

Actividad antibacteriana y citotoxicidad *in vivo* de extractos etanólicos de *Bauhinia variegata* L. (Fabaceae)

Antibacterial activity and *in vivo* cytotoxicity of ethanol extracts from *Bauhinia variegata* L. (Fabaceae)

MSc. Maby M. Martínez, MSc. Diana M. Ocampo, BSc. Jhon H. Galvis, Andrea Valencia

Universidad de Caldas, A. A. 275. Manizales, Colombia.

RESUMEN

Introducción: diversas investigaciones han identificado el potencial biológico de diferentes compuestos como flavonoides, taninos, esteroides, naftoquinonas y sesquiterpenoides presentes en el género *Bauhinia*. Se ha reportado para la especie *Bauhinia variegata* la presencia de flavonoides con propiedades antidiabéticas y antivirales; sin embargo, el estudio del potencial antibacteriano y citotóxico *in vivo* es incipiente, tanto para compuestos de flavonoides como de alcaloides.

Objetivo: determinar la actividad antibacteriana y citotóxica *in vivo* de los extractos alcaloidales de *Bauhinia variegata* L.

Métodos: se aplicó cromatografía de columna para la extracción y el aislamiento de los alcaloides presentes en las hojas de *B. variegata*. Extractos y fracciones alcaloidales se evaluaron para determinar el potencial citotóxico por medio del bioensayo sobre "camarones de mar" (*Artemia salina*) y el potencial antibacteriano sobre *Escherichia coli* por medio del método de difusión en disco (antibiograma por difusión).

Resultados: se obtuvieron 6 compuestos depurados, a los cuales se les determinó la presencia del núcleo protoberberínico según espectrofotometría ultravioleta. En relación con el bioensayo sobre *Artemia salina*, el extracto crudo mostró menor toxicidad ($CL_{50} > 1\ 000\ \mu\text{g/mL}$), mientras que la fracción de los alcaloides totales y el compuesto CD1 mostró alta toxicidad ($CL_{50} < 500\ \mu\text{g/mL}$); contrario a lo evidenciado para el bioensayo antimicrobiano, porque no se presentaron halos de inhibición para los tratamientos con los extractos y compuestos utilizados.

Conclusiones: la actividad citotóxica reportada se debe al efecto sinérgico del conjunto de metabolitos secundarios que pudieron evidenciarse en la planta y a los cuales también se les reconoce esta actividad (alcaloides y terpenos), que explica así la toxicidad mostrada por la fracción de los alcaloides totales.

Palabras clave: alcaloides, *Artemia salina*, *Bauhinia*, citotoxicidad, *Escherichia coli*.

ABSTRACT

Introduction: several research studies have identified the biological potential of different compounds such as flavonoids, tannins, steroids, naphthoquinones and sesquiterpenoid present in the genus *Bauhinia*. It has been reported for the species *B. variegata* the presence of flavonoids with anti-diabetic and antiviral properties, but the study of antibiotic and cytotoxic potential is just incipient for both flavonoid and alkaloid compounds.

Objective: to determine the antibacterial and in vivo cytotoxic activity of alkaloid extracts from *Bauhinia variegata* L.

Methods: column chromatography for extraction and isolation of alkaloids in *B. variegata* leaves was performed. Alkaloid extracts and fractions were tested through bioassay for their cytotoxic potential on "brine shrimp" (*Artemia salina*) and the antibacterial potential on *Escherichia coli* through the disk diffusion method (antibiogram by diffusion).

Results: six compounds were purified and measured the presence of the protoberberinic nucleus by means of UV spectrophotometry. Regarding *Artemia salina* bioassay, the crude extract (CE) showed less toxicity ($LC_{50} > 1000 \mu\text{g/mL}$), whereas the fraction of the total alkaloid fraction (TA) and the CD1 compound showed high toxicity ($LC_{50} < 500 \mu\text{g/mL}$). Unlike the evidence for the antimicrobial bioassay, no inhibition zones for treatment with the extracts and the compounds appeared.

Conclusions: the reported cytotoxic activity is caused by the synergistic effect of all secondary metabolites that could occur in the plant, which were also associated with this activity (alkaloids and terpenes) that account for the toxicity shown by the total alkaloid fraction.

Key words: alkaloids, *Artemia salina*, *Bauhinia*, cytotoxicity, *Escherichia coli*.

INTRODUCCIÓN

En países como Colombia, poseedores de una alta biodiversidad, resulta especialmente importante el estudio de las plantas, extractos o sustancias puras que presentan significativa actividad terapéutica. Dentro de las múltiples estrategias que se pueden utilizar para la selección de especies vegetales como fuentes de principios activos, el estudio de la letalidad que producen los extractos sobre larvas de *Artemia salina*, ha demostrado ser útil para estos propósitos.^{1,2}

Desde 1982 se han venido desarrollando bioensayos para la determinación de la citotoxicidad *in vivo* con la utilización de "camarones de mar" (*Artemia salina*); los

cuales son utilizados como vía inicial de tamizaje citotóxico *in vivo* de extractos, fracciones y compuestos depurados, con el fin de discriminar aquellas muestras de elevada toxicidad, debido a que presenta buena correlación con la citotoxicidad *in vitro*. Además de esta actividad tóxica a nivel celular, se presenta la exploración de la actividad antimicrobiana, debido a la facilidad de detección de este potencial, mediante la observación de la respuesta al crecimiento o inhibición de varios microorganismos a tejidos o extractos de plantas puestos en contacto con ellos;³ principalmente sobre *Escherichia coli*, la cual está presente en grandes concentraciones en la microflora intestinal normal de las personas y animales, donde, por lo general, es inocua. Sin embargo, en otras partes del cuerpo puede causar enfermedades graves como infecciones en vías urinarias y del aparato excretor, cistitis, meningitis, peritonitis, mastitis, septicemia y neumonía gramnegativa.⁴⁻⁶ De acuerdo con lo anteriormente expuesto, estos métodos son los más adecuados para poner en manifiesto metabolitos secundarios relacionados con actividades biológicas interesantes.⁷

La familia Fabaceae se caracteriza por la presencia de numerosas sustancias bioactivas de diversa naturaleza química en corteza, hojas y raíz. De esta familia se han caracterizado y reportado alcaloides, flavonoides y polifenoles. La bioactividad de este tipo de metabolitos de plantas está asociada a su efecto antidiabético,⁸⁻¹³ antiinflamatorio¹⁴ y antimicrobiano.¹⁵ Entre las especies más estudiadas fitoquímicamente, se pueden citar *Bauhinia manca*,¹⁶ *Bauhinia candicans*,¹⁷ *Bauhinia uruguayensis*,¹⁸ *Bauhinia purpurea*,¹⁹ *Bauhinia forficata*²⁰ y *Bauhinia splendens*.²¹ En este género hay una mayor variedad de compuestos como esteroides, terpenoides y flavonoides. Sin embargo, aunque muchos compuestos son conocidos, se sabe poco sobre la actividad farmacológica de la mayoría de las sustancias aisladas del género *Bauhinia*.²²

La especie *Bauhinia variegata* L. (Fabaceae), conocida comúnmente como "casco de buey", "casco de vaca" o "mororó", es la más utilizada en la medicina tradicional como un "remedio" para el tratamiento de la diabetes.²³ Sin embargo, *B. variegata* presenta escasos reportes en la literatura, desde el punto de vista citotóxico y antibacterial; por esta razón fue seleccionada de la información etnobotánica, con el fin de determinar la bioactividad de los extractos etanólicos foliares sobre *Artemia salina* y *Escherichia coli*.

MÉTODOS

Colección del material vegetal

Las hojas de *B. variegata* se colectaron en el municipio Manizales, departamento Caldas, Colombia; un ejemplar reposa en el herbario adscrito a la Facultad de Agronomía de la Universidad de Caldas (FAUC) bajo el número 20601. Las hojas se secaron a temperatura ambiente durante 48 h; posterior a ello, fueron molidas, con el fin de realizar extracciones sucesivas con etanol 96 % mediante el método de maceración en frío, esta percolación se llevó a cabo hasta que se obtuvieron filtrados incoloros. Al extracto etanólico se le realizó un desengrase con hexano y luego se realizó la extracción clásica de alcaloides totales, donde el extracto se disuelve en HCl 3 %, con el fin de obtener los alcaloides totales (AT) en forma de sales y, luego, extraerlos puros en medio básico con diclorometano.²⁴ Estas sales fueron monitoreadas por cromatografía de capa fina (CCF), reactivo de *Dragendorff* y lámpara de luz UV, y fraccionadas utilizando cromatografía de columna (CC), con

el empleo de sílica gel como fase estacionaria y un sistema binario de solventes como fase móvil (MeOH/AcOET).

Ensayos de actividad biológica

Determinación citotóxica de los extractos y compuestos depurados aislados de Bauhinia variegata utilizando como organismo de ensayo Artemia salina

El potencial citotóxico *in vivo* de los extractos se determinó mediante la evaluación de su toxicidad para el crustáceo *Artemia salina*. Los extractos se consideraron activos cuando presentaron concentraciones letales medias (CL₅₀) menores a 1 000 µg/mL. La selección del bioensayo se realizó, considerando que en repetidas ocasiones se ha encontrado una correlación entre la presencia de alcaloides citotóxicos y la toxicidad mostrada frente al crustáceo por los extractos crudos.²⁵

Protocolo experimental para la preparación de bioensayos de citotoxicidad con Artemia salina

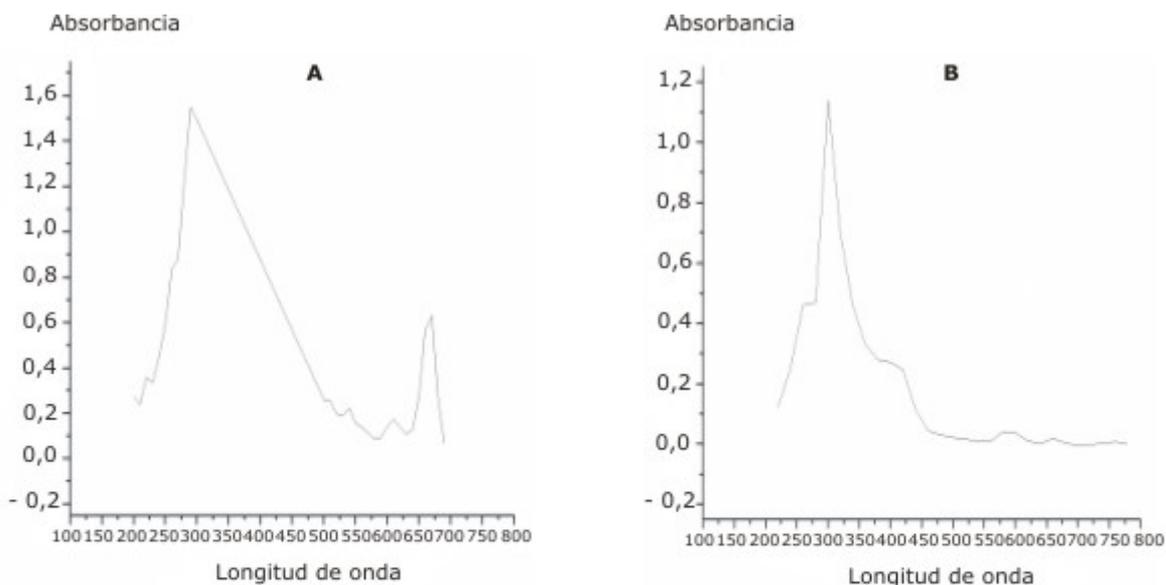
Los huevos de *Artemia salina* se incubaron en solución de sal marina en presencia de luz artificial y a temperatura ambiente durante 48 h. Las muestras se evaluaron a concentraciones de 1000, 500 y 250 µg/mL, solubilizadas en etanol, el cual se dejó durante 24 h a temperatura ambiente para su evaporación; posterior a ello la goma se solubilizó en solución de sal marina (en todos los casos los ensayos se efectuaron por triplicado). A cada tubo se le agregaron 10 organismos ("nauplii") y se incubaron a temperatura ambiente por 24 h, se realizó un monitoreo cada 4, 6, 8, 12 y 24 h. Como control se usó la solución de sal marina, sin los extractos/fracciones/compuestos depurados, con 10 individuos. Al cabo de ese tiempo se contabilizaron los organismos vivos y por diferencia se determinó el porcentaje de mortalidad. El cálculo de la concentración de extracto que provoca la muerte de 50 % de los organismos (CL₅₀) y su intervalo de confianza de 95 % se efectuó por medio del método estadístico *Probit*.²⁶

Actividad antibacteriana sobre Escherichia coli

El ensayo de actividad antibacteriana se efectuó por el método de antibiograma por difusión o difusión en disco de papel filtro Whatman® (6 mm de diámetro; 0,6 mm de espesor) en agar Müller-Hinton para la valoración de los halos de inhibición de *E. coli*;²⁷⁻³² previamente se realizó la estandarización de la turbidez para la preparación del inóculo por medio del estándar de 0,5 *McFarland*,³³ con la finalidad de obtener una suspensión de 1 a 2 × 10⁸ UFC/mL. Los discos se impregnaron con las diluciones etanólicas de los extractos y compuestos depurados a concentraciones de 1 000, 500 y 250 µg/mL, incubados a 37 °C durante 48 h en cajas de petri.^{34,35} Como control se utilizó sultamicilina (ampicilina/sulbactán; 1 000 µg/mL). En todos los casos los ensayos se efectuaron por triplicado. Se midió el diámetro (mm) de todos los halos de inhibición, para comparar el efecto de los extractos con el medicamento utilizado como control y así determinar los puntos de corte, basados en los criterios del *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)*, documento *Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters version 1.3*,³⁶ para identificar la sensibilidad o resistencia del microorganismo frente a los tratamientos.

RESULTADOS

Del extracto etanólico de las hojas de *Bauhinia variegata* se identificaron aquellos alcaloides de los cuales se disponía de la cantidad necesaria (CD1 y CD7), por medio de espectrofotometría UV; que evidencia máximos de absorción hacia 225 y 280 nm y entre 250 y 260 nm; además de un pico pronunciado hacia 650 y 700 nm (Fig. A y B), característico de sistemas protoberberínicos;³⁷ igualmente, el compuesto CD1 se caracterizó por presentar puntos de fusión entre 250 y 260 °C.



A: espectrofotometría del compuesto CD1 con máximos de absorción entre 250 y 320 nm, y entre 650 y 700 nm.

B: espectrofotometría del compuesto CD7 con máximos de absorción entre 250 y 320.

Fig. Compuestos depurados obtenidos por cromatografía de columna.

Actividad biológica

Los datos reportados en el bioensayo de citotoxicidad *in vivo*, el cual se efectuó para el extracto crudo (EC), la fracción de los alcaloides totales (AT) y el compuesto CD1, demostraron que el AT y CD1 presentaron niveles altos de toxicidad, 129,96 µg/mL y 302,37 µg/mL, respectivamente; esta toxicidad se atribuye a que las CL₅₀ se mantuvieron entre 100 y 500 µg/mL. Para el EC evaluado, se evidenció menor número de individuos muertos, además de presentar valores en la CL₅₀ mayores que la máxima concentración evaluada (tabla 1). Con respecto a la evaluación antibacteriana, no se evidenció actividad antibiótica para los tratamientos con EC, AT y D6, debido a que no presentaron diámetros de inhibición; el compuesto D3 presentó un diámetro menor que 14 mm y el compuesto D5 un diámetro cercano a 14 mm en la máxima concentración evaluada (13 mm/1 000 µg/mL). Esto lo hace un candidato promisorio para futuras investigaciones, utilizándolo con un mayor grado de purificación. Aunque se evidenció este punto de corte aproximado al límite

de la susceptibilidad, se evidencia la resistencia del microorganismo a estos compuestos (tabla 2).

Tabla 1. Concentraciones letales medias y bioactividad del extracto crudo, alcaloide total y compuesto depurado, obtenidos en el bioensayo citotóxico

Tratamiento	CL ₅₀ (µg/mL)	Bioactividad		
		Muy activo (≤ 100 µg/mL)	Activo (100-500 µg/mL)	Potencialmente no activo (≥ 1 000 µg/mL)
EC	5,48×10 ⁶	-	-	+
AT	302,376	-	+	-
CD1	129,966	+	-	-

CL₅₀: concentraciones letales medias, EC: bioactividad del extracto crudo, AT: alcaloide total, CD1: compuesto depurado.

Tabla 2. Diámetros obtenidos a partir de los bioensayos con *Escherichia coli*, determinantes de la susceptibilidad o resistencia

Nombre del producto	Tipo	Concentración (µg/mL)	Promedio diámetro (mm)	Puntos de corte	
				Susceptible (≥ 14 mm)	Resistente (≤ 14 mm)
B. var EC	E	250	0	-	+
		500	0	-	+
		1 000	0	-	+
B. var AT	F	250	0	-	+
		500	0	-	+
		1 000	0	-	+
B. var D3	CD	250	0	-	+
		500	0	-	+
		1 000	3,86	-	+
B. var D5	CD	250	1,8	-	+
		500	0,6	-	+
		1 000	13	-	+
B. var D6	CD	250	0	-	+
		500	0	-	+
		1 000	0	-	+
Sultamicilina	CP	1 000	27,33	+	-

E: extracto, F: fracción, CD: compuesto depurado, CP: compuesto puro.

DISCUSIÓN

El uso medicinal de las plantas del género *Bauhinia* por la población en diferentes partes del mundo ha encontrado apoyo en los estudios científicos que demuestran la eficacia de estas plantas en diferentes modelos experimentales. En este contexto, algunos efectos biológicos o farmacológicos, como antimicótico, antibacterial, analgésico, antiinflamatorio y sobre todo antidiabético, son reportados en la literatura, lo que confirma y justifica el uso de estas especies en la medicina popular. Aunque muchos compuestos, incluidos los alcaloides, terpenos, esteroides

y flavonoides, se han aislado e identificado en estas especies, hay pocos estudios que se relacionan con los efectos biológicos de tipo citotóxico, sobre todo de los compuestos de tipo alcaloidal.

De acuerdo con lo anterior, se evidenció un potencial farmacológico de tipo citotóxico de los alcaloides aislados; este efecto se atribuye al núcleo protoberberínico identificado por medio de la espectrofotometría UV, el cual está presente en los extractos y fracciones sometidos a los ensayos. Aunque los compuestos de este núcleo han sido empleados en los tratamientos para la tumefacción esplénica, malaria y leishmaniosis cutánea; además de tener propiedades antibacterianas y antimicóticas,³⁸⁻⁴¹ no se evidenció el potencial antibacterial debido quizá a la purificación parcial de los compuestos utilizados en los bioensayos.

La bioactividad reportada por la etnobotánica colombiana para esta especie, podría fundamentarse no solo en los diferentes mecanismos ejercidos por los compuestos fenólicos (flavonoides, taninos y quinonas), sino además por efecto sinérgico del conjunto de metabolitos secundarios que pudieron evidenciarse en la planta y a los cuales también se les reconoce esta actividad (alcaloides, terpenos), lo cual explica la alta toxicidad mostrada por la fracción de los alcaloides totales.

Los resultados permiten concluir que en las hojas de *Bauhinia variegata* se encuentran metabolitos de tipo alcaloidal que poseen propiedades farmacológicas de tipo citotóxico; por lo cual, se hace necesario continuar estudiando estos principios activos que permitan determinar las propiedades antitumorales de esos compuestos. Asimismo, es importante continuar estudios para determinar la actividad antiparasitaria de los compuestos alcaloidales (leishmaniosis, malaria y enfermedad de chagas), utilizando sistemas *in vitro* con células no tumorales como son los cultivos primarios de macrófagos humanos o de hámster.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Universidad de Caldas. La asistencia técnica de Gerardo Herrera del Laboratorio de Bioquímica de la Universidad de Caldas es también apreciada.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Meyer BM, Ferrigni NR, Putman JE, Jacobsen LB, Nichols DE, McLaughlin JL. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Med.* 1982;45:31-4.
2. Lewan L, Andersson M, Morales-Gómez P. The use of *Artemia salina* in toxicity test. *ATLA.* 1992;20:297-301.
3. Payrol JA, Martínez MM, Carrabeo GT, García CO. Actividad farmacológica preliminar del fruto de *Bromelia pinguin* L. (piña de ratón). *Rev Cubana Farm.* 2001;35:56-60.
4. Winüeld MD, Groisman EA. Role of non-host environments in the lifestyles of *Salmonella* and *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol.* 2003;69:3687-94.

5. Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL. Pathogenic *Escherichia coli*. Nat Rev Microbiol. 2004;2: 123-40.
6. Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. CMR 1998;11:142-201.
7. Sanabria-Galindo A, López SI, Gualdron R. Estudio fitoquímico preliminar y letalidad sobre *Artemia salina* de plantas colombianas. Rev Col Cienc Quim Farm. 1997;26:15-9.
8. Russo EMK, Reichelt AAJ, De-Sa JR, Furlanetto RP, Moises RCS, Kasamatsu TS, et al. Clinical trial of *Myrcia uniflora* and *Bauhinia forficata* leaf extracts in normal and diabetic patients. Braz J Med Biol Res. 1990;23:11-20.
9. Soares J, Costa S, Cecim M. Níveis glicêmicos de colesterol em ratos com diabetes melittus aloxano induzido, tratados com infusão de *Bauhinia candicans* ou *Syzygium jambolanum*. Ciência Rural. 2000;30:113-8.
10. Da Silva ML, Filho VC. Plantas do gênero *Bauhinia*: Composição química e potencial farmacológico. Química nova. 2002;25:449-54.
11. Damasceno DC, Volpato GT, Mattos I, Calderon P, Aguilar R, Cunha-Rudge MV. Effect of *Bauhinia forficata* extracts in diabetic pregnant rats: maternal repercussions. Phytomedicine. 2004;11:196-201.
12. Gupta M, Mazumder UK, Sambath K, Gomathi P, Rajeshwar Y, Kakoti BB, Tamil-Selven V. Antiinflammatory, analgesic and antipyretic effects of methanol extract from *B. racemosa* stem bark in animal models. J Ethnopharmacol. 2005;98:267-73.
13. Murillo E, Tique MM, Ospina LF, Lombo Ó. Evaluación preliminar de la actividad hipoglicemiante en ratones diabéticos por aloxano y capacidad antioxidante *in vitro* de extractos de *Bauhinia kalbreyeri* Harms. Rev Col Cienc Quim Farm. 2006;35:64-80.
14. Yadava RN, Reddy VM. Anti-inflammatory activity of a novel flavonol glycoside from the *Bauhinia variegata* Linn. Nat Prod Res. 2003;17:165-9.
15. Pokhrel NR, Adhikari RP, Baral MP. *In vitro* evaluation of the antimicrobial activity of *Bauhinia variegata*, locally known as Koiralo. World J Microbiol Biotechnol. 2002;18:69-71.
16. Achenbach H, Stocker M, Constenla MAF. Flavonoid and other constituents of *Bauhinia manca*. Phytochemistry. 1988;27:1835-41.
17. Iribarren AM, Pomilio AB. Components of *Bauhinia candicans*. J Nat Prod. 1983;46:752-3.
18. Iribarren AM, Pomilio AB. Steroidal glycosides, flavonoids and other components of *Bauhinia uruguayensis*. Assoc Quim Argent. 1989;77:461-6.
19. Yadava RN, Tripathi P. A novel flavone glycoside from the stem of *Bauhinia purpurea*. Fitoterapia. 2000;71:88-90.

20. Silva KL, Biavatti MW, Leite SN, Yunes RA, Delle-Monache F, Cechinel-Filho VZ. Phytochemical and pharmacognositic investigation of *Bauhinia forficata* L. (Leguminosae) Z. Naturforsch. 2000;55:478-80.
21. Cechinel-Filho V, Breviglieri E, Willain-Filho A, Santos ARS. Estudo fitoquímico e avaliação preliminar da atividade analgésica de *Bauhinia splendens*. Rev Bras Farm. 1995;76:115-7.
22. Da Silva ML, Filho VC. Plantas do gênero *Bauhinia*: Composição química e potencial farmacológico. Química nova. 2002;25:449-54.
23. Gil-Otaiza R. Plantas usuales en la medicina popular venezolana. Mérida. Venezuela: Editorial Universidad de Los Andes; 1997.
24. Lock O. Investigación fitoquímica: Métodos en el estudio de productos naturales. Lima, Perú: Fondo editorial; 1994.
25. McLaughlin J, Colman-Saizarbitoria T, Anderson J. Tres bioensayos simples para químicos de productos naturales. Rev Soc Ven Quim. 1995;18:13-21.
26. Finney DL. Statistical method in biological assay. London: High Wycombe; 1978.
27. Murray PR, Baron M, Pfaller A, Tenover R, Tenover H. Manual of clinical microbiology. Washington, DC.: ASM; 1995.
28. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria. Approved Standard. Villanova, PA; 2001.
29. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically. Approved standard M7-A3. Villanova, PA; 1993.
30. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility test. Approved standard M2-A5; 1993.
31. Müller J, Hinton J. A protein free medium for primary isolation of *Gonococcus* and *Meningococcus*. Proc Soc Exp Biol Med. 1941;48:330-3.
32. Bauer AL, Kirby WMM, Sherris JC, Tenover M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. Am J Clin Pathol. 1966;45:493-6.
33. McFarland J. Nephelometer. J Am Med Assoc. 1907;14:1176-8.
34. Rojas A, Hernández L. Screening for antimicrobial activity of crude drugs extracts and pure natural form Mexican medicinal plants. J Ethnopharmacol. 1992;35:275-83.
35. Arroyo G. Determinación químico-bromatológica y actividad antimicrobiana de *Spondias mombi* L. (Ubo). Ciencia e Investigación. 2000;3:59-62.

36. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters 2011-01-05 (v 1.3). [(cited Mar 30 2011).] Available in: http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Disk_test_documents/EUCAST_breakpoints_v1.3_pdf.pdf
37. Shamma M. The isoquinoline alkaloids: Chemistry and Pharmacology. Verlag Chemie, NY: Academic Press; 1972.
38. Bernal HY, Correa JE. Especies vegetales promisorias de los países del convenio Andrés Bello. Bogotá, Colombia: Editorial SECAB; 1989.
39. Abbasoglu U, Sener B, Gunay Y, Temizer H. Antimicrobial activity of some isoquinoline alkaloids. Archiv de Pharmazie. 1991;324:379-80.
40. Paulo MQ, Barbosa-Folho JM, Lima EO, Maia RF, Barbosa RC, Kaplan MA. Antimicrobial activity of benzylisoquinoline alkaloids from *Annona salzmanii*. J Ethnopharmacol. 1992;36:39-41.
41. Suffredini IB, Sader HS, Gonçalves AG, Reis AO, Varella AD, Younes RN. Screening of antibacterial extracts from plants to the Brazilian Amazon rain forest and Atlantic forest. Braz J Med Biol Res. 2004;37:379-84.

Recibido: 11 de mayo de 2011.

Aprobado: 8 de agosto de 2011.

Jhon H. Galvis. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Caldas, A. A. 275 Manizales, Colombia. Teléf.: (576) 312 896 35 70. Correo electrónico: jhongalvis@live.com