



Artículo científico / Research paper

Determinación de la actividad antibacteriana de extractos de plantas medicinales frente a *Enterococcus faecalis*

Determination of the antibacterial activity of extracts from medicinal plants against *Enterococcus faecalis*

Oliver Ramírez-Condoy^{1*} , Lourdes Jerves-Andrade² , Andrea Abril² ,
Marcela Redrován-Berrezueta¹ 

¹ Bioquímicos Farmacéuticos, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad de Cuenca, Cuenca, Ecuador.

² Grupo de Investigación de Plantas Medicinales de la Universidad de Cuenca, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad de Cuenca, Cuenca, Ecuador.

*Autor de correspondencia: ojrc95@gmail.com

Fecha de recepción: 16 de mayo de 2022 - Fecha de aceptación 25 de mayo de 2022

RESUMEN

Enterococcus faecalis es un microorganismo considerado como agente etiológico de diferentes procesos infecciosos, tales como: infecciones de la piel, osteomielitis, neumonía, infecciones del tracto urinario, endocarditis, entre otros, siendo los pacientes nosocomiales una población más vulnerable a esta bacteria. El objetivo del presente estudio fue evaluar la actividad antibacteriana *in vitro* de extractos metanólicos y clorofórmicos de las plantas *Peperomia galioides*, *Otholobium mexicanum*, *Zingiber officinale* y *Rosmarinus officinalis* frente a *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 (resistente a la vancomicina) y una cepa clínica de *Enterococcus faecalis*. Para la evaluación de esta bioactividad se utilizó la metodología de microdilución y puntos de corte establecidos por la CLSI (2021) para *Enterococcus faecalis* y los resultados obtenidos se expresaron en IC50. El IC50 de mayor interés se obtuvo con el extracto clorofórmico de *Otholobium mexicanum* frente a la cepa clínica, siendo de 2.050 µg/mL, considerándose como muy activo. El IC50 más destacable de *Peperomia galioides* se obtuvo con el extracto clorofórmico frente a la cepa clínica con un valor de 8.248 µg/mL, considerándolo como ligeramente activo. Para *Rosmarinus officinalis*, solo el extracto metanólico mostró una ligera actividad antibacteriana con un IC50 de 20.234 µg/mL frente a *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. Finalmente, todos los extractos de *Zingiber officinale* no mostraron actividad frente a las concentraciones probadas de las diferentes cepas de *Enterococcus faecalis*. Los resultados obtenidos son de gran relevancia ya que pueden ser aplicados para la producción de antimicrobianos a partir de fuentes naturales que podrían tener aplicación dentro de la industria farmacéutica, veterinaria o agrícola.

Palabras clave: Actividad antibacteriana *in vitro*, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 resistente a la vancomicina, microdilución.

ABSTRACT

Enterococcus faecalis is a microorganism considered as an etiological agent of different infectious processes, such as: skin infections, osteomyelitis, pneumonia, urinary tract infections, endocarditis, among others, with nosocomial patients being a population more vulnerable to this bacterium. The objective of the present study was to evaluate the *in vitro* antibacterial activity of methanolic and chloroform extracts from the plants *Peperomia galioides*, *Otholobium mexicanum*, *Zingiber officinale* and *Rosmarinus officinalis* against *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 (vancomycin resistant) and a clinical strain of *Enterococcus faecalis*. For the evaluation of this bioactivity, the microdilution methodology and cut-off points established by the CLSI (2021) for *Enterococcus faecalis* were used. The results obtained were expressed in IC50. The IC50 of greatest interest was obtained with the chloroform extract of *Otholobium mexicanum* against the clinical strain, being 2.050 µg/mL, being considered very active. The most notable IC50 of *Peperomia galioides* was obtained with the chloroform extract against the clinical strain with a value of 8.248 µg/mL, considering it as slightly active. For *Rosmarinus officinalis*, only the methanolic extract showed a slight antibacterial activity with an IC50 of 20.234 µg/mL against *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. Finally, all *Zingiber officinale* extracts did not show any activity against the tested concentrations of the different strains of *Enterococcus faecalis*. The results obtained are of great relevance since they can be applied for the production of antimicrobials from natural sources that could have application within the pharmaceutical, veterinary or agricultural industry.

Keywords: *In vitro* antibacterial activity, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 vancomycin resistant, IC50, microdilution.



1. INTRODUCCIÓN

Actualmente, los investigadores advierten sobre un escenario que podría acabar con la humanidad. Las bacterias en las últimas décadas se han adaptado al entorno que las rodea y por ende han evolucionado su capacidad de soportar los antibióticos a un ritmo muy veloz. Los antibióticos son sustancias químicas que a partir del descubrimiento de la penicilina han ayudado a salvar miles de vidas humanas, permitiendo que la esperanza de vida se extienda hasta 20 años más (Kukso, 2016). La resistencia a los antibióticos, que puede ser definida como la capacidad de una bacteria para subsistir en concentraciones de antibiótico que evitan el crecimiento de otras de su misma especie, es realmente un problema grave en el mundo (Alos, 2015). Se pronostica que para el año 2050 las muertes por resistencia a los antibióticos superen los 10 millones de seres humanos. Se considera que llegará a ser la primera causa de muerte superando al cáncer, es decir morirá una persona cada 3 segundos. Esto se ha generado básicamente por una automedicación indiscriminada e inadecuada (Kukso, 2016). Se ha podido evidenciar que los compuestos bioactivos que presentan las plantas pueden resultar como una alternativa bastante eficiente y eficaz frente a bacterias patógenas de interés, siendo así que desde tiempos ancestrales el ser humano ha encontrado en la naturaleza soluciones a un sin número de afecciones, dolencias o patologías utilizando plantas medicinales y nutraceuticas. En la actualidad muchos de los tratamientos con los antibióticos habituales no han presentado buenos resultados al momento de combatir contra bacterias potencialmente patógenas y de origen nosocomial, esto se debe a la multidrogoresistencia generada por diversos mecanismos genéticos (Gallegos, 2016). En el Ecuador se encuentran numerosas especies nativas e introducidas, siendo un término adecuado para denominar a este país como megadiverso, por ser un territorio con una alta riqueza en recursos vegetales a nivel mundial, las mismas que pueden contribuir a la salud humana (Segovia *et al.*, 2015). Esta investigación ha generado información etnobotánica sobre la actividad antibacteriana de cuatro plantas presentes en el territorio ecuatoriano, *Peperomia galioides*, *Otholobium mexicanum*, *Zingiber officinale* y *Rosmarinus officinalis* frente a una bacteria de interés *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) por su alta resistencia al tratamiento antibacteriano habitual e inclusive presentando genes de resistencia a uno de los antibióticos de última línea como es el caso de la vancomicina.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

El ensayo experimental constó de 3 etapas: recolección de las plantas *Peperomia galioides*, *Otholobium mexicanum*, *Zingiber officinale* y *Rosmarinus officinalis*, obtención de los extractos clorofórmicos y metanólicos de las mismas y evaluación de la actividad antibacteriana de los extractos obtenidos frente a *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Enterococcus faecalis* resistente a la vancomicina ATCC 51299 y una cepa clínica de *Enterococcus faecalis* sin genes de resistencia.

2.1. Selección de las plantas

Las plantas *Otholobium mexicanum* y *Peperomia galioides* fueron seleccionadas con el propósito de contribuir con más información sobre la bioactividad de las mismas frente a bacterias gram positivas, en este caso frente a *Enterococcus faecalis*, ya que, Jerves-Andrade *et al.* (2014), también evaluaron la actividad antibacteriana de los extractos metanólicos y clorofórmicos de estas dos plantas frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 obteniendo valores significativos. Y con el propósito de aumentar el conocimiento sobre la bioactividad de plantas medicinales presentes en el territorio ecuatoriano, se evaluaron dos plantas más, de gran uso medicinal: *Zingiber officinale* y *Rosmarinus officinalis*. Se realizaron diferentes consultas bibliográficas donde se encontró evidencia de la actividad antibacteriana de estas plantas frente a *Enterococcus faecalis*.

2.2. Recolección

Las plantas *Peperomia galioides* y *Otholobium mexicanum* fueron recolectadas del camino viejo a Girón, en la provincia del Azuay: *Peperomia galioides* (X: 709027; Y: 9655473) y *Otholobium mexicanum* (X: 709338; Y: 9655730). Las plantas *Zingiber officinale* y *Rosmarinus officinalis* fueron adquiridas en el mercado 10 de agosto de la ciudad de Cuenca, Ecuador. Las 4 plantas fueron transportadas al laboratorio de lavado de plantas del Grupo de Investigación de Plantas Medicinales de la Universidad de Cuenca en fundas de papel para su respectivo lavado y secado siguiendo los Protocolos Normalizados de Trabajo (PNTs) del laboratorio de lavado del Grupo de Investigación de Plantas Medicinales de la Universidad de Cuenca; se trabajó únicamente con las hojas de las 3 primeras plantas y solo con los rizomas de *Zingiber officinale*.

2.3. Obtención de extractos

La obtención de los extractos metanólicos y clorofórmicos se obtuvieron siguiendo los PNT del laboratorio de fitoquímica del Grupo de Investigación de Plantas Medicinales de la Universidad de Cuenca respectivo para cada solvente, como se detalla a continuación. Las partes seleccionadas de cada planta fueron lavadas bajo agua corriente y con agua destilada, dejando secar por un periodo de 24 horas. El desecado se realizó a una temperatura de 40°C de 24 a 48 horas dependiendo de la carnosidad del material vegetal y luego se troceó por separado para facilitar el proceso de humectación. Se pesó 10 g del troceado, mismo que fue humectado con metanol puro (99.8%) (Sigma-Aldrich) y en otro recipiente también se pesó 10 g del troceado que fue humectado con cloroformo al 99% (Merck); este proceso tuvo una duración de 24 horas. Tras la humectación se dejó en maceración por 24 horas cada humectado con su respectivo solvente. Transcurridas las 24 horas se inició con el proceso de percolación durante 8 horas, primeramente, recolectando el 75% del peso total en volumen de la planta (primera fracción) empleada para la extracción. El producto de la extracción por percolación se llevó a sequedad utilizando un Rotavapor (Heidolph Laborota 4011 HB G3, Alemania). Luego se procedió a la redisolución, donde se ocupó la primera fracción obtenida al inicio de la percolación y se procedió a concentrar con nitrógeno gaseoso hasta obtener un volumen aproximado de 2 mL.

Obtención de extractos metanólicos

Los 2 mL de extracto obtenidos tras la concentración con nitrógeno gaseoso fueron trasvasados a un tubo para liofilización. Se llevó el tubo al biofreezer a una temperatura de -70°C por 24 horas. Pasado este período de tiempo se trasladó el tubo al equipo de liofilización por 24 horas más. Finalmente se dispensaron 5 mg del liofilizado en viales previamente pesados.

Obtención de los extractos clorofórmicos

Los 2 mL fueron dispensados en 6 viales previamente pesados. Posteriormente fueron llevados a un equipo de concentración al vacío, donde se los sometió a ciclos de 60 minutos a una presión de 150 mbar a temperatura ambiente; este proceso se llevó a cabo hasta obtener pesos constantes. Culminado el proceso de concentración al vacío, se seleccionó el vial con mayor cantidad de extracto y de este se dispensaron 5 mg en viales previamente pesados.

2.4. Evaluación de la actividad antibacteriana

El ensayo experimental incluyó tres cepas de *Enterococcus faecalis*, una de aislamiento clínico y dos cepas de referencia ATCC, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 y *Enterococcus faecalis* ATCC 51299. Todas las cepas fueron identificadas según sus características macro y micromorfológicas, además de las pruebas diagnósticas complementarias como se muestra en la Tabla 1. Se procedió con los ensayos como en lo estipulado en los PNT del laboratorio de Microbiología del Grupo de Investigación de Plantas Medicinales de la Universidad de Cuenca. Para la determinación de la actividad antibacteriana de las diferentes plantas medicinales frente a *E. faecalis* se utilizó como método de referencia la microdilución en caldo, documentado en la guía del CLSI publicado en el año 2021. Los inóculos de las cepas bacterianas fueron preparados a base de cepas puras a partir de 24 horas de crecimiento, con una concentración final aproximada de 5x10⁶ UFC/mL de cada una de las

cepas testeadas y criopreservadas a -80°C hasta su uso, posteriormente se realizó la corrección del criostock y se calculó la concentración necesaria para la elaboración del inóculo bacteriano (5x10⁴ UFC/mL). La preparación de las diluciones seriadas de los diferentes extractos de las plantas medicinales se realizó utilizando agua destilada estéril. Los rangos de concentración final fueron de 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1 y 0.5 µg/mL. Para el ensayo de actividad antibacteriana se utilizaron placas estériles de microdilución de 96 pocillos estéril, a las cuales se adicionaron diferentes concentraciones de los extractos de plantas medicinales y del antibiótico sintético utilizado en diluciones sucesivas (ampicilina como control de la actividad antibacteriana), basándose en los puntos de corte establecidos en *Enterococcus spp* (CLSI, 2021). El inóculo bacteriano se preparó con caldo de tripticasa soya estéril (TSB); se incluyó un control negativo de crecimiento (caldo TSB) y un control positivo de crecimiento (TSB más inóculo bacteriano).

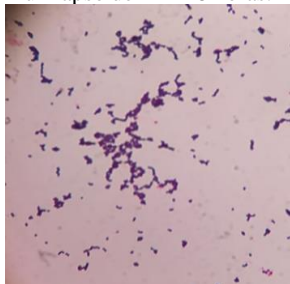
Las placas se incubaron a 37°C durante 24 horas y posteriormente se realizó la lectura en un lector de microplacas con una longitud de onda de 405 nm. Se determinó el porcentaje de inhibición, todos los ensayos se realizaron por triplicado. A partir del porcentaje de inhibición se calculó la concentración mínima capaz de inhibir el 50% de la población bacteriana (IC50), y la concentración mínima capaz de inhibir el 90% de la población bacteriana (IC90).

3. RESULTADOS Y DISCUSIONES

Los resultados (expuestos en la Tabla 2) fueron interpretados de acuerdo con Jerves-Andrade *et al.* (2014); según el cual un extracto es considerado como: muy activo cuando el IC50 es menor a 5 µg/mL, ligeramente activo cuando los rangos de IC50 están entre 30 - 5 µg/mL e inactivo cuando es mayor a 30 µg/mL.

Tabla 1. Características de las diferentes cepas de *Enterococcus faecalis*.

Características macroscópicas y microscópicas de <i>Enterococcus faecalis</i>					
Crecimiento	Tinción de Gram	Catalasa	Crecimiento en tripticasa soya con NaCl al 6.5%	Bilis esculina	Crecimiento de tripticasa soya en 45°C y 37°C
Agar Mueller Hinton	Colonias: incoloro a gris. Tamaño de 2 - 3 mm de diámetro. Crecimiento a una temperatura de 37°C - 45°C en un lapso de 24 - 48 horas.	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo



Otholobium mexicanum

Los IC50 obtenidos del extracto clorofórmico frente a *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 y cepa clínica fueron 8.571 µg/mL, 8.660 µg/mL y 2.050 µg/mL respectivamente, siendo este último de mayor interés al considerarse como muy activo y los otros dos como ligeramente activos. Los IC50 obtenidos del extracto metanólico frente a *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 y cepa clínica fueron de 8.665 µg/mL, 10.586 µg/mL y 15.874 µg/mL respectivamente, considerándose todos estos como ligeramente activos. León-López (2014) demostró que los extractos metanólicos de *Otholobium mexicanum* presentaron actividad antibacteriana moderada frente a *E. faecalis* ATCC 29212 con una CMI (Concentración Mínima Inhibitoria) de 65.5 µg/ml. Se aprecia una diferencia considerable entre los resultados obtenidos por León-López (2014) y los expuestos en la presente investigación; siendo no comparables entre sí, puesto que se evalúan parámetros diferentes, sin embargo, se rescata la evidencia de la actividad antibacteriana de *Otholobium mexicanum* frente a *E. faecalis*.

Peperomia galioides

Por otra parte, los resultados que se obtuvieron del extracto de las hojas de *Peperomia galioides* tanto clorofórmico como metanólico presentaron una actividad muy variada: los IC50 obtenidos del extracto clorofórmico frente a *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 y cepa clínica fueron 28.049 µg/mL, 25.501 µg/mL y 8.248 µg/mL respectivamente, considerándose todos como ligeramente activos. Los IC50 obtenidos del extracto metanólico frente a *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 y cepa clínica fueron de 30.081 µg/mL, 48.661 µg/mL y 31.058 µg/mL respectivamente, considerándose todos estos como inactivos. Al consultar diferentes fuentes bibliográficas, se pudo observar que no existen ensayos publicados dirigidos con el objetivo de determinar la actividad antibacteriana de *Peperomia galioides* frente a *Enterococcus faecalis* mediante la técnica de microdilución o el cálculo de CMI.

Tabla 2. Resultados de la actividad antibacteriana de extractos clorofórmicos y metanólicos frente a las diferentes cepas de *Enterococcus faecalis*.

	Cepa	Nombre científico	IC50 (µg/mL)	Actividad	
Extractos Clorofórmicos	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	<i>Otholobium mexicanum</i>	8.571	Ligeramente activo	
		<i>Peperomia galioides</i>	28.049	Ligeramente activo	
		<i>Rosmarinus officinalis</i>	No es activo a las concentraciones probadas	Inactivo	
		<i>Zingiber officinale</i>	No es activo a las concentraciones probadas	Inactivo	
	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 51299	<i>Otholobium mexicanum</i>	8.660	Ligeramente activo	
		<i>Peperomia galioides</i>	25.501	Ligeramente activo	
		<i>Rosmarinus officinalis</i>	No es activo a las concentraciones probadas	Inactivo	
		<i>Zingiber officinale</i>	No es activo a las concentraciones probadas	Inactivo	
	<i>Enterococcus faecalis</i> CEPA CLÍNICA	<i>Otholobium mexicanum</i>	2.050	MUY ACTIVO	
		<i>Peperomia galioides</i>	8.248	Ligeramente activo	
		<i>Rosmarinus officinalis</i>	No es activo a las concentraciones probadas	Inactivo	
		<i>Zingiber officinale</i>	No es activo a las concentraciones probadas	Inactivo	
	Extractos Metanólicos	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	<i>Otholobium mexicanum</i>	8.665	Ligeramente activo
			<i>Peperomia galioides</i>	30.081	Inactivo
			<i>Rosmarinus officinalis</i>	20.234	Ligeramente activo
			<i>Zingiber officinale</i>	No es activo a las concentraciones probadas	Inactivo
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 51299		<i>Otholobium mexicanum</i>	10.586	Ligeramente activo	
		<i>Peperomia galioides</i>	48.661	Inactivo	
		<i>Rosmarinus officinalis</i>	No es activo a las concentraciones probadas	Inactivo	
		<i>Zingiber officinale</i>	No es activo a las concentraciones probadas	Inactivo	
<i>Enterococcus faecalis</i> CEPA CLÍNICA		<i>Otholobium mexicanum</i>	8.874	Ligeramente activo	
		<i>Peperomia galioides</i>	31.058	Inactivo	
		<i>Rosmarinus officinalis</i>	No es activo a las concentraciones probadas	Inactivo	
		<i>Zingiber officinale</i>	No es activo a las concentraciones probadas	Inactivo	

Rosmarinus officinalis

Se determinó que los extractos procesados no eran activos a las concentraciones probadas frente a las cepas empleadas del patógeno en cuestión, a excepción del extracto metanólico de *Rosmarinus officinalis* que presentó una ligera actividad con un IC50 de 20.234 µg/mL frente a *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. En la literatura consultada se encontró evidencia de la actividad antibacteriana de extractos metanólicos frente a *E. faecalis* mediante diferentes técnicas.

Moreno *et al.* (2006) describieron que la actividad antibacteriana de extractos metanólicos de *Rosmarinus officinalis* frente a bacterias específicamente gram positivas presentaron una CMI entre 2 y 15 µg/mL y frente a *E. faecalis*, específicamente una CMI de 15 µg/mL. Por otro lado, los resultados obtenidos por Zampini *et al.* (2013) demostraron que el extracto metanólico de las hojas de *Rosmarinus officinalis* inhibió el crecimiento de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 y 13 cepas de *Enterococcus faecalis* resistente a estreptomycin, gentamicina y ambas, (cepas obtenidas del Hospital Nicolás Avellaneda, Tucumán, Argentina) con un valor de CMI de 200 µg/mL. Todos estos resultados ratifican la actividad del extracto metanólico de *Rosmarinus officinalis* frente a *Enterococcus faecalis* sin embargo no son comparables con los obtenidos en el presente trabajo porque son expresados en CMI.

Zingiber officinale

Se determinó que los extractos obtenidos fueron inactivos a las concentraciones probadas en este ensayo a pesar de que algunos estudios reportan su actividad.

4. CONCLUSIONES

Se evidenció que los extractos clorofórmicos y metanólicos de *Peperomia galioides* y *Otholobium mexicanum* demostraron una mejor actividad antibacteriana frente a cepas de referencia como *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 y *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 y una cepa clínica de *Enterococcus faecalis* a comparación de los extractos de las plantas *Rosmarinus officinalis* y *Zingiber officinale*. Se observa que los extractos clorofórmicos presentan mejor actividad en relación con los extractos metanólicos, indicando que los compuestos bioactivos, específicamente de las plantas *Peperomia galioides* y *Otholobium mexicanum*, podrían ser de naturaleza lipofílica. El extracto metanólico de *Rosmarinus officinalis* mostró ligera actividad antibacteriana frente a la cepa ATCC 29212 de *Enterococcus faecalis*. En cuanto a los extractos metanólicos y clorofórmicos de *Zingiber officinale* no se evidenció actividad alguna frente a las cepas probadas y a las concentraciones empleadas. Todos estos resultados fueron validados por métodos bioestadísticos para establecer el IC50.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo del Dr. Fabián León, director del grupo de Investigación Plantas Medicinales, y

del Grupo de Investigación de Plantas Medicinales de la Universidad de Cuenca por facilitarnos el uso de sus instalaciones, equipos y reactivos para la realización de esta investigación. Además, queremos agradecer a la Dra. Sonia Domínguez V. por la prestación de la cepa clínica de *Enterococcus faecalis*.

REFERENCIAS

- Alos, J.-I. (2015). Resistencia bacteriana a los antibióticos: una crisis global. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 33(10), 692-699. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2014.10.004>
- Cantón, R., & Ruíz, P. (2013). Infecciones causadas por bacterias grampositivas multiresistentes (*Staphylococcus aureus* y *Enterococcus spp.*) Infections caused by multi-resistant Gram-positive bacteria (*Staphylococcus aureus* and *Enterococcus spp.*). *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 31(8), 543-551. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2013.08.001>
- CLSI. (2021). Zone diameter and MIC Breakpoints for *Enterococcus faecalis*.
- Gallegos, M. (2016). Las plantas medicinales: principal alternativa para el cuidado de la salud, en la población rural de Babahoyo, Ecuador. *Anales de la Facultad de Medicina*, 77(4) 237-331. http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1025-55832016000400002
- Jerves-Andrade, L., León-Tamariz, F., Peñaherrera, E., Cuzco, N., Toral, V., Ansaloni, R., Maes, L., & Wilches, I. (2014). Medicinal plants used in South Ecuador for gastrointestinal problems: An evaluation of their antibacterial potential. *Journals of Medicinal Plant Research*, 8(45), 1310-1320. <https://doi.org/10.5897/JMPR2014.5656>
- Kukso, F. (2016). *Para 2050 la resistencia a los antibióticos será la principal causa de muerte*. Scientific American. <https://www.scientificamerican.com/espanol/noticias/para-2050-la-resistencia-a-los-antibioticos-sera-la-principal-causa-de-muerte/>
- León-López, D. (2014). Evaluación antimicrobiana y aislamiento de metabolitos secundarios de la especie vegetal *Otholobium mexicanum* J.W. Grimes. Trabajo de Fin de Titulación de Bioquímico Farmacéutico, UTPL, Loja. pp. 71. <http://dspace.utpl.edu.ec/bitstream/123456789/9065/1/Leon%20Lopez%20Dian%20FIN%20DE%20TT.pdf>
- Moreno, S., Scheyer, T., Romano, C., & Vojnov, A. (2006). Antioxidant and antimicrobial activities of rosemary extracts linked to their polyphenol composition. *Free Radical Research*, 40(2):223-31. <https://doi.org/10.1080/10715760500473834>
- PNT del laboratorio de lavado de plantas del Grupo de Investigación de Plantas Medicinales de la Universidad de Cuenca.
- PNT del laboratorio de fitoquímica del Grupo de Investigación de Plantas Medicinales de la Universidad de Cuenca
- PNT del laboratorio de microbiología del Grupo de Investigación de Plantas Medicinales de la Universidad de Cuenca

Segovia, M., Carrasco, L., & Acosta, N. (2015). Las colecciones biológicas: Los tesoros escondidos de un país megadiverso. *Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas*, 36(2), 83-85.
<https://doi.org/10.26807/remcb.v36i1-2.278>

Zampini, I., Arias, M., Cudmani, N., Ordoñez, R., Isla, M., & Moreno, S. (2013). Antibacterial potential of non-volatile constituents of *Rosmarinus officinalis* against 37 clinical isolates of multidrug-resistant bacteria. In: *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 12(2), 201-208.
<https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=8562578001>