

Artículo original

Actividad biológica de extractos de tres plantas sobre bacterias patógenas para el humano

Zaida Carvajal Tesorero^{a,*}, Liliana Ramírez Zambrano^a, Marly Ducurú^b, Valery Gómez^b, Gustavo Cabrera^b, Jeannette Méndez^b, Morella Rodríguez Ortega^{a,b}

^aServicio Autónomo Instituto de Biomedicina. Ministerio del Poder Popular para la Salud. ^bEscuela de Química, Facultad de Ciencias. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.

Recibido 3 de febrero de 2012; aceptado 15 de agosto de 2012

Resumen: El objetivo de esta investigación fue determinar la actividad biológica de extractos de tres plantas sobre bacterias patógenas para el humano. Se determinó la citotoxicidad de extractos y fracciones de *Parinari sprucei*, *Couepia paraensis* y *Lantana camara* L. y se evaluó su actividad antibacteriana mediante el ensayo colorimétrico del 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,4-difenilbromuro de tetrazolio (MTT), utilizando sólo concentraciones inocuas en todos los ensayos realizados. La CMI se determinó con el ensayo de micro dilución MTT y se evaluó la actividad de los posibles agentes antimicrobianos por el método de difusión en agar de Kirby-Bauer. La CMI de los extractos metanólico de *C. paraensis* y diclorometano/etanol de *P. sprucei* sobre *Staphylococcus aureus* fue 25 µg/mL, mientras que la CMI con el extracto etanólico de *P. sprucei* fue 50 µg/mL. La CMI de la fracción 19 de *L. camara* L. sobre *Acinetobacter haemolyticus* y *S. aureus* fue 50 µg/mL. Los halos de inhibición obtenidos con los extractos metanólico de *C. paraensis*, y diclorometano/etanol y etanólico de *P. sprucei* sobre *S. aureus* fueron de 8, 9 y 7 mm, respectivamente. Los extractos de la familia Verbenaceae no presentaron actividad antibacteriana, mientras que los de la familia Chrysobalanaceae inhibieron la replicación de bacterias grampositivas.

Palabras clave: extractos, citotoxicidad, actividad antibacteriana, *Parinari sprucei*, *Couepia paraensis*, *Lantana camara* L.

Biological activity of extracts from three plants over bacteria pathogenic for human beings

Abstract: The cytotoxicity of extracts and fractions obtained from three plants was determined, and their antibacterial activity was evaluated through a colorimetric assay with tetrazolium 3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,4-diphenylbromide (MTT), using only innocuous concentrations in all the assays carried out. The MIC was determined by the MTT micro dilution assay, and the activity of the possible antimicrobial agents by the Kirby-Bauer agar diffusion test. The MIC of a methanol extract from *Couepia paraensis*, and a dichloromethanol/ethanol from *Parinari sprucei* over *S. aureus* was 25 µg/mL, while the MIC with the ethanol extract from *P. sprucei* was 50 µg/mL. The MIC of fraction 19 of *Lantana camara* L. over *A. haemolyticus* and *S. aureus* was 50 µg/mL. The inhibition halos obtained with the *C. paraensis* methanol extracts, and the *P. sprucei* over *S. aureus* dichloromethanol/methanol and ethanol extract, were 8, 9 and 7 mm respectively. The Verbenaceae family extracts did not present any antibacterial activity, while those of the Chrysobalanaceae family inhibited replication of gram positive bacteria.

Keywords: extracts, cytotoxicity, antibacterial activity, *Parinari sprucei*, *Couepia paraensis*, *Lantana camara* L.

* Correspondencia:

E-mail: zaidajosefinacarvajal@gmail.com

Introducción

Las propiedades terapéuticas de algunas plantas han sido ampliamente estudiadas, particularmente las de especies pertenecientes a las familias Chrysobalanaceae y Verbenaceae. La familia Chrysobalanaceae está constituida por 17 géneros, de ellos el género *Parinari* y su especie

P. sprucei, ha sido encontrada en la selva amazónica venezolana. Estudios fitoquímicos de las hojas de *P. sprucei* demuestran presencia de diterpenos tetracíclicos con actividad antibacteriana y anticancerígena [1-4]. *Couepia paraensis*, es otro representante de esta familia y está distribuida en Sur América [5,6].

Verbenaceae es otra familia de plantas presente en

Venezuela, formada por 51 géneros, entre los que se encuentra el género *Lantana* con 160 especies. Destaca *Lantana camara* L., conocida como cariaquito morado en Venezuela, cuyos estudios han reportado actividad antimalaria [7]. De las hojas de esta especie se han aislado diferentes triterpenos, flavonoides, alcaloides y glucósidos, que poseen diversas actividades biológicas, incluyendo efectos antibacterianos, antitumorales y antihipertensivos [8]; la raíz se ha utilizado para el tratamiento de malaria, reumatismo y lesiones en piel [9-13]. La lantamina, alcaloide obtenido de la corteza de las ramas y de las raíces de *L. camara* L., ha mostrado actividad antipirética y antiespasmódica, comparable con la quinina [14].

Staphylococcus aureus, es una bacteria grampositiva coagulasa positiva, importante agente causal de lesiones cutáneas. *Staphylococcus lugdunensis* es coagulasa negativo, e inicialmente se ha descrito como productor de endocarditis, pero en los últimos años, su aislamiento ha sido cada vez más frecuente y está asociado a otras lesiones en las que se comporta como un patógeno potencialmente agresivo [15]. *Escherichia coli*, es la especie bacteriana gramnegativa más comúnmente aislada como agente infeccioso en heridas [16]. Por otra parte, existe un amplio espectro de infecciones nosocomiales causadas por *Acinetobacter* spp., un cocobacilo no fermentador.

Los mecanismos de resistencia a los antibióticos que presentan las bacterias se han incrementando; esto plantea el estudio de nuevos compuestos que ayuden al tratamiento de las infecciones producidas por estos microorganismos. El objetivo de esta investigación fue determinar la actividad citotóxica y evaluar la actividad antibacteriana de extractos de *P. sprucei*, *C. paraensis* y *L. camara* L., mediante los métodos de concentración mínima inhibitoria (CMI) y Kirby-Bauer [17], sobre *S. aureus*, *S. lugdunensis*, *E. coli* y *A. haemolyticus*, aislados de lesiones cutáneas.

Materiales y métodos

Material biológico: Fibroblastos aislados de riñón de mono verde africano (Células Vero) fueron adquiridas en el Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel", Ministerio del Poder Popular para la Salud (MPPS).

Los aislados clínicos de las bacterias *S. aureus* (10-07), *S. lugdunensis* (44-07), *A. haemolyticus* (77-07) y *E. coli* (18-07) fueron suministrados por el Laboratorio de Microbiología del Servicio Autónomo Instituto de Biomedicina.

Los extractos y fracciones de las plantas utilizadas fueron facilitados por el Laboratorio de Productos Naturales de la Escuela de Química de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela y provienen del macerado de las hojas y las ramas de cada una de las plantas.

Los extractos de *P. sprucei* fueron obtenidos después de tratar el material vegetal con diclorometano/etanol y posterior extracción con etanol. Los extractos de *C. paraensis* y de *L. camara* L. se obtuvieron mediante el tratamiento con diclorometano/metanol, y posterior extracción con metanol. Para la obtención de las fracciones 14 y 19 de

L. camara L. se partió de un extracto del material vegetal tratado con diclorometano/etanol, el cual se disolvió en una solución metanol:agua (1:1). La fracción soluble de esta mezcla se extrajo con tolueno y acetato de etilo. La fracción soluble de tolueno se purificó mediante cromatografía de columna, utilizando sílica gel como fase estacionaria y una mezcla de diclorometano/metanol (19:1) como eluyente. Se recogieron 30 fracciones. La fracción 14 resultó rica en triterpenos. La fracción soluble en acetato de etilo fue purificada por cromatografía de columna utilizando RP-18 como fase estacionaria y agua/metanol (1:1) como eluyente. Se obtuvieron 26 fracciones. La fracción 19 resultó rica en flavonoides.

Medios de cultivo: Para el crecimiento y mantenimiento de las células Vero se utilizaron Medio Mínimo Esencial de Eagle (MEM) 1X suplementado con 1% de glutamina (200 mM), 0,1% de gentamicina y 8% de suero fetal bovino y MEM 1X suplementado con 1% de glutamina (200 mM), 0,1% de gentamicina y 1% de suero fetal bovino, respectivamente.

Para la preparación de los extractos y fracciones para la evaluación biológica se pesó 1 mg de cada uno de los extractos y fracciones, se disolvieron con 100 µL de dimetil sulfóxido (DMSO) y se llevaron a un volumen de 1 mL con medio MEM 1X.

Los aislamientos bacterianos se sembraron en placas de agar sangre y se incubaron en aerobiosis entre 18 y 24 horas en estufa a 37 °C, para obtener un cultivo fresco.

Ensayos de citotoxicidad: En placas de fondo plano de 96 pozos con 100 µL/pozo de medio de crecimiento se inocularon 100 µL/pozo de una suspensión de células Vero a una concentración de 2×10^5 células/mL por cuadruplicado. Después de 24 horas de incubación a 37 °C, con una atmósfera de 5% de CO₂, se realizó el ensayo colorimétrico del 3-(4,5-dimetiltiazol 2yl)-2,4-difenilbromuro de tetrazolio (MTT) [18].

La absorbancia se determinó a 570 nm en un lector de Elisa Multiscan EX®. Con los datos obtenidos se determinó la viabilidad celular con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Viabilidad celular} = 100 - \left(\frac{DO_C - DO_{EX}}{DO_C} \right) \times 100\%$$

DO_C = Densidad óptica del control celular
DO_{EX} = Densidad óptica de células con extracto

Los valores encontrados en el rango comprendido entre 80 y 120% indican que el extracto de la planta es inocuo sobre las células Vero. Valores por encima de 120 o por debajo de 80 se consideraron proliferativos o citotóxicos, respectivamente [19].

Determinación de la concentración bacteriana: Se estandarizó la concentración bacteriana mediante diluciones seriadas a partir del patrón 0,5 de McFarland hasta obtener lecturas de absorbancia adecuadas siguiendo la Ley de Lambert y Beer, mediante el ensayo colorimétrico de MTT

en micro cultivo [20].

Ensayo de CMI por microdilución en placa: En placas de 96 pozos de fondo plano, se colocaron por sextuplicado diluciones seriadas del extracto a probar como antimicrobiano (100 µL/pozo) partiendo de la mayor concentración inocua en 24 horas para cada compuesto. Se usó gentamicina (10 µg/mL) como control de inhibición bacteriana. En cada uno de los pozos se inocularon 100 µL de la suspensión bacteriana de 150×10^2 bacterias/mL previamente estandarizada y se incubó por 24 horas a 37 °C. Después del tiempo de incubación, se realizó la observación visual de cada una de las concentraciones evaluadas. Las suspensiones bacterianas de dos pozos correspondientes a cada concentración evaluada se mezclaron y se determinaron las unidades formadoras de colonias (UFC) mediante siembra en placas de agar sangre para cada uno de los compuestos y bacterias.

El ensayo colorimétrico [20] se realizó por cuadruplicado con 10 µL/pozo de MTT (5 mg/mL); las placas se incubaron por 30 minutos a 37 °C y se leyeron en un lector MicroScan EX® para la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) [17,21].

Actividad antibacteriana por el método de Kirby-Bauer: Se utilizaron discos de papel de filtro de 6,3 mm marca Oxoid®. Para determinar el volumen de absorción de los discos se pesó un disco seco, luego se sumergió en agua destilada y se determinó el volumen de absorción por diferencia de peso. El volumen de absorción de los discos (18,7 µL) fue usado para impregnarlos con las concentraciones mínimas inhibitorias resultantes de las evaluaciones previas para cada extracto y fracción, resultante del ensayo de microdilución en placa. Los discos impregnados estérilmente con el volumen de absorción se dejaron secando en campana de flujo laminar a temperatura ambiente. Posteriormente se realizó la prueba de sensibilidad por difusión con discos por el método de Kirby-Bauer [22-24].

Resultados

Citotoxicidad: El extracto clorofórmico de *C. paraensis* resultó citotóxico en las concentraciones de 25 y 50 µg/mL e inocuo en el rango de 0,78-12,5 µg/mL, mientras que el extracto metanólico resultó inocuo entre 0,78 y 50 µg/mL. Los extractos diclorometano/etanol, etanólico, diclorometano/metanol y metanólico de *P. sprucei*, así como la fracción 19 de *L. camara* L. resultaron inocuos en el rango entre 0,78 y 50 µg/mL; la fracción 14 de *L. camara* L. resultó inocua en el rango de 0,78 y 25 µg/mL, mientras que a 50 µg/mL resultó citotóxica (Tabla 1).

Sensibilidad bacteriana:

Concentración mínima inhibitoria: Sobre *S. aureus*, las CMIs obtenidas fueron: con el extracto metanólico de *C. paraensis* 25 µg/mL; con los extractos diclorometano/etanol y etanólico de *P. sprucei* 25 y 50 µg/mL, respectivamente. Sólo la fracción 19 de *L. camara* L. presentó una CMI de 50 µg/mL sobre *S. aureus* y *A. haemolyticus*. El resto de los

extractos no presentaron actividad antibacteriana (Tabla 2).

Prueba de sensibilidad por difusión con discos: El halo de inhibición del extracto metanólico de *C. paraensis* (25 µg/mL) sobre *S. aureus* fue de 8 mm y para el extracto diclorometano/etanol de *P. sprucei* fue de 9 mm. El halo del extracto etanólico de *P. sprucei* (50 µg/mL) fue de 7 mm. Con los discos impregnados con el doble de la CMI

Tabla 1. Ensayo de citotoxicidad de los extractos y fracciones evaluados sobre células Vero en 24 horas.

Plantas	Extractos	Citotoxicidad (µg/mL)	
		Inocuo	Citotóxico
<i>C. paraensis</i>	Metanólico	0,78 – 50	-
	Clorofórmico	0,78 – 12,5	50 - 25
<i>P. sprucei</i>	Diclorometano/etanol	0,78 – 50	-
	Etanólico	0,78 – 50	-
<i>L. camara</i> L.	Diclorometano/metanol	0,78 – 50	-
	Metanólico	0,78 – 50	-
	Fracción 14	0,78 – 25	50
	Fracción 19	0,78 – 50	-

Tabla 2. Ensayo de concentración mínima inhibitoria (CMI) de los diferentes compuestos evaluados sobre *Staphylococcus aureus* y *Acinetobacter haemolyticus*.

Plantas	Extractos	CMI (µg/mL)	
		<i>S. aureus</i>	<i>A. haemolyticus</i>
<i>C. paraensis</i>	Metanólico	25	-
	Clorofórmico		-
<i>P. sprucei</i>	Diclorometano/etanol	25	-
	Etanólico	50	-
<i>L. camara</i> L.	Diclorometano/metanol	-	-
	Metanólico	-	-
	Fracción 14	-	-
	Fracción 19	50	50

se obtuvo diferencia de una unidad mayor respecto al halo medido con la CMI. Con la mitad de la CMI, se mantuvo la misma medida del halo original. Con la fracción 19 de *L. camara* L. no se evidenció halo de inhibición para *S. aureus* ni para *A. haemolyticus* (Tabla 3).

Discusión

Los triterpenoides extraídos de diferentes géneros de plantas pertenecientes a la familia Chrysobalanaceae, presentaron actividad contra bacterias grampositivas pero

Tabla 3. Halos de inhibición de los diferentes extractos sobre *Staphylococcus aureus* y *Acinetobacter haemolyticus* por el método de difusión, en función de las CMI's obtenidas.

Plantas	Extractos	Halos de inhibición (mm)			
		50 µg/mL	25 µg/mL	12,5 µg/mL	Gentamicina 10 µg/mL
<i>C. paraensis</i>	Metanólico	9	8	8	20
<i>P. sprucei</i>	Diclorometano/etanol	10	9	8	20
		Halos de inhibición (mm)			
		100 µg/mL	50 µg/mL	25 µg/mL	Gentamicina 10 µg/mL
<i>P. sprucei</i>	Etanólico	8	7	7	20
<i>L. camara</i> L.	Fracción 19	0	0	0	20

no contra gramnegativas [25]; estos resultados están acordes con los del presente estudio, ya que al evaluar extractos de *C. paraensis* y *P. sprucei*, se observó inhibición sobre *S. aureus*, mientras que sobre las bacterias gramnegativas, no hubo inhibición.

Existen reportes de la actividad antibacteriana del ácido lantánico extraído de *L. camara* L. sobre bacterias grampositivas y gramnegativas de cepas de referencia mediante un ensayo bioautográfico [26], sin embargo, bajo las condiciones del presente estudio, la fracción 14, siendo rica en triterpenos, no presentó actividad antibacteriana; posiblemente la composición de triterpenos presentes en estos extractos es diferente.

Los extractos de *L. camara* L. no presentaron actividad antibacteriana en las condiciones utilizadas en el presente trabajo. Sin embargo, otros autores han reportado 100% de inhibición sobre *S. aureus* y ausencia de actividad sobre *E. coli*, utilizando el método de dilución en agar con los extractos diclorometano/metanol y metanólico, en concentraciones de 500 y 1000 µg/mL respectivamente [27]. Estas concentraciones son diez y veinte veces superiores que la máxima concentración usada en la presente investigación; estas diferencias en las concentraciones podrían explicar los resultados obtenidos. Otra variable a considerar es el método: los investigadores realizaron sus evaluaciones con dilución en agar y en este trabajo se utilizó el método de concentración mínima inhibitoria por micro dilución en placa. En otros estudios, la actividad de los extractos clorofórmicos y metanólicos ha sido encontrada de forma específica sobre cepas grampositivas, aunque *Pseudomonas aeruginosa* fue inhibida por el extracto metanólico de forma dosis dependiente [28].

En la Convención Anual de Microbiología en Filipinas (1998), se presentó una evaluación de la actividad antibacteriana de extractos alcohólicos y acuosos de hojas secas de *L. camara* L. por el método de difusión en disco de Kirby-Bauer, utilizando discos con un tamaño de 12,7 mm, sobre cepas de referencia de *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922 y *P. aeruginosa* ATCC 27853; encontraron actividad solo sobre *S. aureus* con una CMI de 125 µg/mL y los halos de inhibición obtenidos con los extractos alcohólico y acuoso fueron 14,6 y 14,8 mm respectivamente [29]. En

el presente estudio la fracción 19 de *L. camara* L. inhibió el crecimiento de *S. aureus*, *A. haemolyticus* y *S. lugdunensis* con una CMI de 50µg/mL. La concentración mínima inhibitoria reportada por estos autores es 2,5 veces más alta que la concentración reportada en el presente trabajo (50 µg/mL), la cual es inocua en células de mamíferos. Otros autores han demostrado la relevancia que tiene trabajar en rangos de concentraciones inocuas en células eucariotas cuando se está en la búsqueda de agentes terapéuticos [30].

Con la fracción 19 de *L. camara* L., constituida fundamentalmente por flavonoides, se obtuvo actividad contra bacterias, corroborando la propiedad antibacteriana de los flavonoides [31]. Sin embargo, no hubo correlación entre la CMI y los halos de inhibición, aun cuando se usó el doble de la CMI sobre los discos. La ausencia de inhibición pudiera deberse a la falta de difusión del extracto en el medio, probablemente por interferencia de algún otro componente presente en esta fracción. Mothana *et al.*, en un estudio con diferentes variedades de plantas, dejaron actuar los discos preparados sobre las placas inoculadas durante dos horas en refrigeración antes de la incubación apropiada para el crecimiento bacteriano [32]. La ausencia de ese factor en la metodología usada en este estudio podría haber contribuido en la falta de difusión de los componentes de la fracción. El siguiente paso de esta investigación será la purificación de cada uno de esos extractos y fracciones, de manera de obtener uno o varios principios activos específicos que se puedan utilizar como agentes terapéuticos para el tratamiento de las enfermedades infecciosas producidas por bacterias.

Conclusión

Los resultados obtenidos muestran que la fracción 19 de *Lantana camara* L. y los componentes de los extractos de la familia Chrysobalanaceae presentaron actividad antibacteriana en un rango de concentraciones inocuas para células de mamíferos, lo que hace factible su uso en estudios *in vivo* como potenciales agentes antibacterianos, después de determinar cuál o cuáles son los principios activos responsables de esta actividad.

Agradecimientos

Los autores agradecen a las Dras. María Isabel Urrestarazu y Noris Serrano, del Laboratorio de Microbiología del Servicio Autónomo Instituto de Biomedicina, por el apoyo en la obtención de los aislados bacterianos. Este estudio fue financiado por el Proyecto del CDCH PG-006589-2006.

Referencias

- Matute M. Aislamiento y caracterización de los flavonoides presentes en el extracto etanólico de la especie *Parinari sprucei*. Trabajo de Grado. Escuela de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela. 2006.
- Braca A, Bilia AR, Méndez J. Three flavonoids from *Licania densiflora*. *Phytochemistry*. 1999; 51:1125-8.
- Braca A, Armenise A, Morelli I, Mendez J, Mi Q, Chai HB *et al.* Structure of kaurane-type diterpenes from *Parinari sprucei* and their potential anticancer activity. *Plant Med*. 2004; 70:540-50.
- Mattia CA, Braca A, De Tommasi N, Puliti R. A new norkaurane-gamma-lactona from *Parinari sprucei*. *Acta Crystallogr C*. 2003; 59:644-6.
- Prance GT, White F. The genera of Chrysobalanaceae: a study in practical and theoretical taxonomy and its relevance to evolutionary biology. *Phil Trans R Soc Lond B*. 1998; 320:1-184.
- Espinosa-Oroño G, Argas-Simon G, Engleman M. Contribución al estudio de la anatomía foliar del icco *Chrysobalanus icaco* L. *Bioagro*. 2002; 14:29-36.
- Carrillo-Rosario T, Díaz de Ramírez A. Actividad antimalárica de extractos acuosos de *Lantana camara* L., *Verbena littoralis* y *Heliotropium indicum* L. en ratones infectados con *Plasmodium berghei*. *Rev Fac Farm ULA*. 2006; 48:252-6.
- Chhabra SC, Mahunnah RLA, Mshiu EN. Plants used in traditional medicine in Eastern Tanzania. VI. Angiosperms (Sapotaceae to Zingiberaceae). *J Ethnopharmacol*. 1993; 39:83-103.
- Ali-Emmanuel N, Moudachiori M, Akakpo AJ, Quetin-Leclercq J. Activités antibactériennes *in vitro* de *Cassia alata*, *Lantana camara* et *Mitracarpus scaber* sur *Dermatophilus congolensis* isolé au Bénin. *Revue Elev Méd vét Pays trop*. 2002; 55: 183-7.
- Taoubi K, Fauvel MT, Gleye J, Moulis C, Fourasté I. Phenylpropanoid glycosides from *Lantana camara* and *Limpia multiflora*. *Plant Med*. 1997; 63:192-3.
- Dicurú M. Aislamiento y caracterización de metabolitos secundarios mayoritarios presentes en los extractos diclorometano-metanol (8:2) y metanólico de la planta *Lantana camara* Linn perteneciente a la familia Verbenaceae. Trabajo de Grado. Escuela de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela. 2006.
- Porras S. Aislamiento y caracterización de metabolitos secundarios en los extractos tolueno y diclorometano de la planta *Lantana camara* Linn perteneciente a la familia Verbenaceae. Trabajo de Grado. Escuela de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela. 2006.
- Ghisalberti E. *Lantana camara* L. (Verbenaceae) Fitoterapia. 2000; 71:467-86.
- Carrillo-Rosario T, Díaz de Ramírez A. Actividad antimalárica de extractos acuosos de *Lantana camara* L., *Verbena littoralis* L. y *Heliotropium indicum* L. en ratones infectados con *Plasmodium berghei*. *Rev Fac Farm ULA*. 2006; 48:14-20.
- Verdaguer R. *Staphylococcus lugdunensis*. Servicio de Microbiología. Ciudad Sanitaria y Universitaria de Bellvitge Hospitales de Llobregat (Barcelona); 2000. Disponible en: <http://www.seimc.org>. Acceso 3 de enero de 2012.
- Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. Enfermedades infecciosas. Principios y prácticas. 4ta edición. Buenos Aires: Editorial Argentina Panamericana; 1997.
- Manual de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana. Organización Panamericana de la Salud. American Society for Microbiology. Washington, USA; 2006. Disponible en: <http://www.ops-oms.org/>. Acceso 10 de enero de 2012.
- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983; 65:55-63.
- Paredes A, Hasegawa M, Prieto F, Méndez J, Rodríguez M, Rodríguez-Ortega M. Biological activity of *Gutteria cardona* fractions. *J Ethnopharmacol*. 2001; 78:129-32.
- Alley MC, Scudiero DA, Monks A, Hursey ML, Czerwinski MJ, Fine DL *et al.* Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Res*. 1988; 48:589-601.
- Programa de vigilancia de los serotipos y resistencia antimicrobiana de *Streptococcus pneumoniae* y *Haemophilus influenzae*. Manual de Procedimientos Organización Panamericana de la Salud-Instituto Nacional de Salud, Colombia. 2004.
- Rippere R. Preparation and control of antibiotic susceptibility discs and other devices containing antibiotics. In: Lorian V, editor. *Antibiotics in Laboratory Medicine*. 5th edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2005. 549-572 p.
- Prat S. Prueba de susceptibilidad antimicrobiana por difusión en agar. Laboratorio de Susceptibilidad. Sección de Bacteriología. Instituto de Salud Pública de Chile. 2005. Disponible en: <http://www.aspch.cl/>. Acceso 20 de enero de 2012.
- Bauer AW, Kirby WMM, Sherris JC, Turck M. Antibiotics susceptibility testing by standardized single disk method. *Am J Clin Pathol*. 1966; 45:493-6.
- Braca A, Morelli I, Mendez J, Battinelli L, Braghiroli L, Mazzanti G. Antimicrobial triterpenoids from *Licania heteromorpha*. *Planta Med*. 2000; 66:768-9.
- Saleh M, Kamel A, Li X, Swaray J. Antibacterial triterpenoids isolated from *Lantana camara*. *Pharm Biol*. 1999; 37:63-6.
- Kumar VP, Chauhan NS, Padh H, Rajani M. Search for antibacterial and antifungal agents from selected Indian medicinal plants. *J Ethnopharmacol*. 2006; 107:182-8.
- Basu S, Ghosh A, Hazra B. Evaluation of the antibacterial activity of *Ventilago madraspatana* Gaertn, *Rubia cordifolia* Linn. and *Lantana camara* Linn.: isolation of emodin and physcion as active antibacterial agents. *Phytother Res*. 2005; 19:888-94.
- Gelera GL, Brillante EL, Alix MG, Pasadilla RS, Agha BI, Marquez MLM, Reyes EI. Antibacterial activity of *Lantana camara* leaf extracts. *Proceedings of the 27th Annual Convention of the Philippine Society for Microbiology, Inc., Philippine Society for Microbiology*. Manila (Philippines), 1998. 274 p.
- Fontanay S, Grare M, Mayer J, Finance C, Duval RE. Ursolic, oleanolic and betulinic acids: antibacterial spectra and selectivity indexes. *J Ethnopharmacol*. 2008; 120:272-6.
- Perera Córdova WH, González Mesa L, Payo Hill AL. Metabolitos secundarios y actividad antimicrobiana de *Pluchea carolinensis*. *Rev Cub Farm*. 2006; 40:8-15.
- Mothana RA, Lindesquist U, Gruenert R, Bednarski PJ. Studies of the *in vitro* anticancer, antimicrobial and antioxidant potentials of selected Yemeni medicinal plants from the island Soqatra. *BMC Comp Altern Med*. 2009; 9:7. Disponible en: <http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1472-6882-9-7.pdf>. Acceso 5 de enero de 2012.