

# EVALUACIÓN *IN VITRO* DE LAS ACTIVIDADES ANTIBACTERIANA Y ANTIDERMATÓFICA DEL EXTRACTO ALCALOIDAL DEL LÁTEX DE *BROSIMUM UTILE* (KUNTH) PITTIER

## In Vitro Evaluation Of The Antibacterial And Anti-Dermatological Activities Of The Alkaloidal Latex Extract Of *Brosimum Utile* (Kunth) Pittier

<sup>1</sup>Karen Acosta\*, <sup>1</sup>Alex Jiménez, <sup>1</sup>Diego Vinueza, <sup>1</sup>Gisela Pilco, <sup>1</sup>Susana Abdo

<sup>1</sup>Facultad de Ciencias, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Panamericana Sur km 1 ½, Riobamba, Ecuador.

\*karen.acosta.leon@gmail.com

### Resumen

*Brosimum utile* (Kunth) Pittier es una especie distribuida principalmente en la cuenca amazónica de Perú, Ecuador y Colombia. En Ecuador, esta especie se denomina comúnmente sande o sandi, y de ella se obtiene látex (leche de sandi), el cual presenta diversas aplicaciones tradicionales. La caracterización fitoquímica del látex de *Brosimum utile* evidenció la presencia de terpenos, saponinas, gomas, grasas, resinas y alcaloides. El extracto total de alcaloides de este látex fue obtenido y evaluado *in vitro* para determinar su actividad frente a bacterias patógenas y hongos dermatofitos. La actividad antibacteriana fue determinada mediante el método de Mistcher frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae*, observando una concentración mínima inhibitoria (CMI) de 1600 µg/ml. La actividad antifúngica se comprobó mediante el método de difusión en disco frente a dos hongos dermatofitos, *Trichophyton rubrum* y *Epidermophyton floccosum*; mostrando un valor de CMI de 2000 µg/ml y diámetros de los halos de inhibición que indican que los hongos evaluados son susceptibles al extracto alcaloidal. La actividad antimicrobiana del látex de *B. utile* es destacable, lo que demuestra su potencial para el futuro desarrollo de formulaciones antibióticas y antifúngicas.

**Palabras claves:** *Brosimum utile*, alcaloides, actividad antibacteriana, actividad antifúngica, dermatofitos.

### Abstract

*Brosimum utile* (Kunth) Pittier is a species distributed mainly in the Amazon of Peru, Ecuador and Colombia. This species in Ecuador is commonly known as sande or sandi, and its latex (leche de sandi) has several traditional applications. The phytochemical characterization of *Brosimum utile* latex evidences the presence of terpenes, saponins, gums, fats, resins and alkaloids. The total alkaloid extract of this latex was obtained and evaluated *in vitro* to determine its activity against pathogenic bacteria and dermatophyte fungi. The antibacterial activity was determined by the method of Mistcher against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae*, showing a minimum inhibitory concentration (MIC) of 1600 µg/ml. The antifungal activity was checked by the disc diffusion method against two dermatophyte fungi, *Trichophyton rubrum* and *Epidermophyton floccosum*, MIC value was 2000 µg/mL and diameters of the inhibition halos obtained indicate that the evaluated fungi are susceptible to the alkaloid extract. The antimicrobial activity of *Brosimum utile* latex is remarkable, showing its potential for the future development of antibiotic and antifungal formulations.

**Keywords:** *Brosimum utile*, alkaloids, antibacterial activity, antifungal activity, dermatophytes.

## INTRODUCCIÓN

*Brosimum utile* es un árbol que pertenece a la familia *Moraceae*, que se encuentra distribuido en Bolivia, Perú, Ecuador, Colombia, Venezuela, Panamá, Brasil, Costa Rica y la Guayana Británica, donde crece en bosques tropicales húmedos de tierras bajas. Esta especie puede medir en promedio 20-30 m, pudiendo alcanzar más de 40 m de alto (1-2). Sus nombres comunes son lechero, guáimaro, árbol de vaca, avichuri (Colombia), mastate, palo de vaca (Costa Rica, Panamá y Venezuela), pangwana (Perú) y amapa doce (Brasil) (3). En el caso del Ecuador, se lo conoce como sande o sandi (castellano), sant+ (awapit), fuka (tsafi'ki), santi wiki (kichwa), camina'jin, ccovi ne'mba (a'ingae), o posa hui'to (pai coca) (4).

*Brosimum utile* presenta un fuste recto y cilíndrico, con raíces tablares bajas y redondeadas. Su copa es irregular y amplia. La corteza externa es de color marrón rojizo y pintas plateadas, con lenticelas abundantes y prominentes; apariencia lisa o finamente agrietada de 2 cm de espesor. La corteza interna es de color anaranjado y presenta abundante exudación en forma de látex blanco. Sus hojas son simples, alternas, con estípula terminal. Las hojas en estado de fustal son grandes y gruesas, miden aproximadamente 12 cm de longitud y 6 cm de ancho. Las flores son diminutas y se encuentran dispuestas en la axila de la hoja. Los frutos están agrupados en forma de infrutescencias globosas de un diámetro aproximado de 1,5 cm (3).

El látex fresco (leche de sandi), las semillas tostadas y el fruto de *B. utile* son comestibles. Los pueblos amazónicos y chachis del Ecuador usan el látex para la obtención de caucho e impermeabilizar botes y canoas (4). De igual manera, el látex presenta diversos usos en la medicina tradicional como antiácido, antiespasmódico, antihelminítico, antiinflamatorio, antiparasitario, antirreumático, purgante y cicatrizante (4-5). Asimismo, es conocido su empleo como gastroprotector por los pueblos amerindios amazónicos de la nacionalidad indígena cofán o a'i. Además, está aprobado por la FDA el uso de este exudado en la fabricación de goma de mascar (6).

En la actualidad, son numerosos los estudios realizados sobre las múltiples resistencias que presentan las cepas bacterianas frente a los antibióticos de uso común (*Multiple Drug Resistance*, MDR). Estos patógenos a menudo ocasionan infecciones de carácter crónico y difícil tratamiento, llevando en muchos casos a la muerte de los pacientes. Estas resistencias se han observado tanto en bacterias Gram-negativas como Gram-positivas, con especial influencia y mortalidad en el ámbito hospitalario (infecciones nosocomiales, ESKAPE).

Bacterias MDR como las entéricas virulentas *Klebsiella*, *Salmonella*, *Pseudomonas*, *Shigella*, *Escherichia*, y otras, son activas en lugares poco higiénicos, comunidades marginales, guetos urbanos y llegan a suponer un problema de salud pública. Por otro lado, las especies MDR *Staphylococcus*, *Enterococcus* y *Streptococcus* son conocidas por haber desarrollado resistencias frente a  $\beta$ -lactámicos y otros tipos de antibióticos (7-8).

La resistencia a antibióticos puede ser intrínseca o adquirida. La intrínseca suele guardar relación con fenómenos de impermeabilidad, inactivación o eflujo; mientras que las resistencias adquiridas suelen deberse a mutaciones que llevan a inactivación o desensibilización, y suelen estar mediadas por la presión selectiva que ejerce el propio tratamiento antibiótico y mecanismos asociados a "quorum sensing". Claros ejemplos de resistencia adquirida podrían ser la resistencia a meticilina en *Staphylococcus aureus* o a los tratamientos con carbapenemasa en *Klebsiella pneumoniae*. Ante esta situación, la Organización Mundial de la Salud considera oportuno el desarrollo de alternativas para el control de bacterias MDR, lo cual supone un reto en los ámbitos de la farmacognosia y farmacología (7-8).

Las dermatofitosis son un conjunto de enfermedades micóticas superficiales causadas por hongos que afectan a la piel, a nivel de la epidermis, llegando a invadir tejidos queratinizados como uñas y pelo, y afectando tanto al hombre como a algunos animales. Son causadas por un grupo de hongos, llamados dermatofitos pertenecientes a los géneros *Microsporum*, *Trichophyton* y *Epidermophyton* (9).

Las investigaciones centradas en *B. utile* son prácticamente escasas. Ferrari et ál. (2005) determinaron la presencia de isoflavonas en la corteza de las raíces de *B. utile*, destacando la actividad del hidrato de isowigteona, compuesto que demostró

una significativa toxicidad *in vitro* sobre las líneas celulares MCF-7 (carcinoma humano de pecho) y PC3 (carcinoma humano de próstata) (2). No obstante, no se han registrado estudios fitoquímicos ni de actividad biológica del látex de *B. utile*, considerando que son múltiples las utilidades que le han sido atribuidas en la medicina tradicional. Por ello, teniendo en cuenta que, a nivel de la fisiología vegetal, el látex ejerce un efecto protector contra agentes invasores externos como bacterias y hongos, la presente investigación se ha centrado en la determinación cualitativa de los metabolitos de este exudado vegetal y la evaluación de sus actividades antimicrobiana y antifúngica.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material vegetal

Para la realización de este estudio se emplearon 2000 ml de látex de la planta *Brosimum utile*. La muestra vegetal fue obtenida de la Amazonía ecuatoriana, en la provincia de Sucumbíos, ciudad de Lago Agrio, zona situada a una altitud de 300 metros sobre el nivel del mar (m.s.n.m) y con una temperatura promedio anual de 25 a 29 °C.

### Pruebas preliminares del látex

Con el objetivo de estandarizar las condiciones iniciales del látex, se analizaron las características organolépticas y físicas de este: coloración, textura, aspecto, olor, sabor y pH. Además, se hicieron pruebas de solubilidad con diferentes solventes (metanol, etanol y agua) para determinar cuál es el solvente que reúne las características adecuadas para realizar la extracción de alcaloides.

### Tamizaje fitoquímico

Para la determinación de los principales grupos fitoquímicos presentes se reali-

zaron los ensayos de caracterización: Sudan, catequinas, resinas, Fehling, Baljet, Liebermann-Buchard, FeCl<sub>3</sub>, espuma, Borntrager, Shinoda, hidroxamato férrico, Dragendorff, Wagner, Mayer, mucílagos y principios amargos (10).

### Obtención del extracto alcaloidal

La obtención del extracto alcaloidal se realizó mediante dos métodos, con el fin de determinar el protocolo que permita un rendimiento de extracción superior. En el primer protocolo se mezcló agua acidulada (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 %) con el látex, agitando vigorosamente y se procedió a filtrar. Al filtrado obtenido se le añadió éter etílico para eliminar las materias neutras solubles en este solvente (ceras, mucílagos, grasas, etc.), y se repitió la filtración. El filtrado ácido obtenido fue basificado con NH<sub>4</sub>OH hasta pH 9 y sometido a una extracción exhaustiva de los alcaloides utilizando cloroformo. Finalmente, el extracto clorofórmico se concentró al vacío a temperatura de ebullición del solvente (40 °C) hasta eliminación total del solvente de extracción. Para su conservación, se reconstituyó en metanol hasta el momento de su uso.

En el segundo procedimiento de extracción, se diluyó el látex con metanol y se refrigeró durante 10 minutos con el fin de estabilizar la muestra y obtener un filtrado de características homogéneas y coloración semitransparente. A continuación, se filtró la mezcla y la solución resultante fue acidulada con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 2 %, hasta llegar a pH 1. El filtrado ácido se recogió y fue tratado con NH<sub>4</sub>OH concentrado hasta pH 9. El producto fue sometido a extracción con cloroformo para purificar la fracción alcaloidea y el extracto fue concentrado mediante rotavapor a presión reducida.

### Cromatografía en capa fina

Para realizar la cromatografía en capa fina del extracto de alcaloides obtenido, se activó la placa de Sílica gel 60 F254 con KOH 0,1 M disuelto en metanol. Como fase móvil se utilizó una mezcla de metanol y amoníaco (10:0,15). El revelado y observación se llevaron a cabo con reactivo de Dragendorff y luz ultravioleta (254 nm), respectivamente (11).

### Actividad antimicrobiana

Se utilizaron cepas estandarizadas de *Staphylococcus aureus* ATCC 1025, *Escherichia coli* ATCC 3522, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 1224 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 1652.

Se preparó un inóculo de microorganismos que cumplía el estándar de turbidez McFarland 0,5 (1,5x10<sup>8</sup> ufc/ml). Para el estudio de la actividad antimicrobiana se empleó el Método de Mitscher, usando como medio de crecimiento agar Mueller Hinton, y extracto total de alcaloides reconstituido en metanol a diferentes concentraciones (200, 500, 1000, 1200, 1400, 1600, 1800 y 2000 µg/ml), con el fin de determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI). Para cada concentración de estudio se realizaron tres repeticiones. El control positivo fue sulfato de gentamicina. Empleando el asa de cultivo, se inoculó el microorganismo siguiendo un patrón radial en cada caja de Petri desde el centro hacia el borde sin topar las paredes; se incubó durante 24 horas y, finalmente, se procedió a la lectura de los cultivos. Los resultados fueron clasificados como: A = activo (no existe crecimiento); P = parcialmente activo (poco crecimiento); I = inactivo (existe crecimiento) (12).

### Actividad antifúngica

Se utilizaron cepas estandarizadas de los dermatofitos *Trichophyton rubrum* ATCC 1825 y *Epidermophyton floccosum* ATCC 3562. Se preparó un inóculo de microorganismos que cumplía el estándar de turbidez McFarland 0,5 (1,5x10<sup>8</sup> ufc/ml). Para el estudio de la actividad antifúngica, se empleó el método de difusión en disco (13-14), de manera que se inoculó el hongo en la superficie del agar y, a continuación, se depositó un disco de papel cargado con concentraciones conocidas de

extracto (1600 y 2000 µg/ml). Para cada concentración de estudio se realizaron tres repeticiones. Se utilizó como control positivo fluoconazol. Los cultivos fúngicos se incubaron durante siete días a temperatura ambiente y se observó la ausencia, presencia y tamaño del halo de inhibición. Dependiendo del tamaño de la zona de inhibición (diámetro de halos) se realizó la siguiente clasificación: hongos sensibles, resistentes, intermedios o indeterminados.

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El látex presentó una coloración cremosa, textura pegajosa, aspecto grumoso, olor ligeramente ácido, sabor picante y un pH 4,25. El metanol solubilizó adecuadamente al látex, ya que no se formaron grumos y la solución fue más homogénea, incrementándose la velocidad y rendimiento de la filtración.

En la tabla 1, se observan los resultados obtenidos a partir del tamizaje fitoquímico del látex de *Brosimum utile*. En primer lugar, el extracto etéreo mostró resultados positivos en Lieberman-Buchard, lo que indica la presencia de tri-

Pruebas	Extracto etéreo	Extracto alcohólico	Extracto acuoso	Metabolitos identificados
Sudan	(+)			Grasas
Catequinas		(-)		Catequinas
Resinas		(+++)		Resinas
Fehling		(-)	(-)	Azúcares reductores
Baljet	(-)	(-)	(-)	Lactonas
Liebermann-Buchard	(++)	(-)	(-)	Triterpenos, esteroides
FeCl <sub>3</sub>		(-)	(-)	Fenoles
Espuma		(+)		Saponinas
Bontrager		(-)	(-)	Quinonas
Shinoda		(-)	(-)	Flavonoides
Hidroxamato férrico		(-)		Cumarinas
Dragendorff	(-)	(-)	(++)	Alcaloides
Mayer	(-)	(-)	(++)	Alcaloides
Wagner	(+)	(-)	(++)	Alcaloides
Mucilagos			(-)	Mucilagos
Principios amargos			(+)	Astringente

Tabla 1. Tamizaje fitoquímico del látex de *Brosimum utile*

terpenos y esteroides. Además, el resultado positivo en las pruebas de Sudan indica la existencia de grasas y aceites. El resultado positivo para Mayer fue el primer indicio de que el extracto contenía alcaloides. En el extracto alcohólico se observaron resinas y saponinas. En el extracto acuoso se evidenció la presencia de resinas; además se confirmó la presencia de alcaloides, mediante resultados positivos en los ensayos de Dragendorff, Mayer y Wagner.

Dentro de los metabolitos identificados, cabe destacar la importancia de las resinas, polímeros muy complejos propios de los exudados de árboles tropicales, producidos por estas especies como sustancias protectoras frente a ciertos parásitos vegetales (15). Por otro lado, es importante considerar la presencia de terpenos y alcaloides, metabolitos considerados como fitoalexinas; es decir, compuestos químicos vegetales presentes ante una infección microbiana. (16-17). Las fitoalexinas se encuentran en pequeñas cantidades en las plantas sanas, pero aumentan su concentración en presencia de daños producidos por patógenos como hongos, bacterias, virus u otros factores como fungicidas, sales de metales pesados, rayos UV, altas temperaturas y lesiones superficiales (18).

Utilizando el primer protocolo de ex-

tracción de alcaloides (véase apartado Material y métodos) se obtuvo un rendimiento de 0,25 mg por cada mililitro de látex respecto al método de mezcla inicial con agua acidulada, con el cual se alcanzaron 0,18 mg/ml; siendo mayor el rendimiento cuando se utilizó metanol como primer solvente de extracción. Se observa que el rendimiento de extracción de alcaloides a partir de látex de *B. utile* es bajo, probablemente debido a que el látex, por su naturaleza, presenta gran cantidad de resinas y gomas, lo que podría enmascarar diversos compuestos e impedir su extracción.

En la cromatografía en capa fina de ambos extractos según las condiciones descritas, se obtuvo una Relación de frentes (Rf) con un valor de 0,33. Un estudio fitoquímico previo del látex de *Brosimum acutifolium* identificó el alcaloide 5-hidroxi-triptamina (bufotenina), compuesto psicotrópico usado en la meseta de la Guyana como alucinógeno (19). El valor de Rf obtenido en el extracto de alcaloides de *B. utile* (0,33) resultó muy similar al de bufotenina reportado por Moffat et al. (Rf = 0,35) (11), lo cual podría indicar la posible presencia de alcaloides similares a bufotenina, considerando que ambas especies pertenecen al mismo género y se encuentran muy relacionadas filogenéticamente. No obstante, son necesarias futuras investigaciones para identificar las estructuras de los alcaloides presentes en el látex de *B. utile*.

De acuerdo con los datos expresados en la tabla 2, se puede observar que, para el rango de 200 a 1500 µg/ml de concentración del extracto de alcaloides no existió actividad antibacteriana. Se observa inhibición del crecimiento bacteriano a partir de concentraciones por encima de 1600 µg/ml, valor fijado como concentración mínima inhibitoria de *S. aureus* ATCC 1025, *E. coli* ATCC 3522,

CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (µg/ml)	200	500	1000	1200	1400	1500	1600	1800	2000
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 1025	I	I	I	I	I	I	A	A	A
<i>Escherichia coli</i> ATCC 3522	I	I	I	I	I	I	A	A	A
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 1224	I	I	I	I	I	I	A	A	A
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 1652	I	I	I	I	I	I	A	A	A

A= extracto activo (no existente crecimiento bacteriano); I= extracto inactivo (existe crecimiento bacteriano), Control positivo (sulfato de gentamicina): CMI = 25 µg/mL

Tabla 2. Actividad antibacteriana del extracto alcaloidal de *Brosimum utile* después de 24 horas de incubación

FORMACIÓN HALOS DE INHIBICIÓN (mm)	Extracto 1600 µg/mL	Extracto 2000 µg/mL	Control Positivo (fluconazol) 1 µg/mL
<i>Trichophyton rubrum</i>	0	19,52 ±0,50	19,16±0,28
<i>Epidermophyton floccosum</i>	0	17,40 ±0,52	19,34±0,40

Tabla 3. Actividad antifúngica del extracto de alcaloides de *Brosimum utile* después de siete días de incubación

*K. pneumoniae* ATCC 1224 y *P. aeruginosa* ATCC 1652. Para el control positivo (sulfato de gentamicina) se determinó una CMI de 25 µg/ml.

Como se observa en la tabla 3, a una concentración de 2000 µg/mL de extracto alcaloidal existe inhibición del crecimiento de las dos especies de hongos dermatofitos; formándose halos de inhibición de 19,52±0,50 mm para *Trichophyton rubrum* y de 17,4±0,52 mm para *Epidermophyton floccosum*. Estos valores indican que ambas especies de hongos son susceptibles ante la presencia del extracto alcaloidal del látex de *B. utile* a una concentración de 2000 µg/mL. Para fluconazol (control positivo) se observó una CMI de 1 µg/mL, y halos de inhibición de 19,16±0,28 mm para *Trichophyton rubrum* y de 19,34±0,40 *Epidermophyton floccosum*.

Existen pocos estudios de la actividad antimicrobiana de especies del género *Brosimum*. Bussmann (20) y Aguila (21) realizaron de forma independiente estudios de actividad antibacteriana del extracto etanólico de la corteza del tronco de *Brosimum rubescens* frente a *Staphylococcus aureus*, obteniendo valores de CMI de 2000 µg/ml y 4000 µg/ml, respectivamente; de manera que se puede observar que el extracto alcaloidal del látex de *B. utile* resulta ser un tanto más activo frente a esta bacteria patógena en relación a *B. rufescens*.

El hecho de que no exista proliferación de microorganismos a determinadas concentraciones de alcaloides podría deberse a que estos metabolitos secundarios provocan efectos citotóxicos, inhibiendo la síntesis de ácidos nucleicos, alterando la homeostasis celular o afectando a nivel de las membranas celulares (22).

## CONCLUSIONES

El látex de *B. utile* presentó terpenos, saponinas, gomas, grasas, resinas y alcaloides. Es importante destacar que la presencia de terpenos y alcaloides, ejercen función protectora frente a microorganismos.

Las actividades tanto antibacteriana como antifúngica del látex de *B. utile* son destacables y las concentraciones mínimas inhibitorias obtenidas sugieren el posible futuro desarrollo de formulaciones antibióticas y antifúngicas. Además, este estudio es un aporte significativo teniendo en cuenta que mundialmente se ha descrito un importante incremento de infecciones bacterianas debido a la resistencia que generan los microorganismos frente a los antibióticos convencionales.

Futuras investigaciones deberían centrarse en identificar y aislar los compuestos presentes en el extracto evaluado de *B. utile* y ensayar su actividad antimicrobiana *in vivo*, con el propósito de desarrollar nuevos productos fitofarmacéuticos, que permitan el desarrollo económico de comunidades amazónicas a través del aprovechamiento sostenible de la especie estudiada.

## AGRADECIMIENTOS

Se agradece al Dr. Manuel Yuste por sus sugerencias en la redacción de este artículo.

## CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran no tener conflictos de interés.

## R eferencias

1. Odegaard F. Species Richness of Phytophagous Beetles in The Tropical Tree *Brosimum utile* (Moraceae): The Effects of Sampling Strategy and The Problem of Tourists. *Ecol. Entomol.* 2004; 29(1): 76-88.
2. Ferrari F, Monache FD, Suárez AI, Arvelo F, Compagnone RS. New Cytotoxic Isoflavone from The Root Bark of *Brosimum utile*. *Nat Prod Res.* 2005; 19(4): 331-35.
3. Corporación de manejo forestal sustentable [Internet]. Ecuador: Tejada M, Arévalo A, Vinueza M; 2010 [actualizada en 2013; acceso 1 de diciembre de 2016]. Disponible en: <http://comafors.org/wp-content/uploads/2010/05/sande.pdf>
4. De la Torre L, Navarrete H, Muriel P, Macía M, Balslev H. (eds) Enciclopedia de las plantas útiles del Ecuador. Vol 1. Quito y Aarhus: Herbario QCA de la Escuela de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador y Herbario AAU del Departamento de Ciencias Biológicas de la Universidad de Aarhus; 2008.
5. Ríos M, Koziol MJ, Borgtoft H, Granda G. Plantas útiles del Ecuador: aplicaciones, retos y perspectivas. Vol 1. Quito: Ediciones Abya-Yala; 2007.
6. U.S. Food and Drug Administration. [Internet]. Silver Spring. [actualizada en agosto 2017; atado 30 de octubre de 2017]. [1 pantalla]. Disponible en: <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?fr=172.615>
7. Harnisz M. Total Resistance of Native Bacteria as An Indicator of Changes in The Water Environment. *Environ Pollut.* 2013; 174: 85-92.
8. Sahu MC, Dubey D, Rath S, Panda T, Padhy RN. Monograph: In vitro Efficacy of 30 Ethnomedicinal Plants Used by Indian Aborigines Against 6 Multidrug Resistant Gram-Positive Pathogenic Bacteria. *Asian Pacific J Trop Dis.* 2015; 5(2): 136-50.
9. Manzano-Gayosso P. Dermatofitos: ecología y morfología. En: Méndez-Tovar J, López-Martínez R, Hernández-Hernández F, (eds). Actualidades en micología médica. 5.ª ed. México: Facultad de Medicina, UNAM; 2010: p. 95-104.
10. Miranda M, Cuellar A, Pérez MB. Manual de prácticas de laboratorio de análisis farmacognóstico. La Habana: Universidad de la Habana; 1992.
11. Moffat A, Osselton M, Widdop B, Watts J. Clarke's Analysis of Drugs and Poisons in Pharmaceuticals, Body Fluids and Postmortem Material. 4.ª ed. Londres-Chicago: Pharmaceutical Press; 2011.
12. Berrio, V. Determinación por el Método Mitscher de la actividad antimicrobiana de 15 aceites esenciales extraídos de la flora salvadoreña [tesis]. San Salvador: Universidad de El Salvador Facultad de Farmacia; 2001.
13. De Bedout C, Ayabaca J, Vega R, Méndez M, Santiago A, Pabón ML, et ál. Evaluación de la susceptibilidad de especies de *Candida* al fluconazol por el método de difusión en disco. *Biomédica.* 2003; 23: 31-37.
14. Meis J, Petrou M, Bille J, Ellis D, Gibbs D. A Global Evaluation of The Susceptibility of *Candida* Species to Fluconazole by Disk Diffusion. Global Antifungal Surveillance Group. *Diag Microbiol Infect Dis.* 2000; 36(4): 215-23.
15. Lastra J. Bosques naturales de Asturias. Oviedo: Universidad de Oviedo; 2001.
16. Kemp M, Burden R. Phytoalexins and Stress Metabolites in The Sapwood of Trees. *Phytochemistry.* 1986; 25(6): 1-3.
17. García M. R., Pérez L. R. Fitoalexinas: mecanismo de defensa de las plantas. *Rev Chapingo.* 2003; 9(1): 5-10.

18. Zhao H-C, Wang, J-B. The Accumulation of Phytoalexin in Cucumber Plant After Stress. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2005; 43: 187-193.
19. Moretti C, Gaillard Y, Grenand P, Fabien B, Prévosto J-M. Identification of 5-hydroxy-tryptamine (Bufotenine) in Takini (*Brosimum acutifolium* Huber subsp. *acutifolium* C.C. Berg, Moraceae), a Shamanic Potion Used in the Guiana Plateau. *J Ethnopharmacol*. 2006; 106: 198-202.
20. Bussmann RW, Malca-García G, Glenn A, Sharon D, Chait G, Díaz D, et ál. Minimum Inhibitory Concentrations of Medicinal Plants Used in Northern Peru as Antibacterial Remedies. *J Ethnopharmacol*. 2010; 132(1): 101–8.
21. Aguila R, Macedo P, Gutiérrez W, Vásquez J, Alva A. Determinación de la actividad antibacteriana *in vitro* del extracto etanólico y acuoso de *Brosimum rubescens* (palisangre) mediante el método de difusión en agar. *Conoc. Amaz.* 2013, 4(2): 97-106.
22. Cushnie TPT, Cushnie B, Lamb AJ. Alkaloids: An Overview of Their Antibacterial, Antibiotic-Enhancing and Antivirulence Activities. *Int J Antimicrob Agents*. 2014; 44(5): 377-86.