

“*Euphorbia tirucalli*” Y COMPORTAMIENTO DEL EXTRACTO ETANÓLICO Y SUS FRACCIONES FRENTE A ENSAYOS BIOLÓGICOS

Resumen

El presente trabajo pretende contribuir a la búsqueda y detección de metabolitos secundarios presentes en la especie *Euphorbia tirucalli*, así como determinar la actividad antimicrobiana y antimicótica que podría tener su extracto etanólico y sus fracciones cromatográficas, frente a *E.coli*, *S. aureus* y *C. albicans*.

La recolección del material vegetal se realizó en las instalaciones del Centro de Investigaciones Agrotropicales (CIAT) ubicado en la ciudad de Palmira. La clasificación taxonómica de la planta se realizó en el Herbario de la Universidad del Quindío

(HUQ). La obtención del extracto se realizó por extracción sólido-líquido, en este caso percolación. Para la obtención de las fracciones cromatográficas se utilizó cromatografía en columna, empleando sílica gel como fase estacionaria, y la fase móvil se realizó en ascenso de polaridad, empezando con diclorometano y terminando con metanol. La determinación de la actividad biológica se realizó por técnica de microtitulación en placa usando resazurin como indicador.

Durante el desarrollo del trabajo se logró determinar la presencia de algunos metabolitos secunda-

¹² Estudiante Química Universidad del Quindío.

¹³ Estudiante Maestría en Ciencias Biomédicas.

¹⁴ Catedrático programa Tecnología en Regencia de Farmacia Centro Regional Pereira.

rios de gran importancia desde el punto de vista farmacológico como lo son: alcaloides, saponinas, esteroides y/o triterpenos, cardiotónicos y lactonas terpénicas. Así como también la determinación de la actividad antimicrobiana que poseen algunas fracciones cromatográficas del extracto etanólico,

frente a *E. coli* y *S. aureus*, en especial cuatro muestras las cuales evidencian actividad bactericida frente a estas cepas. También se determinó la casi nula acción antimicótica que posee dicho extracto y fracciones cromatográficas frente a *C. albicans*.

Palabras claves:

Metabolitos, *Euphorbia tirucalli*, Cromatografía en columna, Percolación, Actividad biológica.

Keywords:

Metabolites, *Euphorbia tirucalli*, Column chromatography, Percolation, Biological activity.

Introducción

Por su participación en los ciclos biológicos, las plantas son indispensables para la supervivencia del hombre. La información obtenida en la investigación de compuestos de origen vegetal, ayuda a comprender la fisiología y bioquímica de los organismos que los producen y permiten su mejor aprovechamiento con fines científicos y económicos (Domínguez, 1985). Los productos naturales de origen vegetal son recursos renovables para el hombre. Le proporcionan alimentos para la subsistencia, fibras textiles para vestirse y material para construir viviendas, le deleitan por su aroma y colorido; le curan o intoxican, según sus propiedades; y regeneran el aire que respira.

En todas las épocas cientos de plantas han sido utilizadas en la medicina. Pero la ciencia moderna analizando y estudiando los efectos terapéuticos de las plantas, quiere precisar, comparar y clasificar las diversas propiedades, no con el fin de disminuir esta confianza en la naturaleza, sino para agrupar a las plantas de efectos similares, para conocer los principios activos responsables de cortar, aliviar o curar enfermedades, separarlos de las plantas que lo contienen, determinar sus estructuras químicas, procurar su síntesis, proponer modificaciones estructurales en busca de una mayor actividad y, finalmente, dar a conocer a la humanidad los resultados de los estudios (Domínguez, 1985). Los prin-

cipios activos de las plantas, están constituidos por uno o varios metabolitos secundarios cuya utilización y dosificación como medicamento es de gran importancia para el ser humano. Entre los metabolitos secundarios más importantes se encuentran: alcaloides, flavonoides, quinonas, esteroides y/o triterpenos, taninos, glucósidos cardiotónicos, cumarinas y sesquiterpenlactonas (Evans, 1986).

Por lo tanto, lo que se busca con este trabajo es contribuir a la búsqueda de nuevos compuestos de origen vegetal, de los cuales el ser humano pueda aprovechar sus beneficios farmacológicos al

máximo. Así como la búsqueda y detección de los metabolitos secundarios presentes en la especie *Euphorbia tirucalli*, los cuales podrían poseer propiedades farmacológicas. En este caso se va a realizar un tamizaje fitoquímico preliminar al extracto etanólico de la especie *E. tirucalli* y la determinación de la capacidad antimicrobiana que posee el extracto etanólico y las fracciones cromatográficas de esta especie, frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. También se va a llevar a cabo la determinación de las propiedades antimicóticas que posee dicho extracto y/o fracciones, frente a *Candida albicans*.

Materiales y métodos

1. Materia prima.

La recolección de la planta se realizó el día 15 de septiembre a las 8:30 a.m., en las instalaciones del Centro de Investigaciones Agrotropicales (CIAT), el cual se encuentra ubicado en la ciudad de Palmira, su cabecera está situada a 30 31'48" de altitud norte 760 81'13" de longitud de oeste de Greenwich. Sus pisos térmicos van desde frío hasta la zona calida del Valle del río Cauca, su temperatura media es de 23 0C y su altura sobre el nivel del mar es de 1.001m.

2. Tratamiento de la muestra. La parte de la planta que se utilizó para la extracción fue el tallo.

La muestra se secó a 40 0C en una incubadora de aire circulante marca Gallenkamp, posteriormente la muestra se molió en un molino victoria con motor *siemens*, y finalmente el tamaño de la partícula de muestra se disminuyó utilizando un tamiz de número de malla 100.

3. Obtención del extracto etanólico y las fracciones cromatográficas.

La obtención del extracto se realizó por extracción sólido-líquido, en este caso percolación. Para la obtención de las fracciones cromatográficas se utilizó cromatografía en columna, empleando sílica gel como fase estacionaria, y la fase móvil se realizó en ascenso de polaridad, empezando con diclorometano y terminando con metanol.

4. Preparación de fracciones y extractos para las pruebas biológicas.

Se tomaron 2mg de extracto o fracción, se depositaron en un tubo eppendorf de 1mL, se le adicionó una gota de dimetilsulfóxido (DMSO), en caso de que el extracto o fracción no disolviera, se calentaba el tubo en baño de María a 500C durante 4 minutos. Posteriormente se llevó al afore de 1mL con agua estéril.

5. Obtención de los microorganismos para las pruebas biológicas.

Se utilizaron para la evaluación de la actividad antimicrobiana de la especie *S. trifasciata*, los siguientes microorganismos:

- *Staphylococcus aureus* (*S. a*) aislado clínico
- *Escherichia coli* (*E. c*) ref. BL 21
- *Candida albicans* (*C. a*) ref. ATCC 90028

El *Staphylococcus aureus* se obtuvo de aislados clínicos identificados en el Centro de Investigaciones en Ciencias Biomédicas de la Universidad del Quindío. Se recultivaron en agar sangre, incubadas a 37°C durante 24 horas. En relación a *Candida albicans* fue cultivada en Agar Sabouraud a 37°C durante 48 horas.

6. Preparación de la solución Resazurin

La solución Resazurin fue preparada por la disolución de un comprimido de 10mg en 10mL de agua destilada estéril. Se mezcló hasta obtener una solución completamente homogénea.

7. Preparación del inóculo.

- a. Se preparó y esterilizó el medio de cultivo
- b. Se incubó a una temperatura de 37°C por 12 h.
- c. Se tomó el asa estéril e inoculó un par de colonias por especie en tubos de ensayo que contenían 3 mL de caldo de soya tripticasa preparado con anterioridad para evitar contaminación.
- d. Se incubó a 37°C por 2 h.

e. La suspensión utilizada para *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* y *Escherichia coli* fue 5×10^5 ufc/ml, Se estandarizó a una D.O. de 0.4 a 620 nm.

Se sembró en placas NUNC estériles de 96 pozos, las placas fueron incubadas a 37°C durante 24 horas. Se le agregaron 100µL de las soluciones de los extractos o fracciones previamente preparadas, posteriormente se le adicionaron 50µL de solución salina y 5µL de solución indicadora resazurin. Se agregó 10 µL de microorganismos a los pozos. Las concentraciones finales de los extractos o fracciones, con las cuales se midieron la actividad antibacteriana y antifúngica fueron de 1000ppm y 500ppm, esto se realizó por duplicado. La medida del control positivo para *Candida Albicans* se efectuó con un antibiótico/antimicótico que fue Amfotericina B y Estreptomicina, mientras que los controles positivos para *S. aureus* y *E. coli* se realizaron con ceftriaxona. Mientras al control negativo simplemente se le adicionó medio, las bacterias y el indicador. Todo el experimento se llevó a cabo teniendo en cuenta las normas bioseguridad y bioética. Se observó la actividad biológica de los extractos y fracciones a las 6 y 24 horas, tomando imágenes para su posterior digitalización en el programa UN-SCAN-IT 5.3. Este programa tiene como función pasar las imágenes a escala de grises, obteniendo el número de píxeles por cada pozo, la técnica de análisis estadístico utilizada fue ANOVA de dos factores con interacciones, para analizar el efecto de la concentración y el tiempo en número de píxeles, para el extracto y las fracciones. Los datos obtenidos se calcularon en el programa STAT-GRAPHICS PLUS 5.1.

8. Resultados y discusión.

Tabla No. 1. Resultado de pruebas fitoquímicas

SUSTANCIA	PRUEBA	RESULTADO			
		Solubles en CHCl ₃	Solubles en CHCl ₃ -ETOH	Alcaloides fenólicos	Amonio 40 u óxidos de aminos
Alcaloides	Dragendorff	+++	+++	-	-
	Mayer	+++	+	-	-
	Valser	+++	+	-	-
	Scheibler	+++	+++	-	-
Flavonoides	Cianidina	-			
	HCL	-			
Nafto y/o Antraquinonas	Borntragger	-			
Taninos	FeCl ₃	-			
Saponinas	Espuma	++			
Esteroides y/o Triterpenos	CCD2 Lieberman-Burchard	+++			
Cumarinas	Placa CCD	-			
	Hidroxamato Fe ³⁺	-			
Cardiotónicos	Baljet	+++			
	Lieberman-Burchard	+++			
	Salkowaki	+++			
	Keller-Kiliani	++			
Lactonas sesquiterpénicas	Placa CCD Vainillina	++			

Fuente: Los Autores

Por medio del tamizaje fitoquímico preliminar se pudo determinar la presencia de algunos metabolitos secundarios, tales como: alcaloides, esteroides y/o triterpenoides, cardiotónicos, lactonas terpénicas y saponinas. Así como la ausencia de flavonoides, naftoquinonas y/o antraquinonas, cumarinas volátiles y taninos. Al comparar los metabolitos encontrados en *E. Tirucalli* y relacionarlos, nos concuerda con los estudios previos de la familia y de la especie. Por lo que algunos de estos metabolitos secundarios aún no se le conocen su funcionalidad en las plantas, se han creado diferentes métodos

para encontrar la utilidad farmacológica de cada una de ellos y así poder hallar el principio activo. En la actualidad no existen trabajos acerca de alcaloides aislados de esta especie, pero por las pruebas hechas en este trabajo se pudo detectar la presencia de este tipo de metabolitos en muy buena proporción.

Con respecto a las pruebas realizadas para la identificación de alcaloides hay que recordar que los reactivos más sensibles (Wagner y Bouchardat), no son los que reaccionan con mayor especificidad

con los alcaloides, ya que tienen la capacidad de reaccionar con muchas sustancias además de los alcaloides, aunque en los resultados obtenidos en el laboratorio se pudo observar que el reactivo de Bouchardat no mostró resultados muy sensibles, ya que dio resultados positivos dudosos, caso contrario a los resultados obtenidos con Wagner. En cuanto a los reactivos Dragendorff y Valsler (que son los reactivos que muestran mayor equilibrio entre sensibilidad y especificidad) (Dominguez, 1985), se observan resultados positivos abundantes mayormente en el reactivo de Dragendorff, lo que es una confirmación de la presencia de alcaloides en *E. Tirucalli*.

En cuanto al resultado positivo obtenido en la prueba de esteroides y/o triterpenoides por medio de la reacción de revelado de Liebermann-Bouchardat,

que no sólo revela los esteroides y/o triterpenoides si no también carotenoides y xantofilas (que se marcan en la foto con puntos negros) (Sanabria, 1983), y que como se observa son de color amarillo, mientras que la presencia de los esteroides y/o triterpenoides se confirma por la coloración verde en las manchas. El aislamiento de lactonas sesquiterpénicas en esta especie no ha sido reportado previamente, tal vez porque la proporción de estas es menor al compararla con las saponinas o los alcaloides que están en mayor cantidad, por esta razón son los más reconocidos en esta especie, restándole importancia a este principio activo. La presencia de estas lactonas sesquiterpénicas se pudo demostrar tras la reacción con vainillina/A. o-fosfórico, el cual revela este tipo de estructura dando una coloración violeta (Sanabria, 1983).

Obtención de las fracciones cromatográficas.

En la tabla 2 se muestran los solventes utilizados y numero de fracciones por solvente.

Tabla 2. Solventes y número de fracciones obtenidas

SOLVENTE	No. DE FRACCIONES
Diclorometano	Diclorometano
Acetato de etilo	Acetato de etilo
Etanol	Etanol
Metanol	Metanol

Fuente: Los Autores

A la fracción número 2 de CH₂Cl₂ se le realizaron pruebas de solubilidad, para así tratar de aislar un compuesto puro. El primer solvente que se utilizó fue el éter de petróleo, el cual disolvió parte de la muestra, esta se filtró y este filtrado se cristalizó, obteniendo los cristales mostrados en las figuras 1 y 2.

Figura 1. Cristales (1) obtenidos a partir de la fracción 2 de diclometano.

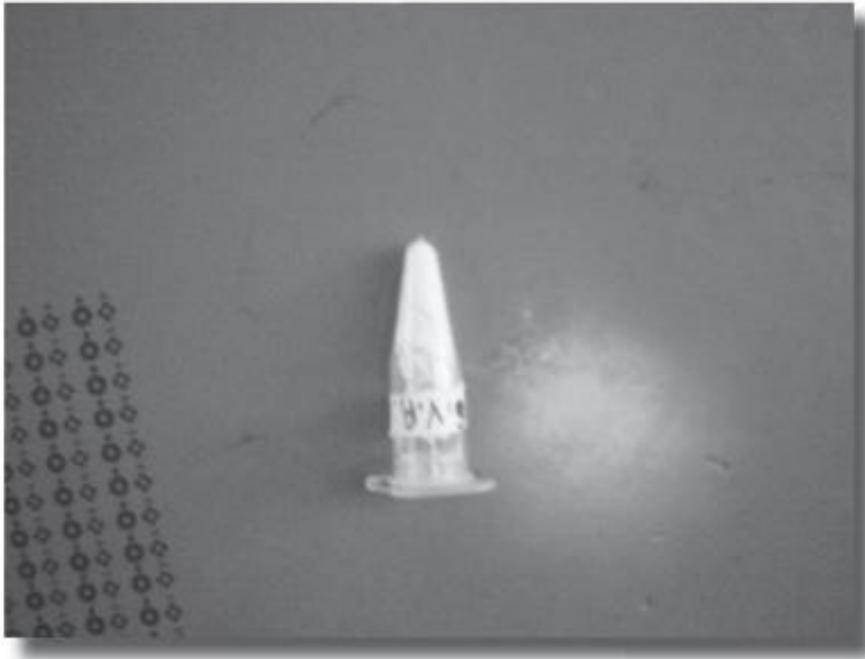


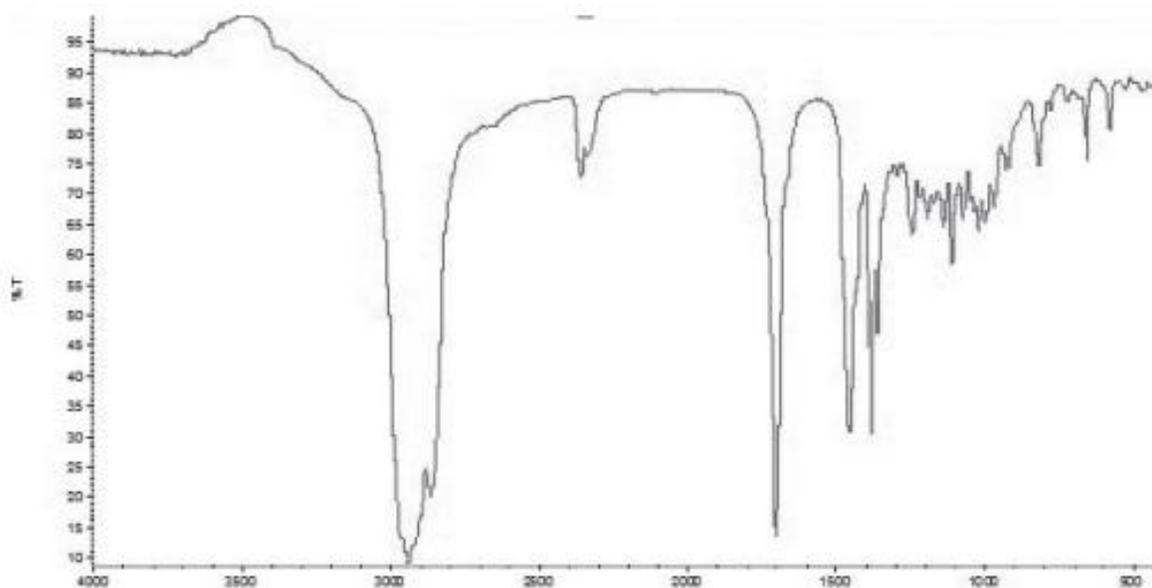
Figura 2. Microscopia de los cristales, observados en un microscopio óptico Nikon eclipse E200, lente 10x.



Fuente: Los autores

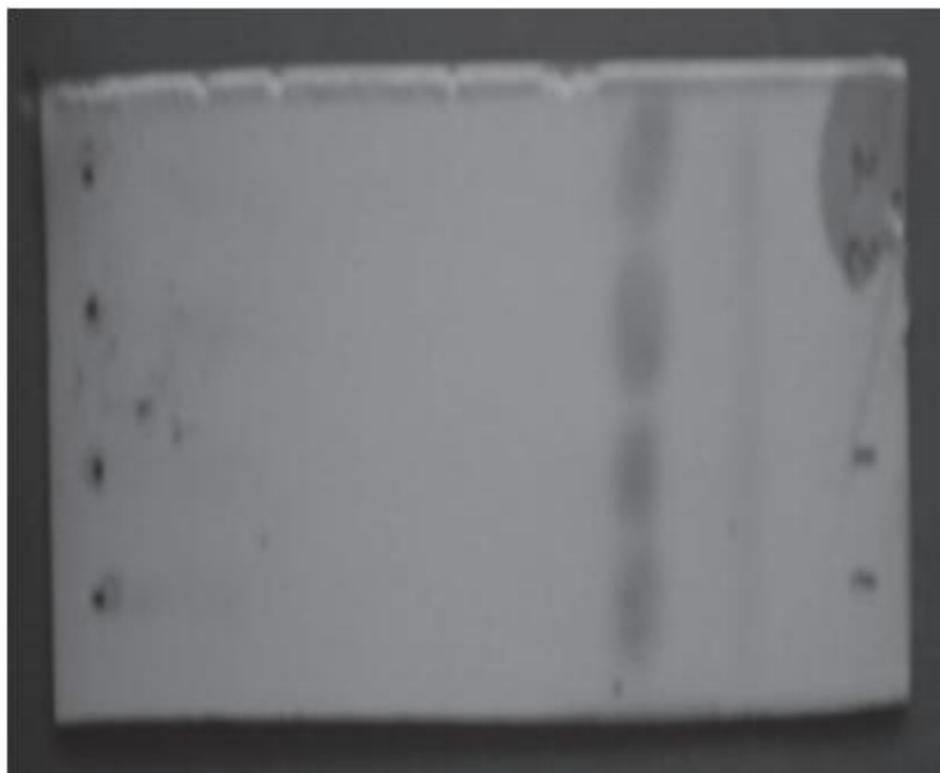
A continuación se muestran el espectro IR realizado a el compuesto cristalizado.

Figura 3. Espectro IR tomado a los cristales, en el espectrofotómetro infrarrojo Thermo Avatar 380 (FT-IR/ESP)



Fuente: Los Autores

Figura 4. C.C.D realizada a los cristales, revelada con vainillina/ácido o-fosfórico.



Fuente: Los Autores

Analizando el espectro IR tomado a los cristales, podemos observar bandas de absorción características para un estiramiento con vibraciones C-H simétricas y asimétricas con hibridación Sp^3 a los 2970cm^{-1} . También se observa una banda a los 2400cm^{-1} que puede corresponder a CO_2 presente en el equipo a la hora de tomar la muestra. Se observa una banda muy bien definida a los 1700cm^{-1} característica de un carbonilo, y más precisamente de un éster por lo bien definida que está la banda, con respecto a la banda observada a los 1470cm^{-1} pertenece a uno o varios grupos CH_3 terminales o muy lejanos, la banda a los 1390cm^{-1} muestra flexión de los enlaces C-H Sp^3 .

En la CCD tomada a los cristales podemos observar cómo después de revelado la placa con una solución etanólica al 1% de vainillina y 10% de ácido o-fosfórico, reactivo característico para la identificación de esteroides, triterpenoides y en general todos los terpenos (entre estos las lactonas terpénicas) (Sanabria, 1983), se nota una mancha de color morada, característica para las lactonas sesquiterpénicas.

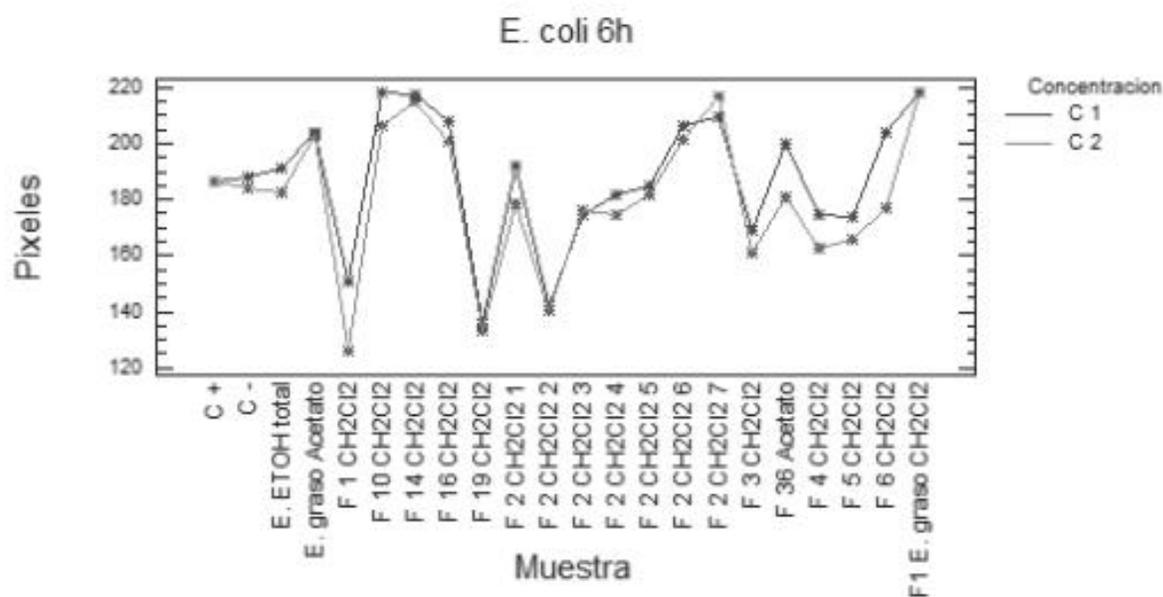
Según lo encontrado tanto en el IR como en la CCD tomados a las muestras se puede pensar que

el compuesto puede pertenecer al grupo de las lactonas terpénicas, aunque con un IR y una CCD es muy poco para afirmar sobre la estructura de un compuesto, para la elucidación completa del compuesto se necesitaría de metodologías más complejas como lo son: espectrometría de masas y ultra visible, así como también RMN +H, RMN ^{13}C , HMQC y HMBC.

Actividad biológica. Para la medida de la actividad biológica no se utilizaron todas las fracciones obtenidas de la cromatografía en columna, debido a que el número de muestras a las que se les podía medir la actividad estaba limitado. Por esta razón se tomaron las fracciones más representativas en cuanto a "pureza" se refería.

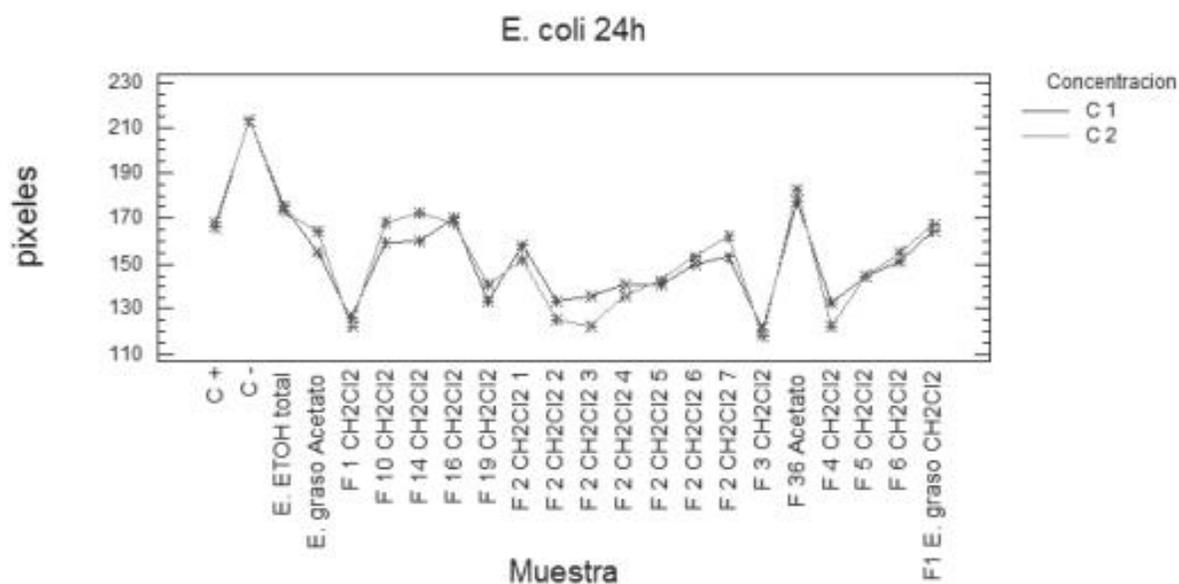
Actividad antimicrobiana. A continuación se muestra el comportamiento de los extractos o fracciones frente a *E. coli* y *S. aureus*, después de haber pasado los datos de las imágenes a números de píxeles obtenidos por el programa UN-SCAN-IT 5.3, y de haber realizado el análisis estadístico por la técnica de ANOVA (Ávila, 2006). La concentración C1 corresponde a 1000ppm , y la C2 a 500ppm .

Figura 5. Comportamiento del extracto o fracciones frente a *E. coli* a las 6 horas.



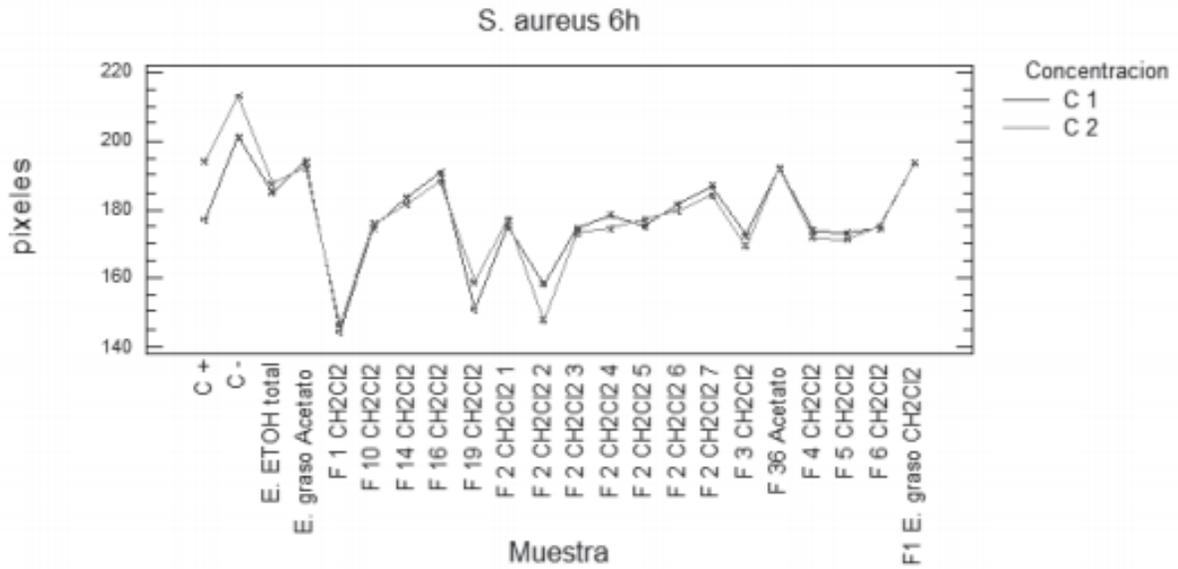
Fuente: Los Autores

Figura 6. Comportamiento del extracto o fracciones frente a *E. coli* a las 24 horas.



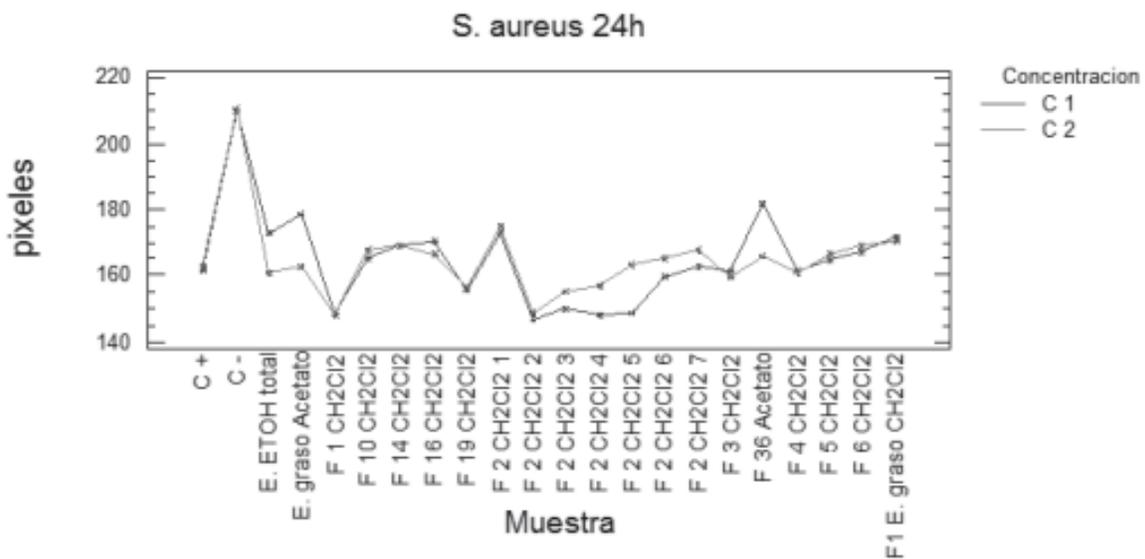
Fuente: Los Autores

Figura 7. Comportamiento del extracto o fracciones frente a *S. aureus* a las 6 horas.



Fuente: Los Autores

Figura 8. Comportamiento del extracto o fracciones frente a *S. aureus* a las 24 horas.



Fuente: Los Autores

En la figura 5 se puede observar como algunas fracciones tienen una actividad antimicrobiana bastante marcada frente a *E. Coli*. Como lo son las muestras 10, 18, 2, 11, en las dos concentraciones (1000ppm y 500ppm), mientras que otras muestras como la 1, 3, 4, 20, 12, 13 y 14 que muestran una actividad antimicrobiana también importante, aunque en un nivel de efectividad menor que las muestras mencionadas anteriormente. Mientras se observan muestras como la 15, 16, 17, 7 y 8, que no muestran mayor actividad antimicrobiana.

Los resultados del comportamiento antimicrobiano observados en la figura 6 (24 horas) para *E. Coli*, nos muestra cómo sigue habiendo una actividad muy marcada por parte de las muestras 10, 18, 2, 11, lo cual evidencia una acción bactericida de estas muestras en las dos concentraciones a las cuales se realizaron las medidas, ya que muestran actividad tanto a las 6 como a las 24 horas. Además las muestras 3, 4, 5, 12, 13 y 14 manifiestan una actividad muy buena a las 24 horas, y una actividad relativamente buena a las 6 horas, por lo que estas muestras se puede observar también una actividad bactericida buena.

Muestras como la 19, 1 y 9 evidencian una actividad antimicrobiana muy leve pero existente, también se puede decir que son muestras bactericidas ya que tienen el mismo efecto tanto a las 6 como a las 24 horas. Muestras como la 20, 15, 16, 17, 6, 7 y 8 no revelaron actividad a las 6 horas, pero si a las 24 horas, por lo que se podrían clasificar dentro de los bacteriostáticos, ya que no tienen un comportamiento uniforme en el tiempo.

Con respecto a las Figuras 7 y 8 y el comportamiento de los extractos y fracciones frente a *S. aureus*, a las 6 y 24 horas se pueden observar acciones bactericidas por parte de las muestras 10, 2, 3 y 5. Las muestras 19, 20, y 4 presentan una actividad antimicrobiana muy buena a las 24 horas pero no tanta a las 6 horas, las muestras 18, 12, 13 y 14 evidencian una buena actividad a las 6 horas pero no tanta a las 24 horas, aunque hay que decir que sin embargo sigue teniendo actividad, las muestras 15, 16, 17, 6, 7, y 11 revelan una actividad muy leve

tanto a las 6 como a las 24 horas. Las muestras 1, 4 y 8 no presentan ningún comportamiento antimicrobiano frente a *S. aureus*.

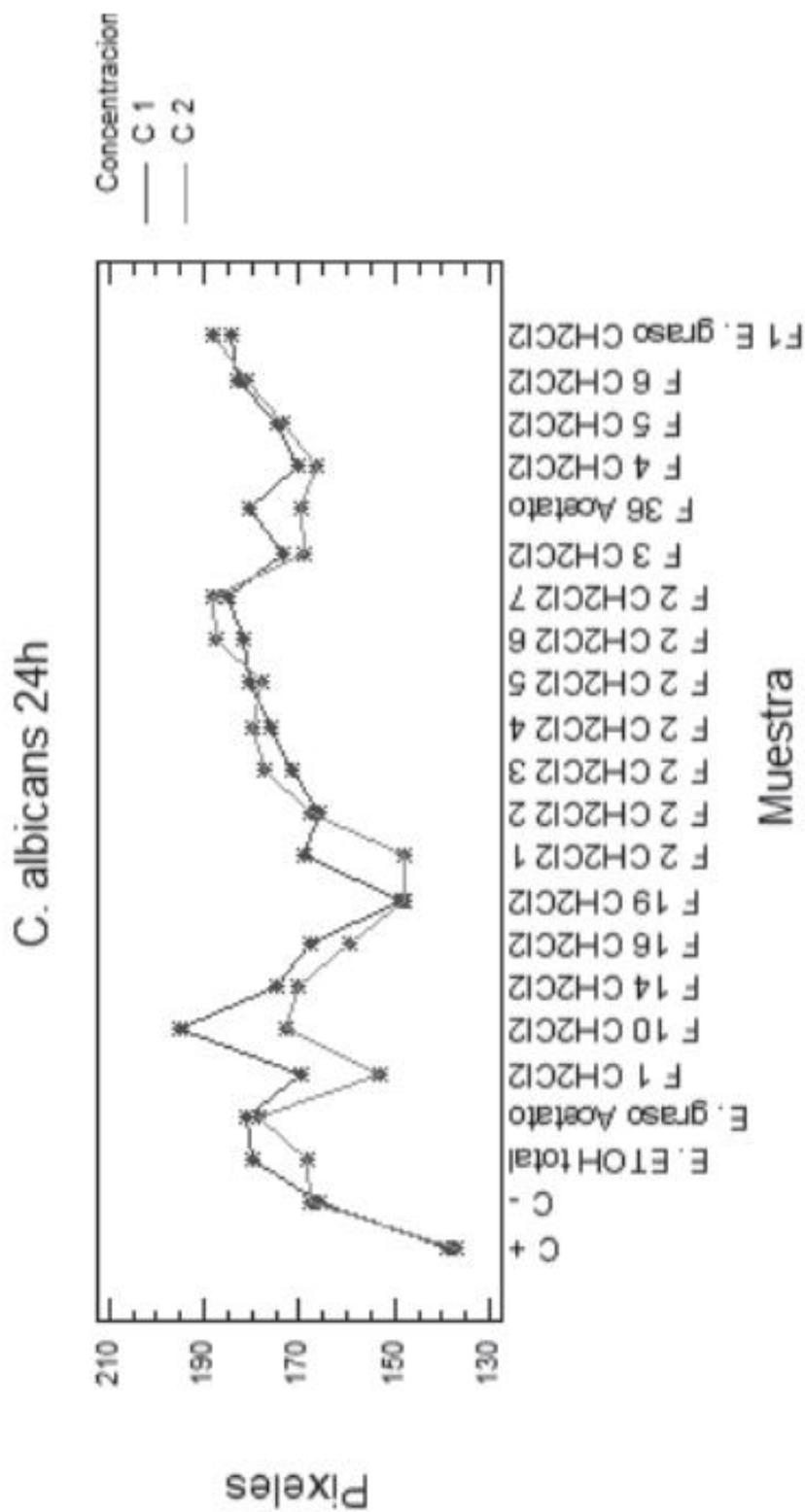
Así mismo, se encontró que el extracto y las fracciones a las cuales se le midió la actividad antimicrobiana tanto en *E. coli* como *S. aureus* poseían capacidad inhibitoria de crecimiento en las dos bacterias. Las bacterias Gram negativas como *E. coli* poseen una membrana adicional denominada "Estructura OM" lo que confiere un mayor grado de resistencia a los agentes antimicrobianos (Ávila, 2006), por lo que se puede decir que los metabolitos presentes en *E. tirucalli*, tienen un alto valor antimicrobiano ya que como explicamos anteriormente varias de estas muestras tuvieron una acción bactericida sobre *E. coli*.

La identificación de terpenos en el vegetal, revelan la conexión entre la actividad determinada y su composición química, estos atraviesan la barrera superficial de la bacteria y después se fijan sobre su membrana celular, que afirma la inhibición de crecimiento del *S. aureus* (Ávila, 2006). Bioensayos realizados en otras plantas como en el Aloe vera reportado por Martínez que utilizaron cuatro bacterias (*Gram*-positivas y *Gram* negativas) y una levadura, encontrando sólo una ligera actividad inhibitoria en *S. aureus*, Ávila y otros relacionan la acción antibacteriana frente *S. aureus* a la presencia de terpenos en la especie *Diplostephium tolimense*, al aumentar la simplicidad química del extracto aumenta la inhibición (Kanzanjan, 2006), esto también podría relacionarse al resultado obtenido, ya que en la especie *E. tirucalli* también se encontró gran presencia de terpenos.

Actividad antifúngica

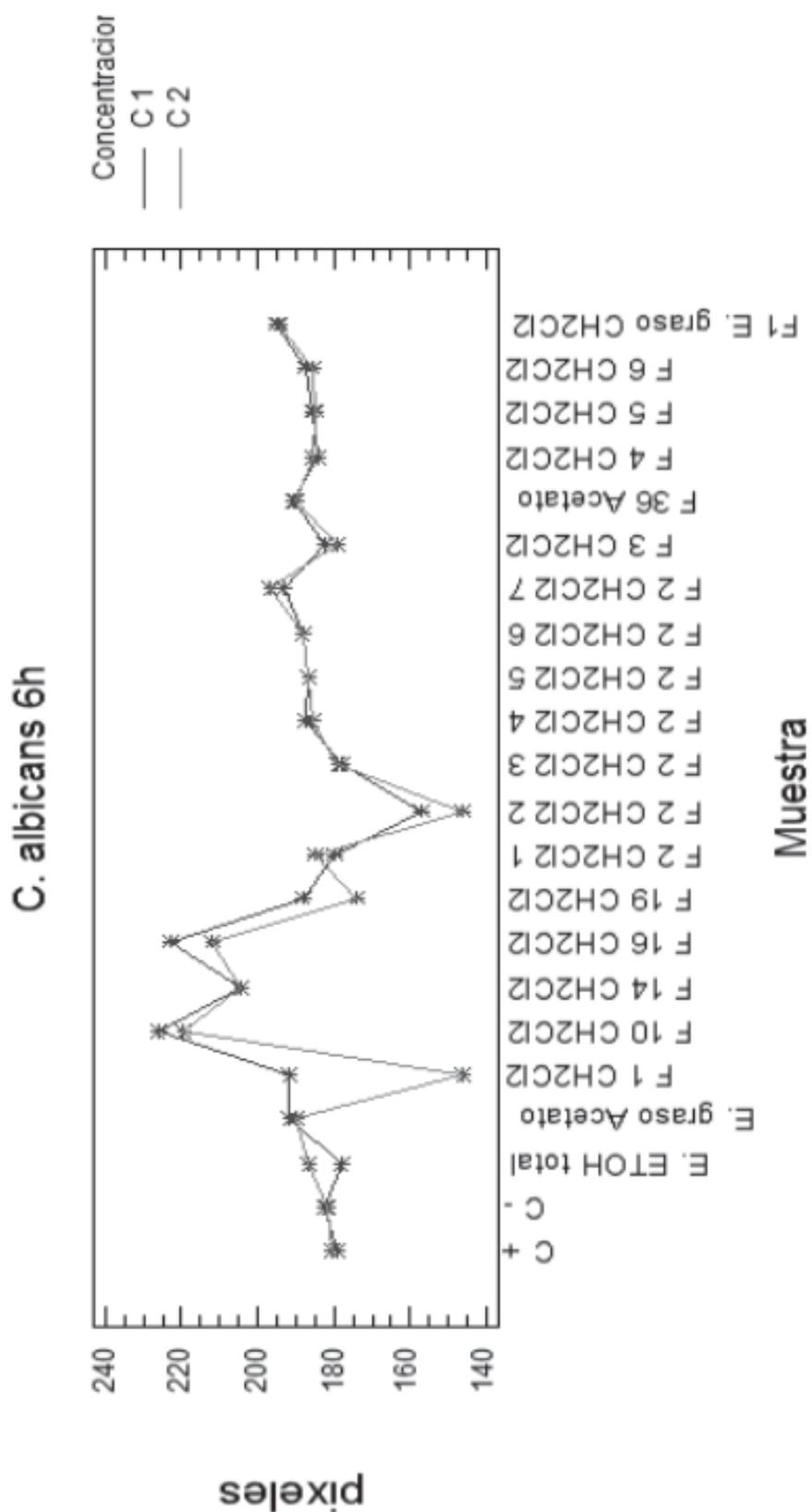
A continuación se muestra el comportamiento de los extractos o fracciones frente a *C. albicans*, después de haber pasado los datos de las imágenes a números de píxeles, obtenidos por el programa UN-SCAN-IT 5.3, y de haber realizado el análisis estadístico por la técnica de ANOVA.

Figura 9. Comportamiento de las fracciones o extractos frente a *C. albicans* a las 6 horas.



Fuente: Los Autores

Figura 10. Comportamiento de las fracciones o extractos frente a *C. albicans* a las 24 horas.



Fuente: Los Autores

Con respecto a la actividad observada sobre *C. albicans*, hay que decir que los resultados son mayoritariamente negativos para la actividad antifúngica por parte de los extractos o fracciones de *E. Tirucalli*, mostrando resultados de actividad sólo las muestras 10 y 2 a las 6 horas, pero teniendo una actividad nula a las 24 horas, muestras como la 19, 3, 4, 5, 6, 7, 11,9, 12, 13, 14, 8 evidencian una leve actividad a las 6 horas, pero nula a las 24 horas, las muestras 18 y 1 manifiestan leve actividad a las 6 horas y son las únicas muestras que revelan actividad a las 24 horas, aunque sea leve.

Estos resultados obtenidos para *C. albicans* son contradictorios con respecto a otros trabajos realizados, pues el principal metabolito al cual se le confiere la capacidad de inhibir el crecimiento de este hongo son las sapogeninas, y el resultado obtenido en las pruebas para este trabajo mostraron un valor positivo para *E. tirucalli*. Las sapogeninas saponifican la superficie celular hidrofóbica y las deja a merced de un choque osmótico. Al-Fatimi (2006) y colaboradores al probar los extractos de 30 plantas medicinales del estado de Yemen, mostraron mayor actividad para *C. albicans* en

Azima tetracantha, *Sansevieria ehrenbergii* y *Solanum incanum*. Thakur, Bhargava y Dixit (2007), tomaron las raíces de *Chlorophytum borivilianum* Sant. (Liliacea), una planta muy utilizada en la India como medicamento para prevenir enfermedades y contrarrestar el envejecimiento. Ellos tomaron el extracto etanólico que contenía gran cantidad de saponinas y las aislaron, luego tomaron un grupo de seis ratas albinas inyectándole *C. albicans* y luego suministrando a un grupo el extracto etanólico y al otro las saponinas, observando diariamente la mortalidad por un periodo de diez días, obteniendo como resultado un 60% de actividad inmunostimulatoria en las saponinas y un 50% en el extracto.

Es necesario aclarar que el Resazurin es muy utilizado para la cuantificación de células *in Vitro*, debido a su estabilidad y lo más importante, no es tóxico para las células, este cambia de color por óxido reducción, entra al citosol en forma oxidada y es reducido por la acción de la actividad enzimática de la mitocondria, por eso es el cambio de coloración de azul a rosa y es leído por colorimetría o fluorometría (Sarker y Kumarasamy, 2007).

Conclusiones

- La especie *Euphorbia tirucalli* presenta resultados positivos para alcaloides, sapogeninas, esteroides y/o triterpenoides, lactonas terpénicas y cardiotónicos, los cuales le dan propiedades farmacológicas a dicha planta.
- Tanto las fracciones aisladas del extracto etanólico como el extracto en sí de esta especie presentaron actividad antimicrobiana frente a *E. coli* y *S. aureus*.
- Las fracciones 10, 18, 2, 11 presentan actividad bactericida frente a *E. coli* y *S. aureus*.
- La actividad antifúngica que presenta el extracto y sus fracciones frente a *C. albicans* es muy baja, pues sólo dos de las fracciones mostraron actividad.

Referencias bibliográficas

- AL-FATIMI, M. e. (2007). *Antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of selected medicinal plants from Yemen*. Journal of Ethnopharmacology. vol. 111 (2). 657-666.
- ÁVILA, L. E. (2006). "Actividad antibacteriana de *diplostephium tolimense* Cuatrec. (asteraceae) frente a *staphylococcus aureus*". *Vitae*, revista de la facultad de química farmacéutica, vol. 13 N° 1.
- DOMÍNGUEZ, X. A. (1985). *Metodos de investigación fitoquímica*. Monterrey: Limusa.
- EVANS, W. C. (1986). *Tratado de farmacognosia*. Nottingham: Emalsa, S.A.
- KANZANJIAN, A. y. (2006). *Actividades biológicas de la esponja Aplysina lacunosa*. Rev. Biol. Trop. Vol 54 .
- SANABRIA, A. (1983). *Análisis fitoquímico preliminar: Metodología y su aplicación en la evaluación de 40 plantas de la familia Compositae*. Bogotá: trabajo de grado. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Química Farmacéutica.
- SARKER SD, Najar L, and KUMARASAMY Y. (2007). *Microtitre plate- based antibacterial assay in incorporating Resazurin as an indicator of cell growth and its application in the in vitro antibacterial screening of Phytochemicals Methods*. 42. (4): 321-324.
- THARKUR, M. B. (2007). *Inmunomodulatory Activity of *holorophytumborivilianum** Sant. F. eCAM. Wvol. 4 N° 4.