

Originales

- » Efectos de un programa de Atención Farmacéutica para pacientes con esclerosis múltiple sobre la adherencia al tratamiento inmunomodulador.

Sánchez Casanueva T, Tenías Burillo JM, Martínez Martínez F, Valenzuela Gámez JC, Navarro Maestre E, Calleja Hernández MA.

- » Estudios microbiológicos y toxicológicos de *Mitracarpus megapotamicus*

Toribio MS, Pombar AS, Oriani SD, Toso RE, Fernández JG.

- » Estabilidad de la quitosana derivada de quitina de langosta *Panulirus argus*, materia prima.

De la Paz N, Pérez D, Fernández M, García C, López O, Nogueira A.

Revisiones

- » La calidad de los medicamentos fabricados industrialmente en España entre 1944 y 1992. Revisión de los requerimientos de calidad establecidos en la legislación oficial durante este período.

Buhigas Cardó MR, Suñé Negre JM, Bel Prieto E.

Originales Breves

- » Evaluación de la biosimilitud y comparabilidad de medicamentos biosimilares

Calvo Hernández B, Zúñiga Hernando L, Gómez López-Tello P.

Artículos Especiales

- » Ionic liquids based active pharmaceutical ingredients

Sekhon BS.

Estudios microbiológicos y toxicológicos de *Mitracarpus megapotamicus*

Mirta Susana Toribio¹, Andrea Silvina Pombar¹, Susana Delia Oriani², Ricardo Enrique Toso¹, Jéscica Gabriela Fernández¹.

1. Cátedra de Farmacología. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Pampa (Argentina).

2. Cátedra de Microbiología. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Pampa (Argentina).

Original Paper Artículo Original

Correspondence/Correspondencia:

Mirta Susana Toribio
Cátedra de Farmacología
Facultad de Ciencias Veterinarias
Universidad Nacional de La Pampa
Calle 5 y 116. General Pico (6360)
La Pampa (Argentina).
E-mail: mstoribiomartin@gmail.com

Competing interest / Conflicto de intereses:
Not declared.

Fundings / Financiación:
Financiado por la Universidad Nacional de La Pampa, Argentina.

Received: 09.04.2013

Accepted: 23.09.2013

RESUMEN

Objetivo: evaluar la actividad antimicrobiana y la toxicidad de extractos obtenidos de la especie vegetal *Mitracarpus megapotamicus*.

Material y Métodos: se determinó la concentración inhibitoria mínima mediante el método de dilución en agar del extracto metanólico. Se utilizó la técnica de difusión en agar para comprobar la persistencia de la actividad antimicrobiana en extracciones acetónicas y clorofórmicas. Los ensayos de toxicidad aguda y subaguda se llevaron a cabo en ratones utilizando una dosis única de 5.000 mg/kg y una dosis diaria durante 14 días de 1.250 mg/kg de extracto hidroalcohólico, respectivamente.

Resultados: La concentración inhibitoria mínima del extracto metanólico fue de 0,48 mg/ml para *Streptococcus equi*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y de 0,96 mg/ml para *Escherichia coli*. La actividad antimicrobiana se manifestó también en las fracciones extractadas con acetona y cloroformo, frente a *Staphylococcus aureus*. El extracto hidroalcohólico no produjo cambios funcionales ni alteraciones histopatológicas en estudios de toxicidad aguda y subaguda en ratones.

Conclusión: Los resultados obtenidos permitirán proyectar estudios de identificación de compuestos y establecer futuros protocolos para determinar la eficacia en modelos *in vivo*.

PALABRAS CLAVE: *Mitracarpus megapotamicus*, Actividad antibacteriana, Toxicidad.

ABSTRACT

Aim: To evaluate the antimicrobial activity and toxicity of extracts obtained from the plant species *Mitracarpus megapotamicus*.

Material and Methods: The minimum inhibitory concentration by agar dilution method of the methanolic extract was determined. The agar diffusion method to check the persistence of antimicrobial activity in chloroform and acetone extractions were used. Acute and subacute toxicity assays in mice were carried out using a single dose of 5,000 mg / kg and a daily dose for 14 days of 1,250 mg / kg of hydroalcoholic extract, respectively.

Results: The minimum inhibitory concentration of the methanol extract was 0.48 mg / ml for *Streptococcus equi*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* and 0.96 mg / ml for *Escherichia coli*. Antimicrobial activity was also expressed in fractions excerpted with acetone and chloroform, against *Staphylococcus aureus*. The hydroalcoholic extract produced neither functional changes nor histopathological alterations in studies of acute and subacute toxicity in mice.

Conclusion: The results obtained will allow to design compound identification studies and establish future protocols to determine effectiveness in models *in vivo*.

KEY WORDS: *Mitracarpus megapotamicus*, Antibacterial activity, Toxicity.

INTRODUCCIÓN

La resistencia a los quimioterápicos es uno de los principales inconvenientes por los que atraviesa la salud pública y la sanidad animal, motivo que alienta a los investigadores a llevar adelante estudios para la búsqueda de nuevos principios activos con acción inhibitoria sobre microorganismos resistentes¹⁻². Aunque la mayor parte de la investigación está dirigida a desarrollar medicamentos sintéticos, se continúa estudiando las drogas de origen natural porque generan interesantes aportes a la industria farmacéutica³.

La Provincia de La Pampa, Argentina, posee una gran diversidad de especies vegetales que se desarrollan favorecidas por sus condiciones edafológicas y climáticas, siendo un recurso de gran importancia para la investigación de compuestos vegetales para potenciales beneficios médicos. En una investigación realizada en 87 especies vegetales seleccionadas al azar, se evaluó la actividad antimicrobiana mediante el método de difusión en pocillos. Los resultados obtenidos permitieron seleccionar a *Mitracarpus megapotamicus* por su espectro antimicrobiano⁴⁻⁵.

Mitracarpus megapotamicus (Spreng.) Kuntze es una hierba perenne, velluda, de flores blancas que se desarrolla en suelos arenosos y pedregosos⁶. Perteneció a la familia Rubiaceae, se conoce con el nombre vulgar "peladilla" y el único uso medicinal descrito en la bibliografía es el antipalúdico⁷. Es una especie muy difundida desde las Antillas hasta el centro de la Argentina⁸.

El objetivo del presente estudio fue evaluar la concentración inhibitoria mínima del extracto metanólico de *Mitracarpus megapotamicus*, investigar la persistencia de la actividad antimicrobiana en extracciones con acetona y cloroformo y determinar el posible potencial toxicológico de la especie mediante ensayos de toxicidad aguda y subaguda en ratones.

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolección y secado del material vegetal

La recolección del material vegetal se llevó a cabo en el mes de noviembre en cercanía de Trebolares, Provincia de La Pampa, Argentina. *Mitracarpus megapotamicus* fue identificada por el ingeniero agrónomo Pedro Eduardo Steibel, de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional de La Pampa y un ejemplar fue depositado en el herbario de la misma. Se secó en estufa con corriente de aire a 50°C.

Preparación de los extractos vegetales

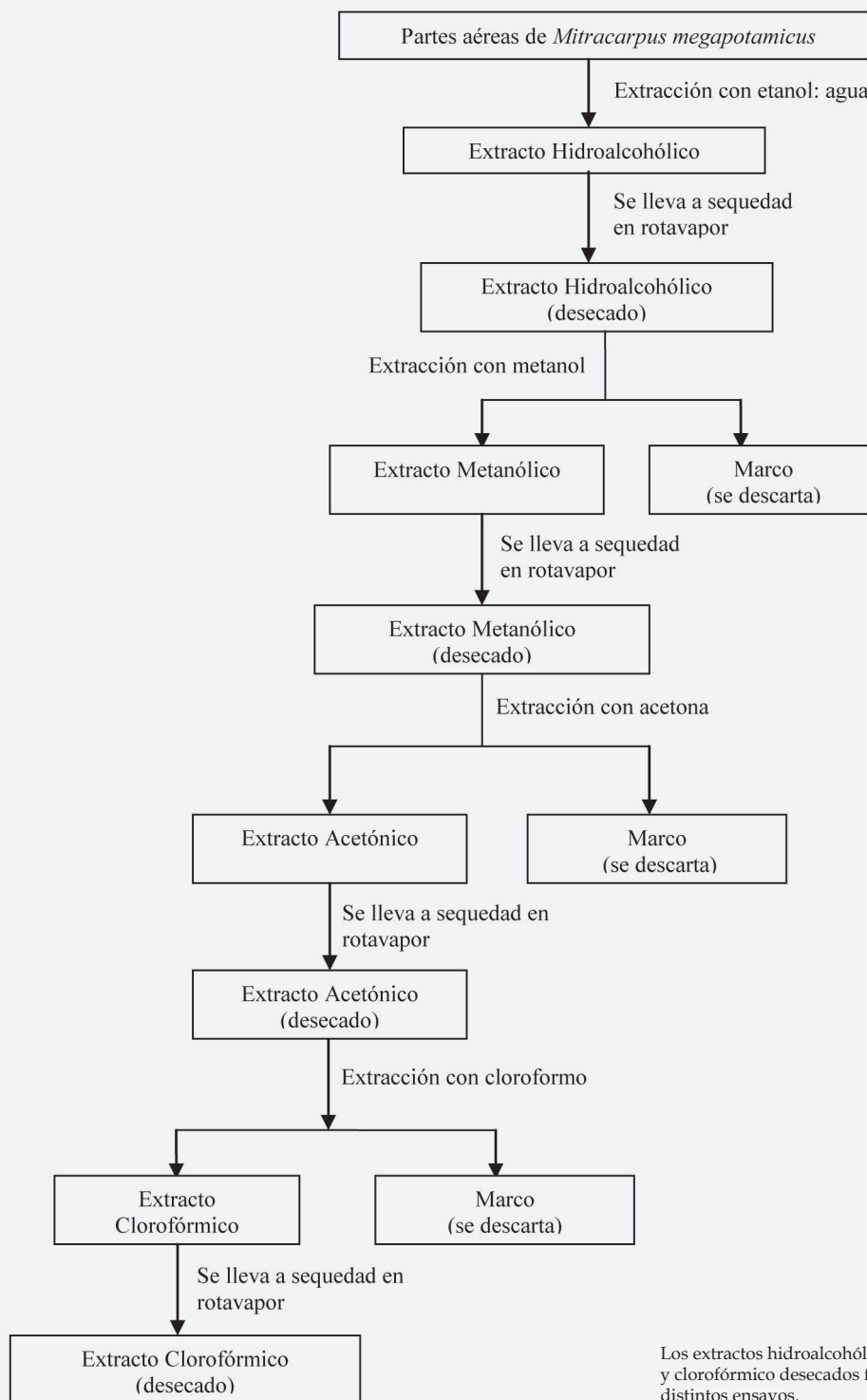
Se realizó una extracción hidroalcohólica (1:1 v/v) por maceración con 20 g de las partes aéreas desecadas de *Mitracarpus megapotamicus*. La fracción obtenida fue sometida a una extracción metanólica. El extracto metanólico seco fue extractado con acetona y el producto con cloroformo. Todas las extracciones se hicieron tres veces consecutivas y el producto obtenido en cada extracción se evaporó mediante rotavapor (Figura 1).

Determinación de la actividad antimicrobiana

► *Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) mediante la técnica de dilución en agar*: El extracto metanólico obtenido a partir de 20 g de partes aéreas desecadas de *Mitracarpus megapotamicus* se llevó a sequedad obteniendo 1,92 g, resultando un rendimiento del 9,6%. El extracto desecado fue resuspendido con agua destilada estéril hasta un volumen de 10 ml, resultando una concentración de 192 mg/ml. A partir de ésta solución se prepararon diluciones 1/10, 1/20, 1/40, 1/80 y 1/160 y se colocó 1 ml de cada una de ellas en diferentes placas con 9 ml de medio de cultivo agar Müeller Hinton. De este modo resulta una concentración final de 1,92 mg, 0,96 mg, 0,48 mg, 0,24 mg y 0,12 mg de extracto seco por ml de agar respectivamente. Se homogenizó y se dejó solidificar. A cada placa se le colocó en 5 puntos separados una descarga de 1 µl de suspensión bacteriana correspondiente a 0,5 de la escala de Mc Farland de cada una de las bacterias en estudio, *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228) y las cepas aisladas de muestras clínicas, *Streptococcus equi* (adenitis equina), *Proteus mirabilis* (otitis canina) y *Escherichia coli* (mastitis bovina). Se incubaron durante 24 horas a una temperatura de 35°C y se interpretaron los resultados. Conjuntamente se prepararon, en las mismas condiciones, placas de control de crecimiento sin el agregado del extracto vegetal.

► *Fraccionamiento guiado por bioensayo*: Los extractos secos de acetona y cloroformo fueron reconstituidos hasta un volumen de 5 ml de agua destilada estéril para las pruebas de actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). Se utilizó la técnica de difusión, según el método de Kirby Bauer⁹ sustituyendo el disco de papel por pocillos en el medio de cultivo agar Müeller Hinton solidificado, colocando en cada uno de ellos 60 µl de la solución de los extractos de acetona y cloroformo de *Mitracarpus megapotamicus* respectivamente. Las placas se incubaron a 35°C y se examinaron a las 24 h. La actividad antibacteriana de las fracciones acetónica y clorofórmica se evaluaron mediante la presencia de halo de inhibición.

Figura 1. Obtención de extractos de *Mitracarpus megapotamicus*.



Ensayos de toxicidad

El diseño experimental cumple con lo establecido en la Guía para el cuidado y uso de los animales de experimentación según el Canadian Council Animal Care¹⁰ y fue aprobado por el Comité de ética de investigación en ciencias biológicas de la Facultad de Ciencias Veterinarias, de la Universidad Nacional de La Pampa.

Los ensayos de toxicidad aguda y subaguda se realizaron en ratones albinos *Mus musculus*, los que se recibieron en el laboratorio 7 días antes del ensayo, y desde ese momento hasta el final de los mismos, todos los animales recibieron alimento balanceado comercial y agua *ad libitum*.

- Toxicidad aguda: Se utilizaron 50 ratones de 3 meses de edad, machos y hembras de 29 - 38 g distribuidos en

cinco grupos de 10 animales cada uno. Todos los animales se dejaron en ayuno de alimentos sólidos 5 horas previas a la experiencia, y recibieron agua *ad libitum*. El Grupo control no recibió tratamiento alguno. Los grupos tratados fueron administrados con una dosis oral única del extracto hidroalcohólico desecado de *Mitracarpus megapotamicus* reconstituido con agua destilada, administrándose un volumen final de 0,1 ml/10g, mediante sonda bucoesofágica. El esquema posológico fue el siguiente; Grupo 1: 625 mg/kg, Grupo 2: 1.250 mg/kg, Grupo 3: 2.500 mg/kg y Grupo 4: 5.000 mg/kg. Los ratones fueron observados a los 30, 60, 120, 240 y 360 minutos pos administración del extracto y durante los 14 días siguientes cada 24 hs con el fin de evaluar el carácter reversible o irreversible de los efectos¹¹. Al finalizar el estudio se sacrificaron los animales del Grupo 4 por dislocación cervical e inmediatamente se realizó la necropsia para la extracción de los órganos a estudiar: estómago, intestino delgado, hígado y riñón. Se realizó una evaluación macro y microscópica de los mismos. Para esta última los órganos fueron fijados en formol al 10% durante 72 h, luego se realizó la inclusión en parafina y los cortes se colorearon con hematoxilina y eosina.

-Toxicidad subaguda: Se formaron tres grupos de ratones de dos meses de edad, cada grupo compuesto de igual número de machos y hembras de 26 - 28 g. El grupo control de 10 animales fue administrado con el vehículo. El grupo tratado y satélite de 20 y 10 animales, recibió diariamente una dosis de 1.250 mg/kg de peso corporal de extracto hidroalcohólico seco de *Mitracarpus megapotamicus* restituido con agua destilada, administrándose un volumen final de 0,1 ml/10 g durante 14 días. En todos los animales la vía utilizada fue la oral mediante sonda bucoesofágica¹². A todos los grupos se les realizó control del consumo de alimento diariamente, registrándose el peso al inicio y final del ensayo. Las observaciones clínicas se hicieron dos veces al día durante todo el experimento para detectar posibles alteraciones de los animales. Al término del tratamiento se tomaron muestras de sangre mediante punción intracardíaca, previa anestesia con Ketamina/Acepromacina (Anestesia Veterinaria®, Holliday Scott) por vía intraperitoneal, para exámenes de hematología (conteo de glóbulos rojos y leucocitos, determinación de la concentración de hemoglobina y hematocrito) y química sanguínea (determinación de niveles de aspartato aminotransaminasa (AST), alanina transaminasa (ALT), fosfatasa alcalina (FAL), creatinina y urea. Posteriormente se realizó la necropsia de los animales y el

examen anatomopatológico e histopatológico de hígado, riñón, estómago e intestino, procediéndose del mismo modo descrito para las muestras obtenidas en los exámenes de toxicidad aguda. Se registró el peso de los siguientes órganos: hígado, pulmón, corazón y riñón.

El grupo satélite se observó durante 14 días posteriores de concluida la administración del extracto para detectar posibles signos clínicos de toxicidad de aparición tardía y/o la recuperación de los mismos. Los análisis estadísticos se hicieron mediante el test T de Student, con un nivel de significancia $P < 0,05$.

RESULTADOS

Actividad antimicrobiana

-Concentración inhibitoria mínima: De las diluciones ensayadas, la mínima concentración del extracto metanólico de *Mitracarpus megapotamicus* que inhibió el desarrollo fue de 1/40 (0,48 mg /ml) para *Streptococcus equi*, *Proteus spp*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y de 1/20 (0,96 mg/ml) para *Escherichia coli* (Tabla 1).

-Fraccionamiento bioguiado: El extracto clorofórmico y acetónico de *Mitracarpus megapotamicus* demostró halo de inhibición en un cultivo de *Staphylococcus aureus*.

Toxicidad aguda

En los ensayos de toxicidad aguda no se observaron cambios en la conducta, signos clínicos de toxicidad, ni muertes en el 100% de los animales tratados. El análisis macroscópico de los órganos estudiados no reportó ningún dato de interés, siendo su aspecto normal. En el estudio microscópico no se encontraron lesiones que pudieran sugerir toxicidad en los animales medicados con la dosis máxima administrada, 5.000 mg/kg.

Toxicidad subaguda

En ninguno de los animales del grupo tratado se observaron signos clínicos que pudieran asociarse a efectos tóxicos sistémicos, registrándose un 100% de supervivencia. Tanto machos como hembras aumentaron de peso corporal durante el experimento, no hubo diferencias entre grupos ($P > 0,05$). En el estudio de las manifestaciones de

Figura 1. Obtención de extractos de *Mitracarpus megapotamicus*.

Microorganismos	1,92 mg/ml	0,96 mg/ml	0,48 mg/ml	0,24 mg/ml
<i>Streptococcus equi</i> ^a	s/d	s/d	s/d	d
<i>Proteus mirabilis</i> ^a	s/d	s/d	s/d	d
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	s/d	s/d	s/d	d
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (ATCC12228)	s/d	s/d	s/d	d
<i>Escherichia coli</i> ^{bx}	s/d	s/d	d	d

Ref: s/d: sin desarrollo bacteriano. d: desarrollo bacteriano. Las diluciones expresadas en mg/ml se calcularon a partir del rendimiento del extracto metanólico (9,6%) proveniente de 20 g de partes aéreas de *Mitracarpus megapotamicus*, aisladas de muestras clínicas.

Tabla 2. Parámetros hematológicos en machos y hembras pertenecientes al Grupo Control y Tratado.

	Machos (Media±DE)		Hembras (Media±DE)	
	Grupo Control	Grupo Tratado	Grupo Control	Grupo Tratado
GR ^a (x10 ⁶ /mm ³)	9,54 ± 0,54	9,04 ± 0,25 ns	10,18 ± 0,25	9,93 ± 0,26 ns
Hg ^b (gr/dl)	14,46 ± 0,60	13,8 ± 0,40 ns	14,13 ± 1,00	16,17 ± 1,74 ns
Ht ^c (%)	44,66 ± 0,57	44,25 ± 0,95 ns	45,33 ± 0,57	48 ± 1,82 ns
GB ^d (x10 ³ /mm ³)	4,93 ± 0,51	5,47 ± 0,73 ns	5,65 ± 0,80	6,39 ± 1,55 ns

Ref: aglúbulos rojos, bhemoglobina, chematocrito, dglúbulos blancos, ns: no significativo (P < 0,05) Test "t" de Student

toxicidad del extracto vegetal a través de la evaluación de los parámetros hematológicos (conteo de glóbulos rojos, leucocitos, hemoglobina y hematocrito) no hubo diferencias entre grupos (P > 0,05) (Tabla 2).

Las enzimas, aspartato aminotransaminasa (AST), alanina transaminasa (ALT) y fosfatasa alcalina (FAL), indicadores de hepatopatías, afecciones de corazón y músculo esquelético, no se encuentran aumentadas respecto al grupo control en las muestras analizadas. Los niveles de urea y creatinina, indicadores de funcionamiento renal, se mantuvieron dentro de los rangos normales. Los datos obtenidos en las diferentes determinaciones hematológicas fueron compatibles con los resultados de la evaluación histopatológica de hígado, riñón, estómago e intestino donde no se presentaron lesiones compatibles con alteraciones patológicas, ni diferencias entre tratados y testigos en el peso de los órganos (P > 0,05) (Tabla 3).

DISCUSION

El valor de la CIM obtenida por el método de dilución en agar orienta acerca de la concentración del extracto de *Mitracarpus megapotamicus* necesaria para inhibir el crecimiento de un microorganismo en particular, pero no representa un valor absoluto, ya que el valor real de la CIM podría estar ubicada entre la menor y la mayor concentración que inhibió el crecimiento bacteriano. Esta técnica es la más adecuada para determinar la actividad antibacteriana de un compuesto de polaridad desconocida¹².

Los resultados del fraccionamiento bioguiado demuestran que la actividad antimicrobiana manifestada en el extracto metanólico se mantiene en las fracciones extraídas a

partir de este con acetona y luego con cloroformo. Por consiguiente es posible sugerir que esta especie vegetal contiene compuestos fenólicos, por ser solubles en acetona y además compuestos terpénicos, solubles en cloroformo. La bibliografía menciona a estos dos grupos químicos como responsables de la actividad antimicrobiana de extractos provenientes de diversas especies vegetales¹³⁻¹⁴. En general las propiedades farmacológicas de las plantas responden a la presencia de más de un componente activo, a diferencia de las moléculas de síntesis¹⁵. Bertucci y col. demostraron la presencia de terpenos y flavonoides, mediante cromatografía en capa fina, en muestras de partes aéreas de *Mitracarpus megapotamicus* recogidas en Uruguay¹⁶. Sin embargo no hallaron actividad antimicrobiana en las extracciones con acetona frente a varias cepas bacterianas (*S. aureus*, *P. aeruginosas*, *M. tuberculosis*, *E. coli*) mediante el método de difusión en agar¹⁷. La falta de concordancia con el presente estudio puede estar influenciado por diversos factores como época y lugar de recolección de la muestra, método de extracción, solubilidad de la misma en el medio de cultivo, método de valoración de la actividad, entre otros¹⁸.

El test de toxicidad agudo y subagudo no produjo mortalidad de los animales bajo las condiciones experimentales ensayadas. Tampoco se presentaron signos clínicos y/o subclínicos de toxicidad. La ganancia de peso obtenida, así como también el consumo de alimento diario, que fue el esperado para la especie y edad de los animales, denota bienestar de los mismos¹⁹. Se estima como poco tóxicos, aquellos extractos que no lo son a dosis superiores a 2000 mg/kg, según criterio utilizado por diversos investigadores²⁰. El empleo del extracto hidroalcohólico para los ensayos de toxicidad permitió evaluar en un solo

Tabla 3. Parámetros bioquímicos en machos y hembras pertenecientes al Grupo Control y Tratado.

	Machos (Media±DE)		Hembras (Media±DE)	
	Grupo Control	Grupo Tratado	Grupo Control	Grupo Tratado
GOT ^a (u/l)	106 ± 25,54	92 ± 28,71 ns	147 ± 34,59	141,7 ± 29,23 ns
Creatinina (mg%)	0,475 ± 0,035	0,477 ± 0,029 ns	0,58 ± 0,18	0,512 ± 0,037 ns
Urea (g/l)	0,515 ± 0,091	0,58 ± 0,045 ns	0,6 ± 0,028	0,637 ± 0,045 ns
GPT ^b (u/l)	37,66 ± 5,50	30 ± 4,24 ns	41 ± 10,14	49,5 ± 14,43 ns
FAL ^c (mUI/ml)	326 ± 34	392 ± 72,91 ns	350 ± 52,91	372,75 ± 127,9 ns

Ref: aglutámico oxalacético transaminasa, bglutámico pirúvico transaminasa, cfosfatasa alcalina, ns: no significativo (P < 0,05) Test "t" de Student.

ensayo la ausencia de toxicidad de esta especie vegetal, ya que el extracto metanólico se obtuvo a partir del hidroalcohólico.

CONCLUSIONES

La inocuidad de los extractos de *Mitracarpus megapotamicus* en ratones, conjuntamente con la actividad antimicrobiana demostrada *in vitro*, permitirá proyectar futuros protocolos para determinar la eficacia en modelos *in vivo* y determinar el posible valor fitoterapéutico de la especie. La presencia de actividad antimicrobiana en las fracciones acetónicas y clorofórmicas constituye un incipiente camino para identificar los compuestos responsables.

BIBLIOGRAFIA

- Denamiel G, Puigdevall T, Más J, Albarellos G, Gentilini E. Prevalencia y perfil de resistencia a betalactámicos en estafilococos de perros y gatos. In Vet. 2009;11(2):117-122.
- Dye C, Scheele S, Dolin P, Pathania V, Raviglione MC. Global burden of tuberculosis: estimated incidence, prevalence and mortality by country. JAMA. 1999; 282:677-686.
- Estévez RJ. Origen de las sustancias medicamentosas. En Botana LM, Landoni F, Martín Jiménez T: Farmacología terapéutica veterinaria. México. McGraw Hill-Interamericana. 2002. p. 3-19.
- Toribio MS, Oriani DS, Toso RE, Fernández JG, Tortone CA. Extractos vegetales con actividad antimicrobiana frente a bacterias Gram negativo. Libro de resúmenes de la V Jornada de Ciencia y Técnica. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Pampa. La Pampa. Argentina; 2007. p. 9.
- Toribio MS, Oriani DS, Toso RE, Tortone CA, Fernández JG. Suceptibilidad de *Staphylococcus aureus* a extractos vegetales obtenidos de plantas nativas y naturalizadas de la provincia de La Pampa, Argentina. Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromáticas. 2007; 6(6):367-8.
- Cabrera AL, Zardini EM. Manual de la flora de los alrededores de Buenos Aires. Argentina. Acme. 1993. p. 240-585.
- Toursarkissian M. Plantas medicinales de la Argentina: sus nombres botánicos, vulgares, usos y distribución geográfica. Buenos Aires. Argentina. Hemisferio Sur. 1980. p. 112.
- Bacigalupo NM. Flora del Valle de Lerma. Aportes botánicos de Salta. Herbario MCNS. Facultad de Ciencias Naturales. UNSa. 1996; 4(3):26-8.
- Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Truck M. Antibiotic susceptibility testing by a single disk method. Am J Clin Pathol. 1966; 45:493-6.
- Olfert ED, Cross BM, Mc William A. Guide to the Care and use of experimental animals. Canadian Council on Animal Care. 1993 (1).
- Souza Brito A. Manual de ensayos toxicológicos in vivo. Campinas, Brasil UNICAMP.1994. p.122.
- Ramírez LS, Marín Castaño D. Methodologies for evaluating the in vitro antibacterial activity of natural compounds of plant origin. Scientia et Technica XV 2009; 42:263-267.
- Fuertes CR, Alcarraz MR, Vidalón MT. Flavonoides y alcaloides de *Lupinus ballianus* sp Smith con actividad antibacteriana y antifúngica. Cienc invest. 1994; 1:12-6.
- Domingo D, López Brea M. Plantas con acción antimicrobiana. Rev Esp Quimioterap. 2003; 16(4):385-93.
- Mendonça-Filho RR. Bioactive phytochemicals: new approaches in the phytosciences. In: Ahmad I, Aqil F, Owais M. Phytomedicine: turning medicinal plants into drugs. Germany. 2006. p. 1-24.
- Bertucci A, Haretche F, Olivaro C, Vásquez A. Prospección química del bosque de galería del río Uruguay. Rev bras farmacogn. 2008; 18(1):21-5.
- Bertucci A, Olivaro C, Almeida Da Silva P, Daniela Ramos D, Cerdeiras MP, Vázquez A. Initial antimicrobial activity studies of plants of the riverside forests of the southern Uruguay River. Rev bras farmacogn. 2009; 19(1A):20-5.
- Ncube NS, Afolayan AJ, Okoh AI. Assessment techniques of antimicrobial properties of natural compounds of plant origin: current methods and future trends. Afr J Biotechnol. 2008; 7(12):1797-806.
- Arencibia Arrebola DF, Rosario Fernández LA, Suárez Fernández YE, Soroa Millán Y. Consideraciones importantes acerca de la cuarentena de ratas y ratones como biomodelos experimentales en toxicología. Revisión. Vet Arg XXVII. 2010; 271.
- Zanetti GD, Manfron MP, Hoelzel SC, Pagliarin VP, Morel AF. Toxicidade aguda e atividade antibacteriana dos extratos de *Tropaeolum majus* L. Acta farm bonaer. 2003; 22(2):159-62.