

EFFECTO ANTIBACTERIANO *in vitro* de *Austro eupatorium inulaefolium* H.B.K. (*Salvia amarga*) y *Ludwigia polygonoides* H.B.K. (*Clavo de laguna*).

María Elena Álvarez L.¹
Gustavo Isaza M.¹
Harold Mauricio Echeverry L.²

RESUMEN

Los extractos alcohólicos de las hojas de *Austro eupatorium inulaefolium* H.B.K. y *Ludwigia polygonoides* H.B.K. se ensayaron *in vitro* para determinar la actividad antibacteriana y la CMI frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*.

Ambos extractos presentaron actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus*; *Austro eupatorium inulaefolium* a concentraciones de 50mg/mL y *Ludwigia polygonoides* a 25mg/mL. Ninguno de los extractos mostró actividad frente a *Escherichia coli* o *Pseudomonas aeruginosa*.

Palabras Claves: *Austro eupatorium inulaefolium* H.B.K., *Ludwigia polygonoides* H.B.K., *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, plantas antibacterianas.

ABSTRACT

The alcoholic extracts of the leaves of *Austro eupatorium inulaefolium* H.B.K. and *Ludwigia polygonoides* H.B.K. they were tested *in vitro* to determine the antibacterian activity and the CMI in response to *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudoma aeruginosa*.

Both extracts presented antibacterian activity in regards to *Staphylococcus aureus*, as well as to *Austro eupatorium inulaefolium* with 50 mg/ml concentrations and to *Ludwigia polygonoides* with 25 mg/ml. None of the extracts showed activity

in response to *Escherichia coli* or *Pseudomona aeruginosa*.

Keywords: *Austro eupatorium inulaefolium* H.B.K., *Ludwigia polygonoides* H.B.K., *Staphylococcus aureus*, *Pseudomona aeruginosa*, antibacterial plants.

INTRODUCCIÓN

La búsqueda de la capacidad curativa de las plantas es muy antigua y su uso medicinal se ha ejercido por milenios; sin embargo en las últimas décadas del pasado siglo, descendió mucho su utilización terapéutica, a expensas de los productos sintéticos. La tradición empírica de utilizar las plantas con fines medicinales se ha vuelto a incrementar en los últimos años en particular en países del tercer mundo, aun cuando esta práctica se extiende por todos los continentes. La OMS calcula que en todo el mundo, de la cuarta parte a la mitad de los productos farmacéuticos dispensados, tienen origen en plantas ya sea como extractos o como principios activos puros aislados de ellas o bien como fármacos semisintéticos. Considera además que el 80% de la población confía en las plantas medicinales tradicionales para fines terapéuticos en la atención primaria en salud (1).

Desde el advenimiento de los antibióticos obtenidos por lo general de fuentes naturales como *Penicillium* y *Streptomyces*, el uso de plantas superiores como fuente de productos antimicrobianos ha sido virtualmente inexistente (2).

1 Profesores Departamento de Ciencias Básicas para la Salud. Facultad de Ciencias para la Salud - Universidad de Caldas.

2 Estudiante de pregrado. Programa de Medicina Veterinaria y Zootecnia- Facultad de Ciencias Agropecuarias- Universidad de Caldas.

El eje cafetero cuenta con un buen número de plantas con excelente potencial medicinal y comercial; se tiene además un valioso conocimiento cultural empírico y tradicional de nuestra población, en especial la rural, que ha usado estas prácticas medicinales durante mucho tiempo; tales conocimientos deben ser validados mediante la investigación farmacológica y llegar a un uso sustentado en tales investigaciones con el fin de ampliar el arsenal terapéutico, lo que eventualmente permitiría enfrentar con nuevos medicamentos el tratamiento de diferentes patologías. El planeta tierra cuenta con más de 500.000 especies de las cuales América Latina posee la mayor variedad, alrededor de 100.000 (3); Colombia es el segundo país del mundo más rico en especies vegetales después de Brasil; poseemos alrededor de 49.000 especies vegetales y de las 110 plantas aprobadas por el INVIMA y el Ministerio de Protección Social seleccionadas de acuerdo a su uso empírico y tradición histórica (3,4), solamente existen 11 especies de flora nativa, las demás son especies exóticas; como antimicrobianas, en dicho listado, se encuentran las siguientes plantas medicinales: *Hytis capitata*, *Solanum nigrum*, *Jacaranda mimosifolia*, *Jacaranda caucana* y *Solanum lycopersicum* (3). Es evidente la necesidad de ampliar con nuestra flora, la oferta de nuevas moléculas antibacterianas.

El aislamiento de sustancias bioactivas provenientes de productos naturales especialmente plantas para la elaboración de nuevos medicamentos, ha aumentado en los últimos años, debido en gran parte a la gran biodiversidad y a problemas de toxicidad y altos costos de los fármacos sintéticos (4).

Austro eupatorium inulaefolium con usos empíricos como tratar "enfermedades de la garganta" y *Ludwigia polygonoides* para el "tratamiento de la gripe", están entre las diez plantas más usadas empíricamente como medicinales en el área rural del municipio de Villamaría y en la zona urbana de los municipios de Manizales y Chinchiná. (5).

Austro eupatorium inulaefolium ha sido empleada en el control de ectoparásitos (garrapatas, piojos y nuches) en animales especialmente en bovinos), también se ha usado como insecticida (6). Estudios etnobotánicos informan de usos como antiinflamatorios y efectos antibacterianos diversos (7).

Muy poca información se encuentra sobre estudios realizados con estas dos especies vegetales. Un estudio hecho *in vitro* encontró que una especie similar tiene efectos sobre *Plasmodium falciparum* (8). Los extractos acuosos de *Austro eupatorium inulaefolium* H.B.K y *Jussiae polygonoides* H.B.K fueron evaluados por investigadores de esta Línea en ratas inmunizadas con una suspensión de glóbulos rojos de carnero al 20%. Se analizó el leucograma y los títulos de anticuerpos hemaglutinantes para valorar la respuesta humoral. El tratamiento vía oral de extractos acuosos de ambas especies no produjo cambios estadísticamente significativos en los valores del leucograma y en la respuesta humoral en comparación con el grupo control. Resultados positivos en ambos parámetros los produjeron otras especies como la *Phenax rugosus* y *Tabebuia chrysantha* (9,10).

Actualmente se encuentran serios problemas de resistencia a los medicamentos antimicrobianos, la cual se presenta con diversos microorganismos dentro de los cuales cabe destacar *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, en especial en el ámbito hospitalario; mientras las infecciones por *Staphylococcus* no adquiridas en hospitales pueden tratarse con los antibióticos derivados betalactámicos, las infecciones adquiridas en hospitales son, en su gran mayoría, resistentes a estos antibióticos y requieren tratamientos alternativos más costosos y, muchas veces, de mayor toxicidad. La resistencia se extiende a antimicóticos, antimaláricos y antivirales, haciendo cada vez menos efectivos los viejos medicamentos (11,12). Este problema de la resistencia se ha extendido igualmente al campo de la terapéutica veterinaria pues el uso

indiscriminado de antibióticos y a veces su adición en los concentrados usados en la alimentación de animales, ha determinado que muchas bacterias como *E. coli* hayan adquirido cada vez mayor resistencia (13).

En la bibliografía científica consultada no se encuentran investigaciones que validen los conocimientos populares empíricos acerca de la utilidad antimicrobiana de *Ludwigia polygonoides* y *Austro eupatorium inulaefolium* H.B.K ni se han encontrado referencias sobre su utilidad como antibacterianas (14, 15, 16, 17). La selección de las plantas se realizó basándose en previas investigaciones etnofarmacológicas y de laboratorio realizadas por nuestra línea de investigación (5, 10, 18, 19).

La presente investigación validó experimentalmente los usos de *Austro eupatorium inulaefolium* H.B.K. y *Ludwigia polygonoides* H.B.K. mediante pruebas *in vitro* buscando efectos antibacterianos frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*.

METODOLOGÍA

Preparación de los Extractos:

El material vegetal se identificó y comparó con la muestra de referencia del Herbario de la Universidad de Caldas donde se encuentran registrados *Austro eupatorium inulaefolium* con número 010557 y *Ludwigia polygonoides* 014804; se recolectaron en la central de abastos de la ciudad de Manizales.

El material vegetal se lavó con agua bidestilada y secado en estufa a una temperatura de 40°C; 100 g de las hojas de *Austro eupatorium inulaefolium* y *Ludwigia polygonoides*, fueron macerados con 200 mL de etanol al 96%. Los extractos se filtraron y evaporaron en rotavapor a 40°C hasta sequedad y fueron guardados en congelador para los ensayos biológicos (20).

Preparación de las cepas bacterianas:

Las cepas utilizadas en el trabajo fueron adquiridas en el Instituto Nacional de Salud – Ministerio de Salud, Bogotá, República de Colombia. - con los siguientes códigos: *Staphylococcus aureus* ATCC (American Typed Culture Collective) 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Las cepas liofilizadas de *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* se reconstituyeron con 1 mL de caldo nutritivo y sembradas en agar Mac Conkey; *Staphylococcus aureus* se reconstituyó con 1 mL de caldo nutritivo y sembrado en agar sangre, se incubó a 37°C por 24 horas (20).

Preparación del Patrón de McFarland:

Es una escala de turbidez elaborada con una mezcla de BaCl₂ 0,048 M y H₂SO₄ 0,36 M. El cloruro de bario proporciona la turbidez, el cual va en cantidad creciente mientras el ácido sulfúrico va disminuyendo la proporción. Cada uno de los tubos patrón de acuerdo con la turbidez representa una concentración reconocida de bacterias. Esto hace posible comparar una emulsión de bacterias en la que no se conoce el número de ellas con el tubo del patrón de McFarland que más se asemeje, se realiza su lectura por medio de espectrofotometría para determinar la absorbancia o la transmitancia (21).

En la presente investigación se utilizó como referencia para la preparación de las suspensiones bacterianas el tubo número 0,5 en la escala de MacFarland el cual tiene una absorbancia entre 0,08 a 0,1 a una longitud de onda de 560 nm y equivale a 1.5x10⁸ UFC/mL.

Método 1:

100 mg, de cada uno de los extractos se diluyeron con 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO).

Cada una de las bacterias se suspendió en 5 mL de solución salina estéril usando como referencia el tubo número 0,5 en la escala de MacFarland lo que equivale a 1.5×10^8 UFC/mL; se mezclaron 1 mL de la suspensión bacteriana y 20 mL de agar Müeller-Hinton fundido a temperatura de 45°C y a un pH entre 7 a 7,2; después de solidificado el medio se abrieron dos pozos con un sacabocados de 0,5 cm de diámetro y 0,4 cm de profundidad; una vez sellado el fondo con una gota de agar, se colocó en cada pozo 20 iL de cada uno de los extractos a una concentración de 100 mg/mL.

En una caja independiente se mezclaron 1 mL de la suspensión bacteriana y 20 mL de agar Müeller-Hinton y se perforaron dos pozos para los controles, positivo con gentamicina 10 µg/mL y negativo con DMSO. Incubados a 37°C por 24 horas, se evaluó el crecimiento de los microorganismos alrededor del pozo a las 24 y 48 horas. Todas las pruebas se realizaron por duplicado. (22).

Se realizaron controles de viabilidad de cada una de las cepas bacterianas y de esterilidad de los extractos y del DMSO.

Los halos de inhibición se midieron en milímetros por medio de la regla utilizada en la técnica de difusión de disco por el método de Kirby Bauer, y se determinó el porcentaje de inhibición de los extractos aplicando la siguiente fórmula (23):

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{\text{Diámetro de la muestra (mm)} - \text{Diámetro del blanco}}{\text{Diámetro del control (mm)} - \text{Diámetro del blanco}}$$

Diámetro del blanco = Halo de inhibición de DMSO en mm
Diámetro del control = Halo de inhibición de gentamicina en mm

Método 2:

Se realizó una suspensión bacteriana de la misma forma que en el método uno. 100 mg de cada uno de los extractos se diluyeron con 1 mL de DMSO, se colocaron en una caja de Petri estéril, adicionando 20 mL de agar Müeller-

Hinton a temperatura de 45°C, una vez solidificados se hicieron tres pozos con un sacabocados de 0,5 cm de diámetro y 0,4 cm de profundidad. En cada pozo se colocaron 20 iL de suspensión bacteriana de cada una de las cepas a evaluar.

Incubados a 37°C, se realizó la lectura a las 24 y 48 horas. Todas las pruebas se realizaron por duplicado.

En una caja independiente se mezclaron 1 mL de la suspensión bacteriana y 20 mL de agar Müeller-Hinton a la cual se le hicieron 2 pozos para los controles, positivo con gentamicina 10 µg/mL y negativo con DMSO. Se realizó control de esterilidad de los extractos, control de esterilidad del DMSO y control de viabilidad de las diferentes cepas. (24)

Los resultados se obtuvieron mediante determinación visual de crecimiento o no de las cepas bacterianas en los pozos.

Medición de la MIC:

100mg del extracto de cada planta fueron disueltos en 1 mL de DMSO.

Se hicieron diluciones decrecientes a partir de la solución anterior (solución madre) en una relación 1:2 en tubos independientes hasta obtener un tubo con una concentración de 6,125 mg/mL. Las diluciones quedaron 100mg/mL, 50 mg/mL, 25 mg/mL, 12,5 mg/mL y 6,125 mg/mL.

A 5 tubos con 4,8 µL de caldo Müeller-Hinton, se le agregó 100 iL de una de las diferentes concentraciones de los extractos y 100 µL de la suspensión bacteriana a probar (20).

Se efectuó un control positivo con Gentamicina 10 µg/mL y negativo con DMSO, controles de esterilidad de los extractos, del DMSO y control de viabilidad de las diferentes cepas.

Las pruebas se realizaron para los dos extractos y para cada una de las bacterias que mostraron actividad en los métodos 1 y 2; todos los ensayos se realizaron por duplicado.

RESULTADOS

En la tabla 1 se muestran los resultados obtenidos en el diámetro de sensibilidad y porcentaje de inhibición de los extractos alcohólicos de las hojas de *Austro eupatorium inulaefolium* y *Ludwigia polygonoides* sobre *Staphylococcus aureus*; los extractos no tuvieron actividad antibacteriana sobre *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*; el control positivo mostró una actividad inhibitoria de 16 mm sobre *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*; el control negativo no tuvo actividad inhibitoria sobre ninguna de las cepas bacterianas en estudio.

En la tabla 2 los resultados obtenidos por el método dos muestran la sensibilidad de *Staphylococcus aureus* y la resistencia de *Escherichia*

coli y *Pseudomonas aeruginosa* a los extractos alcohólicos de las hojas de *Austro eupatorium inulaefolium* y *Ludwigia polygonoides*; el control positivo presentó una actividad inhibitoria sobre *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*; el control negativo no tuvo actividad inhibitoria sobre ninguna de las cepas bacterianas en estudio.

En la técnica de Concentración Mínima Inhibitoria (Tabla 3) aparecen los valores en los cuales *Staphylococcus aureus* es inhibido por los extractos alcohólicos de las hojas de *Austro eupatorium inulaefolium* 50mg/mL y *Ludwigia polygonoides* 25mg/mL.

Los controles mostraron las respuestas esperadas: la gentamicina inhibió el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, el DMSO no mostró actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus*; los extractos no presentaron ningún tipo de contaminación bacteriana o fúngica, y *Staphylococcus aureus* presentó viabilidad.

Tabla 1. Evaluación de la actividad antibacteriana de los extractos alcohólicos de *Austro eupatorium inulaefolium* y *Ludwigia polygonoides*, determinada por el diámetro y el porcentaje de inhibición.

EXTRACTO	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Austro eupatorium inulaefolium</i>	12 mm / 53,8 %	5 mm	5 mm
<i>Ludwigia polygonoides</i>	16 mm / 81,6 %	5 mm	5 mm
Gentamicina	18 mm	18 mm	18 mm
DMSO	5 mm	5 mm	5 mm

Tabla 2. Evaluación de la actividad antibacteriana de los extractos alcohólicos de *Austro eupatorium inulaefolium* y *Ludwigia polygonoides*.

BACTERIA	EXTRACTO O CONTROL	RESULTADO
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Austro eupatorium inulaefolium</i>	Sensible
	<i>Ludwigia polygonoides</i>	Sensible
	Control Positivo Gentamicina	Sensible
	Control Negativo DMSO	Sin crecimiento
<i>Escherichia coli</i>	<i>Austro eupatorium inulaefolium</i>	Resistente
	<i>Ludwigia polygonoides</i>	Resistente
	Control Positivo Gentamicina	Sensible
	Control Negativo DMSO	Sin crecimiento
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Austro eupatorium inulaefolium</i>	Resistente
	<i>Ludwigia polygonoides</i>	Resistente
	Control Positivo Gentamicina	Sensible
	Control Negativo DMSO	Sin crecimiento

Tabla 3. Concentración Mínima Inhibitoria de los extractos alcohólicos de *Austro eupatorium inulaefolium* y *Ludwigia polygonoides* sobre *Staphylococcus aureus*

CONCENTRACIÓN DEL EXTRACTO	100 mg/mL	50 mg/mL	25 mg/mL	12,5 mg/mL	6,25 mg/mL
<i>Austro eupatorium inulaefolium</i>	+	+	-	-	-
<i>Ludwigia polygonoides</i>	+	+	+	-	-

+ Sensible
- Resistente

DISCUSIÓN

La gran cantidad de metabolitos secundarios en las plantas ofrece una gigantesca posibilidad de hallar moléculas bioactivas entre las cuales las que tengan actividad antimicrobiana son muy promisorias y buscadas afanosamente, en especial por el alarmante incremento de la resistencia bacteriana (25,26).

Si bien las plantas superiores no han aportado antibióticos que tengan amplia comercialización, la industria farmacéutica y la comunidad científica- basados en gran parte en los exitosos resultados de su uso tradicional en la atención primaria en salud- están estimulando esta búsqueda desde dichas fuentes dado que la obtención de antibióticos se ha disminuido sustancialmente a partir de hongos, o desde las síntesis química que poco han aportado en los últimos 20 años. Incluso en países muy desarrollados en la síntesis química, diversos autores llaman la atención sobre la importancia de recurrir a fuentes naturales, entre ellas las plantas, para explorar nuevas moléculas con actividad antiinfecciosa (27, 28).

El 90% de microorganismos del género *Staphylococcus* de ambiente hospitalario son resistentes a los betalactámicos y cada vez más cepas son resistentes a meticilina, lo cual deja de elección a la vancomicina o alternativos como dalfopristina-quinupristina o el linezolid para el tratamiento de las infecciones hospitalarias causadas por estas cepas (3). Pero el incremento de reportes de *Staphylococcus* resistentes a la meticilina y a vancomicina (29) enfrenta a la

comunidad científica al reto de buscar fuentes alternativas para el tratamiento de estos agentes infecciosos. Una promisoriosa alternativa es la búsqueda en fuentes naturales, pues en éstas se han encontrado muchas plantas con efectos antibacterianos, como lo demuestran investigaciones hechas en nuestra región (24, 30) y las múltiples que se publican periódicamente en revistas internacionales demostrativas del interés en todos los continentes para evaluar su flora.

El resultado obtenido en la presente investigación de la actividad antibacteriana de los extractos alcohólicos de *Austro eupatorium inulaefolium* y *Ludwigia polygonoides* frente a *Staphylococcus aureus* podría explicar el uso empírico que tienen en nuestras comunidades rurales por ser *Staphylococcus aureus* un frecuente contaminante de heridas (5, 19).

Ambas especies investigadas por esta línea de investigación (10) no presentaron efectos significativos en la producción de anticuerpos ni en el recuento leucocitario de ratas inmunizadas con una suspensión de glóbulos rojos de carnero al 20 %; por lo tanto su uso tradicional empírico podría explicarse por un posible efecto antibacteriano en particular sobre *Staphylococcus aureus*.

Los resultados del presente trabajo permiten afirmar que *Austro eupatorium inulaefolium* H.B.K. y *Ludwigia polygonoides* H.B.K. son productoras de sustancias bioactivas con efecto antibacteriano contra *Staphylococcus aureus*. Estas especies se sumarían a las ya reportadas previamente por la literatura científica como

especies promisorias por su potencial bioactivo frente a dicha bacteria como son *Phellinus linteus*, *Puerariae radix*, *Melaleuca alternifolia* y *Rhus coriaria* (30, 31, 32, 33) y muchas más que se evalúan en casi todo el mundo en una intensa y afanosa búsqueda de antibióticos obtenibles de plantas (34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41).

En nuestras condiciones experimentales *Austroeupeatorium inulaefolium* y *Ludwigia polygonoides* no mostraron efecto antibacteriano contra *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*; sin embargo no se puede descartar que pueden tener efectos sobre éstas y otras bacterias a dosis más altas a las empleadas en el presente trabajo; esto podría evidenciarse con estudios

adicionales utilizando fracciones separadas por técnicas cromatográficas.

Dado que *Staphylococcus aureus* es un microorganismo patógeno de una alta morbilidad y mortalidad (26, 29) creemos que debería estudiarse con más profundidad, por ejemplo aislando fracciones o principios activos puros y evaluándolos en ésta y otras bacterias.

AGRADECIMIENTOS:

A Jorge Ariel Henao, laboratorio de farmacología, Amilbia Arango y Jorge Julio Ramirez, laboratorio de microbiología, por su excelente y valiosa colaboración.

BIBLIOGRAFIA

1. SANABRIA A. Biodiversidad, Tradiciones e investigación al servicio de la salud. Memorias del Seminario Internacional de Plantas Medicinales y sus Derivados: OPS, Ministerio del Medio Ambiente y de la Protección Social, Embajada Real de los Países Bajos. Bogotá, 2003; pp 22-31.
2. MURPHY COWAN M. Plant Products as Antimicrobial Agents. Clin. Microbiol. Rev., 1999. 12:564-582.
3. ISAZA CA, ISAZA G, FUENTES J, MARULANDA T. EN: ISAZA CA, ISAZA G, FUENTES J, MARULANDA T (EDS.). Fundamentos de Farmacología en Terapéutica. 4 ed; Postergraph. Dosquebradas (Risaralda-Colombia), 2002. pp 711-721.
4. Seminario Internacional Plantas Medicinales y sus Derivados. Memorias del Seminario Internacional Plantas Medicinales y sus Derivados; Bases para un Desarrollo Reglamentario Armónico e Integral. Santafé de Bogotá: Despacho Viceministro de Ambiente - Grupo Mercados Verdes, 2003. pp 11-13.
5. BUENO JG, ISAZA G, PÉREZ JE, ET AL. Estudio Etnofarmacológico de Plantas Usadas Empíricamente por Posibles Efectos Inmunoestimulantes. Rev Med de Risaralda. 2001; 7:7-11.

6. GIRALDO JE. Etnoveterinaria. Memoria de los Encuentros de Saberes sobre el Uso de las Plantas Medicinales en la Salud Animal en la Zona de Nogales, Buga (Valle). Instituto Mayor Campesino. Red de Reservas Naturales de la Sociedad Civil, 2001. pp 11-12.
7. ARANGO S. Estudios etnobotánicos en los Andes Centrales (Colombia): Distribución del conocimiento del uso de las plantas según características de los informantes. Center for Conservation and Sustainable Development, Missouri Botanical Garden. Disponible en: <http://www.lyonia.org/viewArticle.php?articleID=315>, 2003.
8. BLAIR S, MESA J, CORREA A, ET AL. Antimalarial activity of neurolepin B and derivatives of *Eupatorium inulaefolium* (Asteraceae); Antioquia: Grupo Malaria Facultad de Medicina Universidad de Antioquia; Disponible en: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/ry.fcgi?cmd=Retrieve&db=pubmed&dopt=Abstract&list_uids=12116880, 2002.
9. PEREZ JE, ISAZA G, BUENO JG, ARANGO MC, Y COL. Efecto de los extractos de *Phenax rugosus*, *Tabebuia chrysantha*, *Althernantera williamsii* y *Solanum dolicossepalum* sobre el leucograma y la producción de anticuerpos en ratas. Rev Med de Risaralda, 2004. 10:13-20.
10. BUENO JG, ISAZA G, ARANGO MC; et al. Efecto de los Extractos de *Austroeupatorium inulaefolium* H.B.K (Salvia amarga) y *Jussiae polygonoides* H.B.K (Clavo de laguna) sobre el leucograma y la producción de anticuerpos en ratas. Biosalud, 2004. 3:42-48.
11. AHFS (ED). Drug Information. American Society of Health System Pharmacists. 2005; pp 48-887.
12. WHITWORTH JA. The need for new drugs: A response. Australian Prescriber, 2004. 27:137-138.
13. Biology Cabinet Organization. Institute of biological research. Disponible en: <http://www.biocab.org/Mutantes.html>
14. Secretaría Ejecutiva del Convenio Andrés Bello-SECAB-(ed). Especies vegetales promisorias de los países del Convenio Andrés Bello. Tomos I a XII. Editorial Guadalupe Ltda., Bogotá, Colombia, 1998.
15. NAPRALERT PROFILE FOR *Austroeupatorium inulaefolium* 06/25/04
NAPRALERT PROFILE FOR *Jussiae polygonoides* 06/25/04
NAPRALERT PROFILE FOR *Ludwigia polygonoides* 07/18/05
16. Gupta MP (ed). 270 Plantas medicinales Iberoamericanas. CYTED: Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo. 1ed. ed. Presencia Ltda, Santafé de Bogotá, 1995.

17. GÓMEZ A, RIVERA H. Descripción de malezas en plantaciones de café. Centro Internacional de Investigaciones de café-CENICAFE, Chinchiná ,1987. pp:481.
18. ARANGO MC, DUQUE N, ISAZA G. Evaluación de la actividad antimicrobiana de 24 arvenses (malezas) del Eje Cafetero. Medicina de Caldas, 2001. 15:7-11.
19. ISAZA G, BUENO JG, JARAMILLO RAFAEL, ET AL. Estudio Etnofarmacológico de Plantas Usadas Empíricamente en 4 Ciudades del Centro - Occidente Colombiano. MEDOMAI, 2001. 2: 8-9.
20. Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo. CYTED. Manual de Técnicas de Investigación. Técnicas Cuantitativas. Calculo de la CMI (Concentración Mínima Inhibitoria), 1995. pp:69-70 y 73-74.
21. KONEMAN ET AL. Diagnóstico Microbiológico; Quinta edición, Ed Médica Panamericana S. A. 1999; pp 4-803.
22. BERNARD H. Diagnóstico y tratamiento clínico para el laboratorio. Ed. Salvat S.A. 8 ed. 1990.
23. VILLANOVA P. NCCLS. Performance Standars for Antimicrobial Susceptibility Testing. Third informational supplement. M 100-53. NCCLS. 1991.
24. DIAZ HE, RAMIREZ LE. Evaluación de la actividad antibacteriana de los extractos y fracciones del Ruibarbo, *Rumex conglomeratus*. Tesis (Maestría en Microbiología). Pontificia Universidad Javeriana. Universidad Católica de Manizales. Programa de Postgrado en Microbiología; 1998; pp 67.
25. Mukherjee PK. Quality control of herbal drugs. Business Horizons, New Delhi-India. 2002; p 90-111.
26. Jawetz et al. Microbiología Médica; XVII Edición, Ed Manual Moderno. 2002; p163-172.
27. SIVIN N. Exploiting Medicinal Plants. En: Medicinal Plants. University of Pennsylvania Press, Pha. 1998.
28. Centro de Monitoreo de la Conservación Mundial del Programa Ambiental de las Naciones Unidas. El primer Atlas Mundial de la Biodiversidad: El Estado de los Recursos Vivientes de la Tierra para el Siglo XXI. University of California Press. Disponible en: <http://www.actionbioscience.org/esp/biodiversity/plotkin.html>, 2002.
29. Cercenado E, Sánchez C, Alcalá L, Bouza E. Grupo de Trabajo para el estudio

- de estafilococos. Situación actual de la resistencia de *Staphylococcus* en España. Cuarto estudio nacional (1996). Rev Clin Esp., 1997. 197:12-18.
30. Arango MC, Bueno JG, Isaza G, Perez Jorge E: Efectos antibacterianos y antimicóticos de *Alternanthera williamsii*, *Solanum dolichosepalum*, *Baccharis trinervis*, *Tabebuia chrysantha* y *Phenax rugosus*. Biosalud, 2004. 3:49-55.
 31. Kim S, Fung DY, Antibacterial effect of crude water-soluble arrowroot (*Puerariae radix*) tea extracts on food-borne pathogens in liquid medium. Lett Appl. Microbiol, 2004. 39:319-25 .
 32. Christoph F, Kaulfers PM, Stahl E. In vitro evaluation of the antibacterial activity of beta-triketones admixed to *Melaleuca* oils. Planta Med, 2001. 67:768-71.
 33. Nasar SM, Halkman AK. Antimicrobial effect of water extract of sumac (*Rhus coriaria* L.) on the growth of some food borne bacteria including pathogens. Int. J. Food Microbiol., 2004. 97:63-9.
 34. Hur JM, Yang CH, Han SH, et al. Antibacterial effect of *Phellinus linteus* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Fitoterapia, 2004. 75:603-5.
 35. Khan MR, Omoloso AD. Antibacterial activity of *Galeola foliata*. Fitoterapia, 2004. 75:494-496.
 36. Setzer WN, Vogler V, Schmidt JM, Leathy JG and Rives R (USA). Antimicrobial activity of *Artemisia douglasiana* leaf essential oil. Fitoterapia, 2004; 75:192-200.
 37. Ramezani M, Fazli-Bazzaz BS, Saghafi-Khadem F, Dabaghian A. Antimicrobial activity of four *Artemisia* species of Iran. Fitoterapia, 2004. 75:201-203.
 38. Petrovic J, Stanojkovic LC. Antibacterial activity of *Cichorium intybus*. Fitoterapia, 2004. 75:737-739 .
 39. Sasikumar JM, Pichai AD, Doss a: Antibacterial activity of *Eupatorium glandulosum* leaves. Fitoterapia, 2005. 76:240-243.
 40. Hernandez L, Rodriguez M. Actividad antimicrobiana de plantas que crecen en Cuba. Rev. Cubana Plant. Med., 2001. 2:44-47.
 41. Elegami AA, Nima EL, Tohami MS, Muddathir AK. Antimicrobial activity of some species of the family Combretaceae. Phytother Res, 2002. 16:555-561.