

Estudio de la calidad bacteriológica de doce plantas medicinales de uso común en Ecuador

Katherine, Barros-Navarrete¹; Carmita, Jaramillo-Jaramillo¹; Diana, San-Martin¹; Haydelba, D'Armas²

(Recibido: junio 2017, Aceptado: octubre 2017)

¹Facultad de Ciencias Químicas y de la Salud, Universidad Técnica de Machala, UTMACH, Machala, Ecuador. Email: kbarros_est@utmachala.edu.ec; cjaramillo@utmachala.edu.ec; dsanmartin_est@utmachala.edu.ec;

²Facultad de Ciencias de la Ingeniería, Universidad Estatal de Milagro, Milagro, Ecuador. E-mail: hdarmasr@unemi.edu.ec

Resumen: En Ecuador, el 80% de la población utiliza la Medicina Tradicional y por consiguiente las plantas o sus productos naturales. El propósito de esta investigación, fue realizar un estudio del contenido bacteriano de doce plantas medicinales de uso común que se expenden en el mercado central de la ciudad de Machala, y que han sido procesadas para estudios de estabilidad en la Planta Piloto de Farmacia de la Universidad Técnica de Machala, a excepción de *Moringa oleifera* (moringa) que se cultiva en los terrenos de la Unidad Académica de Ciencias Agropecuarias. En tal sentido, se realizó una caracterización de las colonias bacterianas que se obtuvieron sembrando en agar eosina azul de metileno (EMB), medio selectivo para determinar el microorganismo patógeno *Escherichia coli*; fijación en una placa y tinción de Gram. Además, se realizó un recuento de aerobios totales en el medio de cultivo agar Casoy o TSA, en el que se demostró que las plantas medicinales *Piper carpunya* Ruiz y Pav (guaviduca) y *Taraxacum officinale* W (diente de león) exceden el límite permitido dado por la OMS. Finalmente, se hizo un estudio de Enterobacterias utilizando como medio de cultivo el Agar MacConkey, donde ocho especies vegetales sobrepasaron el límite permitido, mientras *Borago officinalis* L (borraja), *Lippia citrodora* (cedrón), *Melissa officinalis* L (toronjil) y *Taraxacum officinale* W (diente de león) no excedieron el valor (1x10⁴UFC/g) establecido por la Organización Mundial de la Salud (OMS) para material vegetal. Los parámetros de calidad determinados indicaron que las especies analizadas están dentro de las especificaciones de calidad para drogas crudas establecidas por las normas de la OMS.

Palabras Clave: aerobios, calidad bacteriológica, contenido bacteriano, plantas medicinales.

Study of the bacteriological quality of twelve medicinal plants commonly used in Ecuador

Abstract: The 80% of the population in Ecuador uses the Traditional Medicine and therefore the plants or their natural products. The purpose of this research was to carry out a study of the bacterial content of twelve common medicinal plants that are sold in the central market of Machala city and that have been processed for stability studies in the Pharmacy Pilot Plant of the Universidad Técnica de Machala, with the exception of *Moringa oleifera* (moringa) that is cultivated in the lands of the Academic Unit of Agricultural Sciences. In this sense, a characterization of the bacterial colonies was done which were obtained using eosin methylene blue agar (EMB), a selective agar to determine the pathogenic microorganism *Escherichia coli*; fixation on a dish and Gram staining. In addition, a total aerobic count was performed in the Casoy agar or TSA culture medium, in which *Piper carpunya* Ruiz and Pav (guaviduca) and *Taraxacum officinale* W (diente de león) were shown to exceed the permitted limit given by the WHO. A study of Enterobacteria was finally made using MacConkey Agar, where eight vegetal species exceeded the limit allowed, while *Borago officinalis* L (borraja), *Lippia citrodora* (cedrón), *Melissa officinalis* L (toronjil) and *Taraxacum officinale* W (diente de león) did not exceed the value (1x10⁴ UFC/g) established by the World Health Organization (WHO) for plant material. The determined quality parameters indicated that the analyzed species are within the quality specifications for crude drugs established by WHO standards.

Keywords: aerobic, bacteriological quality, bacterial content, medicinal plants.

INTRODUCCIÓN

El uso de plantas medicinales se remonta a épocas prehistóricas, desde cuando el médico-sacerdote y botánico ha sido su unidad, aun en este siglo se sigue utilizando el conocimiento ancestral de grupos indígenas sobre las plantas o sus derivados

para curar, prevenir y tratar sus dolencias. En Ecuador el 80% de la población utiliza la Medicina Tradicional y por consiguiente las plantas o sus productos naturales (1).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) definió como Medicina Tradicional el conjunto de

conocimientos, aptitudes y prácticas basados en teorías, creencias y experiencias indígenas de diferentes culturas, usados para el mantenimiento de la salud, así como para la prevención, el diagnóstico, la mejora o el tratamiento de enfermedades físicas o mentales (2).

La producción farmacéutica en Ecuador a partir de plantas de uso medicinal es escasa, según reportes existentes en la literatura. Los fitomedicamentos producidos son vendidos sin un control de calidad adecuado y sin condiciones adecuadas para la población, ya que es probable que no cumplan con las exigencias de normas internacionales, constituyendo un riesgo para la población. Esta situación también hace que los productos naturales nacionales no compitan con los elaborados por la industria farmacéutica foránea, aun cuando el país dispone de una gran biodiversidad de plantas medicinales que pueden constituir materias primas para la elaboración de fitomedicamentos con fines comerciales (1).

Desde hace mucho tiempo la FAO (Food and Agriculture Organization) reconoce la importancia de las plantas medicinales no solo por su valor para el tratamiento de las enfermedades en las poblaciones rurales, sino también por su repercusión como actividad económica, pudiendo incluso generar beneficios a través de la exportación. La FAO recomienda una recolección sostenible de la materia prima vegetal para la obtención de fitofármacos, para asegurar que los recursos sigan estando disponibles y con atención a la conservación de la biodiversidad de las plantas medicinales existentes en Ecuador (3).

Muchos de los usos de las plantas medicinales para tratar enfermedades provienen de los conocimientos tradicionales o saberes ancestrales. La necesidad de la validación y protección de ese conocimiento cobra relevancia por su papel estratégico en la conservación y uso sostenible de la biodiversidad. La Organización Mundial de la Salud reconoce la importancia de las plantas medicinales en el tratamiento y prevención de múltiples enfermedades, como también su relevancia a nivel económico al ser una fuente de descubrimiento de nuevas drogas que en algunos casos tienen un costo muy inferior a la síntesis de nuevos fármacos (2).

En la actualidad la Industria Farmacéutica combina los conocimientos científicos modernos con los ancestrales para la elaboración de productos naturales o sintéticos, donde muchos de ellos son la fuente de importantes drogas que sirven para salvar vidas, como por ejemplo los alcaloides del opio (morfina, codeína) proporcionados por la planta de amapola y que son utilizados en analgesia, además de los antibióticos, hormonas, vitaminas, enzimas prostaglandinas, etc. (4).

Ecuador por ser un país multicultural y poseer una elevada biodiversidad, es un sitio estratégico para los intereses de la industria farmacéutica, puesto que su mayor riqueza está reflejada en el saber

ancestral relacionado al mundo vegetal (1). En el país existen alrededor de 432 especies medicinales, 273 se expenden en las hierberías de los mercados y 255 son silvestres, 92 se comparten entre las de mercado y silvestres. Las especies de las hierberías tratan 77 enfermedades y las silvestres 74, entre las enfermedades más comunes en los dos casos están la inflamación estomacal, problemas de la circulación, afecciones nerviosas, resfrío, entre otras. Entre las especies de las hierberías, 178 son nativas, 83 introducidas y 12 endémicas, mientras que de las silvestres 199 son nativas, 43 introducidas y 13 endémicas (5).

En vista de que la materia vegetal en su mayoría es utilizada como un medicamento, es importante que el producto sea de la más alta calidad; por este motivo el tema propuesto es poder evaluar la calidad bacteriológica de algunas plantas medicinales de uso común en Ecuador, que han sido procesadas en la Planta Piloto de Farmacia de la Universidad Técnica de Machala (UTMACH).

DESARROLLO

Metodología

El presente trabajo de investigación fue un trabajo descriptivo, mediante método cuali-cuantitativo, basado en un estudio del contenido bacteriano de doce plantas medicinales de uso común para la población. Los ejemplares fueron adquiridos en agosto de 2015 en el mercado central de la ciudad de Machala, Provincia del Oro, Ecuador, con 65-85 % de humedad relativa y temperatura promedio de 26 °C; a excepción de *Moringa oleífera* (moringa) que se cultiva en los terrenos de la Unidad Académica de Ciencias Agropecuarias. Según su calidad organoléptica, se seleccionaron los órganos botánicos sanos para realización de los análisis; siendo procesados en el laboratorio, sin almacenamiento previo.

Las plantas cuestión de estudio fueron: achochilla (*Momordica charantia*); ajeno (*Artemisia absinthium* L.); altamisa (*Ambrosia artemisiifolia*.); borraja (*Borago officinalis* L.); cedrón (*Lippia citrodora*); culantro (*Coriandrum sativum*); diente de león (*Taraxacum officinale* W.); guaviduca (*Piper carpunya Ruiz y Pav.*); hierba luisa (*Cymbopogon citratus*); mastranto (*Ageratum conizoides*); moringa (*Moringa oleífera*) y toronjil (*Melissa officinalis* L.).

Inicialmente, se procesó la droga fresca: de cada planta se utilizaron sólo las hojas, se seleccionaron y lavaron primero con agua potable tratando de eliminar por completo tierra, lodo y otras impurezas que se encuentren. El secado que se realizó, es el secado simple a temperatura ambiente y bajo sombra por 24 horas, luego se sometieron a un secado con calor colocándolas en una estufa marca MEMMERT SNB 400 con flujo de aire a 40°C por 24 horas.

Una vez secas las muestras vegetales, se pulverizaron con ayuda de un molino o trituradora de cuchillas de acero (Lab. Mill serial No. 56969,

Type AR 400 Erweka®, Germany) previamente desinfectadas con alcohol al 70% y se recogieron en bolsas herméticas, estériles y debidamente rotuladas, garantizando su calidad y la conservación de sus metabolitos.

Posteriormente, se pesaron y se determinaron los parámetros de calidad establecidos por la OMS (6): humedad por gravimetría y cenizas totales por gravimetría, y familia de metabolitos secundarios por tamizaje fitoquímico (7).

Para los ensayos microbiológicos se preparó una solución madre con 10 g de muestra y 90 ml de caldo peptona (dilución 10-1), a partir de esta se realizaron diluciones seriadas con agua destilada estéril. Se sembró en placa por vertido para: Aerobios totales (30 a 35° C por 24 h) y *Enterobacterias* (37°C por 24 a 48 h) (8, 9).

Para la determinación de la presencia o ausencia de *Escherichia coli*, se sembró 1ml de solución madre en agar EMB y se estudiaron las características de las colonias y su reacción en el agar (10, 11).

Resultados y Discusión

Especificaciones de calidad de las drogas crudas

En la Tabla 1 se detallan los resultados obtenidos del ensayo de humedad residual de las drogas crudas de las doce plantas medicinales en estudio; los que indican que dichos valores se encuentran dentro de los parámetros de calidad establecidos por la normas de la Organización Mundial de la Salud (6), misma que establece un contenido de humedad no mayor al 10 %, a excepción de *Moringa oleífera* (moringa), *Piper carpunya* (guaviduca) y *Taraxacum officinale* (diente de león) que sobrepasan este límite. Por lo tanto, se recomienda mayor tiempo de secado para disminuir el contenido de agua y garantizar la estabilidad de estas muestras, minimizándose el contenido bacteriano.

En cuanto al contenido de cenizas totales, algunos de los valores obtenidos (los de mastranto, borraja, cedrón, toronjil y moringa) están muy cercanos a los parámetros de referencia de la Farmacopea española (12) que es el 12%, por lo que si se le va a dar utilidad para elaboración de fitofármacos, se sugiere determinar cenizas insolubles en ácido clorhídrico; y en caso de que sean mayor al 1%, hacer un estudio de su contenido, para evaluar posible toxicidad.

Se evaluó parámetros físicos (humedad y cenizas) de todas las drogas crudas previamente sometida a un secado a 40°C; encontrándose dentro del límite establecido por la OMS y la Farmacopea española, con excepción de *M. oleífera* (moringa), *P. carpunya* (guaviduca) y *T. officinale* (diente de león) que sobrepasaron el límite establecido de humedad en plantas medicinales.

Las plantas producen una sorprendente diversidad de metabolitos secundarios, tales como los alcaloides, flavonoides, taninos, terpenos,

esteroles y glicósidos, los cuales son recursos invaluable, tanto nutraceúticos como farmacéuticos. Los metabolitos secundarios son sintetizados en pequeñas cantidades y no de forma generalizada, su producción está restringida a determinados géneros de plantas, familias e incluso a algunas especies (13).

Tabla 1. Resultados de los parámetros físicos de humedad y cenizas en la droga cruda de las plantas en estudio.

Nombre Científico	Nombre Común	Humedad (%)	Cenizas Totales (%)
<i>Ageratum conizoides</i>	Mastranto	8,9±0,75	10,34±0,08
<i>Ambrosia artemisiifolia</i>	Altamisa	8,5± 0,56	7,12±0,03
<i>Artemisa absinthium</i>	Ajenjo	9,6 ± 0,38	7,86±0,13
<i>Borago officinalis</i> L	Borraja	8,3 ± 0,24	10,1± 0,10
<i>Coriandrum sativum</i>	Culantró	2,50 ±1,01	1,17 ± 0,18
<i>Cymbopogon citratus</i>	Hierba luisa	7,1± 0,04	9,23±0,03
<i>Lippia citrodora</i>	Cedrón	9,4± 0,63	10,76±0,25
<i>Melissa officinalis</i> L	Toronjil	9,8±0,54	11,45±0,20
<i>Momordica charantia</i>	Achochilla	7,4± 0,26	8,20±0,23
<i>Moringa oleífera</i>	Moringa	11,1±0,26	11,13±0,10
<i>Piper carpunya</i> Ruiz y Pav.	Guaviduca	11,2±0,54	9,5±0,18
<i>Taraxacum officinale</i> W	Diente de león	10,7±0,04	8,40±0,22

En la Tabla 2, se puede observar que todas las hojas de las especies estudiadas mostraron la presencia de alcaloides, a excepción del mastranto (*A. conizoides*); siendo altamisa (*A. artemisiifolia*) y culantro (*C. sativum*) las que exhibieron una alta evidencia del contenido de estos metabolitos. En este sentido, no se detectó la presencia de fenoles y flavonoides en diente de león (*T. officinale*) y borraja (*B. officinalis*), respectivamente; sin embargo, tanto hierba luisa (*C. citratus*) como cedrón (*L. citrodora*) no presentaron contenido de ambas familias de compuestos químicos.

Las saponinas estuvieron presentes en las muestras de todas las plantas, excepto en ajeno (*A. absinthium*), hierba luisa (*C. citratus*), moringa (*M. oleífera*) y diente de león (*T. officinale*). Además, se puede apreciar que estas especies vegetales tienen muy poco contenido de mucílagos y azúcares reductores.

Los fitomedicamentos producidos son vendidos sin un control de calidad adecuado y sin condiciones adecuadas para la población, ya que es probable que no cumplan con las exigencias de normas internacionales, constituyendo un riesgo para la población (14).

La OMS reconoce la importancia de las plantas medicinales como parte de la terapéutica, sin embargo, las tendencias actuales precisan fusionar el uso tradicional o empírico con la evidencia científica (15). La calidad es un requisito básico de los medicamentos, no sólo por su significación intrínseca, sino porque constituye la base sobre la que reposa la reproducibilidad de los parámetros seguridad y eficacia (16). Esto resulta aún más importante en los medicamentos a base de plantas medicinales, en los que la problemática es mucho más compleja que en los fármacos de síntesis.

Tabla 2. Resultados de los metabolitos determinados por Tamizaje Fotoquímico en la droga cruda de las plantas en estudio

Nombre común	Dragendoff (Alcaloides)	Mayer (Alcaloides)	Wagner (Alcaloides)	Cloruro Férrico (Fenoles)	Shinoda (flavonoides)	Fehling (azucares)	Espuma (saponinas)	Mucilagos (mucilagos)	Principios Amargo
Mastranto	-	-	-	++	+++	-	+++	NAEac	NAEac
Altamisa	+++	++	++	+	+	-	+	-	+
Ajenjo		++	+++	TANNO PIROCATECOL	++	-	-		
Borraja		+	+	+	-	-	+	+	-
Culantro	+++	+++	+++	+	+++		+		-
Hierba Luisa	+	+		-	-	-	-	+	+
Cedrón	+	+		-	-	-	+	-	-
Toronjil	+	+		+	+	-	+	-	+
Achochilla	++	+	++	+	+		+	-	++
Moringa	+	+	++	+++	++		-	-	++
Guaviduca		+	+	TANNO PIROCATECOL	++	++	+++	-	
Diente de León		++	++		++	+	-		

+++ Alta evidencia; ++ Evidencia; + Baja evidencia; - Negativo

Recuento de microorganismos

Toda droga vegetal que servirá como materia prima para la preparación de un medicamento (fitofármaco) debe ser de excelente calidad y estar libre de contaminación. El principal objetivo de esta investigación fue determinar la carga bacteriológica a bacterias aerobias totales y Enterobacterias en algunas plantas medicinales que han sido procesadas en la Planta Piloto de Farmacia, las que se detallan a continuación en la Tabla 3.

Tabla 3. Aerobios totales en la droga vegetal seca de las plantas medicinales en estudio.

Nombre Científico	Nombre Común	UFC/g	Decisión
<i>Ageratum conizoides</i>	Mastranto	3,7x10 ⁵	C
<i>Ambrosia artemisiifolia</i>	Altamisa	6,9x10 ⁴	C
<i>Artemisa absinthium</i>	Ajenjo	5,7x10 ⁶	C
<i>Borago officinalis</i> L.	Borraja	6,6x10 ⁶	C
<i>Coriandrum sativum</i>	Culantro	3,0x10 ⁶	C
<i>Cymbopogon citratus</i>	Hierba Luisa	4,9x10 ⁴	C
<i>Lippia citrodora</i>	Cedrón	1,2x10 ³	C
<i>Melissa officinalis</i> L.	Toronjil	2,7x10 ⁵	C
<i>Momordica charantia</i>	Achochilla	2,0x10 ⁴	C
<i>Moringa oleifera</i>	Moringa	7,8x10 ⁶	C
<i>Piper carpunya</i> Ruiz y Pav.	Guaviduca	1,3x10 ⁷	NC
<i>Taraxacum officinale</i> W.	Diente de león	2,5x10 ⁷	NC

UFC/g: Unidad formadora de colonia por cada gramo; C: cumple; NC: no cumple

Según se puede observar en dicha tabla, en el recuento de aerobios totales, los datos obtenidos de 1,3x10⁷ y 2,5x10⁷ UFC/g indican que existe contaminación bacteriana en guaviduca (*P. carpunya*) y diente de león (*T. officinale*) respectivamente, ya que ambas drogas crudas no cumplen con los límites de contaminación microbiana en materiales de plantas medicinales, al exceder el límite permitido según la OMS ⁶ que establece como límite máximo 1x10⁷ UFC/g de

bacterias aerobias.

La OMS establece que se deben eliminar los contaminantes sobre todo si se llegara a encontrar patógenos, a niveles permisibles, requiriéndose no solo del lavado, sino también de la desinfección, debido a que las drogas crudas normalmente transportan bacterias y hongos del suelo (17).

En base a los resultados obtenidos en la caracterización macroscópica de crecimiento bacteriano en agar EMB y del recuento de bacterias aerobias totales, se podría inferir que no se encontró colonias fermentadores fuertes típicas de la lactosa, en especial *Escherichia coli*; solo dos muestras presentaron desarrollo de aerobios totales superior al límite establecido. Las diez plantas medicinales restantes están aceptadas para ser usadas en la elaboración de fitofármacos, debido a que se encuentran dentro de los límites establecidos.

No se detectó la presencia de microorganismos patógenos asociados a riesgo de enfermedades graves para la salud.

Como se mencionó previamente, en cuanto al análisis presuntivo de acuerdo a las características de las colonias y su reacción en agar EMB, no se encontraron colonias fermentadores fuertes como *Escherichia coli*, que producen colonias negro verdosas con un brillo metálico. Los fermentadores débiles, que incluyen *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia* y *Hafnia* y que producen colonias violáceas en 24-48 h se encontraron en la mayoría de las hojas de las plantas estudiadas, a excepción de ajeno (*A. absinthium*), cedrón (*L. citrodora*) y diente de león (*T. officinale*) que presentaron microorganismos no fermentadores de lactosa, que incluyen *Proteus*, *Salmonella* y *Shigella*, por mostrar colonias transparentes o incoloras en los análisis realizados (18).

Como se observa en la Tabla 4, la droga cruda de las especies mastranto, altamisa, ajenjo, culantro, hierba luisa, achochilla, moringa y guaviduca poseen valores significativos elevados de UFC/g, determinándose que no se encuentran dentro de los límites establecidos por la OMS (2) para Enterobacterias en materiales vegetales de uso interno, cuyo valor máximo es 1x10⁴UFC/g.

Tabla 4. Resultados del conteo microbiológico de Enterobacterias en droga vegetal seca de las plantas medicinales en cuestión de estudio.

Nombre Científico	Nombre Común	UFC/g	Decisión
<i>Ageratum conizoides</i>	Mastranto	3,1x10 ⁴	NC
<i>Ambrosia Artemisiifolia</i>	Altamisa	3,7x10 ⁴	NC
<i>Artemisa absinthium</i>	Ajenjo	2,8x10 ⁴	NC
<i>Borago officinalis</i> L.	Borraja	3,8x10 ²	C
<i>Coriandrum sativum</i>	Culantro	3,5x10 ⁵	NC
<i>Cymbopogon citratus</i>	Hierba luisa	5,4x10 ⁴	NC
<i>Lippia citrodora</i>	Cedrón	<30	C
<i>Melissa officinalis</i> L.	Toronjil	<30	C
<i>Momordica charantia</i>	Achochilla	4,5x10 ⁶	NC
<i>Moringa oleífera</i>	Moringa	5,1x10 ⁴	NC
<i>Piper carpunya</i> Ruiz y Pav.	Guaviduca	1,4x10 ⁷	NC
<i>Taraxacum officinale</i> W.	Diente de león	3,0x10 ²	C

UFC/g: Unidad formadora de colonia por cada gramo; C: cumple; NC: no cumple

Mientras que se observaron valores significativos de Enterobacterias en ocho plantas de las doce estudiadas, *L. citriodora* (cedrón) y *M. officinalis* (toronjil) se encuentran por debajo del límite para recuentos de colonias, de 30 a 300 colonias (19).

Dentro de las especies estudiadas, *Piper carpunya* (guaviduca) mostró mayor vulnerabilidad en proliferación de microorganismos, por lo que es difícil de estabilizar en polvo seco como materia prima, siendo este resultado evidencia de la deficiencia en la calidad higiénico-sanitaria en cultivo y proceso de las muestras analizadas.

Plantas como *L. citriodora* (cedrón) y *M. officinalis* (toronjil) presentaron menor vulnerabilidad en proliferación de microorganismos por lo que se indica que estas son materias primas excelentes para la elaboración de productos naturales y/o alimenticios que tan solo con procesos básicos o sencillos de secado manipulación y control sanitario vamos a obtener materias estables útiles para la producción.

CONCLUSIONES

Los parámetros de calidad determinados indicaron que las especies analizadas están dentro de las especificaciones de calidad para drogas crudas establecidas por las normas de la OMS.

L. citriodora (cedrón) y *M. officinalis* (toronjil) presentaron menor vulnerabilidad en proliferación de microorganismos por lo que se indica que estas son materias primas excelentes para la elaboración de productos naturales y/o alimenticios que tan solo con procesos básicos o sencillos de secado,

manipulación y control sanitario se obtienen materias estables útiles para la producción. A diferencia de *Piper carpunya* (guaviduca), que mostró mayor vulnerabilidad en la proliferación de microorganismos, por lo que se puede concluir que es difícil de estabilizar en polvo seco como materia prima.

Se validó un método de lavado y secado de drogas crudas que permitió disminuir el contenido bacteriano de las mismas.

Agradecimientos

Los autores expresan su agradecimiento al Proyecto Prometeo de la Secretaría Nacional de Educación Superior, Ciencia y Tecnología de la República de Ecuador (SENESCYT) por el financiamiento de esta investigación.

REFERENCIAS

- (1) Ríos M, de la Cruz R, Mora A. Conocimiento tradicional y plantas útiles del Ecuador-saberes y prácticas. Quito-Ecuador: Ediciones Abya- Yala; 2008.
- (2) OMS. Pautas generales para las metodologías de investigación y evaluación de la medicina tradicional. Ginebra: Organización Mundial para la Salud; 2000. Disponible en <http://archives.who.int/tbs/trm/s4930s.pdf>
- (3) FAO. Unasylva-Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la alimentación. *Revista Nacional de Silvicultura e industrias forestales*; Vol. 35 Rev. Febrero 2014; 1983. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/q1460s/q1460s00.htm>.
- (4) Gennaro A. Remington Farmacia. 21ª ed. Buenos Aires: Editorial Panamericana; 2012.
- (5) Cerón C. Plantas medicinales de los Andes Ecuatorianos. *Botánica económica de los Andes Centrales*. La Paz-Bolivia: Universidad de San Andrés; 2006, p 285-293.
- (6) OMS. Quality control methods for medicinal plant materials, Geneva: World Health Organization (WHO); 1998. 122p.
- (7) Miranda M, Cuellar A. Manual de prácticas de laboratorio.: Farmacognosia y Productos Naturales. La Habana-Cuba: Instituto de Farmacia y Alimentos; 2002.
- (8) Vidaurre M, Querevalú L, de los Ríos E, Ruiz S. Características farmacognósticas de las hojas de *Capparis avicennifolia*. *Rev. Med. Vallejana*. 2007; 4 (2): 121-131.
- (9) Rodríguez E, Gamboa M, Hernández F, García J. Bacteriología general, principios y prácticas de laboratorio. Costa Rica: Editorial Universal; 2005. 458 p.
- (10) Torres A. Adhesins of enteropathogenic *Escherichia coli* in the Americas. *ASMScience/Ecosaltplus*. 2016; 1-19.
- (11) Barragán A, Rodríguez G, Figueroa I, Shirai K. Manual de prácticas de laboratorio:

Microbiología de los Alimentos. México DF: Universidad Autónoma Metropolitana; 2013. 82pp.

- (12) Real Farmacopea Española. Formas Farmacéutica. 2.^a edición. Barcelona: RFE. p. 579-619. Disponible en http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/lecturageneralidades-3_15034.pdf.
- (13) Marcano D, Hasegawa M. Fitoquímica Orgánica. Caracas-Venezuela: UCV- Litopar; 2002.
- (14) Sharapin N. Materias primas vegetales para la industria de productos fitofarmacéuticos. *Revista de Fitoterapia*. 2000; 1 (3): 197-203.
- (15) Avello LM, Cisternas FI. Fitoterapia, sus orígenes, características y situación en Chile. *Rev. Med. Chile*. 2010; 138 (10):1288-1293.
- (16) Mosihuzzaman M, Choudhary MI. Protocols on safety, efficacy, standardization, and documentation of herbal medicine (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem*. 2008; 80: 2195–2230.
- (17) O.M.S. Pautas para la Evaluación de Medicamentos Herbarios. Programa de Medicina Tradicional. Ginebra: Organización Mundial para la Salud; 1991.
- (18) Koneman E, Procop G, Schrenckenberge P, Woods G, Janda W, Allen S, Winn W. Diagnóstico microbiológico. Buenos Aires-Argentina: Editorial Médica Panamericana; 2008. 169 p.
- (19) Tortora G, Funke B, Case C. Introducción a la microbiología. Argentina: Editorial Médica Panamericana; 2007. 988 p.