
ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE EXTRACTOS DE *Phenax rugosus* Y *Tabebuia chrysantha*

Jorge E. Pérez C.¹
Gustavo Isaza M.¹
Sandra M. Acosta²

RESUMEN

Se evaluó la actividad antibacteriana de extractos metanólicos, clorofórmicos y de éter de petróleo de las hojas de *Phenax rugosus* y *Tabebuia chrysantha* frente a *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris* y *Pseudomona aeruginosa*; en los resultados obtenidos se observa muy leve actividad antibacteriana con los extractos metanólicos de ambas plantas; los extractos clorofórmicos y los etéreos no presentaron actividad antimicrobiana. Estos hallazgos indican que posiblemente el uso empírico de estas plantas no se deba a un efecto antibacteriano, pues las concentraciones de los extractos que inhiben el crecimiento bacteriano son demasiado altas para considerarlas antibacterianas.

Palabras clave: Agentes antiinfecciosos, *Tabebuia*, *Phenax rugosus*.

ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF *Phenax rugosus* and *Tabebuia* *chrysantha* EXTRACTS

ABSTRACT

The antibacterial activity of methanol, chloroform and petroleum ether extracts obtained from the leaves of *Phenax rugosus* and *Tabebuia chrysantha* against to *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris* and *Pseudomona aeruginosa* was evaluated. The results showed a very small antibacterial activity with the methanol extracts of both plants; the chloroform and ether extracts do not show antibacterial activity. These findings establish that the empiric use of the leaves of these plants is not associated with an antibacterial effect, because the inhibitory concentrations of the extracts are very high to be considered antibacterial.

Key words: Anti-infective agents, *Tabebuia*, *Phenax rugosus*.

¹ Profesores del Departamento de Ciencias Básicas para la Salud, Facultad de Ciencias para la Salud, Universidad de Caldas. Manizales, Caldas. República de Colombia.

² Joven Investigadora de Conciencias. Departamento de Ciencias Básicas para la Salud, Facultad de Ciencias para la Salud, Universidad de Caldas. Manizales, Caldas. República de Colombia.

INTRODUCCIÓN

La resistencia de las bacterias a los antibióticos se reconoce ampliamente como una amenaza para el ejercicio médico en todo el mundo (14). A pesar de los esfuerzos de muchas entidades de la salud pública para tratar de disminuir dicha resistencia, ésta continúa emergiendo y proliferando, como lo demuestra la existente a múltiples medicamentos de cepas de bacterias Gram negativas (*Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Acinetobacter*, *Escherichia coli* y especies de *Salmonella*, entre otras) y Gram positivas (*Staphylococcus*, *Enterococcus* y varias especies de *Streptococcus*) (32). La resistencia de la tuberculosis a muchos fármacos, es otro problema serio de salud pública (7, 14, 15).

Esta resistencia que apareció con mayor incidencia en los ambientes hospitalarios, por ejemplo las reportadas a *Klebsiella*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter*, en especial en las Unidades de Cuidados Intensivos, y a *Staphylococcus aureus* metilicino resistentes y vancomicina resistentes, se ha ido difundiendo a infecciones bacterianas adquiridas en la comunidad, tales como neumonía, gonorrea e infecciones del tracto urinario, cada vez más difíciles de tratar con los antibióticos usuales (7, 14, 30).

Diversas estrategias se han sugerido para tratar de minimizar esta amenaza y una de ellas es la necesidad de hallar nuevos antibióticos. Es alarmante la disminución del interés de la industria farmacéutica en la búsqueda de nuevas moléculas antibacterianas (14, 22); se considera que los mecanismos bacterianos de resistencia y su capacidad de diseminación son mucho más eficientes que la capacidad humana para producir más y mejores antibióticos (27). Por ello, se ha recomendado que sea la Academia la que haga esfuerzos para hallar moléculas nuevas desde la síntesis química hasta la búsqueda en fuentes naturales (22, 31).

Las plantas, por su biodiversidad y riqueza en metabolitos secundarios, proporcionan una interesante fuente de posibles sustancias activas contra muchas bacterias. Por esto, en los últimos años se ha ido desarrollando un creciente interés en varios centros de investigación de todo el mundo en búsqueda de efectos antibacterianos de extractos de múltiples especies vegetales (8, 16, 26, 29, 34, 37). Es así como estudios realizados en especies de *Tabebuia*, tales como *T. avellaneda*, *T. rosea* y *T. impetiginosa*, han demostrado diferentes acciones de sus extractos, ya sea modulando el efecto inflamatorio o inhibiendo a *Staphylococcus aureus* metilicino resistente y a diferentes especies de hongos, en el tratamiento de úlceras, de la diabetes o de la sífilis, como anticanceroso y antimicótico, como neutralizante del veneno de serpientes, diurético y astringente. En estos estudios se han podido aislar diferentes moléculas, por ejemplo: naftoquinonas, furanonaftoquinonas, diferentes tipos de glucósidos, el lapacol, glucosidoiridoides y dialdehidos ciclopentanos (12, 16, 23, 24, 26, 33, 35, 36).

En estudios etnofarmacológicos realizados por nuestra Línea de Investigación, se encontró que el uso de plantas para tratar piel y heridas infectadas es una práctica muy común en el Eje Cafetero y en la región centro occidental del país (4, 9). Algunas de estas especies se han evaluado midiéndoles su actividad *in vitro* frente a varias cepas bacterianas (1, 3); además, *Phenax rugosus* (n.vulg. esparietaria) y *Tabebuia Chrysantha* (n.vulg. Guayacán amarillo, cañahuate) mostraron en un estudio experimental que midió el leucograma y la producción de anticuerpos en ratas (25), que producía, la primera, incrementos estadísticamente significativos en los leucocitos, monocitos, eosinófilos y linfocitos, mientras que la segunda especie incrementó los niveles de anticuerpos. Extractos etanólicos de estas dos especies no produjeron inhibición de varias cepas bacterianas en concentraciones por debajo de 500 µg/ml(3).

En la presente investigación se evaluó la actividad antibacteriana de extractos metanólicos, clorofórmicos y de éter de petróleo de las hojas de *Phenax rugosus* y *Tabebuia chrysantha* en cepas certificadas de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomona aeruginosa* y *Escherichia coli*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolección del material vegetal

Las partes aéreas de *Phenax rugosus* (SW) Wedd se recolectaron en la vereda El Guayabo del municipio de Cartago, Valle del Cauca, a 1200 m.s.n.m. y 22°C de temperatura promedio; *Tabebuia chrysantha* (Jacq.) Nichols, se recolectó en la vereda Santágueda, municipio de Palestina, Caldas, a 1800 m.s.n.m y a una temperatura promedio de 20°C.

Las plantas fueron identificadas y clasificadas en el herbario del programa de Agronomía de la Universidad de Caldas y debidamente comparadas con la muestras de referencia para *Phenax rugosus* (SW) (número 1016) y para *Tabebuia chrysantha* (Jacq.) (número 1525).

Preparación de los extractos

Las hojas se lavaron con abundante agua destilada, se secaron en estufa a una temperatura de 40°C durante 24 horas, se pulverizaron y almacenaron en frascos ámbar a - 4°C hasta el momento de ser empleadas (13).

Cada muestra fue sometida a un proceso de extracción en soxhlet con solventes de distinta polaridad: metanol, cloroformo y éter de petróleo. Se utilizaron tres muestras diferentes, una para cada solvente; los extractos obtenidos se concentraron en rotavapor y se diluyeron en dimetilsulfóxido para su evaluación antibacteriana preliminar. Para la determinación de la concentración inhibitoria mínima (CMI), se diluyeron los extractos metanólico y etéreo en solución salina fisiológica estéril, y los

clorofórmicos en una mezcla de solución salina y tween 20 (9:1).

Se tomaron 50 g de cada material vegetal seco, los cuales tuvieron los siguientes porcentajes de rendimiento después de la extracción en soxhlet: para los extractos metanólicos fue del 4%, para los clorofórmicos del 3.6% y para los de éter de petróleo fue del 1%.

Microorganismos

Se trabajó con cinco cepas proporcionadas por el Instituto Nacional de Salud, Ministerio de la Protección Social, Bogotá D.C., Colombia, obtenidas de cepas semilla de las siguientes especies bacterianas:

Escherichia coli (ATCC25922)

Staphylococcus aureus (ATCC25923)

Pseudomona aeruginosa (ATCC27853)

Proteus vulgaris (ATCC49132)

Streptococcus pneumoniae (ATCC49619)

Ensayo preliminar para la determinación de la actividad antibacteriana

Cada uno de los extractos se evaluó empleando la técnica de cultivo en pocillos (5). En este procedimiento se utilizó una caja de petri para cada bacteria con un inóculo (1 ml) de 10⁸ UFC/ml, determinada por la escala de MacFarland y 20 ml de agar (Müeller Hinton) fundido; después de que el agar solidificó, se realizaron 5 pozos equidistantes de 5 mm de diámetro por 0,6 mm de profundidad; en cada uno de los pozos se depositaron 50 µl de cada extracto que había que ensayar a concentraciones de 500, 250, 125, 62.5 y 31.25 mg/ml. Para cada cepa se depositó en una caja independiente como controles: gentamicina, dimetil sulfóxido (DMSO), y los respectivos solventes utilizados en la obtención de los extractos; se hizo también un control de la viabilidad de cada una de las cepas bacterianas. Las cajas se incubaron a 37°C

durante 18 horas tiempo al cabo del cual se registró el diámetro de los halos de inhibición en el crecimiento bacteriano.

Cada extracto fue sometido como mínimo a dos ensayos; se reportan los promedios de las mediciones hechas.

Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (19, 21)

A partir de cultivos bacterianos de 18 horas, se obtuvo una suspensión de las bacterias que había que probar en caldo tripticosa soya; la concentración se ajustó al grado de turbidez del tubo No. 0.5 de la escala de McFarland que equivale 10⁸ UFC/ml.

Para determinar la CMI se empleó el método de diluciones seriadas dobles en medio líquido. Se tomaron 500 mg de cada extracto y se disolvieron en 1 ml de las soluciones antes descritas; a partir de esta solución se hicieron diluciones decrecientes (factor de dilución 2) en tubos independientes con 1 ml de caldo Müeller

Hinton a concentraciones de 250, 125, 62.5 y 31.25 mg/ml y en cada tubo se depositaron 50 µl de la suspensión bacteriana que se debía probar.

Todos los tubos se incubaron a 37°C por 18 horas, se observó en cada tubo la presencia de turbidez, y se confirmó la presencia de crecimiento bacteriano por inoculación de una alícuota de cada tubo en agar Mac Conkey para las bacterias Gram negativas y en agar sangre para *S. aureus*, y *S. pneumoniae*. Estos subcultivos se incubaron por el tiempo y a la temperatura mencionada anteriormente.

Los ensayos preliminares y de CMI realizados con *S. pneumoniae* se hicieron en un ambiente de microaerofilia, utilizando para ello campanas de anaerobiosis.

Se consideró que la concentración inhibitoria mínima correspondió a la mínima dilución del extracto hasta el cual no hubo crecimiento bacteriano visible.

RESULTADOS

Tabla 1. Actividad antimicrobiana de los extractos de *Phenax rugosus* y *Tabebuia chrysantha*.

Microorganismo	E.M.P. (mg/ml)			E.C.P. (mg/ml)			E.E.P. (mg/ml)			E.M.T. (mg/ml)			E.C.T. (mg/ml)			E.E.T. (mg/ml)			Gentamicina	
	500	250	125	500	250	125	500	250	125	500	250	125	500	250	125	500	250	125	40 µg	10 µg
Zona de inhibición en mm																				
Concentración del extracto (mg/ml)	500	250	125	500	250	125	500	250	125	500	250	125	500	250	125	500	250	125	40 µg	10 µg
<i>E. coli</i>	16	14	13	14	12	-	NR	11	-	-	-	-	9	-	-	-	-	-	11.5	
<i>S. aureus</i>	17	17	17	15	-	-	-	-	-	14	13	12	9	-	-	-	-	-	14	
<i>P. vulgaris</i>	14	14	14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	13	
<i>P. aeruginosa</i>	15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	12.5	
<i>S. pneumoniae</i>	22	20	18	-	-	-	-	-	-	NC	NC	NC	-	-	-	-	-	-	NR	

E.M.P: Extracto metanólico de *Phenax*.

E.C.P: Extracto clorofórmico de *Phenax*.

E.E.P: Extracto etéreo de *Phenax*.

E.M.T: Extracto metanólico de *Tabebuia*.

E.C.T: Extracto clorofórmico de *Tabebuia*.

E.E.T: Extracto etéreo de *Tabebuia*.

(-): No inhibición.

NC: Ausencia de colonias visibles en la caja de petri.

NR: No realizado.

En la tabla 1 se observan los resultados de los ensayos preliminares de la actividad antibacteriana en medio semisólido. Se utilizaron tres extractos de diferente polaridad, obtenidos de *P. rugosus* y *T. chrysantha*. Se observa que el extracto metanólico de *P. rugosus* presenta leve actividad (125 mg/ml) frente a las cepas bacterianas, excepto con *P. aeruginosa*; los extractos clorofórmicos y etéreos de ambas plantas no mostraron actividad antibacteriana. Además de los ensayos con los extractos, se determinó la actividad antibacteriana del dimetil sulfóxido, el metanol, el cloroformo y el éter; no se encontró actividad inhibitoria (datos no mostrados). Como control de susceptibilidad a los antibióticos de las cepas utilizadas, se empleó la gentamicina que mostró una actividad inhibitoria (10 mm o más) a concentraciones de 10 µg para *E.coli* y *P.vulgaris*; 16 µg para *S.pneumoniae* y 40 µg para *S.aureus* y *P. aeruginosa*.

Las CMI de los extractos analizados de *P. rugosus* y *T. chrysantha* aparecen en la tabla 2. En este ensayo, debido a la inhibición producida por el dimetil sulfóxido a los volúmenes utilizados, se cambió el solvente por solución salina estéril para los extractos metanólicos y clorofórmicos y por una mezcla Tween 20: solución salina para los extractos etéreos. Estas soluciones no produjeron inhibición de ninguna de las cepas utilizadas. Se observa que los extractos metanólicos de ambas plantas, a concentraciones muy altas, tienen una acción inhibitoria sobre las cinco especies bacterianas utilizadas, mientras que los extractos clorofórmico y etéreo presentan poca (de nuevo a altas concentraciones) o ninguna actividad.

De la misma manera que en el ensayo anterior, se realizaron pruebas de susceptibilidad frente a la gentamicina, y los valores encontrados oscilaron entre 10 y 40 µg del antibiótico (tabla 2.).

Tabla 2. Concentración mínima inhibitoria de los extractos de *Phenax rugosus* y *Tabebuia chrysantha* frente a 5 especies bacterianas.

Microorganismo	E.M.P. (mg/ml)	E.C.P. (mg/ml)	E.E.P (mg/ml)	E.M.T. (mg/ml)	E.C.T. (mg/ml)	E.E.T. (mg/ml)	Gentamicina (µg/ml)
<i>E. coli</i>	15.62	-	31.25	62.5	125	-	10
<i>E. aureus</i>	125	-	-	15.62	-	-	40
<i>P. vulgaris</i>	15.62	-	-	125	-	-	10
<i>P. aeruginosa</i>	250	-	-	250	-	-	40
<i>S. pneumoniae</i>	62.5	125	-	31.25	62.5	-	16

E.M.P: Extracto metanólico de *Phenax*.

E.C.P: Extracto clorofórmico de *Phenax*.

E.E.P: Extracto etéreo de *Phenax*.

E.M.T: Extracto metanólico de *Tabebuia*.

E.C.T: Extracto clorofórmico de *Tabebuia*.

E.E.T: Extracto etéreo de *Tabebuia*.

(-): No inhibición.

DISCUSIÓN

En la presente investigación no se produjo ningún efecto inhibitorio con concentraciones por debajo de 125 mg/ml. Por lo tanto, se decidió tomar esta concentración como la medida de bioactividad; si bien se reconoce que es una concentración alta para definir una apreciable actividad antibacteriana, se clasificó esta como leve.

Se demuestra que *Phenax rugosus* y *Tabebuia chrysantha* sólo con los extractos metanólicos poseen actividad antibacteriana muy leve contra algunos microorganismos Gram positivos y Gram negativos; los resultados de la inhibición se consideran muy bajos, dadas las altas concentraciones que se necesitaron para obtener tales efectos. *Phenax rugosus* produjo, cuando se midió la CMI, mayor actividad -con los extractos metanólicos- para *E. coli*, *P. vulgaris* y *S. pneumoniae*, mientras que con *S. aureus* y *P. aeruginosa*, se requirió de concentraciones 8 y 16 veces más altas. En este ensayo, esta especie vegetal presentó actividad con el extracto etéreo y clorofórmico para *E. coli* y *S. pneumoniae*, respectivamente. El efecto sobre *E. coli* -de los extractos metanólicos- se produjo a concentraciones no tan elevadas si se comparan con las necesarias para obtener actividad antibacteriana en otras bacterias del presente trabajo.

Los extractos metanólicos de *Phenax rugosus* en el ensayo preliminar produjeron inhibición del crecimiento bacteriano en todos los microorganismos ensayados, excepto con *P. aeruginosa*, y este efecto aparece desde las concentraciones más bajas empleadas (125 mg/ml).

El extracto etéreo de *Tabebuia chrysantha* en el ensayo preliminar no presentó actividad contra ninguna de las cepas bacterianas a las concentraciones usadas en la presente investigación, y el extracto clorofórmico sólo produjo una pequeña zona de inhibición a altas

concentraciones frente a *E. coli* y *S. aureus*. Estos resultados se confirmaron en el ensayo de la CMI, en el que solo se observó inhibición frente a los extractos clorofórmicos; por el contrario, hubo efecto antibacteriano con el extracto metanólico que mostró actividad inhibitoria en la CMI de las cinco cepas bacterianas, aun cuando de nuevo *P. aeruginosa* requirió la máxima concentración para su inhibición. Esta especie vegetal mostró mayor actividad antibacteriana para *S. aureus* con el extracto metanólico; otros estudios realizados con *Tabebuia avellaneda* han demostrado mayor actividad frente a esta bacteria con las fracciones no polares del extracto, específicamente asociándola con naftoquinonas (16).

Hubo una mayor eficiencia en la determinación de la actividad antimicrobiana frente a *S. pneumoniae* en la CMI que en los ensayos preliminares. Esta discrepancia en los resultados puede estar asociada con los requisitos mínimos necesarios para el cultivo de este microorganismo y con la susceptibilidad del mismo a los cambios de temperatura, ya que en el ensayo preliminar, al hacer una siembra en profundidad, se requiere agregar el medio de cultivo sobre el microorganismo a una temperatura de al menos 50°C que permita la distribución homogénea del medio de cultivo en la caja. La incubación en microerofilia, además, produjo una mayor frecuencia de contaminación de las cajas de petri, razón por la cual siempre los resultados se confirmaron haciendo subcultivos en los medios respectivos, confirmando de esta manera los resultados con las características de las colonias y por su morfología microscópica.

P. rugosus, en estudios etnofarmacológicos previos (4-9), ha sido reportada como una planta no muy frecuentemente usada; sin embargo, en nuestra región se la utiliza para el tratamiento de infecciones y como preventivo de enfermedades (10). De allí el interés de nuestro grupo de investigación de evaluar su efecto antibacteriano e inmunoestimulante; la investigación de esta última actividad dio como

resultado que sus extractos hidroalcohólicos producían un aumento estadísticamente significativo en el recuento total de leucocitos y en los linfocitos, monocitos y eosinófilos de ratas (25). Los resultados obtenidos en la presente investigación muestran una leve actividad inhibitoria de los extractos metanólicos sobre bacterias que son causa de una amplia morbimortalidad en la población, como lo son *E. coli*, *S. aureus*, *P. vulgaris*, *S. pneumoniae* y *P. aeruginosa*, siendo mayor esta actividad frente a *E. coli*, *P. vulgaris*, y *S. pneumoniae*. De los tres solventes usados, el metanol es el de mayor polaridad, por lo que es de esperar que en el proceso de extracción arrastre más metabolitos secundarios bioactivos que los otros dos solventes; por lo tanto, la ausencia de actividad antimicrobiana, de acuerdo con los parámetros seleccionados por nosotros en la presente investigación, obtenida con el cloroformo y con los extractos etéreos, permite concluir que los principios activos antibacterianos de esta planta posiblemente requieren para su extracción solventes altamente polares como el metanol.

T. chrysantha y otras especies como *Tabebuia rosacea* tienen un uso tradicional empírico más extendido que *P. rugosus* en nuestra región (4, 28). El uso de otras especies de este género ha sido tradicional en toda América, utilizando para ello especialmente la corteza y las flores de dicha planta (6, 12, 16, 23, 24, 26, 33, 35, 36). Ningún reporte sobre ensayos realizados con las especies de plantas utilizadas en este estudio se ha encontrado en la literatura mundial. Estudios realizados para determinar los efectos sobre algunos factores de la respuesta inmune en ratas dieron como resultado que *T. chrysantha* produce un incremento estadísticamente significativo en los anticuerpos de ratas inmunizadas con glóbulos rojos de carnero (25). Los resultados del presente trabajo muestran que esta especie vegetal no tiene un amplio espectro antibacteriano, pues sólo los extractos metanólicos presentaron CMI

bajas para las 5 cepas bacterianas estudiadas, si bien estos efectos requirieron concentraciones elevadas. Al igual que para *P. rugosus*, la alta polaridad del metanol parece extraer la mayor cantidad de principios bioactivos; estudios realizados en otras especies de *Tabebuia* han demostrado que los compuestos polares tales como el lapacol y la beta lapacona tienen efectos antimicrobianos, aunque compuestos no polares como naftoquinonas también han demostrado este efecto (16, 26).

La baja potencia de los extractos de ambas especies requiere futuras investigaciones fitoquímicas biodirigidas, para aislar moléculas puras, ya que los extractos vegetales, como los obtenidos en esta investigación, contienen muchos metabolitos e impurezas.

Investigaciones como la presente tienen amplia justificación dada la enorme biodiversidad de nuestra flora colombiana, los usos tradicionales empíricos de estas dos especies y la posibilidad de hallar moléculas bioactivas. Esta búsqueda en el mundo es intensa (17, 18, 20) y ha dado resultados positivos, por ejemplo con fármacos de origen vegetal terapéuticamente útiles como anticancerosos y antipalúdicos (2, 11).

Como conclusión se puede afirmar que los efectos antibacterianos obtenidos en nuestras condiciones experimentales, con *P. rugosus* y *T. chrysantha*, no validan uno de sus usos tradicionales empíricos como es el tratamiento de heridas infectadas. Se recomienda el metanol como un solvente adecuado para futuras investigaciones de estas plantas que busquen aislar sus principios activos como moléculas puras. Es necesario profundizar en las investigaciones antibacterianas e inmunológicas de ambas especies vegetales, dado que han producido respuestas importantes en las evaluaciones preliminares que nuestro grupo de investigación ha hecho como inmunoestimulantes.

REFERENCIAS

1. Álvarez ME, Isaza G, Echeverry HM. Efecto antibacteriano *in vitro* de *Austroeupeatorium inulaefolium* H.B.K. (Salvia amarga) y *Ludwigia polygonoides* H.B.K. (Clavo de laguna). Biosalud 2005; 4:46-55.
2. American Society of Health – System Pharmacists. Antineoplastic agents. In: American Society of Health – System Pharmacists (eds). Drug information. AHFS, 2005. p.1124-1135.
3. Arango MC, Bueno JG, Isaza G, Pérez JE. Efectos antibacterianos y antimicóticos de *Alternanthera williamsi*, *Solanum dolichosepalum*, *Baccharis trinervis*, *Tabebuia chrysantha* y *Phenax rugosus*. Biosalud 2004; 3:49-55.
4. Bueno JG, Isaza G, Gutiérrez F, Carmona WD, Pérez JE. Estudio etnofarmacológico de plantas usadas empíricamente por posibles efectos inmunoestimulantes. Rev. Médica de Risaralda 2001; 7:7-11.
5. Cyted. Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el desarrollo. Técnicas Cuantitativas. Cálculo de la CMI (Concentración mínima inhibitoria). En: Cyted. Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el desarrollo (eds). Manual de técnicas de investigación; 1995. p. 69-70 y 73-74.
6. Gaynes, R. The impact of antimicrobial use on the emergence of antimicrobial resistant bacteria in hospitals. Infectious Disease Clinics of North America 1997; 11:757-765.
7. Guzmán M, Casellas JM, Sader HS. Bacterial resistance to antimicrobial agents in Latin America. The giant is awakening. Infect Dis Clin North Am. 2000; 14:67-81.
8. Hernández L, Rodríguez JM. Actividad antimicrobiana de plantas que crecen en Cuba. Rev. Cubana de plantas medicinales 2001; 2:44-47.
9. Isaza G, Bueno JG, Jaramillo R, Gutiérrez F, Guzmán AM. Estudio etnofarmacológico de plantas usadas en cuatro ciudades del centro-occidente colombiano. Medomai 2001; 2:8-9.
10. Isaza G, Bueno JG, Safón RF, Peñalosa CA. Estudio etnofarmacológico de plantas usadas empíricamente en cuatro ciudades del centro-occidente colombiano. Medomai 2001; 2:8-15.
11. Isaza CA, Isaza G, Fuentes J, Marulanda T. Plantas medicinales. En: Isaza CA, Isaza G, Fuentes J, Marulanda T (eds). Fundamentos de Farmacología en Terapéutica. 4ª ed. Pereira: Postergraph; 2002. p. 457-458.
12. Koyama J, Morita I, Tagahara TK, Hirai KI. Cyclopentene dialdehydes from *Tabebuia impetiginosa*. Phytochemistry 2000; 53:869-872.
13. Lapenna E, Medina G, Díaz L, Aguillón K, Marín H. Actividad bactericida y fungicida de algunas plantas utilizadas en la medicina tradicional venezolana. Revista del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel, 2003; 34:6-9.
14. Livermore DM. The need for new antibiotics. Clin Microbiol Infect 2004; 10 (S4):1-9.
15. Livermore DM. Minimising antibiotic resistance. Lancet Infect Dis 2005; 5:450-459.
16. Machado TB, Pinto AV, Pinto CFR, Leal CR, Silva MG, Amaral CF, et al. In vitro activity of Brazilian medicinal plants, naturally occurring naphthoquinones and their analogues, against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. International Journal of Antimicrobial Agents 2003; 21:279-284.
17. Márquez DM, Galeano E, Martínez MA. Productos naturales con actividad antimicrobiana parte I. Vitae 2003; 10:61-71.

18. Márquez DM, Galeano E, Martínez MA. Productos naturales con actividad antimicrobiana parte II. *Vitae* 2003. 11:35-41.
19. Mitscher LA, Drake S, Gollapudi GA, Okwote SK. A modern look at folkloric use of antiinfective agents. *J. Natural Products* 1978; 50: 1024-1025.
20. Murphy M. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews* 1999; 12:564-582.
21. National committee for clinical laboratory standards. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. 5th ed. Villanova, PA: NCCLS, approved Standard: M7-A5; 2000.
22. Norrby SR Nord CE, Finch R. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. *Lancet Infect Dis.* 2005; 5:115-119.
23. Otero R; Nuñez V; Jiménez SL; Fonnegra R; Osorio RG; García ME, et al. Snakebites and ethnobotany in the northwest region of Colombia. Part II: Neutralization of lethal and enzymatic effects of *Bothrops atrox* venom. *Journal of Ethnopharmacology* 2000; 71:505-511.
24. Otero R, Nuñez V, Barona J, Fonnegra R, Jiménez SL, Osorio RG, et al. Snakebites and ethnobotany in the northwest region of Colombia. Part III: Neutralization of haemorrhagic effects of *Bothrops atrox* venom. *Journal of Ethnopharmacology* 2000; 73:233-241.
25. Pérez JE; Isaza MG; Arango MC; Hincapié BL; Nieto AM; Londoño DP. Efecto de los extractos de *Phenax rugosus*, *Tabebuia chrysantha*, *Althernantera williamsi* y *Solanum dolichosepalum* sobre el leucograma y la producción de anticuerpos en ratas. *Revista médica de Risaralda* 2004; 10:13-21.
26. Portillo A, Vila R, Freixa B, Adzet T, Cañigueral S. Antifungal activity of Paraguayan plants used in traditional Medicine. *Journal of Ethnopharmacology* 2001; 76: 93-98.
27. Restrepo A, Robledo J, Leiderman E, Restrepo M, Botero D, Bedoya V. Resistencia bacteriana a antibióticos. En: Robledo J, Robledo C (eds). *Fundamentos en Medicina. Enfermedades infecciosas.* 6ª ed. Medellín: Corporación para Investigaciones Biológicas; 2003. p. 38-39.
28. Restrepo M, Quintero PR. Plantas medicinales. Colección Guías Prácticas de Biodiversidad. Vol. 3. Manizales: Publigráficas; 2003. p. 32.
29. Sabovljevic A, Sokovic M, Savovljevic M, Grubisic D. Antimicrobial activity of *Bryum argenteum*. *Fitoterapia* 2006; 77:144-145.
30. Sahm DE, Tenover FC. Surveillance for the emergence and dissemination of antimicrobial resistance in bacteria. *Infectious Disease Clinics of North America* 1997; 11:757-765.
31. Sanabria A. Biodiversidad, tradiciones e investigación al servicio de la salud. En: OPS, Ministerios del Medio Ambiente y de la Protección Social, Embajada Real de los Países Bajos (eds). *Memorias del Seminario Internacional Plantas Medicinales y sus Derivados, Bogotá 20 y 21 de noviembre 2003.* p. 22-31.
32. Sharma R, Sharma CL, Kapoor B. Antibacterial resistance: current problems and possible solutions. *Indian J Med Sci.* 2005; 59:120-129.
33. Steinert J, Khalaf H, Rimpler M. HPLC separation and determination of naphtha [2,3-b] furan-4,9-diones and related compounds in extracts of *Tabebuia avellaneda* (Bignoniaceae). *Journal of Chromatography* 1995; 693:281-287.

Jorge E. Pérez C., Gustavo Isaza M., Sandra M. Acosta

34. Tan BK, Vanitha J. Immunomodulatory and antimicrobial effects of some traditional chinese medicinal herbs: a review. *Curr Med Chem* 2004; 11:1423-30.
35. Warashina T, Nagatani Y, Noro T. Constituents from the bark of *Tabebuia impetiginosa*. *Phytochemistry* 2004; 65:2003-2011.
36. Warashina T, Nagatani Y, Noro T. Further constituents from the bark of *Tabebuia impetiginosa*. *Phytochemistry* 2005; 66:589-597.
37. Zhang JT. New drugs derived from medicinal plants. *Therapie* 2002; 57: 137-50.