



**ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA E HIPOGLICEMIANTE DE LOS EXTRACTOS
CRUDOS DEL PHYLLANTHUS SALVIAEFOLIUS H.B.K. (EUPHORBIACEAE) DE
LOS ANDES VENEZOLANOS**

**Silvana Villarreal¹, Irama Ramírez-González¹, Mariana Solorzano¹, Judith Velasco²,
Tulia Díaz², Carlos Ciangherotti³, Juan Carmona⁴**

- 1. Instituto de Investigaciones. Facultad de Farmacia y Bionálisis. Universidad de Los Andes. Mérida, Venezuela.**
- 2. Departamento de Microbiología y Parasitología. Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Universidad de Los Andes. Mérida-Venezuela.**
- 3. Laboratorio de Neuropeptidos. Facultad de Farmacia. Universidad Central de Venezuela.**
- 4. Departamento de Farmacognosia y Medicamentos Orgánicos. Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Universidad de Los Andes. Mérida-Venezuela.**

Correspondencia: Silvana Villarreal Rivas. Oficina de Educación Médica. Facultad de Medicina. Universidad de Los Andes. Av. Don Tulio, Mérida. Teléfono: (0274)2403106.

E-mail: silvanab@ula.ve

Recibido: 12/1/2016

Aceptado: 3/3/2016



RESUMEN

En este trabajo se estudiaron las actividades antibacteriana e hipoglicemiante de los extractos de diclorometano y metanol de las hojas del *Phyllanthus salviaefolius* H.B.K. (Euphorbiaceae). La actividad antibacteriana se determinó por el método de difusión en agar con discos contra bacterias Gram positivas y Gram negativas. El extracto metanólico presentó actividad contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. El extracto de diclorometano presentó actividad hipoglicemiante óptima a la dosis de 100 y 300 mg/kg. De acuerdo a la literatura consultada es la primera vez que se reporta la actividad biológica para esta especie vegetal.

PALABRAS CLAVE: Actividad antibacteriana, actividad hipoglicemiante, *Phyllanthus salviaefolius*, *Euphorbiaceae*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*.

ANTIBACTERIAL AND HYPOGLYCEMIC ACTIVITY OF THE RAW EXTRACTS OF PHYLLANTHUS SALVIAEFOLIUS H.B.K. (EUPHORBIACEAE) FROM THE VENEZUELAN ANDES

ABSTRACT

In this work the antibacterial and hypoglycemic activity of dichloromethane and methanolic extracts from the leaves of *Phyllanthus salviaefolius* H.B.K. (Euphorbiaceae) was studied. The antibacterial activity was determined by the diffusion method in agar against Gram positive and Gram negative bacteria. The methanolic extract presented activity against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. On the other hand the dichloromethane

Recibido: 12/1/2016

Aceptado: 3/3/2016

extract presented good hypoglycemic activity at 100 mg/kg and 300 mg/kg doses. In agreement to the consulted literature it is the first time that brings the biological activity for this vegetable species.

KEYWORDS: Antibacterial activity, hypoglycemic activity, *Phyllanthus salviaefolius*, *Euphorbiaceae*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*.

INTRODUCCIÓN

Una de las familias botánicas mejor representadas en la región Andina es la Euphorbiaceae en la que se incluyen aproximadamente 300 géneros y 8000 especies, entre los más importantes se encuentran: *Euphorbia*, *Phyllanthus*, *Hevea*, *Aleurites*, *Croton*, *Manihot*, *Ricinus*, *Pedilanthus* y *Jatropha*, entre otras (1,2). Estudios etnobotánicos en la India revelan que en la medicina tradicional se hace uso de plantas de esta familia (3,4), ya que es una de las angiospermas más diversas en hábito, hábitat y morfología (5). El género *Phyllanthus* consiste en 700 especies tropicales, de los cuales 200 son neotropicales y 76 de ellas se conocen en Venezuela, las cuales están ampliamente distribuidas en todo el territorio (6). En los

últimos años se han intensificado los estudios químicos y farmacológicos de algunas especies del *Phyllanthus*. Esta evaluación habla de los conocimientos adquiridos por los estudios farmacológicos, bioquímicos y clínicos *in-vitro* e *in-vivo* que se han llevado a cabo con extractos y compuestos activos. Los datos disponibles en la literatura, indican la presencia de flavonoides, alcaloides, cumarinas, saponinas, aminoácidos, mucílagos, lignanos, terpenos y/o esteroides, sustancias reductoras, taninos, principios amargos y astringentes, glicósidos y quinonas, que respaldan la mayoría de sus usos en la medicina popular como un antiviral, antiespasmódico, antialérgico y en el tratamiento de los trastornos genito-urinario, por lo tanto las plantas de este género

Recibido: 12/1/2016

Aceptado: 3/3/2016

presentan un potencial interés terapéutico como una fuente de nuevas drogas (7-11).

Algunas especies del *Phyllanthus* tienen importancia en la medicina tradicional, debido a que infusiones de las hojas, los tallos y las raíces de diversas plantas de este género, han sido usadas por muchos años en Brasil y otros países como remedios tradicionales para el tratamiento de los cálculos de riñón y vesícula, la diabetes, la disentería y otras infecciones intestinales, así como antiinflamatorio y analgésico (12-14). Diversas investigaciones han demostrado actividad antiviral del *Phyllanthus* spp. frente a los virus de la Hepatitis B (VHB), el Virus Herpes Simple tipo 1 (VHS-1) y el Virus de Inmunodeficiencia Humana tipo 1 (VIH-1) (15-19). Además, algunas especies representan una valiosa fuente para la producción de compuestos naturales con actividad antitumoral, antibacteriana, antifúngica y antioxidante (20-22). La especie *P. salviaefolius*, en América, está distribuida en los países: Colombia, Costa Rica, Ecuador, Perú (15) y a nivel nacional en los Estados: Táchira, Mérida, Trujillo y

Sucre (6). En las localidades en las que se ubica esta especie es conocida con diferentes nombres comunes, como: juquere, yuco, juco, cascarudo, cedrillo, chirrichao, madura, piedra (1). No existen reportes fitoquímicos, ni de actividad biológica para esta especie, considerando los aspectos antes mencionados, en el presente trabajo se evaluó la actividad antibacteriana e hipoglicemiante de los extractos de diclorometano y metanol de las hojas de dicha especie vegetal.

METODOLOGÍA

Material vegetal. La especie *P. salviaefolius* (Euphorbiaceae), fue recolectada en las cercanías de la población de Mucurubá, Estado Mérida – Venezuela a 2371 m.s.n.m. Un *Voucher specimen*, fue depositado en el Herbario MERF de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, bajo el SVN° 01. Luego se procedió a confirmar la determinación botánica de la especie con la ayuda de un taxónomo especialista.

Recibido: 12/1/2016

Aceptado: 3/3/2016

Preparación de los extractos.

Se recolectaron 1025 g de hojas de la especie, luego de secas y molidas (500 g) se sometieron a una extracción exhaustiva a temperatura ambiente (TA) con diclorometano y posteriormente con metanol. Los extractos obtenidos se concentraron a presión reducida a temperatura de 40 °C, obteniéndose 22 g y 103 g de los extractos de diclorometano y metanol respectivamente. Para la preparación de los distintos patrones para las pruebas antibacterianas, se pesaron 5 g de cada extracto y se disolvieron con 10 mL de diclorometano y 5 mL con metanol para obtener una concentración final de 500 mg/mL para el primero y 1000 mg/mL para el último. Las muestras restantes se enviaron al Laboratorio de Neuropeptidos de la Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela, para los ensayos de la actividad hipoglicemiante.

Evaluación de la actividad antibacteriana.

Impregnación de los discos: Para la evaluación de la actividad antibacteriana, se impregnaron discos de papel filtro (6 mm

diámetro) con 20 µL de cada extracto con concentraciones de 500 y 1000 mg/mL. Además, se impregnaron discos con los solventes utilizados (diclorometano y metanol), como control negativo. Estos discos se dejaron secar a TA y en condiciones de esterilidad con luz ultravioleta, durante 12 horas (23).

Preparación del inóculo bacteriano: Los cultivos bacterianos (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 25992, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 23357 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) se mantuvieron en tubos con agar conservado en cuña, a TA. Para la reactivación de las cepas se sembraron en Agar Trypticase Soya con la finalidad de obtener colonias aisladas y de estas se tomó un pool de colonias para sembrarlas en 2,5 mL de caldo Müeller Hinton y luego se incubaron a 37 °C durante 18 horas. Cada inóculo bacteriano se preparó a partir del cultivo en caldo en solución salina fisiológica (SSF) estéril comparándolo con el patrón de turbidez de

Recibido: 12/1/2016

Aceptado: 3/3/2016

Mac Farland N° 0,5 a fin de obtener 10^6 - 10^8 UFC/mL (23).

Análisis microbiológico: La actividad antibacteriana de los extractos *del P. salviaefolius* H.B.K., se evaluó por el método en agar con discos, colocando en una placa de Petri agar Müeller Hinton. Una vez solidificado, se inóculo el microorganismo en la superficie del agar con un hisopo estéril, luego se colocaron los discos de papel de filtro, previamente impregnados con las diferentes concentraciones de los extractos y con los controles negativos (diclorometano y metanol). También se colocó el disco estándar del antibiótico de referencia como control positivo para cada uno de los microorganismos respectivamente (Ampicilina-Sulbactam® 10/10 µg, Vancomicina® 30 µg, Kanamicina® 30 µg, Ceftazidina® 30 µg y Piperacilina-Tazobactam® 100/10 µg). Posteriormente el medio de cultivo inoculado se sometió a preincubación durante 18 horas a 4 °C y luego se incubó a 37 °C durante 24 horas. Se realizó la lectura de los halos de inhibición a

las 24 horas. El diámetro de la zona de inhibición, producto de la actividad antibacteriana se expresó en mm, la prueba se consideró negativa cuando se observó desarrollo microbiano alrededor de los discos, al igual que el control negativo. Los ensayos se realizaron por duplicado (23).

Concentración inhibitoria mínima (CIM):

Se determinó solo con el extracto que mostró actividad antibacteriana. La CIM se le realizó a las reuniones del percolado del extracto metanólico. La elución del percolado se hizo utilizando solventes y mezclas de solventes en orden de polaridad creciente. Se obtuvieron 7 reuniones, con un rango de concentración de 160-1025 mg/mL, de las cuales se hizo una dilución 1:10 para determinar el rango de dilución en el cálculo de la CIM, la cual se realizó por el método de difusión en agar con discos (23). La CIM se define como la concentración más baja capaz de inhibir el crecimiento bacteriano (24).

Evaluación de la actividad hipoglicemiante aguda en ratas.

Recibido: 12/1/2016

Aceptado: 3/3/2016

Se basó en el método descrito por Verspohl (25) y modificado por Guerrero *et al.*, (26). Se utilizaron ratas adultas de un peso comprendido entre 180 y 250 g, todas fueron machos de la cepa Sprague-Dawley. Los extractos fueron administrados por vía oral en suspensión con carboximetilcelulosa al 1 %, se probaron los extractos de diclorometano (DCM) y metanol. Los animales se mantuvieron con libre acceso al agua y a los alimentos hasta 12 horas antes del experimento (ayuno) y fueron distribuidos en grupos ($n \geq 5$), según el protocolo de tratamientos utilizado. La glibenclamida (hipoglicemiante oral) fue usada como control positivo, el vehículo (los

solventes) como control negativo y se utilizaron varias dosis de los extractos. Todos los tratamientos son administrados oralmente por gavaje. Antes de la administración de los tratamientos, se tomó una muestra de sangre de la vena caudal de la cola del animal, a través de una pequeña incisión en la punta de la misma, para estimar la glucosa sanguínea basal (tiempo cero). Luego se midió la glucosa a las 1,5; 3; 5; 7 y 9 horas post-tratamiento. La glucosa se determinó por el método enzimático de la glucosa oxidasa, empleando un glucómetro comercial. Los resultados se muestran como el porcentaje de variación de la glicemia, calculada a través de la siguiente ecuación:

$$\% \text{ variación de glicemia} = [(G_i - G_t) / G_i] \times 100 \% \text{ (Ec.1)}$$

En donde G_i es el valor de glicemia inicial (tiempo cero) y G_t es el valor de glicemia a las 1,5; 3; 5 y 7 horas post-tratamiento.

Recibido: 12/1/2016

Aceptado: 3/3/2016

RESULTADOS

Actividad antibacteriana de los extractos crudos del *P. salviaefolius* H.B.K.

En la **Tabla 1** se expresan los resultados de la valoración de la actividad antibacteriana de los extractos de diclorometano y metanol obtenidos de las hojas del *P. salviaefolius* H.B.K., contra bacterias Gram positivas y Gram negativas, estos microorganismos son morfológicamente y fisiológicamente diferentes y estos resultados son representativos de la actividad antibacteriana de los extractos de esta especie. En tal sentido, sólo el extracto metanólico inhibió el desarrollo de las bacterias Gram positivas, *S. aureus* ATCC 25923 y *E. faecalis* ATCC 29212 a una concentración de 1000 mg/mL. Basados en estos resultados se procedió a realizar un percolado del extracto metanólico, para ello se prepararon mezclas

de solventes con polaridad creciente (E₁: hexano 100, acetato de etilo: hexano 25:75, E₂: acetato de etilo: hexano 50:50, E₃: acetato de etilo: hexano 75:25, acetato de etilo 100, E₄: metanol: acetato de etilo 25:75, E₅: metanol: acetato de etilo 50:50, E₆: metanol: acetato de etilo 75:25 y E₇: metanol 100) obteniéndose 7 muestras, de las cuales se hizo una dilución 1:10 para el cálculo de la CIM. La evaluación de la actividad antibacteriana realizada por el método de difusión en agar con discos, reveló que las muestras E₁ (CIM 400 mg/mL), E₂ (CIM 150 mg/mL) y E₅ (CIM 100 mg/mL) presentaron actividad contra el *E. faecalis*. Todas las fracciones ensayadas mostraron actividad contra *S. aureus* con un rango de concentración de 20-160 mg/mL, observándose mayor actividad en E₅ con un halo de inhibición de 24 mm y CIM 20 mg/mL Tabla 2.

Tabla 1: Actividad antibacteriana del extracto crudo metanólico del *Phyllanthus salviaefolius* H.B.K.

Microorganismos	Zona de inhibición mm (discos 6 mm de diámetro)*					
	Extracto Metanólico ^a	Compuestos de referencia				
		Amp-S (10/10 µg)	Va (30 µg)	Kn (30 µg)	Cef (30 µg)	Pip/T (100/10 µg)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	20*	40*	---	---	---	---
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	15*	---	30*	---	---	---
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	NA	---	---	27*	---	---
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 23357	NA	---	---	---	42*	---
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	NA	---	---	---	---	30*

*promedio de dos ensayos, NA: no activo, Amp-S: Ampicilina-Sulbactam®, Va: Vancomicina®, Kn: Kanamicina®, Cef: Ceftazidima®, Pip/T: Piperacilina-Tazobactam®, ^a: concentración 1000 mg/mL.

Tabla 2: Actividad antibacteriana de las fracciones del extracto metanólico del *P. salviaefolius* H.B.K.

Extractos	Microorganismos			
	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	CIM (mg/mL)	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	CIM (mg/mL)
E ₁	9*	100	9*	400
E ₂	11*	30	9*	150
E ₃	13*	160	NA	NP
E ₄	21*	100	NA	NP
E ₅	24*	20	10*	100
E ₆	22*	77	NA	NP
E ₇	22*	47,5	NA	NP

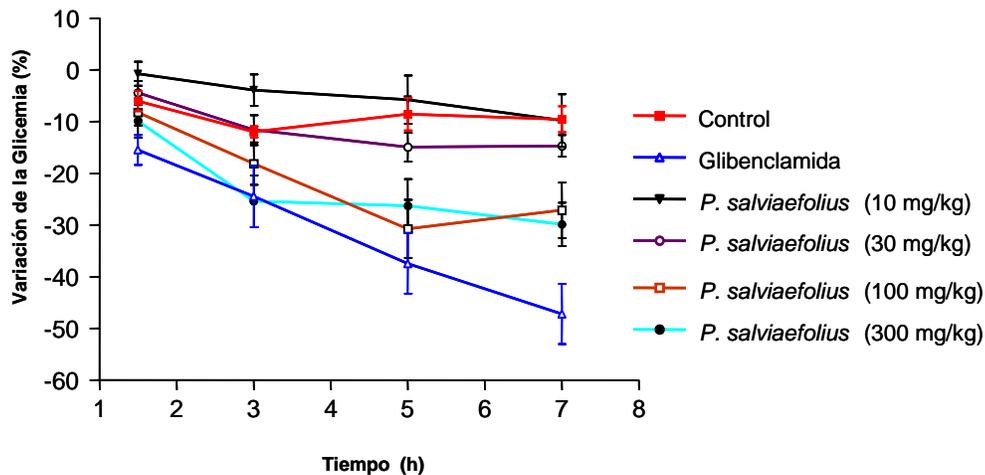
E₁: hexano + acetato de etilo 25:75, E₂: acetato de etilo: hexano 50:50, E₃: acetato de etilo: hexano 75:25 + acetato de etilo 100, E₄: metanol: acetato de etilo 25:75, E₅: metanol: acetato de etilo 50:50, E₆: metanol: acetato de etilo 75:25 y E₇: metanol 100. *Zona de inhibición mm (discos 6 mm de

diámetro), promedio de dos ensayos. NA: no activo. NP: no probado. CIM: concentración inhibitoria mínima, rango de concentración 10-1025 mg/mL.

Actividad hipoglicemiante aguda en ratas de los extractos crudos del *P. salviaefolius* H.B.K.

Para evaluar la actividad hipoglicemiante de los extractos de diclorometano y metanol se utilizaron seis grupos de ratas machos de la cepa Sprague-Dawley (cada grupo constituido por cinco animales). Se suministraron varias dosis de los extractos (10, 30, 100 y 300 mg/kg), la Glibenclamida (hipoglicemiante-referencia) y el vehículo (control negativo). Los niveles de glicemia se midieron utilizando el método de la glucosa oxidasa, al inicio y a las 1,5; 3; 5 y 7

horas post-tratamiento. El extracto con diclorometano mostró actividad hipoglicemiante a la dosis de 100 y 300 mg/kg con una diferencia significativa en algunos tiempos evaluados. La Glibenclamida fue estadísticamente significativa con respecto al control negativo, en todos los casos (**Figura 1**). Los porcentajes de variación de la glicemia fueron los siguientes: $-8,22 \pm 2,51$; $-18,13 \pm 4,08$; $-30,75 \pm 5,62$; $-27,15 \pm 5,33$ a las 1,5; 3; 5 horas (**Figura 2**) y 7 horas (**Figura 3**) respectivamente. El extracto metanólico no presento actividad hipoglicemiante.



Recibido: 12/1/2016

Aceptado: 3/3/2016

Figura 1. Actividad hipoglicemiante del extracto de diclorometano del *P. salviaefolius*. La diferencia estadísticamente importante para la Glibenclamida con el control negativo correspondiente en cada caso; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

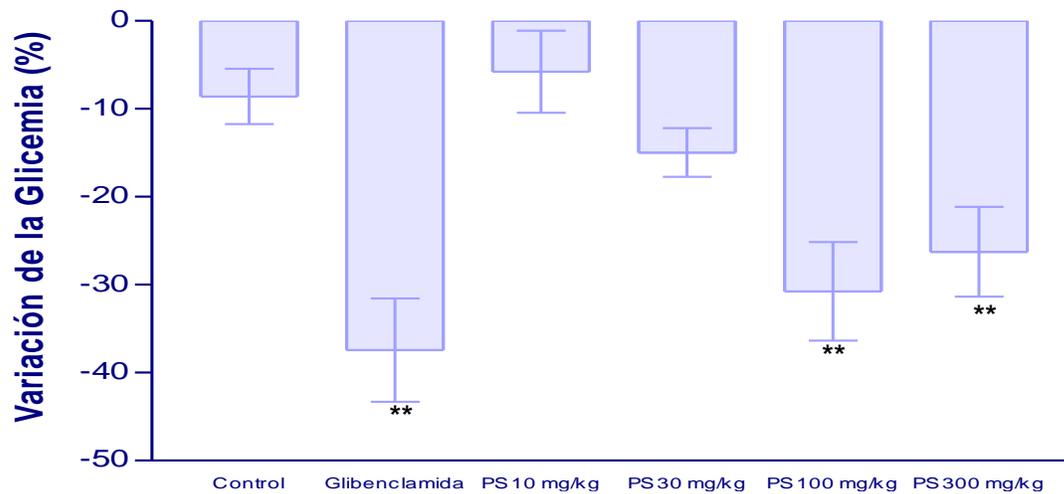
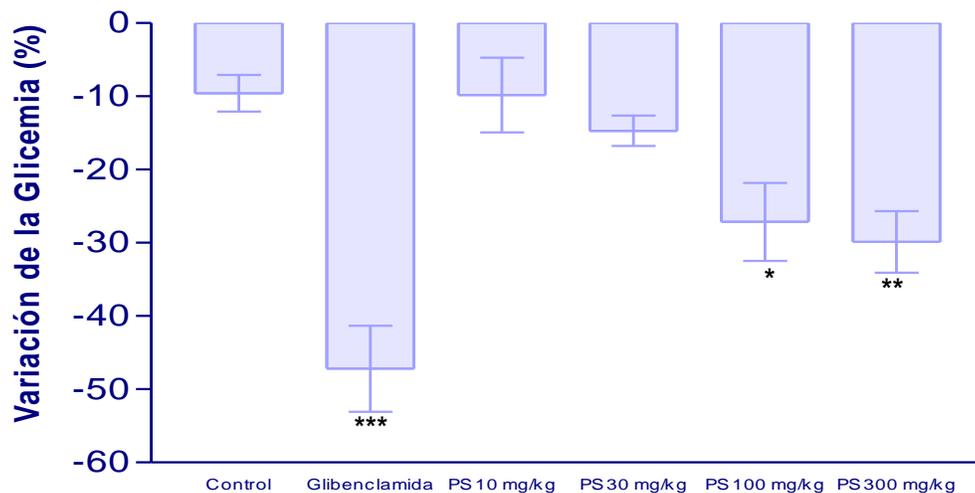


Figura 2. Actividad hipoglicemiante del extracto de diclorometano del *P. salviaefolius* a la quinta hora post-tratamiento. PS= Extracto *Phyllanthus salviaefolius*. ** $p < 0,01$.

Figura 3. Actividad hipoglicemiante del extracto de diclorometano del *P. salviaefolius* a la séptima hora post-tratamiento. PS = Extracto *Phyllanthus salviaefolius*. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.



Recibido: 12/1/2016

Aceptado: 3/3/2016

DISCUSIÓN

En este trabajo de investigación se ha valorado la actividad antibacteriana e hipoglicemiante de los extractos crudos de diclorometano y metanol de las hojas del *P. salviaefolius* H.B.K. Con respecto a la actividad antibacteriana observada del extracto metanólico sólo contra las bacterias Gram positivas permite inferir que el mecanismo de acción de o las sustancia(s) activa(s) presente(s) en el mismo, inhiben la síntesis de la pared celular bacteriana (petidoglicano) (27). La aparición e incremento en los últimos años de bacterias Gram positivas multiresistentes, ha dificultado el tratamiento de ciertas infecciones intrahospitalarias y han reducido las opciones terapéuticas, representando las mismas, un problema de salud pública. Esto

es particularmente cierto para los *Staphylococcus aureus* resistentes a la Meticilina (MRSA) y *Enterococcus faecalis* resistentes a la Vancomicina (23, 28-31).

Los resultados obtenidos en esta investigación se correlacionan con estudios anteriores realizados con otras especies pertenecientes a este género (20, 32), de los cuales, generalmente, se han aislado compuestos con actividad antibacteriana significativa, tales como flavonoides, lignanos, triterpenos, entre otros (9) aislados y caracterizados en otras especies y a los cuales se les ha demostrado actividad antimicrobiana (33, 34). La actividad antibacteriana exhibida por el extracto metanólico contra estos microorganismos, apoya futuras investigaciones orientadas a aislar y caracterizar el o los compuestos responsable(s) de dicha actividad. Por otra

Recibido: 12/1/2016

Aceptado: 3/3/2016

parte los resultados obtenidos en el ensayo de la actividad hipoglicemiante del extracto de diclorometano del *P. salviaefolius*, se correlacionan con estudios anteriores realizados a otras especies pertenecientes a este género, de las cuales generalmente se le han aislado compuestos con actividad hipoglicemiante aguda significativa, tales como flavonoides, saponinas, terpenoides entre otros (35-37). En la presente investigación se reveló el potencial antibacteriano e hipoglicemiante del *P. salviaefolius* H.B.K., siendo este el primer reporte para esta especie.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo de Desarrollo Científico, Humanístico y Tecnológico (CDCHT – Mérida- Venezuela, código N° S-FA-14-06-

03) por financiar esta investigación. Al Ing. Juan Carmona (Facultad de Farmacia y Bioanálisis) por la identificación del material botánico.

REFERENCIAS

1. Jones SB. Sistemática Vegetal. Editorial McGRAW-HILL: México; 1988.
2. Webster GL. Flora de Nicaragua. Introducción Gimnospermas y Angiospermas. Missouri Botanical Garden Press; 2001.
3. Kala C, Dhyani P, Sajwan B. Developing the medicinal plants sector in northern India: Challenges and opportunities. J. Ethnobiol. Ethnomedicine; 2006, 32: 1-15.
4. Muthu C, Ayyanar M, Raja N, Ignacimuthu S. Medicinal plants used by traditional healers in Kancheepuram

Recibido: 12/1/2016

Aceptado: 3/3/2016

- District of Tamil Nadu, India. J. Ethnobiol. Ethnomedicine; 2006, 2: 43.
5. Babillo VM, Schnee L. Clave de las Familias de Plantas Superiores de Venezuela. Revista de la Facultad de Agronomía. Universidad Central de Venezuela; 1965: 144.
 6. Ministerio del Ambiente y de los Recursos Naturales Renovables. Catálogo de la Flora de Venezuela; 1998.
 7. Calixto JB, Santos AR, Paulino N, Cechinel V, Yunes RA. The plants of the genus *Phyllanthus* as a potential source of new drugs. Ciênc. Cult. (São Paulo); 1997, 49: 422-32.
 8. Gutiérrez YI, Miranda MM, Barrio G, Varona TN, Mayoral JJ. Evaluación farmacognóstica y fitoquímica preliminar de *Phyllanthus rebicularis* HBK. Rev. Cubana Farm.; 2000, 34: 56-62.
 9. Gertsch J, Tobler RT, Brun R, Sticher O, Heilmann J. Antifungal, antiprotozoal, cytotoxic and piscicidal properties of Justicidin B and new aryl-naphthalide lignan from *Phyllanthus piscatorum*. Planta Médica; 2003, 69: 420-24.
 10. Bagalkotkar G, Sagineedu S, Saad M, Stanslas J. Phytochemicals from *Phyllanthus niruri* Linn., and their pharmacological properties: a review. Journal of Pharmacy and Pharmacology; 2006, 58: 1559-70.
 11. Lam SH, Wang CY, Chen CK, Lee SS. Chemical investigation of *Phyllanthus reticulatus* by HPLC-SPE-NMR and conventional methods. Phytochemical Analysis; 2007, 18: 251-55.
 12. Lans C. Ethnomedicines used in Trinidad and Tobago for urinary problems and *Diabetes mellitus*. J. Ethnobiol. Ethnomedicine; 2006, 2: 45.

13. Kumar D, Kumar S, Vasudeva N. A review: chemistry and biological activities of genus *Phyllanthus*. *Journal of Plant Sciences*; 2006, 1: 339-46.
14. Bhattacharjee R, Sil PC. Protein isolate from the herb, *Phyllanthus niruri* L. (Euphorbiaceae), plays hepatoprotective role against carbon tetrachloride induced liver damage via its antioxidant properties. *Food and Chemical Toxicology*; 2007, 45: 817-26.
15. Unander DW, Webster GL, Blumberg BS. Uses and Bioassays in *Phyllanthus* (Euphorbiaceae): a compilation II. The subgenus *Phyllanthus*. *Journal of Ethnopharmacology*; 1991, 34: 97-133.
16. Fernández RJ, Barrio AG, Romeu AB, Gutiérrez Y, Valdés VS, Parra F. Herpes simplex virus type 1. *Phyllanthus orbicularis*. Antiviral activity. Virucidal activity. *Phytotherapy Research*; 2003, 17: 980-82.
17. Huang RL, Huang YL, Ou JC, Chen CC, Hsu FL, Chang C. Screening of 25 compounds isolated *Phyllanthus* species for anti-human Hepatitis B virus *in vitro*. *Phytother Res.*; 2003, 17: 449-53.
18. Valdés S, Barrio G, Gutiérrez Y, Morier L. Evaluación preliminar de la actividad antiviral del extracto acuoso de *Phyllanthus orbicularis* frente al virus VHS-1. *Rev. Cubana Med. Trop.*; 2006, 55: 169-73.
19. Lam WY, Leung KT, Tik-Wan LP, Ming-Yuen LS, Lik-Yuen CH, Fung KP, Eng-Choon OV, Miu-Yee WM. Antiviral effect of *Phyllanthus nanus* ethanolic extract against Hepatitis B virus (HBV) by expression microarray analysis. *Journal of Cellular Biochemistry*; 2006, 97: 795-812.
20. Calderón A, Valua F, Castro A, Félix L. Determinación de compuestos orgánicos de *Phyllanthus niruri* L. “Chanca Piedra”, actividad antibacteriana y antiviral. V

- Congreso Mundial de Medicina Tradicional Lima-Perú. 2005. Disponible en: congreso_mundial/000data/temlib.htm-256k
www.medicina.usmp.edu.pe/
21. Kumar S, Sachdeva N, Amir M, Kumar A, Singh SK. Free radical scavenging effect of *Phyllanthus simplex*: *in vitro* and *in vivo* study. Saudi Pharmaceutical Journal; 2007, 15: 55-59.
 22. Chatterjee M, Sil PC. Hepatoprotective effect of aqueous extract of *Phyllanthus niruri* on nimesulide-induced oxidative stress *in vivo*. Indian Journal of Biochemistry & Biophysics; 2006, 43: 299-305.
 23. Velasco J, Contreras E, Buitrago D, Velasco E. Efecto antibacteriano de *Virola sebifera* sobre *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina. Ciencia; 2005, 13: 411-415.
 24. CLSI. *Clinical and Laboratory Standards Institute*. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; eighteenth informational supplement. CLSI document M100-S18 [ISBN 1-56238-653-0]. Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA; 2008.
 25. Verspohl EJ. Recommended Testing in Diabetes Research. *Planta Médica*; 2002, 68: 581-90.
 26. Guerrero JA, Hersch P, Pedraza CJ, Navarrete A, Mata R. Antihyperglycemic effect of constituents from *Hintonia standleyana* in streptozotocin-induced diabetic rats. *Planta Médica*; 2005, 71: 1-7.
 27. Ryan K, Ray CS. *Microbiología Médica*. 4 ed. México: McGraw-Hill Interamericana; 2005.
 28. Velásquez J, Lizaraso F, Zetola N, Pamo O, Sánchez L, Wong W,

- Hernández R. Vigilancia de la resistencia de *Enterococcus* sp., a la vancomicina y evaluación *in vitro* de nuevas alternativas terapéuticas. Rev. Soc. Perú. Med. Interna; 2002^a, 15: 66-72.
29. Velásquez J, Lizaraso F, Wong W, Alfaro C, Véliz J, Salazar J, Larrea H, Gamarra J, Sacsquispe R. Vigilancia de la resistencia de *Staphylococcus aureus* a la oxacilina-vancomicina y patrones de coresistencia. Rev. Soc. Per. Med. Interna; 2002b, 15:184-89.
30. Picazo J, Betriu C, Rodríguez I, Culebras E, Gomez M. Vigilancia de resistencia a los antimicrobianos: Estudio VIRA. Enferm Infecc Microbiol Clin.; 2004, 22: 517-25.
31. Alvarez C, Cortes J, Arango A, Correa C, Leal A. Resistencia antimicrobiana en unidades de cuidado intensivo de Bogotá, Colombia, 2001-2003. Rev. Salud Pública; 2006, 8: 86-101.
32. Goun E, Cunningham G, Chu D, Nguyen C, Miles D. Antibacterial and antifungal of Indonesian ethnomedical plants. Fitoterapia; 2003, 74: 592-96.
33. Naeem I., Anwar R., Khan T. M. Antibacterial alkaloids of *Saracococca saligna*. Pak. J. Pharm. Sci.; 2005, 18: 3-5.
34. Chen L., Cheng X., Shi W., Lu Q., Go V. L., Heber D., Ma L. Inhibition of growth of *Streptococcus mutans*, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, and vancomycin-resistant *Enterococci* by kurarinone, a bioactive flavonoid isolated from *Sophora flavescens*. J. Clin. Microbiol.; 2005, 43: 3574-75.
35. Hnatyszyn O, Miño J, Ferraro G, Acevedo C. The hypoglycemic effect of *Phyllanthus sellowianus* fractions in streptozotocin-induced diabetic mice. Phytomedicine; 2002, 9: 556-59.



36. Negri G. Diabetes melito: plantas e princípios ativos naturais hipoglicemiantes. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences; 2005, 41: 121-42.
37. Barbosa-Filho JM, Vasconcelos TH, Alencar AA, Batista LM, Oliveira RA, Guedes DN, Falcão H de S, Moura MD, Diniz MF, Modesto-Filho J. Plants and their active constituents from South, Central, and North America with hypoglycemic activity. Brazilian Journal of Pharmacognosy; 2005, 15: 392-413.