

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

**Eduardo Sánchez-García, Sandra Loruhama
Castillo-Hernández, Patricia García-Palencia**

Laboratorio Química Analítica, Facultad de Ciencias Biológicas de la
Universidad Autónoma de Nuevo León, México.

eduardo.sanchezg@uanl.mx, sandra.castilloh@uanl.mx,
patricia.garciapl@uanl.edu.mx

<http://dx.doi.org/10.3926/oms.334>

Sánchez-García, E., Castillo-Hernández, S.L., & García-Palencia, P. (2016).
Actividad antimicrobiana. En Rivas-Morales, C., Oranday-Cardenas, M.A.,
& Verde-Star, M.J. (Eds.). *Investigación en plantas de importancia médica*. Barce-
lona, España: OmniaScience. 77-100.

Resumen

Los productos naturales tales como los extractos de plantas y/o sus compuestos puros proveen oportunidades ilimitadas para el desarrollo de nuevas drogas que puedan ser utilizadas para el control microbiano. Existen pruebas estandarizadas *in vitro* conocidas como bioensayos de susceptibilidad antimicrobiana, las cuales son técnicas esenciales en la búsqueda de actividades biológicas de nuevos compuestos naturales.

Dentro de los principales métodos de evaluación preliminar de la actividad antimicrobiana se encuentran los métodos de difusión en disco y difusión del pozo en agar, mediante los cuales se determina en forma cualitativa el efecto antimicrobiano de los extractos de plantas sobre los microorganismos de interés, los resultados obtenidos se expresan midiendo el diámetro de los halos de inhibición producido por los extractos.

Por otro lado los métodos de dilución son apropiados para la determinación cuantitativa de la actividad antimicrobiana, la técnica más utilizada es la denominada concentración mínima inhibitoria (CMI), con la cual se define la concentración mínima capaz de inhibir el crecimiento visible del microorganismo. Esta técnica puede ser mejorada con la ayuda de indicadores REDOX, que son utilizados generalmente para la determinación del crecimiento/viabilidad microbiana.

Una vez que se ha establecido de forma cualitativa y cuantitativa el efecto antimicrobiano de los extractos es conveniente determinar el compuesto responsable de dicha actividad. La bioautografía es la técnica más utilizada para tal fin ya que nos indica directamente la localización del compuesto de interés en una cromatografía de capa delgada. Dicho compuesto puede ser obtenido en cantidades suficientes, utilizando técnicas como la cromatografía en columna y la cromatografía en capa preparativa para realizar diferentes bioensayos o para caracterizarlo mediante técnicas espectroscópicas.

Las metodologías para determinar la actividad antimicrobiana de extractos de plantas son muy variadas, sin embargo, siempre aportan información muy valiosa para la búsqueda preliminar de compuestos con propiedades antimicrobianas. Es importante tomar en cuenta los factores que pueden causar variaciones en los resultados, de ahí la importancia de la estandarización de los métodos y la recomendación es evaluar la actividad antimicrobiana por métodos ya estandarizados.

Palabras Clave

Extractos de plantas, actividad antimicrobiana, técnicas de evaluación antimicrobiana.

3.1. Introducción

Desde la antigüedad han sido empleadas las plantas para diferentes fines ya sean en el área de alimentos (condimento), en la cosmetología y en la médica principalmente enfocados a curar o prevenir diversas enfermedades (Negroni, 2000). Los productos naturales tales como los extractos de plantas y/o sus compuestos puros proveen oportunidades ilimitadas para el desarrollo de nuevas drogas que puedan ser utilizadas para el control microbiano. A este respecto, el desarrollo de farmacéuticos comienza con la identificación de los principios activos, para después utilizando diversos ensayos biológicos obtener información sobre la capacidad antimicrobiana del compuesto de interés, ya sea obteniendo la concentración mínima inhibitoria o la concentración mínima bactericida (Ncube, Afolayan & Okoh, 2008). Para determinar su correcta evaluación existen pruebas estandarizadas que se llevan a cabo con el fin de valorar su actividad, en especial la antimicrobiana, a través de diferentes métodos *in vitro* principalmente desarrollados en el laboratorio y así establecer a qué microorganismos son sensibles o muestran una resistencia ya sean a bacterias, hongos y protozoos (Ramirez & Marin, 2009); además se deben considerar diversos ensayos de toxicidad, para asegurar su consumo (Cos, Vlietinck, Berghe & Maes, 2006).

Estas pruebas estandarizadas son de vital importancia, debido a que la actividad biológica de extractos de plantas o sus compuestos puros es evaluada en todo el mundo por diferentes grupos de investigación. Esto es relevante debido a que se pueden obtener diferentes beneficios de los métodos antes mencionados como son el establecer una terapia alterna, una vez que el extracto vegetal ha sido evaluado en diferentes concentraciones, considerando sus propiedades antimicrobianas y tóxicas, además de establecer el descubrimiento de nuevos mecanismos de acción de los extractos vegetales, generar una base de datos que permitan seleccionar los diferentes extractos vegetales para el tratamiento de diversas afectaciones médicas, hasta desarrollar políticas de uso de los extractos vegetales estudiados (Taroco, Seija & Vignoli, 2006).

Las pruebas de susceptibilidad microbiana son técnicas esenciales en la investigación y los resultados pueden variar dependiendo de una gran cantidad de factores involucrados en el desarrollo de las mismas (Bakht, Humaira, Madiha & Haq, 2015). Desde la selección de las plantas, el tipo de extracción, la elección de bioensayos apropiados hasta detalles como la cantidad de inóculo y técnica utilizada para la determinación de actividad antimicrobiana, pueden influir en los

resultados de una manera contundente. Los métodos antimicrobianos y antifúngicos, están clasificados en tres grupos principales: difusión, dilución y métodos bioautográficos (Ramírez & Marin, 2009).

Los ensayos de sensibilidad deben estar estandarizados y sujetos a procesos de control que aseguren su reproducibilidad. Y aunque no existe una reglamentación y/o estandarización de la metodología para la evaluación de la capacidad inhibitoria de los extractos de plantas, como está establecido para los antibióticos, la mayoría de los métodos están basados en los utilizados para evaluar la resistencia y/o susceptibilidad a antibióticos. Los métodos para evaluar la actividad de extractos sobre bacterias y hongos suelen ser similares, variando la preparación del inóculo, medio de cultivo, temperatura y el tiempo de incubación (Cowan, 1999).

Método de difusión. Es un método cualitativo, que se caracteriza por ser de fácil estandarización y está indicado para microorganismos no exigentes y crecimiento rápido. Este método está apoyado por datos clínicos y de laboratorio y además presenta la ventaja de ser reproducible; el método se desarrolla en base a los fundamentos descritos por (Bauer, Kirby, Sherris & Turck, 1966) en el método de Kirby-Bauer. Esta técnica se puede realizar ya sea en pozo o disco ya que actualmente ambos se encuentran estandarizados y son recomendados por el Subcomité de ensayos de susceptibilidad del NCCLS, de los Estados Unidos (Ramírez & Marin, 2009).

Se recomienda su empleo cuando una bacteria se aísla y se desconoce su sensibilidad, sobre todo si se conoce que el microorganismo presenta resistencia a los antimicrobianos más frecuentes y además, cuando se sabe que el microorganismo tiene sensibilidad a cierto medicamento, pero el paciente presenta una alergia hacia él, para estudiar nuevas alternativas de tratamiento a través de extractos naturales (Taroco et al., 2006).

A través de este método se determina en forma cualitativa el efecto de ciertas sustancias a estudiar sobre cepas bacterianas las cuales pueden provenir de muestras aisladas de pacientes o bien ser de referencia (ATCC). El método se desarrolla en base a la relación entre la concentración de la sustancia necesaria para inhibir una cepa bacteriana y el halo de inhibición de crecimiento en la superficie de una placa de agar con un medio de cultivo adecuado y que se encuentra sembrado de forma homogénea con el microorganismo a estudiar y sobre el cual se coloca un papel filtro de 6 mm de diámetro o se deposita en un pozo en el agar

de la placa una cantidad determinada de la sustancia a probar. Una desventaja que se presenta cuando la sustancia a probar es un extracto natural es el papel filtro Whatman debido a que contiene celulosa y esta posee grupos hidroxilos libres presentes en cada glucosa haciendo que la superficie del disco sea hidrofílica actuando directamente con algunos compuestos catiónicos de los productos naturales absorbiéndolos en la superficie del disco impidiendo la difusión de estos en el agar; lo que explica porqué el método de pozo es más sensible (Burgess, Jordan, Bregu, Mearns-Spragg & Boyd, 1999).

3.2. Metodología

3.2.1. *Técnica de difusión en placa*

- **Material vegetal.** La planta colectada se debe secar en la sombra a temperatura ambiente, posteriormente la planta seca es triturada para llevar a cabo el proceso de extracción.
- **Microorganismos.** Es importante de establecer si estos provienen de muestras clínicas de paciente o si son cepas de referencia ATCC con la finalidad de conocer las condiciones físico-químicas específicas de cada uno de los microorganismos en estudio y que estos no sean factores que influyan de manera negativa en el procedimiento.
- **Medio de cultivo.** Cuando las cepas se encuentran liofilizadas se cultivan en caldo para posteriormente preservarse en agar inclinado en tubo (bacterias). El tipo de agar para el tubo inclinado dependerá del tipo de microorganismo, aunque los medios más recomendados son infusión cerebro y corazón (ICC), agar soya tripticasa (TSA), agar Mueller Hinton (MH) o agar nutritivo. En el caso de hongos y levaduras, se recomienda agar Saboreaud-Dextrosa. Las temperaturas de incubación, varían dependiendo del microorganismo en cuestión, siendo la temperatura de $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ para la mayoría de las bacterias mientras que para hongos y levaduras la temperatura recomendada es de $29\pm 2^{\circ}\text{C}$. El tiempo de incubación puede variar de 24-48 h, mientras que para el crecimiento de hongos se recomiendan de 5 a 7 d. Para las pruebas de actividad antimicrobiana se deben incubar según las condiciones descritas anteriormente aplicando el método de pozo o de disco. Para la técnica de difusión en pozo algunos medios son recomendados para microorganismos específicos, tal es el caso

del agar Baird-Parker para el cultivo de *Staphylococcus aureus*; el agar McConkey para *Escherichia coli*; agar sangre para *Streptococcus* β hemolítico y agar Saboreaud-Dextrosa para *Saccharomyces cerevisiae*; para el método de disco se emplea cotidianamente Muller Hilton a excepción de las levaduras en las que se emplea el medio descrito en el método modificado de pozo en agar.

- **Preparación del inóculo.** Una vez cultivadas las cepas en el medio inclinado, se toman con el asa inóculos del cultivo colocándose en un tubo con solución salina (0.85%) se debe ajustar el inóculo a 0.5 unidades (10^8 cel/mL) según la escala de Mc Farland y se verifica con la absorbancia a 580 nm cercana al 25%.

3.2.1.1. Método de difusión en Disco (Kirby-Bauer)

Se realiza la inoculación y siembra sobre la superficie de los agares Mueller Hinton (bacterias) y Saboreaud-Dextrosa (levadura). Se impregnan de 10 a 25 μ L de los extractos, estándares y blancos en cada uno de los discos de papel filtro Whatman N° 42 por triplicado y se colocan sobre la superficie de la placa de agar inoculada. Estas se incuban invertidas a $35\pm 2^\circ\text{C}$ por 24 h para bacterias y a $29\pm 2^\circ\text{C}$ por 48 h en caso de levaduras, posteriormente se miden los halos de inhibición incluyendo el diámetro de los discos (Figura 1).

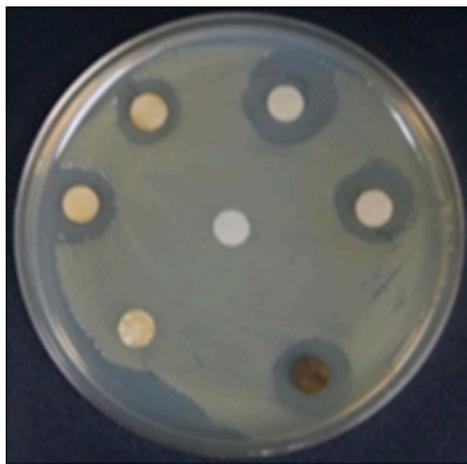


Figura 1. Halos de inhibición producidos por extractos de plantas mediante la técnica de difusión en disco

3.2.1.2. Método modificado de pozos de agar

Se deposita el inóculo y se siembra sobre las superficies del agar selectivo estipulado para este método; seguido de ello se hacen los pozos sobre la superficie del agar con el apoyo de un sacabocados estéril de 6 mm de diámetro y en cada uno de ellos se deposita de 10 a 25 μL de los extractos a evaluar, estándares (control positivo y negativo) y blanco por triplicado, se deja reposar por espacio de 30 min (para evaporar el líquido), finalmente se incuba con la caja invertida a $35\pm 2^\circ\text{C}$ por 24 h para bacterias y a $29\pm 2^\circ\text{C}$ por 48 h en caso de levaduras, posteriormente se miden los halos de inhibición (Figura 2) (Ríos, Recio & Villar, 1988).



Figura 2. Halos de inhibición producidos por extractos de plantas mediante la técnica de difusión en pozo

3.2.2. Métodos de dilución

Estos métodos son apropiados para la determinación cuantitativa de la actividad antimicrobiana (Klančnik, Piskernik, Jeršek & Možina, 2010). En esta técnica una cantidad de extracto de planta o compuesto activo, es mezclado con una cantidad de medio de cultivo. Puede ser llevado a cabo tanto en medio sólido como en medio líquido. La concentración final deseada debe ser considerada p/v o v/v con respecto al medio de cultivo.

3.2.2.1. *Dilución en agar*

En este método, el agar es mezclado con una cantidad de extracto de planta o compuesto activo para obtener una concentración final con el medio. Por ejemplo, si tuviésemos un extracto crudo del que no conociéramos su concentración, podría agregarse una alícuota en peso (mg, μg) aforando a un volumen final; es decir si tuviésemos una alícuota de 100 μg y completáramos el volumen con el medio de cultivo a 1 mL tendríamos una concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Posteriormente, se siembra por extensión en la superficie del agar 1 mL del cultivo microbiano incubándose por tiempo determinado para cada tipo de microorganismo. Para este método, la concentración mínima inhibitoria (CMI) se define como la menor concentración capaz de inhibir al microorganismo y por lo tanto no hay crecimiento visible. La desventaja de este método radica en la gran cantidad de medio que se coloca en la placa Petri regular (23 mL aprox) por lo que se requiere gran cantidad de extracto y/o compuesto. Para contrarrestar esto, pueden utilizarse placas pequeñas o placas de tres divisiones sembrando 100 μL de cultivo microbiano. Esto con el fin de utilizar menor cantidad de agar, extracto y/o compuesto. También puede sembrarse por goteo mediante el método de Miles y Misra (descrito más adelante) con lo que podrían sembrarse en una misma placa, cepas diferentes. A pesar de esta recomendación, hay que tener cuidado con la cantidad de humedad contenida en el agar, pues al sembrar por goteo, las gotas pueden migrar a través del agar y juntarse unas con otras. Por ello es de suma importancia que las placas tengan la prueba de esterilidad que ayudará a evitar un exceso de humedad en el medio.

3.2.2.1.1. Dilución en medio líquido

En el caso de dilución en medio de cultivo líquido (dilución en caldo), se procederá de la misma forma descrita en la sección anterior para obtener una concentración final del extracto en el medio, sin embargo, la interpretación de los resultados se realiza de manera diferente, por turbidimetría e indicadores REDOX, que son utilizados generalmente para la determinación del crecimiento/viabilidad microbiana. Para este tipo de técnicas se requiere un espectrofotómetro en el cual se realizan lecturas a una densidad óptica (DO) de 600 nm para la determinación de crecimiento microbiano y de 540-570 nm cuando se utiliza REDOX. Las desventajas de la turbidimetría se presentan en aquellos compuestos no solubles que pudieran interferir con la lectura. Es por ello de suma importancia utilizar

un control de crecimiento (medio de cultivo y microorganismo sin adición de compuesto o extracto) así como un blanco que contenga medio de cultivo y el compuesto en cuestión sin adición del microorganismo.

En el caso de los indicadores REDOX, los utilizados principalmente son el bromuro de difeniltetrazolio (MTT) y resazurina. El primero está basado en la conversión del MTT a formazán por las células metabólicamente activas, produciendo un color púrpura directamente proporcional a la viabilidad celular; normalmente se prepara en una concentración de 0.5% con agua destilada (v/v) después de 24-48 h de incubación o el requerido por el microorganismo. Una vez adicionado el MTT la reacción se lleva a cabo en 3-5 h, presentándose un viraje a azul en aquellos cultivos en donde haya viabilidad celular. Los cultivos deben ser centrifugados para recuperar el formazán al cual se le adiciona dimetil sulfóxido (DMSO) para disolverlo, finalmente se lee a una DO de 540-570 nm dependiendo de las indicaciones del fabricante, ya que hay casos en que el ensayo se proporciona a manera de «KIT» especificando la DO de lectura (Wang et al 2010). Este ensayo tiene la desventaja que el resultado no es directo, sino que se lleva a cabo en dos etapas, la reducción del MTT a formazán y la disolución de éste último en un compuesto orgánico siendo el DMSO el más utilizado.

El segundo método se basa en la reducción de resazurina a resofurina por las células metabólicamente activas, produciendo un color rosa directamente proporcional a las células viables. La resazurina se prepara con agua destilada a una concentración de 0.01% esterilizándose por filtración (Palomino et al., 2002); después del tiempo de incubación requerido por el microorganismo, se agrega una alícuota (10% v/v) de la resazurina preparada y se deja incubar por 30 min más para observar el cambio de color. Este método tiene la ventaja de ser directo sin embargo hay que ser cuidadosos con las interferencias en la lectura que se pudieran presentar debido al tipo de compuestos o extractos adicionados.

Estos dos métodos pueden escalarse a micrométodos en donde los cultivos se realizan en placas de 96 pozos (microplacas), teniendo en cuenta las proporciones arriba mencionadas.

La CMI se considera aquella concentración en la que no haya viabilidad por lo tanto no hay cambio de color.

El método de dilución en medio líquido permite también determinar efecto bacteriostático o bactericida. Para hacer esta determinación se debe realizar un conteo en placa antes y después de la incubación, mediante la utilización de diluciones seriadas (1:10) en tubos con 9 mL de solución salina al 0.85%. Posteriormente se adiciona 1 mL del cultivo y se va diluyendo en serie pasando 1 mL del tubo anterior al tubo nuevo las veces que se desee. Para inóculos muy grandes se recomienda una serie de 10 tubos, mientras que para inóculos pequeños, de 5 a 6 diluciones. Al diluir se van obteniendo diluciones seriadas (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} etc.) por lo que al plaquear 1 mL de 10^{-1} , el resultado obtenido se multiplica por el inverso de la dilución es decir por 10. Esto es, si la cuenta en placa de la dilución 10^{-1} resultó en 150 colonias, el resultado final será 1500 UFC/mL. Si hubiese 12 colonias en la dilución 10^{-2} , el resultado se multiplicaría por 100 por lo que el conteo final quedaría como 1200 UFC/mL. Este método se puede escalar a micro-método colocando 1.8 mL de solución salina en tubo, adicionando 200 μ L del cultivo y en las subsecuentes diluciones. En el citado micro-método, se podrían plaquear 100 μ L, por lo que el resultado final para 1 mL tendría que multiplicarse por 10 debido a que solo se plaqueó la décima parte. Es decir, si en la dilución 10^{-2} se obtuvieran 12 colonias, antes de multiplicarse por el inverso de la dilución, se multiplicaría por 10 (120 UFC) para posteriormente multiplicarse por el inverso: $120 \times 100 = 12,000$ UFC/mL.

Para determinar si el efecto del extracto o compuesto en cuestión es bacteriostático o bactericida, se toma en cuenta el conteo en placa obtenido. Para considerarse bactericida, no debe haber crecimiento en el cultivo, mientras que al obtener un crecimiento igual al inóculo inicial, se considera bacteriostático. Una de las técnicas utilizadas para el conteo bacteriano es la técnica de Miles y Misra (1938), en donde después de realizar las diluciones en tubo e incubar el tiempo determinado, se toman alícuotas de 20 μ L depositando en forma de gota en el agar (Lee et al., 2009). Por lo que en este caso, el resultado obtenido deberá multiplicarse por 50 para ajustar el resultado a 1 mL para posteriormente multiplicar por el inverso de la dilución. Es decir si en la dilución 10^{-2} se obtuvieron 9 colonias, este resultado se multiplicará por 50 antes de multiplicarse por el inverso de la dilución ($9 \times 50 = 450 \times 100 = 45,000$ UFC/mL).

Los métodos de dilución en caldo son métodos que han permitido determinar la CMI de una gran cantidad de compuestos. Las ventajas de estos métodos sobre la difusión son la sensibilidad y reproducibilidad, además de ser utilizados para una gran cantidad de microorganismos. La concentración mínima bacteri-

cida, normalmente refiere aquella concentración que causa la muerte total del microorganismo, por lo que requiere un plaqueo del cultivo que corrobore este hecho. Uno de los medios que se recomienda para este tipo de ensayos es el Muller Hinton para aquellos microorganismos que no se consideran fastidiosos también el Soya Trypticase junto con el agar nutritivo, podrían considerarse para estos microorganismos. Hay que considerar los factores que pudiesen generar variaciones en el resultado, entre ellos el inóculo. Se recomienda un inóculo de 10^5 para bacterias y de 10^4 para levaduras. Un inóculo muy bajo 10^2 dará falsos positivos, mientras que uno alto 10^8 , dará falsos negativos. Aunado a esto, es importante tomar los inóculos de cultivos frescos que se encuentren en fase logarítmica (Cos et al., 2006).

3.2.3. Bioautografía

Este método es una variante del de difusión en agar, con la premisa de que el extracto crudo al que se le evaluarán las propiedades antimicrobianas, es colocado sobre una placa de cromatografía en capa fina (CCF), posteriormente es eluído con una mezcla apropiada de solventes, permitiendo la separación de los diferentes componentes del extracto (Ncube et al., 2008). La CCF es un método ideal para la separación de compuestos naturales debido a que después de eluir la cromatografía se evapora el solvente, evitando así la posible actividad de el mismo (Cretu & Morlock, 2014; Jesionek, Choma, Majer-Dziedzic & Malinowska, 2014)

La bioautografía es empleada como una técnica preliminar de tamizaje fitoquímico, para detectar compuestos que afectan las tasas de crecimiento de microorganismos en mezclas y matrices complejas, como los extractos de plantas (Choma & Jesionek, 2015), se conoce como purificación guiada por bioensayos (Schmourlo, Mendonça-Filho, Alviano & Costa, 2005). Esta técnica tiene un gran número de ventajas ya que simplifica el proceso de aislamiento e identificación de compuestos antimicrobianos a partir de extractos crudos, utiliza relativamente muy poca cantidad de muestra, lo cual es ideal cuando se trabaja con extractos de plantas, además da una idea precisa de la polaridad de los compuestos activos (Runyoro, Matee, Ngassapa, Joseph & Mbwambo, 2006); es un ensayo práctico, fácil de realizar y es sumamente reproducible, una vez que se ha estandarizado la técnica (Silva, Simas, Batista, Cardarelli & Tomassini, 2005).

Los métodos bioautográficos son divididos principalmente en tres categorías (Dewanjee, Gangopadhyay, Bhattacharya, Khanra & Dua, 2015):

- a) Bioautografía por contacto.
- b) Bioautografía directa.
- c) Bioautografía por inmersión o por superposición de agar.

Hay que considerar que antes, se debe seleccionar la fase móvil que proporcione mayor separación de los componentes del extracto con el fin de poder realizar la identificación del compuesto responsable con mayor facilidad.

3.2.3.1. *Bioautografía por contacto*

En este método se deben preparar placas Petri con agar Mueller Hinton (MH), posteriormente, la placa cromatográfica previamente eluída y sin restos de solventes, se coloca «cara abajo» sobre el agar inoculado con la cepa de interés, una vez colocada se debe permitir que los compuestos separados difundan hacia el agar, por lo que es recomendable mantener la CCF sobre el agar por 2 h. Después de esto, el cromatograma es retirado y la placa Petri será incubada considerando las condiciones óptimas de crecimiento del microorganismo. Transcurrido el tiempo de incubación, la actividad antimicrobiana se evidencia mediante la aparición una zona de inhibición del crecimiento sobre la superficie del agar en el lugar donde el o los compuestos antimicrobianos estuvieron en contacto con la capa de agar (Horváth et al., 2010).

3.2.3.2. *Bioautografía directa*

En este método, la cromatografía en capa delgada previamente eluída y sin restos de solventes, es sumergida en una suspensión del microorganismo de interés, el cual se encuentra en crecimiento activo y en un caldo de cultivo apropiado (Queiroz, Wolfender, Atindehou, Traore & Hostettmann, 2002), posteriormente la bioautografía se incuba en una cámara húmeda y bajo las condiciones apropiadas para el desarrollo del microorganismo utilizado, esto permitirá que la sílica cubierta con el caldo de cultivo sirva de soporte y permita el crecimiento del microorganismo directamente sobre la CCF. Después del tiempo de incubación se observan las zonas donde no hay crecimiento, las

cuales corresponden a los compuestos antimicrobianos buscados (Choma & Grzelak, 2011).

3.2.3.3. Bioautografía por inmersión o por superposición de agar

Esta técnica es una combinación de la bioautografía por contacto y la bioautografía directa. En esta el cromatograma es cubierto con una capa de agar MH previamente inoculado, hay que considerar que el agar debe estar aproximadamente a 45 °C al momento de inocularlo para evitar inactivar al microorganismo en cuestión. Posteriormente, la placa cubierta con agar es incubada en cámara húmeda durante el tiempo y la temperatura apropiada, después de esto, zonas claras sobre la placa de CCF indican la actividad antimicrobiana de los componentes (Figura 3) (Marston, 2011).

Estandarización de las técnicas.

Estas técnicas, aunque fáciles de realizar, presentan algunos inconvenientes, sobre todo en la estandarización de las mismas, varios factores importantes deben ser considerados: la fase móvil apropiada para conseguir la mejor separación de los componentes del extracto, la cual debe ser establecida con anterioridad (Horváth et al., 2010); el tiempo de contacto de la cromatoplaque y el agar inoculado, ya que suele ser muy variable con los diferentes extractos, por lo que hay que realizar una serie de ensayos para minimizar este problema. También es importante considerar que en algunas ocasiones el contacto de la placa cromatográfica con el agar

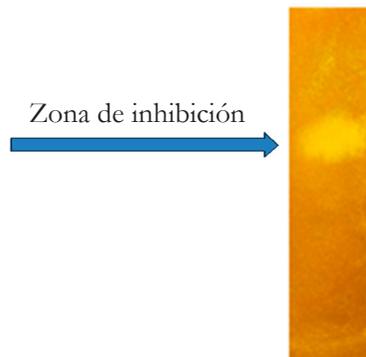


Figura 3. Zona de inhibición producida por un componente antimicrobiano en una bioautografía

no es completamente eficiente y en otras ocasiones la sílica de la cromatoplaca puede desprenderse del soporte y caer sobre la superficie del agar, además existe el problema ocasionado por la polaridad de los compuestos separados, ya que se debe considerar que entre menos polares sean estos compuestos, menor será su difusión (Dewanjee et al., 2015). Además, existen reportes que sugieren que al momento de separar los componentes de un extracto mediante CCF, puede ocasionar la interrupción de sinergismo entre los componentes activos del extracto reduciendo de este modo su actividad (Schmourlo et al., 2005).

Rios, Recio y Villar (1988) mencionan que en estas técnicas influyen diversos factores como la composición del medio de cultivo, el pH y la solubilidad del extracto en el medio de cultivo utilizado en la bioautografía, por lo que puede resultar difícil la estandarización de estos métodos debido a la diferencia existente entre los diversos extractos de plantas (Figura 4).

Basándonos en lo anterior se destaca la importancia de estandarizar las técnicas bioautográficas, ya que mucha de la literatura menciona que aunque presentan inconvenientes, son técnicas especialmente diseñadas para la detección selectiva de compuestos con actividad antimicrobiana (Nagy, Kocsis, Kőszegi & Botz, 2002).

Como parte de la estandarización de las técnicas bioautográficas, es de suma importancia considerar el inóculo del microorganismo de interés, y para esto la literatura señala que lo más recomendable es trabajar con 1×10^6 UFC/mL en

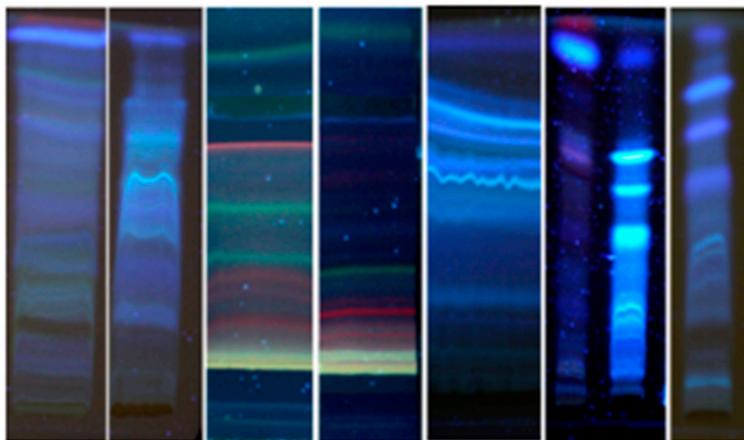


Figura 4. CCF de diferentes extractos de plantas observados con luz UV

el caso de bacterias y para el caso de hongos filamentosos 1×10^6 conidias/mL (Schmourlo et al., 2005).

Para facilitar la observación de las zonas de inhibición es recomendable utilizar indicadores de actividad enzimática microbiana, por lo general se utilizan sales de tetrazolio (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol; MTT), estas sales detectan la actividad deshidrogenasa de microorganismos vivos, los cuales las transforman en un compuesto altamente coloreado llamado formazán, por lo que las zonas de inhibición incoloras, contrastan con el fondo purpura intenso (Silva et al., 2005). Otro colorante altamente utilizado es la resazurina (7-Hidroxi-3H-fenoxazina-3-ona 10-óxido), el cual detecta la viabilidad celular en respuesta a una reducción química del medio, dicha reducción provoca que el indicador que es de color azul intenso, cambie a su forma reducida, quedando un color rosa, observándose fácilmente las zonas de inhibición de color azul (Figura 5).

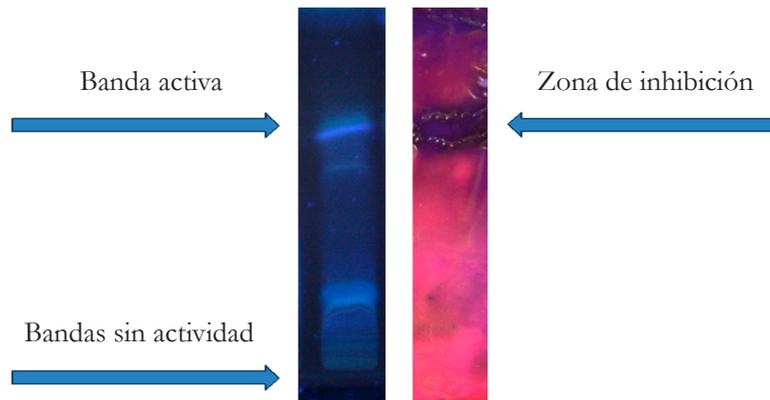


Figura 5. Bioautografía revelada con resazurina, mostrando las zona de inhibición

3.2.4. Cromatografía en columna

Los compuestos con actividad antimicrobiana detectados mediante estas técnicas bioautográficas, pueden ser obtenidos en cantidades suficientes para realizar evaluaciones espectroscópicas, con las cuales se podrá caracterizar el compuesto responsable de la actividad antimicrobiana (Choma & Jesionek, 2015). Para esto, se puede utilizar la cromatografía en columna mediante la cual el extracto se separa obteniendo diferentes fracciones (Figura 6).

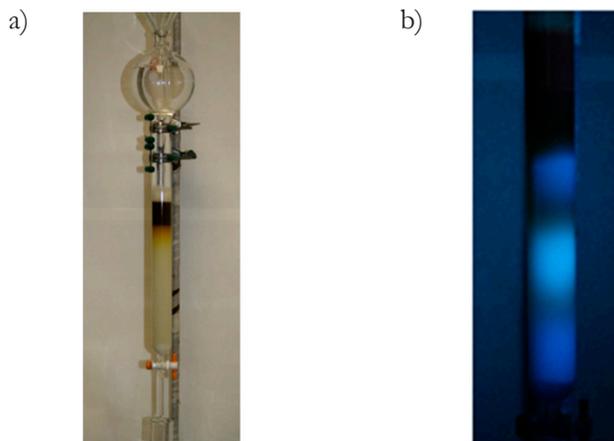


Figura 6. Separación de los compuestos por cromatografía en columna
a) Observada al visible; b) Observada con luz UV

Posteriormente las fracciones obtenidas «semipuras» son separadas mediante la cromatografía en capa preparativa (2.5 mm de espesor), donde se coloca el extracto a lo largo de toda la base de la placa, para eluirlo con el sistema de solventes utilizados en la CCF, después del desarrollo de la cromatografía, las bandas del compuesto antimicrobiano son raspadas y lavadas con el solvente apropiado, posteriormente el solvente se evapora y el compuesto es colocado en viales ámbar para su posterior análisis (Figura 7) (Móricz, Fornal, Jesionek, Majer-Dziedzic & Choma, 2015), por métodos espectroscópicos (UV, IR, RMN, CG-EM) y la toxicidad de los compuestos activos.

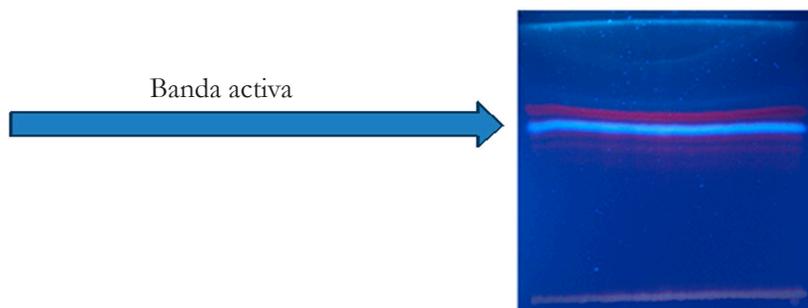


Figura 7. Cromatografía en capa preparativa de la fracción activa mostrando el compuesto con actividad antimicrobiana, seleccionado de acuerdo a la autobiografía

Nombre científico	Técnica utilizada	Microorganismo	Referencia
<i>Thymus vulgaris</i> <i>Lavandula angustifolia</i> <i>Eucalyptus globulus</i> <i>Mentha spicata</i> <i>Cinnamomum</i> <i>Zeylanicum</i>	Bioautografía Directa	<i>Staphylococcus saprophyticus</i> <i>Bacillus cereus</i> <i>Pseudomonas</i> <i>Syringae</i> <i>Micrococcus lysodeikticus</i>	(Horváth et al., 2010)
<i>Hypericum perforatum</i>	Aislamiento por cromatografía preparativa	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Escherichia coli</i>	(Jesionek et al., 2014)
<i>Chelidonium majus</i>	Bioautografía Directa Aislamiento cromatografía preparativa	<i>B. subtilis</i> <i>E. coli</i>	(Móricz et al., 2015)
<i>Helichrysum italicum</i>	Concentración Mínima Inhibitoria	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Enterococcus faecalis</i>	(Ramirez & Marin, 2009)
<i>Achyranthes aspera</i>	Difusión en agar	<i>B. subtilis</i>	(Narayan, Kartik, Manoj & Singh, 2010)
<i>Nymphaea nouchali</i>	Difusión en disco en agar Concentración Mínima Inhibitoria por método microdilución/ colorimétrico	<i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Salmonella typhi</i> <i>Vibrio cholerae</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Candida albicans</i> <i>Penicillium</i> <i>Trichophyton mentagrophytes</i>	(Parimala & Shoba, 2014)
<i>Salvia indica</i>	Difusión en pozo en agar Concentración Mínima Inhibitoria	<i>Proteus vulgaris</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>E. coli</i> <i>S. aureus</i> ,	(Viswanad, Aleykutty, Jaykar, Zachariah & Thomas, 2011)
<i>Adansonia digitata</i> , <i>Hibiscus sabdarifa</i> , <i>Aframomum polyanthum</i> , <i>A. albobviolaceum</i> <i>Ocimum gratissimum</i>	Concentración Mínima Inhibitoria	<i>E. aerogenes</i> <i>K. pneumoniae</i> <i>Enterobacter cloacae</i> <i>P. aeruginosa</i>	(Djeussi et al., 2013)

Continúa

Continuación

Nombre científico	Técnica utilizada	Microorganismo	Referencia
<i>Rhus coriaria</i> <i>Sacropoterium spinosum</i> <i>Rosa damascena</i>	Método de microdilución Concentración Mínima Inhibitoria	<i>P. aeruginosa</i>	(Adwan, Abu-Shanab & Adwan, 2010)
<i>Melissa officinalis</i> , <i>Mentha piperita</i> , <i>Lauria nobilis</i> , <i>R. coriaria</i> , <i>Dianthus coryophyllum</i> , <i>Pippier nigrum</i> , <i>Capsicum annum</i>	Método en pozo en agar Concentración Mínima Inhibitoria	<i>B. subtilis</i> , <i>S. aureus</i> <i>S. epidermidis</i> <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> <i>C. albicans</i> <i>A. niger</i>	(Ertürk, 2006)
<i>Acacia arabica</i> , <i>Nymphaea lotus</i> <i>Sphareranthus hirtus</i> , <i>Emblica officinalis</i> , <i>Cinchorium intybus</i> <i>Cardua marianum</i>	Método en pozo en agar Concentración Mínima Inhibitoria Concentración Mínima Bactericida	<i>E. coli</i> , <i>S. typhi</i> , <i>P. aeruginosa</i>	(Hassan, Rahman, Deeba & Mahmud, 2009)
<i>Margaritaria discoidea</i> <i>Cajanus cajan</i> <i>Ziziphus abyssinica</i> <i>Combretum zeyheri</i> <i>P lectranthus barbatus</i>	Bioautografía por sobreposición en agar	<i>C. albicans</i>	(Runyoro et al., 2006)
<i>Ottonia martiana</i>	Técnica de difusión en papel filtro; Bioautografía con observación colorimétrica	<i>S. aureus</i> <i>Streptococcus mutans</i> <i>Streptococcus pyogenes</i> <i>E. coli</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>E. aerogenes</i>	(Machado et al., 2012)
<i>Scutellaria baicalensis</i> <i>Magnolia officinalis</i> , <i>Rubus chingii</i> , <i>Terminalia chebula</i> <i>Rabdosia rubescens</i>	Concentración Mínima Inhibitoria Concentración Mínima Bactericida Técnicas Espectrofotométricas	<i>Acinetobacter baumannii</i> <i>E. coli</i>	(Miyasaki et al., 2013)

Nombre científico	Técnica utilizada	Microorganismo	Referencia
<i>Xylopiya aethiopica</i> <i>Mitracarpus scaber</i> <i>Aframomum danielli</i> <i>Cinnamomum zeylanicum</i> <i>Albizia lebecke</i> <i>Baillonella toxisperma</i> <i>Fagara leprieuri</i>	Técnica de difusión en pozo en agar Concentración Mínima Inhibitoria Concentración Mínima Bactericida	<i>Trichophyton rubrum</i> <i>C. albicans</i> <i>S. saprophyticus</i> <i>S. epidermidis</i> <i>S. typhi</i> <i>S. aureus</i> <i>K. pneumonia</i> <i>E. coli</i>	(Njimoh et al., 2015)
<i>Acacia farnesiana</i>	Técnica de difusión en pozo en agar Concentración Mínima Inhibitoria Concentración Mínima Bactericida Cromatografía en columna	<i>V. cholerae</i>	(Sanchez, Heredia, Camacho-Corona & Garcia, 2013)
<i>Azadirachta indica</i>	Técnica de difusión en pozo en agar Técnicas espectrofotométricas	<i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> <i>Propionibacterium acnés</i>	(Nand, Drabu & Gupta, 2012)
<i>Lythrum salicaria</i>	Técnica de difusión en pozo en agar	<i>A. baumannii</i> <i>P. aeruginosa</i>	(Guclu, Genc, Zengin & Karabay, 2014)

Tabla 1. Plantas con la actividad antimicrobiana evaluada por diferentes técnicas

3.3. Conclusión

La metodología para determinar la actividad antimicrobiana de extractos de plantas es muy variada y aporta información muy valiosa para la búsqueda preliminar de extractos o compuestos con propiedades antimicrobianas. Es importante tomar en cuenta los factores que pueden causar variaciones en los resultados, de ahí la importancia de la estandarización de los métodos y de las recomendaciones realizadas en métodos ya estandarizados. Las condiciones específicas utilizadas durante el desarrollo del método aseguran la reproducibilidad de los resultados, que son de suma importancia para evaluar la actividad antimicrobiana. Hay que

considerar algunos factores que son decisivos para obtener resultados reproducibles y exactos, desde el método de extracción, solventes utilizados, medios de cultivo, cantidad de inóculo, uso correcto de controles; esto nos permitirá descartar algunos errores sistemáticos durante la realización de las evaluaciones que pudieran arrojar falsos positivos o negativos.

Referencias

- Adwan, G., Abu-Shanab, B., & Adwan, K. (2010). Antibacterial activities of some plant extracts alone and in combination with different antimicrobials against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 3(4), 266-269. [http://dx.doi.org/10.1016/S1995-7645\(10\)60064-8](http://dx.doi.org/10.1016/S1995-7645(10)60064-8)
- Bakht, N., Humaira, F., Madiha, A., & Haq, I.U. (2015). Recent Trends and Methods in Antimicrobial Drug Discovery from Plant Sources. *Austin J Microbiol.*, 1(1), 1002.
- Bauer, A.W., Kirby, W.M., Sherris, J.C., & Turck, M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*, 45(4), 493-496. [http://doi.org/10.1016/S0305-4179\(78\)80006-0](http://doi.org/10.1016/S0305-4179(78)80006-0)
- Burgess, J.G., Jordan, E.M., Bregu, M., Mearns-Spragg, A., & Boyd, K.G. (1999). Microbial antagonism: a neglected avenue of natural products research. *Journal of Biotechnology*, 70(1), 27-32. [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1656\(99\)00054-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1656(99)00054-1)
- Choma, I., & Jesionek, W. (2015). TLC-Direct Bioautography as a High Throughput Method for Detection of Antimicrobials in Plants. *Chromatography*, 2(2), 225-238. <http://doi.org/10.3390/chromatography2020225>
- Choma, I.M., & Grzelak, E.M. (2011). Bioautography detection in thin-layer chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1218(19), 2684-2691. <http://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.12.069>
- Cos, P., Vlietinck, A.J., Berghe, D.V., & Maes, L. (2006). Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger *in vitro* «proof-of-concept». *Journal of Ethnopharmacology*, 106(3), 290-302. <http://doi.org/10.1016/j.jep.2006.04.003>

- Cowan, M.M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews*, 12(4), 564-82. [http://doi.org/0893-8512/99/\\$04.0010](http://doi.org/0893-8512/99/$04.0010)
- Cretu, G.C., & Morlock, G.E. (2014). Analysis of anthocyanins in powdered berry extracts by planar chromatography linked with bioassay and mass spectrometry. *Food Chemistry*, 146, 104-112. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.09.038>
- Dewanjee, S., Gangopadhyay, M., Bhattacharya, N., Khanra, R., & Dua, T.K. (2015). Bioautography and its scope in the field of natural product chemistry. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 5(2), 75-84. <http://doi.org/10.1016/j.jpha.2014.06.002>
- Djeussi, D.E., Noumedem, J.A., Seukep, J.A., Fankam, A.G., Voukeng, I.K., Tankeo, S.B. et al. (2013). Antibacterial activities of selected edible plants extracts against multidrug-resistant Gram-negative bacteria. *BMC complementary and alternative medicine*, 13(1), 164. <http://doi.org/10.1186/1472-6882-13-164>
- Ertürk, Ö. (2006). Antibacterial and antifungal activity of ethanolic extracts from eleven spice plants. *Biologia*, 61(3), 275-278. <http://doi.org/10.2478/s11756-006-0050-8>
- Guclu, E., Genc, H., Zengin, M., & Karabay, O. (2014). Antibacterial Activity of *Lythrum salicaria* against Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Annual Research & Review in Biology*, 4(7), 1099-1105. <http://dx.doi.org/10.9734/ARRB/2014/7357>
- Hassan, A., Rahman, S., Deeba, F., & Mahmud, S. (2009). Antimicrobial activity of some plant extracts having hepatoprotective effects. *Journal of Medicinal Plants Research*, 3(1), 20-23.
- Horváth, G., Jám bor, N., Végh, A., Böszörményi, A., Lemberkovic, É., Héthelyi, É. et al. (2010). Antimicrobial activity of essential oils: the possibilities of TLC-bioautography. *Flavour and fragrance journal*, 25(3), 178-182. <http://dx.doi.org/10.1002/ffj.1993>
- Jesionek, W., Choma, I.M., Majer-Dziedzic, B., & Malinowska, I. (2014). Screening bacterial and radical scavenging properties of chosen plant extracts using thin-layer chromatography-direct bioautography. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 37(20), 2882-2891. <http://dx.doi.org/10.1080/10826076.2014.907103>

- Klančnik, A., Piskernik, S., Jeršek, B., & Možina, S.S. (2010). Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts. *Journal of microbiological methods*, 81(2), 121-126. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2010.02.004>
- Lee, K.-M., Kim, W.-S., Lim, J., Nam, S., Youn, M., Nam, S.-W. et al. (2009). Antipathogenic properties of green tea polyphenol epigallocatechin gallate at concentrations below the MIC against enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of food protection*, 72(2), 325-331.
- Machado, M., Garcia, C., De, C.P., Cristina, L., Dallarmi, M., Sanquetta, O.G., & Roberto, C. (2012). Bioautography to assess antibacterial activity of *Ottonia martiana* Miq. (Piperaceae) on the human oral microbiota. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, 33(4), 515-519.
- Marston, A. (2011). Thin-layer chromatography with biological detection in phytochemistry. *Journal of Chromatography A*, 1218(19), 2676-2683. <http://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.12.068>
- Miyasaki, Y., Rabenstein, J.D., Rhea, J., Crouch, M.-L., Mocek, U.M., Kittell, P.E. et al. (2013). Isolation and characterization of antimicrobial compounds in plant extracts against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *PloS one*, 8(4), e61594. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0061594>
- Móricz, Á.M., Fornal, E., Jesionek, W., Majer-Dziedzic, B., & Choma, I.M. (2015). Effect-directed isolation and identification of antibacterial *Chelidonium majus* L. alkaloids. *Chromatographia*, 78(9-10), 707-716. <http://dx.doi.org/10.1007/s10337-015-2870-6>
- Nagy, S., Kocsis, B., Kószegi, T., & Botz, L. (2002). Optimization of conditions for culture of the test bacteria used for direct bioautographic detection. 1. The gram-positive test bacterium *Bacillus subtilis*. *JPC-Journal of Planar Chromatography-Modern TLC*, 15(2), 132-137. <http://dx.doi.org/10.1556/JPC.15.2002.2.9>
- Nand, P., Drabu, S., & Gupta, R.K. (2012). Insignificant anti-acne activity of *Azadirachta indica* leaves and bark. *Journal of Pharmaceutical Negative Results*, 3(1), 29-33. <http://dx.doi.org/10.4103/0976-9234.99650>

- Narayan, G.R., Kartik, V., Manoj, P., & Singh, P.S. (2010). Antibacterial activities of ethanolic extracts of plants used in folk medicine. *IJRAP*, 1(2), 529-535.
- Ncube, N.S., Afolayan, A.J., & Okoh, A.I. (2008). Assessment techniques of antimicrobial properties of natural compounds of plant origin: current methods and future trends. *Journal of Biotechnology*, 7(12), 1797-1806. <http://dx.doi.org/10.5897/ajb07.613>
- Negróni, M. (2000). *Microbiología estomatológica*. Ed. Médica Panamericana.
- Njimoh, D.L., Assob, J.C. N., Mokake, S.E., Nyhalah, D.J., Yinda, C.K., & Sandjon, B. (2015). Antimicrobial Activities of a Plethora of Medicinal Plant Extracts and Hydrolates against Human Pathogens and Their Potential to Reverse Antibiotic Resistance. *International journal of microbiology*, 2015, 547156. <http://doi.org/10.1155/2015/547156>
- Palomino, J., Martín, A., Camacho, M., Guerra, H., Swings, J., & Portaels, F. (2002). Resazurin Microtiter Assay Plate: Simple and Inexpensive Method for Detection of Drug Resistance in Mycobacterium tuberculosis Resazurin Microtiter Assay Plate: Simple and Inexpensive Method for Detection of Drug Resistance in Mycobacterium tuberculosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(8), 2720-2722. <http://doi.org/10.1128/AAC.46.8.2720>
- Parimala, M., & Shoba, F.G. (2014). *In vitro* antimicrobial activity and HPTLC analysis of hydroalcoholic seed extract of *Nymphaea nouchali* Burm. f. *BMC complementary and alternative medicine*, 14(1), 361. <http://doi.org/10.1186/1472-6882-14-361>
- Queiroz, E.F., Wolfender, J.-L., Atindehou, K.K., Traore, D., & Hostettmann, K. (2002). On-line identification of the antifungal constituents of *Erythrina vogelii* by liquid chromatography with tandem mass spectrometry, ultraviolet absorbance detection and nuclear magnetic resonance spectrometry combined with liquid chromatographic micro-fractionation. *Journal of Chromatography A*, 974(1), 123-134. [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673\(02\)01224-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673(02)01224-4)
- Ramírez, L., & Marin, D. (2009). Metodología para evaluar *in vitro* la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. Methodologies for evaluating the *In vitro* antibacterial activity of natural compounds of plant origin. *Scientia et Technica*, 42, 263-268.

- Rios, J.L., Recio, M.C., & Villar, A. (1988). Screening methods for natural products with antimicrobial activity: a review of the literature. *Journal of ethnopharmacology*, 23(2), 127-149. [http://dx.doi.org/10.1016/0378-8741\(88\)90001-3](http://dx.doi.org/10.1016/0378-8741(88)90001-3)
- Runyoro, D.K.B., Matee, M.I.N., Ngassapa, O.D., Joseph, C.C., & Mbwambo, Z.H. (2006). Screening of Tanzanian medicinal plants for anti-Candida activity. *BMC complementary and alternative medicine*, 6, 11. <http://doi.org/10.1186/1472-6882-6-11>
- Sanchez, E., Heredia, N., Camacho-Corona, M.D.R., & Garcia, S. (2013). Isolation, characterization and mode of antimicrobial action against *Vibrio cholerae* of methyl gallate isolated from *Acacia farnesiana*. *Journal of Applied Microbiology*, 115(6), 1307-1316. <http://doi.org/10.1111/jam.12328>
- Schmourlo, G., Mendonça-Filho, R.R., Alviano, C.S., & Costa, S.S. (2005). Screening of antifungal agents using ethanol precipitation and bioautography of medicinal and food plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 96(3), 563-568. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2004.10.007>
- Silva, M.T.G., Simas, S.M., Batista, T.G.F.M., Cardarelli, P., & Tomassini, T.C.B. (2005). Studies on antimicrobial activity, *in vitro*, of *Physalis angulata* L.(Solanaceae) fraction and physalin B bringing out the importance of assay determination. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 100(7), 779-782. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762005000700018>
- Taroco, R., Seija, V., & Vignoli, R. (2006). Métodos de estudio de la sensibilidad antibiótica. *Temas de bacteriología y Virología Médica*, (Cim), 663-672.
- Viswanad, V., Aleykutty, N.A., Jaykar, B., Zachariah, S.M., & Thomas, L. (2011). Studies on antimicrobial and antioxidant activity of methanolic extract of *Saundersia indica*. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 11, 59-64.