

Toxicidad de extractos herbáceos sobre microorganismos aislados en infecciones nosocomiales

Palabras clave: Infecciones nosocomiales, antimicrobianos, plantas medicinales.

Key words: Nosocomial infections, antimicrobials, medical plants.

Recibido: 26/01/2010

Aceptado: 11/03/2010

Aníbal Domínguez Odio,* Rodolfo Rodríguez Grillo,** Alfonso Escobar Villalba,*** Carlos Manuel Dutok Sánchez ****

* Centro de Biofísica Médica. Universidad de Oriente (UO). Santiago de Cuba. Cuba.

** Policlínico Docente 28 de Septiembre. Santiago de Cuba. Cuba.

*** Instituto Superior de Ciencias Médicas. Facultad No. I. Santiago de Cuba. Cuba.

**** Departamento de Farmacia. Facultad de Ciencias Naturales. UO

Correspondencia:

Dr. MV. Aníbal Domínguez Odio
Centro de Biofísica Médica. Universidad de Oriente.
Patricio Lumumba s/n. CP 90500.
Santiago de Cuba. Cuba.
Telf. 022-631424 y 631425 Fax. 022-632545 y 686214
E-mail: anibalodio@yahoo.com
anibalodio@gmail.com

Este artículo también puede ser consultado en versión completa en: <http://www.medicgraphic.com/patologiaclinica/>

148

Resumen

La búsqueda de nuevos compuestos de origen vegetal que sean tóxicos a las diferentes células microbianas patógenas es una tarea constante de la ciencia moderna. Teniendo en cuenta estos antecedentes, se realizó un estudio para evaluar la toxicidad de extractos acuosos provenientes de *Piper aduncum*, *Spondias mombin*, *Desmodium axillare*, *Solanum torvum* y *Solanum americanum* sobre microorganismos aislados en infecciones nosocomiales. Se prepararon extractos acuosos de hojas y tallos en diferentes concentraciones (50, 100 y 200 mg/mL), los cuales se enfrentaron a *Escherichia coli*, *Enterobacter* sp, *Staphylococcus* sp, *Streptococcus* sp, *Neisseria* sp y *Candida albicans* por el método de difusión en disco. Se evidenció la presencia de un efecto tóxico positivo sobre los microorganismos patógenos en todos los extractos utilizados.

Abstract

The search for new compounds derived from plants that are toxic to different pathogenic microbial cells is a task of modern science. Taking into account this background, a study was conducted to evaluate the toxicity of aqueous extracts derived from *Piper aduncum*, *Spondias mombin*, *Desmodium axillare*, *Solanum torvum* and *Solanum americanum* on microorganisms isolated of nosocomial infections. Aqueous extracts obtained from leaves and stems were prepared at different concentrations (50, 100 and 200 mg/mL), and confronted against *Escherichia coli*, *Enterobacter* sp, *Staphylococcus* sp, *Streptococcus* sp, *Neisseria* sp and *Candida albicans* by the diffusion disc method. It was demonstrated the presence of a toxic positive effect on pathogenic microorganisms, in all the extracts used.

Introducción

La resistencia de algunas poblaciones microbianas a distintos antimicrobianos es en la actualidad un grave problema que enfrenta la práctica médica moderna,¹ aspecto que adquiere matices alarmantes y dramáticos cuando se trata de infecciones nosocomiales. Sobre este particular, se puede afirmar que los errores en la prescripción, administración y uso inadecuado de tales medicamentos han influido de forma conjunta para aumentar su alarmante incidencia en el mundo.²⁻⁶

Este problema de salud desencadena una serie de acciones concretas en la comunidad científica internacional, dirigidas no sólo a identificar posibles factores de riesgos,^{7,8} o desarrollar nuevas prácticas que garanticen el uso adecuado y racional de estos medicamentos para disminuir los eventos de resistencia antimicrobiana y aumentar la seguridad del paciente,^{9,10} sino también a buscar, quizás como nunca antes, nuevos compuestos tóxicos para la célula microbiana, en especial aquellas que son de importancia clínica.¹¹⁻¹³

Sobre este último aspecto, existen en nuestro continente y en otras partes del mundo muchos ejemplos que demuestran el interés científico existente, por descubrir estos compuestos a partir de organismos vegetales. Tal preferencia, obedece a que éstos contienen en sus raíces, tallos, hojas, flores y frutos muchos principios activos, que se sinergizan unos a otros, atacando por diferentes vías a los microorganismos y, al hacerlo, al mismo tiempo dificultan el desarrollo de resistencia hacia tantos compuestos.¹² En este contexto, la medicina tradicional practicada y transmitida por los habitantes de una zona geográfica determinada es, sin duda, una fuente primaria muy importante de información para identificar nuevas plantas candidatas a medicamentos fitoterapéuticos o portadoras de compuestos químicos específicos con actividad terapéutica.^{14,15}

La sabiduría popular en estos casos no es suficiente, se requiere además tener un respaldo

científico adecuado que permita demostrar, o que contribuya a probar, las potencialidades toxicológicas sobre las células microbianas. Para lograrlo, es común enfrentar los extractos herbáceos a diferentes poblaciones de microorganismos patógenos, por medio de diversas técnicas (difusión en disco, microdilución en placa, concentración mínima inhibitoria, entre otras), y normas (AFNOR/NF-T-72-150), las cuales, a pesar de sus limitaciones, ofrecen al investigador información suficiente para determinar la sensibilidad o resistencia de poblaciones microbianas a sustancias químicas.¹⁶

En este sentido, es común la utilización de cepas de *Escherichia coli*, *Enterobacter* sp, *Staphylococcus* sp, *Streptococcus* sp y *Candida albicans* por tres razones fundamentales: Primero, provocan enfermedades debilitantes, agudas, crónicas y en ocasiones mortales; segundo, pueden contribuir a la disminución de la capacidad física y mental del individuo enfermo y comprometer su productividad; y tercero, son frecuentemente aisladas en expectoraciones, líquidos y secreciones procedentes de pacientes adultos y pediátricos con síntomas clínicos de infecciones,^{17,18} o en objetos, dispositivos y materiales médicos contaminados.¹⁹⁻²¹

A pesar de los indudables beneficios médicos, sociales y económicos que generan estas investigaciones *in vitro*, del esfuerzo científico realizado, del potencial que posee la flora del archipiélago cubano, del arraigo popular de la medicina natural y tradicional y de lo común que resultan las enfermedades infecciosas en las consultas médicas, son insuficientes las evidencias existentes en nuestro país que demuestran por métodos científicos las propiedades antimicrobianas atribuidas popularmente a diferentes plantas medicinales. Sobre este tema, son aún menores los resultados que involucran a poblaciones microbianas patógenas «salvajes» o circulantes de individuos enfermos a sanos. Tal desconocimiento, impide tener una idea más cercana a la realidad sobre la sensibilidad y resistencia de estos microorganismos a tales productos, lo cual dificulta valorar su efectividad en la práctica clínica.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, el presente trabajo tuvo como propósito evaluar la toxicidad de extractos acuosos provenientes de *Piper aduncum*, *Lin*, *Spondias mombin*, *Lin*, *Desmodium axillare*, (Sw) DC, *Solanum torvum*, Sw y *Solanum americanum*, Mill sobre cepas patógenas aisladas en infecciones nosocomiales (*Escherichia coli*, *Enterobacter* sp, *Staphylococcus* sp., *Streptococcus* sp, *Neisseria* sp) y levaduras (*Candida albicans*).

Material y métodos

Material vegetal. El material vegetal elegido para este estudio consistió en hojas y tallos sanos de *Piper aduncum*, *Spondias mombin*, *Desmodium axillare*, *Solanum torvum* y *Solanum americanum*, las cuales se colectaron siempre en horario de la mañana, y en lugares pertenecientes al macizo montañoso Nipe-Sagua-Baracoa a 475 metros sobre el nivel del mar. Una muestra de los organismos vegetales colectados fueron depositados en el herbario del Centro Oriental de Ecosistema y Biodiversidad, perteneciente al Ministerio de Ciencia, Tecnología y Medio Ambiente de la República de Cuba.

Preparación del extracto acuoso. Después de seleccionar las hojas y tallos a utilizar, se deshidrataron en una estufa con circulación de aire caliente a una temperatura de 37 °C durante cuatro días continuos. Posteriormente, las hojas y tallos secos se trituraron en un molino eléctrico hasta obtener una granulometría adecuada. El extracto acuoso fue preparado por decocción, añadiendo 50 g del material vegetal seco y triturado a 1,000 mL de agua destilada. El mismo material vegetal fue sometido tres veces al proceso de extracción y, cuando éste culminó, se filtró y se dejó enfriar al abrigo de la luz. Posteriormente, los extractos se colocaron en un evaporador rotatorio (R-Büchi R-205, Zwitzerland), a presión reducida, y temperatura menor que 37 °C, hasta obtener un volumen aproximado de 20 mL, para finalmente liofilizarlo y almacenarlo dentro de envases oscuros y en lugar seco a 8 °C de temperatura, hasta el momento de su utilización.

Determinación de la actividad antimicrobiana *in vitro* de los extractos acuosos.

Material microbiológico. Los microorganismos usados en el estudio fueron cepas de bacterias y levaduras actualmente circulantes en poblaciones humanas (*Escherichia coli*, *Enterobacter* sp, *Staphylococcus* sp, *Streptococcus* sp, *Neisseria* sp y *Candida albicans*), aisladas de muestras biológicas obtenidas de pacientes adultos y pediátricos con infecciones nosocomiales, atendidos en el Área de Bacteriología del Policlínico 28 de Septiembre.

Ensayo de inhibición del crecimiento. Para evaluar la toxicidad de los extractos acuosos, se utilizaron inicialmente medios de cultivos líquidos, para que los microorganismos seleccionados crecieran sin dificultad. En el caso de las bacterias, se empleó medio cerebro-corazón (Oxoid) y para la levadura, medio dextrosa Saboureaud (Oxoid); ambos se prepararon según las instrucciones del fabricante y se esterilizaron en autoclave a 120 °C por 20 minutos. El subcultivo de los inóculos fue incubado a 37 °C durante 8 horas. Al cabo de ese tiempo, se preparó una suspensión de 1 a 2 x 10⁶ UFC/mL, cuya densidad óptica igual a 1 fue medida a 550 nm en un espectrofotómetro Spectronic 601. Posteriormente, se tomó una pequeña porción de cada cultivo y se sembraron en forma de césped en placas de Petri que contenían agar Muller-Hinton (Oxoid) para las bacterias y en agar dextrosa Saboureaud (Oxoid) para la levadura.

Una vez cumplimentado todos estos requisitos, se utilizó el ensayo de difusión en disco,²² el cual consistió en depositar discos de papel con un diámetro de 5 mm impregnados con los diferentes extractos acuosos en diferentes concentraciones (50, 100 y 200 mg/mL), sobre la superficie húmeda de los medios agarizados correspondientes. Las placas se incubaron a 37 °C durante 24 y 48 horas; transcurrido ese tiempo, se evaluaron los resultados mediante la lectura en milímetros del diámetro del halo de inhibición del crecimiento de los microorganismos, en distintas direcciones (0°, 45°, 90°, 135°, 180°). Dicha zona de inhibición es

resultante de la movilización de los componentes químicos contenidos en los extractos hacia el medio (difusión simple). La presencia o ausencia del halo de inhibición, permitió clasificar la actividad antimicrobiana en: sin actividad, con actividad ligera, moderada y marcada según criterio de Toda y colaboradores, 1991.²³

Diseño experimental. La evaluación de la actividad antibacteriana de los extractos se realizó a través de un experimento completamente al azar. Cada una de las poblaciones de microorganismos estudiadas se trabajó de forma independiente y

todas tuvieron en común la presencia de tres tratamientos, los cuales se corresponden con las dosis de 50, 100 y 200 mg/mL, más un tratamiento control negativo, que resultó ser agua destilada estéril. En todos los casos se realizaron ocho repeticiones por tratamiento, distribuidos en dos placas de Petri por separado, convenientemente identificadas.

Resultados y discusión

Las plantas se han empleado desde tiempos ancestrales y aún siguen utilizándose con fines terapéuti-

Cuadro I. Potencial antimicrobiano de los extractos acuosos sujetos a estudio.

NC	Microorganismos	Concentraciones (mg/mL)		
		50	100	200
<i>P. aduncum</i>	<i>Escherichia coli</i>	Moderada	Moderada	Moderada
	<i>Enterobacter sp.</i>	Ligera	Ligera	Ligera
	<i>Staphylococcus sp.</i>	Ligera	Ligera	Ligera
	<i>Streptococcus sp.</i>	Ligera	Ligera	Ligera
	<i>Neisseria sp.</i>	Ligera	Ligera	Ligera
	<i>Candida albicans</i>	Ligera	Ligera	Moderada
<i>S. mombin</i>	<i>Escherichia coli</i>	Ligera	Moderada	Moderada
	<i>Enterobacter sp.</i>	Ligera	Ligera	Ligera
	<i>Staphylococcus sp.</i>	Ligera	Moderada	Moderada
	<i>Streptococcus sp.</i>	Ligera	Ligera	Ligera
	<i>Neisseria sp.</i>	Sin actividad	Sin actividad	Ligera
	<i>Candida albicans</i>	Sin actividad	Ligera	Ligera
<i>D. axillare</i>	<i>Escherichia coli</i>	Sin actividad	Sin actividad	Ligera
	<i>Enterobacter sp.</i>	Sin actividad	Ligera	Ligera
	<i>Staphylococcus sp.</i>	Ligera	Ligera	Ligera
	<i>Streptococcus sp.</i>	Ligera	Ligera	Ligera
	<i>Neisseria sp.</i>	Ligera	Ligera	Moderada
	<i>Candida albicans</i>	Moderada	Moderada	Moderada
<i>S. torvum</i>	<i>Escherichia coli</i>	Sin actividad	Ligera	Ligera
	<i>Enterobacter sp.</i>	Ligera	Ligera	Moderada
	<i>Staphylococcus sp.</i>	Ligera	Moderada	Moderada
	<i>Streptococcus sp.</i>	Ligera	Moderada	Moderada
	<i>Neisseria sp.</i>	Ligera	Moderada	Moderada
	<i>Candida albicans</i>	Moderada	Moderada	Moderada
<i>S. americanum</i>	<i>Escherichia coli</i>	Sin actividad	Ligera	Moderada
	<i>Enterobacter sp.</i>	Ligera	Ligera	Moderada
	<i>Staphylococcus sp.</i>	Moderada	Moderada	Moderada
	<i>Streptococcus sp.</i>	Moderada	Moderada	Moderada
	<i>Neisseria sp.</i>	Ligera	Ligera	Moderada
	<i>Candida albicans</i>	Ligera	Ligera	Ligera

NC = Nombre científico.

cos para el tratamiento de diferentes enfermedades humanas, incluidas las de naturaleza infecciosa. Sobre esta base, no existen dudas sobre la importancia de las plantas medicinales en el mantenimiento o recuperación de la salud y que éstas constituyen un arsenal de compuestos bioactivos, a pesar del desarrollo alcanzado por la síntesis química.^{12, 15}

El análisis integral de los resultados (*cuadro 1*), muestra el efecto tóxico positivo de los extractos sobre los microorganismos patógenos de origen clínico seleccionados, independientemente de la planta y la concentración utilizada. En este aspecto es importante señalar que el tratamiento control negativo (agua destilada estéril) no interfirió con el desarrollo de los microorganismos evaluados, por lo que la inhibición de su desarrollo por los diferentes extractos puede atribuirse sólo a los compuestos contenidos en las especies de plantas evaluadas.

Particularizando en esta actividad biológica, puede afirmarse que ésta no se comportó de igual manera en todos los casos, por ejemplo, en los extractos procedentes de *P. aduncum*, *S. mombin* y *D. axillare* predominó una ligera actividad antimicrobiana (halo de inhibición no mayor de 12 mm), mientras que los de *S. torvum* y *S. americanum* expresaron una actividad mayoritariamente moderada. Estas dos últimas plantas se distinguieron del resto porque 83.33 y 66.66% del total de microorganismos expuestos a la concentración de 200 mg/mL mostraron una sensibilidad moderada, y en el caso del *S. americanum* provocó el único efecto tóxico marcado en el experimento (halo de inhibición mayor que 24 mm).

Igualmente quedó demostrado que los extractos acuosos de hojas y tallos secos de *S. mombin* y *D. axillare* fueron los que exhibieron el menor efecto tóxico sobre el total de bacterias utilizadas, pues ambas carecieron de actividad para 33.34% de ellas cuando se utilizó la concentración de 50 mg/mL. Tal efecto no parece estar relacionado con los tipos de estructuras de la envoltura celular propia de las bacterias Gram negativas y positivas, más bien debe estar relacionado con el número y las

bajas concentraciones de principios activos con propiedades antimicrobianas contenidas en los extractos acuosos, producto quizás del tipo de solvente utilizado.

Razonamiento independiente merece la respuesta emitida por la cepa circulante de *Candida albicans*, cuando se enfrentó a la acción tóxica de los diferentes extractos y sus respectivas concentraciones. Sobre este particular puede afirmarse que esta levadura patógena es moderadamente sensible a todas las concentraciones del extracto acuoso del *D. axillare* y a la dosis de 200 mg/mL del *P. aduncum*. Referente a la *D. axillare* es importante destacar que, a pesar de ser considerada una riqueza florística de nuestro país,²⁴ no se reporta hasta el momento ningún estudio experimental o etnobotánico que describa o afirme las potencialidades halladas, por lo que este resultado *in vitro* posiblemente sea el primer reporte en Cuba sobre sus propiedades antifúngicas sobre poblaciones actualmente circulantes en organismos humanos.

En sentido general, los resultados demostraron concordancia no sólo entre las propiedades demostradas y las atribuidas popularmente en Cuba, el cual confirmó la actividad antimicrobiana del *P. aduncum*, *S. mombin* y *S. americanum*,²⁵ sino con algunos resultados de estudios *in vitro* e *in vivo* divulgados en publicaciones internacionales. Respecto a las evidencias experimentales sobre el potencial antimicrobiano de los extractos sujetos a estudio, diferentes autores han confirmado que *P. aduncum*,²⁶ *S. mombin*,²⁷ *D. axillare*,²⁸ *S. torvum*,^{14, 29, 30} y *S. americanum*³¹ poseen efectos tóxicos positivos sobre diferentes microorganismos patógenos aislados en humanos y animales enfermos, en los cuales se incluyen bacterias, virus y nematodos. Lo anterior, permite inferir la amplia variedad de efectos que poseen y que dicho comportamiento no es algo exclusivo en individuos que crecen en Cuba, sino que es una característica inherente a cada especie.

Independientemente de que algunas de las plantas involucradas en este estudio actualmente

se usan por sus propiedades antimicrobianas,³² se recomienda ampliar el estudio de la actividad antimicrobiana, con un mayor número de cepas bacterianas y fúngicas de interés clínico. Además, sería conveniente realizar estudios fitoquímicos para tratar de caracterizar los principios activos responsables de estas propiedades, conjuntamente con aquellos que brinden criterios de seguridad sobre su uso en el huésped, como requisito para su futuro empleo terapéutico, pues se conoce que algunas especies, como las pertenecientes al género *Solanum*, inducen con frecuencia cuadros de intoxicación en macroorganismos posterior a su consumo.³³

Referencias

1. Bissett L. Reducing the risk of acquiring antimicrobial-resistant bacteria. *Br J Nursing* 2006; 15 (2): 68-71.
2. Koop BJ, Erstad BL, Allen ME, Theodorou AA, Priestley G. Medication errors and adverse drug events in an intensive care unit: Direct observation approach for detection. *Crit Care Med* 2006; 34 (2): 415-425.
3. Hoefel HH, Lautert L. Errors committed by nursing technicians and assistants in administering antibiotics. *Am J Infect Control* 2006; 34: 437-442.
4. Tang FL, Sheu SS, Wei IL, Chen C. Nurse related the contributing factors involved in medication errors. *J Clin Nursing* 2007; 16: 447-457.
5. Fry MM, Dacey M. Factors contributing to incidents in medicine administration. Part I. *Br J Nursing* 2007; 16 (9): 556-559.
6. Marques TC. Erros de administração de antimicrobianos identificados em estudo multicêntrico brasileiro. *Rev Brasil Cienc Farmac* 2008; 44 (2): 305-314.
7. Moreira MR. Risk factors and evolution of Ventilator-associated pneumonia by *Staphylococcus aureus* sensitive or resistant to oxacillin in patients at the intensive care unit of a Brazilian University Hospital. *Braz J Infect Dis* 2008; 12 (6): 499-503.
8. Pinheiro MR. *Pseudomonas aeruginosa* infections: factors relating to mortality with emphasis on resistance pattern and antimicrobial treatment. *Braz J Infect Dis* 2008; 12 (6): 509-515.
9. Bucknall TK. Implementing guidelines to improve medication safety for hospitalized patients: experiences from western health, Australia. *Worldviews on Evidence-Based Nursing* 2007; 4 (1): 51-53.
10. Gunton VV, Amos V, Sidler AL, Beney J, Troillet N et al. Hospital pharmacists' reinforcement of guidelines for switching from parenteral to oral antibiotics: A pilot study. *Pharmacy World Science* 2003; 25 (2): 52-55.
11. Romero CD, Chopin SF, Buck G, Martinez E, Garcia M et al. Antibacterial properties of common herbal remedies of the southwest. *J Ethnopharmacol* 2004; 99: 253-257.
12. Calixto JB. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: A personal view. *J Ethnopharmacol* 2005; 99: 131-134.
13. Ríos JL, Recio MC. Medicinal plants and antimicrobial activity. *J Ethnopharmacol* 2005; 99: 80-84.
14. Wiart C, Mogana S, Khalifah S. Antimicrobial screening of plants used for traditional medicine in the state of Perak, Peninsular Malaysia. *Fitoterapia* 2004; 75 (1): 68-73.
15. Fernández RD, Guimarães LG, Neves CF, Abreu L, Varga SV. Investigation of the antimycobacterial activity of 36 plant extracts from the Brazilian Atlantic Forest. *Rev Brasil Cienc Farmaceut* 2008; 44 (4): 669-674.
16. Ubaldo RP. Evaluación de la actividad bactericida *in vitro* de soluciones antibacterianas en uso. *Rev Mex Patol Clin* 2006; 53 (2): 123-125.
17. Barriga GA, Asumir EC, Mercado FG. Actualidades en la susceptibilidad antimicrobiana de microorganismos causales de infecciones respiratorias en pacientes ambulatorios. *Rev Mex Patol Clin* 2008; 55 (1): 29-36.
18. Reséndiz SJ, Morales JJ. Factores asociados a mortalidad por fungemias causadas por *Candida* sp en niños. *Bol Med Hosp Infan Mex* 2007; 64 (2): 81-98.
19. Ubaldo RP, Martínez PD, Páez CN, Rodríguez PC. Estudio de la resistencia de microorganismos aislados de infecciones nosocomiales ante soluciones en uso. *Rev Mex Patol Clin* 2006; 53 (2): 119-122.
20. Rivera RM. Determinación de la población bacteriana y sensibilidad antibacteriana en una unidad médica de alta especialidad. *Rev Mex Patol Clin* 2008; 55 (1): S5-S30.
21. Tapia YJ, Martínez LB. Frecuencia de microorganismos aislados en puntas de catéter en un hospital pediátrico, experiencia de tres años. *Rev Mex de Patol Clin* 2008; 55 (1): S5-S30.
22. Lop HA, Valdez MV, Zuago JS. *Microbiología y parasitología médicas*. La Habana, Cuba: Editorial Ciencias Médicas; 2001.
23. Toda M, Okubo S, Hora Y, Shimamura D. Antibacterial and bactericidality methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Jap J Bacteriol* 1991; 46 (5): 845-849.
24. Barreto VA, Godínez CD, Salgueiro ER, Reyes AG. Riqueza florística del complejo orográfico Sierra de Najasa, provincia de Camagüey, Cuba. *Rodríguesia* 2007; 58 (1): 59-71.
25. Scull L, Ramón MM, Infante LR. Plantas medicinales de uso tradicional en Pinar del Río: Estudio etnobotánico I. *Rev Cub Farmacia* 1998; 32 (1): 57-62.
26. Kloucek P, Polesny Z, Svobodova B, Vlkova E, Kokoska L. Antibacterial screening of some Peruvian medicinal plants used in Callería District. *J Ethnopharmacol* 2005; 99 (2): 309-312.
27. Ademola IO, Fagbemi BO, Idowu SO. Antihelmintic activity of extracts of *Spondias mombin* against gastrointestinal nematodes of sheep: Studies *in vitro* and *in vivo*. *Tropical Animal Health Production* 2005; 37 (3): 223-235.
28. Odone G, Bourdy G, Castillo D, Estevez Y, Lancha-Tangoa A et al. 'Ta'ta', Huayani: Perception of leishmaniasis and evaluation of medicinal plants used by the Chayahuita in Peru. Part II. *J Ethnopharmacol* 2009; 103: 23-32.
29. Arthan D, Svasti J, Kittakoop P, Pittayakhachonwut D, Tanticharoen M et al. Antiviral isoflavonoid sulfate and steroid glycosides from the fruits of *Solanum torvum*. *Phytochemistry* 2002; 59 (4): 459-463.
30. Shah KF, Muko KN, Oboegbulem SI. Antimicrobial activity of methanolic extract of *Solanum torvum* fruit. *Fitoterapia* 2000; 71 (2): 187-189.
31. Afolabi OC, Ogunsola FT, Coker AO. Susceptibility of cariogenic *Streptococcus mutans* to extracts of *Garcinia kola*, *Hibiscus sabdariffa*, and *Solanum americanum*. *West Africa J Med* 2008; 27 (4): 230-233.
32. Lizbeth KMS, Irene JF, Cárdenas ON, Aguirre RJ, Jasso PY. Evaluación de plantas tradicionalmente utilizadas en la desinfección de heridas. *Rev Mex Cienc Farmaceut* 2009; 40 (2): 5-10.
33. Smith SW, Giesbrecht E, Thompson M, Nelson LS, Hoffman RS. Solanaceous steroid glycoalkaloids and poisoning by *Solanum torvum*, the normally edible susumber berry. *Toxicon* 2008; 52 (6): 667-676.