

Evaluación de la actividad antidiarreica y antibacteriana de los extractos de la semilla de palto (*Persea americana*) y buganvilla (*Bougainvillea glabra*)

Evaluation of the activity antibacterial and anti-diarrhoeal of extracts seed of avocado (*Persea americana*) and Bougainvillea (*Bougainvillea glabra*)

Max Linder Escobar Hinojosa¹, Jhenny Pinto Davalos², Silvia Zabalaga Via², Adolfo Escalante Lunario², Zulema Bustamante Garcia²

¹ Programa de Fármacos Alimentos y Cosméticos, Facultad de Bioquímica y Farmacia, Universidad Mayor de San Simón. Cochabamba, Bolivia.

² Facultad de Bioquímica y Farmacia, Universidad Mayor de San Simón. Cochabamba, Bolivia.

Dirección para correspondencia: Max Linder Escobar Hinojosa, Programa de Fármacos Alimentos y Cosméticos, Facultad de Bioquímica y Farmacia, Universidad Mayor de San Simón. Av. Aniceto Arce frente al Parque la Torre, Cochabamba Bolivia.

E mail: marck144@gmail.com

Recibido para publicación en 10/08/10

Aceptado en 15/12/10

RESUMEN

La incidencia de pacientes con diarreas de etiología bacteriana en nuestro país se ha incrementado en los últimos años y la medicina tradicional utiliza diferentes plantas medicinales para tratar estas infecciones, entre las cuales se encuentran la *Bougainvillea glabra*, también conocida como buganvilla, y la *Persea americana*, conocida como palto. Estas plantas se encuentran principalmente en zonas templadas y cálidas de toda Bolivia. La parte utilizada de buganvilla son las hojas que se utilizan como antiinflamatorias, antidiarreicas y para reducir la acidez del estómago; y las de semilla de palto se usan como antidiarreicas. En el presente estudio se evaluó la actividad antibacteriana y antidiarreica de los extractos de *B. glabra* y *P. americana* frente a cepas ATCC de *Escherichia coli*, *Shigella dysenteriae* y *Salmonella typhimurium*. La actividad antibacteriana fue evaluada mediante la prueba de sensibilidad por la técnica de difusión en doble capa; la prueba de la actividad antidiarreica fue evaluada a través de pruebas por inducción bacteriana que producen diarrea en ratas de la cepa Winstar. Los resultados muestran que el extracto etanólico de las hojas de buganvilla presenta actividad antibacteriana y antidiarreica a una concentración de 0.763 gr/Kg peso,

contra *Escherichia coli* y el extracto de la semilla de palto a una concentración de 0.688 gr/kg peso, contra *Escherichia coli*, *Shigella dysenteriae* y *Salmonella typhimurium*. Así también se determinó que los compuestos responsables de la actividad antibacteriana y antidiarreica son principalmente taninos y flavonoides, presentes tanto en hojas de buganvilla y semilla de palto. **Palabras Clave:** Actividad antidiarreica, antibacteriana, palto, buganvilla.

ABSTRACT

The incidence of patients with diarrheas with bacterial etiology has increased in recent years in our country. This is an experimental work because the protocol established continued and they were tested in vitro and in vivo test. The *Bougainvillea glabra*, also known as buganvilla, and *Persea Americana*, also known as avocado, are plants that are found mainly in temperate and warm throughout Bolivia. The leaves of the buganvilla are used in traditional way as anti-inflammatory, antidiarrhoeal and to reduce acidity of the stomach. Seed of avocado is used as antidiarrhoeal. In the present study the antibacterial activity of extracts was evaluated against ATCC strains of *Escherichia coli*, *Shigella dysenteriae* and *Salmonella typhimurium*.

This antibacterial activity was evaluated by susceptibility testing by the technique of modified double-layer diffusion; the conviction of antidiarrhoeal activity was evaluated by testing for bacteria that cause diarrhea induction. The results show that the ethanol extract from leaves of *Bougainvillea* at a concentration of 0.763 g/kg weight, has antidiarrhoeal and antibacterial activity against *Escherichia coli* and the seed extract of avocado to a concentration of 0.688 g/kg against *Escherichia coli*, *Shigella dysenteriae* and *Salmonella typhimurium*. So also found that the compounds responsible for the antibacterial and antidiarrhoeal are tannins and flavonoids present in leaves of *bougainvillea* and avocado seed.

Key Words: Activity antidiarrhoeal, antibacterial, avocado, *bougainvillea*.

INTRODUCCIÓN

Desde hace mucho tiempo, se considera a la diarrea como uno de los problemas sanitarios más importantes de los países en vías de desarrollo. A nivel mundial es la causa de la muerte de 5-8 millones de niños menores de 5 años. De acuerdo con los cálculos de la OMS correspondientes al año 2006, hubo alrededor de 7,1 millones de muertes a causa de la diarrea.¹

En Bolivia, cada año mueren 15 mil niños menores de cinco años por causas que pueden ser razonablemente prevenibles y relativamente superables como las diarreas, la desnutrición y la pobreza extrema.²

El Ministerio de Salud reporta que en Cochabamba se produce anualmente más de 116.775 casos de diarreas y en el municipio de Cercado se reportan cerca de 41.793 casos de diarreas.³

La falta de asistencia médica básica, la insuficiente y mala alimentación, la ausencia de condiciones mínimas de salubridad e higiene, la desnutrición materna, la carencia de servicios básicos como agua potable y alcantarillado y los crecientes niveles de pobreza e indigencia son los principales factores explicativos asociadas a la muerte por diarrea en Bolivia.⁴

Entre los principales agentes causantes de diarreas, se encuentra el rotavirus y bacterias como *Escherichia coli* *diarreogénica*, *Shigella dysenteriae* y *Salmonella typhimurium*.

La medicina tradicional desde la antigüedad utiliza recursos naturales para solucionar estas infecciones. Bolivia presenta una gran diversidad de plantas medicinales, todas las culturas tienen su propia medicina desde las selvas amazónicas a los nevados andinos, estas zonas cobijan una amplia gama de etnias y culturas indígenas que supieron adaptarse a su medio, nutrirse correctamente y curar sus propias dolencias mediante siglos de conocimiento, sin embargo estas plantas medicinales no fueron validadas por lo que es importante conocer el potencial antibacteriano in vitro e

in vivo de plantas utilizadas en la medicina tradicional boliviana.⁵

Entre la diversidad de plantas medicinales utilizadas para las diarreas, se encuentran las hojas de buganvilla (*B. glabra*) y la semilla de palto (*P. americana*), objetos de esta investigación. Ellas serán evaluadas para determinar la actividad antibacteriana in vitro y la actividad antidiarreica in vivo de los extractos etanólicos de hojas de buganvilla y semilla de palto, sobre bacterias Gram (-)

MATERIAL Y METODOS

La metodología utilizada para este trabajo de investigación es de tipo analítico experimental.

El trabajo se realizó con las hojas de buganvilla (*Bougainvillea glabra*) y semilla de palto (*Persea americana*), que fueron recolectadas del valle Alto provincia Punata del Departamento de Cochabamba.

Las cepas utilizadas para la evaluación de la actividad antibacteriana in vitro fueron *Escherichia coli* *diarreogénica*, *Shigella dysenteriae* y *Salmonella typhimurium*.

Para las pruebas in vivo de actividad antidiarreica, se utilizaron ratas de la cepa Winstar.

Los métodos utilizados fueron los siguientes

Preparación de los extractos de hojas de buganvilla y semilla de palto. Para la preparación de los extractos se utilizó el método de maceración. El solvente utilizado fue etanol: agua en una relación de (7:3). La relación de la maceración de la materia solvente fue de 1:10, se dejó en reposo por 48 horas, pasado este tiempo se procedió al filtrado en papel filtro y un embudo previamente lavado con alcohol al 70 %. Se concentró el extracto filtrado en el rotaevaporador marca (FISALOM) a temperatura de 40 – 45 °C hasta la cuarta parte del volumen original y se conservó el extracto en el refrigerador a una temperatura de 8° C, para posteriormente realizar los sólidos totales.

Sólidos totales. Se determinó el porcentaje de humedad por el método gravimétrico, secando las muestras en estufa (FANEM) con circulación de aire hasta peso constante. Con estos datos se calcularon los sólidos totales con la siguiente formula:

$$ST = 100 - \% \text{ Humedad}$$

Determinación de la actividad antibacteriana. La evaluación antibacteriana se realizó siguiendo la técnica descrita por Kirby Bauer. Es una técnica que permite ensayar diferentes dosis de extractos sobre cepas bacterianas, en la que puede observarse la formación o no de halos de inhibición empleando el método de Difusión radial en medio agarizado de doble capa.

Determinación de la actividad antidiarreica (estandarización de la técnica). La determinación de la

actividad antidiarreica se realizó empleando procedimientos in vivo utilizando ratas albinas Wistar, cepa Novergicus rattus de 180 a 200 g. de peso. Antes de comenzar con las pruebas, los animales se mantuvieron en ayunas durante 24 horas, dejándolos únicamente con agua ad libitum. De acuerdo al método descrito por Edwin⁶

El material biológico se distribuyó en lotes de 3 animales de la siguiente forma:

Lote 1 Blanco: Tratado únicamente con el vehículo, agua destilada

Lote 2 Problema: Tratado con los extractos etanólicos de las hojas de buganvilla en una concentración 0.763 gr/Kg peso y semilla de palto a una concentración 0.688 gr/kg de peso. Para causar la diarrea se procedió primero con la estandarización de la técnica empleando las siguientes bacterias: *Escherichia coli* diarreogénica, *Shigella dysenteriae* y *Salmonella typhimurium*.

La dosificación de las cepas se realizó de acuerdo a la dosis infectante de cada una de las bacterias: *Escherichia coli* 10^8 UFC/ml, para *Salmonella* 10^5 - 10^8 UFC/ml y para *Shigella* 10^3 UFC/ml, la dosificación se realizó con la ayuda de la escala de Marc Farland.⁷

Se administró 2ml de esta solución a cada una de las ratas con la ayuda de una sonda Nasogástrica. Se observaron las deposiciones y se analizaron la consistencia de las heces.

Una vez producida la diarrea se administraron los extractos, previamente dosificados, según el peso corporal de las ratas.

Screening fitoquímico. La marcha fitoquímica permitió identificar los metabolitos secundarios presentes en las plantas según el método descrito por Olga Lock de Ugaz.^{3, 8}

RESULTADOS

Pruebas antibacterianas. Los resultados de la prueba cualitativa antibacteriana del extracto etanólico de buganvilla mostraron actividad frente a *Escherichia coli*, y el extracto de semilla de palto presentó actividad antibacteriana frente a *Escherichia coli*, *Shigella dysenteriae*, *Salmonella typhimurium*.

En relación a la Concentración Inhibitoria Mínima del extracto etanólico de hojas de buganvilla y semilla de palto frente a *Escherichia coli*, los resultados fueron los siguientes: 7.25×10^{-3} mg/ml hojas de buganvilla, 0.344 mg/ml semilla de palto, mostrando mayor actividad antibacteriana en las hojas de buganvilla (Ver Fotografías 1 y 2)



Fotografía 1. Concentración Inhibitoria Mínima del extracto etanólico de hojas de buganvilla frente a *E. coli*.



Fotografía 2. Concentración Inhibitoria Mínima del extracto etanólico de la semilla de Palto frente a *E. coli*.

La Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) del extracto etanólico de la semilla de palto frente a *Shigella dysenteriae*, fue de 0.344 mg/ml. No se determinó la CIM de la buganvilla porque no presentó actividad antibacteriana en la prueba preliminar.

La CIM del extracto etanólico de semilla de palto frente a *Salmonella typhimurium*, demostró presencia de actividad antibacteriana, con un resultado de 0.689 mg/ml. No se determinó la CIM de la buganvilla porque no presentó actividad antibacteriana en la prueba preliminar.

Pruebas antidiarreicas. El tratamiento con el extracto etanólico a una concentración de 0.763 gr/Kg peso buganvilla frente a *Escherichia coli*, presentó actividad antidiarreica, puesto que durante las primeras horas se observó 80 deposiciones líquidas, para normalizarse a partir de la séptima hora. Por su parte el blanco mostró un promedio de 120 deposiciones durante las 7 primeras horas. (Ver Tabla 1 y Fotografías 3 y 4.)

Tabla 1. Datos del número y consistencia de la heces del grupo control y del grupo con el tratamiento del extracto etanólico de buganvilla.

TRATAMIENTO	DOSIS DE UFC/ml	DOSIS (mg/kg)	NÚMERO DE HECES ACUOSAS EN EL TIEMPO 7hrs	TIEMPO TRANSCURRIDO HASTA LA PRIMERA DEFECACIÓN NORMAL
Control	12 x 10 ⁸ /ml	-----	120	Mayor a 7 hrs
E. Etanólico de buganvilla	-----	0.763	80	6hrs:45min

**Fotografía 3. Defecaciones diarreas****Fotografía 4. Primeras defecaciones normales**

En la Fotografía 3 se muestra la deposición líquida de los animales del grupo blanco y en la Fotografía 4 el efecto antidiarreico después de la administración del extracto.

Para la interpretación de estos resultados se realizó un análisis estadístico de comparación de medias

Tabla 2. Análisis estadístico de la comparación de medias del extracto de buganvilla.

	Tipo	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
Cuento	Control 1	3	120,00	5,568	3,215
	Extracto 1	3	80,33	6,028	3,480

Tabla 3. Prueba T para la igualdad de medias del extracto de buganvilla

T	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error típ. de la diferencia	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
					Inferior	Superior
8,373	4	,001	39,67	4,738	26,513	52,820
8,373	3,975	,001	39,67	4,738	26,480	52,853

Las hipótesis planteadas para la comparación de medias fueron:

- 1.- Hipótesis Nula plantea: Las medias son iguales
 - 2.- Hipótesis Alterna plantea: Las medias son diferentes
- Analizando el valor del sig que es menor a 0.05, se asume que las medias son diferentes, por lo tanto existe actividad antidiarreica del extracto en comparación con el blanco.

El tratamiento con el extracto etanólico a una concentración de 0.688 gr/Kg peso de semilla de palto frente a *Escherichia coli*, presentó actividad antidiarreica, puesto que durante las 7 primeras horas se observó 90 deposiciones líquidas, normalizándose posteriormente. El grupo control presentó un promedio de 116 deposiciones líquidas por más de 7 hrs. Tabla 4.

Tabla 4. Datos del número y consistencia de la heces del grupo control y del grupo con el tratamiento del extracto etanólico de semilla de Palto.

TRATAMIENTO	DOSIS DE UFC/ml	DOSIS (mg/kg)	NÚMERO DE HECES ACUOSAS EN EL TIEMPO 7hrs	TIEMPO TRANSCURRIDO HASTA LA PRIMERA DEFECACIÓN NORMAL
Control	12 x 10 ⁸ /ml	-----	116	Mayor a 7 hrs
E. Etanólico de Semilla de Palto	-----	0.688	90	6hrs:45min

Para el análisis estadístico de estos resultados se utilizó un test de comparación de medias.

Tabla 5. Análisis estadístico de la comparación de medias del extracto etanólico de semilla de palto.

	Tipo	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
Conteo	Control 2	3	116,33	5,033	2,906
	Extracto 2	3	90,00	4,583	2,646

Tabla 6. Prueba T para la igualdad de medias del extracto de semilla de palto

T	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error típ. de la diferencia	95% Intervalo de confianza para la diferencia	Inferior	Superior
8,373	4	.003	26,33	3,930		15,422	37,245
8,373	3,975	,003	26,33	3,930		15,384	37,282

Las hipótesis fueron:

- 1.- Hipótesis Nula plantea: Las medias son iguales
 - 2.- Hipótesis Alterna plantea: Las medias son diferentes
- Analizando el valor del sig, se concluye que las medias son diferentes, mostrando actividad antidiarreica de la semilla de palto, en comparación con el grupo blanco.

Los resultados obtenidos de la semilla de palto frente a *Shigella dysenteriae* a una concentración de 0.688 gr/Kg peso mostraron actividad antidiarreica, obteniendo 102 deposiciones con consistencia líquida durante 7 hrs con 15 min, transcurrido este lapso de tiempo se normalizan las deposiciones fecales. El grupo blanco presentó un promedio de 125 deposiciones líquidas por más de 7 hrs. Tabla 7.

Tabla 7. Datos del número y consistencia de la heces del grupo control y del grupo con el tratamiento del extracto etanólico de semilla de palto.

TRATAMIENTO	DOSIS DE UFC/ml	DOSIS (mg/kg)	NÚMERO DE HECES ACUOSAS EN EL TIEMPO 7hrs	TIEMPO TRANSCURRIDO HASTA LA PRIMERA DEFECACIÓN NORMAL
Control	3 x 10 ⁸ /ml	-----	125	Mayor a 7 hrs
E. Etanólico de semilla de Palto	-----	0.688	102	7hrs:15min

Para la interpretación de estos resultados, se realizó un análisis estadístico de comparación de medias.

Tabla 8. Análisis estadístico de la comparación de medias del extracto etanólico de la semilla de palto

	Tipo	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
Conteo	Control 2	3	125,00	15,000	8,660
	Extracto 2	3	102,67	9,504	5,487

Tabla 9. Prueba T para la igualdad de medias del extracto de semilla de palto

T	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error típ. de la diferencia	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
					Inferior	Superior
8,373	4	,095	22,33	10,252	-6,132	50,798
8,373	3,975	,107	22,33	10,252	-8,301	52,968

Analizando el valor del sig, se concluye que las medias son iguales, mostrando que la actividad antidiarreica de la semilla de palto no es significativa, en comparación con el grupo blanco.

Los resultados obtenidos con la semilla de palto frente a *Salmonella typhimurium* a una concentración de 0.688

gr/Kg peso mostraron actividad antidiarreica, obteniendo 92 deposiciones fecales con una consistencia líquida durante 8 hrs con 15 min, transcurrido este lapso de tiempo se normalizan las deposiciones fecales. El grupo blanco presentó un promedio de 122 deposiciones líquidas por más de 7 hrs. Tabla 10.

Tabla 10. Datos del número y consistencia de la heces del grupo control y del grupo con el tratamiento del extracto etanólico de semilla de Palto.

TRATAMIENTO	DOSIS DE UFC/ml	DOSIS (mg/kg)	NÚMERO DE HECES ACUOSAS EN EL TIEMPO 7hrs	TIEMPO TRANSCURRIDO HASTA LA PRIMERA DEFECACIÓN NORMAL
Control	12 x 10 ⁸ /ml	-----	122	Mayor a 7 hrs
E. Etanólico de semilla de Palto	-----	0.688	92	8hrs:15min

Para la interpretación de estos resultados, se realizó un análisis estadístico de comparación de medias.

Tabla 11. Análisis estadístico de la comparación de medias del extracto etanólico de la semilla de palto.

	Tipo	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
Conteo	Control 2	3	125,00	15,000	8,660
	Extracto 2	3	102,67	9,504	5,487

Tabla 12. Prueba T para la igualdad de medias del extracto de semilla de Palto

T	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error típ. de la diferencia	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
					Inferior	Superior
8,373	4	,007	30,33	5,840	14,118	46,549
8,373	3,975	,011	30,33	5,840	12,719	47,948

Analizando el valor del sig, se concluye que las medias son diferentes, mostrando actividad antidiarreica de la semilla de palto, en comparación con el grupo blanco.

Para comparar la actividad antibacteriana entre los diferentes extractos se utilizo un test de anova.

Tabla 13. Anova prueba de comparación entre los extractos

	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	754,917	3	251,639	5,730	.022
Intra-grupos	351,333	8	43,917		
Total	1106,250	11			

El análisis de la varianza nos permitió comparar la actividad antidiarreica de los cuatro extractos con respecto a sus medias; como el valor de Sig. es menor a

0,05, las actividades antidiarreicas de los 4 extractos son diferentes, siendo mayor la actividad del extracto de buganvilla como se observa en la Tabla 14.

Tabla 14. Comparación de medias de los extractos 1,2,3 y 4

Tipo	N	Subconjunto para alfa = .05	
		1	2
Extracto 1	3	80,33	
Extracto 2	3	90,00	90,00
Extracto 4	3	92,00	92,00
Extracto 3	3		102,67
Sig.		,140	,107

Los resultados obtenidos de la marcha fitoquímica preliminar se muestran en la Tabla 15.

Tabla 15. Screening fitoquímico preliminar

Muestra	Taninos R.	Flavonoides	Saponinas	Alcaloides		Antraquinonas	
	Cloruro ferrico	R. Shinoda	Prueba de espuma	Draguendorf	Mayer	Bostrager	Salkowski
Hojas de buganvilla	++	+	++	+	+	-	-
Semilla de Palto	++	+	++	+	+	-	-

En la Tabla 15 se muestra la presencia de Taninos, Flavonoides, Saponinas y alcaloides presentes en los extractos etanolicos de hojas de buganvilla y semilla de palto.

DISCUSIÓN

Las diarreas de origen bacteriano en niños menores de 5 años en el departamento de Cochabamba son las causas más consecuentes debido a la mala higiene y a la

pobreza¹. En el presente estudio se estandarizó la técnica de determinación de la actividad antidiarreica en el laboratorio del Programa de Fármacos Alimentos y Cosméticos (PROFAC) de la Facultad de Bioquímica y Farmacia, ya que no se realizaron estudios en Bolivia, con bacterias que producen la diarrea en humanos.

Se trabajó con extractos etanólicos de hojas de buganvilla y semilla de palto teniendo conocimiento de que estas plantas eran usadas desde la antigüedad para las diarreas.

Se demostró que los extractos etanólicos de buganvilla presentan actividad antibacteriana frente a *Escherichia Coli diarreogenica*. Estos resultados son respaldados por otros trabajos realizados especialmente en México, que indican que la buganvilla tiene buena actividad antibacteriana contra enterobacterias.⁶

Así mismo las semillas de palto presentan actividad antidiarreica, por pruebas in vivo, resultado muy importante porque apoya el uso tradicional de esta semilla como antidiarreico. Existen varios trabajos en México que indican que la semilla de palto tiene actividad antidiarreica.⁷

La semilla de palto presenta actividad antibacteriana frente a *Escherichia coli diarreogenica*, *Shigella dysenteriae*, *Salmonella typhimurium*. Estos resultados son respaldados por otros trabajos que indican que se encontró buena actividad antibacteriana en las semillas de palto, especialmente contra *Salmonella thipy*.⁸

En relación a los metabolitos secundarios encontrados en las plantas en estudio, se puede notar que en la buganvilla se encuentran especialmente los flavonoides y taninos, en trabajos previos se reportaron los flavonoides como los compuestos más importantes para su actividad antibacteriana.⁶

El estudio realizado es preliminar por lo cual se propone continuar con estudios aplicados a formas farmacéuticas.

AGRADECIMIENTOS

Al Programa de Fármacos Alimentos y Cosméticos (PROFAC) por todo el apoyo proporcionado durante dicha investigación.

REFERENCIAS

1. Laguardia E, Talavera JC. Infecciones Diarreicas. Buena salud. 2008 (Acceso 10 de marzo del 2009). Disponible en : http://www.salud.com/enfermedades/infecciones_diarreicas.asp
2. Viesca Treviño C. Medicina prehispánica de México el conocimiento de los nahuas. 2da. ed. México: Panorama; 1996.
3. Centro Nacional de Información de Medicamentos (CIMED). Plantas medicinales. (Revista en Internet)* (acceso 10 de marzo del 2009. Disponible en: <http://sibdi.ucr.ac.cr/CIMED/cimed27.pdf> 4.
4. Piñedos Corpas J, Garcia Barriga H, Montaña Barrera E. Extractos naturales de plantas medicinales. 2 da. Ed. universitario escuela de medicina Juan N. Corpas Bogotá Colombia; 1998.
5. Thompson K. Salud y plantas Medicinales. Nuestra Capacidad de estar sanos por naturaleza. 3ra. ed. Buenos Aires-Argentina: Planeta; 1992.
6. Edwin E, Sheeja E, Toppo E, Tiwari V, Dutt K. Utilizacion de la semilla de palto como producto agroindustrial. 2009 (acceso 6 de marzo 2009) Disponible en <http://farmacia.ugr.es/ars/pdf/384.pdf> .
7. Warren E, Jawetz E. Microbiología e inmunología. Manual Moderno. 3ra ed. México: Mmundo moderno S.A; 2001.
8. William S, Withe J. Plantas utilizadas en México para el tratamiento de asma. CIMET 2008 (Acceso 10 de marzo del 2009) Disponible en <http://www.nietoeditores.com.mx/download/otorrinolarinologia/sep-oct%202009/Otorrino%204.7%20ALGUNAS.pdf>..