

# Tamizaje de acción antimicrobiana de 34 extractos vegetales contra bacilos gramnegativos

## Antimicrobial activity screening of 34 plant extracts against gram-negative bacilli

### Screening para atividade antimicrobiana de 34 extratos vegetais contra bacilos gram-negativos

...

Angélica Vallejo G.<sup>1\*</sup>, Aldenir Feitosa<sup>2</sup>, Antonio E. Gourlart S<sup>2</sup>, Luana L. Pires<sup>3</sup>, Oscar M. Mosquera M<sup>1</sup>.

Recibido: Julio de 2014. Aceptado: Noviembre de 2014

**Citación Vancouver:** Vallejo A, Feitosa A, Gourlart AE, Pires LL, Mosquera OM. Tamizaje de acción antimicrobiana de 34 extractos vegetales contra bacilos gramnegativos. Salud Soc Uptc. 2014;1(1):34-39

## Resumen

**Introducción:** El hombre a través de los años ha utilizado el potencial biológico de las plantas con el fin de aliviar los dolores y enfermedades que lo han afectado, no obstante, a pesar del gran avance alcanzado en la medicina y la síntesis de nuevos compuestos, las plantas siguen siendo la principal fuente de moléculas con efecto terapéuticos conocida por la humanidad. **Objetivo:** Realizar el tamizaje del efecto antimicrobiano de 34 extractos diclorometánicos provenientes de las familias botánicas Euphorbiaceae, Piperaceae y Solanaceae. **Metodología:** Los extractos provenientes de las partes aéreas de las 34 especies de plantas, se obtuvieron por el método de lixiviación a temperatura ambiente con diclorometano. La realización del tamizaje se llevó a cabo a través del método de microdilución en placa, contra *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603. Además se determinaron los principales núcleos fitoquímicos de cada uno de los extractos. **Resultados:** Se observó un gran potencial biológico de la familia Euphorbiaceae, seguida por la familia Solanaceae y Piperaceae. Los extractos que tuvieron una actividad antimicrobiana promisoría fueron los de *Alchornea* spp, *Alchornea grandis*, *Acalypha diversifolia* y *Malbea montana* pertenecientes a la familia Euphorbiaceae. En

el caso de la familia Solanaceae se encuentran *Lycianthes radiata*, *Solanum ovalifolium* y *Browallia speciosa*. Para los extractos de la familia Piperaceae, el más representativo fue el de *Piper crassinervium*. **Conclusión:** A partir de los resultados obtenidos, se observa un gran potencial bactericida entre las especies evaluadas, mostrando así la posibilidad de encontrar un antimicrobiano de origen natural.

**Palabras clave:** Euphorbiaceae, Piperaceae, Solanaceae, Extractos vegetales, Farmacorresistencia Microbiana. (Fuente: DeCS).

## Abstract

**Introduction:** Human being through of the years has used biological potential of plants to relive pain and diseases that have affected him. However, despite the great progress achieved in medicine and synthesis of new compounds, plants remain the main sources of molecules with therapeutic effect known to mankind. **Objective:** Perform screening antimicrobial effect of 34 dichloromethane extract from botanical families Euphorbiaceae, Piperaceae and Solanaceae. **Methodology:** The extracts from the aerial parts of 34 plant

1. Grupo de Biotecnología-Productos Naturales, Universidad Tecnológica de Pereira. (Pereira, Colombia).

2. Laboratório de Pesquisa em Recursos Naturais (LPqRN). Universidade Federal de Alagoas. (Maceió, Brasil).

3. Centro de Patologia e Medicina Laboratorial. Universidade Estadual de Ciências da Saúde de Alagoas. (Maceió, Brasil).

\*E-mail para correspondencia: anvallejo@utp.edu.co

species, were obtained by lixiviation method at room temperature, with dichloromethane. Performance of screening against *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, was conducted through of microdilution method in 96-well plates. Determination of main phytochemicals nucleus of each one of the extracts also was carrying out. **Results:** Was observed a great biological potential from Euphorbiaceae family, followed by Solanaceae and Piperaceae families. Extracts with a promising antimicrobial activity were *Alchornea* spp, *Alchornea grandis*, *Acalypha diversifolia* y *Malbea Montana* extracts, which belonging to Euphorbiaceae family. In Solanaceae family were found *Lycianthes radiata*, *Solanum ovalifolium* and *Browallia speciosa*. From Piperaceae family, *Piper crassinervium* extract was the most active. **Conclusion:** Starting from results, great bactericidal potential was observed among tested species, demonstrating a possibility to find a natural antimicrobial.

**Key Words:** Euphorbiaceae, Piperaceae, Solanaceae, Plant Extracts, Drug Resistance, Microbial. (Source: DeCS).

## Resumo

**Introdução:** O Homem através dos anos tem utilizado o potencial biológico das plantas com o fim de aliviar os dores e as doenças que o têm afetado, não obstante, apesar do grande progresso alcançado na medicina e na síntese dos novos compostos, as plantas seguem sendo a fonte principal de moléculas com maiores efeitos terapêuticos conhecidos pela humanidade. **Objetivo:** Realizar o screening do efeito antimicrobiano dos 34 extratos diclorometânicos das famílias de plantas Euphorbiaceae, Piperaceae y Solanaceae. **Metodologia:** Os extratos das partes aéreas de 34 espécies de plantas foram obtidos pelo método de lixiviação à temperatura ambiente, três vezes com diclorometano. A realização do screening foi levado a cabo através do método de microdiluição em placas de 96 poços, contra *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603. Além disso, foram determinados os principais núcleos fitoquímicos de cada um dos extratos. **Resultado:** Foi observado o grande potencial biológico pela família Euphorbiaceae, seguido pelas famílias Solanaceae y Piperaceae. Os extratos que tiveram uma atividade antimicrobiana promissora foram *Alchornea* spp, *Alchornea grandis*, *Acalypha diversifolia* y *Malbea montana* pertenente à Euphorbiaceae, no caso das Solanaceae encontra-se *Lycianthes radiata*, *Solanum ovalifolium* y *Browallia speciosa*. Para as Piperaceae o extrato mais representativo foi para *Piper crassinervium*. **Conclusão:** A partir dos resultados obtidos, se observa um grande potencial bactericida entre as espécies avaliadas. Mostrando assim a possibilidade para encontrar um antibiótico de origem natural.

**Palavras chave:** Euphorbiaceae, Piperaceae, Solanaceae, Extractos vegetales, Resistência Microbiana a Medicamentos. (Fonte: DeCS).

## INTRODUCCIÓN

La resistencia bacteriana es un fenómeno creciente, caracterizado por una refractariedad parcial o total de los microorganismos al efecto del antibiótico, generado principalmente por el uso indiscriminado e irracional de estos, lo que trae consigo implicaciones sociales y económicas enormes, dadas por el incremento de la morbi-mortalidad, el aumento de los costos en los tratamientos y las largas estancias hospitalarias (2).

En los últimos años, el incremento de bacterias resistentes y la rápida emergencia de nuevas infecciones han disminuido la intensidad en la eficacia de los antibióticos para tratar patologías causadas por ciertos microorganismos. Esta situación aumenta la urgente necesidad para el desarrollo de nuevos agentes antibacterianos. (3).

Diversas estrategias se han sugerido para tratar de minimizar este tipo de amenaza; una de ellas es la necesidad de hallar nuevos antibióticos. En respuesta a estas necesidades se ha recurrido a la fitoquímica y a la fitofarmacología, logrando encontrar nuevas moléculas extraídas de plantas (4, 5).

Así, se acepta que a pesar del avance alcanzado por la síntesis química, las plantas son una valiosa fuente de sustancias activas con propiedades antibacterianas (6).

Según la premisa de que las plantas producen más de 100.000 metabolitos secundarios, muchos de los cuales pueden ser antibacterianos, y a que en los últimos años se ha ido desarrollando un creciente interés en varios centros de investigación de todo el mundo con respecto a la búsqueda de efectos antibacterianos de especies vegetales (7), el objetivo del presente trabajo fue realizar el tamizaje del efecto antimicrobiano de 34 extractos vegetales diclorometánicos provenientes de las familias botánicas Euphorbiaceae, Piperaceae y Solanaceae.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Obtención de los extractos.** Las plantas evaluadas fueron recolectadas en los sitios de reserva ubicados en Colombia, específicamente en Pereira, en el Parque Regional Natural Ucumari [4°43'22.0"N y 75°33'90"W], Alto del Nudo [4°52'35.4"N y 75°42'53.5"W], La Nona y La Marcada [4°53'53.1"N y 75°43'21.9"W]. En Manizales, en el Parque Los Yarumos [5°04'23.9"N y 75°29'11.7"W] y en Filandia en la Zona de Reserva Bremen - La Popa [4°40'40.0"N y 75°37'15"W]. El material recolectado fue identificado taxonómicamente por el doctor F. J. Roldán, además el voucher de cada planta fue registrado en el Herbario de la Universidad de Antioquia. El material aéreo de las plantas recolectadas se llevó hasta sequedad en estufa a 50°C durante 48 horas, luego estos fueron molidos y extraídos por lixivación a temperatura ambiente, tres veces con diclorometano. Los extractos obtenidos fueron concentrados a presión reducida hasta sequedad y almacenados a 5°C (8). La lista de extrac-

tos clasificados por familia y especie, obtenidos al aplicar esta técnica se muestran en la tabla 1.

**Tabla 1. Extractos diclorometánicos obtenidos por el método de lixiviación.**

Familia	Especie	Nº UTP
Solanaceae	<i>Solanum acerifolium</i>	120
	<i>Solanum (trachycyphum) cf umbellatum</i>	121
	<i>Dunalia solanácea</i>	145
	<i>Solanum ovalifolium</i>	173
	<i>Cestrum sp</i>	137
	<i>Browallia speciosa</i>	171
	<i>Deprea aff sachapapa</i>	170
	<i>Solanum brevifolium</i>	174
	<i>Solanum sp</i>	129
	<i>Witheringia coccoloboides</i>	165
	<i>Solanum trachycyphum</i>	188
	<i>Solanum sp</i>	161
	<i>Solandra coriácea</i>	164
	<i>Cestrum humboldtii</i>	168
<i>Solanum lepidotum</i>	134	
<i>Lycianthes radiata</i>	146	
<i>Solanum sp</i>	189	
Piperaceae	<i>Piper pesaresanum</i>	148
	<i>Piper daniel-gonzalezii</i>	197
	<i>Piper glanduligerum</i>	172
	<i>Piper crassinervium</i>	167
	<i>Piper umbellatum</i>	163
	<i>Piper crassinervium</i>	175
	<i>Peperomia acuminata</i>	154
	<i>Piper eriopodon</i>	158
	<i>Piper calceolarium</i>	194
Euphorbiaceae	<i>Acalypha macrostachya</i>	196
	<i>Alchornea spp</i>	140
	<i>Alchornea grandis</i>	202
	<i>Acalypha diversifolia</i>	126
	<i>Alchornea calophylla</i>	128
	<i>Hyeronima antioquiensis</i>	85
	<i>Mabea montana</i>	92
<i>Hyeronima</i>	130	

**Preparación de los extractos.** Se tomaron 10 mg de cada uno de los extractos a evaluar y se realizó una posterior disolución de estos en 660 µL de metanol al 99,8 % PA, para ser completada con 1.340 µL de agua destilada con el fin de obtener una concentración de solución madre de 5 mg/mL. Luego de esto, los extractos fueron filtrados con la ayuda de filtros Millemex® GV de 0,22 µm con el fin de garantizar la esterilidad de los mismos. Posteriormente se realizó una dilución con agua destilada estéril, para obtener una solución de 3 mL a una concentración de 2 mg/mL.

**Evaluación de actividad antimicrobiana.** Se llevó a cabo por el método de dilución en placa, realizando un tamizaje de 34 extractos diclorometánicos de las familias Euphorbiaceae, Piperaceae y Solanaceae, a una concentración de 1.000 ppm. Cada cepa se homogenizó en solución de NaCl al 0,85%, hasta ser ajustadas al patrón 0,5 de la escala de McFarland (9, 10). El medio de cultivo usado para el ensayo fue el caldo Mueller Hinton (100 µL por pocillo) al cual se añadió 100 µL de extracto, cada uno por triplicado. El inóculo bacteriano usado fue de 10 µL para cada uno de los pozos. Adicionalmente a los ensayos de inhibición, se montaron controles de inhibición (cloranfenicol), de crecimiento (sin ningún aditivo), de esterilidad (solo el medio de cultivo) y del solvente (Metanol al 13,2%) (10-12). Posteriormente las placas se incubaron por 20 horas y después de dicho periodo se adicionó 10 µL de MTT (Sigma-Aldrich®) a una concentración de 0,5 mg/mL. Para la lectura de las placas se dejó incubar el revelador por 30 minutos y luego se realizó observando un viraje de color, el cual demostraba el efecto antimicrobiano del extracto si permanecía amarillo o su inocuidad para el microorganismo si viraba a color púrpura.

**Determinación de los principales núcleos fitoquímicos.** La marcha fitoquímica se desarrolló evaluando la presencia de metabolitos secundarios mediante cromatografía de capa delgada (CCD). El sistema de elusión usado para el análisis de los metabolitos secundarios en los extractos diclorometánicos fue acetato de etilo-metanol-agua (100:13,5:10). Después de la elusión de la fase móvil, la placa se secó para luego ser rociada con una solución reveladora para la identificación de los metabolitos secundarios. Los reveladores utilizados fueron el Dragendorff que confirma la presencia de alcaloides usando como control positivo la licorina y la escopolamina (5.000 ppm), el anisaldehído/CH<sub>3</sub>COOH-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> que identifica la presencia de terpenos, triterpenos y esteroides con control positivo de lanosterol, estigmasterol y diosgenina (5.000 ppm), la vainillina al 1% en EtOH-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> muestra la presencia de saponinas con un control positivo de patrón de mimakiano (5.000 ppm), el FeCl<sub>3</sub> al 5% en HCl 0,5N determina la presencia de fenoles y taninos usando como control positivo el catecol a 5.000 ppm y por último el AlCl<sub>3</sub> al 1% en etanol absoluto que identifica la presencia de flavonoides usando como control positivo el extracto de San Joaquín y de Ruda (13-15).

## RESULTADOS

Los 34 extractos vegetales pertenecientes a las familias Euphorbiaceae, Piperaceae y Solanaceae fueron probados contra 3 cepas bacterianas gramnegativas a saber: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 - productora de carbapenemasas (KPC). Los resultados obtenidos se resumen en la tabla 2.

**Tabla 2. Resultados actividad antibacteriana y marcha fitoquímica.**

Familia	Especie	N° UTP	Microorganismos <sup>a</sup>			Fitocompuestos <sup>b</sup>				
			1a	2a	3a	Ib	IIb	IIIb	IVb	Vb
Solanaceae	<i>Solanum acerifolium</i>	120	-	-	-	-	-	-	+	-
	<i>Solanum (trachycyphum) cf umbellatum</i>	121	-	-	-	+	-	-	-	-
	<i>Dunalia solanácea</i>	145	-	+	-	-	+	-	+	-
	<i>Solanum ovalifolium</i>	173	+	+	-	-	+	-	+	-
	<i>Cestrum sp</i>	137	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Browallia speciosa</i>	171	+	+	+	-	++	-	++	-
	<i>Deprea aff sachapapa</i>	170	-	+	-	-	+++	+	++	-
	<i>Solanum brevifolium</i>	174	-	-	-	-	++	-	++	-
	<i>Solanum sp</i>	129	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Witheringia coccoloboides</i>	165	+	-	-	++	++	++	++	-
	<i>Solanum trachycyphum</i>	188	-	-	-	-	+	++	+++	-
	<i>Solanum sp</i>	161	+	-	-	++	+	-	+	-
	<i>Solandra coriácea</i>	164	+	-	-	-	+	-	+	-
	<i>Cestrum humboldtii</i>	168	+	-	-	-	++	+	++	-
	<i>Solanum lepidotum</i>	134	-	-	-	-	-	-	-	++
	<i>Lycianthes radiata</i>	146	+	-	+	-	+	++	++	-
<i>Solanum sp</i>	189	+	-	-	-	+	++	+	++	
Piperaceae	<i>Piper pesaresanum</i>	148	+	-	-	+++	++	++	++	++
	<i>Piper daniel-gonzalezii</i>	197	+	-	-	-	+	+	+	-
	<i>Piper glanduligerum</i>	172	+	-	-	-	-	+++	+	+++
	<i>Piper crassinervium</i>	167	+	-	-	-	+++	+	+	++
	<i>Piper umbellatum</i>	163	+	-	-	-	+++	+	+	+++
	<i>Piper crassinervium</i>	175	+	+	-	-	-	-	-	++
	<i>Peperomia acuminata</i>	154	+	-	-	+	++	+++	+	+
	<i>Piper eriopodon</i>	158	-	-	-	-	++	++	++	++
	<i>Piper calceolarium</i>	194	-	-	-	-	+	+	+	-
Euphorbiaceae	<i>Acalypha macrostachya</i>	196	-	-	-	-	+	++	++	-
	<i>Alchornea spp</i>	140	+	+	+	-	-	+	-	+
	<i>Alchornea grandis</i>	202	+	-	+	-	++	+++	+++	+
	<i>Acalypha diversifolia</i>	126	+	+	+	-	++	++	++	+
	<i>Alchornea calophylla</i>	128	-	+	-	-	++	++	++	++
	<i>Hyeronima antioquiensis</i>	85	-	-	-	-	+++	+++	++	-
	<i>Mabea montana</i>	92	+	-	+	-	++	++	+++	+
	<i>Hyeronima</i>	130	+	-	-	-	+	-	+	+

a. Microorganismos: 1a. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, 2a. *Escherichia coli* ATCC 25922, 3a. *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603. b. Compuestos fitoquímicos: Ib. Alcaloides, IIb. Terpenos y triterpenos, IIIb. Saponinas, IVb. Fenoles y Taninos, Vb. Flavonoides.

## DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Entre los resultados obtenidos para los extractos evaluados pertenecientes a las especies de la familia Euphorbiaceae, puede decirse que estos exhibieron porcentajes variables de actividad antimicrobiana frente a las cepas bacterianas probadas. Para el caso de *P. aeruginosa* ATCC 27853 manifestaron una actividad bactericida del 63%, para cepas de *K. pneumoniae* ATCC 700603 un porcentaje del 50% y finalmente contra cepas de *E. coli* ATCC 25922 un 43% de los extractos mostró efecto inhibitorio. Lo anterior evidencia el potencial inhibitorio que posee esta familia, al mostrar un alto poder bactericida frente a bacilos gramnegativos. Cabe notar que la diferencia entre los porcentajes de actividad de extractos crudos aquí evaluados puede deberse a la ausencia de fitocompuestos capaces de inhibir el crecimiento bacteriano o también puede verse asociado a que las bacterias evaluadas eran gramnegativas, las cuales poseen una resistencia intrínseca a los antibióticos más alta que la de las grampositivas.

Para el caso de los extractos de la familia Solanaceae, estos manifiestan actividad contra todas las bacterias analizadas pero en una menor proporción respecto a la expresada por los extractos de la familia Euphorbiaceae. Por último se encuentran los extractos de la familia Piperaceae, que aunque no mostraron actividad antimicrobiana en dos de las tres bacterias evaluadas, si presentan una actividad muy marcada contra *P. aeruginosa* ATCC 27853.

*Pseudomonas aeruginosa* es resistente (tanto de manera natural como adquirida) a un gran número de antibióticos, esto se debe a las características de su membrana celular, la cual que tiene propiedades excepcionales de impermeabilidad a los antibióticos, y a que se encuentran presentes en muchos ambientes, tanto en la naturaleza como en ambientes habitados por el hombre como los hospitales (16).

Para el caso de *K. pneumoniae* ATCC 700603 es menor el porcentaje de extractos que tienen efecto sobre su crecimiento. Esta cepa bacteriana es productora de carbapenemasas, las cuales son un complejo enzimático capaz de inhibir un gran número de antibióticos (17).

Para la familia Euphorbiaceae, que reportó una actividad antimicrobiana promisoriosa, se logró establecer un punto de comparación entre las actividades ya reportadas en la literatura; como es el caso de los extractos diclorometánicos de las especies *Alcalypha diversifolia*, *Alchornea coelophylla*, *Hyeronima antioquiensis* y *Mabea montana*, los cuales en estudios anteriores como el de Niño y colaboradores no presentaron actividad antimicrobiana contra cepas de *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 1003), *Escherichia coli* ATCC 9637 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (18).

Para el caso de la familia Solanaceae se encontraron registros de actividad antibacteriana para algunos géneros y especies con los cuales es posible establecer una similitud del efecto antimicrobiano para los extractos de *Lycianthes radiata*, *Solanum ovalifolium*, *Browallia speciosa* y *Solanum lepidotum* (8). Algunas diferencias entre los resultados obtenidos en la literatura y los reportados en el presente estudio, pueden deberse a la diferencia de la metodología empleada para la evaluación de la actividad biológica (19), además de la diferencia entre las cepas que se usaron en cada ensayo.

Cabe resaltar que los resultados obtenidos son contrastados con la marcha fitoquímica realizada para cada una de las especies estudiadas, ya que cada una de estas muestra una diversidad importante de metabolitos secundarios, siendo estos los responsables de la actividad biológica obtenida. Entre los metabolitos secundarios presentes, la inhibición del crecimiento bacteriano puede deberse a la actividad de compuestos fenólicos, taninos, terpenos, flavonoides y alcaloides (20).

La actividad biológica aquí comprobada, da lugar a la evaluación de otros extractos medianamente polares de diferentes fuentes vegetales, ya sea con igual o diferente solvente de extracción, debido a que se evidenció la presencia de metabolitos secundarios de tal naturaleza que cuentan con un alto potencial biológico y que en la mayoría de las veces no se escogen para ensayos debido a sus inconvenientes con respecto a la solubilidad.

## CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Laboratório de Pesquisa em Recursos Naturais (LPqRN) de la Universidade Federal de Alagoas y Centro Patología e Medicina Laboratorial – UNCISAL Brasil, por facilitar el desarrollo experimental del presente estudio, además a la oficina de relaciones internacionales de la Universidad Tecnológica de Pereira, por facilitar parte del financiamiento de la investigación y finalmente al grupo de Biotecnología Productos Naturales por el suministro de técnicas y metodologías aplicadas en la investigación.

## REFERENCIAS

1. Rodríguez RMA, González PJ, Barreto J, Alonso NL, Areu A, Pardo NA. Tetraciclinas. . Acta Médica. 1998;8(1):75-9.
2. Sussmann OA, Mattos L, Restrepo A. Resistencia Bacteriana Universitas Medica 2002;43 N° 1(2002):12.
3. Martins S, Amorim ELC, Sobrinho TJS, Saraiva AM, Pisciotano MNC, Aguilar CN, et al. Antibacterial activity of crude methanolic extract and fractions obtained from *Larrea tridentata* leaves. Industrial Crops and Products. 2013;41:306-11.
4. Leyva M, Marquetti MdC, Tacoronte JE, Scull R, Tiomno O, Mesa A, et al. Actividad larvicida de aceites esenciales de plantas contra *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). Revista Biomédica 2009;20(1):5-13.
5. Ávila L, Baquero E, Viña A, Murillo E. Actividad Antibacteriana de *Diplostegium tolimense* Cuatrec. (Asteraceae) frente A *Staphylococcus aureus*. Revista de la Facultad de Química Farmaceutica, VITAE. 2006;13(1):55-60.
6. Nascimento GGF, Locatelli J, Freitas PC, Silva GL. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic resistant bacterial. Brazilian Journal of Microbiology. 2000;31:247-56.
7. Pérez CJE, Isaza MG, Acosta SM. Actividad Antibacteriana de Extractos de *Phenax rugosus* y *Tabebuia chrysantha*. Biosalud 2007 Diciembre 2007;6:59 - 68.
8. Niño J, Correa YM, Mosquera OM. Antibacterial, Antifungal, and Cytotoxic Activities of 11 Solanaceae Plants from Colombian Biodiversity. Pharmaceutical Biology. 2006;44(1):14-8.
9. Sampietro DA, Catalan CAN, Vattuone MA. Isolation, Identification and Characterization of Allelochemicals/Natural Products: Science Publishers; 2009.
10. Picazo JJ, editor. Métodos básicos para el estudio de la actividad a los antimicrobianos: Procedimientos en Microbiología Clínica; 2000.
11. Bueno SJG, Kouznetsov VV. Antimycobacterial susceptibility testing methods for natural products research. Brazilian Journal of Microbiology. 2010;41(8):270 - 7.
12. Cos P, Vietinck AJ, Berghe DV, Maes L. Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger in vitro 'proof-of-concept'. Journal of Ethnopharmacology. 2006;106(3):290-302.
13. Niño J, Correa YM, Cardona GD, Mosquera OM. Antioxidant and anti-topoisomerase activities in plant extracts of some Colombian flora from La Marcada Natural Regional Park. Revista de Biología Tropical. 2011 September 2011;59(9):1089-97.
14. Harborne JB. Phytochemical Methods: A guide to modern techniques of plant analysis. In: Hall C, editor. Third ed1998.
15. Domínguez X. Métodos de Investigación Fitoquímica. México Limusa; 1985. p. 281.
16. Gómez A, Carlos Andrés,, Leal C, Aura Lucía,, Pérez dG, María de Jesús,, Navarrete J, Myriam Lucía. Mecanismos de Resistencia en *Pseudomonas Aeruginosa*: Entendiendo a un peligroso enemigo. Revista de la Facultad Médica Universidad Nacional de Colombia. 2005; 53 (1):8.
17. Thomson JM, Bonomo RA. The threat of antibiotic resistance in Gram-negative pathogenic bacteria: -lactams in peril! Current Opinion in Microbiology. 2005;8(5):518-24.
18. Niño J, Mosquera OM, M. Y. Antibacterial and antifungal activities of crude plant extracts from Colombian biodiversity. Revista de Biología Tropical 2012 Diciembre, 2012;60(4):1535-42.
19. Othman M, Loh HS, Wiat C, Khoo TJ, Lim KH, Ting KN. Optimal methods for evaluating antimicrobial activities from plant extracts. Journal of Microbiological Methods. 2011;84(2):161-6.
20. Domingo D, López-Brea M. Plantas con acción antimicrobiana. . Revista Española de Quimioterapia 2003;16(4):385-93.