI I)	AY530295	INTA Balcarce, Buenos Aires (BA)
<i>P. larvae</i> 2 (PI II)	AY530295	INTA Balcarce, BA
<i>P. larvae</i> 4 (PI IV)	DQ079623	INTA Balcarce, BA
<i>P. larvae</i> 6 (PI VI)	AY530295	INTA Balcarce, BA
<i>P. larvae</i> 7 (PI VII)	AY530295	Paso del durazno, Córdoba (Cba)
<i>P. larvae</i> 8 (PI VIII)	AY530295	Coronel Moldes, (Cba)
<i>P. larvae</i> 9 (PI IX)	AY530295	Coronel Moldes, (Cba)
<i>P. larvae</i> 10 (PI X)	DQ079623	Coronel Moldes, (Cba)
<i>P. larvae</i> 11 (PI XI)	AY530295	Coronel Moldes, (Cba)

Adicionalmente se realizaron dos pruebas de rutina:

- **Coloración de Gram:** Se empleó la técnica de Gram a partir de las colonias aisladas desarrolladas en medio de cultivo MYPGP agarizado, preparando una delgada película bacteriana en agua destilada fijada con calor sobre un portaobjetos, y realizando luego la coloración de Gram.
- **Prueba de la catalasa:** Se efectuó a partir de cultivos de 48 – 72 horas desarrollados en medio de cultivo MYPGP agarizado. En un portaobjetos seco se colocaron 2 gotas de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) al 10% y una colonia sospechosa. Una reacción positiva se evidencia por la aparición de burbujas, originadas por la acción de la catalasa sobre el peróxido de hidrógeno. En caso de reacción negativa no debe observarse desprendimiento de burbujas de oxígeno.

4.2.2. Mantenimiento y conservación de cepas

Las cepas fueron mantenidas en cajas de Petri con agar MYPGP a 4 °C y se realizaron repiques en medio de cultivo fresco cada semana (González, 2005),

incubándolos a 37 °C por 48 a 72 horas en atmosfera de microaerofilia con una concentración de dióxido de carbono de 5%.

5. Actividad antibacteriana de oxitetraciclina (OTC) y extractos naturales

5.1. Determinación de la actividad antibacteriana de las fracciones del EHA de *A. satureioides*

5.1.1. Técnica de difusión en disco

Tomando una ansada directamente del tubo o placa en el que se mantenían las cepas, se realizó un primer inóculo de los microorganismos en CKB o CMYPPG, para *P. syringae* este inóculo se dejó en incubación por 24 horas más a 28 °C, para luego hacer un segundo inóculo tomando una alícuota y pasándola a CKB fresco incubándola por otras 18 horas. A partir de los inóculos finales se realizaron diluciones factor 10 en CKB o CMYPPG para obtener una dilución equivalente al tubo 0,5 en la escala de McFarland. Se sembraron 100 µL de este inóculo ($10^6 - 10^8$ ufc/mL) sobre placas de AKB o AMYPPG. Alícuotas de 10 µL de las soluciones de cada una de las fracciones del extracto vegetal (a concentración de 1mg/mL) y DMSO puro, se absorbieron en discos de papel filtro estéril y se colocaron los mismos sobre las placas previamente sembradas, dejándolos 30 minutos a temperatura ambiente para que el extracto difundiera. Luego se incubaron a las condiciones y tiempos adecuados de crecimiento para cada microorganismo, tiempo en el cual se midieron los halos de inhibición. Los ensayos fueron realizados por duplicado (Bauer y Kirby, 1966; Kiska, 1998).

5.1.2. Concentración Inhibitoria Mínima (CIM)

Se determinó por la técnica de microdilución en caldo según Mann y Markham (1998). La técnica utilizada en este ensayo fue parcialmente modificada con el objeto de adecuarla a las condiciones de crecimiento de *P. larvae*.

Preparación de la dilución de trabajo: Se tomó una ansada de un cultivo desarrollado en agar MYPPG por 48 a 72 horas y se preparó un inóculo en caldo MYPPG agarizado al 0,1%; a partir de este se realizaron diluciones factor 10 en caldo MYPPG agarizado al 0,1% hasta la dilución 10^{-5} . En una microplaca de 96 pocillos se

colocaron 170 μ L de cada dilución del microorganismo a probar (de la más concentrada – pocillo 1 a la más diluida – pocillo 5), 20 μ L de DMSO (diluyente) y 10 μ L de resazurina (indicador redox). Se incubaron a 37 °C durante 8 horas en microaerofilia. Como dilución de trabajo se eligió la primera dilución incapaz de reducir la resazurina (azul). La visualización se fundamenta en la capacidad que tienen los microorganismos vivos, a determinada concentración, de reducir el indicador redox resazurina (0,1%); el color azul indicó que la concentración celular es insuficiente para reducir el compuesto (estado oxidado) y el rosado presencia de crecimiento (estado reducido).

Determinación de la CIM: A partir de una solución de concentración de 1 mg/mL de cada extracto o de 1 mg/mL de OTC, se realizaron 9 diluciones seriadas factor 2 en DMSO hasta una concentración final de 1,9 μ g/mL de cada una de las fracciones y antibiótico a ensayar por separado. En una microplaca de 96 pocillos se agregaron del 1 al 10, 20 μ l de cada una de las diluciones a probar (de la más concentrada – pocillo 1, a la más diluida – pocillo 10) más 170 μ l del inóculo (dilución de trabajo). El control positivo (pocillo 11) consistió en 170 μ l del inóculo con 20 μ l de DMSO y los controles negativos (pocillo 12) en 170 μ l de medio de cultivo sin inóculo con 20 μ l de la solución más concentrada del extracto a ensayar y/o 170 μ l de medio de cultivo sin inóculo con 20 μ l de DMSO. La microplaca se incubó a 37 °C en atmósfera de microaerofilia durante 16 horas. Pasado este tiempo, se agregaron 10 μ l de una solución de resazurina al 0,1% en todos los pocillos y la microplaca fue nuevamente incubada durante 5 horas a 37 °C recubierta con papel de aluminio para evitar la reducción de la resazurina por la luz. El ensayo fue realizado por duplicado. Se consideró la CIM como la última dilución del extracto que presentó color azul, es decir, la concentración más baja de extracto que inhibió el crecimiento visible del microorganismo.

5.1.3. Concentración bactericida mínima (CBM)

En placas con agar MYPGP se tomaron 100 μ l de la dilución considerada en la microplaca como CIM y se sembraron en superficie en AMYPGP. Del mismo modo se sembraron las cuatro diluciones más concentradas a la CIM. Las placas se incubaron a 37 °C en condiciones de microaerofilia durante 24 – 48 horas y se observó la CBM como la mínima concentración a la cual menos del 0,01% del inóculo sobrevivió, es

decir, la placa que no presentó crecimiento del microorganismo. Cada ensayo se realizó por duplicado (Finelgold y col., 1992).

5.1.4. Bioautografía

Se determinó la actividad antibacteriana por bioautografía de las bandas de FH y FE contra cepas de *P. larvae* con la técnica parcialmente modificada de Gende y col. (2008b).

A partir de un cultivo desarrollado en agar MYPGP con 72 horas de incubación a 37 °C en atmósfera de microaerofilia, se preparó el inóculo a probar obteniéndose una dilución en caldo MYPGP semi – sólido equivalente al tubo 1 de la escala de MacFarland. 1 ml del inóculo anterior se diluyó en 20 ml de medio de cultivo MYPGP agarizado al 0,6% fundido a 40 °C y se vertió en una caja de Petri que contenía un cromatofolio desarrollado y esterilizado previamente. Las cajas se incubaron a 37 °C en microaerofilia durante 24 h, y se asperjó 1 ml de solución de cloruro de 2,3,5-trifenil tetrazolio (TTC) al 5% sobre la superficie del medio de cultivo. Las cajas se incubaron nuevamente durante 24 – 48 horas. El ensayo fue realizado por duplicado.

La visualización se fundamenta en la capacidad que tienen los microorganismos vivos de reducir el TTC en formazán. El color rosa indicó crecimiento bacteriano, mientras que las zonas sin coloración indicaron inhibición del crecimiento, éstas fueron comparadas con los Rf de los cromatofolios correspondientes, permitiendo identificar las bandas activas.

V – RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Especie vegetal

1.1. Recolección y procesamiento de *Achyrocline satureioides*

Se realizó la recolección en los meses de diciembre de 2012 y enero de 2013, período en el cual la planta se encontraba en época de floración; el material vegetal se obtuvo de la localidad serrana de Santa Mónica (32° 5' 28,21" S y 64° 36' 31,66" O), provincia de Córdoba.

1.2. Obtención de las fracciones del Extracto Hidro – Alcohólico (EHA) de *A. satureioides*

- Fracciones en hexano (FH), benceno (FB), éter etílico (FE) y acetato de etilo (FAE):

Se obtuvieron cuatro fracciones del EHA de *A. satureioides* cada una con los siguientes pesos: 2,6538 g de FH; 1,7052 g de FB; 3,8008 g de FE y 2,2351 g de FAE, con rendimientos de 0,75% p/p; 0,45% p/p; 1,02% p/p y 0,6% p/p respectivamente para cada fracción. Los rendimientos obtenidos fueron similares a los reportados por estudios previos de este grupo de investigación para las fracciones hexano y benceno en los que obtuvieron rendimientos de 0,52% p/p (FH) y 0,50% p/p (FB), pero sustancialmente diferentes, entre 6 y 10 veces más, para las fracciones éter etílico y acetato de etilo que reportaron 0,17% p/p (FE) y 0,06% p/p (FAE) (González 2011).

Se han utilizado varias estrategias para obtener extractos de plantas, y aunque el agua es usada en muchos protocolos tradicionales, la extracción variando la polaridad de solventes orgánicos permite obtener constituyentes de la planta de varias solubilidades ampliando el espectro en la búsqueda de principios activos (Sarker y col., 2006). Entre los diferentes extractos obtenidos de plantas medicinales, las decocciones son las que presentan mayor concentración de ácidos fenólicos y flavonoides, seguidas de las infusiones y los EHA y, aunque de manera general todas poseen actividad antibiótica, las decocciones poseen mejores propiedades antioxidantes respecto a los EHA, los que presentan mayores características antimicrobianas (Martins y col., 2014).

Se ha demostrado la actividad antimicrobiana de extractos crudos y de otras preparaciones de plantas con altos contenidos de compuestos fenólicos, de hecho

algunos ácidos fenólicos y flavonoides presentes en extractos han sido estudiados por presentar actividad biológica contra bacterias y hongos (Cushnie y Lamb, 2005).

2. Microorganismos

2.1. *Pseudomonas syringae*

Se repicaron las 8 cepas de diferentes patovares de *P. syringae* reseñadas en materiales y métodos, que de acuerdo a su caracterización por secuenciamiento parcial del gen ARNr 16S, todos los patovares presentaron un 99% de identidad con la cepa de referencia *P. syringae* pv. *glycinea* (AB001443.1). Luego de 24 a 48 horas de incubación en medio de cultivo AKB a 28 °C se observaron colonias blancas, cremosas, lisas, planas y brillantes algunas con producción de pigmento amarillo – verdoso (Figura 9, a y b). La producción de pigmentos es característico del género *Pseudomonas*, por ejemplo algunas especies como *Pseudomonas savastoni* o *P. syringae* subsp. *savastanoi* (Garrity y col., 2009) producen un pigmento fluorescente azul en medio AKB el cual puede ser observado bajo luz UV.

A las cepas repicadas se les realizó la coloración de Gram, técnica que permitió corroborar la morfología de bacilos Gram negativo, delgados y agrupados, resultados que corresponden al agente causal del tizón bacteriano (Figura 9, c).

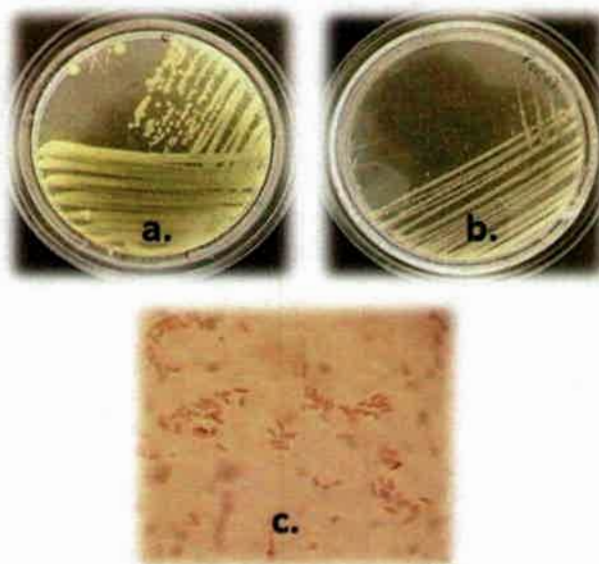


Figura 9. a. y b. Colonias de *P. syringae* repicadas en medio AKB; c. Coloración de Gram de *P. syringae* observada al microscopio óptico (100x)

2.2. *Paenibacillus larvae*

Se repicaron 13 cepas de *P. larvae* de diferentes orígenes geográficos, reseñadas en materiales y métodos, que de acuerdo a su caracterización por secuenciamiento parcial del gen ARNr 16S, todas presentaron entre el 97 y el 99% de identidad con las cepas de referencia *P. larvae* DSM 3615 o el aislamiento 03 – 189. Luego de 72 horas de incubación en medio de cultivo MYPGP a 37 °C en atmósfera de microaerofilia con un porcentaje de CO₂ del 5%, se observaron colonias translúcidas, planas, de bordes algo irregulares, de aproximadamente 3 a 4 mm de diámetro, tendiendo a emerger juntas en áreas de gran crecimiento (Figura 10, a).

A las cepas repicadas se les realizó la coloración de Gram, técnica que permitió corroborar la morfología de bacilos Gram positivo, delgados agrupados de a pares, solos o en cadenas cortas, resultados que corresponden a la forma vegetativa del agente causal de Loque Americana (Figura 10, b).

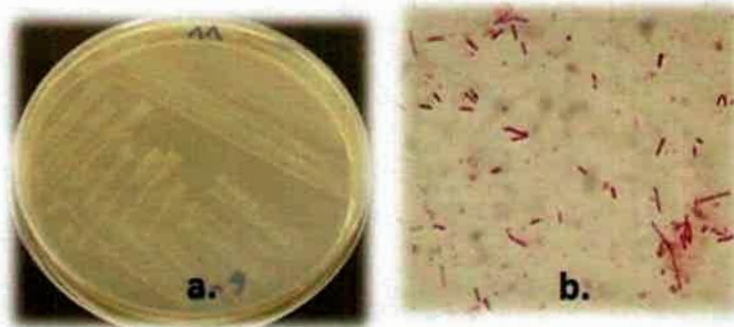


Figura 10. a. Colonias de *P. larvae* repicadas en medio AMYPPG; b. Coloración de Gram de *P. larvae* observado al microscopio óptico (100x)

2.2.1. Prueba de la catalasa

Se realizó la prueba de catalasa como ensayo de rutina de caracterización de las cepas aisladas de *P. larvae*, este microorganismo no produce esta enzima y si lo hace, lo hace en pequeñas proporciones (De Vos, 2009); se evidenció que al contacto con la solución de peróxido de hidrógeno no se presentó burbujeo, lo que indicó que las cepas fueron catalasa negativo.

3. Determinación de la actividad antibacteriana de extractos de *A. satureioides*

3.1. Técnica de difusión en disco

3.1.1. *Pseudomonas siringae*

Se evaluó la actividad antibacteriana, de las diferentes fracciones del EHA (1 mg/mL) de *A. satureioides* sobre cepas fitopatógenas de *P. syringae* aisladas de soja, por la técnica de difusión en disco. Los resultados del ensayo muestran que no hubo inhibición del microorganismo por ninguna de las fracciones (FH, FB, FE y FA) ya que no se observó la presencia de halos de inhibición en las placas de Petri (Figura 11 y Anexo: Fig. 1a).

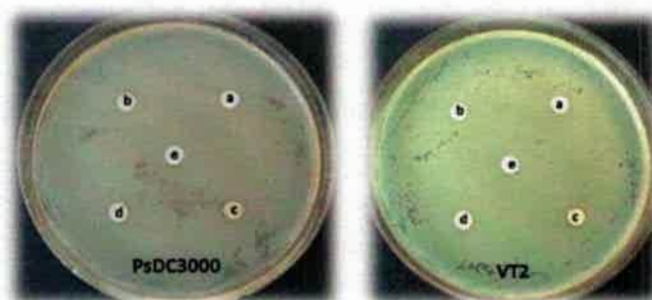


Figura 11. Actividad antibacteriana de las fracciones del EHA de *A. satureioides*, (1 mg/mL), sobre las cepas *P. siringae* pv. *tomato* DC3000 y *P. syringae* VT2

Referencias: a – FH (fracción hexano); b – FB (fracción benceno); c – FE (fracción éter etilo); d – FA (fracción acetato de etilo) y e – DMSO (diluyente)

De acuerdo a los resultados anteriores, se observa que las cepas de *P. syringae* fueron resistentes a las cuatro fracciones del EHA de *A. satureioides* a concentración de 1 mg/mL. Martins y col., (2014) al comparar las actividades biológicas de las decocciones, infusiones y EHA de *Origanum vulgare* L. evidenciaron que los EHA de la planta ejercieron mayormente un efecto antimicrobiano más que antioxidante y concluyen que estos poseen actividad inhibitoria sobre una amplia variedad de especies de *Pseudomonas* spp. Rakholiya y col., (2014) evaluaron los EHA de *Momordica charantia* L. contra varios patógenos de alimentos, incluidas diferentes especies del genero *Pseudomonas*, encontrando que los extractos en metanol al 50% y 100% tuvieron actividad contra todas las especies evaluadas; sin embargo, Fernandes y col., (2014) al analizar las propiedades antimicrobianas de los

extractos en metanol de diversas plantas medicinales de la sabana brasilera contra bacterias Gram negativo como *P. aeruginosa*, determinaron que estas fueron resistentes en presencia de extractos de hojas de *Solanum lycocarpum* y flores de *A. satureioides* al no presentar zonas de inhibición por la técnica de difusión en disco.

Las especies del género *Pseudomonas* crean resistencia al ser expuestas prolongadamente ante algunos antimicrobianos de uso convencional, debido a su uso difundido, más ante sustancias sintéticas que a naturales; las estrategias de resistencia que utilizan estos microorganismos involucran la inactivación por enzimas de la sustancia antimicrobiana, modificaciones bacterianas que impiden la llegada de la sustancia al punto diana y alteración por parte de la bacteria de su punto diana (Daza, 1998), estas dos últimas generadas por la transferencia horizontal de genes lo cual es de gran relevancia en la epidemiología de las enfermedades causadas por bacterias patógenas (Ruiz, 2007). Lo anterior explicaría el efecto nulo que presentaron las fracciones del EHA de *A. satureioides* contra las cepas fitopatógenas analizadas.

Por otro lado, al analizar los aceites esenciales (AE) de diferentes plantas medicinales como *Nepeta cataria*, *Mentha arvensis* y *Melissa officinalis*, se encontró que estos fueron activos frente a bacilos Gram negativos del género *Pseudomonas* y tuvieron mayor actividad antibacteriana contra *P. syringae* pv. *syringae* que contra *P. fluorescens*, y deducen que esto no es de sorprender ya que *P. fluorescens*, tal como *P. aeruginosa*, están dentro de los organismos más resistentes a los antimicrobianos, demostrándose que los AE son potencialmente más efectivos contra este tipo bacterias Gram negativo (Kokoskova y col., 2011).

3.1.2. *Paenibacillus larvae*

La actividad antibacteriana de las diferentes fracciones del EHA de *A. satureioides* a concentración de 1 mg/mL, ensayada por la técnica de difusión en disco, mostró los resultados que se resumen en la Tabla 5, estos representan el promedio del diámetro del halo de inhibición (medido en cm) de un ensayo por duplicado para cada una de las 13 cepas de *P. larvae* estudiadas. Cabe destacar que todas las fracciones del EHA tuvieron actividad antimicrobiana contra *P. larvae* con valores de halos de inhibición de 0,8 cm hasta 3 cm. Se muestra en la Tabla 5 que aquella fracción que presentó mayor actividad respecto al diámetro de halo de inhibición producido contra las cepas fue la FH, seguida de la FE, FB y FAE, respectivamente. El diámetro promedio de los halos de inhibición de la FH fue de 2,5

cm, superando en todas las cepas los 2 cm. La fracción menos activa fue la FAE, en la cual los halos de inhibición de mayor tamaño que se observaron no superaron 1 cm de diámetro.

Tabla 5. Diámetro de los halos de inhibición (en cm) producidos por las fracciones del EHA de *A. satureioides* contra cepas de *P. larvae*

Cepa	FH	FB	FE	FAE
PI 1	2,7	1,0	1,1	0,8
PI 2	2,2	0,9	1,2	0,8
PI 4	2,8	1,1	1,3	0,9
PI 6	3,0	1,1	1,2	1,0
PI 7	3,7	1,3	1,5	1,0
PI 8	2,3	1,0	1,3	0,8
PI 9	2,3	1,1	1,2	0,9
PI 10	2,6	1,0	1,1	1,0
PI 11	2,3	1,1	1,1	0,8
PI 12	2,1	1,0	1,2	0,9
PI 13	2,0	0,9	1,2	0,8
PI 14	2,2	1,0	1,1	0,9
PI 17	2,5	1,1	1,2	0,8
Promedio	2,5 ± 0,5	1,0 ± 0,1	1,2 ± 0,1	0,8 ± 0,1

Los resultados presentados demuestran que todas las cepas de *P. larvae* resultaron ser susceptibles a todas las fracciones del EHA de *A. satureioides*, de las cuales la mayor actividad antibacteriana la tuvieron la FH y FE. En la figura 12 (Anexo: Fig. 2a) se destacan los halos de inhibición obtenidos en 3 cepas de este bacilo esporulado con las distintas fracciones de este vegetal.

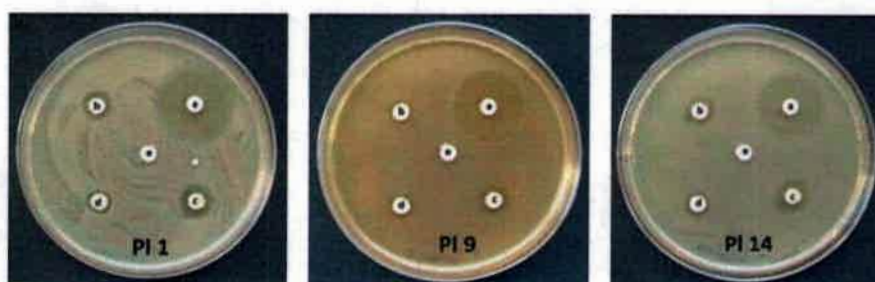


Figura 12. Halos de inhibición producidos por las fracciones del EHA de *A. satureioides* a concentración de 1 mg/mL, contra cepas de *P. larvae*
Referencias: a – FH; b – FB; c – FE; d – FA y e – DMSO (diluyente)

La actividad biológica de la FH con aplicación efectiva de 10 µg fue comparable a resultados que analizaban la sensibilidad de los antibióticos oxitetraciclina (OTC) (30

µg), gentamicina (10 µg), ampicilina (10 µg) y una alternativa natural: propóleo. Además la actividad antibiótica de la FH de *A. satureioides* resultó ser un 95% más efectiva a la de los antibióticos nitrofuratoína y sulfisoxazole evaluados en el mismo estudio, en el cuál su aplicación efectiva fue de 300 µg (Antúnez y col., 2004). La actividad antimicrobiana sobre *P. larvae* de todas las fracciones con una aplicación de 10 µL por disco, resultó ser más efectiva que los extractos obtenidos por arrastre de vapor de ajo, canela, sábila (aloe vera), ruda, romero y manzano, aplicados puros a un volumen de 500 µL sobre el mismo microorganismo (Delgado, 2012). En el mencionado estudio se observó que los extractos con mayor halo de inhibición (1,3 cm) fueron los de canela y manzano semejantes a los halos de inhibición de la FE (1,2 cm) pero menores a los de la FH (2,5 cm) de “Marcela” del presente estudio. A partir de estos resultados se destaca que fueron requeridas menores concentraciones de FH y FE de *A. satureioides* para ejercer efecto inhibitorio sobre cepas de *P. larvae*.

Los resultados muestran que *P. larvae*, bacilo Gram positivo, fue susceptible a las fracciones del EHA de *A. satureioides* en comparación con las cepas fitopatógenas de *P. syringae*, bacilo Gram negativo, que presentaron resistencia. Estos resultados se corresponden con otros estudios llevados a cabo con diferentes extractos de la misma planta contra especies de bacterias Gram positivo y Gram negativo de interés clínico. Machado (2008) demostró que las extracciones hidro – alcohólicas de *A. satureioides* presentaron capacidad de inhibición y/o inactivación intensa y selectiva frente a cepas de *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Salmonella enteritidis*, encontrándose que mientras las decocciones de esta planta fueron bacteriostáticas sobre bacterias Gram positivo, frente a bacterias Gram negativo fueron ineficaces. Joray y col., (2010) analizaron el extracto en etanol de *A. satureioides* contra diferentes cepas de importancia clínica (*E. coli*, *Proteus mirabilis*, *P. aeruginosa*, *Salmonella enterica*, *E. faecalis* y *S. aureus*), demostrando que las especies Gram positivo fueron inhibidas a menores concentraciones de extracto en comparación a las Gram negativo que presentaron mayores valores de CIM y CBM. Casero (2012) describe la actividad antibacteriana del macerado en hexano, diclorometano y metanol al 50 % de las ramas y flores de *A. satureioides* contra cepas tanto Gram positivo (*E. faecalis*, *Streptococcus pyogenes* y tres especies de *Staphylococcus* spp.) como Gram negativo (*P. aeruginosa* y *E. coli*) resultando éstas resistentes al extracto al no producir halos de inhibición o menores diámetros de halos comparadas con las primeras. Aunque muchos compuestos de plantas ejercen fuerte actividad contra bacterias Gram positivo, las Gram negativo son más resistentes a

estos lo que se atribuye probablemente a la estructura compleja y naturaleza hidrófila de su pared celular (Šmejkal y col., 2008). Por otro lado, las resistencias no parecieran tan difundidas en bacterias Gram positivo ya que no son capaces de incorporar plásmidos; en el caso de los Gram negativo, estos elementos extracromosomales permiten que la resistencia se disemine entre ellos y se transfiera con facilidad (Errecalde, 2004).

3.2. Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) por la técnica de microdilución en caldo

Una vez determinadas las fracciones más activas y contra que microorganismo ejercían algún efecto, se evidenció que la FH y FE fueron las que presentaban mayores halos de inhibición contra cepas de *P. larvae*, por lo que a estas dos fracciones se les determinó la CIM y la CBM. Los resultados del ensayo de la actividad antibacteriana por la técnica de microdilución en caldo de la FH y FE del EHA de *A. satureioides* y sus respectivas CIM y CBM se resumen en la Tabla 6. Se utilizó como control positivo el antibiótico OTC al cual se le determinó también CIM y CBM.

Tabla 6. CIM y CBM de FH y FE del EHA de *A. satureioides* y OTC contra cepas de *P. larvae*

Fracción	FH		FE		OTC (Control)	
	CIM (mg/mL)	CBM (mg/mL)	CIM (mg/mL)	CBM (mg/mL)	CIM (mg/mL)	CBM (mg/mL)
PI 1	0,015	NP	0,015	NP	0,25	0,5
PI 2	0,015	0,031	0,015	NP	0,125	0,125
PI 4	0,031	0,062	0,015	NP	0,125	0,125
PI 6	0,031	0,125	0,031	0,062	NP	NP
PI 7	0,031	0,062	0,015	0,062	0,25	0,25
PI 8	0,015	0,062	0,015	0,062	NP	NP
PI 9	0,015	0,125	0,015	NP	0,25	0,25
PI 10	0,015	NP	0,015	0,062	0,25	0,25
PI 11	0,015	0,125	0,015	0,125	0,125	0,125
PI 12	0,015	0,125	0,015	0,125	0,125	0,125
PI 13	0,015	NP	0,015	0,25	0,125	0,125
PI 14	0,015	NP	0,015	NP	0,062	0,062
PI 17	0,015	NP	0,015	NP	0,062	0,062

NP – No presentó

La desviación estándar de los datos de CIM y CBM para la FH fueron de $\pm 0,007$ mg/mL y $0,04$ mg/mL respectivamente y los de la CIM y CBM para la FE fueron $\pm 0,004$ mg/mL y $\pm 0,07$ mg/mL respectivamente. Como se puede evidenciar en la Tabla 6 (Anexo: Tablas 1a y 2a), los valores de CIM para ambas fracciones oscilaron entre $0,015$ a $0,031$ mg/mL (Figura 13 y Anexo: Fig. 3a) y, de las cepas ensayadas, el 76,9% (10 cepas) fueron sensibles a la FH con un valor de CIM de $0,015$ mg/mL y el porcentaje restante (3 cepas) fue sensible a una CIM de $0,031$ mg/mL.

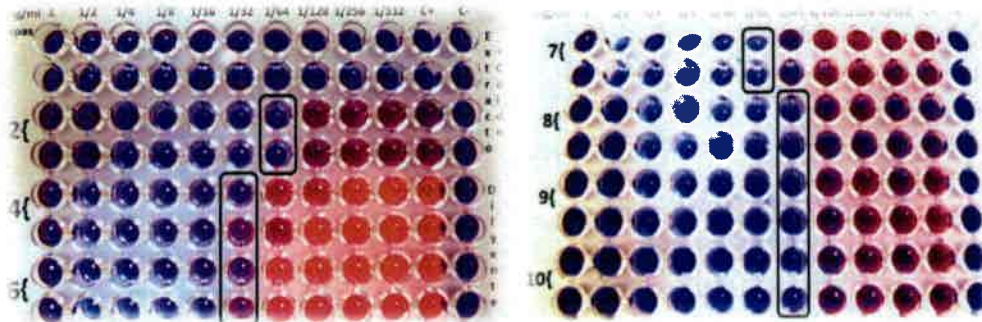


Figura 13. Actividad antibacteriana FH de *A. satureioides* frente a cepas de *P. larvae* 2, 4, 6, 7, 8, 9 y 10

En estudios previos de la actividad antimicrobiana de la FH de *A. satureioides* contra cepas de *P. larvae* se describieron CIM comparables, reportándose valores de inhibición entre $0,016$ y $0,125$ mg/mL (González, 2011). Cabe destacar que los datos del presente estudio tuvieron mayor uniformidad y la CIM más alta reportada es 4 veces menor a la informada por González (2011). Estudios similares que evaluaron la actividad de macerados en hexano de ramas y flores de *A. satureioides* contra especies Gram positivo (*S. aureus*) mostraron valores de CIM entre 10 y 20 veces mayores en comparación con la FH reportada en este estudio (Casero, 2012).

Los extractos obtenidos a partir de *A. satureioides* demostraron tener efectiva actividad antimicrobiana lo que resulta comparable a otros productos naturales obtenidos a partir de otros vegetales. Gende y col., (2008a) evaluaron el AE de canela contra cepas de *P. larvae*, como el extracto más activo analizado, obteniendo valores de CIM entre $0,025$ y $0,050$ mg/mL. Los valores de CIM reportados por Boligon y col., (2013), quienes analizaron el extracto crudo y las fracciones de *Scutia buxifolia* (quebracho o coronilla) contra cepas de *Paenibacillus* spp., entre ellas *P. larvae*,

fueron para el extracto en diclorometano de 1,56 mg/mL, es decir 50 veces mayores a los presentados por *A. satureioides* en el presente estudio.

En el caso de la FE, el 92,3% de las cepas (12) fueron sensibles con un valor de CIM de 0,015 mg/mL y el porcentaje restante fue sensible a una CIM de 0,031 mg/mL, por lo cual se evidencia, en una primera apreciación, que la FE presentó mayor porcentaje de inhibición que la FH. En la figura 14 (Anexo: Fig. 4a) se observan los valores de CIM obtenidos con la FE para las cepas 2, 4, 6, 7, 8, 9 y 10. Los valores de CIM de la FE fueron menores a los reportados por González (2011) cuyos valores oscilaron en un intervalo de 0,5 a 1 mg/mL, lo que significa aproximadamente 32 veces mayor en comparación con la FE reportada en este estudio. No se han reportado estudios en los que se evalúe la FE contra otras especies de bacterias Gram positivo.

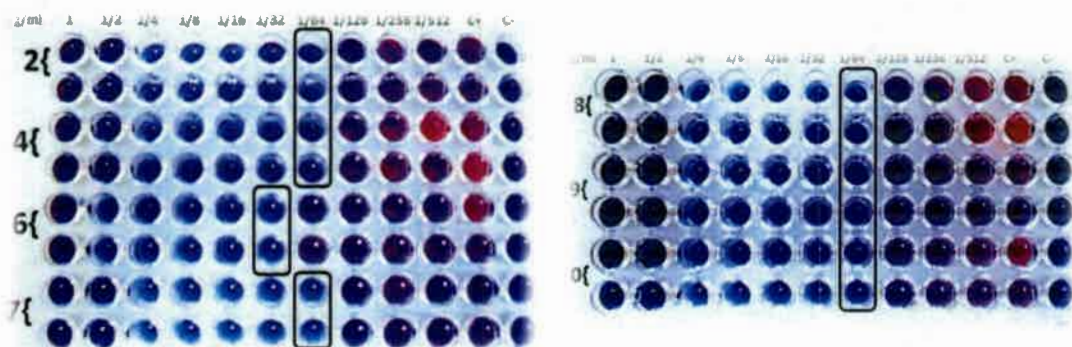


Figura 14. Actividad antibacteriana de la FE de *A. satureioides* frente a cepas de *P. larvae* 2, 4, 6, 7, 8, 9 y 10.

Se ha demostrado la efectividad de diferentes antibióticos en el tratamiento de la AFB, la OTC ha sido usada para su control pero se han generado cepas resistentes a este antibiótico en Argentina, Estados Unidos y Canadá (Evans, 2003; Alippi y col., 2007). Respecto al control empleado (OTC), se observó que sus valores de CIM estuvieron comprendidos entre 0,062 mg/mL y 0,25 mg/mL, destacándose los menores valores de CIM de FH y FE (Tabla 6). Estos resultados indican que las dos fracciones derivadas del EHA de *A. satureioides* serían una herramienta promisoriosa como reemplazo a las alternativas paliativas en el tratamiento de la Loque Americana, como el uso de la OTC, disminuyendo los residuos de antibióticos expulsados al medio ambiente y evitando la aparición de cepas resistentes a estos.



3.3. Determinación de la Concentración Bactericida Mínima (CBM)

Los resultados de la CBM de la FH y FE del EHA de *A. satureioides* se muestran en la Tabla 6 (Anexo: Tablas 3a, 4a). La prueba se basa en la determinación del efecto "cida" de la sustancia de interés (FH y FE), el cuál se pone de manifiesto por la ausencia de crecimiento al inocular el cultivo correspondiente a la CIM de la microtécnica y de las cuatro diluciones anteriores a esta en agar MYPGP.

Los valores de CBM de FH frente al 61,5% de las cepas de *P. larvae* estudiadas estuvieron comprendidos entre 0,031 y 0,125 mg/mL, sin embargo, frente al porcentaje restante FH no presentó CBM. La FE presentó CBM frente el 53,8% de las cepas expuestas con valores entre 0,062 y 0,25 mg/mL y el porcentaje restante no presentó CBM (Tabla 6). Los datos presentados demuestran que la FH tiene mayor actividad bactericida contra las cepas analizadas que la FE. Fue evidente la disminución del crecimiento microbiano a mayores concentraciones de fracción en aquellos casos que no se evidenció CBM (Anexo: Fig. 5a, 6a, 7a, 8a).

Los valores de CBM de la FH y FE en este estudio son menores o iguales a 0,125 mg/mL y menores en varios casos a los reportados por Gende y col., (2008b) cuyos valores de CBM estuvieron entre 0,125 y 0,25 mg/mL contra cepas de *P. larvae* expuestas al AE de canela. Al comparar las CBM reportadas por Joray y col., (2010) quienes analizaron el efecto antimicrobiano del extracto etanólico completo de *A. satureioides* sobre las bacterias Gram positivo *E. faecalis* y *S. aureus*, los resultados mostraron similitudes en cuanto a las concentraciones efectivas obtenidas con la FH y FE de este estudio.

En los datos obtenidos para el control de inhibición (OTC), se evidenció que los valores de CIM estuvieron entre 0,062 mg/mL y 0,25 mg/mL ($\pm 0,07$ mg/mL) y los de CBM entre 0,062 mg/mL y 0,5 mg/mL ($\pm 0,12$ mg/mL). El 84,6% de las cepas fueron susceptibles en presencia del antibiótico; sin embargo estos resultados están por encima de los valores de CIM (0,015 mg/mL y 0,031 mg/mL) y CBM (0,031 y 0,25 mg/mL) de la FH y FE aquí analizadas y las desviaciones estándar de la OTC fueron más altas a las de dichas fracciones ($\pm 0,004$ mg/mL y $\pm 0,07$ mg/mL, respectivamente) indicando mayor dispersión de los resultados respecto a este estudio. Reynaldi y col., (2010) al analizar la sensibilidad *in vitro* de 6 cepas de *P. larvae* frente a cuatro antibióticos (oxitetraciclina, tilosina, tilmocosina y lincomisina), obtuvieron valores de CIM y CBM comprobables a los del presente estudio, sin embargo,

las desviaciones estándar para cada antibiótico variaron considerablemente respecto a las obtenidas en este trabajo, evidenciándose mayor disparidad entre sus resultados.

Este es el primer estudio en el que se reportan las CBM de las fracciones en hexano (FH) y en éter etílico (FE) del EHA de *A. satureioides* contra diferentes cepas de *P. larvae*. Los datos hasta aquí presentados demuestran que *A. satureioides* es un vegetal con efectiva actividad antimicrobiana contra la forma vegetativa del patógeno *P. larvae*. El aislamiento de las moléculas activas que forman parte de estas fracciones, permitiría el conocimiento de la naturaleza química de las mismas y, a futuro, la formulación de nuevas alternativas para el tratamiento de esta bacteria en las colmenas.

4. Fraccionamiento bioguiado de la FH y FE

El fraccionamiento bioguiado es una de las aplicaciones más frecuentes para la evaluación de extractos naturales como herramienta para evaluar mezclas complejas de compuestos desconocidos en estos (Weller, 2012). Para el caso en estudio, este ensayo se realizó con la ayuda de técnicas cromatográficas, en sílica gel se sembraron las fracciones o compuestos que presentaron actividad antimicrobiana contra *P. larvae* (FH y FE) y fueron desarrolladas en la fase móvil apropiada para cada muestra.

4.1. Cromatografía en Capa Delgada (CCD) para la FH y FE

Una vez que se determinó que la FH y FE del EHA de *A. satureioides* presentaban actividad antibacteriana contra *P. larvae*, se procedió a realizar un ensayo bioguiado para la elucidación de los componentes o grupo de componentes a los cuales atribuir dicha actividad. Para esto se obtuvo un perfil de bandas de cada fracción por CCD y se separaron las fracciones por CCF. En primer lugar se realizó un screening para determinar el sistema de solventes de baja polaridad que mejor separaban las bandas de cada fracción y que lograban un punto medio entre las bandas cercano a 0,35 o un ΔR_f de 0,35 (Furniss y col., 1989). El sistema que contenía las proporciones 8,5:1,5 de hexano:acetona fue el que cumplió con esta condición para ambas fracciones. En la Tabla 7 se muestran los ΔR_f para la FH y la FB en cada sistema de solventes.

Tabla 7. Resultados de los ΔR_f para cada una de las fracciones en distintos sistemas de solventes

Sistema de solventes (Hexano:Acetona)	Fracción hexano (FH)	Fracción éter etílico (FE)
8,5:1,5	0,31	0,33
8:2	0,41	0,45
7,5:2,5	0,47	0,47
7:3	0,60	0,62
6:4	0,74	0,79

Cuando las cromatografías corridas con hexano/acetona (8,5:1,5) como fase móvil fueron reveladas bajo luz UV a 254 nm, se observaron bandas bien definidas cuyos Rf se muestran en la figura 15 y se resumen la Tabla 8.

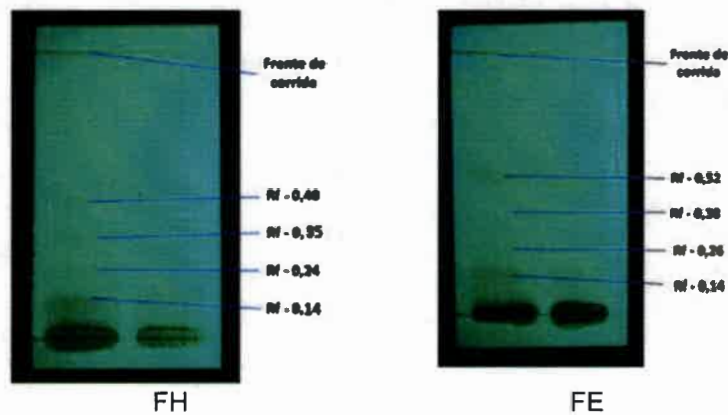


Figura 15. Bandas observadas en CCD de FH y FE con sus respectivos Rf

Tabla 8. Rf para cada una de las fracciones obtenidas por CCD

Fracción hexano	Fracción éter etílico
0,14	0,14
0,24	0,26
0,35	0,38
0,48	0,52

Teniendo en cuenta el criterio extraído de Furniss y col., (1989) para una mejor separación de las bandas en la CCF, se obtuvieron 4 bandas bien definidas y separadas de cada una de las fracciones, que comparadas con la FH analizada por González (2011), obtuvieron 7 bandas bajo el mismo sistema de solventes pero a diferentes proporciones, diferencia que podría estar dada por el origen del vegetal. En estudios en los que se evaluaron las variaciones en la composición del AE de las

partes aéreas de *A. satureioides* respecto a la temporada de recolección del material vegetal, se determinó que los rendimientos de extracción y la composición química varían dependiendo de la época en que esta se lleva a cabo y se evidenció una variación significativa en la actividad antibacteriana cuando se determinó la CIM (Cezarotto y col., 2011) y se evidencia una variación en la composición de extractos colectados durante un mismo año correspondiéndose en diferencias con las actividades antioxidantes y antimicrobianas (Cezarotto, 2009).

4.2. Determinación de la actividad antimicrobiana de bandas obtenidas de la FH y FE por Bioautografía

Obtenidas las CCD de la FH y FE, se procedió a determinar la actividad antibacteriana de sus bandas contra las cepas más susceptibles de *P. larvae*. Para ello se utilizó la técnica de bioautografía, la cual no resultó ser efectiva para la visualización de la actividad inhibitoria de las fracciones (Figura 16 a y b).

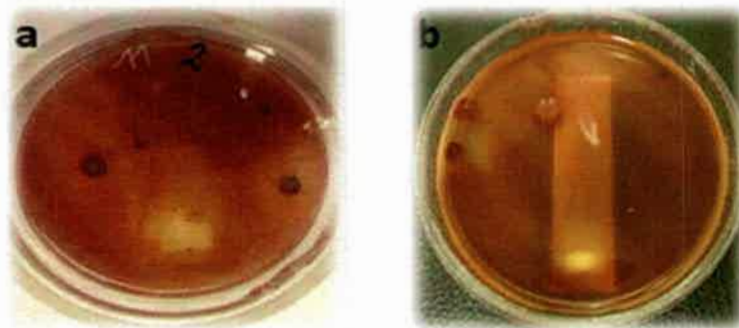


Figura 16. Bioautografías para las bandas de a. FH y b. FE

Se ha discutido que esta técnica presenta varias ventajas como la rapidez para ejecutarla y la versatilidad de adaptación a diferentes condiciones de acuerdo a las necesidades del análisis; pero también se han analizado sus dificultades como: la deficiente interpretación cuantitativa de los resultados obtenidos y la influencia de varios factores en la técnica, algunos de estos, el microorganismo a ensayar, composición del medio, pH y solubilidad de la muestra en el medio (Choma y Grzelak, 2011). Uno de los parámetros adicionales a tener en cuenta es la cantidad de muestra a sembrar en la CCD previa al análisis, ya que las bandas con poca cantidad no

presentan inhibición generando falsos negativos. Por el contrario con una sobrecarga de muestra, esta puede no ser separada quedando en la línea de siembra y mostrando inhibición únicamente en esta área tal como se ve en la figura 16 a y b. Además, la constante manipulación de la placa genera contaminación indeseada. Debido a que no se obtuvieron los resultados deseados con esta técnica, se procedió a determinar las actividades antibacterianas de las bandas de manera directa para lo cual se obtuvieron las bandas de cada fracción por separado mediante Cromatografía en Columna (CC) tipo "Flash Chromatography".

4.3. Cromatografía en Columna Flash (CCF) para la FH y la FE

Luego de establecer el sistema de solventes óptimo, de evidenciar que al realizar una CCD de cada una de las fracciones por separado se observaban bandas definidas y separadas bajo la luz UV y luego de considerar a esta técnica como la más adecuada para la separación de las bandas correspondientes, se procedió a obtener por CCF una cantidad considerable de cada una de estas para la siguiente determinación de su actividad antimicrobiana y establecer cual banda o bandas eran las más activas contra cepas de *P. larvae*.

Al realizar la CCF de la FH se obtuvo el perfil de separación de bandas que se observa en la figura 17 con sus respectivos Rf. Se obtuvieron 5 bandas, de las cuales 4 de ellas presentaron Rfs entre 0,14 y 0,48 equivalentes a los obtenidos en los ensayos de CCD. Se observó una banda adicional que presentó un Rf = 0,94 la cual no se visualizó cuando se realizó la CCD.



Figura 17. Perfil de las bandas obtenidas luego de la CC de la FH con sus respectivos Rf

En la Tabla 9 se muestran las cantidades obtenidas de cada banda a partir de 0,4922 g de FH. La banda de mayor rendimiento fue la de $R_f = 0,94$, mientras que la de menor rendimiento fue la de $R_f = 0,14$; para el resto de las bandas se obtuvieron rendimientos de 7,6 a 8,7%.

Tabla 9. Cantidades de cada una de las bandas obtenidas de la FH por CCF

Banda – R_f	Cantidad recuperada, mg	% de rendimiento
1 – 0,94	81,5	16,5
2 – 0,48	42,8	8,7
3 – 0,35	39,1	8,0
4 – 0,24	37,7	7,6
5 – 0,14	4,6	0,93

En la figura 18 se presenta los resultados de las bandas obtenidas por CCF para la FE de la cual se observaron tres bandas independientes (R_f s 0,52, 0,26 y 0,14) y dos mezclas. En las mezclas se visualizaron dos bandas por calle que tenían en común la banda con $R_f = 0,38$, la cual no se logró separar.



Figura 18. Perfil de las bandas obtenidas luego de la CC de la FE con sus respectivos R_f

En la Tabla 10 se observa que la banda con $R_f = 0,38$ no logró separarse posiblemente debido a que la cantidad de esta fue muy baja en la muestra, razón por la que fue eluida con las bandas 1 y 2 constituyendo las mezclas denominadas como M1 y M2.

Tabla 10. Cantidades de cada una de las bandas obtenidas de la FE por CCF

Banda – Rf	Cantidad recuperada, mg	% de rendimiento
1 – 0,52	42,3	16,8
M1 – 0,52 y 0,38	15,5	6,1
M2 – 0,38 y 0,26	4,3	1,7
2 – 0,26	27,2	10,8
3 – 0,14	22,4	8,9

La elevada actividad antibacteriana ejercida por extractos hexánicos y diclorometánicos de partes aéreas de *A. satureioides* sobre cepas bacterianas Gram positivo y Gram negativo, aisladas de patologías humanas, fundamentó el desarrollo de diversas técnicas cromatográficas y estudios espectroscópicos con el objetivo de aislar y caracterizar metabolitos potencialmente bioactivos (Hueso – Falcón y col., 2011). Es por ello que entre las metodologías para el aislamiento preliminar de metabolitos secundarios de extractos de plantas y sus fracciones se encuentra la CC entre ellas CCF.

En la elución de una banda en CC, como en otras técnicas cromatográficas, se corre el riesgo de dispersar el compuesto o fracción que se desea separar dentro de otras bandas pudiéndose evadir su detección y separación eluyendo junto con otras si la concentración de esta es muy baja en la muestra, por esto se recomienda colectar el eluido en un gran número de fracciones muy pequeñas ya que significa que en cada fracción hay más probabilidad de encontrarse el compuesto o fracción de interés aunque se requiera más trabajo para analizar cada fracción (Richard y Cannell, 1998), si bien se tuvo en cuenta lo anterior tomando 100 alícuotas de 3 mL, otro factor relevante es la distancia media entre cada banda medidas por sus Rf, ya que bandas con Rf muy próximos tienden a eluir juntas en la CC.

4.4. Ensayo de la actividad antibacteriana para las fracciones de *A. satureioides* obtenidas en la CCF

Una vez obtenidas las bandas y/o mezclas de cada una de las fracciones por CCF, se procedió a evaluar la actividad antibacteriana de estas realizando un screening inicial para determinar cuáles cepas eran más sensibles a cada una de ellas mediante la técnica de difusión en disco.

4.4.1. Bandas de la fracción hexano (FH)

4.4.1.1. Técnica de difusión en disco

Los resultados del ensayo de la actividad antibacteriana por la técnica de difusión en disco de las cinco bandas obtenidas por CCF de la FH de *A. satureioides* a concentración de 1mg/mL se resumen en la Tabla 11, estos representan el promedio del diámetro del halo de inhibición medido en cm. Se observa que las bandas 2, 3, 4 y 5 fueron capaces de inhibir a todas las cepas de *P. larvae* ensayadas, mientras que la banda 1 ($R_f = 0,94$) no presentó actividad antibacteriana.

Se calcularon los promedios de halos de inhibición de las cinco bandas para cada cepa y para cada banda, estos se determinaron para estimar la banda con mayor actividad y las cepas más susceptibles a las 5 bandas. Se evidenció que las bandas B2 a B5 produjeron inhibición consistente contra todas las cepas analizadas produciendo halos de inhibición entre 0,9 cm a 1,4 cm y, de acuerdo a los promedios de halos de inhibición de las bandas, la banda 2 ($R_f = 0,48$) y la banda 3 ($R_f = 0,35$) fueron las que demostraron mayor actividad inhibitoria. En la última columna de la Tabla 11 se observan las cepas más sensibles, resaltadas en negrita, siendo las cepas PI 11, 12, 13 y 17, seguidas de las cepas PI 1, 7, 8, 9 y 14 con halos de inhibición de tamaño intermedio y las cepas PI 2, 4, 6 y 10 con halos de menor tamaño. En la figura 19 (Anexo: Fig. 9a) se observan los halos de inhibición producidos por las 5 bandas sobre las cepas PI 11 y 12 de *P. larvae*.

Tabla 11. Diámetro de los halos de inhibición (en cm) producidos por las bandas de la FH de *A. satureioides* contra cepas de *P. larvae*

Cepa	B1	B2	B3	B4	B5	Promedio
PI 1	NI	1,3	1,0	0,9	-	1,06 ± 0,2
PI 2	NI	0,9	1,0	1,0	1,0	0,97 ± 0,1
PI 4	NI	1,1	1,0	0,9	0,8	0,95 ± 0,1
PI 6	NI	1,1	1,0	0,9	0,8	0,95 ± 0,1
PI 7	NI	1,1	1,2	0,9	0,8	1,00 ± 0,2
PI 8	NI	1,0	1,2	1,1	1,1	1,10 ± 0,1
PI 9	NI	1,1	1,0	1,0	0,9	1,00 ± 0,1
PI 10	NI	1,2	1,0	0,9	0,8	0,97 ± 0,2
PI 11	NI	1,0	1,4	1,0	1,2	1,15 ± 0,2
PI 12	NI	1,5	1,3	1,1	1,5	1,35 ± 0,2
PI 13	NI	1,2	1,2	1,0	1,1	1,12 ± 0,1
PI 14	NI	1,1	1,1	1,0	1,2	1,10 ± 0,2
PI 17	NI	1,2	1,2	0,9	1,3	1,15 ± 0,2
Promedio	NI	1,4 ± 0,2	1,2 ± 0,1	1,0 ± 0,1	0,9 ± 0,2	

Ref: (NI): No inhibe



Figura 19. Halos de inhibición producidos por las bandas de la FH de *A. satureioides* contra dos de las cepas de *P. larvae* más susceptibles

Referencias: b1 – Rf: 0,94; b2 – Rf: 0,48; b3 – Rf: 0,35; b4 – Rf: 0,24; b5 – Rf: 0,14

4.4.1.2. Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) por la técnica de microdilución en caldo

Una vez determinadas las bandas que presentaban actividad contra cepas de *P. larvae*, se seleccionaron las cepas más susceptibles para cada banda (PI 11, 12, 13 y 17) y se determinó su CIM. Los resultados del ensayo de la actividad antibacteriana por la técnica de microdilución en caldo de las bandas separadas por CC de la FH de *A. satureioides* y su respectiva CIM se resumen en la Tabla 12. Estos son el promedio de un ensayo por duplicado para cada una de las 4 cepas de *P. larvae* estudiadas (Figura 20 y Anexo: Fig. 10a y 11a).

Tabla 12. Concentración Inhibitoria Mínima (mg/mL) de las bandas de la FH del EHA de *A. satureioides* contra cepas de *P. larvae*

Banda	Cepa			
	PI 11	PI 12	PI 13	PI 17
2 Rf – 0,48	0,25	0,125	0,062	0,062
3 Rf – 0,35	0,25	0,25	0,125	0,125
4 Rf – 0,24	0,25	0,25	0,25	0,125
5 Rf – 0,14	0,062	0,125	0,25	0,125

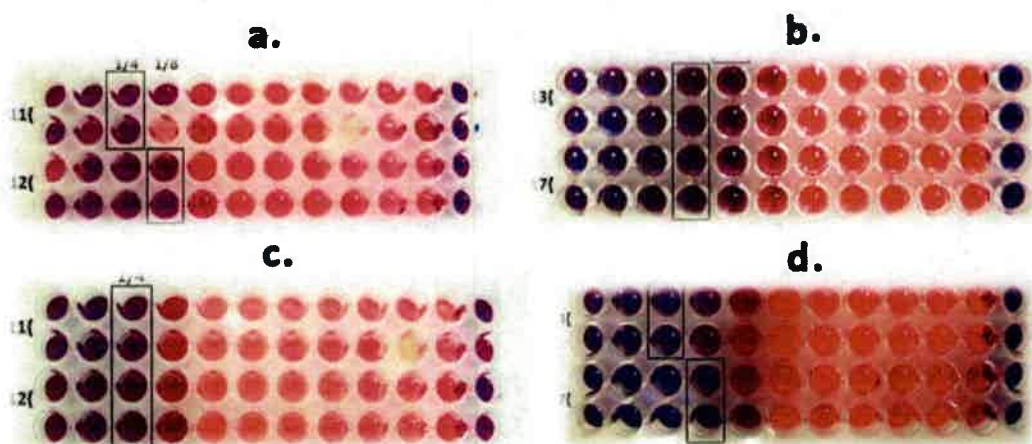


Figura 20. Actividad antibacteriana de las bandas de la FH de *A. saturoioides*:

a. Banda 2 Rf = 0,48 frente a cepas PI 11 y 12 de *P. larvae*; b. Banda 3 Rf = 0,35 frente a cepas PI 13 y 17 de *P. larvae*; c. Banda 4 Rf = 0,24 frente a cepas PI 11 y 12 de *P. larvae* y d. Banda 5 Rf = 0,14 frente a cepas PI 13 y 17 de *P. larvae*

Los valores de CIM de las bandas analizadas se encontraron entre 0,062 y 0,25 mg/mL, siendo mayores a los obtenidos por la FH que estuvieron entre 0,015 y 0,031 mg/mL (Tabla 6), indicando posibles asociaciones entre compuestos en la fracción completa que potenciarían su actividad inhibitoria en comparación a las bandas separadas. Las cepas PI 11, PI 13 y PI 17 que se consideraron como las más resistentes entre las cuatro evaluadas, por la media de sus halos de inhibición, fueron las más susceptibles al determinarse la CIM (0,062 mg/mL) en contacto con las bandas 5 (Rf = 0,14) y 2 (Rf = 0,48) respectivamente. La cepa PI 12 fue la que presentó mayores valores de CIM (0,125 a 0,25 mg/mL) al estar en presencia de todas las bandas, siendo la más resistente.

4.4.1.3. Determinación de la Concentración Bactericida Mínima (CBM)

En todos los casos analizados anteriormente se tomaron 100 μ L de la mezcla que contenía la CIM y dos diluciones por encima a esta y se sembraron por duplicado en placas con agar MYPGP, se dejaron incubar en las condiciones y tiempo adecuados para *P. larvae*. Aunque fue evidente la disminución del crecimiento microbiano a mayores concentraciones del compuesto (Anexo: Fig. 12a, 13a, 14a, 15a), no se obtuvieron valores de CBM.

4.4.2. Bandas de la fracción éter etílico (FE)

4.4.2.1. Técnica de difusión en disco

Los resultados del ensayo de la actividad antibacteriana por la técnica de difusión en disco de las tres bandas y las dos mezclas obtenidas por CCF de la FE de *A. satureioides* a concentración de 1 mg/mL (promedio del diámetro del halo de inhibición medido en cm) se resumen en la Tabla 13. Los promedios de la última columna se determinaron para estimar las cepas más susceptibles a las bandas y/o mezclas (Resaltados en negrita). Debido a que la banda con $R_f = 0,38$ fue eluída junto con las bandas de $R_f = 0,52$ y $R_f = 0,26$ se decidió analizar las mezclas que la contenían ($M1 - R_f = 0,52$ y $0,38$ y $M2 - R_f = 0,38$ y $0,26$) para determinar qué efectos antimicrobianos tenían dichas mezclas.

Tabla 13. Diámetro de los halos de inhibición (en cm) producidos por las bandas de la FE de *A. satureioides* contra cepas de *P. larvae*

Cepa	B1	M1	B2	M2	B3	Promedio
1	1,2	1,7	2,0	1,0	2,0	1,6 ± 0,4
2	0,8	1,0	1,3	0,7	1,5	1,0 ± 0,3
4	1,1	1,5	1,4	0,9	2,0	1,3 ± 0,4
6	1,0	1,4	1,8	1,0	2,0	1,4 ± 0,4
7	1,0	1,5	1,6	0,9	2,0	1,4 ± 0,4
8	1,2	1,3	1,6	1,0	1,7	1,3 ± 0,3
9	1,0	1,8	1,5	1,0	2,0	1,4 ± 0,4
10	1,0	1,3	1,3	0,8	1,6	1,2 ± 0,2
11	1,0	1,3	1,5	1,0	1,6	1,3 ± 0,3
12	0,9	1,4	1,7	1,0	1,7	1,3 ± 0,4
13	1,1	1,8	1,5	1,0	2,5	1,6 ± 0,6
14	1,0	1,6	1,9	1,5	2,0	1,6 ± 0,4
17	1,0	1,4	1,6	0,9	1,4	1,4 ± 0,3
Promedio	1,0 ± 0,1	1,46 ± 0,2	1,59 ± 0,2	0,9 ± 0,2	1,4 ± 0,3	

Se evidenció que la mezcla M1 y las bandas 2 y 3 produjeron inhibición consistente contra todas las cepas analizadas ya que produjeron halos de inhibición mayores a 1 cm, en contraposición la banda 1 y la mezcla 2 no tuvieron este mismo efecto presentando halos de inhibición $\leq 1,00$ cm. Las cepas más susceptibles fueron PI 1, 13 y 14 cuyos halos de inhibición promedio fueron los de mayor diámetro, seguidas de las cepas PI 4, 6, 7, 8, 9, 11, 12 y 17 con halos de inhibición de tamaño intermedio.

M1 que se compone de una mezcla entre las bandas B1 (Rf = 0,52) y X (Rf = 0,38) presentó un diámetro promedio de halos de inhibición de 1,46 cm ($\pm 0,23$), lo que demuestra mayor inhibición en comparación con la banda aislada B1 ($1,0 \pm 0,11$ cm). En este caso la banda X, que está en la mezcla en menor proporción y que eluyó junto a B1, podría estar confiriendo un efecto potenciador, aditivo o sinérgico. Caso contrario se observó con la mezcla M2, la cual se compone de las bandas X (Rf = 0,38) y B2 (Rf= 0,26), la cual presentó menor promedio de halos de inhibición ($M2 = 0,9 \pm 0,19$ cm) que la banda B2 ($1,59 \pm 0,21$ cm) sola (Figura 21 y Anexo: Fig. 16a).

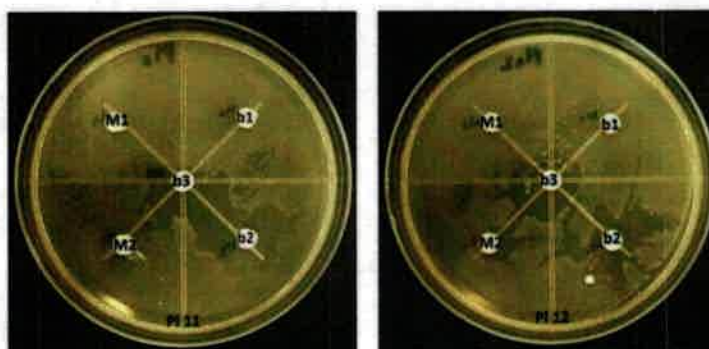


Figura 21. Halos de inhibición producidos por las fracciones de las bandas de la FE de *A. satureioides* contra dos de las cepas de *P. larvae* más susceptibles

Referencias: b1 – Rf: 0,52; M1 – Rf: 0,52 y 0,38; b2 – Rf: 0,26; M2 – Rf: 0,38 y 0,26; b3 – Rf: 0,14

Se conoce que se pueden establecer asociaciones positivas, negativas e indiferentes entre los compuestos de una mezcla. Para el caso de la M1 se podría estar dando una asociación de tipo aditiva o sinérgica en el cuál la actividad antimicrobiana se ve aumentada respecto a la banda 1 sola, mientras que en la M2 existiría una interacción del tipo antagonico debido a que existe una disminución en el efecto antimicrobiano.

Se definen así las siguientes asociaciones (Moscou y Snipe, 2013):

- Potenciadora: El proceso por el cual una droga (antimicrobiano), incrementa el efecto de otra droga (antimicrobiano), si esta no produce ningún efecto al ser administrada sola.
- Aditiva: Puede ocurrir cuando dos drogas (antimicrobianos) son administradas conjuntamente. El efecto incrementado es igual a la suma de los dos efectos producidos por cada una de las drogas (antimicrobiano) solas.

- Sinérgica: Es el resultado de dos drogas (antimicrobianos) administradas juntas generando un efecto aun mayor al que podría ser producido si cualquiera de las drogas (antimicrobiano) fuera administrada sola, teniendo un efecto mayor al aditivo.
- Antagónica: Interacción que causa una disminución del efecto de las drogas (antimicrobianos) al ser administradas juntas.

4.4.2.2. Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) por la técnica de microdilución en caldo

Una vez determinadas las bandas y mezclas que presentaban inhibición significativa (Banda 2 y 3, Mezcla 1) contra cepas de *P. larvae* y seleccionar las más susceptibles en presencia de cada banda y/o mezcla, se realizó la técnica de microdilución en caldo de las bandas de la FE y se determinó la CIM. Los resultados se resumen en la Tabla 14 (Figura 22 y Anexo: Fig. 17a y 18a), estos son el promedio de un ensayo por duplicado para cada una de las 4 cepas de *P. larvae* estudiadas.

Tabla 14. Concentración Inhibitoria Mínima (mg/mL) de las bandas y mezclas de la FE del EHA de *A. satureioides* contra cepas de *P. larvae*

Banda y/o mezcla	Cepa			
	PI 11	PI 12	PI 13	PI 17
M1 Rf – 0,52 y 0,38	-	0,25	0,031	0,031
2 Rf – 0,26	-	0,062	0,031	0,031
3 Rf – 0,14	-	0,062	0,031	0,031

- Sin CIM a concentración de 1 mg/mL

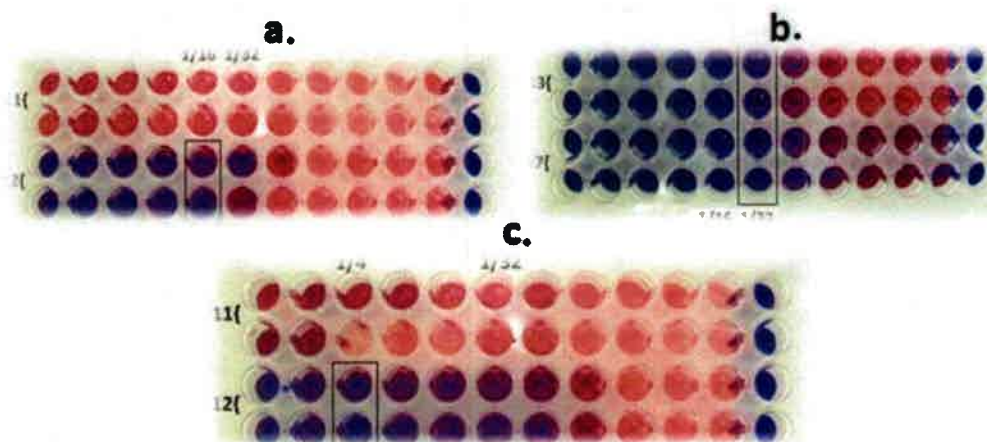


Figura 22. Actividad antibacteriana de las bandas de la FH de *A. saturoioides*:

a. Mezcla 1 Rf = 0,52 y 0,38 frente a cepas PI 11 y 12 de *P. larvae*; b. Banda 2 Rf = 0,26 frente a cepas PI 13 y 17 de *P. larvae* y c. Banda 3 Rf = 0,14 frente a cepas PI 11 y 12 de *P. larvae*

Los valores CIM de las bandas contra las cepas analizadas, se encontraron entre 0,031 y 0,25 mg/mL, siendo similares a los obtenidos por la FE que estuvieron entre 0,015 y 0,031 mg/mL, sin embargo, la CIM más alta obtenida de las bandas (0,25 mg/mL) es mayor que las reportadas por la FE (0,031 mg/mL), indicando posibles asociaciones entre compuestos en la fracción completa que potenciarían su actividad inhibitoria en comparación a las bandas separadas. La cepa PI 11 directamente no presentó CIM a concentración de banda y/o mezcla de 1 mg/mL, por lo que de las cuatro cepas analizadas fue la más resistente, seguida de PI 12, PI 17 y PI 13, estos datos se corresponden con los valores de la técnica de difusión en disco, en los que el orden de susceptibilidad, de acuerdo al promedio del diámetro de los halos de inhibición, fue: PI 13 ($1,6 \pm 0,61$) < PI 17 ($1,4 \pm 0,30$) < PI 12 ($1,3 \pm 0,38$) < PI 11 ($1,3 \pm 0,28$).

4.4.2.3. Determinación de la Concentración Bactericida Mínima (CBM)

En todos los casos analizados anteriormente se tomaron 100 μ L de la mezcla que contenía la CIM y dos diluciones por encima a esta y se sembraron por separado en placas con agar MYPGP, se dejaron incubar en las condiciones y tiempo adecuados. Si bien se observó una disminución del crecimiento bacteriano (Anexo: Fig. 19a, 20a, 21a), no se obtuvieron valores de CBM.

Como se puede evidenciar la FH presenta mayores halos de inhibición que el resto de las fracciones y bandas analizadas, tanto esta fracción como la FE del EHA de *A. satureioides* sin separar reportan menores valores de CIM (menores concentraciones activas) y presentan efecto bacteriostático y/o bactericida al evaluarse su CBM. En contraposición sus respectivas bandas separadas tienen valores de CIM mayores y no presentan CBM frente a las cepas más susceptibles de *P. larvae*. Respecto a lo anterior se podría decir que la FH y FE del EHA tienen mayor efecto bacteriostático frente a cepas de *P. larvae* que las bandas individuales y entre estas dos la FH es más eficaz para generar dicho efecto. Los datos presentados se corresponden con Joray y col., (2013) quienes evalúan las interacciones entre metabolitos de *A. satureioides* en relación a su actividad antibacteriana y en sus resultados indican la existencia de una acción concertada entre los metabolitos presentes en la planta, dando especial importancia a las interacciones sinérgicas entre los componentes de extractos derivados de plantas para el control de bacterias patógenas. Son pocos los casos en los cuales se le puede atribuir a un único compuesto o a un grupo de compuestos la actividad biológica de una planta medicinal y este fenómeno se debe al hecho de que dicha actividad se presenta por las diferentes asociaciones existentes entre compuestos químicamente diversos y a que dicho efecto combinado podría ser mayor que el de los compuestos individuales (Joray y col., 2013).

En los últimos tiempos la investigación de nuevos antibacterianos efectivos a partir de plantas ha tenido como objetivo el hallazgo de un único compuesto activo (Ulrich –Merzenich y col., 2010) abordado desde una “aproximación reduccionista” según Verpoorte y col., (2006) basadas en la metodología del fraccionamiento bioguiado. Muchos esfuerzos se han destinado para aislar e identificar moléculas que podrían ser consideradas realmente como exitosas, pero en muchos casos los metabolitos secundarios de plantas por separado tienen un efecto débil contra una amplia gama de organismo desde bacterias hasta insectos y de hecho, en la naturaleza las plantas continuamente están expuestas a infecciones bacterianas y debido a dicha adaptación se podría abordar el estudio de extractos de plantas desde un enfoque o estrategia “sinérgica” (Hemaiswarya y col., 2008).

Los datos hasta aquí presentados demostraron que las fracciones derivadas del EHA de *A. satureioides* (Marcela), planta endémica de la zona serrana del sur de Córdoba, presentaron efectos antimicrobianos contra *P. larvae*, patógeno esporulado y agente causal de Loque Americana en abejas melíferas, evidenciándose su potencial



uso como estrategia de control alternativa, natural y no contaminante de la enfermedad a partir de derivados de la flora autóctona Argentina.

Al estudiar las fracciones del EHA de *A. satureioides* desde un enfoque bioguiado, se evidencia que las fracciones completas (sin separar) ejercen similares efectos bacteriostáticos pero mayores efectos bactericidas que las respectivas bandas separadas por técnicas cromatográficas, sugiriendo el uso de las fracciones integra reduciendo los pasos de extracción y fraccionamiento, sin embargo, no se descarta el aislamiento de moléculas activas que forman parte de las fracciones de la planta, lo que permitiría el conocimiento de la naturaleza química de estas y, a futuro, la formulación de nuevas alternativas para el tratamiento de esta bacteria en las colmenas.

VI – CONCLUSIONES

- Se obtuvieron cuatro fracciones a partir del extracto hidro – alcohólico (EHA) de *Achyrocline satureioides*: fracción en hexano (FH), benceno (FB), éter etílico (FE) y acetato de etilo (FA). Estas fracciones, a concentración de 1 mg/mL, presentaron efecto inhibitorio sobre las 13 cepas de *P. larvae* aquí ensayadas y no ejercieron el mismo efecto frente a las 8 cepas de *P. syringae*.
- La FH y la FE del EHA de *A. satureioides* fueron las que presentaron mayores actividades inhibitorias contra las cepas de *P. larvae* con efectos comparables entre sí al inhibir el crecimiento bacteriano dentro de un rango de concentraciones similar.
- La FH y la FE presentaron CIM contra todas las cepas de *P. larvae* a menores concentraciones que el antibiótico de referencia, oxitetraciclina (OTC). Lo anterior indica que estas fracciones tienen potencial uso para el tratamiento de la enfermedad producida por este patógeno al inhibirlo a menores concentraciones que el antibiótico utilizado como método convencional y paliativo de tratamiento.
- La FH presentó actividad “cida” contra el 61,5% de las cepas y la FE contra el 53,8%; de acuerdo a estos valores, a las concentraciones efectivas administradas y a los porcentajes de inhibición, la FH tendría mayor efecto “cida” en comparación a la FE contra las cepas analizadas de *P. larvae*.
- *P. larvae* (bacilo Gram positivo) fue susceptible frente a diferentes fracciones de la planta *A. satureioides* y a sus bandas separadas, en comparación, las cepas fitopatógenas de *P. syringae* (bacilo Gram negativo) no fueron inhibidas incluso frente a las fracciones completas de las mismas.
- A partir de técnicas cromatográficas como la Cromatografía en Capa Delgada (CCD) y la Cromatografía en Columna Flash (CCF) se logró la separación e identificación de la actividad biológica de las bandas resultantes de cada fracción.

- La técnica de bioautografía, utilizada para realizar un estudio bioguiado de las fracciones activas del EHA de *A. satureioides*, resultó poco fiable y se recomienda tener en cuenta sus limitaciones antes de realizarla.
- Mediante CCD y CC se lograron obtener 5 bandas de la FH y 5 bandas de la FE, de esta última dos no lograron separarse y se obtuvieron en forma de mezcla. Cada banda indicaría la presencia de distintos grupos de compuestos con actividad biológica.
- Todas las bandas y/o mezclas, obtenidas a partir de las fracciones activas (FH y FE), tuvieron efecto inhibitorio considerable frente a las cepas de *P. larvae* analizadas. De acuerdo a los diámetros de los halos de inhibición y a los valores de CIM de las bandas obtenidas, dichas bandas presentaron inhibición comparable a las fracciones de las cuales fueron extraídas.
- La mezcla 1 de la FE demostró mayor inhibición a la producida por una las bandas administrada por separado, en este caso se establecería una asociación positiva (potenciadora, aditiva y/o sinérgica) entre las bandas que la componen; en la mezcla 2 de esta misma fracción, se presentaría una asociación negativa (antagónica) al haber una disminución en el efecto antimicrobiano producido al compararse con el efecto de una sola banda, que formaba parte de dicha fracción.
- Las bandas obtenidas no presentaron actividad bactericida a diferencia de las fracciones completas que sí ejercieron efecto "cida" sobre las cepas de *P. larvae*. Para evaluar la antibiosis desde un enfoque bioguiado se debe tener en cuenta que existe una acción conjunta en la actividad antimicrobiana entre los metabolitos presentes en una planta, en estas interacciones entre metabolitos son de especial importancia las asociaciones positivas para el control de bacterias patógenas como *P. larvae*.
- Los extractos completos o sin separar presentaron mayor actividad antibiótica frente al patógeno *P. larvae* y la FH completa mostró mayores halos de inhibición, menores valores de CIM y presentó CBM ante un mayor porcentaje de cepas en comparación al resto de las fracciones y bandas analizadas, ésta bien podría ser la que posee mayor efecto antibiótico.

- Las fracciones derivadas del EHA de *Achyrocline satureioides* (Marcela) tienen un uso potencial como estrategia de control alternativa, natural y no contaminante de la Loque Americana a partir de extractos de la flora autóctona Argentina.
- El estudio bioguiado del EHA de *A. satureioides* muestra que las fracciones integras (sin separar) ejercen similares efectos bacteriostáticos pero mayores efectos bactericidas que sus respectivas bandas separadas por técnicas cromatográficas, esto contribuiría en la reducción de los pasos de extracción y fraccionamiento en el proceso.

Proyecciones.

Las fracciones de *A. satureioides* y sus compuestos podrían ser considerados en la formulación de nuevos antimicrobianos como alternativa natural para el control de *P. larvae*. La separación y caracterización de moléculas activas que forman parte de las fracciones de esta planta, permitiría el conocimiento de la naturaleza química de estas y, a futuro, el estudio de la actividad antibiótica de estas moléculas desde un enfoque o estrategia sinérgica – bioguiado permitiría la formulación de nuevas estrategias para el tratamiento de este microorganismo y de la Loque Americana en las colmenas.



VII – BIBLIOGRAFÍA

- ✓ Albo, G.; Henning, C.; Ringuelet, J.; Reynaldi, F.; De Giusti, M.; Alippi, A.; (2003). Evaluation of some essential oils for the control and prevention of American Foulbrood disease in honey bees. *Apidologie*, 34, 417 – 437.
- ✓ Alippi, A.; (1990). Técnicas de laboratorio para el aislamiento e identificación de *Bacillus larvae* White, agente causal de la Loque americana. *Serie Difusion – CIC*, 2 (6), 1 – 19.
- ✓ Alippi, A.; (1992). Characterization of *Bacillus larvae* White, the causative agent of American Foulbrood of honey bees. First record of its occurrence in Argentina. *Revista Argentina de Microbiología*, 24, 67 – 72.
- ✓ Alippi, A.; (1996). Caracterización de aislamientos de *Paenibacillus larvae* mediante tipo bioquímico y resistencia a oxitetraciclina. *Revista Argentina de Microbiología*, 28, 197 – 203.
- ✓ Alippi, A.; López, A.; Reynaldi, F.; Grasso, D.; Aguilar, O.; (2007). Evidence for plasmid – mediated tetracycline resistance in *Paenibacillus larvae*, the causal agent of a honey bee larval disease. *Veterinary Microbiology*, 125, 290 – 303.
- ✓ Alonso, J.; Desmarchelier, C.; (2005). *Plantas medicinales autóctonas de la Argentina. Bases científicas para su aplicación en atención primaria de la salud*. Argentina. Ediciones Fitociencia. p. 313 – 329.
- ✓ Alström, S.; (1992). Antibacterial activity of tea and coffee wastes against some plant pathogenic *Pseudomonas syringae* strains. *Journal of phytopathology*, 136, 329 – 334.
- ✓ Antúnez, K.; D'Alessandro, B.; Piccini, C.; Zunino, P.; (2004). Efecto de diferentes sustancias antimicrobianas, sobre *Paenibacillus larvae larvae*, agente causal de la loque americana. *Journal of Invertebrate Pathology*, 86, 197 – 205.
- ✓ Antúnez, K.; Harriet, J.; Gende, L.; Maggi, M.; Eguaras, M.; Zunino, P.; (2008). Efficacy of natural propolis extract in the control of American Foulbrood. *Veterinary Microbiology*, 131, 324 – 331.
- ✓ Antúnez, K.; Piccini, C.; Castro – Sowinski, S.; Rosado, A.; Seldin, L.; Zunino, P.; (2007). Phenotypic and genotypic characterization of *Paenibacillus larvae* isolates. *Veterinary Microbiology*, 124, 178 – 183.
- ✓ Arredondo, M.; Blasina, F.; Echeverry, C.; Morquio, A.; Ferreira, M.; Abin-Carriquiry, J.; Lafon, L.; Dajas, F.; (2004). Cytoprotection by *Achyrocline satureioides* (Lam) D.C. and some of its main flavonoids against oxidative stress. *Journal of Ethnopharmacology*, 91, 13 – 20.
- ✓ Bailey, L.; Lee, D.; (1962). *Bacillus larvae*: Its cultivation *in vitro* and its growth *in vivo*. *Journal of General Microbiology*, 29, 711 – 717.
- ✓ Balestra, G.; Rossetti, A.; & Quattrucci, A.; (2008, junio). Biological control of kiwifruit and tomato bacterial pathogens. Trabajo presentado en: 16th IFOAM Organic World Congress, Modena, Italia.
- ✓ Bambrick, J.; (1964). Resistance to American foulbrood in honey bees V. Comparative pathogenesis in resistant and susceptible larvae. *Journal of Insect Pathology*, 6, 284 – 304.

- ✓ Bambrick, J.; Rothenbuhler, W.; (1961). Resistance to American foulbrood in honey bees. IV. The relationship between larvae age at inoculation and mortality in a resistant and in a susceptible line. *Journal Insect Pathology*, 3, 381 – 390.
- ✓ Bashan, Y.; (1997). Alternative strategies for controlling plant diseases caused by *Pseudomonas syringae*. *Developments in Plant Pathology: Pseudomonas Syringae, Pathovars and Related Pathogens*, 9, 575 – 583.
- ✓ Bastos, E.; Simone, M.; Jorge, D.; Soares, A.; Spivak, M.; (2008). *In vitro* study of the antimicrobial activity of Brazilian propolis against *Paenibacillus larvae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 97, 273 – 281.
- ✓ Bauer, A.; Kirby, W.; Sherris, J.; Turck, M.; (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*, 36, 493 – 496.
- ✓ Boligon, A.; Faccim de Brum, T.; Zadra, M.; Piana, M.; Filippi dos Santos, C.; Pedroso, V.; dos Santos Barboza, V.; de Almeida Vaucher, R.; Vianna, R.; Linde, M.; (2013). Antimicrobial activity of *Scutia buxifolia* against the honeybee pathogen *Paenibacillus larvae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 112, 105 – 107.
- ✓ Broussalis, A.; Ferraro, G.; Gurni, A.; Coussio, J.; (1988). Phenolic constituents of four *Achyrocline* species. *Biochemical Systematics and Ecology* 16, 401–402.
- ✓ Broussalis, A.; Ferraro, G.; Gurni, A.; Coussio, J.; (1989). Aspectos fitoquímicos de especies Argentinas del género *Achyrocline*. *Latin American Journal of Pharmacology* 8, 11 – 16.
- ✓ Cabrera, M.; Raimondo, M.; Alvarez, R.; Cúndom, M.; Gutiérrez, S.; (2003). *Actualización del conocimiento sobre los microorganismos presentes en follaje de soja del NEA*. Comunicaciones Científicas y Tecnológicas. Corrientes, Argentina: Facultad de Cs. Agrarias, Universidad Nacional del Nordeste.
- ✓ Cantore, L.; Iacobellis, N.; Senatore, F.; Capasso, F.; (2003). Preliminary results on the antibacterial activity of essential oils on some pathovars of *Pseudomonas syringae*. *Pseudomonas syringae and Related Pathogens* 495 – 499.
- ✓ Carney, J.R.; Krenisky, J.M.; Williamson, R.T.; Luo, J.; (2002). Achyrofuran, a new antihyperglycemic dibenzofuran from the South American medicinal plant *Achyrocline satureioides*. *Journal of Natural Products*, 65, 203 – 205.
- ✓ Cezarotto, V.; (2009). Influencia da sazonalidade nos constituintes químicos, atividade antimicrobiana e antioxidante das partes aéreas de *Baccharis articulata* (Lam.) Pers. e *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. Thesis. Universidad Federal de Santa Maria, Brazil.
- ✓ Cezarotto, V.; Giacomelli, S.; Flores, E.; Mack, J.; Barin, J.; da Silva, U.; Linares, C.; (2011). Seasonal variation, chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of *Achyrocline satureioides* (Lam.) D.C. *Latin American Journal of Pharmacy*, 30, 1536 – 1541.
- ✓ Casero, C.; (2012). Metabolitos secundarios de *Achyrocline satureioides*, Quimiomodulación de la actividad antibacteriana. Tesis de doctorado para optar al título de Doctor en Ciencias Biológicas, Departamento de Microbiología e Inmunología, Universidad Nacional de Río Cuarto, Río Cuarto, Argentina.
- ✓ Choma, M.; Grzelak, M.; (2011). Bioautography detection in thin layer chromatography. *Journal of Chromatography A*, 19, 2684 – 2691.

- ✓ Costa, J.; Cervera, S.; Cunill, F.; Esplugas, S.; Mans, C.; Mata, J.; (2004). *Curso de ingeniería química: Introducción a los procesos, las operaciones unitarias y fenómenos de transporte*. Capítulo 2: las operaciones unitarias; pp. 37 – 92. Barcelona, España. Reverté, S.A.
- ✓ Cowan, M.; (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12 (4), 564 – 582.
- ✓ Cracogna, N.; (2008). Las enfermedades bacterianas en cultivo de soja en Argentina. *Agro Mercado*, 147, 12 – 14.
- ✓ Cushnie, T.; Lamb, A.; (2005). Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 26, 343 – 356.
- ✓ Daza, R.; (1998). Resistencia bacteriana a antimicrobianos: su importancia en la toma de decisiones en la práctica diaria. *Información Terapéutica del Sistema Nacional de Salud*, 22 (3), 57 – 67.
- ✓ De Souza, K.; Bassani, V.; Schapoval, E.; (2007). Influence of excipients and technological process on anti-inflammatory activity of quercetin and *Achyrocline satureioides* (Lam.) D.C. extracts by oral route. *Phytomedicine*, 14, 102 – 108.
- ✓ Delgado, M.; (2012). Perspectiva de extractos vegetales para el control del loque americana (*Paenibacillus larvae*) en la larva de las abejas melíferas (*Apis mellifera*). Tesis de doctorado para optar al título de Doctor en Ciencias, Departamento de Química Agrícola, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, España.
- ✓ Dellacassa, E.; Ferreira, F.; Menéndez, P.; Moyna, P.; Rossini, C.; Soule, S.; Vaz, R.; Vásquez, A.; Alonso, E.; (1993). Diferencias varietales en los flavonoides de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. In: II Congreso de Ciencias Farmacéuticas del Cono Sur, Montevideo, Uruguay.
- ✓ Dembitsky, V.; Tolstikov, G.; Tolstikov, A.; (2003). Natural halogenated polyacetylenides. *Chemistry for Sustainable Development*, 11, 341 – 348.
- ✓ Demo, M.; Oliva, M.; López, M.; Zunino, M.; Zygadlo, J.; (2005). Antimicrobial Activity of Essential Oils Obtained from Aromatic Plants of Argentina. *Pharmaceutical Biology*, 43 (2), 129 – 134.
- ✓ Dingman, D.; Stahly, D.; (1983). Medium promoting sporulation of *Bacillus larvae* and metabolism of medium components. *Applied Environmental Microbiology*, 46 (4), 860 – 869.
- ✓ Distefano, S.; (2013, Abril 26). Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria – INTA. Recuperado el 28 de marzo de 2014 de: <http://inta.gob.ar/documentos/informe-sanitario-de-la-campana-de-soja-2012-13/>.
- ✓ Domingo, D.; López – Brea, M.; (2003). Plantas con actividad antimicrobiana. *Revista Española de Quimioterapia*, 16 (4), 385 – 393.
- ✓ Errecalde, J.; (2004). *Uso de antimicrobianos en animales de consumo, incidencia del desarrollo de resistencias en salud pública*. Capítulo 13, La resistencia a los antimicrobianos, sus mecanismos y Epidemiología; pp. 18 – 30. La Plata, Argentina, FAO – Producción y Sanidad Animal.
- ✓ Evans, J.; (2003). Diverse origins of tetracycline resistance in the honey bee bacterial pathogen *Paenibacillus larvae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 83, 46 – 50.

- ✓ Fernandes, A.; da Silva, G.; Barbosa, L.; Alves, F.; Andrade, B.; Albano, M.; Di Stasi, L.; (2014). Medicinal Plants from the Brazilian Savanna with Antibacterial Properties. *European Journal of Medicinal Plants*, 4(1), 1 – 13.
- ✓ Fernández, L.; (2005). *Fitoquímica del Agave salmiana*. Memoria para optar al título de Licenciada en Químico-farmacobiología, Escuela de Ciencias, Departamento de Química y Biología, Universidad de las Américas Puebla, Puebla, México.
- ✓ Ferraro, G.; Norbedo, C.; Coussio, J.; (1981). Flavonoids from Argentine medicinal plants. Part 12. Polyphenols from *Achyrocline satureioides*. *Phytochemistry*, 20, 2053 – 2054.
- ✓ Finelgold, S.; Barón, E.; (1992). In Bailey Scott: *Diagnóstico microbiológico, Aislamiento e identificación de microorganismos patógenos*. Capítulo 24: *Micrococcaceae*: estafilococos y micrococcos; pp. 340 – 437. Buenos Aires, Argentina. Editorial Médica Panamericana.
- ✓ Flesar J.; Havlik, J.; Kloucek, P.; Rada, V.; Titera, D.; Vendar, M.; Stropnický, M.; Kokoska, L.; (2010). *In vitro* growth-inhibitory effect of plant-derived extracts and compounds against *Paenibacillus larvae* and their acute oral toxicity to adult honey bees. *Veterinary Microbiology*, 145, 129 – 133.
- ✓ Formento, N.; Scandiani, M.; Ivancovich, A.; Sillón, M.; (2007, Marzo 19). Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria – INTA. Recuperado el 28 de marzo de 2014 de: <http://www.engormix.com/MA-agricultura/soja/articulos/enfermedades-fin-ciclo-roya-t1400/415-p0.htm>.
- ✓ Furniss, S.; Hannaford, J.; Smith, P.; Tatchell, A.; (1989). *VOGEL's textbook of practical organic chemistry*. Chapter 2: Técnicas experimentales – Procesos de aislamiento y purificación; pp. 131 – 234. New York, United States. Longman Scientific and Technical.
- ✓ Garrity, G.; Bell, J.; Lilburn, T.; (2009). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Second edition), Vol. 2, Genus I, Pseudomonas, pp. 323 – 378.
- ✓ De Vos, P.; Ludwig, W.; Schleifer, K.; Whitman, W.; (2009). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Second edition), Vol. 3, Genus I, Paenibacillus, pp. 269 – 295.
- ✓ Gattuso, S.; Gattuso, M.; (1998). Caracteres anatómicos y exomorfológicos distintivos de *Achyrocline satureioides* (Larn.) DC (Asteraceae - Inuleae). *Acta Farmacológica Bonaerense* 17 (4), 255 – 261.
- ✓ Gende, L.; Principal, J.; Maggi, M.; Palacios, S.; Fritz, R.; Eguaras, M.; (2008a). Extracto de *Melia azedarach* y aceites esenciales de *Cinnamomun zeylanicum*, *Mentha piperita* y *Lavandula officinalis* como control de *Paenibacillus larvae*. *Zootecnia Tropical*, 26 (2), 151 – 156.
- ✓ Gende, L.; Floris, I.; Fritz, R.; Eguaras, M.; (2008b) Antimicrobial activity of cinnamon (*Cinnamomun zeylanicum*) essential oils and its main components against *Paenibacillus larvae* from Argentine. *Bulletin of Insectology*, 61, 1 – 4.
- ✓ Gende, L.; Bailac, P.; Maggi, M.; Ponzi, M.; Fritz, R.; Eguaras, M.; (2009). Antimicrobial activity of *Pimpinella anisum* and *Foeniculum vulgare* essential oils against *Paenibacillus larvae*. *Journal of Essential Oil Research*, 21, 91 – 93.
- ✓ Genersch, E.; (2010). American Foulbrood in honeybees and its causative agent, *Paenibacillus larvae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 103, S10 – S19.

- ✓ Glasstone, S.; Sesonske, S.; (2005). *Ingeniería de reactores nucleares*. Capítulo 8: Combustibles nucleares; pp. 503 – 556. España. Reverté.
- ✓ González, M.; (2005). Actividad microbiana de extractos y/o productos vegetales de plantas aromáticas contra *Paenibacillus Larvae* subespecie *Larvae*, agente causal de Loque Americana. Tesis de grado para optar al título de Microbiología, Departamento de Microbiología e Inmunología, Universidad Nacional de Río Cuarto, Río Cuarto, Argentina.
- ✓ González, M.; (2011). Caracterización de algunos productos naturales con actividad antimicrobiana contra *Paenibacillus larvae*, agente causal de Loque Americana. Tesis de doctorado para optar al título de Doctor en Ciencias Biológicas, Departamento de Microbiología e Inmunología, Universidad Nacional de Río Cuarto, Río Cuarto, Argentina.
- ✓ González, M.; Marioli, J.; (2010). Antibacterial activity of water extracts and essential oils of various aromatic plants against *Paenibacillus larvae*, the causative agent of American Foulbrood. *Journal of Invertebrate Pathology*, 104, 209 – 213.
- ✓ Graaf, D.; Alippi, A.; Antúnez, K.; Aronstein, K.; Budge, G.; De Koker, D.; De Smet, L.; Dingman, D.; Evans, J.; Foster, L.; Fünfhaus, A.; García - González, E.; Gregorc, A.; Human, H.; Murray, D.; Nguyen, B.; Poppinga, L.; Spivak, M.; van Engelsdorp, D.; Wilkins, S.; Genersch, E.; (2013). Standard methods for American foulbrood research. *Journal of Apicultural Research*, 52 (1), 1 – 27.
- ✓ Gupta, M.; (1995). *270 Plantas Medicinales Iberoamericanas*. Editorial Presencia. Santafé de Bogotá, Colombia.
- ✓ Haensel, R.; Ohlendorf, D.; (1971). A new flavone from *Achyrocline satureioides* unsubstituted in ring B. *Arch. Pharm. Dtsch. Pharm. Ges.* 304, 893 – 896.
- ✓ Hamburger, M.; Cordell, G.; (1987). A direct bioautographic TLC assay for compounds possessing antibacterial activity. *Journal of Natural Products*, 50 (1), 19 – 22.
- ✓ Hasemann, L.; (1961). How long can spores of American foulbrood live? *American Bee Journal*, 101, 298 – 299.
- ✓ Heinzen, H.; Vázquez, A.; Dellacassa, E.; (2005). Especies relevantes para una propuesta de cadena productiva para encarar la producción y comercialización de productos fitofarmacéuticos en Uruguay. Fundaquim - Red Propymes - URU. TEC.- FUNDASOL-GTZ, Uruguay, Montevideo.
- ✓ Hemaiswarya, S.; Kruthiventi, A.K.; Doble, M.; (2008). Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. *Phytomedicine*, 15, 639 – 652.
- ✓ Heyndrickx, M.; Vandemeulebroecke, K.; Hoste, B.; Janssen, P.; Kersters, K.; de Vos, P.; Logan, N.; Ali, N.; Berkeley, R.; (1996). Reclassification of *Paenibacillus* (formerly *Bacillus*) *pulvifaciens* (Nakamura 1984) Ash et al. 1994, a later subjective synonym of *Paenibacillus* (formerly *Bacillus*) *larvae* (White 1906) Ash et al. 1994, as a subspecies of *P. larvae*, with emended descriptions of *P. larvae* as *P. larvae* subsp. *larvae* and *P. larvae* subsp. *pulvifaciens*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 46, 270 – 279.
- ✓ Hitchcock, J.; Stoner, A.; Wilson, T.; Menapace, M.; (1979). Pathogenicity of *Bacillus pulvifaciens* to honeybee larvae of various ages (Hymenoptera: Apidae). *Journal of the Kansas Entomological Society*, 52, 238 – 246.

- ✓ Holzschuh, M.; Gosmann, G.; Schneider, P.; Schapoval, E.; Bassani, V.; (2010). Identification and stability of a new bichalcone in *Achyrocline satureioides* spray dried powder. *Pharmazie*, 65, 650 – 656.
- ✓ Hostettmann K.; Wolfender J.; Terreaux C.; (2001). Modern screening techniques for plant extracts. *Pharmaceutical Biology*, 39, 18 – 32.
- ✓ Hueso – Falcón, I.; Casero, C.; Amesty, A.; Gutiérrez – Nicolás, F.; Cedrón, J.; Estévez – Braun, A.; Ravelo, A.; (2011). Quimiotecas bioactivas a partir de estructuras privilegiadas de origen natural. *Biocáncer*, 5, 215 – 239.
- ✓ Hwang, M.; Morgan, R.; Sarkar, S.; Wang, P.; Guttman, D.; (2005). Phylogenetic characterization of virulence and resistance phenotypes of *Pseudomonas Syringae*. *Applied and environmental microbiology*, 71 (9), 5182 – 5191.
- ✓ Joray, M.; Rollán, M.; Ruiz, G.; Palacios, S.; Carpinella, M.; (2010). Antibacterial activity of extracts from plants of central Argentina--isolation of an active principle from *Achyrocline satureioides*. *Journal of Medicinal Plant and Natural Product Research*, 77(1), 95 – 100.
- ✓ Joray, M.; Palacios, S.; Carpinella, M.; (2013). Understanding the interactions between metabolites isolated from *Achyrocline satureioides* in relation to its antibacterial activity. *Phytomedicine*, 20, 258 – 261.
- ✓ Kiehlbauch, J.; Hannett, G.; Salfinger, M.; Archinal, W.; Monserrat, C.; Carlyn, C.; (2000). Use of the National Committee for Clinical Laboratory Standards Guidelines for Disk Diffusion Susceptibility Testing in New York State Laboratories. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(9), 3341 – 3348.
- ✓ Kimbrough, D.; Kandel, M.; Reynolds, R.; O'Dell, C.; Wigman, L.; Kelsch, C.; (1992). Four Exciting Chromatography Activities. *Journal of Chemical Education*, 69, 987 – 992.
- ✓ Kiska, D.; (1998). *In vitro* testing of antimicrobial agents. *Seminars in Pediatric Infectious Diseases* 9, 281 – 291.
- ✓ Kokoskova, B.; Pouvova, D.; Pavela R.; (2011). Effectiveness of plant essential oils against *Erwinia amylovora*, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* and associated saprophytic bacteria on/in host plants. *Journal of Plant Pathology*, 93 (1), 133 – 139.
- ✓ Lamaty, G.; Menut, C.; Bessiere, J.; Schenkel, E.; Dos Santos, M.; Bassani, V.; (1991). The chemical composition of some *Achyrocline satureioides* and *Achyrocline alata* oils from Brazil. *Journal of Essential Oil Research*, 3, 317–321.
- ✓ Lorenzi, H.; Matos, F.; (2002). *Plantas medicinais no Brasil: nativas y exóticas cultivadas*. Nova Odessa, SP. Instituto Plantarum, Sao Paulo, Brasil.
- ✓ Lorenzo, D.; Tai – Seraffini, L.; Santos, A.; Frizzo, C.; (2000). *Achyrocline satureioides* essential oils from Southern Brazil and Uruguay. *Planta Medica*, 66, 476 – 477.
- ✓ Luna, S.; Albanesi, A.; López, C.; (2002). Caracterización de la variabilidad de cepas de *Paenibacillus larvae* subsp. *Larvae* (White) Heyndrickx et al. en la Argentina. *Agroscientia*, 19, 31 – 36.
- ✓ Machado, M.; (2008). Atividade antibacteriana *in vitro* de inflorescências de *Achyrocline satureioides* (LAM.) DC. – Asteracea – (“macela”, “marcela”) como fator de proteção em zoonoses. *Acta Scientiae Veterinariae*, 36 (3), 2008, 337 – 338.

- ✓ Mann, C.; Markham, J.; (1998). A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils. *Journal of Applied Microbiology*, 84 (4), 538 – 544.
- ✓ Marques, V.; Farah, A.; (2009). Chlorogenic acids and related compounds in medicinal plants and infusions. *Food Chemistry*, 113, 1370 – 1376.
- ✓ Martins, N.; Barros, L.; Santos-Buelga, C.; Henriques, M.; Silva, S.; Ferreira, I.; (2014). Decoction, infusion and hydroalcoholic extract of *Origanum vulgare* L.: Different performances regarding bioactivity and phenolic compounds. *Food Chemistry*, 158, 73 – 80.
- ✓ Mendoza N.; (2008). *Farmacología médica*. Capítulo 3: Quimioterapia; pp. 565 – 727. Ciudad de México, México. Panamericana.
- ✓ Mesquita, A.; Correa, D.; De Padua, A.; Guedes, M.; Gottlieb, O.; (1986). Flavonoids from four Compositae species. *Phytochemistry*, 25, 1255 – 1256.
- ✓ Michael, A.; (1960). A new technique for studying bee diseases. Trabajo presentado en: XVII International Beekeeping Congress, Bologna, Roma.
- ✓ Miyagi, T.; Peng, C.; Chuang, R.; Mussen, E.; Spivak, M.; Doi, R.; (2000). Verification of oxytetracycline – resistant American foulbrood pathogen *Paenibacillus larvae* in the United States. *Journal of Invertebrate Pathology*, 75, 95 – 96.
- ✓ Moscou, K.; Snipe, K.; (2013). *Pharmacology for Pharmacy Technicians*. Unit 1, Introduction of pharmacology; pp. 2 – 75. Missouri, United State. Elsevier, Mosby.
- ✓ Muñoz, F.; (1996). *Plantas medicinales y aromáticas, estudio cultivo y procesado*. Capítulo 1: Las plantas medicinales: pp. 15 – 32. Madrid, España. Ediciones Mundi – Prensa.
- ✓ Nordstrom, S.; Fries, I.; (1995). A comparison of media and cultural conditions for identification of *Bacillus larvae* in honey. *Journal of Apiculture Research*, 43 (2), 97 – 103.
- ✓ Ortuño, M.; (2006). *Manual práctico de aceites esenciales, aromas y perfumes*. Capítulo 8 – sección 8.7: Extractos de plantas. La alternativa a los aceites esenciales; pp. 223 – 231. España. Aiyana.
- ✓ Parodi, D.; (1979). *Enciclopedia Argentina de Agricultura y Jardinería*. ACME, Buenos Aires, Argentina.
- ✓ Petrovick, P.; Knorst, M.; (1992). Efeito da operação son pressoa reducida sobre a qualidade dos extratos concentrados de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. Compositae. In: Abstracts of the XII Simpósio de plantas medicinais do Brasil, Curitiba.
- ✓ Piccini, C.; Zunino, P.; (2000). American Foulbrood in Uruguay: isolation of *Paenibacillus larvae larvae* from larvae with clinical symptoms and adult honeybees and susceptibility to oxytetracycline. *Journal Invertebrate Pathology*, 78, 176 – 177.
- ✓ Raaman, N.; (2006). *Phytochemical techniques*. Chapter 4: Methods of extraction; pp. 9 – 19. Nueva Dheli, India. New India Publishing Agency.
- ✓ Rakholiya, K.; Kaneria, M.; Chanda, S.; (2013). Medicinal plants as alternative sources of therapeutics against multidrug resistance pathogenic microorganisms based on their antimicrobial potential and synergistic properties. *Fighting multidrug*

- resistance with herbal extracts, essentials oils and their components*, 11, 165 – 175.
- ✓ Rakholiya, K; Vaghela, P.; Rathod, T.; Chanda, S.; (2014). Comparative study of hydroalcoholic extracts of momordica charantia L. against foodborne pathogens. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 76, 148 – 56.
 - ✓ Ratera, E.; Ratera, M.; (1980). *Plantas de la Flora Argentina empleadas en la medicina popular*. Hemisferio Sur, Buenos Aires, Argentina.
 - ✓ Remington, G.; (2003). *Farmacología*. Parte 4: Pruebas, análisis y control farmacéuticos; pp. 557 – 764. Buenos Aires, Argentina. Panamericana.
 - ✓ Retta, D.; Dellacassa, E.; Villamil, J.; Suárez, S.; Bandoni, A.; (2012). Marcela, a promising medicinal and aromatic plant from Latin America: A review. *Industrial Crops and Products*, 38, 27 – 38.
 - ✓ Reynaldi, F.; Rule, R.; Arauz, S.; Alippi, A.; (2010). Sensibilidad *in vitro* de *Paenibacillus larvae* frente a los antibióticos oxitetraciclina, tilosina, tilmicosina y lincomicina. *Analecta Veterinaria*, 30 (1), 25 – 29.
 - ✓ Richard, J.; Cannell, P.; (1998). *Methods in Biotechnology, Vol. (4): Natural Products Isolation*. Chapter 1: How to Approach the Isolation of a Natural Product; pp. 1 – 51. New Jersey, United State, Humana Press Inc.
 - ✓ Ruiz, L.; (2007). "*Pseudomonas aeruginosa*": Aportación al conocimiento de su estructura y al de los mecanismos que contribuyen a su resistencia a los antimicrobianos. Tesis de doctorado para optar al título de Doctor en Ciencias, Dpto. de Patología y Terapéutica Experimental, Universidad de Barcelona, Barcelona, España.
 - ✓ Sabaté, D.; González, M.; Porrini, M.; Eguaras, M.; Audisio, M.; Marioli, J.; (2012). Synergistic effect of surfactin from *Bacillus subtilis* C4 and *Achyrocline satureioides* extracts on the viability of *Paenibacillus larvae*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28, 1415 – 1422.
 - ✓ Sarker, S.; Latif, Z.; Gray, A.; (2006). *Methods in Biotechnology, Vol. 20, Natural Products Isolation*. Chapter 2: Initial and Bulk Extraction; pp. 27 – 46. 2nd ed. New Jersey, United State, Humana Press Inc.
 - ✓ Shimanuki, H.; (1963). *In vitro and in vivo studies of Bacillus larvae*. Ph.D. dissertation, Iowa State University of Science and Technology, Ames, Iowa.
 - ✓ Simoes, C.; Bauer, L.; Petrovick, P.; Bassani, V.; (1988). Analysis of flavonoids from *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. Compositae. *Revista Asociación Argentina de Farmacia y Bioquímica*, 28, 2626 – 2630.
 - ✓ Šmejkal, K.; Chudík, S.; Klouček, P.; Marek, R.; Cvačka, J.; Urbanová, M.; Julínek, O.; Koboška, L.; Šlapetová, T.; Holubová, P.; Zima, A.; Dvorská, M.; (2008). Antibacterial α -geranylfavonoids from *Paulownia tomentosa* fruits. *Journal of Natural Products*, 71, 706 – 709.
 - ✓ Still, M.; Kahn, M.; Mitra, A.; (1978). Rapid Chromatographic Technique for Preparative Separations with Moderate Resolution. *Journal of Organic Chemistry*, 43, 2923 - 2925.
 - ✓ Ulrich - Merzenich, G.; Zeitler, H.; Vetter, H.; Wagner, H.; (2010). Drug development from natural products: exploiting synergistic effects. *Indian Journal of Experimental Biology*, 48, 208 – 219.

- ✓ Verpoorte, R.; Kim, H.; Choi, Y.; (2006). Plants as source of medicines. In: Bogers, R.; Craker, L.; Lange, D.; (Eds.). *Medicinal and Aromatic Plants*. Springer, Netherlands, 261–273.
- ✓ Wagner, H.; Maurer, G.; Farkas, L.; Haensel, R.; Ohlendorf, D.; (1971). Structure and synthesis of gnaphaliin, methylgnaphaliin from *Gnaphalium obtusifolium* and isognaphaliin from *Achyrocline satureioides*. *Chemische Berichte*, 104, 2381 – 2388.
- ✓ Weller, M.; (2012). A Unifying Review of Bioassay – Guided Fractionation, Effect – Directed Analysis and Related Techniques. *Sensors*, 12, 9181 – 9209.
- ✓ Wilson, W.; (1970). Inoculation of the pupal honeybee with spores of *Bacillus larvae*. *Journal of Apicultural Research*, 9, 33 – 37.
- ✓ Wilson, W.; (1971). Resistance to American foulbrood in honey bees XI. Fate of *Bacillus larvae* spores ingested by adults. *Journal of Invertebrate Pathology*, 17, 247 – 255.
- ✓ Wilson, W.; Rothenbuhler, C.; (1968). Resistance to American foulbrood in honey bees. VIII. Effects of injecting *Bacillus larvae* spores into adults. *Journal of Invertebrate Pathology*, 12, 418 – 424.
- ✓ Yue, D.; Nordhoff, M.; Wieler, L.; Genersch, E.; (2008). Fluorescence in situ hybridization (FISH) analysis of the interactions between honeybee larvae and *Paenibacillus larvae*, the causative agent of American foulbrood of honeybees (*Apis mellifera*). *Environmental Microbiology*, 10 (6), 1612 – 1620.

VIII – ANEXOS

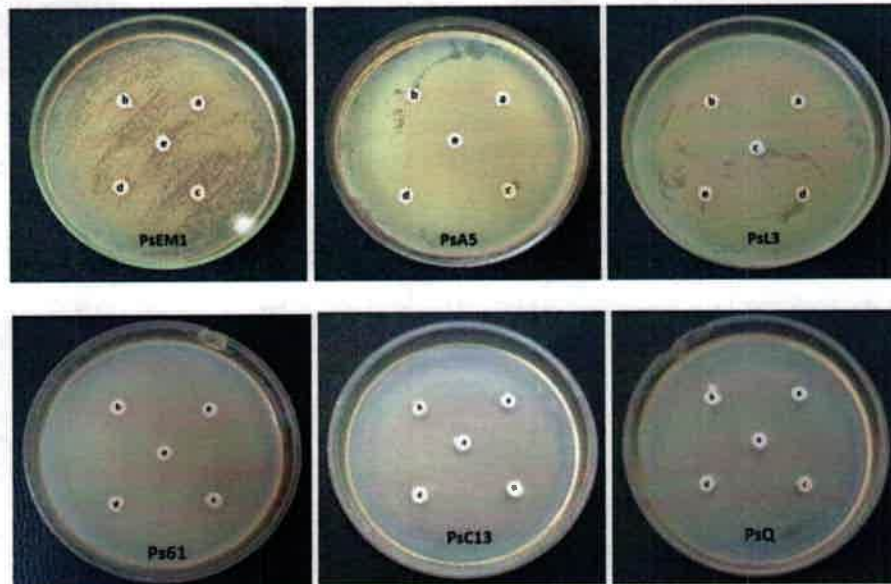


Figura 1a. Actividad antibacteriana de las fracciones del EHA de *A. saturoioides*, (1 mg/mL), sobre los diferentes patovares de *P. syringae*.

Referencias: a – FH; b – FB; c – FE; d – FA y e – DMSO (diluente)

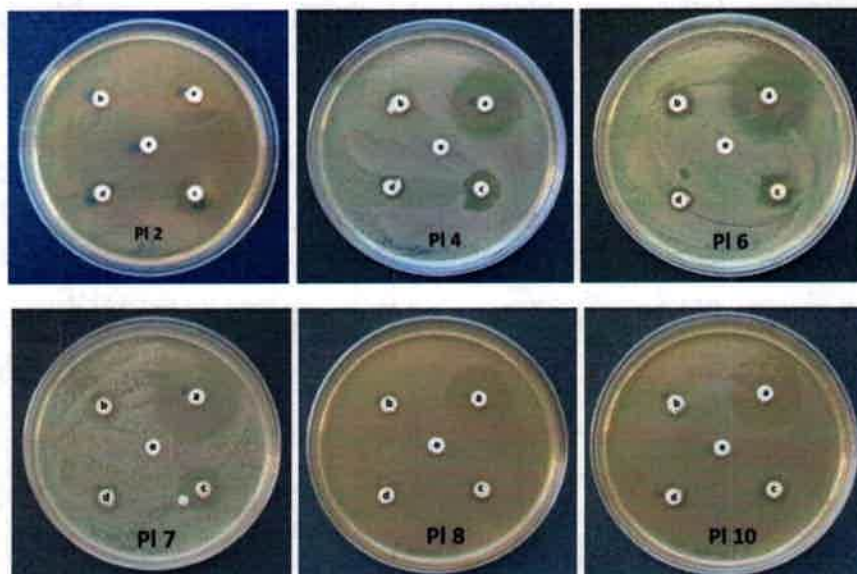


Figura 2a. Halos de inhibición producidos por las fracciones del EHA de *A. saturoioides* a concentración de 1 mg/mL, contra cepas de *P. larvae*.

Referencias: a – FH; b – FB; c – FE; d – FA y e – DMSO (diluente)

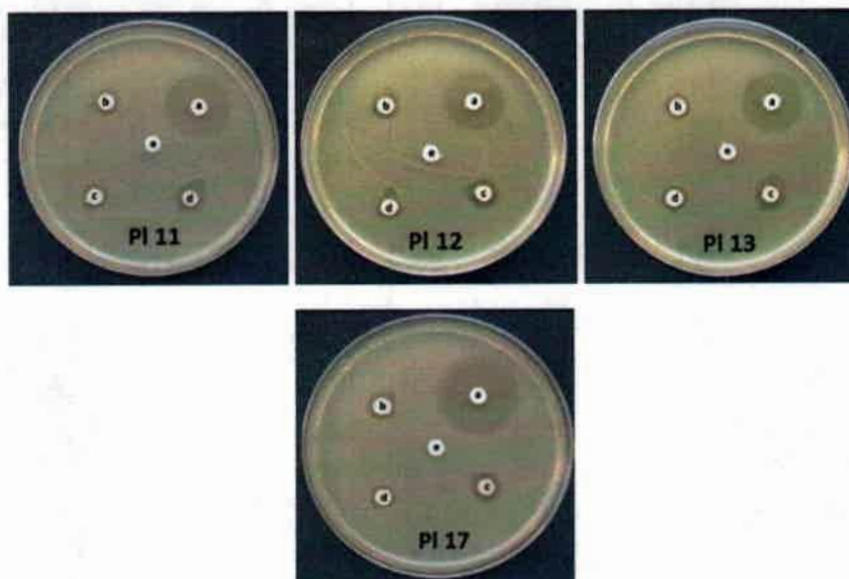


Figura 2a. Continuación. Halos de inhibición producidos por las fracciones del EHA de *A. satureioides* a concentración de 1 mg/mL, contra cepas de *P. larvae*.

Referencias: a – FH; b – FB; c – FE; d – FA y e – DMSO (diluyente)

Tabla 1a. Actividad antibacteriana de la FH del EHA de *A. satureioides* contra cepas de *P. larvae*

Cepas de <i>P. larvae</i>	Concentración de la FH (mg/ml)									
	1	0,5	0,25	0,125	0,062	0,031	0,015	0,007	0,003	0,001
1							CIM	NI	NI	NI
2							CIM	NI	NI	NI
4							CIM	NI	NI	NI
6							CIM	NI	NI	NI
7							CIM	NI	NI	NI
8							CIM	NI	NI	NI
9							CIM	NI	NI	NI
10							CIM	NI	NI	NI
11							CIM	NI	NI	NI
12							CIM	NI	NI	NI
13							CIM	NI	NI	NI
14							CIM	NI	NI	NI
17							CIM	NI	NI	NI

Referencias: CIM – Concentración Inhibitoria Mínima; | – Inhibe el crecimiento; NI – No inhibe de crecimiento

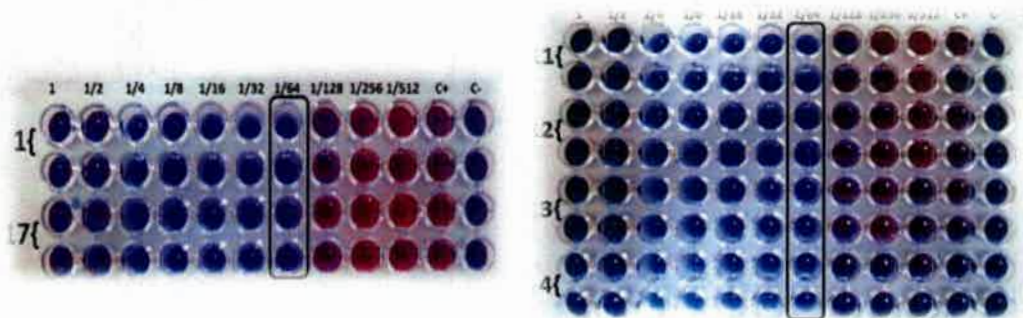


Figura 3a. Actividad antibacteriana FH de *A. saturoioides* frente a cepas de *P. larvae* 1, 11, 12, 13, 14 y 17.

Tabla 2a. Actividad antibacteriana de la FE del EHA de *A. saturoioides* contra cepas de *P. larvae*

Cepas de <i>P. larvae</i>	Concentración de la FE (mg/ml)									
	1	0,5	0,25	0,125	0,062	0,031	0,015	0,007	0,003	0,001
1							CIM	NI	NI	NI
2							CIM	NI	NI	NI
4							CIM	NI	NI	NI
6						CIM	NI	NI	NI	NI
7							CIM	NI	NI	NI
8							CIM	NI	NI	NI
9							CIM	NI	NI	NI
10							CIM	NI	NI	NI
11							CIM	NI	NI	NI
12							CIM	NI	NI	NI
13							CIM	NI	NI	NI
14							CIM	NI	NI	NI
17							CIM	NI	NI	NI

Referencias: CIM – Concentración Inhibitoria Mínima; | – Inhibe el crecimiento; NI – No inhibe de crecimiento

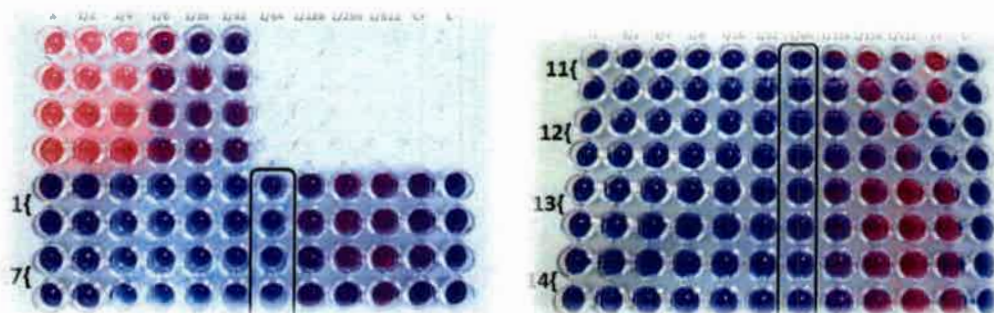


Figura 4a. Actividad antibacteriana de la FE de *A. saturoioides* frente a cepas de *P. larvae* 1, 11, 12, 13, 14 y 17.

Tabla 3a. CBM de la FH del EHA de *A. saturoioides* contra cepas de *P. larvae*

Cepas de <i>P. larvae</i>	Concentración de la FH (mg/ml)					
	0,5	0,25	0,125	0,062	0,031	0,015
1	ND	NB	NB	NB	NB	NB
2	B	B	B	B	CBM	NB
4	B	B	B	CBM	NB	
6	B	B	CBM	NB	NB	
7	B	B	B	CBM	NB	
8	ND	B	B	CBM	NB	NB
9	ND	B	CBM	NB	NB	NB
10	ND	NB	NB	NB	NB	NB
11	ND	B	CBM	NB	NB	NB
12	ND	B	CBM	NB	NB	NB
13	ND	NB	NB	NB	NB	NB
14	ND	NB	NB	NB	NB	NB
17	ND	NB	NB	NB	NB	NB

Referencias: CBM – Concentración Bactericida Mínima; B –Bactericida; NB – No Bactericida; ND – No determinado

Tabla 4a. CBM de la FE del EHA de *A. saturoioides* contra cepas de *P. larvae*

Cepas de <i>P. larvae</i>	Concentración de la FE (mg/ml)					
	0,5	0,25	0,125	0,062	0,031	0,015
1	ND	NB	NB	NB	NB	NB
2	ND	NB	NB	NB	NB	NB
4	ND	NB	NB	NB	NB	NB
6	B	B	B	CBM	NB	
7	ND	B	B	CBM	NB	NB
8	ND	B	B	CBM	NB	NB
9	ND	NB	NB	NB	NB	NB
10	ND	B	B	CBM	NB	NB
11	ND	B	CBM	NB	NB	NB
12	ND	B	CBM	NB	NB	NB
13	ND	CBM	NB	NB	NB	NB
14	ND	NB	NB	NB	NB	NB
17	ND	NB	NB	NB	NB	NB

Referencias: CBM – Concentración Bactericida Mínima; B –Bactericida; NB – No Bactericida; ND – No determinado



Figura 5a. Disminución del crecimiento bacteriano en la determinación de la CBM para la cepa PL 1 expuesta a la FH a diferentes concentraciones

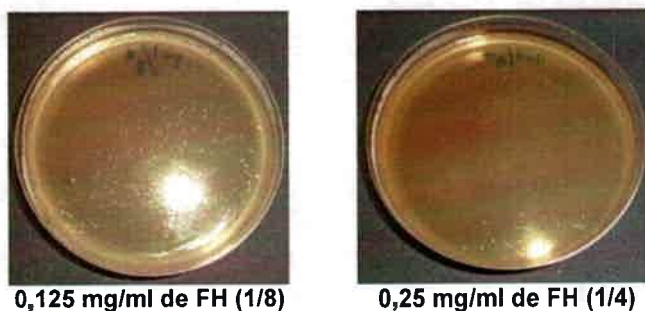


Figura 5a. Continuación. Disminución del crecimiento bacteriano en la determinación de la CBM para la cepa PL 1 expuesta a la FH a diferentes concentraciones

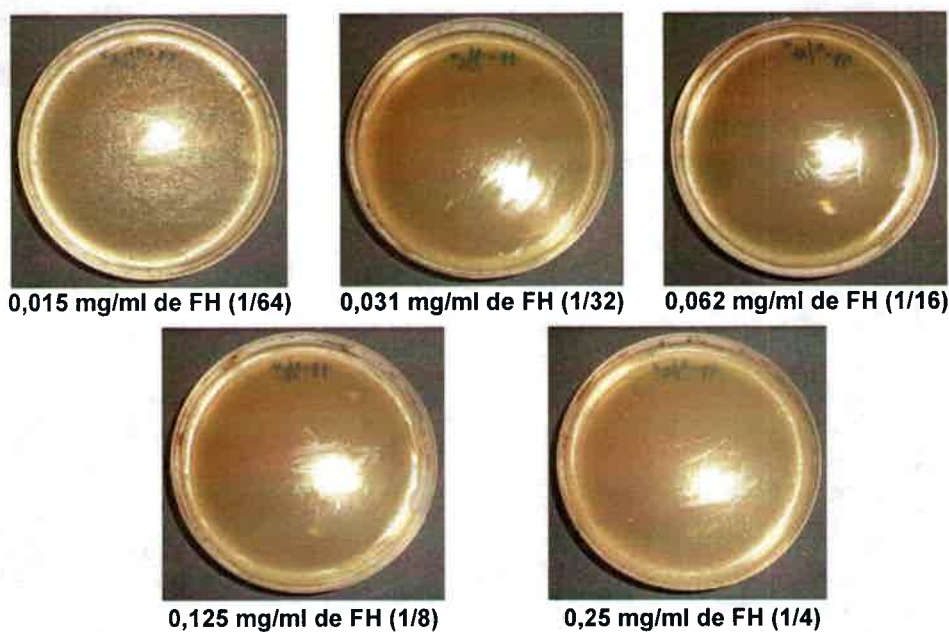


Figura 6a. Disminución del crecimiento bacteriano en la determinación de la CBM para la cepa PL 17 expuesta a la FH a diferentes concentraciones



Figura 7a. Disminución del crecimiento bacteriano en la determinación de la CBM para la cepa PL 1 expuesta a la FE a diferentes concentraciones

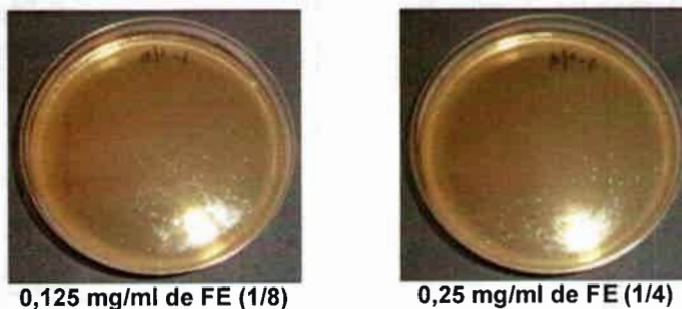


Figura 7a. Continuación. Disminución del crecimiento bacteriano en la determinación de la CBM para la cepa PL 1 expuesta a la FE a diferentes concentraciones

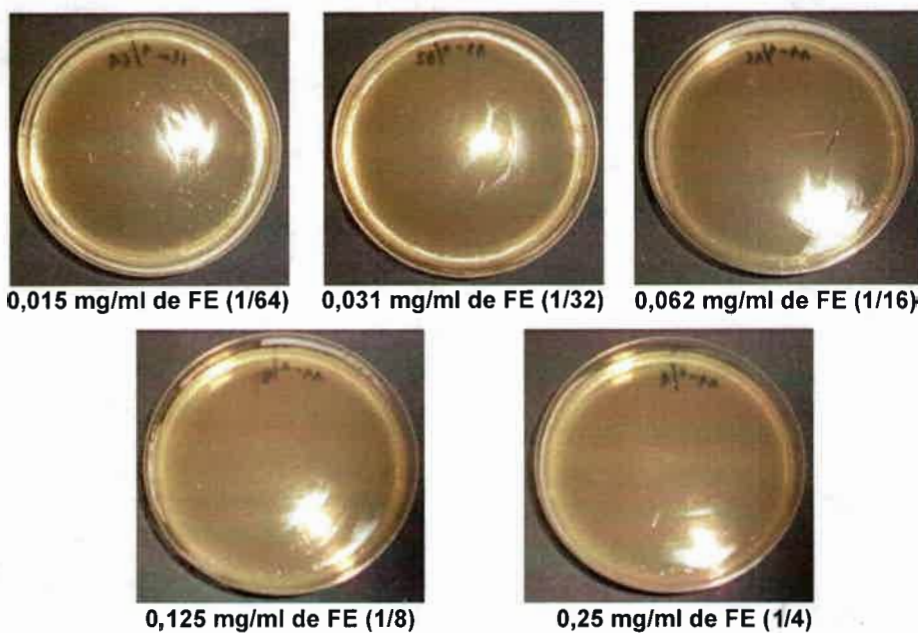


Figura 8a. Disminución del crecimiento bacteriano en la determinación de la CBM para la cepa PL 11 expuesta a la FE a diferentes concentraciones

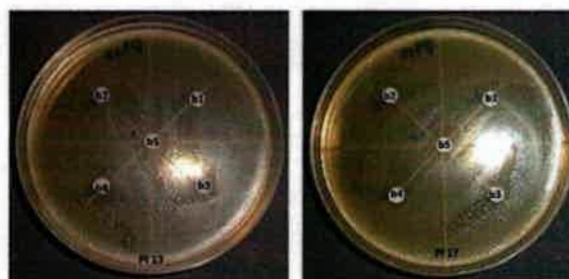


Figura 9a. Halos de inhibición producidos por las fracciones de las bandas de la FH de *A. saturoioides* contra las cepas de *P. larvae* PI 13 y PI 17
Referencias: b1 – Rf: 0,94; b2 – Rf: 0,48; b3 – Rf: 0,35; b4 – Rf: 0,24; b5 – Rf: 0,14

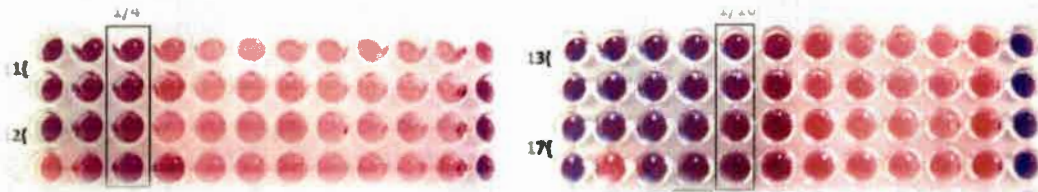


Figura 10a. Actividad antibacteriana de la banda 2 Rf = 0,48 de la FH de *A. saturoioides* frente a cepas PI 11, 12, 13 y 17 de *P. larvae*

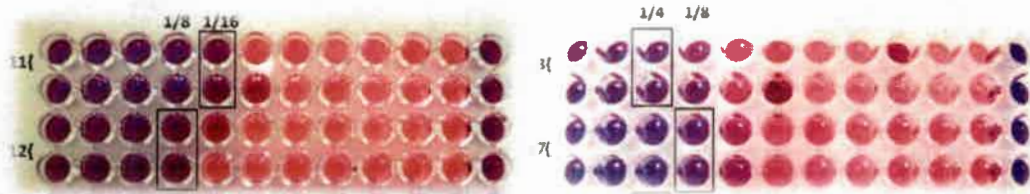


Figura 11a. Actividad antibacteriana de la banda 4 Rf = 0,24 de la FH de *A. saturoioides* frente a cepas PI 11, 12, 13 y 17 de *P. larvae*



0,062 mg/ml de banda 2 FH (1/16) – CIM



0,25 mg/ml de banda 2 FH (1/4)

Figura 12a. Disminución del crecimiento bacteriano en la determinación de la CBM para la cepa PI 13 expuesta a la banda 2 de la FH a la CIM y una dilución por encima

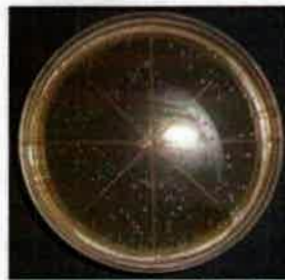


0,125 mg/ml de banda 3 FH (1/8) – CIM

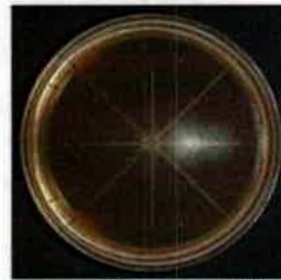


0,5 mg/ml de banda 3 FH (1/2)

Figura 13a. Disminución del crecimiento bacteriano en la determinación de la CBM para la cepa PI 17 expuesta a la banda 3 de la FH a la CIM y una dilución por encima

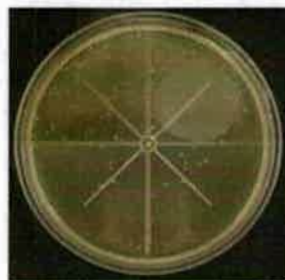


0,25 mg/ml de banda 4 FH (1/4) – CIM

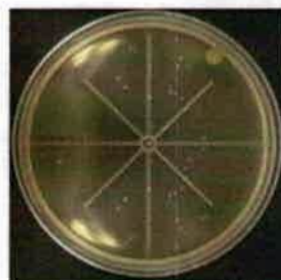


1 mg/ml de banda 4 FH (1)

Figura 14a. Disminución del crecimiento bacteriano en la determinación de la CBM para la cepa PI 11 expuesta a la banda 4 de la FH a la CIM y una dilución por encima



0,125 mg/ml de banda 5 FH (1/8) – CIM



0,5 mg/ml de banda 5 FH (1/2)

Figura 15a. Disminución del crecimiento bacteriano en la determinación de la CBM para la cepa PI 12 expuesta a la banda 5 de la FH a la CIM y una dilución por encima



Figura 16a. Halos de inhibición producidos por las fracciones de las bandas de la FE de *A. satureioides* contra las cepas de *P. larvae* PI 13 y PI 17

Referencias: b1 – Rf: 0,52; M1 – Rf: 0,52 y 0,38; b2 – Rf: 0,26; M2 – Rf: 0,38 y 0,26; b3 – Rf: 0,14

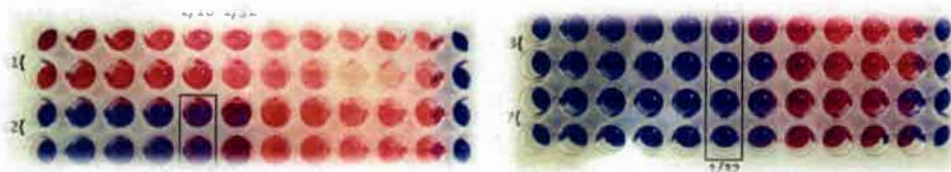


Figura 17a. Actividad antibacteriana de la mezcla 1 Rf = 0,52 y 0,38 de la FE de *A. satureioides* frente a cepas PI 11, 12, 13 y 17 de *P. larvae*

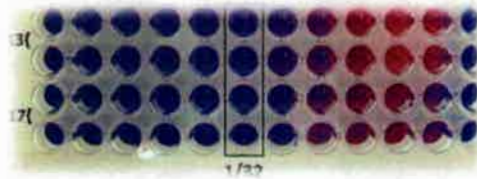


Figura 18a. Actividad antibacteriana de la banda 3 Rf = 0,14 de la FE de *A. satureioides* frente a cepas PI 13 y 17 de *P. larvae*



0,031 mg/ml de banda 2 FE (1/32) – CIM



0,125 mg/ml de banda 2 FE (1/8)

Figura 19a. Disminución del crecimiento bacteriano en la determinación de la CBM para la cepa PI 13 expuesta a la banda 2 de la FE a la CIM y una dilución por encima



0,062 mg/ml de Mezcla 1 FE (1/16) – CIM



0,25 mg/ml de Mezcla 1 FE (1/4)

Figura 20a. Disminución del crecimiento bacteriano en la determinación de la CBM para la cepa PI 12 expuesta a la Mezcla 1 de la FE a la CIM y una dilución por encima



0,031 mg/ml de banda 3 FE (1/32) – CIM



0,125 mg/ml de banda 3 FE (1/8)

Figura 21a. Disminución del crecimiento bacteriano en la determinación de la CBM para la cepa PI 17 expuesta a la banda 3 de la FE a la CIM y una dilución por encima