



Archivos Venezolanos de Farmacología y
Terapéutica
ISSN: 0798-0264
revista.avft@gmail.com
Sociedad Venezolana de Farmacología Clínica y
Terapéutica
Venezuela

Identificación de metabolitos secundarios y evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de *Callistemon speciosus* (escobillón rojo)

Vaca Altamirano, Gabriela Liseth; Quispillo Moyota, John Marcos; ubon Usca, Irvin Ricardo; Viteri Rodríguez, Juan Alberto

Identificación de metabolitos secundarios y evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de *Callistemon speciosus* (escobillón rojo)

Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica, vol. 39, núm. 2, 2020

Sociedad Venezolana de Farmacología Clínica y Terapéutica, Venezuela

Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=55969799010>

DOI: <https://doi.org/10.5281/zenodo.4068500>

Derechos reservados. Queda prohibida la reproducción total o parcial de todo el material contenido en la revista sin el consentimiento por escrito del editor en jefe.



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Atribución-SinDerivar 4.0 Internacional.

Identificación de metabolitos secundarios y evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de *Callistemon speciosus* (escobillón rojo)

Identification of secondary metabolites and evaluation of the antimicrobial activity of the ethanol extract of *Callistemon speciosus* (red swab)

Gabriela Liseth Vaca Altamirano
Universidad Regional Autónoma de los Andes, Ecuador

 <https://orcid.org/0000-0003-4707-7147>

DOI: <https://doi.org/10.5281/zenodo.4068500>

Redalyc: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=55969799010>

John Marcos Quispillo Moyota
Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Ecuador

 <https://orcid.org/0000-0002-7257-9694>

Irvin Ricardo ubon Usca
Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Ecuador
irvintubon@gmail.com

 <https://orcid.org/0000-0003-0053-4187>

Juan Alberto Viteri Rodríguez
Universidad Regional Autónoma de los Andes, Ecuador

 <https://orcid.org/0000-0002-2463-7036>

Recepción: 07 Febrero 2020

Aprobación: 02 Marzo 2020

RESUMEN:

Introducción: *Callistemon speciosus*, ampliamente distribuido en la región de los Andes, es una planta medicinal usada comúnmente por sus propiedades antisépticas, expectorantes y broncodilatadoras.

Objetivos: Identificar posibles metabolitos secundarios presentes en *Callistemon speciosus* y evaluar la actividad antimicrobiana *in vitro* del extracto etanólico (CSEE) frente a cepas de bacterias y hongos.

Método: A partir de todas las partes de la planta seca, a excepción de la raíz, se preparó un extracto etanólico (CSEE) al cual se realizaron subextracciones usando etanol y cloroformo (1:1). Sucesivamente a través de cromatografía en capa fina y columna se separaron los metabolitos secundarios. Finalmente usando espectroscopia UV-Vis se determinó la absorción de cada fracción purificada. La actividad microbiológica de CSEE se realizó empleando el método Mitscher.

Resultados: Siguiendo las reglas de Woodward y Fisher, se identificaron 3 estructuras: 7-metoxi-flavona, 7-hidroxi-flavona y miricetina. CSEE inhibió el crecimiento bacteriano en una concentración dependiente, así, a una concentración de 10000 µg/mL mostró actividad para *S. aureus* y *C. albicans*, y actividad parcial para *E. coli*, *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa*. Mientras que a una concentración de 1000 µg/mL solo presentó actividad frente a *C. albicans* y *S. aureus*, Finalmente a una concentración de 100 µg/mL fue parcialmente activo para *S. aureus*.

Conclusiones: Estos resultados proporcionan datos sobre la composición fitoquímica y la actividad antimicrobiana de CSEE. Sin embargo, son necesarios estudios complementarios usando técnicas más específicas para tener un perfil fitoquímico completo de la planta y confirmar su actividad antimicrobiana.

PALABRAS CLAVE: *Callistemon speciosus*, Ecuador, plantas medicinales..

ABSTRACT:

Introduction: *Callistemon speciosus*, widely distributed in the Andes region, is a medicinal plant commonly used for its antiseptic, expectorant and bronchodilator properties.

Objectives: To identify possible secondary metabolites present in *Callistemon speciosus* and evaluate the *in vitro* antimicrobial activity against bacteria and fungus strains.

Method: From all parts of the dried plant, except the root, a main ethanolic extract (CSEE) was prepared. Subsequently, from the main extract, a subextraction was carried out using ethanol (A) and chloroform (B) (1:1). Then the secondary metabolites present in the subextracts were separated by thin layer and column chromatography. Afterward, using UV-Vis spectroscopy the absorption of each purified fraction was determined. The microbiological activity of CSEE was performed using the Mitscher method.

Results: Following the rules of Woodward and Fisher, 3 structures were identified: 7-methoxy-flavone, 7-hydroxy-flavone and myricetin. CSEE inhibited bacterial growth in a concentration-dependent manner. Thus, at a concentration of 10000 µg/mL showed activity against *S. aureus* and *C. albicans*, and partial activity for *E. coli*, *K. pneumoniae*, and *P. aeruginosa*. While at a concentration of 1000 µg/mL it only shows activity against *C. albicans* and *S. aureus*. Finally, at a concentration of 100 µg/mL, it is partially active against *S. aureus*.

Conclusions: These results provide data on the phytochemical composition and antimicrobial activity of CSEE. However, complementary studies should be carried out with more specific techniques to have a complete phytochemical profile of the plant and confirm its antimicrobial activity.

KEYWORDS: *Callistemon speciosus*, Ecuador, medicinal plants..

INTRODUCCION

En los últimos años, el número de estudios en productos naturales han ido en aumento, no solo debido a que son usados como cura primaria en muchos países en vías de desarrollo, sino también debido a la creciente popularidad de plantas medicinales usadas en la medicina tradicional¹⁻³. Actualmente, más de 20000 especies de plantas son usadas para el tratamiento de diferentes enfermedades, siendo también reservorio de potenciales nuevos principios activos^{4,5}. Recientes estudios sugieren además que el uso histórico y etno-farmacológico de plantas medicinales puede representar una herramienta de detección en el campo del descubrimiento de fármacos⁶. Sin embargo, se debe tener siempre en consideración que un uso incorrecto puede provocar problemas de toxicidad⁷.

Ecuador, al ser considerado como uno de los países más mega diversos del mundo, posee una flora y fauna extremadamente rica, es así que al momento un estimado de 17000 especies de plantas han sido descubiertas, de las cuales más de 3000 son usadas como plantas medicinales por diversas comunidades indígenas⁸. Sin embargo, en la mayoría de los casos, el conocimiento sobre la forma de preparación, dosis y ruta de administración de preparados basados en plantas medicinales, son transferidos solamente oralmente de generación en generación, por lo que estudios científicos en los cuales se reporte su composición fitoquímica o el mecanismo biológico por el cual actúan, son escasos y en muchas ocasiones no existen.

La familia Myrtaceae, constituida en su mayor parte por árboles y arbustos de elevado tamaño, está formada por cerca 2800 especies las cuales contienen numerosos y diminutos depósitos de esencias aromáticas. Dentro de estos se encuentra el género *Callistemon*, compuesto por 34 especies, que se caracteriza por poseer flores cilíndricas, con forma de pincel que se asemejan a un cepillo de botella. Mediante diversos análisis fotoquímicos de este género se han podido identificar la presencia de flavonoides C-metílicos, triterpenos y derivados del floroglucinol. Adicionalmente, ha sido estudiada la actividad biológica de diversas especies de *Callistemon*, mediante la cual se ha podido comprobar un efecto antimicrobiano, antiestafilococal, insecticida y nematocida⁹⁻¹¹.

El *Callistemon speciosus* Sweet es un arbusto con tronco más o menos recto de copa globosa con ramas delgadas y ligeramente penduladas, hojas alternas y lanceoladas, con un nervio central prominente y flores rojas brillantes agrupadas en espigas en la parte terminal de las ramas. Aunque la especie es originaria de Australia oriental y sudoriental, fue introducida y crece en regiones tropicales y subtropicales de América. Diversos estudios han reportado la presencia de aceites esenciales, en los cuales se observa la presencia de 1,8-cineol, α -pineno, limoneno y al β -terpineol, con actividad antimicrobiana¹²⁻¹⁵.

En busca de ampliar el conocimiento de las diversas especies vegetales presentes en el territorio ecuatoriano y tomando en cuenta que no existen estudios sobre la composición fitoquímica y la actividad biológica del

Callistemon speciosus Sweet, la presente investigación, busco determinar posibles metabolitos secundarios presentes, así como también su posible actividad antimicrobiana.

PARTE EXPERIMENTAL

Material vegetal

Callistemon speciosus Sweet fue recogido en Riobamba - Ecuador, en mayo del 2016. La planta fue identificada y certificada por el herbario de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo (Riobamba – Ecuador) y un voucher con el espécimen fue depositado (Nro. 435).

Preparación del extracto vegetal

Las plantas libres de algún tipo de enfermedad fueron lavadas bajo un flujo constante de agua. Posteriormente fueron secadas al aire libre y todas las partes de la planta a excepción de la raíz fueron trituradas hasta obtener un polvo fino. Usando 500 g del polvo obtenido se realizó una extracción inicial por 72 horas con etanol al 96% obteniendo un extracto etanólico de *Callistemon speciosus* (CSEE) que fue concentrado con el uso de un rotavapor a 40°C. El extracto obtenido fue sometido a una subextracción, por separación de fases utilizando un embudo de separación, siguiendo el esquema de la figura 1 (a). Así, se realizó una extracción Etanol:Clorofomo (1:1) obteniendo los subextractos A y B. Los extractos obtenidos fueron conservados a 5°C hasta posteriores análisis. Los rendimientos obtenidos para el extracto etanólico y los subextractos etanólico y clorofórmico fueron de 2,61%, 1,49% y 0,99%, respectivamente.

Análisis fitoquímico preliminar

Un análisis fitoquímico preliminar (Tabla 1) fue realizado al CSEE. Mediante pruebas cualitativas, colorimétricas y de precipitación, se determinó la presencia o ausencia de varios metabolitos como flavonoides, saponinas, terpenos y fitoesteroides¹⁶.

Análisis fitoquímico preliminar.

El análisis preliminar del extracto etanólico mostró la presencia de saponinas, taninos, flavonoides, alcaloides, sesquiterpenolactonas, triterpenos y esteroides.

TABLA 1
Análisis fitoquímico cualitativo para evidenciar la presencia
o ausencia de metabolitos secundarios en el CSEE

Metabolito	Prueba	Resultado
Saponina	Espuma	+
Taninos pirogálicos	Cloruro férrico	+
Taninos catéquicos	Cloruro férrico	-
Flavonoides	Shinoda	++
Alcaloides	Wagner	+
Sesquiterpenolactonas	Baljet	++
Monoterpenos	Sudan III	-
Triterpenos - esteroides	Liebermann burchard	++

Interpretación: (-) Negativo, (+) Baja evidencia, (++) Evidencia, (+++) Alta evidencia.

Separación de metabolitos secundarios

Posteriormente se procedió a la separación de los metabolitos presentes en los extractos obtenidos (figura 1b), para lo cual, en el caso del extracto clorofórmico, usando cromatografía en columna con sílica gel (SiO₂-H₂O) como adsorbente y cloroformo, acetato de etilo, metanol y agua como eluyentes, se recogieron aproximadamente 3 mL por cada fracción. A continuación, usando cromatografía de capa fina (TLC) se realizó la detección de posibles metabolitos aislados en cada fracción. Se utilizó un sistema de adsorbente y eluyente igual que en la cromatografía en columna usando como revelador a la vainillina. En el caso del subextracto etanólico se realizó una separación por placa preparativa para aislar posibles metabolitos secundarios.

Elucidación de estructuras mediante espectroscopia UV-visible

Los compuestos aislados fueron elucidados siguiendo las reglas de Woodward-Fieser^{17,18} basados en la absorbancia que presentan los grupos funcionales al ser analizados mediante espectroscopia UV-visible (Espectrofotómetro UV 1603, Shimadzu) en un rango de longitudes de onda de 200 a 700 nm.

Preparación del extracto para análisis microbiológico

Para el ensayo de la actividad microbiológica, el CSEE fue preparado pesando 40 mg de extracto el cual fue resuspendido en 4000 µL de DMSO, de esta manera se consiguió una concentración del extracto de 10000 µg/mL. Previo al inicio del ensayo microbiológico y a partir de la solución madre se prepararon diluciones seriadas (1:10 y 1:100) del extracto obteniendo concentraciones de 1000 µg/mL y 100 µg/mL. Las soluciones fueron almacenadas a 4°C hasta su posterior uso.

Cepas bacterianas

Fueron usados una colección de seis microorganismos tipificados por la ATCC entre ellos bacterias Gram-positivos como *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, bacterias Gram-negativas como *Escherichia coli* ATCC 9637, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y cepas de hongos de *Candida albicans* ATCC 10231, las cuales fueron obtenidas del laboratorio de microbiología de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Preparación del inóculo

Partiendo de las bacterias cultivadas en sus respectivos agares nutritivos se seleccionaron cuatro o cinco colonias y fueron resuspendidas en solución salina al 0,9% hasta obtener una solución homogénea de aproximadamente 1×10^8 UFC/mL (turbidez ajustada a la concentración 0,5 del patrón de McFarland).

Detección de actividad antibacteriana.

Para determinar la actividad antimicrobiana del CSEE se utilizó el ensayo de difusión en agar avalado por National Committee for Clinical Laboratory Science (NCCLS)¹⁹⁻²³. Los ensayos fueron realizados por triplicado, para ello se inició con la codificación de las placas de Petri para cada extracto a concentraciones de 10000, 1000, 100 µg/mL. Se colocaron 15 mL de agar Mueller Hinton en las placas de Petri, el cual fue preparado previamente según las indicaciones del fabricante, a los cuales se añadieron 100 µL de las tres diferentes concentraciones de CSEE obteniendo soluciones homogéneas del extracto con el agar. Una vez solidificado el agar más el extracto se procedió a la siembra de las cepas diluidas previamente, para lo cual se sembró la bacteria suspendida con una turbidez similar a la escala 0,5 de McFarland, asegurándose que la totalidad de la superficie del medio quedara inoculada intensamente. Las placas fueron almacenadas a temperatura ambiente por 15 a 20 min para garantizar que el inóculo sea totalmente absorbido, posteriormente se incubaron las placas a 37°C durante 24 a 48 horas. Como control negativo se utilizaron placas de agar Mueller-Hinton con DMSO²⁴. Posteriormente, a las 24 y 48 horas se determinó visualmente si el extracto presenta inhibición de la actividad bacteriana, denotándose las abreviaturas: A = indica actividad, es decir ningún tipo de crecimiento en las placas de Petri inoculadas la cual es indicativo que la cepa bacteriana es sensible al extracto, I = indica que no posee actividad, es decir el crecimiento en la placa de petri es similar al control negativo, indicativo que la cepa bacteriana es resistente a la actividad antimicrobiana del extracto. P = indica actividad parcial, esto quiere decir que hay un crecimiento moderado, atrofiado o la ausencia de alguna característica típica de la bacteria o microorganismo objeto de prueba.

RESULTADOS**Preparación de extractos.**

Los extractos fueron realizados de acuerdo al diagrama de la figura 1.

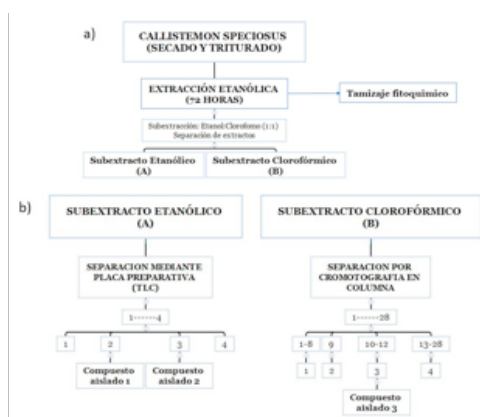


FIGURA 1

a) Diagrama de extracción para la obtención del extracto etanólico y subextractos etanólico (A) y clorofórmico (B) de *Callistemon speciosus*. b) Esquema seguido para el aislamiento de compuestos presentes en los subextractos etanólico (A) y clorofórmico (B).

Separación de metabolitos secundarios y elucidación de posibles estructuras

Mediante técnicas cromatográficas (cromatografía en columna, cromatografía en capa fina y placas preparativas) se pudo aislar 3 compuestos (figura 1b) de los subextractos de *Callistemon speciosus*. Para la elucidación se realizó mediciones de sus absorbancias en un rango de 200 a 500 nm (Tabla 2) y se utilizó las reglas de Woodman y Fieser, dando como resultados 3 estructuras: 7-metoxi flavona, 7-hidroxi flavona y la miricetina (figura 2).

TABLA 2

a) Absorbancias obtenidas de los compuestos aislados 1 y 2 del subextracto etanólico a diferentes longitudes de onda. b) Sistema de solventes y fracciones usadas para la separación por cromatografía en columna del subextracto clorofórmico. b) Absorbancias obtenidas del compuesto aislado 3 del subextracto clorofórmico a diferentes longitudes de onda.

a)			
Subextracto etanólico (A)	Longitud de onda (Å) nm	Absorbancia (Abs)	
Compuesto 1	205 nm	2.348	
	276 nm	1.879	
	280 nm	1.3543	
Compuesto 2	205 nm	1.568	
	276 nm	2.487	
	280 nm	0.850	

b)			
Fase móvil	Proporción	Fracciones	
Cloroformo	100	1-9	
Cloroformo : Metanol	95:5	10-14	
Cloroformo : Metanol	50:50	15-18	
Cloroformo : Metanol	30:70	19-21	
Metanol : Agua	70:30	22	
Metanol : Agua	50:50	23-24	
Metanol : Agua	30:70	25-27	
Agua	100	28	

c)			
Subextracto clorofórmico (B)	Longitud de onda (Å) nm	Absorbancia (Abs)	
Compuesto 3	222 nm	2.418	
	283 nm	1.250	
	319 nm	1.074	

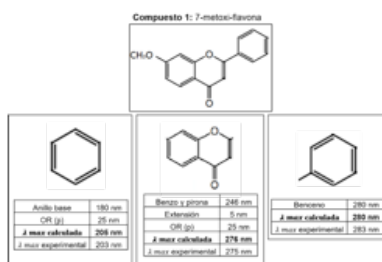


FIGURA 2.

Compuestos aislados de los subextractos etanólico y clorofórmico. Comparación de las $\lambda_{\max}$ calculadas teóricamente siguiendo las reglas de Woodward y Fiester versus las $\lambda_{\max}$ experimentales.

Ensayo de difusión en agar

Durante la observación de las placas después de 24 y 48 horas se determinó que el extracto etanólico a la concentración de 10000 $\mu\text{g/mL}$ demostró actividad para *S. aureus* y *C. albicans*, y actividad parcial para *E. coli*, *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa*. Mientras que a una concentración de 1000 $\mu\text{g/mL}$ solo presenta actividad frente a *C. albicans* y *S. aureus*, y finalmente a una concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$ es parcialmente activo para *S. aureus* (figura 3).

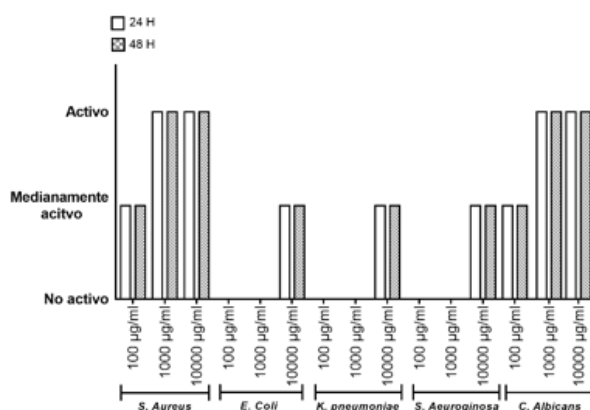


FIGURA 3

Ensayo de dilución en agar extracto alcohólico de *Callistemon speciosus*

DISCUSION DE RESULTADOS

El género *Callistemon*, por encontrarse ampliamente distribuido, ha sido considerablemente estudiado, pudiendo comprobarse varias de las actividades biológicas que se le atribuían²⁵⁻²⁷. Sin embargo, hasta el momento no se ha reportado un análisis fitoquímico del CSEE. Tomando en cuenta esto se realizó un tamizaje fitoquímico inicial, el cual mostró la presencia de varios grupos de metabolitos como son: flavonoides, triterpenos, saponinas y alcaloides. Dicho resultado concuerda con algunos análisis reportados anteriormente para diferentes tipos de *Callistemon*^{28,29}.

Conociendo que las actividades biológicas que presenta un extracto de planta medicinal son atribuidas a la presencia de principios activos, se decidió realizar el aislamiento de compuestos que estuvieran presentes en la planta. Como resultado, con el uso de técnicas cromatografías y predicciones teóricas basadas en el cálculo de longitudes de onda establecidas por la regla de Woodward y Fieser, se logró aislar 3 flavonoides: 7-metoxi-flavona, 7-hidroxi-flavona y miricetina los cuales en estudios previos presentaron diversas actividades biológicas como antiinflamatorios, anticancerígenos, agentes anti-tuberculosis y tripanocidas³⁰⁻³³. Diversos

estudios sobre flavonoides, en el transcurso de los años, han ido verificando su actividad benéfica en el ser humano como agente antiinflamatorio, antioxidante, hepatoprotector entre otros³⁴⁻³⁶. Sin embargo, en los últimos años, dado la importancia de los flavonoides como metabolito secundario en la protección contra microorganismos en las plantas³⁷, se han realizado estudios enfocados en el uso de estos como agentes antimicrobianos comprobando dicha actividad^{38,39}.

Basándonos en la presencia de este tipo de flavonoides en el extracto y suponiendo la presencia de otros tipos, se decidió realizar un análisis microbiológico del extracto etanólico.

La actividad microbiológica fue determinada cualitativamente mediante el ensayo de difusión en agar, el mismo que a pesar de no ser una prueba concluyente sobre la actividad antimicrobiana del extracto, sirve como ensayo preliminar para determinar el poder antibacterial del material vegetal²². En base a los resultados obtenidos en el ensayo microbiológico se puede determinar que el extracto alcohólico de *Callistemon speciosus* presenta actividad antimicrobiana solo a la concentración de 10000 µg/mL sobre *S. aureus* y *C. albicans*, lo cual corrobora las propiedades antibacteriales y antifúngicas del género *Callistemon*^{13,27}. Si bien los compuestos obtenidos no son los mismos reportados en literatura, ya que la mayoría se enfocan en el análisis de los compuestos volátiles, la inhibición presentada frente a *S. aureus* y *E. coli* muestran resultados similares a estudios realizados previamente, pese a realizarse un método de extracción distinto, lo que corrobora el poder antibacteriano de la planta^{27,40}. En cuanto a la inactividad del extracto sobre bacterias Gram-negativas podría estar centrado en la compleja morfología y fisiología en las estructuras de sus membranas y pared celular que atribuyen cierto grado de resistencia frente a los antibacterianos⁴¹.

CONCLUSIONES

El presente estudio es el primero en reportar una caracterización fitoquímica cualitativa del extracto etanólico de *Callistemon speciosus*. Además, mediante un ensayo de difusión en agar se determinó la actividad antimicrobiana a distintas concentraciones sobre bacterias Gram-positivas como el *S. aureus* y cepas de *C. Albicans*. Sin embargo, estos resultados al ser preliminares deberían ser confirmados por técnicas más específicas como HPLC, RMN, MS y MIC.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Romero-Benavides JC, Ruano AL, Silva-Rivas R, Castillo-Veintimilla P, Vivanco-Jaramillo S, Bailon-Moscoso N. Medicinal plants used as anthelmintics: Ethnomedical, pharmacological, and phytochemical studies. 2017 [cited 2017 Oct 6]; Available from: https://ac.els-cdn.com/S0223523417300703/1-s2.0-S0223523417300703-main.pdf?_tid=
2. Molla V, de Marquis R, Yibirín G, Rodríguez R, Moll C, Zahner C, et al. Effectiveness and tolerability of the *Petasites hybridus* leaf extract Ze 339 in the treatment of allergic rhinitis in a paediatric population. *Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica* [Internet]. 2015 [cited 2020 Apr 22];34(1):4–10. Available from: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=55945565001>
3. Castillo YM, Hernández MS, Lares M. Componentes bioactivos del Asai. *Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica* [Internet]. 2017;36(3):58–66. Available from: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=55950806002>
4. Shakeri A, Sahebkar A, Javadi B. *Melissa officinalis* L. - A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *J Ethnopharmacol* [Internet]. 2016;188:204–28. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2016.05.010>
5. Ciangherotti Carlos, Maldonado Ana María, Orsini Giovannina, Perdomo Lourdes, Álvarez Marco, Salazar-Bookaman María Margarita et al. Efecto protector de la raíz de *Ruellia Tuberosa* L. sobre el daño renal inducido

- por la diabetes experimental. AVFT [Internet]. 2013 Dic [citado 2020 Abr 23]; 32(4):57-66. Disponible en: http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-02642013000400001&lng=es.
6. Gyllenhaal C, Kadushin MR, Southavong B, Sydara K, Bouamanivong S, Xaiveu M, et al. Ethnobotanical approach versus random approach in the search for new bioactive compounds: Support of a hypothesis. *Pharm Biol.* 2012;50(1):30–41.
 7. Guerrero, Yudith, Omaña, Betty, Rodríguez-Acosta, Alexis, Sobre un caso de intoxicación por el uso de la planta de estropajo o tusa (*Luffa cylíndrica*) en Venezuela. *Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica* [Internet]. 2015;34(4):58-61. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=55949313003>
 8. Haque ME, Sultana A, Shibib BA, Islam MM. Antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activities of *Callistemon citrinus* (Curtis) skeels. *Dhaka Univ J Pharm Sci.* 2012;11(1):51–4.
 9. Quijano-Célis C, Gaviria M, Vanegas-López C, Pino JA. Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil of *callistemon viminalis* (gaertn.) g. don leaves from Colombia. *J Essent Oil-Bearing Plants.* 2010;13(6):710–6.
 10. Arora DS, Nim L, Kaur H. Antimicrobial Potential of *Callistemon lanceolatus* Seed Extract and its Statistical Optimization. *Appl Biochem Biotechnol* [Internet]. 2016;180(2):289–305. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s12010-016-2099-3>
 11. Güette-Fernández J, Olivero-Verbel J, O'byrne-Hoyos I, Jaramillo B, Stashenko E. Chemical composition and toxicity against artemia franciscana of the essential oil of *callistemon speciosus* (Sims) DC. Collected in bogota (Colombia). *J Essent Oil Res.* 2008;20(3):272–5.
 12. Guerra C, Meccia G, Khouri N, Rojas L. Estudio comparativo de los aceites esenciales de *Callistemon speciosus* DC . recolectado en los Estados Carabobo , Lara y Mérida (Venezuela). *Rev la Fac Farm.* 2003;45(2):51–3.
 13. Pino JA, Rodríguez DK, Beldarraín T. Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil of *Callistemon speciosus* (Sims) DC. leaves from Cuba. *J Essent Oil Res* [Internet]. 2013;25(5):418–22. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/10412905>.
 14. Brophy JJ, Goldsack RJ, Forster PI, Craven LA, Lepschi BJ. The leaf essential oils of the australian members of the genus *callistemon* (myrtaceae). *J Essent Oil Res.* 1998;10(6):595–606.
 15. Sarker SD, Latif Z, Gray AI. Natural Product Isolation. In: *Natural Products Isolation* [Internet]. Totowa, NJ: Humana Press; 2006 [cited 2018 Oct 29]. p. 1–25. Available from: <http://link.springer.com/10.1385/1-59259-955-9:1>
 16. Woodward RB. Structure and the Absorption Spectra of α,β -Unsaturated Ketones. *J Am Chem Soc.* 1941;63:1123–6.
 17. Woodward RB. Structure and Absorption Spectra. III. Normal Conjugated Dienes. *J Am Chem Soc.* 1942;64:72–5.
 18. Biemer JJ. *Annals of clinical & laboratory science.* *Ann Clin Lab Sci* [Internet]. 1973;3(2):135–40. Available from: <http://www.anncinlabsci.org/content/3/2/135.short>
 19. Jan H. Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol [Internet]. 2009. Available from: www.atcc.org
 20. Taroco R, Seija V, Vignoli R. Temas de bacteriología y virología médica Métodos de estudio de la sensibilidad antibiótica. 2010;(Cim):10. Available from: <http://www.higiene.edu.uy/bacvir/materiales/cefa/2008/BacteCEFA36.pdf>
 21. Ncube N, Afolayan A, Okoh A. Assessment techniques of antimicrobial properties of natural compounds of plant origin: current methods and future trends. *African J Biotechnol* [Internet]. 2008;7(12):1797–806. Available from: <http://www.academicjournals.org/AJB>
 22. Ramirez LS, Marin Castaño D. Metodologías 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. *Sci Tech.* 2009;(42):263–8.
 23. Corrales Ramírez L, Castillo Castañeda A, Vargas AM. Evaluación del potencial antibacterial in vitro de *Croton lechleri* frente a aislamientos bacterianos de pacientes con úlceras cutáneas. *NOVA* [Internet].

2013;11(9). Available from: http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S1794-24702013000100006&script=sci_abstract&tlng=es

24. Gomber C, Saxena S. Anti-staphylococcal potential of *Callistemon rigidus*. *Cent Eur J Med*. 2007;2(1):79–88
25. Salem MZM, Ali HM, El-Shanhorey NA, Abdel-Megeed A. Evaluation of extracts and essential oil from *Callistemon viminalis* leaves: Antibacterial and antioxidant activities, total phenolic and flavonoid contents. *Asian Pac J Trop Med*. 2013;6(10):785–91.
26. Kavitha KS, Satish S. Bioprospecting of some medicinal plants explored for antifungal activity. *Pharmacogn J*. 2016;8(1):59–65.
27. Tiwari U, Jadon M, Nigam D. Evaluation of Antioxidant and Antibacterial Activities of Methanolic Leaf Extract of *Callistemon Viminalis*. 2014;2:1–12.
28. Ali N, Ahmed G, Ali Shah SW, Shah I, Ghias M, Khan I. Acute toxicity, brine shrimp cytotoxicity and relaxant activity of fruits of *callistemon citrinus curtis*. *BMC Complement Altern Med*. 2011;11:1–8.
29. Zemanova L, Hofman J, Novotna E, Musilek K, Lundova T, Havrankova J, et al. Flavones Inhibit the Activity of AKR1B10, a Promising Therapeutic Target for Cancer Treatment. *J Nat Prod*. 2015;78(11):2666–74.
30. Jin Z, Yang YZ, Chen JX, Tang YZ. Inhibition of pro-inflammatory mediators in RAW264.7 cells by 7-hydroxyflavone and 7,8-dihydroxyflavone. *J Pharm Pharmacol*. 2017;69(7):865–74.
31. Lin YM, Zhou Y, Flavin MT, Zhou LM, Nie W, Chen FC. Chalcones and flavonoids as anti-tuberculosis agents. *Bioorganic Med Chem*. 2002;10(8):2795–802.
32. Ambrozín ARP, Vieira PC, Fernandes JB, Fernandes Da Silva MFDG, De Albuquerque S. Trypanocidal activity of Meliaceae and Rutaceae plant extracts. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2004;99(2):227–31.
33. B.H. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids [Internet]. Vol. 96, Pharmacology and Therapeutics. 2002. 67–202 p. Available from: <http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=emed5&NEWS=N&AN=2002423363>
34. Harborne JB, Williams CA. Review Advances in Flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*. 2000;55:481–504.
35. Maggioni D, Biffi L, Nicolini G, Garavello W. Flavonoids in oral cancer prevention and therapy. *Eur J Cancer Prev*. 2015;24(6):517–28.
36. Piasecka A, Jedrzejczak-Rey N, Bednarek P. Secondary metabolites in plant innate immunity: Conserved function of divergent chemicals. *New Phytol*. 2015;206(3):948–64.
37. Tsuchiya H. Membrane interactions of phytochemicals as their molecular mechanism applicable to the discovery of drug leads from plants. *Molecules*. 2015;20(10):18923–66.
38. Christena LR, Subramaniam S, Vidhyalakshmi M, Mahadevan V, Sivasubramanian A, Nagarajan S. Dual role of pinostrobin-a flavonoid nutraceutical as an efflux pump inhibitor and antibiofilm agent to mitigate food borne pathogens. *RSC Adv*. 2015;5(76):61881–7.
39. Kavitha KS, Satish S. Antibacterial activity of *Callistemon lanceolatus* DC. against human and phytopathogenic bacteria. *J Pharm Res*. 2013;7(3):235–40.
40. Kajangwe V, Chalchat J, Rutayisire J, Ndagijimana A, Mukazayire M, Duez P. Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil of *Callistemon speciosus* (Sims) DC. growing in Rwanda. *Planta Med*. 2008;74(09):1084927.
41. Silhavy TJ, Kahne D, Walker S. The bacterial cell envelope. [Internet]. Vol. 2, Cold Spring Harbor perspectives in biology. 2010 [cited 2019 Sep 3]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2857177/>