

# ACTIVIDAD ANTIFUNGICA Y ANTIBACTERIANA DE *Ageratina ibaguensis*

ANTONIO SANABRIA GALINDO\*  
GERMÁN RICARDO SARMIENTO\*  
MÁXIMO AUGUSTO RODRÍGUEZ\*

## RESUMEN

De la parte aérea de *Ageratina ibaguensis* (Schultz-Bip. ex Hieron) R.M. King & H. Robinson se aisló un terpenoide que presentó actividad antimicrobiana. La concentración crítica antifúngica está comprendida entre 500 y 2.000 mcg/ml y la actividad antibacteriana entre 190-930 mcg/ml.

## SUMMARY

From the aerial part of *Ageratina ibaguensis* (Schultz-Bip. ex Hieron) R.M. King & H. Robinson, a terpenoid, which presented antimicrobial activity was isolated. The critical antifungal concentration was found between 500 and 2.000 mcg/ml and the antibacterial activity between 190-930 mcg/ml.

## INTRODUCCION

Aunque la terapéutica cuenta con un número elevado de agentes antibacterianos, no ocurre lo mismo con los antifúngicos y por esta razón se justifica plenamente la búsqueda de estos principios en fuentes naturales.

En estudios preliminares de un número elevado de plantas se encontró que *Ageratina ibaguensis* (Schultz-Bip. ex Hieron.) R.M. King & H. Robinson (antes *Eupatorium ibaguense* Schultz-Bip. ex Hieron.) presentó actividad frente a bacterias y hongos<sup>1,2,3</sup>. En el presente trabajo se evaluó la actividad del extracto alcohólico y de fracciones purificadas frente a cepas de bacterias y de hongos.

En especies del género *Ageratina* se han obtenido diferentes tipos de metabolitos secundarios: de *A. adenophora* se

aislaron derivados del cadineno (Bohlmann y Gupta<sup>4</sup>, Shukla y col.<sup>5</sup> y Bordoloi y col.<sup>6</sup>) y aceites esenciales (Ansari y col.<sup>7</sup>); de *A. ampla* una flavona (De Pérez y col.<sup>8</sup>); de *A. aschenborniana* sesquiterpenoides y cromenos (Bohlmann y Fiedler<sup>9</sup>); de *Ageratina cronquistii* una lactona sesquiterpénica (Melek y col.<sup>10</sup>); de *A. deltoidea* la lactona sesquiterpénica deltoidea (Quijano y col.<sup>11</sup>); de *A. dendroides* y *A. exertovenosa* varios cromenos y diterpenos (Bohlmann y Grenz<sup>12</sup>); de *A. gilbertii* la flavona salvigenina (Herz y col.<sup>13</sup>); de *A. glehnophylla* cromenos, esteroides y triterpenos (Becerra y col.<sup>14</sup>) y derivados del timol (Delle Monache y col.<sup>15</sup>); de *A. gracile* flavonoides (Torrenegra y col.<sup>16</sup>); de *A. jhani* janilactona (González y col.<sup>17</sup>); de *A. ligustrina* una lactona sesquiterpénica (Romo y col.<sup>18</sup>); de *A. petiolaris* 11,13-dihidroeupatopicrina (Guerrero y col.<sup>19</sup>); de *A. pichinchensis* cromenos y diterpenos (Bohlmann y Grenz<sup>12</sup>); de *A. riparia* cromenos (Anthonsen<sup>20</sup>); de *A. sternbergiana* flavanonas (González y col.<sup>21</sup>) y de *A. tinifolia* derivados del timol (Delle Monache y col.<sup>22</sup>).

## PARTE EXPERIMENTAL

### Materiales

El material vegetal se colectó en el Km 18 de la vía Bogotá-Cáqueza a 2.800 m. de altitud y un espécimen se determinó como *Ageratina ibaguensis* (Schultz Bip. ex Hieron.) R.M. King & H. Robinson, el cual reposa en COL bajo el N° 206022. El presente estudio se realizó con la parte aérea de la planta.

Para todos los ensayos de actividad antimicrobiana se utilizaron cepas bioquímicamente tipificadas del laboratorio de microbiología del Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional.

### Análisis fitoquímico preliminar

Con el propósito de establecer la presencia de algunos metabolitos secundarios habitualmente relacionados con acciones biológicas, se realizó el análisis fitoquímico preliminar descrito por Sanabria<sup>23</sup>.

### Ensayos microbiológicos

La actividad antibacteriana se determinó por el método del tubo pequeño de Catalfo y Schultz<sup>24</sup> con algunas modifica-

\* Universidad Nacional, Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia, A.A. 14490. Santafé de Bogotá. Colombia.

ciones. Se hicieron soluciones de los extractos, las distintas fracciones y las sustancias patrón en etanol del 95% o en agua estéril, de tal manera que al agregar 0.1 ml de la solución en 3 ml de agar soya tripticasa (AST) fundido a  $42 \pm 2$  °C se obtuvo la concentración requerida para el ensayo (12.800, 6.400, 3.200, 1.600, 800, 400 y 200 mcg/ml); se homogenizó en un Vortex y se vertió en viales estériles para formar una capa de aproximadamente 6 mm de espesor y se dejó solidificar. Sobre esta capa de agar se aplicó con una pipeta de Pasteur una gota de las bacterias de prueba que previamente se habían sembrado en caldo nutritivo (CN) 24 horas antes del ensayo las Gram positivas y 5 horas antes las Gram negativas. Se incubó a 37 °C y se examinó el crecimiento a las 24 y a las 48 horas. Todos los ensayos se realizaron por duplicado y siempre se hizo un blanco con el solvente utilizado y se empleó como patrón sulfato de estreptomycinina.

Para la determinación de la actividad antifúngica se siguió la misma metodología descrita, con la diferencia de que el inóculo se preparó tomando 2 rodajas de 10 mm de diámetro del hongo crecido en agar Sabouraud (AS) y se suspendieron por agitación en un Vortex en 10 ml de CN y el cultivo se hizo en AS. Como patrón de comparación se utilizó nistatina y/o nitrato de isoconazol.

Con el propósito de determinar la Concentración Crítica (CC) se utilizó el método de difusión en gel perforación estandarizado por Sanabria y Mantilla<sup>2</sup> utilizando AST para bacterias y AS para hongos. El antimicrobiano en ensayo se depositó en una perforación de 8 mm de diámetro realizada en el agar y después de la incubación se midió el halo de inhibición; en algunos casos se produjo una inhibición total (T) y en otros una inhibición parcial (P) de la población microbiana.

#### Purificación de las sustancias activas

A partir de 10 g. de planta, se prepararon por maceración extractos en etanol del 95 %, cloroformo y éter de petróleo, se evaporó el solvente y se determinó la actividad antibacteriana y antifúngica, obteniéndose mayor actividad en el extracto etanólico, seguido del clorofórmico y finalmente el etéreo.

Se maceró con agitación mecánica 1 Kg de material vegetal con 10 L. de etanol del 95%, el etanol se evaporó a presión reducida y se obtuvieron 171 g.. El extracto etanólico se disolvió en la mínima cantidad de etanol y se precipitaron las clorofilas con una solución de acetato de plomo al 4% que contenía 0,5% de ácido acético, se filtró y el filtrado se extrajo varias veces con cloroformo, se deshidrató el extracto clorofórmico con sulfato de sodio anhidro, se evaporó el solvente y se obtuvo un residuo que pesó 6,5 g..

El extracto clorofórmico se examinó por cromatografía en capa fina (CCF) sobre sílicagel G desarrollada con ciclohexano-acetato de etilo (85:15) y benceno -acetona (95:5) (solventes I y II respectivamente) y observadas al UV (254 nm) o reveladas con vainillina-ácido o-fosfórico.

Mediante una bioautografía en capa delgada siguiendo la técnica de Kline y Golab<sup>25</sup> modificada por Castrillón y Farfán<sup>26</sup>, utilizando *Mucor* sp. y eluyendo con el solvente I, se estableció aproximadamente la localización de las manchas activas.

El extracto clorofórmico se fraccionó por cromatografía seca de acuerdo con Bohem y col.<sup>27</sup> modificado por Castrillón y Farfán<sup>25</sup> utilizando sílica gel HF<sub>254</sub>; las columnas se cortaron según la observación al UV y después de eluir con cloroformo-metanol (70:30) se obtuvieron en orden creciente de Rf las fracciones FI, FII, FIII y FIV; estas 4 fracciones se examinaron por CCF. También se determinó su actividad frente a *Mucor* sp. por el método de difusión en gel-perforación a concentraciones de 20, 5 y 1,25 mg/ml de cada una de estas 4 fracciones, del extracto etanólico, el extracto clorofórmico y a una solución de nistatina de 2 mg/ml.

Como se encontró que la mayor actividad antifúngica se presentaba en la fracción FIII, se se pesaron 1.2 g. de esta fracción por cromatografía en columna sobre sílica gel tipo 60 y se eluyó con benceno inicialmente y se aumentó gradualmente la cantidad de acetona hasta un 10%. Las fracciones de 20 ml obtenidas se examinaron por CCF y se agruparon como FIII-A de 1-12, FIIIB de 13-30 y FIIIC de 31-45. Estas 3 fracciones se ensayaron contra los hongos *Fonsecae pedrosoli* y *Aspergillus niger* a concentraciones de 10, 2 y 0,4 mg/ml, demostrándose que la actividad era muy superior en FIIIB.

FIIIB estaba constituida por 2 manchas (Rf 0,52 y 0,70) que fueron separadas por cromatografía preparativa en capa fina (CPCF) sobre sílica gel G eluyendo en doble recorrido con ciclohexano-acetato de etilo (95:5). De esta forma se obtuvieron 251 mg de FIIIB1 (Rf 0,52) y 30 mg de FIIIB2 (Rf 0,70 con algunas impurezas). Debido a la cantidad limitada de FIIIB2 y a que correspondía a 3 manchas, sólo se evaluó la actividad antimicrobiana de FIIIB1, la cual mediante una CCF bidimensional (solventes I y II) mostró una sola mancha.

Con el fin de establecer el espectro antifúngico de FIIIB1 se evaluó, mediante el método de difusión en gel-perforación, frente a 10 hongos utilizando como patrón de comparación nistatina. Igualmente se determinó por el mismo método la actividad antibacteriana de FIIIB1 contra 8 bacterias (4 Gram negativas, 3 Gram positivas y 1 ácido resistente) empleando como patrón sulfato de estreptomycinina.

Se determinó la Concentración Crítica (CC) de FIIIB1 (Lorian<sup>28</sup>) contra 4 hongos a concentraciones de 4.000, 2.500, 2.000, 1.000, 500 y 250 mcg/ml por el método de difusión en gel-perforación. Se midieron los halos de inhibición a las 48 horas y se graficó el logaritmo natural (ln) de las concentraciones contra el cuadrado de los halos de inhibición. Se trazó la recta por el método de los mínimos cuadrados y el punto de intersección con las ordenadas correspondió a la CC. Del mismo modo, se determinó la CC frente a 5 bacterias empleando en las concentraciones 6.000, 3.000, 2.000, 1.000, 500 y 250 mcg/ml.

## RESULTADOS Y DISCUSION

### Análisis fitoquímico preliminar

En el análisis preliminar efectuado se obtuvieron reacciones positivas para flavonoides (cianidina), nafto y/o antraquinonas (Borträger-Kraus), taninos (gelatina-sal), saponinas (hemólisis), esteroides y/o triterpenoides (CCF Liebermann-Burchard) y lactonas terpénicas (CCF hidroxamato férrico, vainilliana y Raymond). Se observaron reacciones negativas para alcaloides, cumarinas y cardenólidos.

### Actividad antimicrobiana del extracto etanólico

Por el método del tubo pequeño, contra bacterias el extracto etanólico presentó actividad a 6.400-12.800 mcg/ml frente a *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Serratia marcescens* (Gram negativas), a 3.200-6.400 mcg/ml contra *Streptococcus faecalis* y *Staphylococcus epidermidis*, y a 1.600-3.200 mcg/ml contra *Streptococcus pneumoniae* y *Bacillus anthracis* (Gram positivas). Los anteriores resultados muestran que el extracto etanólico es más activo frente a bacterias Gram positivas que contra Gram negativas. Frente a los hongos dicho extracto fue activo a 1.600-3.200 mcg/ml contra *Candida albicans* y *Fusarium oxysporum* y a 800-1.600 mcg/ml contra *Mucor* sp.. Por los resultados obtenidos, por lo menos con los organismos ensayados, se puede afirmar que el extracto etanólico tiene mayor actividad antifúngica que antibacteriana.

### Purificación y evaluación de las sustancias activas

Según el procedimiento descrito, después de precipitar las clorofilas, se obtuvieron 6,5 g. de extracto clorofórmico. De este extracto se separaron por CCF 8 sustancias al eluir con el solvente I y por medio de una bioautografía en capa delgada se demostró que la actividad frente a *Mucor* sp. se debe a sustancias con un Rf superior a 0,5 (manchas a Rf 0,63 y/o 0,75).

La separación de 5,5 g. del extracto clorofórmico por cromatografía seca produjo 1,3 g. de FI, 0,61 g. de FII, 1,5 g. de FIII y 0,10 g. de FIV. Por CCF eluyendo con el solvente I se obtuvieron manchas a Rf 0,6 y 0,15 para FI, a Rf 0,15 y 0,34 para FII, a Rf 0,53 y 0,86 para FIII y una ligera mancha a Rf 0,86 para FIV. También se determinó la actividad antimicótica frente a *Mucor* sp., tal como se muestra en la Tabla 1.

**TABLA 1.** ACTIVIDAD FRENTE A *Mucor* sp. DE FRACCIONES Y EXTRACTOS DE *Ageratina ibaguensis*.

SUSTANCIA	CONCENTRACION mg/ml.	HALOS DE INHIBICION (mm)	
Extracto etanólico	20	5T	10P
	5		2P
	1,25		-
Extracto Clorofórmico	20	12T	18P
	5	9T	12P
	1,25		12P
F I	20		12P
	5		5P
	1,25		2P
F II	20	14T	21P
	5	9T	14P
	1,25		12P
F III	20	22T	35P
	5	14T	22P
	1,25		14P
F IV	20	7T	
	5	3T	
	1,25		-
NISTATINA	2	34T	42P

T = Halo de inhibición total

P = Halo de inhibición parcial

- = Ausencia de inhibición

En la Tabla 1. se aprecia que contra *Mucor* sp. FIII presenta la mayor actividad, seguida de FII, mientras que FI y FIV tienen una actividad despreciable. También se observa que a medida que avanza el proceso de purificación, también la actividad aumenta, pues FIII tiene mayor actividad que el extracto clorofórmico y este mayor que el etanólico.

La separación de 1,2 g. de FIII por cromatografía en columna produjeron las fracciones FIIIA, FIIIB y FIIIC demostrándose que la actividad antimicrobiana era muy superior en FIIIB, constituida por 2 manchas a Rf 0,52 y 0,70. FIIIB se separó por CPCF y se obtuvieron 251 mg de FIIIB1 (Rf 0,52) y 30 mg de FIIIB2 (Rf 0,70 y 2 impurezas). Debido

a la escasa cantidad de FIIIB2 y a que todavía estaba impura, se dejó su estudio para una nueva extracción; la pureza de FIIIB1 se demostró mediante una CCF bidimensional eluyendo con los solventes I y II y se estableció la actividad frente a 10 hongos (Tabla 2.) y a 8 bacterias (Tabla 3.) por el método de difusión en gel-perforación.

**TABLA 2.** ACTIVIDAD ANTIFUNGICA DE FIIIB1 COMPARADA CON NISTATINA.

HONGO	Fracción	FIIIB1	Patrón	Nistatina
	2.500 mcg/ml	500 mcg/ml	2.500 mcg/ml	500 mcg/ml
<i>Mucor sp.</i>	12T 21P	11P	29T	26T
<i>Aspergillus niger</i>	18T 26P	15P	47T	40T
<i>Aspergillus fumigatus</i>	18T 30P	16T 18P	43T	40T
<i>Circinella sp.</i>	20T 14P	18T 14P	46T	43T
<i>Zigorrinchus sp.</i>	12T 23P	16P	40T	38T
<i>Candida albicans</i>	12T 14P	–	40T	38T
<i>Fusarium oxysporum</i>	17T	–	32T	28T
<i>Alternaria sp.</i>	21P	10P	43T	40T
<i>Absidia sp.</i>	17P	–	41T	36T
<i>Kluyveromices fragilis</i>	11T 18P	–	47T	37T

T = Inhibición total    P = Inhibición parcial    – = Ausencia de inhibición

En la Tabla 2. se aprecia que FIIIB1 presentó mayor actividad frente a *Circinella sp.* (Phycomycetes), *Aspergillus niger* y *A. fumigatus* (Ascomycetes) y en menor escala frente a los demás hongos ensayados. Lo anterior indica que esta sustancia tiene un amplio espectro de acción antifúngica, pero si se compara con la actividad de la nistatina frente a estos mismos hongos, se nota que la potencia de FIIIB1 es muy inferior. Contra la mayoría de hongos del ensayo FIIIB1 presenta inhibición parcial del crecimiento exclusivamente o además de inhibición total, lo cual puede indicar que puede ejercer una actividad micostática.

En la Tabla 3. se observa que FIIIB1 presentó actividad contra las 8 bacterias ensayadas y de una manera marcada frente a *Mycobacterium sp.* y *Sarcina lutea*. De los tres antimicrobianos empleados, sólo el nitrato de isoconazol mostró también actividad contra todas las bacterias. El sulfato de estreptomycin no fue activo contra *Mycobacterium sp.* y *E. coli*, mientras que FIIIB1 sí las inhibió. También se puede ver que ninguno de los tres patrones utilizados inhibió las 8 bacterias de ensayo mientras que FIIIB1 siempre mostró actividad. Sin embargo, es claro que frente a las bacterias susceptibles, la estreptomycin tiene una potencia de acción mayor que FIIIB1.

**TABLA 3.** ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE FIIIB1 EN COMPARACION CON TRES ANTIMICROBIANOS.

BACTERIA	FIIIB1				Nista- tina	Nista- tina	Isoco- nazol	Isoco- nazol	Estrep- tomic	Estrep- tomic
	2000	1000	500	250	1000	500	1000	500	1000	500
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	14T 19T	12T 24R	11T	9T	9T	-	19T	17T	21T	26R
	17T 27P	14T 26P	11T 28P	10P 26R	-	-	17T	16T	20T	16P
<i>Staphylococcus aureus</i>	14T 20P	13T 24P	12T 17P	10T 19P	12T 18P	11T 15P	21T 26P	16T 20P	13T 15P	11T 14P
<i>Mycobacterium sp.</i>	24T	20T	17T	16T	14T	13T	28T	26T	-	-
<i>Escherichia coli</i>	13T 20P	10T 18P	14P	13P	12P	11P	13P	11P	-	-
<i>Pseudo. aeruginosa</i>	16P	15P	14P	13P	13P	11R	12P	11P	22T	17T
<i>Salmonella enteritidis</i>	13T 18P	9T 16P	15P	14P	11P	10P	14P	12P	22P	18P
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	18P 30P	16P 27P	14P	13P	12P	11P	13P	12P	18T	15T

T= Inhibición total P= Inhibición parcial --= No inhibición

Concentraciones en mcg/ml

Tal como se indicó en la parte experimental, se calculó el valor de la Concentración Crítica (CC) de FIIIB1 frente a 4 hongos y 5 bacterias, cuyos resultados se aprecian en la Tabla 4. junto con los respectivos valores del coeficiente de correlación, los cuales en todos los casos se aproximan a comportamientos lineales de difusión del antimicrobiano.

Para el caso de los hongos, se observa en la Tabla 4. que FIIIB1 es más activa contra *Candida albicans* (CC=519 mcg/ml) y contra *Fusarium oxysporum* (CC=1.038 mcg/ml). Con respecto a la acción antibacteriana, la mayor actividad se presentó con *Staphylococcus aureus* (CC=186 mcg/ml), *Mycobacterium sp.* (CC=190 mcg/ml) y *S. epidermidis* (CC=289 mcg/ml). Estos valores permiten afirmar que, por los menos en los organismos de ensayo, FIIIB1 posee mayor potencia de actividad antibacteriana que antifúngica, a diferencia de lo que se apreció con el extracto etanólico.

**TABLA 4.** CONCENTRACION CRITICA DE FIIIB1 FRENTE A ALGUNOS HONGOS Y BACTERIAS.

	ORGANISMOS ENSAYADOS	CC mcg/ml	Coefficiente de Correlación
HON- GOS	<i>Mucor sp.</i>	2.036	0,997
	<i>Aspergillus niger</i>	1.964	0,998
	<i>Candida albicans</i>	519	0,967
	<i>Fusarium oxysporum</i>	1.038	0,993
BAC- TE- RIAS	<i>Staphyl. epidermidis</i>	289	0,965
	<i>Sarcina lutea</i>	601	0,963
	<i>Staphilococcus aureus</i>	186	0,999
	<i>Mycobacterium sp.</i>	190	0,982
	<i>Escherichia coli</i>	934	0,996

Es importante tener en cuenta que según Lorian<sup>28</sup>, los valores de CC son generalmente de 2 a 4 veces los valores de concentraciones mínimas inhibitorias obtenidas por el método de diluciones seriadas. Por tanto, es importante que FIIB1 posea simultáneamente actividad antibacteriana y antifúngica, porque sustancias con este espectro de actividad antimicrobiana son muy necesarios para el tratamiento de infecciones cruzadas entre hongos y bacterias. Se continuarán estudios encaminados a la elucidación de la estructura de FIIB1 y demás sustancias activas de *A. ibaguensis*.

## AGRADECIMIENTOS

Se agradece por el apoyo financiero para la realización del presente trabajo a COLCIENCIAS y a la Universidad Nacional, a través del proyecto "Búsqueda de principios bioactivos en plantas medicinales colombianas".

## BIBLIOGRAFIA

1. N.L. MORENO y N.M. TINJACÁ. *Estudio preliminar del efecto antimicrobiano de diferentes extractos de algunas plantas de la familia Compositae*. Tesis. Universidad Nacional, Departamento de Farmacia, Bogotá, 1986.
2. R. MANTILLA y A. SANABRIA. *Rev. Colomb. Cien. Quím. Farm.* **4**(2), 25-33 (1985).
3. A. SANABRIA y J.R. MANTILLA. *Rev. Colomb. Cien. Quím. Farm.* **Nº15**, 17 (1986).
4. F. BOHLMANN y R.K. GUPTA. *Phytochem.* **20**, 1432 (1981).
5. V. SHUKLA, N.C. BARUA, N.C. CHOWDHURY, R.P. SHARMA y J.N. BARUAH. *Chem. Ind. (London)* **Nº22**, 863 (1983).
6. M.J. BORDOLOI, B.S. SHUKLA y R.P. SHARMA. *Tetrahedron Lett.* **26**, 509 (1985).
7. S. ANSARI, P. JAIN, R.P. TYAGI, B.C. JOSHI y F.C.K. BARAR. *Herba Pol.* **29**, 93 (1983).
8. C.E. DE PÉREZ, A.M. ROA y Y. CASTELLANOS. *Rev. Col. Quím.* **10**, 17 (1980).
9. F. BOHLMANN y L. FIEDLER. *Phytochem.* **17**, 566 (1978).
10. F.R. MALEK, D.A. GAGE y T.J. MABRY. *J. Nat. Prod.* **48**, 331 (1985).
11. L. QUIJANO, J.S. CALDERÓN, G.S. GÓMEZ, J.T. GARDUNO y C.T. RÍOS. *Phytochem.* **19**, 1975 (1980).
12. F. BOHLMANN y M. GRENZ. *Chem. Ber.* **110**, 321 (1977).
13. W. Herz y S. Gibaja. *Phytochem.* **11**, 2625 (1972).
14. J. BECERRA, M. SILVA, G. DELLE MONACHE, F. DELLE MONACHE y M. BOTTA. *Rev. Latinoam. Quím.* **14**, 92 (1983).
15. G. DELLE MONACHE, F. DELLE MONACHE, F. BECERRA, M. SILVA y F. MANICHINI. *Phytochem.* **23**, 1947 (1984).
16. R.D. TORRENEGRA, J.A. PEDROZO y S. SCARRIA. *Rev. Latinoam. Quím.* **15** 129 (1984).
17. A.G. GONZÁLEZ, J.M. ARTEAGA, B.M. FRAGA, M.G. HERNÁNDEZ y J. FAYOZ. *Experientia* **34**, (1978).
18. J. ROMO, T. RÍOS y L. QUIJANO. *Tetrahedron* **24**, 6087 (1968).
19. C. GUERRERO, V. CRUZ y J. TABOADA. *Rev. Latinoamer. Quím.* **13**, 33 (1982).
20. T. ANTHONSEN. *Acta Chem. Scand.* **23**, 3605 (1969).
21. A. G. GONZÁLEZ, B.M. FRAGA, V.P. GARCÍA y M.G. HERNÁNDEZ. *Rev. Latinoamer. Quím.* **14**, 115 (1984).
22. G. DELLE MONACHE, G. BOTTA, F. DELLE MONACHE, G.B. MARINI-BETTOLO y B.M. MURILLO. *Farmaco*, Ed. Sci. **36**, 960 (1981).
23. A. SANABRIA. *Análisis fitoquímico preliminar. Metodología y su aplicación en evaluación de 40 especies de la familia Compositae*, Universidad Nacional, Departamento de Farmacia, Bogotá, 1983.
24. P. CATAFOLMO y H.W. SCHULTZ. *J. Pharm. Sci.* **55**, 117 (1966).
25. R.M. KLINE y T. GOLAB. *J. Chromatog.* **18**, 409 (1965).
26. C.E. CASTRILLÓN y F.E. FARFÁN. *Aislamiento de sustancias con actividad antimicrobiana en Conyza floribunda H.B.K.* Tesis, Universidad Nacional, Bogotá, 1981.
27. J.M. BOHEN, M.M. JOULLIÉ y F.A. KAPLAN. *J. Chem. Educ.* **50**, 367 (1973).
28. V. LORIAN. *Antibiotics in laboratory medicine*. Williams & Wilkins, Baltimore, U.S.A. 1980, p.11.