

# Metabolitos secundarios de mezcla de plantas medicinales con acción antibacterial sobre microorganismos causantes de infección puerperal en la provincia de Chachapoyas

## Secondary metabolites mixture of medicinal plants with antibacterial action on microorganisms causing puerperal infection in the province of Chachapoyas

Rosa Aguilar Alva<sup>1</sup>, María Rodríguez Quezada<sup>2</sup>, Eduardo Pérez Rodríguez<sup>3</sup>

Recibido: 2 de noviembre de 2014

Aceptado: 8 de diciembre de 2014

### Resumen

La mezcla de *Piper aduncum*, *Plantago mayor* y *Alternanthera philoxeroides*(c.Mart) Griseb conocidas como matico, llantén y lancetilla respectivamente, se usa en medicina tradicional como antibacterial. El propósito de este trabajo fue identificar grupos de metabolitos secundarios responsables de su actividad farmacológica. De un macerado etanólico en frío usando 200 g de las hojas secas y molidas de cada planta, se obtuvo un extracto de 30,76 g. Los siguientes grupos de metabolitos secundarios fueron identificados cualitativamente con ensayos a la gota: flavonoides, compuestos fenólicos, esteroides y alcaloides. 10g del extracto fue sometido a cromatografía de columna gruesa al vacío, usando como eluyentes éter de petróleo, cloroformo, acetato de etilo y metanol. Se obtuvo 7 fracciones: EP1 (éter de petróleo), CF1 y CF2 (cloroformo),

AE1 y AE2 (acetato de etilo) y ME1 y ME2 (metanol). Para el ensayo de la actividad antibacterial se preparó para la mezcla y fracciones soluciones de 5%,10%,20% y 40%, usando el método de macrodilución se enfrentó a las cepas *Echericha Coli* y *Staphylococcus Aureus*. El resultado fue positivo en concentraciones de la mezcla al 20% y 40% para las dos cepas, las fracciones AE2 y CF2 para *Echericha Coli* y las fracciones AE1,AE2,CF1 y CF2 para *Staphylococcus Aureus* a las mismas concentraciones.

**Palabras claves:** Metabolitos secundarios, actividad antibacterial, *Staphylococcus Aureus*, *Echericha Coli*, *Piper aduncum*, *Plantago mayor* y *Alternanthera philoxeroides*.

### Abstract

The mixture *Piper aduncum*, *Plantago mayor* y *Alternanthera philoxeroides*(c.Mart) Griseb, known as matico, llantén y lancetilla respectively, is used in the traditional medicine as antibacterial. It was extracted at room temperature by ethanol from a dried mild plant obtaining an 30,76 g of extract. The following secondary metabolites were identified in a qualitative way using drop assays: flavonoids, phenolic compounds, steroids and alkaloids.

Ten grams of this extract was chromatographed vacuum column. petroleum ether, hexane, ethyl acetate and methanol were used as eluyents and 7 fractions were obtained: EP1 (petroleum ether); CF1 and CF2 (chloroform) AE1 and AE2 (ethyl

acetate), and ME1 and ME2(methanol). Pharmacologyc assays was performed in order to evaluate the antibacterial effect was prepared for mixing and fractions solutions of 5 %, 10% , 20% and 40 %, using the macrodilution method faced strains: *Echericha Coli* and *Staphylococcus Aureus*. The result was positive for concentrations of the mixture 20% and 40% for the two strains, AE2 and CF2 for *Echericha Coli*, AE1, AE2,CF1 and CF2 for *Staphylococcus Aureus* at the same concentrations.

Key words: secondary metabolites, antibacterial activity, *Staphylococcus Aureus*, *Echericha Coli*, *Piper aduncum*, *Plantago mayor* y *Alternanthera philoxeroides*.

1 Ing. químico. Doctora en Ciencias e Ingeniería. Profesora de la Universidad Privada Antenor Orrego.

2 Lic. En Enfermería. Profesor asociado de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza Amazonas.

3 Alumno de la Escuela Profesional de Medicina de la Universidad Privada Antenor Orrego.

## I. INTRODUCCIÓN

El hombre desde la prehistoria buscó combatir las enfermedades utilizando los recursos de la naturaleza como las plantas; desde esa época se han usado con el propósito de prevenir y curar las enfermedades.

El poblador de la zona rural y de la selva utiliza los recursos naturales que están a su alcance para prevenir o tratar algunas enfermedades que se presentan en la mujer gestante durante el periodo perinatal, a fin de evitar complicaciones en el parto y puerperio ya sea para la madre o el niño. Después de concebir es vital garantizar la recuperación de la madre y el bienestar del bebé.

La población de la provincia de Chachapoyas posee un bagaje de información empírica acerca del uso de diversos recursos naturales, sea flora o fauna para tratar enfermedades de la mujer durante el periodo de gestación, el parto y el puerperio. Se trata de un conocimiento de tratamientos alternativos que benefician a las familias rurales de la provincia de Chachapoyas.

Delgado Mario et al. (2006) investigaron acerca de las prácticas hogareñas en el cuidado de la madre y el recién nacido en la costa pacífica caucana, concluyendo que en una mujer con prolongación del parto es probable que se presente una asfixia perinatal, por lo que debe recurrir a otro tipo de métodos que le faciliten el parto, como la ingestión de bebedizos con plantas medicinales y otra serie de prácticas culturales que han permanecido a lo largo de generaciones.

Bohórquez de Figueroa A. y Zambrano G. (2009), en su estudio llamado "Prácticas de cuidado de las gestantes desplazadas" observaron que el conocimiento sobre el uso de las hierbas durante el embarazo es transmitido entre las mujeres, quienes las clasifican en hierbas "calientes" y "frescas". Entre las hierbas calientes que ingieren en infusión, una vez iniciado el trabajo de parto, se incluyen canela, manzanilla, higo, hierbabuena y ruda. Estas plantas tienen el efecto de acelerar el trabajo de parto.

Rodríguez M., Gamarra O. y Pérez F. (2011) realizaron una evaluación fitoquímica y antibacterial de las especies vegetales *Bidens andicola* H.B.K. "cadillo", *Alternanthera philoxeroides* (C. Mart.) Griseb. "lancetilla" y *Celosia* sp. "pashquete", usadas en medicina tradicional para el tratamiento de infecciones urinarias. Las tres especies presentaron en común esteroides, flavonoides y taninos; pero sólo la especie *Alternanthera philoxeroides* (C. Mart.) Griseb. presentó alcaloides. El extracto acuoso de lancetilla y el extracto etanólico de cadillo mostraron actividad antibacterial contra *E. coli*.

Rodríguez M., Gamarra O. y Pérez F. y Silvia M. (2011) analizaron el potencial agroindustrial de las plantas usadas para tratar enfermedades materno perinatales en la provincia de Chachapoyas, encontrando en el distrito de Leymebamba que los agentes de la medicina tradicional usan cola de caballo, palpar, pie de perro, diente de león, granadilla, malva para inflamaciones e infecciones urinarias; mientras que la lancetilla, llantén, matico los usan para tratar infecciones puerperales y el perejil para eliminar el dolor en el parto.

El éxito de los programas para el descubrimiento de productos naturales de interés terapéutico requiere de varios componentes: conocimiento para la selección y recolección de plantas; una selectiva y efectiva selección de bioensayo para detectar el extracto de la planta que contiene constituyentes bioactivos; una efectiva reproducción/propagación de las plantas y un eficiente proceso fitoquímico para aislar e identificar los productos bioactivos. Por esto se han incorporado los bioensayos de manera rutinaria (McLaughlin, 1991; Cowan, 1999; Cutler y Cutler, 2000; Heinrich, 2000; Cordero, 2002; Fyhrquist et al., 2002) para adquirir un conocimiento y significado en los trabajos actuales de la química de los productos naturales.

El presente proyecto pretende evaluar los principios fotoquímicos asociados al efecto antibacterial de la mezcla de las plantas medicinales lancetilla, llantén y matico, usada por la población de la provincia de Chachapoyas para tratar la infección puerperal, con el fin de validar el uso empírico que da la población a recursos naturales como las plantas medicinales en la medicina tradicional.

Tabla 1. Metabolitos y usos reportados del matico, llantén y lancetilla.

<i>Especie</i>	<i>Metabolitos</i>	<i>Actividad</i>
<i>Matico</i>	Aceites esenciales, esteroides sesquiterpenos, polifenoles, alcaloides, flavonoides.	Antibacteriana, alergia estomacal, antiséptica vaginal cicatrizante de heridas, dolor de garganta.
<i>Llantén</i>	Taninos, esteroides, flavonoides, alcaloides ácidos fenolcarboxílicos.	Laxante, infecciones urinarias cólicos renales, úlceras.
<i>Lancetilla</i>	Flavonoides, alcaloides esteroides.	Diurético, antiinflamatorio intestinal, emoliente.

En la presente publicación se presentan los resultados del efecto antibacterial de la mezcla y fracciones EP1, CF1,CF2, AE1,AE2, ME1 y ME2 y los resultados de los metabolitos secundarios identificados en la mezcla y fracciones.

## II. MATERIAL Y MÉTODOS

### 2.1 Recurso vegetal

La *Piper aduncum* pertenece a la familia piperaceae, al género piper y a la especie aduncum; la *Plantago* mayor a la familia plantaginaseae, al género plantago y a la especie mayor y la *Alternanthera philoxeroides* (c.Mart) Griseb a la familia amarantaceae, al género alternanthera. Las figuras 1,2 y 3 muestran las imágenes de las plantas. Las muestras fueron recolectadas de la provincia de luya, departamento de Amazonas, a una altitud de 2300 msnm, en las localidades de Colcamar y Chachapoyas y crecen en quebradas y lugares húmedos (Soukup, 1998).



Figura 1: Planta matico



Figura 2: Planta llantén



Figura 3:Planta lancetilla

### 2.2 Preparación de la muestra

Las ramas y hojas de las plantas fueron secadas a temperatura ambiente y bajo sombra por espacio de una semana y posteriormente en estufa a 40 °C. El material resultante fue molido con un molino casero (Moulinex) y almacenada en bolsas tipo zyploc.

### 2.3 Obtención de extractos por maceración

En un frasco de vidrio de boca ancha y de 10 litros de capacidad, se colocó 200 g de muestra seca y molida de cada planta y se le adiciono 5 litros de etanol; luego, la mezcla se agitó y dejó macerar durante 7 días con agitación manual diaria por espacio de 5 minutos, para obtener un material de color verduzco que fue filtrado y concentrado en rotavapor a 40°C y 40 mmHg.

## 2.4 Determinaciones cualitativas

El extracto etanólico de cada una de las plantas, de la mezcla y fracciones fueron sometidas a ensayos a la gota. La identificación cualitativa de alcaloides se realizó con las reacciones de coloración de Dragendorf, Mayer y Wagner. Los esteroides con el ensayo de Libermann-Burchard; flavonoides con la prueba de Shinoda; compuestos fenólicos con la prueba de cloruro férrico; saponinas con la prueba de espuma; taninos, con el ensayo de gelatina sal y cardiotónicos, con el reactivo de Kede. (Lock, 1994, 195-204).

## 2.5 Separaciones

Del extracto etanólico de la mezcla, 20 g se fraccionaron en una columna líquida al vacío (CLV), con soporte de silicagel (60GF<sub>254</sub>) usando eluyentes de acuerdo a polaridad creciente: éter de petróleo, cloroformo, acetato de etilo y metanol, obteniéndose 7 fracciones. Cada fracción fue sometida a cromatografía de capa delgada usando el sistema cloroformo acetato de etilo 5:5.

## 2.6. Obtención de espectros

De las fracciones EP1, CF1, CF2, AE1, AE2, ME1 y ME2 se obtuvieron sus espectros IR.

## 2.7 Determinación de la actividad antibacterial

Se usó agar nutritivo Müller Hinton, caldo Luria Bertani (LB) y cepas ATCS *Echericha Coli* 25922 y *Staphylococcus aureus* 25923. El método desarrollado fue el de macrodilución, usando el extracto de la mezcla de plantas y las 7 fracciones, para lo cual se prepararon cuatro soluciones acuosas de cada una de las muestras con las concentraciones 5%, 10%, 20% y 40%.

Todas las soluciones preparadas fueron sometidas a la prueba de esterilidad, sembrando cada una de ellas por estriado en placas cubiertas con agar Müller Hinton e incubadas por 24 hrs a 37°C. Después de comprobarse la esterilidad de las soluciones, se colocó 1 mL de caldo LB en un tubo de ensayo, al cual se adicionó 1 mL de la solución al 5%. Posteriormente, 100 µL de la cepa E. Coli suspendida y se dejó en incubación por 24 hrs a 37°C, se consideró también un blanco positivo (caldo más extracto) y un blanco negativo (caldo más cepa), se trabajó de la misma manera para las demás concentraciones de mezcla y para la cepa de *St. Aureus*. Para los cuatro tratamientos se realizaron 3 repeticiones con cada cepa.

Después de pasadas las 24 hrs de incubación se observó si hay crecimiento de bacterias en cada tubo de ensayo, se comprueba la actividad antibacterial haciendo un sembrado por estriado del contenido de los tubos de ensayo en placa cubiertas con agar Müller Hinton y se lleva a incubación por 24 horas a 37°C, pasado este tiempo se observa

si hay crecimiento de bacterias. El mismo proceso se usó para todas las fracciones del extracto etanólico.

## III. RESULTADOS

### 3.1. Determinación de extractos

De 200 g de cada planta seca y molida, por maceración, se obtuvo 30,76 g de extracto etanólico de color verde oscuro de apariencia pastosa.

### 3.2. Cromatografía líquida al vacío

De 20 g de extracto se obtuvo siete fracciones (Tabla 2)

Tabla 2: Fracciones de cromatografía líquida al vacío

Tabla 2: Fracciones de cromatografía líquida al vacío

Fracción	Color	Peso (g)
EP1	Verde claro	3,22
CF1	Amarillo verdoso	3,26
CF2	Verde petróleo	2,08
AE1	Verde negruzco	1,22
AE2	Verde oscuro	1,27
ME1	Marrón claro	4,25
ME2	Marrón oscuro	4,94

Los resultados de la cromatografía en capa delgada para la fracción CF1 muestra una mancha de color naranja pálido con  $r_f=0,8$ cm, una mancha de color naranja oscuro con  $r_f=0,34$ cm y una mancha naranja pálido con  $r_f=0,57$ cm. La fracción CF2 presenta las mismas manchas, excepto la mancha con  $r_f=0,57$ cm. La fracción AE1 presenta tres manchas de color rosado, violeta y naranja intenso con  $r_f=0,85$ cm,  $r_f=0,6$ cm,  $r_f=0,28$ cm respectivamente. La fracción AE2 solo presenta una mancha de color naranja intenso con  $r_f=0,85$ cm. La fracción ME1 presenta una mancha naranja intenso con  $r_f=0,28$ cm. En la fracción ME2 se aprecia una mancha de color violeta fosforescente al UV con  $r_f=0,28$ cm. Por lo observado las fracciones se trabajaron por separado.

### 3.3 De los espectros

Del análisis espectroscópico de los espectros IR para las fracciones, se dedujeron las siguientes asignaciones:

**Fracción EP1:**  $\nu(\text{cm}^{-1})$  2950 estiramiento, alifático (C-H), 1480 deformación  $\text{CH}_0$ , 1560 deformación  $\text{CH}_2$ . Por lo observado se puede deducir la presencia de hidrocarburos lineales saturados e insaturados, ausencia de aromáticos.

**Fracción CF1, CF2:**  $\nu(\text{cm}^{-1})$  2850 estiramiento, alifático(C-H),3650 estiramiento(O-H), 1750 estiramiento (C=O), 1300 estiramiento(C-O)

**Fracción AE1,AE2:**  $\nu(\text{cm}^{-1})$  3580 estiramiento(O-H), 1745 estiramiento(C=O) o anillo pequeño de lactona.

**Fracción ME1, ME2:**  $\nu(\text{cm}^{-1})$  3450 estiramiento(O-H), 1435 deformación(C-H),1560, 1600 estiramiento, aromático(C=C), 1640 estiramiento olefínico(C=C)

### 3.4. Determinación de grupos de metabolitos secundarios

Las determinaciones cualitativas en el extracto etanólico y fracciones fueron deducidas de las coloraciones (Tablas 3 a 7).

Tabla 3: Grupos de metabolitos secundarios en la mezcla

Prueba	Color	Resultado	Metabolito
Shinoda	Rosa palido	+	Flavonoide
FeCl <sub>3</sub>	Verde	+	Comp. Fenólicos
Lieberman Burch	Verde azulado	+	Esteroides
Dragendorf	Rojo (ppdo)	+	Alcaloides
Mayer	Blanco(ppdo)	+	Alcaloides
Wagner	Naranja(ppdo)	+	Alcaloides
Prueba de espuma	Espuma	+	Saponinas
Kede	Rojizo	+	cardiotónicos

Tabla 4: Grupos de metabolitos secundarios en la fracción EP1

Prueba	Color	Resultado	Metabolito
Shinoda	Transparente	-	Flavonoide
FeCl <sub>3</sub>	Verde	+	Comp. Fenólicos
Lieberman Burch	Verde azulado	+	Esteroides
Dragendorf	No precipitado	-	Alcaloides
Mayer	No precipitado	-	Alcaloides
Wagner	No precipitado	-	Alcaloides
Bontrager	Rosa suave	+	Quinonas
Kede	Palo rosa	+	Cardiotonicos

Tabla 5: Grupos de metabolitos secundarios en las fracciones CF1-CF2

Prueba	Color	Resultado	Metabolito
Shinoda	Blanco	-	Flavonoide
FeCl <sub>3</sub>	Verde	+	Comp. Fenólicos
Liberman Burch	Verde azulado	+	Esteroides
Dragendorf	No precipitado	-	Alcaloides
Mayer	No precipitado	-	Alcaloides
Wagner	No precipitado	-	Alcaloides
Bontrager	palo rosa	+	Quinonas
Kede	verde	-	Cardiotónicos

Tabla 6: Grupos de metabolitos secundarios en las fracciones AE1-AE2

Prueba	Color	Resultado	Metabolito
Shinoda	Verde	-	Flavonoide
FeCl <sub>3</sub>	Verde	+	Comp. Fenólicos
Liberman Burch	Verde azulado	+	Esteroides
Dragendorf	Naranja (ppdo)	+	Alcaloides
Mayer	Naranja (ppdo)	+	Alcaloides
Wagner	Naranja (ppdo)	+	Alcaloides
Bontrager	verde tenue	-	Quinonas
Kede	verde	+	Cardiotónicos

Tabla 7: Grupos de metabolitos secundarios en las fracciones ME1-ME2

Prueba	Color	Resultado	Metabolito
Shinoda	ME1 verde	-	Flavonoide
	ME2 rojo intenso	+	Flavonoide
FeCl <sub>3</sub>	ME1 verde, ME2 azul	+	Comp. Fenólicos
Liberman Burch	ME1 verde	+	Esteroides
	ME2 rojo	-	Esteroides
Dragendorf	Naranja (ppdo)	+	Alcaloides
Mayer	Naranja(ppdo)	+	Alcaloides
Wagner	Naranja(ppdo)	+	Alcaloides
Kede	Rojo	+	Cardiotónicos

### 3.4. Actividad antibacterial

Las pruebas de esterilidad para las mezclas y fracciones no muestran crecimiento de bacterias, los ensayos de macrodilución y posterior sembrado en placa arrojan los resultados que se muestran en la tabla 8.

Tabla 8: Actividad antibacterial de mezcla y fracciones

Muestra	<i>Staphilococcus Aureus</i>	<i>Echerichia Coli</i>
EP1(20%, 40%)	no muestra actividad	no muestra actividad
CF1(20%, 40%)	presenta actividad	no muestra actividad
CF2 (20%, 40%)	Presenta actividad	Presenta actividad
AE1(20%,40%)	presenta actividad	no muestra actividad
AE2(20%,40%)	presenta actividad	presenta actividad
ME1(20%,40%)	no muestra actividad	no muestra actividad
ME2(20%,40%)	no muestra actividad	no muestra actividad
Mezcla(20%,40)	presenta actividad	presenta actividad

La figura 4 muestra los resultados en placa obtenidos para la mezcla en las cuatro concentraciones, observándose que el resultado es positivo para concentraciones al 20% y 40% y el notorio crecimiento de bacterias a las concentraciones de 5% y 10%.

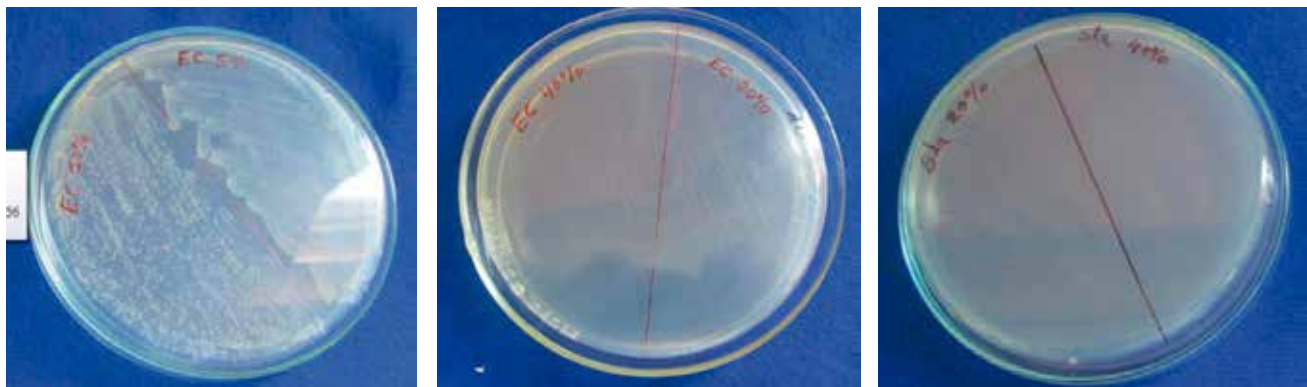
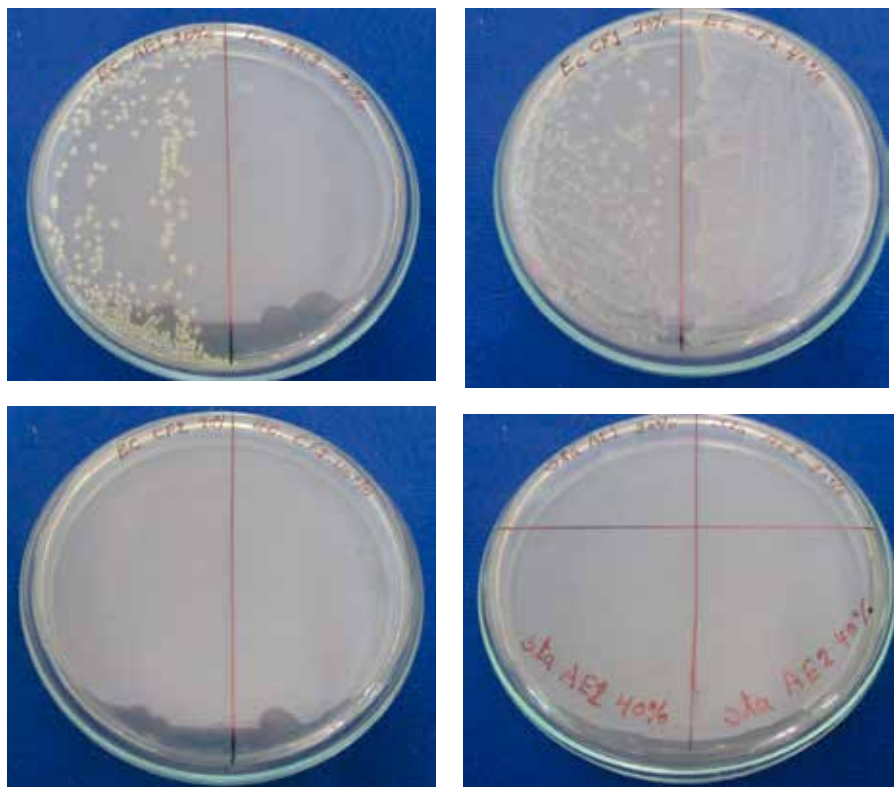


Figura 4: Actividad antibacterial para la mezcla al 5%, 10% , 20% y 40%

La figura 5 muestra los resultados de la actividad antibacterial para las fracciones al 20% y 40% que dieron prueba positiva frente a E. coli y Sta. Aureus.



**Figura 5: Actividad antibacteriana frente a E.Coli y Sta. Aureus para fracciones AE1,AE2,CF1 ,CF2, AE1 y AE2 al 20% y 40%**

#### **IV. DISCUSIÓN**

Las pruebas de coloración indican presencia de flavonoides, compuestos fenólicos, alcaloides, quinonas y compuestos cardiotónicos.

Los espectros IR solo nos indican la presencia de grupos funcionales pero no son suficientes para identificar compuesto, por lo que se hace necesario usar otro tipo de espectros que ayuden a identificar la estructura de los metabolitos secundarios.

La evaluación del efecto antibacteriano estuvo orientada a determinar la concentración mínima inhibitoria y la concentración mínima bactericida del extracto acuoso de la muestra y fracciones, después de 24 horas de incubación se obtiene prueba positiva para la mezcla al 20% y 40% y a las mismas concentraciones para las fracciones CF1, CF2, AE1 y AE2 frente a *Staphylococcus aureus*. Las fracciones CF2 y AE2 impiden el crecimiento de la bacteria *E. coli* a las concentraciones de 20% y 10% .

La concentración mínima inhibitoria y la concentración mínima bactericida es de 10%.

#### **V. CONCLUSIONES**

1. La mezcla del extracto en solución acuosa tiene como metabolitos secundarios flavonoides, compuestos fenólicos, esteroides y alcaloides.
2. La mezcla de matico, llantén y lancetilla contiene metabolitos secundarios con acción antibacteriana.
3. La concentración de la mezcla con concentraciones de 20% y 40% presentan actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.
4. Las fracciones CF1, CF2, AE1 y AE2 presentan acción antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus*; la fracción CF2 y AE2 acción antibacteriana frente *Escherichia coli*. para concentraciones acuosas de 20% y 40%.
5. La concentración mínima inhibitoria y la concentración mínima bactericida es de 10%.



## VI. BIBLIOGRAFÍA

1. Cordero C. (2002). *La industria farmacéutica en busca de nuevos elementos: explora la biodiversidad*. Conabio; pp 1-4.
2. Cutler S.J. y Cutler H.G. (2000). *Biologically active natural products: pharmaceutical*. CRC Press. USA; pp 1-2, 7, 25-26, 46.
3. Goodman, G.A., Rall T.W., Nies A.S., Taylor P. (1995). *Goodman and Gilman's. The pharmacological basis of therapeutics*. 11 edition. Pergamon Press. E. U. 2; pp 914-931.
4. Koneman E.W., Allen S.D., Dowell V.R., Sommers H. M. (1990). *Diagnóstico microbiológico*. Editorial Médica Panamericana. México; pp 40-63
5. McLaughlin J.L. (1991). *Crown gall tumours on potato discs and brine shrimp lethality: two simple bioassays for higher plant screening and fractionation*. En *Methods in plant biochemistry*. Series editors Dey P.M. and Harborne J.B. edited by Hostettmann. Academic Press; pp 2-3.
6. SS, Secretaria de Salud. Kumate, J. Biseca, T.C. Sanfilipo, B. J. (1993<sup>a</sup>). *La investigación científica de la herbolaria medicinal mexicana*. Secretaría de salud. Edición Conmemorativa México; pp 11,19.
7. Watanabe H. Shibuya T. (1999). *Pharmacological research on traditional herbal medicines*. Harwood Academia Publishers. Netherlands; pp 17, 31, 34, 41.
8. Zapata Acha Sergio. (2001). *Posibilidades y potencialidad de la agroindustria en el Perú en base a la biodiversidad y los bionegocios*. Comité Biocomercio Perú, pp 4-5, 24-27, 32, 46.
9. Alanís Ríos A. (2006). *Evaluación de la actividad antibacteriana de algunas plantas medicinales, usadas en la medicina tradicional mexicana, contra enterobacterias causantes de diarrea y disentería: Estudio farmacológico y químico del Pericarpio de púnica granatum L. (granado)*. Tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencias en Investigación en Medicina. Instituto Politécnico Nacional Escuela Superior de Medicina Sección de Estudios de Posgrado e Investigación. México. D.F. pp
10. Lock de Ugas O. (1994). *Investigación fitoquímica métodos de estudio de productos naturales*. Fondo Editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú pp 6,8,10, 195-204
11. Iglewski BH.(1996). *Pseudomonas*. In: *Baron's Medical Microbiology*. Barron S et al, eds. 4th ed. edición. Univ of Texas Medical Branch. (via NCBI Bookshelf).
12. Jiménez M, Fernández E. (1999). *Infecciones urinarias en la mujer y en el paciente geriátrico*. En: Navío S, editor. *Patología urológica infecciosa*. Madrid. Aula Médica, Ediciones 1999: 87-102.
13. Martínez C., Pons E., Prats G. and Leon J. (2004). *Salicylic acid regulates flowering time and links defense responses and reproductive development*. *Plant J*. 37:209-217