



## Evaluación de la actividad anti-*Helicobacter pylori* del Aceite Esencial y Acido Ursólico de *Clinopodium bolivianum* (Khoa) por el método de impregnación de disco

MAMANI, MARISEL<sup>1</sup>  
 GONZALES, EDUARDO<sup>1</sup>  
 MAMANI, BENIGNO<sup>1</sup>

CORRESPONDENCIA: EDUARDO GONZALES  
 EDUARDO.GONZALES@GMAIL.COM

FECHA DE RECEPCIÓN: 16 DE ABRIL DE 2014

FECHA DE ACEPTACIÓN 30 DE JULIO DE 2014

### Resumen

*Helicobacter pylori* es una bacteria que tiene una relación directa con el desarrollo de la enfermedad gastroduodenal. Se estima que más del 50% de la población mundial está infectada por esta bacteria. La terapia empleada para la erradicación de la bacteria falla en más del 20%, principalmente por la generación de resistencia a los antibióticos comerciales. De tal manera, es importante controlar esta enfermedad, buscando nuevos tratamientos y/o compuestos que sean más específicos, menos tóxicos y de fácil acceso a la población. Las plantas medicinales constituyen potenciales fuentes para el descubrimiento y desarrollo de nuevos agentes efectivos contra la infección por esta bacteria. En el área de Farmacología del Instituto de Investigación Fármaco Bioquímicas de la Facultad

### Abstract

*Helicobacter pylori* are a bacterium that has a direct relationship with the development of gastroduodenal disease. It is estimated that over 50 % of the world population is infected with this bacterium. The therapy used to eradicate the bacteria fails by more than 20 %, mainly due to the generation of resistance to commercial antibiotics. Thus, it is important to control this disease, finding new treatments and / or compounds which are more specific, less toxic and easily accessible to the population. Medicinal plants are potential sources for the discovery and development of new agents effective against infection by this bacterium. In the area of Pharmacology, Institute of Drug Biochemical Research, Faculty of Pharmaceutical Sciences and Biochemical carried out several studies on the

<sup>1</sup> Área de Farmacología del Instituto de Investigaciones Fármaco-bioquímicas, Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas, Universidad Mayor de San Andrés., Av. Saavedra No.2224, La Paz, Bolivia.

de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas se lleva a cabo diferentes estudios sobre las plantas de la herbolaria Boliviana, en este caso realizando estudios sobre los metabolitos secundarios de las plantas hacia una terapéutica natural, basado en la medicina tradicional. En los últimos años el uso de la medicina tradicional, para el tratamiento de enfermedades comunes del ser humano se ha incrementado, sin embargo los conocimientos aportados de los médicos tradicionales y/o curanderos son de carácter empírico y transmitido de generación en generación cuyo tratamiento se basa en la práctica y observación. Estos tratamientos no cuentan con una base científica para probar su eficacia farmacológica. Por esta razón se debe validar científicamente el efecto de las plantas medicinales, hacia la identificación de los principios activos, y su actividad contra el *Helicobacter pylori*. El presente estudio corresponde a la evaluación del Aceite esencial y Acido Ursólico del *Clinopodium bolivianum*, los cuales no cuentan con estudios de la actividad anti-*Helicobacter pylori*.

#### **PALABRAS CLAVE**

*Helicobacter pylori*,  
*Clinopodium bolivianum*, Acido  
Ursólico y Aceite esencial.

plants of the Bolivian herbal medicine, in this case by conducting studies on the secondary metabolites of plants to natural therapeutics, based on traditional medicine. In recent years the use of traditional medicine for the treatment of common human diseases has increased, however the traditional knowledge provided medical and / or healers are empirical and transmitted from generation to generation whose treatment based on practice and observation. These treatments do not have a scientific basis to prove their pharmacological efficacy. For this reason it should be scientifically validate the effect of medicinal plants, to identify the active ingredients and their activity against *Helicobacter pylori*. The present study is the evaluation of the essential oil and Ursolic Acid from *Clinopodium bolivianum*, which do not have studies of anti - *Helicobacter pylori* activity.

#### **KEY WORDS**

*Helicobacter pylori*,  
*Clinopodium bolivianum*,  
Ursolic acid and essential oil.

## **INTRODUCCIÓN**

Desde el descubrimiento de los investigadores australianos Warren y Marshall después de haber realizado cultivos de *Helicobacter pylori*, al principio de la década de los años 80, se llegaron a realizar numerosos estudios sobre la microbiología de esta interesante bacteria, la cual tenía una característica en particular. *Helicobacter pylori* es un espiral Gram negativo microaerófilico que infecta la mucosa gástrica humana y está asociado con el desarrollo de diversas enfermedades digestivas como ser: la gastritis, ulcera gastroduodenal, adenocarcinoma gástrico y con el desarrollo del linfoma gástrico de células B del tejido linfoide asociado a la mucosa (MALT), (Yakoob, J., et al., 2008).

Más de 25 años después de haber aislado por primera vez esta bacteria, aún no se ha encontrado en el mundo el tratamiento óptimo de erradicación del *Helicobacter pylori*; así, incluso las combinaciones más efectivas actual-

mente disponibles fracasan en aproximadamente un 20% de los casos (Gisbert, 2011). Se ha observado que el 70 a 90% de los pacientes con úlcera gástrica o duodenal se encuentran infectados con *H. pylori* y que el tratamiento combinado utilizando antibióticos (amoxicilina y claritomicina) y un anti secretor (omeprazol) produce la erradicación del microorganismo en un 80-90% de los casos (Vu, C., Ng, Y. 2000). Estos fracasos en la erradicación están relacionados a la falta de adherencia al tratamiento, la resistencia bacteriana y los efectos adversos de estos tratamientos (Francesco, et al. 2010).

En estudios realizados en la ciudad de La Paz, Bolivia, demuestran que aproximadamente el 50% de la población presenta infección por *Helicobacter pylori* (Bilbao, P. 2006). El uso de la quimioterapia para erradicar a *Helicobacter pylori* es bastante compleja fastidiosa, y costosa. Bolivia tiene elevados índices de pobreza, por lo que resulta costoso para algunas familias acceder al tratamiento. El aumento de la prevalencia de esta enfermedad en la población y la necesidad de disminuir los efectos que esta produce ha sido el estímulo de muchos científicos para el desarrollo de nuevas técnicas y medicamentos seguros para la población, estudiándose también alternativas naturales o derivados semisintéticos de productos naturales que ayuden a curar o prevenir el desarrollo de esta patología y sus efectos. Rescatando de esta manera los conocimientos de nuestras etnias y culturas, las mismas que sugieren terapias alternativas en base al uso de plantas medicinales. Algunos productos naturales han sido reportados como antiulcerogénicos en modelos de úlcera gástrica en animales (Lewís, D.A., Hanson, P.J. 1991)

Debido a los diversos estudios realizados en el ámbito científico con el fin de mitigar la propagación de esta bacteria, se ha estado buscando una alternativa terapéutica, a base de compuestos naturales, estudios anteriores desarrolladas en el Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas UMSA, realizó el análisis preliminar contra esta bacteria: uno de los trabajos realizados fue un estudio sobre la actividad anti- *Helicobacter pylori* *in vitro* con el uso de plantas medicinales como ser: *Calendula officinalis* (Calendula), *Clinopodium bolivianum* (Khoa), *Piper elongatum* (Matico), *Plantago major* (Llantén), *Verbena officinalis* (Verbena) y *Rubus boliviensis* (Khari-khari). Se ha evidenciado que los extractos diclorometánico, hidroalcohólico y acuoso de *Clinopodium bolivianum*, y *Piper elongatum*, tienen actividad anti-*Helicobacter pylori* al igual que el extracto hidroalcohólico de *Plantago major* (Claros P. M., et al 2007) mostrando resultados alentadores. En la misma línea de investigación se realizó otro estudio de la "Evaluación de la actividad anti-*Helicobacter pylori* del *Clinopodium bolivianum*, y *Piper elongatum* mediante la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) por agar en dilución. Se determinó que el extracto diclorometánico de *Clinopodium bolivianum* (Khoa) tiene actividad anti- *Helicobacter pylori* definida con un MIC de 64 ug/mL presentando solamente 6.06% de cepas resistentes (Quisbert, M., 2009).

La finalidad de este trabajo es complementar los estudios ya citados realizados en el Instituto de Investigación Fármaco Bioquímicas, la finalidad de utilizar nuestros recursos naturales, como una alternativa al tratamiento de *Helicobacter pylori*. Los extractos Acuoso, Hidroalcohólico y Diclorometáni-

co de la especie *Clinopodium bolivianum*, mostro actividad contra la bacteria, la finalidad de este trabajo es de evaluar al compuesto mayoritario (Ácido Ursólico), y el aceite esencial, sobre la actividad Anti-*Helicobacter pylori* ya que sobre estos compuestos no se tiene reportes. En el año 2011 se llegó a aislar e identificar el Ácido Ursólico (Acido 3 beta-hidroxiurs-12-en-28 oico) como producto mayoritario de la especie *Clinopodium bolivianum* identificado mediante los espectros de resonancia magnética unidimensional y bidimensional (Mamani B., 2011). Otro estudio realizado por Figueroa 1997 señala que los aceites esenciales de *Clinopodium bolivianum* poseen actividad antibacteriana *in vitro* sobre *Staphylococcus aureus* (coco gram positivo), *Bacillus subtilis*, *Shigella flexneri*, *Escherichia coli* y *Salmonella enteritidis* (bacilos gram negativo), pero ningún estudio se realizó sobre la *Helicobacter pylori*. El ácido Ursólico es un compuesto triterpénico pentacíclico que está presente en numerosas especies vegetales.

## METODOLOGÍA

---

### Material vegetal

La especie *Clinopodium bolivianum* fue recolectado en el mes de febrero del año 2012. En la comunidad Tanca, cantón Compi, provincia Murillo departamento de La Paz. Se realizó el secado de la planta y fue llevado al herbario nacional de Bolivia para su autenticación y clasificación.

### Obtención de los compuestos mayoritarios del *Clinopodium bolivianum*

Con la planta seca se realizó la extracción del aceite Esencial por la técnica de arrastre de vapor. Para la obtención del compuesto mayoritario Acido Ursólico, se pidió la colaboración del Lic. Benigno Mamani (Licenciado en Química) en la proporción del compuesto debido a que, en el año 2011 realizo la extracción e identificación del compuesto mayoritario del *Clinopodium bolivianum*. En el instituto de investigación de la facultad de Ciencias Puras y Naturales con la colaboración del Instituto de Investigación Fármaco Bioquímicas UMSA.

### Determinación de la actividad anti *Helicobacter pylori*. Recuperación de cepas de *H. pylori*.

Se obtuvieron cepas salvajes de *Helicobacter pylori*, cedidas en medio de caldo urea por el laboratorio de Microbiología del Hospital Arco Iris. Una vez trasladadas las muestras de biopsias al laboratorio de Microbiología del IIFB, con la ayuda de un hisopo estéril se procedió a estrujar la muestra de biopsia presionándola contra las paredes del tubo para la cual es sembrada inmediatamente en medio de cultivo. El medio de cultivo empleado es el Agar BHI (Infusión Cerebro Corazón) suplementado con 7 % de sangre de carnero desfibrada, mas *Helicobacter pylori* Selective Supplement. Las placas se incubaron en frascos de vidrio con cierre hermético por 5 días a 37°C, la atmosfera

microaerofílica se generó con 2 sobres de alkaseltzer (tableta efervescente de antiácidos) colocados en un frasco con 5 ml de agua estéril y 1 vela encendida.

### Identificación: Observación macroscópica.

A los cinco días de incubación de la muestra recolectada de una biopsia positiva al test urea, se observara si existe desarrollo en las placas. Si al cabo de ese tiempo no hay la presencia del crecimiento de la bacteria se esperara tres días más antes de desechar el cultivo. Se observó colonias muy pequeñas de aproximadamente 0,5 mm de diámetro, translúcidas, transparentes y brillantes que se asemejan a gotas de rocío de agua, algunas veces se presentó como una alfombra que tapiza el medio de cultivo.

### Observación microscópica.

Se realizó la tinción de Gram, observando en el microscopio bacilos curvos en forma de u, alas de gaviota o helicoidales, gram negativos.

### Identificación de las características bioquímicas:

**Prueba de la catalasa.** Para la realización de esta prueba se toma las colonias sospechosas de *Helicobacter pylori* en un porta objetos esparciéndolo sobre la superficie luego se le coloca una gota de peróxido de hidrogeno y si la prueba es positiva se debe observar la presencia de burbujas blancas (burbujeo), si la prueba es negativa no se observara la formación de burbujeo.

**Prueba de la oxidasa.** La prueba de la oxidasa se la realizo mediante una suspensión en solución fisiológica de la bacteria a la cual se le agrego un disco de oxidasa y se esperara por 5 minutos para observar el cambio de color del disco.

**Prueba de la ureasa.** En agar urea en pico de flauta se sembró colonias sospechosas de *Helicobacter pylori* se dejó en la estufa a 37°C por 24 horas y se observara el cambio de color del agar.

### Actividad Anti-*Helicobacter pylori*:

**Difusión en disco del Ácido Ursólico del *Clinopodium bolivianum*.** Primeramente se realiza una suspensión bacteriana de un cultivo de 2 días de incubación en solución fisiológica a la escala 4 de Macfarland, se atempera las cajas con el medio agar sangre modificada para la resiembra en 3 direcciones con un ángulo de 60° pasado los 10 min. Se coloca los discos de papel filtro whatman N° 5 (diámetro de 6 mm) un disco por caja; para el control positivo se utilizó Tetraciclina (concentración 3 ug/ul volumen 10 ul), control negativo (etanol al 75% y agua estéril volumen 10ul) y Acido Ursólico (concentración 0.6 ug/ul volumen 10 ul), incubación de las cajas invertidas en jarra de anaerobiosis durante 3 días a 35-37°C, medir los halos de inhibición con el Vernier en forma horizontal y vertical, para medir el diámetro.

**Difusión en disco del aceite esencial del *Clinopodium bolivianum*.** Se realizó una suspensión bacteriana de un cultivo de 2 días de incubación en solución fisiológica a la escala 4 de Macfarland, se atempera las cajas con el medio agar sangre modificada para la resiembra en 3 direcciones con un ángulo de 60° pasado los 10 min. Se coloca los discos de papel filtro whatman N° 5 (diámetro de 6 mm) un disco por caja; para el control positivo se utilizó Tetraciclina (concentración 3 ug/uL volumen 10 uL), control negativo (agua estéril volumen 10 uL) y Aceite Esencial (volumen 10, 7.5, 5, 2.5, y 1 uL), incubación de las cajas invertidas en jarra de anaerobiosis durante 3 días a 35-37°C, medir los halos de inhibición con el Vernier en forma horizontal y vertical, para medir el diámetro.

## RESULTADO Y DISCUSIÓN

### Rendimiento de aceite esencial obtenido del *Clinopodium bolivianum* por el método de arrastre de vapor

Tabla 1

Marco de rendimiento en porcentaje masa/ volumen del Aceite Esencial *Clinopodium bolivianum*.

N° de extracciones	Peso de la planta	Aceite esencial	Rendimiento % (m/v)
1	150	4,8	3,2
2	150	4,4	2,93
3	450	9,9	2,2
4	350	9,5	2,71

En las extracciones 1 y 2 se trabajó con hojas y tallos, de donde se obtuvo un mayor rendimiento, esto debido a que la presencia de tallos permitía mayor ingreso de vapor arrastrando mayor cantidad de Aceite. En comparación con las extracciones 3 y 4 que se trabajaron con solo hojas, este no presenta mayor circulación de vapor es por eso que el rendimiento fue menor. En total se obtuvo 28.6 ml de Aceite esencial en un total de 1100 gramos de planta.

### Técnica de impregnación de disco

Tabla 2

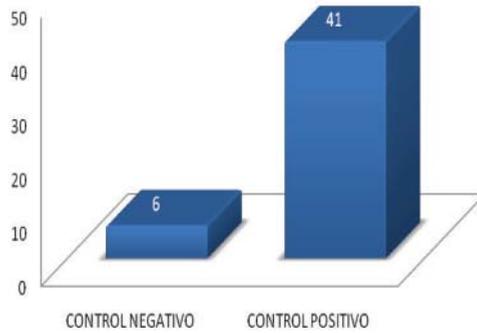
Actividad Anti-*Helicobacter pylori* de la Tetraciclina por la técnica de impregnación en disco. control positivo control negativo

	Control positivo	Control negativo
Promedio	40.5	6.18
I.C. 95%	39.85 - 41.21	6.06 - 6.29
Standard Dev.	2.26	0.38
Variación	5.12	0.15
C.V.	0.05	0.06
Actividad	R	S

Promedio: Diferencia significativa frente al control \*\*P<0.01

Actividad: S= sensible halo de inhibición mayor a 30 mm; R= resistente halo de inhibición menor a 30 mm.

Figura 1  
Actividad Anti-*Helicobacter pylori* de la Tetraciclina.



La tabla 2 y figura 1 muestra los halos de inhibición de la tetraciclina sobre cepas salvajes de *Helicobacter pylori*, el diámetro es expresado en milímetros, también se observa los resultados del control negativo (agua estéril y etanol al 75%). La tetraciclina tiene un promedio de diámetro de halo de inhibición de 40.5 mm, las pruebas de susceptibilidad se realizaron por triplicado, y para cada compuesto en estudio, siendo los resultados el promedio. Sea seleccionado la tetraciclina como control positivo debido a que es utilizado en la terapia alternativa para la erradicación de la *Helicobacter pylori* cuando fracasa la terapia de primera selección, además estudios revisados demuestran tasas de prevalencia de resistencia de *Helicobacter pylori* de 1% para Norte América, 8% para Centro y Sur América; 5% para Asia y 2% para Europa (Ramirez, P., et al 2012). El control negativo (agua estéril y etanol al 75%) no mostro halo de inhibición en ninguno de los casos, por lo que se reporta el diámetro del disco que es 6mm. Estadísticamente la actividad de la tetraciclina frente al control negativo es significativa con un nivel de confianza del 99 %.

Tabla 3  
Actividad Anti-*Helicobacter pylori* del Ácido Ursólico frente al control negativo y positivo.

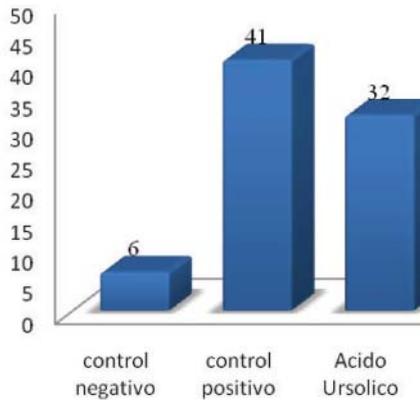
	control negativo	control positivo	Ac. Ursólico
<b>Promedio</b>	6.18	40.53	31.6**
<b>I.C. 95%</b>	6.06 - 6.29	39.85 - 41.21	29.5-33.7
<b>Standard Dev.</b>	0.38	2.26	3.79
<b>Variación</b>	0.15	5.12	14.33
<b>C.V.</b>	0.06	0.05	0.12
<b>Actividad</b>	S	R	S

Promedio: Diferencia significativa frente al control \*\*P<0.01

Actividad: S= sensible halo de inhibición mayor a 30 mm; R= resistente halo de inhibición menor a 30 mm.

Figura 2

Actividad Anti-*Helicobacter pylori* del Ácido Ursólico y sus modificaciones frente al control negativo.



La tabla 3 y figura 2 muestran los halos de inhibición del compuesto mayoritario Acido Ursólico sobre cepas salvajes de *Helicobacter pylori*, el diámetro es expresado en milímetros, de discos de impregnación con 10 uL [0.6 ug/uL] del compuesto en estudio. El promedio del diámetro del halo de inhibición del compuesto mayoritario Acido Ursólico es de 31.6 mm, siendo considerado Sensible. De acuerdo a lo reportado en los anteriores trabajos Para la interpretación de resultados se tomó como parámetro de resistencia cuando el halo de inhibición es menor a 30 mm y como sensible cuando el halo es mayor a 30 mm (Ludmila Boyanova et al1999).

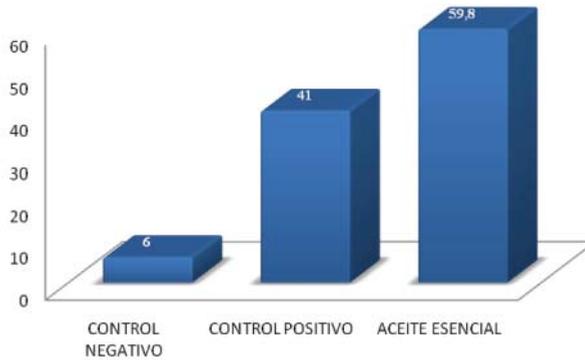
Tabla 4

Actividad Anti-*Helicobacter pylori* del Aceite Esencial frente al control negativo y control positivo.

	control negativo	control positivo	aceite esencial
<b>Promedio</b>	6.18	40.53	59.80
<b>I.C. 95%</b>	6.06 - 6.29	39.85 - 41.21	59.49-60.11
<b>Standard Dev.</b>	0.38	2.26	0.561
<b>Variación</b>	0.15	5.12	0.314
<b>C.V.</b>	0.06	0.05	0.009
<b>Actividad</b>	S	R	S

Promedio: Diferencia significativa frente al control \*\*P<0.01 Actividad: S= sensible halo de inhibición mayor a 30 mm; R= resistente halo de inhibición menor a 30 mm.

Figura 3  
Actividad Anti-*Helicobacter pylori* del Aceite Esencial frente al control negativo.



La tabla 4 y figura 3 muestran los halos de inhibición del Aceite Esencial sobre cepas salvajes de *Helicobacter pylori*, el diámetro es expresado en milímetros, de discos de impregnación con 10, 7.5, 5, 2.5, y 1 uL de los compuestos en estudio.

El promedio del diámetro del halo de inhibición del Aceite Esencial es de 59.8mm, siendo considerado Sensible, la actividad de este compuesto no presenta diferencia en las muestras. Pero si realizamos una comparación con el control positivo podemos indicar que el Aceite Esencial tiene mayor actividad contra la bacteria a comparación con el control positivo.

## CONCLUSIÓN

Luego de realizado el trabajo se puede indicar: Que se pudo obtener el Aceite Esencial del *Clinopodium bolivianum* (Khoa) por arrastre de vapor, para la evaluación de la actividad. Obteniendo un rendimiento de 2.76 % (p/v) del Aceite Después de un análisis estadístico con el Ácido Ursólico, podemos concluir que el Ácido Ursólico presenta actividad anti-*Helicobacter pylori*. Se determinó que los aceites esenciales (monoterpenoides) del *Clinopodium bolivianum* tiene actividad anti-*Helicobacter pylori* con una inhibición completa hasta el volumen de 1 uL por disco. Después de un análisis estadístico con el Ácido Ursólico podemos concluir que el Ácido Ursólico presenta actividad anti-*Helicobacter pylori*.

## AGRADECIMIENTO

Al INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN FARMACO BIOQUIMICA DE LA FCFB-UMSA por todo el apoyo brindado.

## REFERENCIAS

- Bilbao, P. (2006). Estudio de la Infección por *Helicobacter pylori* y Evaluación de los Métodos de Diagnóstico Laboratorial, en Pacientes que Acuden a Consultas de Gastroenterología en la Clínica "Caja Petrolera de Salud" y el Hospital "Arco Iris" de Junio 2005 a Abril 2006 en la Ciudad de La Paz - Bolivia, Tesis de Grado, FCFB-INLASA, La Paz - Bolivia.
- Ludmila, B., (1999). Evaluación comparativa de dos tipos de pruebas de metronidazol susceptibilidad de *Helicobacter pylori* en la práctica habitual. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 35:33-36.
- Claros, M., Bilbao, P., Damiani, E., Gonzales, E., Estensoro, M., Alvarez, M., (2007). Actividad anti-*Helicobacter pylori* de *Plantago major*, *Clinopodium bolivianum*, *Caléndula officinalis* y *Piper angustifolium* por el método de difusión de disco. *BIOFARBO*. 15:1
- Figueroa N., (1997). Determinación de la Actividad Antibacteriana de los Aceites Esenciales de Plantas Medicinales de la Herbolaria Boliviana, Tesis de Grado, UMSA-FCFB-IIFB. La Paz - Bolivia.
- Francesco, V., Giorgio F., Hassan C., et.al. Worldwide. (2010). H. pylori antibiotic resistance: a systematic susceptibilidad de *helicobacter pylori* a levofloxacino. *Journal of Gastrointestinal and Liver Disease*. 19(4): 409-414.
- Gisbert, JP, (2011). Rescue therapy after *Helicobacter pylori* eradication failure. *Gastroenterología y Hepatología*. 34(2): 89-99.
- Lewis, D.A., Hanson, P.J. (1991). Anti-Ulcer drugs of plant origin. In: *Progress in Medicinal Chemistry*. Rev. Elsevier 28:201-231.
- Mamani, B., (2011). Hemisíntesis del compuesto mayoritario de la Satureja boliviana (KHOA) y evolución preliminar de la actividad antiinflamatoria, Tesis de Grado, UMSA-FCPN-IIPN. La Paz - Bolivia.
- Quisbert, M., (2009). Evaluación de la actividad anti-*Helicobacter pylori* del *Clinopodium bolivianum* (Khoa) y *Piper elongatum* (Matico) mediante la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) por dilución en agar. Tesis de Grado, UMSA-FCFB-IIFB, La Paz - Bolivia.
- Ramirez, P., Mercado, M., Trespalcios, A., Avila, J., Otero, W. (2012). Estado actual de la resistencia de *Helicobacter pylori* a tetraciclina: revisión sistemática de la literatura.
- Vu, C., NG, Y., (2000). Prevalence of *Helicobacter pylori* in peptic ulcer disease in a Singapore hospital. *Singapore Med. J.*, 41, 478-481.
- Yakoob, J., Rasool, S., Abbas, Z., Jafri, W., Abid, S., Islam, M., Ahmad, Z., (2008). Gastric juice for the diagnosis of H pylori infection in patients on proton pump inhibitors. *World J Gastroenterol*. Mar 14; 14(10):1539-43.