

Isolering en karakterisering van antibakteriese verbindings uit blare van *Combretum apiculatum* subsp. *apiculatum*

Authors:

David R. Katerere^{1,2}, Andrew Serage¹, Jacobus N. Eloff^{1*}

Affiliations:

¹ Fitomedisyne Program, Dept Parakliniese Wetenskappe, Fakulteit van Veeartsenykunde, Universiteit van Pretoria

² Permanente adres:

Dept Farmaseutiese Wetenskappe, Tshwane Universiteit van Tegnologie, Pretoria

Corresponding author:

JN Eloff
kobus.eloff@up.ac.za

Dates:

Received: 24/10/2017

Accepted: 07/11/2018

Published: 06/12/2018

How to cite this article:

David R. Katerere, Andrew Serage, Jacobus N. Eloff, Isolering en karakterisering van antibakteriese verbindings uit blare van *Combretum apiculatum* subsp. *apiculatum*, *Suid-Afrikaanse Tydskrif vir Natuurwetenskap en Tegnologie* 37(1) (2018)

An English copy of this paper is available online at <http://www.satnt.ac.za/index.php/satnt/article/view/665>

Copyright:

© 2018. Authors. Licensee: *Die Suid-Afrikaanse Akademie vir Wetenskap en Kuns*. This work is licensed under the Creative Commons Attribution License.

Doel: Om antibakteriese verbindings te isoleer en die aktiwiteit van ekstrakte, fraksies en antibakteriese verbindings uit *Combretum apiculatum* subsp. *apiculatum* blare teen vier belangrike bakteriese patogene *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* en *Pseudomonas aeruginosa* te bepaal.

Metodes en Resultate: Die aktiwiteit van tien organiese en watererige ekstrakte van blare teen *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* en *Pseudomonas aeruginosa* is bepaal deur 'n reeksverduunnings in mikroplate en bio-outografie met p-jodonitrotetrazolium pers (INT) as aanduider van groei. Die asetonekstrak het die hoogste aktiwiteit gehad en is gebruik om die antibakteriese verbindings te isoleer en te karakteriseer. Drie bekende flavonoiede- flavokawein, alpinetin en pinesembrien was verantwoordelik vir die aktiwiteit.

Gevolgtrekkings: Die flavonoiede wat vir die eerste keer uit hierdie spesie geïsoleer is, was redelik aktief teen die twee Gram-positiewe bakterieë *Staphylococcus aureus* en *Enterococcus faecalis* met minimum inhiberende konsentrasies (MIK) van 40 µg/ml. Die etieleter en etielasetaat ru-ekstrakte het dieselfde aktiwiteit teen *E. faecalis* gehad as die geïsoleerde verbindings wat daarop dui dat daar sinergistiese interaksies tussen verbindings in die ekstrak was.

Impak van die navorsing: Lede van die Combretaceae word wyd in Afrika en Asië gebruik vir medisinale doeleindes. Die navorsing ondersteun die tradisionele gebruik teen infeksies en dui ook daarop dat dit meer voordelig is om ekstrakte te gebruik as die geïsoleerde antibakteriese verbindings.

Isolation and characterisation of antibacterial compounds from *Combretum apiculatum* subspecies *apiculatum* (Combretaceae) leaves:

Aims: To isolate the antibacterial compounds and to investigate the activity of extracts of, and the antibacterial flavonoids isolated from leaves of *Combretum apiculatum* against four important community-acquired and nosocomial bacterial pathogens viz. *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*.

Methods and results: Ten organic and aqueous extracts of the leaf powder of *Combretum apiculatum* Sond subsp. *apiculatum* Exell were initially tested against *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. coli* and *P. aeruginosa* using a serial dilution microtitre plate and bioautography assays using p-iodonitrotetrazolium violet (INT) as indicator of growth. The acetone extract was the most potent and selected for further bioassay-guided fractionation of antibacterial compounds which resulted in the isolation of three known flavonoids viz. flavokawain, alpinetin and pinocembrin.

Conclusions: The flavonoids which were isolated from *C. apiculatum* for the first time were moderately active against *S. aureus* and *E. faecalis* with MICs of 40 µg/ml. Ethyl ether and ethyl acetate extracts were equally active against *E. faecalis* pointing to synergistic effects of phytochemical constituents in exerting antibacterial activity.

Significance and impact of the research: The Combretaceae taxa are important materia medica in Africa and Asia. The results confirm the validity of using *C. apiculatum* crude extracts against bacterial infections and the superiority of extracts over isolated individual compounds.

Keywords: Combretaceae; *Combretum apiculatum*; flavonoids; flavones; Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (NMR); antibacterial; bioautography

Inleiding

Die ontwikkeling van antimikrobiële geneesmiddels is een van die belangrikste ontwikkelings in moderne medisyne (Katzung 1998). Die irrasionele gebruik van antibiotika het egter gelei tot die ontwikkeling van weerstandige mikroorganismes.

Die gebruik van plantekstrakte in verskillende vorms het die afgelope twee dekades meer populêr geraak. Verskeie publikasies op lede van die Combretaceae het aangedui dat baie spesies goeie antibakteriese aktiwiteit het wat moontlik terapeuties toegepas kan word (Katerere et al. 2003; Martini et al. 2004; Eloff et al. 2008).

Die Combretaceae familie bestaan uit 18 genera wat wyd verspreid in Afrika, Asië en die Amerikas voorkom (Exell 1970). Die twee grootste genera *Combretum* en *Terminalia* bestaan uit 370 en 200 spesies onderskeidelik en albei word wyd gebruik in tradisionele medisyne in Afrika en Asië (Rogers and Verotta 1995).

In hierdie studie is fyngepoëerde blare van *C. apiculatum* ge-ekstraheer met 10 oplosmiddels met wisselende polariteite en die antibakteriese aktiwiteit teen verskillende bakterieë is bepaal deur bio-outografie en reeksverdunding in mikrotiterplate. Die mees aktiewe ekstrak is daarna gefraksioneer en drie antibakteriese flavonoïede is geïsoleer.

Materiaal en Metodes

Chemikalieë

Alle chemikalieë, benewens die ekstaheermiddels, was van analitiese kwaliteit en is aangekoop van Merck (Darmstadt, Duitsland). *p*-Jodonitrotetrasolium pers is aangekoop van Sigma-Aldrich, Duitsland.

Versameling van plantmateriaal

Blare van *Combretum apiculatum* Sond subsp. *apiculatum* Exell is versamel van 'n boom in die Laeveld Nasionale Botaniese Tuin, Nelspruit, Suid-Afrika. 'n Verwysingseksemplaar is in die herbarium van die Universiteit van Pretoria geplaas. Die blare is binnenshuis vir twee maande by kamertemperatuur gedroog en daarna fyn verpoëier met 'n Junkel and Kunkel Model A10 meule. Dit is reeds bewys dat gedroogde blare van *Combretum erythrophyllum* na 90 jaar geen antibakteriese aktiwiteit verloor het nie (Eloff 1999a).

Vir voorlopige analise is 0.5 g van die blaarpoeier ge-ekstraheer met 5 ml oplosmiddel in 'n sentrifugeerbuis deur baie deeglik te skud en daarna te sentrifugeer teen 3000 x g vir 5 minute volgens metodes reeds voorheen getoets vir effektiwiteit (Eloff, 1998a; Kotze and Eloff, 2002). Die ekstraksieproses is twee keer herhaal. Tien oplosmiddels van tegniese gehalte, (aangekoop van Merck, Darmstad) is gebruik nl. i.e. heksaan, isopropieleter, dietieleter, meti-leendichloried, etielasetaat, tetrahydrofuran, aseton, metanol, etanol en water.

Die asetonekstrak was die mees aktiewe met die laagste minimum inhiberende konsentrasie (MIK). Dit het ook die meeste antibakteriese verbindings gehad op bio-outogramme. Om die aktiewe verbindings te isoleer is groot-skaal ekstraksie met 'n aseton tot poeier verhouding van 10:1 gebruik (Martini en Eloff, 1998). Dit is opgevolg deur die oplosmiddel-oplosmiddel fraksionering (Suffness en Douros 1979; Martini and Eloff, 1998). Vir die fraksionering is gelyke volumes gebruik en herhaal om effektiewe skeiding te bewerkstellig. Die ekstrakte is gefiltreer en onder vakuum gedroog (Büchi, Duitsland). Die chloroform fraksie het die beste aktiwiteit gehad en is verder gebruik om die aktiewe verbindings te ekstraheer.

Chromatografie

Die gedroogde chloroformfraksie is op 20x10 cm Silica Gel 60 DLC F254 Merck plate gelaai en ontwikkel met chloroform:etielasetaat:mieresuur (CEF) (5:4:1), benseen:etanol:ammonia (BEA) (36:4:0.4) en etielasetaat:metanol:water (EMW) (40:5.4:4.0) (Kotze and Eloff 2002). Vyf µl van 'n 20 mg/ml oplossing (d.w.s. 100 µg) is aangewend in 'n dun streep c.1 cm wyd en ontwikkel vir c. 9 cm in verseelde dunlaagchromatografie tenks. Die geskeide komponente is ondersoek onder 254 nm and 360 nm golflengte lig met 'n UV ligbron. Chromatogramme is daarna gespuut met vanillien-swawelsuur of anysaldehid- swawelsuur en teen 100°C verhit tot optimale kleurentwikkeling.

Silikagelkolomchromatografie is gebruik om aktiewe verbindings deur aktiwiteit-geleide fraksionering te isoleer. Kolomme is gepak met Silikagel 60 (0.040-0.063 mm, Merck) en is ge-elueer met heksaan gevolg deur toenemende dichlorometaankonsentrasies en daarna toenemende konsentrasies metanol. Fraksies van 50 ml is versamel, gekonsentreer onder 'n koue lugstroom en daarna geanaliseer deur dunlaagchromatografie. Fraksies met ooreenstemmende samestellings is saamgevoeg en die antibakteriese aktiwiteit is bepaal. Aktiewe fraksies is daarna weer aan kolomchromatografie blootgestel totdat suiwer oplossings van die antibakteriese verbindings wat nie deur DLC geskei kon word nie, geïsoleer is. Die Rf waardes van antibakteriese verbinding bepaal deur bio-outografie het gehelp om die aktiewe verbindings te isoleer.

Spektroskopiese analise

Kernmagnetiese resonansspektra is op 'n 300 MHz Varian instrument (Oxford Instruments) by die Medunsa kampus van die Universiteit van Limpopo uitgevoer. Massaspektroskopie is uitgevoer by die Kaapse Tegnikon op 'n VG70-SEQ (Micromass, UK) instrument.

Bepaling van antimikrobiële aktiwiteit

Twee Gram positiewe bakterieë, *Staphylococcus aureus* (ATCC 292163) en *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) en twee Gram negatiewe bakterieë, *Escherichia coli* (ATCC 27853) en *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 25922) is gebruik met 'n wyd-gebruikte metode met *p*-jodonitrotetrasolium pers (INT) as indikator van groei. (Eloff, 1988).

'n Direkte bio-outografiese metode is gebruik om die aantal verbindings aktief teen *S. aureus* en *E. coli* te bepaal (Masoko and Eloff, 2006). Chromatogramme is in 'n stroom lug geplaas om die eluermiddels te verwyder en daarna gespuit met 'n digte kultuur van die relevante bakterieë, oornag ge-inkubeer teen 37°C en gesprei met 0.2 mg/ml p-jodonitrotetrazolium pers (INT) (Sigma). Om die MIK te bepaal is 'n reeksverdunding mikroplaattegniek met INT as indikator van groei gebruik (Eloff 1998b). Gentamisien is as positiewe kontrole en asetoon as negatiewe kontrole gebruik.

Resultate

Ekstraksie doeltreffendheid

Tetrahidrofuraan en asetoon het die grootste massa uit die blare ge-ekstraheer met 14% en 13% respektiewelik. Dit vergelyk redelik met die 16.2% vir asetoon uit dieselfde spesie wat vroeër bepaal is (Eloff, 1999b). Water het slegs 0.8% van die oorspronklike massa blare ekstraheer.

Antibakteriese aktiwiteit

Die aantal antibakteriese verbindings in elke ekstrak is bepaal deur bio-outografie teenoor *S. aureus* en *E. coli*. (Resultate nie aangedui nie). Teenoor *E. coli* in die isopropieleter en etieleter en tot 'n mindere mate in die metileendichloried- en etielsetaatektrakte is daar twee aktiewe verbindings geskei. Teenoor *S. aureus* is daar ten minste drie aktiewe verbindings geskei.

Asetoon, tetrahidrofuraan en etielsetaat het beter resultate opgelewer as die ander oplosmiddels. Die aktiewe verbindings sou waarskynlik intermediêre polariteit hê. Die waterekstrak het prakties geen antibakteriese aktiwiteit gehad nie. Die ander ekstrakte was aktief teen beide Gram-positiewe en Gram-negatiewe bakterieë.

Die totale aktiwiteit is 'n maatstaf om ekstrakte van verskillende plante te vergelyk. Dit neem nie net die MIK in aanmerking nie, maar ook die massa wat uit een gram plantmateriaal ge-ekstraheer is. Dit word bereken deur die

massa in mg van een gram plantmateriaal ge-ekstraheer te deel met die MIK in mg/ml (Eloff, 2000 en 2004). Die waarde kan ook gebruik word om verskillende ekstraheermiddels te vergelyk. Die gemiddelde totale aktiwiteit teenoor die vier bakterieë het gewissel van 3 ml/g vir water tot 764 ml/g vir die asetoonektrakte (Tabel 2). Die asetoonekstrak was veral aktief teenoor *E. coli* (1433 ml/g). Die etielsetaatekstrak het 'n hoë totale aktiwiteit gehad teenoor *E. faecalis* (1075/g ml). Dit beteken dat die hoeveelheid ge-ekstraheer uit 1 g blare deur asetoon kan verdun word tot 1433 ml en dit sal nog die groei van *E. coli* inhibeer.

Isolering van antibakteriese verbindings

Omdat asetoon die hoogste totale aktiwiteit gehad het en vir verskeie ander redes, soos lae toksisiteit teen mikroorganismes (Eloff 1998a) is asetoon verkies as die oplosmiddel om die aktiewe verbindings te isoleer.

Herhaalde kolomchromatografie het gelei tot die isolering van drie verbindings aangedui as CA-1, CA-2 en CA-3. Die chemiese struktuur is opgeklare deur KMR en massaspektrometrie (Figuur 1). Die KMR spektra van die verbindings het ooreenkomste gehad en was tipies van flavonoïede met 'n heterosikliese ring met drie koolstofatome, C-2 wat resoneer tussen 71-80 dpm, alifatiese metileen, C-3 wat resoneer tussen 39-47 dpm en 'n karbiniel, C-4 tussen 186 en 199 dpm (Agrawal 1989). Gebaseer op die KMR spektra en HEIMS gegewens en in vergelyking met die literatuur is die strukture opgeklare as 4'-Hidroksi-2',6'-dimetoksikalkoon (flavokawaien-A) (CA-1) (Wollenweber and Siegler, 1982; Nascimento and Mors, 1972), 5-Metoksi-7-hidroksiflavanon (alpinetien) (CA-2) (Jiang et al, 2001) and 5,7 - Dihidroksiflavanon (pinosembrien) (CA-3) (Itokawa, 1981).

Die antibakteriese aktiwiteit van die verbindings was laag teenoor die Gram negatiewe bakterieë (Tabel 1). Die beste aktiwiteite met MIKs van 40 µg/ml was vir CA-1 and CA-2 teenoor *S. aureus* en CA-2 and CA-3 teenoor *E. faecalis*.

TABEL 1. MIK waardes (µg/ml) van 10 *C. apiculatum* blaarektrakte en verbindings geïsoleer teenoor vier bakteriespesies.

	HE	IE	EE	MD	EA	TF	AC	ET	ME	WA	CA-1*	CA-2*	CA-3*
<i>E. coli</i>	600	100	100	100	100	100	100	100	100	600	300	130	300
<i>P. aeruginosa</i>	300	200	200	200	100	600	600	200	100	250	400	40	40
<i>E. faecalis</i>	300	100	40	200	40	200	200	300	300	500	600	250	130
<i>S. aureus</i>	600	200	200	200	200	200	200	200	100	130	40	40	80

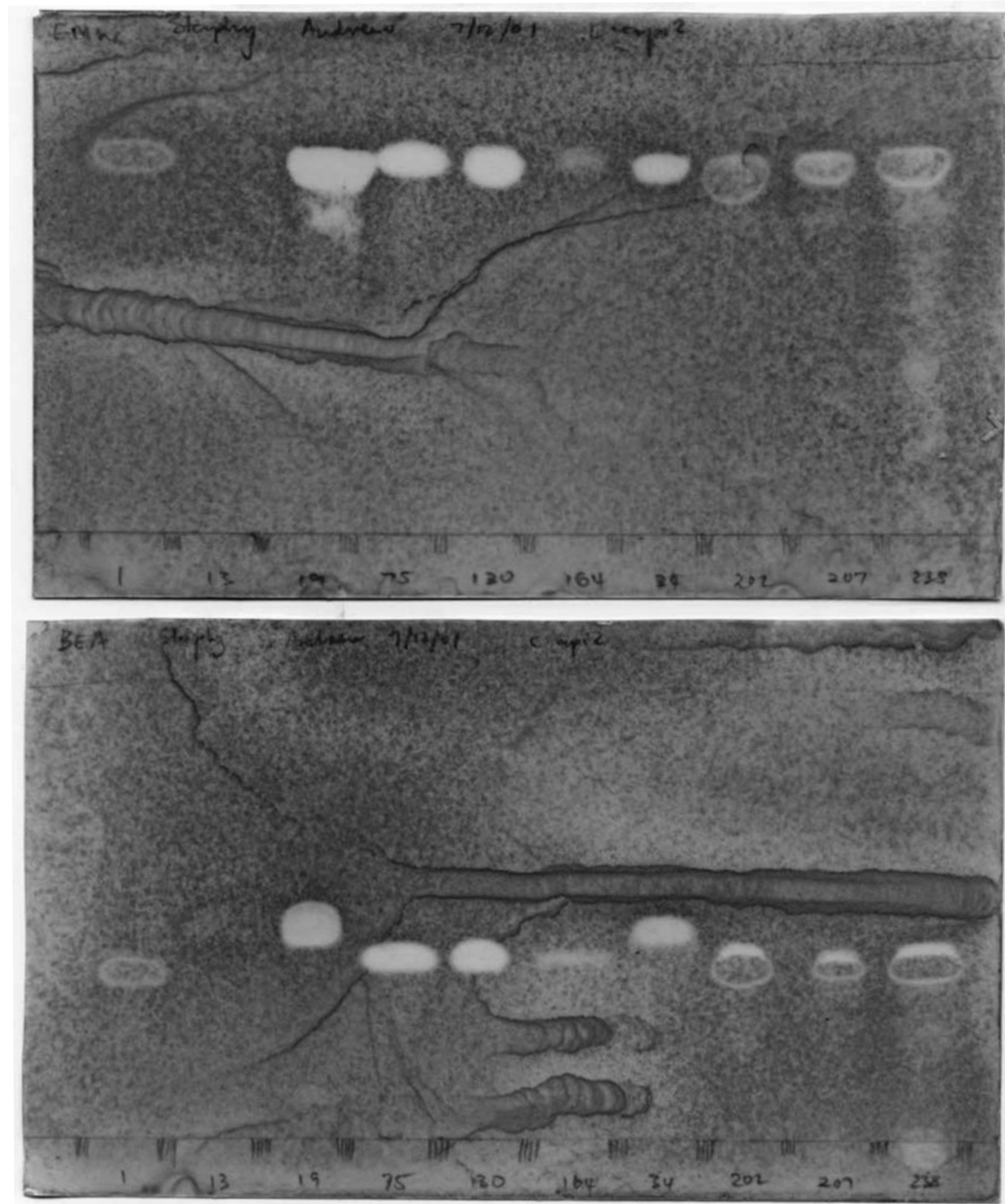
IE-isopropieleter, EE-etieleter, MD-metileendichloried, EA-etielsetaat, TH-tetrahidrofuraan, AC-asetoon, ET-etanol, ME-metanol, HE-heksaan, WA-water.

CA-1 - flavokawaien-A, CA-2 - alpinetien, CA-3 - pinosembrien, * verbindings geïsoleer

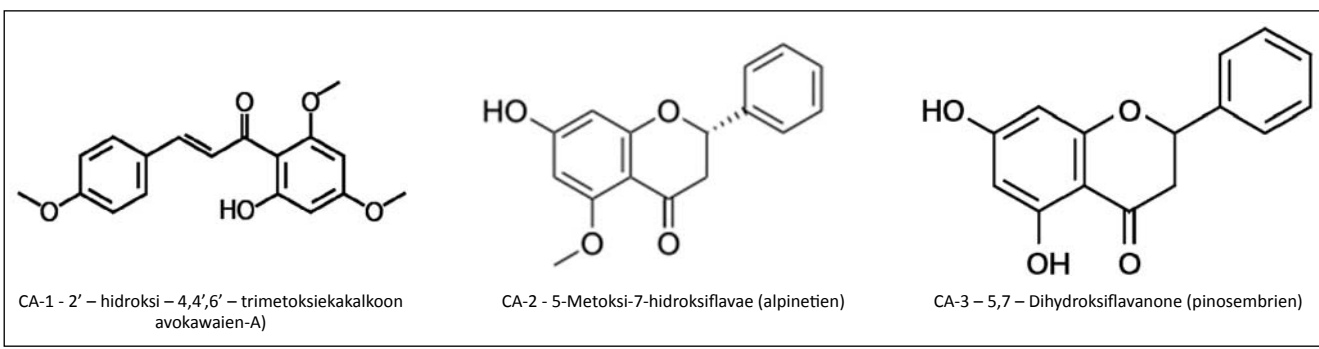
#Gentamisien die positiewe kontrole het 'n MIK van 0.02 tot 0.6 gehad, daar was geen groei-inhibering met asetoon alleen nie

TABEL 2: Totale aktiwiteit in ml/g van *C. apiculatum* blaarektrakte, ge-ekstraheer met tien verskillende oplosmiddels teen verskillende bakterieë. IE-isopropieleter, EE-etieleter, MD-metileendichloried, EA-etielsetaat, TH-tetrahidrofuraan, AC-asetoon, ET-etielsetaat, ME-metanol, HE-heksaan, WA-water.

Oplosmiddels	HE	IE	EE	MD	EA	TH	AC	ET	ME	WA
<i>E. coli</i>	19	307	358	588	537	163	1433	486	256	6
<i>P. aeruginosa</i>	38	153	179	294	537	204	179	243	255	2
<i>E. faecalis</i>	38	307	716	294	1075	819	717	121	64	1
<i>S. aureus</i>	19	153	179	294	268	820	717	243	256	3
Gemiddelde	29	230	358	368	604	502	762	273	208	3



FIGUUR 1: Bioautogramme van gekombineerde fraksie wat die RF waardes van geskeide verbindings deur EMW and BEA teen *Sus* aandui.



FIGUUR 2: Strukture van drie antibakteriese flavanoiede geïsoleer uit blare van *Combretum apiculatum* subsp. *apiculatum*

Bespreking

Plante beskerm hulleself teen aanvalle van fungi en bakterieë deur induseerbare fitoalleksiene te vorm indien daar 'n infeksie is of deurdat hulle voortdurend fitoantisiptiene bevat (González-Lamothe et al. 2009). Dit verklaar waarom hoër plante ondersoek word om antibiotiese verbindings te ontdek wat tot nuwe antibiotika mag lei.

Escherichia coli was die sensitiefste teen die verskillende ekstrakte met 'n MIK meestal van 100 µg/ml en *S. aureus* was meer weerstandig. Die mees polêre water en nie-polêre oplosmiddel heksaan het die laagste aktiwiteit gehad. Ander outeurs het dieselfde bevind (Martini et al. 2004). Die asetoonekstrak en hiervan die chloroform fraksie is verkies om die aktiewe verbindings te isoleer.

Die aktiwiteit van die geïsoleerde flavonoïede was in dieselfde orde as die flavonoïede uit *C. erythrophyllum* (Martini et al, 2004a). Pinosembrien is een van die verbindings wat verantwoordelik is vir die antibakteriese aktiwiteit van heuning (Katerere et al. 2003). Die antibakteriese aktiwiteit van flavonoïede word wyd aanvaar (Cushnie and Lamb 2005). Teenstrydighede in die literatuur kan toegeskryf word aan die metodes soos agar diffusie en holte-plaat diffusie wat gebruik word om die antibakteriese aktiwiteit te bepaal (Cushnie and Lamb 2005). Die metode wat hier gebruik is, is nie afhanklik van diffusie in 'n agarmatriks nie.

Struktuur-altiwiteit verwantskappe is betekenisvol in die antibakteriese aktiwiteit van fenoliese verbindings. Die 2',4'-or 2',6'-dihidrosilering van 5,7 -dihidroksileerde flavanone bv.alpenitien is belangrik vir aktiwiteit teen metisillien-weerstandige *S. aureus*. Kalkone het ook oor die algemeen hoër aktiwiteit as flavone en flavonone. Die resultate hier behaal teenoor *S. aureus* met hoër aktiwiteit van die kalkoon flavokawein as die flavone alpinetien en pinosembrien ondersteun die gevolgtrekking van Cushnie and Lamb (2005).

Alhoewel geen nuwe verbindings in hierdie studie geïsoleer is nie, is die resultate tog interessant. Dit is interessant dat die etielasetaat en etieleter ekstrakte 'n baie hoër aktiwiteit (40 µl/ml) gehad het teen *E. faecalis* as die drie geïsoleerde verbindings (130, 250 en 600 µg/ml) (Tabel 1). Die belangrikste verbinding wat aktief was teenoor *E. faecalis* het dieselfde Rf waarde gehad as die geïsoleerde verbindings. Die verklaring is waarskynlik dat daar sinergistiese aktiwiteit is tussen verskillende verbindings in die plantekstrakte. Soortgelyke resultate is behaal met twee ander *Combretum* spesies (Martini et al. 2004; Angeh et al. 2007). Sinergie tussen flavonoïede onderling en met antibiotika is reeds gerapporteer (Sato et al. 2004; Lin et al. 2005). Sekere fitochemiese verbindings is al as "antibiotiese potensieerders" bestempel wat werk deur efflukspompe te beïnvloed of tot hipersensitering kan lei deur hoër ioniese sterkte of lae osmotiese potensiaal (González-Lamothe et al. 2009).

Die resultate bevestig die waarde om ekstrakte eerder as geïsoleerde verbindings te gebruik teen bakteriese infeksies. Verdere werk kan oorweeg word om die interaksie tussen ekstrakte of die geïsoleerde verbinding met bestaande antibiotika te ondersoek. Weerstandbiedende organismes mag dalk hierdeur gesensitiseer word. Dit mag toepassing vind in lae-koste behandeling nadat geneesmiddel-plant interaksies en farmokinetiese studies afgehandel is.

Erkennings

Mnr Nkosinathi Freddy Makhubalo van Medunsa het die NMR spektra bepaal. Die NNS het die navorsing befonds. Die kurator Johan Kluge van die Laeveld nasionale Botaniese Tuin in Nelspruit, Mpumalanga het ons toegelaat om blare te versamel.

Verwysings

- Agrawal, P. (1989) Studies in Organic Chemistry 39. Carbon-13 NMR of Flavonoids. Amsterdam: Elsevier.
- Angeh, J.E., Huang, X., Sattler, I., Swan, G.E., Dahse, H., Hartl, A. and Eloff, J.N. (2007) Antimicrobial and anti-inflammatory activity of four known and one new triterpenoid from *Combretum imberbe* (Combretaceae). *Journal of Ethnopharmacology* 110, 56-60.
- Cushnie, T.P.T. and Lamb, A.J. (2005) Antimicrobial activity of flavonoids. *Int J of Antimicrob Agents* 26, 343 - 356.
- Eloff, J.N. (1998a) Which extractant should be used for the screening and isolation of antimicrobial components from plants? *Journal of Ethnopharmacology* 60, 1-8
- Eloff, J.N. (1998b) A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. *Planta Med* 64, 711-713.
- Eloff, J.N. 1999a It is possible to use herbarium specimens to screen for antibacterial components in some plants. *Journal of Ethnopharmacology* 67, 355-360.
- Eloff J.N. 1999b The antibacterial activity of 27 southern African members of the Combretaceae. *South African Journal of Science* 95, 148-152
- Eloff J.N. 2000 A proposal on expressing the antibacterial activity of plant extracts a small first step in applying scientific knowledge to rural primary health care in South Africa. *South African Journal of Science* 96,116-118
- Eloff J.N. [2004] Quantifying the bioactivity of plant extracts during screening and bioassay-guided fractionation. *Phytomedicine* 11, 370-371
- Eloff, J.N., Katerere, D.R. and McGaw, L.J. (2008) The biological activity and chemistry of the southern African Combretaceae. *Journal of Ethnopharmacology* 119, 686-699.
- Exell, A.W. (1970) Summary of the Combretaceae of Flora Zambesiaca. *Kirkia* VII, 159 -223.
- Gelfand, M., Mavi, S., Drummond, R. and Ndemera, B. (1993) The traditional medical practitioner in Zimbabwe Gweru: Mambo Press. .
- González-Lamothe, R., Mitchell, G., Gattuso, M., Diarra, M., Malouin, F. and Bouarab, K. (2009) Plant Antimicrobial Agents and Their Effects on Plant and Human Pathogens. *International Journal of Molecular Sciences* 10, 3400-3419.
- Hutchings, A., Scott, A., Lewis, G. and Cunningham, A. (1996) *Zulu Medicinal Plants - An inventory* Pietermaritzburg University of Natal Press.
- Katerere, D.R., Gray, A.I., Nash, R.J. and Waigh, R.D. (2003) Antimicrobial activity of pentacyclic triterpenes isolated from African Combretaceae. *Phytochemistry* 63, 81-88.
- Katzung, B. (1998) Basic and clinical pharmacology. Principles of antimicrobial drug action. New York McGraw-Hill Medical.
- Kotze, M. and Eloff, J.N. (2002) Extraction of antibacterial compounds from *Combretum microphyllum* (Combretaceae). *South African Journal of Botany* 68, 62-67.
- Lin, R.-D., Chin, Y.-P. and Lee, M.-H. (2005) Antimicrobial activity of antibiotics in combination with natural flavonoids against clinical extended-spectrum β-lactamase (ESBL)-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Phytotherapy Research* 19, 612-617.
- Martini, N.D., Katerere, D.R. and Eloff, J.N. (2004) Biological activity of five antibacterial flavonoids from *Combretum erythrophyllum* (Combretaceae). *Journal of Ethnopharmacology* 93, 207-212.

Masoko P and Eloff JN (2006) Bioautography indicates the multiplicity of antifungal compounds from twenty-four southern African Combretum species (Combretaceae). African Journal of Biotechnology 5, 1625-1647

Rogers, C.B. and Verotta, L. (1995) Chemistry and biological properties of the African Combretaceae. In Chemistry, Biological and Pharmacological properties of African medicinal plants Proceedings of the first International IOCD Symposium ed. In: Hostettmann, K., Chinyanganya, F., Maillard, M., Wolfender, J.-L. : UZ Publications.

Sato, M., Tanaka, H., Oh-Uchi, T., Fukai, T., Etoh, H. and Yamaguchi, R. (2004)

Antibacterial activity of phytochemicals isolated from Erythrina zeyheri against vancomycin-resistant enterococci and their combinations with vancomycin. Phytotherapy Research 18, 906-910.

Suffness, M. and Douros, J. (1979) Drugs of plant origin Methods in Cancer Research 16 73126

Thembo, K.M., Vismer, H.F., Nyazema, N.Z., Gelderblom, W.C. and Katerere, D.R. (2010) Antifungal activity of four weedy plant extracts against selected mycotoxigenic fungi. J Appl Microbiol 1, 1479-1486.

