

Tamizaje de la actividad antibacteriana de 34 especies de plantas de la ecorregión cafetera colombiana

Screening of antibacterial activity of 34 species of plants from the colombian coffee-growing eco-region

Screening da atividade antibacteriana de 34 espécies de plantas da ecoregião cafeeira colombiana

. . .

Aura M. Blandón O.¹, Luana L. Santos P.², Aldenir Feitosa dos Santos³
Antônio E. Goulart S.³, Oscar M. Mosquera M.^{1*}

Recibido: Noviembre de 2013. Aceptado: Marzo de 2014

Citación Vancouver: Blandón A.M., Santos L.L., Feitosa A., Goulart A.E., Mosquera O.M. Tamizaje de la actividad antibacteriana de 34 extractos de plantas de la ecoregión cafetera colombiana. Salud Soc. Uptc. 2014;1(1): pp. 6-11.

Resumen

Introducción: En los últimos años la resistencia bacteriana ha aumentado considerablemente en todo el mundo, por lo que la búsqueda de nuevos compuestos antimicrobianos se ha convertido en uno de los principales temas de investigación para la farmacología, la medicina, y la química, entre otras. **Objetivo:** Realizar el tamizaje de la actividad antibacteriana in vitro de 34 extractos metanólicos de plantas de las familias *Euphorbiaceae*, *Piperaceae* y *Solanaceae*. **Materiales y métodos:** Las plantas fueron recolectadas de diferentes reservas naturales de los departamentos de Risaralda, Caldas y Quindío (Colombia). Los extractos se obtuvieron mediante maceración en frío con metanol al 99,5% y fueron evaluados a una concentración de 1 mg/mL contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii*. La reacción colorimétrica del MTT se usó como indicador de metabolismo. **Resultados:** 18 extractos (53%) fueron activos contra al menos una de las bacterias de ensayo. Las especies *Solanum sp.* y *Piper pesaresanum* presentaron actividad contra *S. aureus*

ATCC 25923, *S. aureus* (aislado clínico multiresistente), *E. coli* ATCC 25922 y un aislado clínico multiresistente de *A. baumannii*. **Conclusión:** Las especies *Solanum sp.* y *Piper pesaresanum* se vislumbran como una importante fuente de productos naturales con acción antibacteriana.

Palabras clave: *Etnofarmacología*, *Euphorbiaceae*, *Farmacoresistencia bacteriana*, *Piperaceae*, *Solanaceae*. (Fuente: DeCS)

Abstract

Introduction: In the last years the bacterial drug resistance has been increasing considerably around the world, so the search of new antimicrobial compounds has been recognized as one of the main subjects of investigation in pharmacology, medicine, and chemistry, among others. **Objective:** To perform the screening of antibacterial activity in vitro of 34 methanolic plant extracts of *Euphorbiaceae*, *Piperaceae* and *Solanaceae* families. **Materials and Methods:** Plants were collected from different natural reserves of Risaralda, Caldas and Quindío

1 Universidad Tecnológica de Pereira. (Pereira, Colombia)

2 Centro de Estudos Superiores de Maceió. (Maceió, Brasil)

3 Universidad Federal de Alagoas. (Maceió, Brasil).

* Autor para correspondencia: omosquer@utp.edu.co

(Colombia). Extracts were obtained by cold maceration with 99.5% methanol and were examined at a concentration of 1 mg/mL against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. MTT colorimetric reaction was used as an indicator of metabolism. **Results:** 18 extracts (53%) were active against at least one of test bacteria, *Solanum sp.* and *Piper pesaresanum* showed activity against *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* (multiresistant clinical isolated), *E. coli* ATCC 25922 and *A. baumannii* (multiresistant clinical isolated), **Conclusion:** *Solanum sp.* and *Piper pesaresanum* are seen as an important source of natural products with antibacterial action.

Keywords: *Ethnopharmacology, Euphorbiaceae, Bacterial drug resistance, Piperaceae, Solanaceae.* (Source: DeCS)

Resumo

Introdução: Nos últimos anos a resistência bacteriana tem aumentado consideravelmente em todo o mundo, assim a busca de novos compostos antimicrobianos torna-se um dos principais temas de investigação para a farmacologia, medicina, química entre outras. **Objetivo:** Realizar o screening da atividade antibacteriana in vitro de trinta e quatro extratos metanólicos de plantas das famílias *Euphorbiaceae*, *Piperaceae* e *Solanaceae*. **Materiais e métodos:** As plantas foram coletadas em diferentes reservas naturais dos departamentos de Risaralda, Caldas e Quindío (Colômbia). Os extratos foram obtidos por maceração à frio em metanol 99,5% e foram avaliados na concentração de 1 mg/mL contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii*. A reação colorimétrica do MTT foi usada como indicador de metabolismo. **Resultados:** Dezoito extratos (53%) foram ativos pelo menos contra uma das bactérias do ensaio. As espécies *Solanum sp.* e *Piper pesaresanum* apresentaram atividade contra *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* (isolado clínico multirresistente), *E. coli* ATCC 25922 e um isolado clínico multirresistente de *A. baumannii*. **Conclusão:** As espécies *Solanum sp.* e *Piper pesaresanum* estão emergindo como uma importante fonte de produtos naturais com atividade antibacteriana.

Palavras chave: *Etnofarmacologia, Euphorbiaceae, Farmacorresistência Bacteriana, Piperaceae, Solanaceae.* (Fonte: DeCS)

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades infecciosas constituyen la primera causa de muerte en el mundo, en estas constantemente se producen cambios que justifican su importancia e interés. Entre estos cambios se incluyen el mayor número de personas susceptibles a adquirir infecciones, el aumento de la infección nosocomial y el desarrollo de

mecanismos de resistencia bacteriana que anulan la acción de los antimicrobianos habitualmente empleados para el tratamiento de las infecciones (1). La resistencia bacteriana consiste en la disminución o ausencia de sensibilidad de una cepa bacteriana a un antibiótico determinado (2). El desarrollo de resistencia a los antimicrobianos en las bacterias causantes de infecciones es un tema de gran importancia por varias razones, incluyendo la dificultad de su tratamiento, el aumento del coste sanitario y, en algunos tipos de infecciones, el aumento de la mortalidad (3). A nivel mundial, la resistencia bacteriana se ha incrementado dramáticamente en los últimos años, por lo que actualmente es un reto importante la búsqueda de nuevos productos con capacidad antibiótica frente a microorganismos multirresistentes.

Las plantas se vislumbran como una fuente potencial de antibacterianos debido a su capacidad para producir compuestos que confieren una defensa antimicrobiana contra los microorganismos en su propio ecosistema (4). Metabolitos secundarios obtenidos de plantas y extractos de éstas, evaluados por su actividad antibacteriana, han mostrado importantes resultados en la búsqueda de nuevos agentes antimicrobianos (5-9).

Colombia tiene una extensión territorial equivalente al 0,77% de la superficie del planeta y concentra aproximadamente el 10% de la biomasa animal y vegetal de la tierra. Cuenta con 55.000 especies de plantas, de las cuales la tercera parte son endémicas (10). La ecorregión cafetera colombiana alberga alrededor de 1.262 especies, lo cual hace que tenga un amplio potencial como fuente de nuevos principios activos que pueden ser usados como alternativa terapéutica (11).

En la búsqueda de especies vegetales con bioactividad, el presente estudio estuvo orientado a evaluar la actividad antimicrobiana de 34 extractos metanólicos de especies vegetales de la ecorregión cafetera colombiana contra cepas bacterianas de importancia clínica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolección del material vegetal

La parte aérea de las plantas fue recolectada en diferentes reservas naturales de los departamentos de: Risaralda, Caldas y Quindío. En Risaralda (Parque Regional Natural Ucumari, Alto El Nudo, La Nona y La Marcada), en Caldas (Parque Los Yarumos), y en Quindío (Zona de reserva Bremen-La Popa). Los ejemplares recolectados fueron clasificados por el taxónomo Francisco Javier Roldan del Herbario de la Universidad de Antioquia, donde reposa un voucher de cada una, según codificación presentada en la tabla 1.

Tabla 1. Especies vegetales empleadas en el tamizaje de actividad antibacteriana.

Familia	Especie	FJR	Familia	Especie	FJR
Euphorbiaceae	<i>Acalypha macrostachya</i>	4050	Solanaceae	<i>Solanum acerifolium</i>	3961
	<i>Alchornea</i> sp.	3982		<i>Solanum cf umbellatum</i>	3962
	<i>Alchornea grandis</i>	4056		<i>Dunalia solanacea</i>	3992
	<i>Acalypha diversifolia</i>	3967		<i>Solanum ovalifolium</i>	4027
	<i>Alchornea calophylla</i>	3969		<i>Cestrum</i> sp.	3978
	<i>Hyeronima antioquiensis</i>	3905		<i>Browallia speciosa</i>	4025
	<i>Mabea montana</i>	3912		<i>Deprea aff sachapapa</i>	4024
	<i>Hyeronima</i> sp.	3971		<i>Solanum brevifolium</i>	4028
Piperaceae	<i>Piper pesaresanum</i>	3996		<i>Solanum</i> sp	3970
	<i>Piper daniel-gonzalezii</i>	4051		<i>Witheringia coccoloboides</i>	4019
	<i>Piper glanduligerum</i>	4026		<i>Solanum trachycyphum</i>	4042
	<i>Piper crassinervium</i>	4021		<i>Solanum</i> sp.	4010
	<i>Piper umbellatum</i>	4012		<i>Solandra coriacea</i>	4013
	<i>Piper crassinervium</i>	4030		<i>Cestrum humboldtii</i>	4022
	<i>Peperomia acuminata</i>	4002		<i>Solanum lepidotum</i>	3975
	<i>Piper eriopodon</i>	4007		<i>Lycianthes radiata</i>	3993
<i>Piper calceolarium</i>	4048	<i>Solanum</i> sp.	4043		

FJR: Herbario Universidad de Antioquia. (Francisco Javier Roldán)

Preparación de los extractos

La parte aérea de las plantas se secó en horno a 50°C, se pulverizó y se realizó extracción mediante maceración en frío con metanol al 99,5%. Los extractos se obtuvieron mediante evaporación del solvente y fueron mantenidos en refrigeración hasta su utilización. Para los bioensayos, los extractos de las plantas fueron disueltos hasta una concentración de 2 mg/mL en dimetilsulfóxido (DMSO).

Evaluación de la actividad antibacteriana

La evaluación de la actividad antibacteriana de los extractos se realizó en microplacas de 96 pozos, siguiendo el procedimiento propuesto por Ferreira de Lima y colaboradores

(12) con algunas modificaciones como se describe a continuación: se colocaron 100 µL de la solución del extracto a cada pozo conteniendo 100 µL de caldo Mueller-Hinton (Sigma-Aldrich), se adicionaron 10 µL del inóculo bacteriano (1x10⁶ UFC/mL). El antibiótico cloranfenicol 50 µg/mL fue empleado como control positivo y como control negativo el DMSO al 1%, se colocaron además un control de crecimiento y un control de esterilidad. Cada extracto se evaluó por triplicado a una concentración de 1 mg/mL frente a cada bacteria. En la tabla 2 se presentan las cepas bacterianas de referencia y los aislados clínicos obtenidos del laboratorio de microbiología del Centro de Patología y Medicina de Laboratorio (CPML) de la Universidad Estadual de Ciencias de la Salud de Alagoas (UNCISAL).

Tabla 2. Cepas bacterianas en estudio.

Nombre	Cepa ATCC	Aislado clínico	Identificación
<i>Staphylococcus aureus</i>	X		ATCC 25923
		X	IC262
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	X		ATCC 27853
		X	IC148
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	X		ATCC BAA 1705
<i>Escherichia coli</i>	X		ATCC 25922
<i>Acinetobacter baumannii</i>		X	IC89

Después de incubar las microplacas por 20 horas a 37°C, se adicionaron a cada pozo 10 µL de una solución de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) de concentración 1 mg/mL, y se dejó en incubadora a 37°C por 30 minutos. La presencia de coloración violeta es indicativo de actividad metabólica (crecimiento bacteriano) y el no viraje de color del reactivo revela lo contrario.

RESULTADOS

Para la familia *Solanaceae*, fueron evaluados 17 extractos, de los cuales tres fueron activos contra al menos una de las

bacterias estudiadas, mientras que para la familia *Piperaceae*, ocho de nueve extractos evaluados presentaron actividad antibacteriana, por último, en la familia *Euphorbiaceae* de ocho extractos estudiados siete fueron activos contra al menos una bacteria.

Los resultados presentados en la tabla 3, se obtuvieron calificando los extractos como activos (+) si después de 24 horas de incubación, no se detectó crecimiento bacteriano y como inactivo (-) cuando el crecimiento bacteriano fue evidente por el no viraje del reactivo revelador. Las especies vegetales que no se muestran en la tabla 3 no presentaron actividad frente a ninguna de las bacterias de este estudio.

Tabla 3. Actividad antibacteriana de extractos metanólicos de plantas de la ecorregión cafetera colombiana.

Familia/Especie	Especie bacteriana					
	<i>S.a.</i>	<i>K.p.</i>	<i>E.c.</i>	<i>Pa.</i> <i>IC148</i>	<i>A.b.</i> <i>IC89</i>	<i>S.a.</i> <i>IC262</i>
Euphorbiaceae						
<i>A. diversifolia</i>	+	-	-	-	+	+
<i>Alchornea sp</i>	-	-	-	-	-	+
<i>A. grandis</i>	+	-	-	-	-	+
<i>A. calophylla</i>	+	-	-	-	-	+
<i>Hyeronima sp</i>	-	-	-	-	-	+
<i>H. antioquiensis</i>	-	-	-	-	-	+
<i>Mabea montana</i>	-	-	-	-	-	+
Piperaceae						
<i>P. pesaresanum</i>	+	-	+	-	+	+
<i>P. glanduligerum</i>	-	-	-	-	-	+
<i>P. umbellatum</i>	-	-	-	-	-	+
<i>P. crassinervium (FJR 4030)</i>	+	-	-	+	-	+
<i>P. crassinervium (FJR 4021)</i>	+	+	-	+	+	+
<i>P. eriopodon</i>	+	-	-	-	-	-
<i>P. calceolarium</i>	+	-	-	+	-	+
<i>Peperomia acuminata</i>	+	-	-	-	-	-
Solanaceae						
<i>Solanum sp (FJR 4010)</i>	+	+	+	-	+	+
<i>S. ovalifolium</i>	-	-	-	+	-	+
<i>S. trachycyphum</i>	+	-	-	-	-	+

S.a.: *Staphylococcus aureus*, **K.p.:** *Klebsiella pneumoniae*, **E.c.:** *Escherichia coli*, **A.b.:** *Acinetobacter baumannii*. (-) Inactivo, (+) Activo.

Ninguno de los extractos evaluados en este trabajo presentó actividad frente a *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, no obstante los extractos de *A. diversifolia*, *A. grandis*, *A. calophylla*, *P. pesaresanum*, *P. crassinervium*, *P. eriopodon*, *P. calceolarium*, *Peperomia acuminata*, *Solanum* sp. y *S. trachycyphum* inhibieron el crecimiento de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Frente a *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA1705 los extractos de *Piper crassinervium* y *Solanum* sp. mostraron actividad, al igual que los de *Piper pesaresanum* y *Solanum* sp. frente a *Escherichia coli* ATCC 25922.

Los extractos que mostraron actividad frente a las bacterias gramnegativas aisladas clínicamente fueron los de *A. diversifolia*, *P. pesaresanum*, *P. crassinervium*, *P. calceolarium*, *Solanum* sp y *S. ovalifolium*. En relación a *Staphylococcus aureus* IC262 un total de 16 extractos reportaron actividad.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

De acuerdo con Fabry y Okemo (13) para que extractos crudos de plantas sean considerados como candidatos potenciales para la investigación de metabolitos con efecto antimicrobiano, el valor de la concentración mínima inhibitoria debe ser menor a 8 mg/mL, por su parte Ríos y Recio (14) sugieren que para extractos vegetales se evite evaluar la actividad antimicrobiana a una concentración superior a 1 mg/mL.

La concentración a la que fueron evaluados los extractos metanólicos de *Solanum* sp. y *Piper pesaresanum*, los cuales inhibieron el crecimiento de las cepas de referencia de *S. aureus* y *E. coli*, así como a los aislados clínicos de *A. baumannii* y *S. aureus*, fue de 1 mg/mL, lo anterior podría calificar estos extractos como promisorios para investigar a fondo su actividad antibacteriana. Debe tenerse en cuenta que no se realizó dilución alguna a los extractos, por lo que la concentración mínima inhibitoria (CMI) puede ser menor a 1 mg/mL.

Las siete especies de la familia Euphorbiaceae estudiadas presentaron actividad frente al aislado clínico de *S. aureus*; con respecto a lo anterior diversos autores han reportado que especies de esta familia poseen actividad contra esta bacteria; es el caso de *Acalypha monostachya* (15), *Croton draco* (16), *Croton lechleri*, *Hura crepitans* (17) y *Alchornea cordifolia* (18).

Otras especies vegetales colombianas de la familia Piperaceae también han presentado actividad antibacteriana frente a *S. aureus* ATCC 25923, este es el caso de *P. tricuspe*, *P. sanctifelicis*, *P. aff arboreum*, *P. gorgonillense*, *P. multipinervium* y *P. peltatum* (19). También han presentado actividad *P. lancifolium* y *Solanum* sp, extractos que fueron activos a una concentración de 100 mg/mL frente a *S.*

aureus sensible a la meticilina (20). Estos resultados se encuentran en consonancia con lo obtenido en este estudio, puesto que especies de la familia Piperaceae mostraron importante actividad contra esta bacteria grampositiva. Diversos estudios han sugerido que flavonoides presentes en las especies de esta familia son los responsables de dicha actividad (21).

La actividad presentada por los extractos de *Piper crassinervium* y *Solanum* sp. frente a *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA1705 representan un resultado interesante dado que esta cepa presenta un mecanismo de resistencia a los antibióticos por la capacidad de producir carbapenemasas, enzimas capaces de hidrolizar los antimicrobianos de la familia de los carbapenémicos.

Con respecto a *Escherichia coli* ATCC 25922, los extractos de *Piper pesaresanum* y *Solanum* sp. fueron activos. Para la familia Piperaceae otros autores han demostrado que los extractos de *Piper aff arboreum*, *Piper gorgonillense*, *Piper tricuspe*, *Piper amalago* y *Piper auritum* presentan actividad contra esta misma bacteria (19), como también los extractos de *Solanum americanum* Mill. y *Solanum nigrum*, especies pertenecientes a la familia Solanaceae (17).

En consonancia con los resultados presentados por Silva y colaboradores, el extracto de *Piper umbellatum* es inactivo frente a *E. coli* y *P. aeruginosa*, pero presenta actividad contra *S. aureus* a altas concentraciones, según los autores su modo de acción parece estar asociado con cambios en la permeabilidad de las membrana bacteriana (22).

En el caso de *Acinetobacter baumannii* IC89, aislado clínico que presenta resistencia a β -lactámicos, quinolonas y aminoglucósidos, los extractos que presentaron actividad fueron los de *Piper crassinervium* y *Acalypha diversifolia*. Otros estudios han demostrado que las especies *Bridelia micantha* y *Mallotus oppositifolius* (Euphorbiaceae) presentan actividad contra cepas multirresistentes de esta misma bacteria (23).

En conclusión, de los 34 extractos metanólicos evaluados, 18 (53%) presentaron actividad contra al menos una de las bacterias usadas en el estudio, y particularmente 16 (47%) inhibieron el crecimiento de al menos una de las bacterias multirresistentes.

Los extractos que mostraron el más amplio espectro de actividad fueron los de las especies *Solanum* sp. y *Piper pesaresanum* al presentar actividad contra *Staphylococcus aureus* ATCC25923 y un aislado clínico multirresistente de esta bacteria, *Escherichia coli* ATCC 25922 y un aislado clínico multirresistente de *Acinetobacter baumannii*, lo que hace a estas dos especies especialmente interesantes para profundizar en la investigación de la actividad antibacteriana. Futuros estudios son requeridos para aislar e identificar los metabolitos secundarios responsables de la actividad biológica demostrada y la presencia o ausencia de

sinergismo entre los compuestos químicos presentes en las especies vegetales que exhibieron actividad; no sin antes realizar diluciones sucesivas a los extractos que presentaron actividad.

AGRADECIMIENTOS

Al grupo de investigación en biotecnología y productos naturales de la Universidad Tecnológica de Pereira. Al

laboratorio de Investigación en recursos naturales (LPqRN) de la Universidad Federal de Alagoas. Al Centro de Patología y Medicina Laboratorial (CPML) de la Universidad de Ciencias de la Salud de Alagoas.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran no tener conflictos de intereses.

BIBLIOGRAFÍA

- Ausina V y Moreno S. Tratado SEIMC de enfermedades infecciosas y microbiología clínica. Buenos Aires, Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2006.
- Mirelis B y Gurgui M. Medicamentos antibacterianos. En: Ausina V y Moreno S. Tratado SEIMC de Enfermedades Infecciones y Microbiología Clínica. Buenos Aires, Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2006. p. 97-116.
- Martín R y Pachón J. Características generales de las infecciones bacterianas. En: Ausina V y Moreno S. Tratado SEIMC de Enfermedades Infecciones y Microbiología. Buenos Aires; Madrid, Editorial Médica Panamericana; 2006. p. 247-252.
- Theuretzbacher U. Global antibacterial resistance: The never-ending story. *J Glob Antimicrob Resist*. 2013; 1(2):63-69.
- Adetutu A, Morgan W, Corcoran O. Antibacterial, antioxidant and fibroblast growth stimulation activity of crude extracts of *Bridelia ferruginea* leaf, a wound-healing plant of Nigeria. *J Ethno-pharma*. 2011; 133(1):116-119.
- Bhattacharjee I, Catterjee SK, Gosh A, Chandra G. Antibacterial activities of some plant extracts used in Indian traditional folk medicine. *Asian Pac Jou Trop Biomed*. 2011; 1(2): S165-S169.
- Careaga M, Fernández E, Dorantes L, Mota L, Jaramillo ME. Antibacterial activity of *Capsicum* extract against *Salmonella typhimurium* and *Pseudomonas aeruginosa* inoculated in raw beef meat. *Int J Food Microbiol*. 2003; 83(3): 331-335.
- Kloucek P, Polesnya Z, Svobodová B, Vlková E, Kokoska L. Antibacterial screening of some Peruvian medicinal plants used in Calleria District. *Jou Ethno-pharma*. 2005; 99(2):309-312.
- Yasunaka K, Abe F, Nagayama A, Okabe H, Lozada L, López E. Antibacterial activity of crude extracts from Mexican medicinal plants and purified coumarins and xanthones. *Jou Ethno-pharma*. 2005; 97(2): 293-299.
- Ministerio del Medio Ambiente. Política nacional de biodiversidad Colombia: Ministerio del medio ambiente. Departamento nacional de planeación. Instituto "Alexander Von Humboldt"; 1996.
- Fonnegra R, Jiménez SL. Plantas medicinales aprobadas en Colombia. 2 ed. Medellín: Editorial Universidad de Antioquia; 2007.
- Ferreira MR, Azevedo E, Luna JS, Goulart AE. The antibiotic activity of some Brazilian medicinal plants. *Jou Ethno-pharma*. 2006; 105(1-2): 137-47.
- Fabry W, Okemo PO, Ansorg R. Antibacterial activity of East African medicinal plants. *Jou Ethno-pharma*. 1998; 60: 79-84.
- Ríos JL, Recio MC. Medicinal plants and antimicrobial activity. *Jou Ethno-pharma*. 2005; 100(1-2):80-84.
- Macías KL, Juárez BI, Cárdenas NC, Aguirre JR, Jasso P. Evaluación de plantas tradicionalmente utilizadas en la desinfección de heridas. *Rev Mex Cienc Farm*. 2009; 40(2):5-10.
- Yasunaka K, Abe F, Nagayama A, Okabe H, Lozada L, López E, Muñoz EE. Antibacterial activity of crude extracts from Mexican medicinal plants and purified coumarins and xanthones. *J Ethno-pharma*. 2005;97(2):293-9.
- Bussmann RW, Malca G, Glenn A, Sharon D, Chait G, Díaz D. Minimum inhibitory concentrations of medicinal plants used in Northern Peru as antibacterial remedies. *Jou Ethno-pharma*. 2010;132(1):101-108.
- Pesewu G, Cutler R, Humber D. Antibacterial activity of plants used in traditional medicines of Ghana with particular reference to MRSA. *J Ethnopharmacol*. 2008;116(1):102-111.
- Pino N, Stashenko EE. Validación antibiótica de plantas medicinales del noroeste de Colombia contra *Staphylococcus aureus*. *Blacpma* 2009;8(2):145-150.
- Lopez A, Hudson JB, Towers GH. Antiviral and antimicrobial activities of Colombian medicinal plants. *Jou Ethno-pharma*. 2001;77(2-3):189-96.
- Cushnie TP, Lamb AJ. Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. *Int Jou Antimicrob Ag*. 2011;38:99-107.
- Ibere JR, Godinho R, Mendez I, Da Costa T, Dinizeti S, De Oliveira DT. Evaluation of acute toxicity, antibacterial activity, and mode of action of the hydroethanolic extract of *Piper umbellatum*. *Jou Ethno-pharma*. 2014;151:137-143.
- Gangoué-Piéboji J, Eze N, Ngongang A, Ngameni B, Tsabang N, Pegnyemb DE. The in-vitro antimicrobial activity of some traditionally used medicinal plants against beta-lactam-resistant bacteria. *Jou Infect Dis Ctries*. 2009;3(9):671-680.