

# ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE PLANTAS SUPERIORES COLOMBIANAS\*

José Ramón Mantilla\*\*  
Antonio Sanabria\*\*\*

## INTRODUCCION

La búsqueda de sustancias con actividad antibacteriana en fuentes no tradicionales como las plantas superiores, es importante porque existe la posibilidad de encontrar metabolitos con buena actividad antimicrobiana frente a bacterias resistentes a antibióticos y con otras propiedades que permitan su utilización como agentes quimioterapéuticos, desinfectantes o como preservativos antimicrobianos en productos farmacéuticos o en alimentos.

Las investigaciones de sustancias de plantas con actividad antibacteriana comenzó hace aproximadamente 40 años, ya en 1949 (1) se conocían algunas; posteriormente se publicaron informes sobre ensayos preliminares de un número grande de especies como los de Farnsworth (2), Nobuyoshi (3), Nickell (4) y Malcon y Sofowora (5). Igualmente existen informes sobre la actividad antimicrobiana de plantas particulares, por ejemplo Pitts y col. (6) observaron actividad en un extracto acuoso de *Solanum carolinense* frente a bacterias Gram negativas; Gaind y col. (7) estudiaron la actividad antimicrobiana de *Cassia occidentalis*; Benjamín y Lamijanra (8) analizaron la *Cassia alata*, debido a que es empleada en Nigeria para el tratamiento de afecciones de la piel, y Chogo y Grank (9) estudiaron la acción antibacteriana del aceite esencial de *Ocimum suave*.

Dentro de las sustancias con actividad antibacteriana aisladas de las plantas, vale la pena citar las sesquiterpenlactonas, en un artículo de Rodríguez y col. (10) informa sobre la acción antibacteriana de las mismas; más tarde Lec y col. (11) estudiaron la relación entre la estructura química y la actividad antibacteriana de dichos compuestos; además se han publicado otros trabajos sobre la actividad de las sesquiterpenlactonas frente a bacterias Grampositivas (12, 13). Fue demostrado que alcaloides obtenidos de distintas plantas presentan actividad antimicrobiana, el alcaloide Canthin-6-ona, aislado por Mitscher y col. (14) de *Zanthoxylum elephantiasis* mostró una buena actividad frente a bacterias Grampositivas y Gramnegativas; el mismo autor (15, 16) informó sobre la actividad antimicrobiana de alcaloides derivados de la bis-bencilisoquinoleína aislados de plantas del género *Thalictrum* y sobre la actividad de alcaloides de amonio cuaternario presentes en las hojas de *Ptelea trifoliata* (17); también se informó recientemente sobre la actividad antimicrobiana de la oxoaporfina liriodenina aislada de una Magnoliácea (18) y de los alcaloides de una Urticácea (19). Igualmente existen publicaciones sobre la actividad antibacteriana de poliacetilenos (20), cumarinas (21, 22), terpenoides (23) y naftoquinonas (24, 25). Lo expuesto puede ser suficiente para comprender que las plantas son una buena fuente de antibióticos y por esta razón se justifica iniciar el estudio de las mismas, con el propósito de encontrar este tipo de sustancias.

## PARTE EXPERIMENTAL

### 1. Material vegetal

Todas las plantas analizadas en el presente estudio fueron colectadas en distintas regiones

\* Trabajo desarrollado dentro del proyecto de investigación "Contribución al estudio de la acción antimicrobiana de algunas plantas colombianas", copatrocinado por COLCIENCIAS y la Universidad Nacional de Colombia.

\*\* Profesor Asistente. Departamento de Farmacia, Universidad Nacional de Colombia.

\*\*\* Profesor Asociado. Departamento de Farmacia, Universidad Nacional de Colombia.

del Departamento de Cundinamarca (Colombia), teniendo en cuenta sus usos populares, reacciones positivas a pruebas de toque para alcaloides (Dragendorff), triptaminas (Ehrlich) y fenoles (cloruro férrico), o al hecho de pertenecer a familias de plantas con antecedentes de poseer metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana. Las diferentes partes de las plantas fueron secadas el mismo día de su colección en una estufa con aire circulante a 40°C y luego molidas hasta un tamaño de partícula adecuada para los procesos de extracción. Los ejemplares de las plantas fueron determinados taxonómicamente y registrados en el Instituto de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional por los profesores Santiago Díaz P., Gustavo Lozano y Roberto Jaramillo.

## 2. Microorganismos de ensayo

Para la evaluación de la actividad antibacteriana se escogieron especies representativas de varios grupos bacterianos que difieren en morfología, reacción al Gram y sensibilidad a los agentes antimicrobianos. De las cepas enumeradas en la Tabla I, la mayoría son utilizadas como organismos patrón en valoraciones de antibióticos, y su sensibilidad a los agentes químicos antimicrobianos es conocida.

Los cultivos desarrollados en agar soya tripticasa se mantuvieron en refrigeración.

Tabla I

### ORGANISMOS UTILIZADOS PARA LA EVALUACION DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE PLANTAS SUPERIORES

| No. | Organismo                       | Procedencia | Clasificación    |
|-----|---------------------------------|-------------|------------------|
| 1   | <i>Staphylococcus aureus</i>    | ATCC 6538 P | Grampositivo     |
| 2   | <i>Staphylococcus epidermis</i> | U.C. 719    | Grampositivo     |
| 3   | <i>Bacillus subtilis</i>        | ATCC 66833  | Grampositivo     |
| 4   | <i>Escherichia coli</i>         | ATCC 10536  | Gramnegativo     |
| 5   | <i>Salmonella typhi</i>         | FUN         | Gramnegativo     |
| 6   | <i>Klebsiella pneumoniae</i>    | ATCC 10031  | Gramnegativo     |
| 7   | <i>Pseudomonas aeruginosa</i>   | I.N.S.      | Gramnegativo     |
| 8   | <i>Mycobacterium fortuitum</i>  | I.N.S.      | Acido resistente |

ATCC: American Type Culture Collection

U.C.: Upjohn Company

FUN: Farmacia - Universidad Nacional

I.N.S.: Instituto Nacional de Salud

## 3. Preparación de los extractos

10 g de planta seca y pulverizada fueron suspendidos en 120 ml de etanol del 95%, se hizo burbujear una corriente de nitrógeno por uno o dos minutos, se tapó herméticamente y se dejó en la oscuridad durante 12 horas, después de este tiempo se colocó en un baño de agua a 60°C, se agitó a 200 r.p.m. durante 10 minutos,

se filtró en frío al vacío, se lavó con 30 ml de etanol y finalmente se evaporó el etanol a presión reducida a una temperatura no superior de 40°C. El residuo resultante se disolvió en etanol del 95% y se llevó a un volumen de 10 ml, con lo cual se obtuvo un extracto en el que 1 ml equivale a las sustancias presentes en 1 g de planta seca.

## 4. Preparación de los cultivos bacterianos

De los cultivos de mantenimiento conservados en refrigeración se hicieron siembras por estrías en placas de agar soya tripticasa, utilizando una placa por bacteria.

De la placa de *Mycobacterium fortuitum*, incubada a 37°C por 72 horas, se transfirieron 5 colonias en 5 ml de caldo soya tripticasa, después de 24 horas de incubación a 37°C se sembraron 0.1 ml en 5 ml de caldo soya tripticasa y se incubó a 37°C por 40 horas. De cada una de las otras siete bacterias desarrolladas en placas incubadas a 37°C por 24 horas, se transfirió una colonia en 5 ml de caldo soya tripticasa, después de 8 horas de incubación se hicieron resiembras en tubos con 5 ml de caldo soya tripticasa y se incubaron a 37°C por 16 horas.

## 5. Evaluación de la actividad antibacteriana

**5.1. Método de dilución en agar e inoculación múltiple en superficie.** De cada uno de los extractos preparados para el ensayo, de sus diluciones 1:10 en etanol del 95%, del etanol utilizado para la extracción y de una solución acuosa de sulfato de estreptomycin al 0.1%, se tomaron por duplicado volúmenes de 0.4 ml, se incorporaron en tubos con 20 ml de agar soya tripticasa a 42 ± 2°C, se mezclaron en un agitador mecánico de tubos (Vortex), el contenido de cada tubo se envasó en una caja de Petri estéril y se dejó solidificar. En cada ensayo se incluyeron dos cajas de Petri con solo agar soya tripticasa.

El cultivo de *Mycobacterium fortuitum* se diluyó con solución salina fisiológica estéril en proporción 1:10; del cultivo diluido se tomaron 0.5 ml, se suspendieron en 4.5 ml de agar semisólido (0.25% de agar-agar en caldo nutritivo) fundido y enfriado a 42 ± 2°C, la suspensión se homogeneizó en un Vortex e inmediatamente se tomó con una pipeta capilar estéril, un volumen suficiente para inocular en cada una de las placas preparadas para el ensayo con una gota del medio semisólido con células en suspensión. Las gotas se dejaron caer en puntos previamente definidos.

De igual manera se procedió a diluir, suspender, homogeneizar e inocular otro microorganismo y así sucesivamente con cada una de las 8 bacterias de ensayo; las gotas de inóculo se distribuyen en forma equidistante. En el caso de

bacterias Grampositivas se utilizó la dilución 1:10.000 y para Gramnegativas la dilución 1:1.000.000.

Los medios de cultivo inoculados se mantuvieron durante 30 minutos a temperatura ambiente, luego se incubaron a 37° C y se examinaron a las 24, 48 y 72 horas. Los extractos que presentaron actividad (ausencia de crecimiento o reducción significativa de la población inoculada) fueron almacenados a temperatura ambiente y re-evaluados a los 8 días. El material vegetal que mantuvo su actividad inicial se valoró mediante el método de difusión en gel-perforación en placa (26, 27).

**5.2. Evaluación por el método de perforación en placa.** Con base en ensayos preliminares se adoptó el siguiente procedimiento: Del cultivo de *Mycobacterium fortuitum* se transfirieron por duplicado volúmenes de 0.5 ml en tubos con 25 ml de agar soya tripticasa fundido y a  $42 \pm 2^\circ\text{C}$ ; se homogeneizó en un Vortex y luego se vertió en cajas de Petri de 90 mm de diámetro. De igual manera se procedió con los demás microorganismos enumerados en la Tabla I pero utilizando las siguientes diluciones de los cultivos preparados como se indicó en 4.: dilución 1:100 para los Grampositivos y dilución 1:100.000 para los Gramnegativos.

Una vez solidificado el medio de cultivo inoculado en profundidad, se hicieron 4 perforaciones de 8 mm de diámetro; en una de las perforaciones se aplicó un volumen de 0.1 ml de etanol del 95% utilizado para la preparación de los extractos (control de inactividad del solvente) y en las otras tres, el extracto etanólico de la planta en 3 proporciones (C: extracto etanólico en el que 1 ml contiene lo extraído de 1 g de plata seca; M: dilución 3:7 de C y D: dilución 1:9 de C). Se dejó en predifusión durante 1 hora a temperatura ambiente y luego se incubó a 37°C. Los halos de inhibición se registraron a las 24 horas y se verificaron a las 48 horas, a excepción de los presentados en las placas de *Mycobacterium fortuitum* que se registraron a las 72 horas.

## RESULTADOS Y DISCUSION

El método de dilución en placas de agar es, por diversas razones, el más adecuado para evaluar la actividad de sustancias antibacterianas sin purificar y de diversos materiales con características fisicoquímicas heterogéneas. En este procedimiento una cantidad determinada del material de ensayo se mezcla homogéneamente con el agar nutritivo fundido, los microorganismos

de ensayo se inoculan en la superficie de medio solidificado en caja de Petri, se incuba y se observa la presencia o ausencia de crecimiento (colonias) en el sitio de inoculación; de esta manera la turbidez de los materiales o la opacidad que adquiera el medio de cultivo no interfieren en la evaluación; la interacción entre las sustancias disueltas y/o suspendidas en el medio de cultivo y cada una de las células inoculadas es directa e inmediata, por tanto, cualquier sustancia (soluble o insoluble en agua) podrá ejercer su acción aunque no existan condiciones adecuadas para una buena difusión; la contaminación natural de los materiales de ensayo es fácil de reconocer y prácticamente no tiene importancia, por tanto, no es necesario una previa esterilización de las soluciones a ensayar (28). Por estas razones y por la facilidad de conocer la susceptibilidad de varias bacterias utilizando una placa de Petri, se escogió este método para el estudio primario ("screening") de sustancias con acción antibacteriana en plantas superiores.

Para la evaluación de extractos etanólicos de material vegetal, se modificó el método descrito por Mitscher y col. (5); para tal fin, se estandarizó una técnica de siembra por goteado en placa. En esta técnica los inóculos se prepararon suspendiendo los cultivos desarrollados en caldo o sus diluciones en un caldo con agar-agar al 0.25% (medio semisólido fluido) con el fin de que las gotas depositadas en la superficie de la placa de agar ocuparan un área pequeña y definida. Utilizando este fluido e inoculando las gotas en puntos equidistantes, se logró el crecimiento independiente, sin contaminación cruzada, de 8 bacterias por caja de Petri de 90 mm. Con la siembra de un volumen definido, gota suministrada con una pipeta capilar estándar, se mantuvo constante la población inoculada en todas las placas que se necesitaron para llevar a cabo un ensayo confiable; en todo ensayo, además de los diferentes extractos etanólicos evaluados por duplicado, se utilizan placas con 2% de etanol para verificar la inactividad del solvente, placas de control de crecimiento de las poblaciones inoculadas en el medio de cultivo de ensayo y placas con 10 mcg/ml de sulfato de estreptomicina para comprobar la sensibilidad de los inóculos. Para evitar resultados positivos o negativos falsos por defecto o exceso en el número de células expuestas, se establecieron las condiciones necesarias para que en cada gota se tuviese una población de  $10^4$  células viables (29,30); estas poblaciones no se afectaron por la presencia de etanol del 95% incorporado en el medio en concentraciones inferiores al 3% y la sensibilidad frente a diferentes antibióticos fue adecuada.

En la Tabla II se presentan los resultados de la evaluación de los extractos etanólicos correspondientes a 56 muestras vegetales. Los resultados se consideraron válidos cuando el crecimiento de las bacterias inoculadas en agar con 2% de etanol (control de inactividad del solvente) fue similar al observado en agar soya triptica (control de crecimiento de los inóculos). El resultado de la interacción entre cada una de las 8 bacterias enumeradas en la Tabla I y las so-

luciones etanólicas 'C' y 'D' se representan y catalogan de acuerdo con los criterios presentados en la Tabla III.

Los extractos que manifestaron actividad fueron re-evaluados a los 8 días con el fin de verificar el resultado inicial y conocer algo de la estabilidad de las sustancias responsables de la actividad antibacteriana: los resultados de estos ensayos fueron similares a los expresados en la Tabla II.

**Tabla II**  
**ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE EXTRACTOS ETANOLICOS DE PLANTAS SUPERIORES EVALUADAS POR DILUCION EN AGAR**

| No. | PLANTA  | Parte de Planta   | S | GRAMPOSITIVOS |    |    | GRAMNEGATIVOS |    |    | A.R. |    |
|-----|---|-------------------|---|---------------|----|----|---------------|----|----|------|----|
|     |   |                   |   | 1*            | 2  | 3  | 4             | 5  | 6  | 7    | 8  |
| 1   | ANNONACEAE<br><i>Raymondia quinduensis</i>                          | Aérea             | C | ++            | ++ | ++ | ++            | ++ | ++ | ++   | +  |
|     |   |                   | D | ++            | ++ | ++ | +             | ++ | +  | ++   | -  |
| 2   | BARBERIDACEAE<br><i>Berberis rigidifolia</i> H.B.K.                 | Aérea             | C | -             | -  | +  | -             | -  | -  | -    | -  |
|     |   |                   | D | -             | -  | -  | -             | -  | -  | -    | -  |
| 3   | BIGNONIACEAE<br><i>Tabebuia chrysantha</i> (J.) Nichols             | Corteza del tallo | C | +             | -  | +  | -             | -  | -  | -    | -  |
|     |   |                   | D | -             | -  | -  | -             | -  | -  | -    | -  |
| 4   | <i>Tecoma stans</i> (L.) Juss.                                      | Hojas             | C | ++            | ++ | ++ | -             | -+ | -  | -+   | -+ |
|     |   |                   | D | ++            | ++ | ++ | -             | -  | -  | -    | -  |
| 5   | <i>Tecoma stans</i> (L.) Juss.                                      | Vainas            | C | ++            | ++ | ++ | -             | -  | -  | -    | -  |
|     |   |                   | D | -             | -  | -+ | -             | -  | -  | -    | -  |
| 6   | BURSERACEAE<br><i>Bursera graveolens</i> (H.B.K.) Tr. & Pl.         | Hojas             | C | +             | +  | +  | -             | -  | -  | -    | -  |
|     |   |                   | D | -             | -  | -+ | -             | -  | -  | -    | -  |
| 7   | <i>Bursera graveolens</i> (H.B.K.) Tr. & Pl.                        | Corteza del tallo | C | -             | -  | +  | -             | -  | -  | -    | -  |
|     |   |                   | D | -             | -  | -  | -             | -  | -  | -    | -  |
| 8   | CAPPARIDACEAE<br><i>Cleome anomola</i> H.B.K.                       | Aérea             | C | -             | -  | +  | -             | -  | -  | -    | -  |
|     |   |                   | D | -             | -  | -+ | -             | -  | -  | -    | -  |
| 9   | COMPOSITAE<br><i>Ageratina ibaguensis</i> King & Rob.               | Aérea             | C | ++            | ++ | ++ | ++            | ++ | ++ | ++   | ++ |
|     |   |                   | D | ++            | ++ | -  | -             | -  | -  | +    | -  |
| 10  | <i>Baccharis prunifolia</i> H.B.K.                                  | Aérea             | C | ++            | ++ | ++ | -             | -  | -  | +    | ++ |
|     |   |                   | D | +             | +  | +  | -             | -  | -  | -    | +  |
| 11  | <i>Baccharis prunifolia</i> H.B.K. var. <i>Subprunifolia</i> Cuatr. | Aérea             | C | ++            | ++ | ++ | -             | -  | -  | -    | ++ |
|     |   |                   | D | ++            | ++ | ++ | -             | -  | -  | -    | ++ |
| 12  | <i>Baccharis trinervis</i> (Lam.) Pers.                             | Aérea             | C | +             | -  | +  | -             | -  | -  | -    | -  |
|     |   |                   | D | -             | -  | -  | -             | -  | -  | -    | -  |
| 13  | <i>Bidens pilosa</i> L.   | Aérea             | C | +             | +  | +  | -             | -  | -  | -    | -  |
|     |   |                   | D | -             | -  | -  | -             | -  | -  | -    | -  |
| 14  | <i>Calea glomerata</i> Klatt.                                       | Aérea             | C | ++            | ++ | ++ | -             | -  | -  | +    | ++ |
|     |   |                   | D | ++            | ++ | ++ | -             | -  | -  | -    | ++ |
| 15  | <i>Calea glomerata</i> Klatt.                                       | Raíces            | C | +             | -  | -  | -             | -  | -  | -    | -  |
|     |   |                   | D | -             | -  | -  | -             | -  | -  | -    | -  |
| 16  | <i>Clibadium villosum</i> Benth.                                    | Aérea             | C | -             | -  | -  | -             | -  | -  | -    | -  |
|     |   |                   | D | -             | -  | -  | -             | -  | -  | -    | -  |

| No.           | PLANTA  | Parte de Planta   | S      | GRAMPOSITIVOS |          |          | GRAMNEGATIVOS |         |         | A.R.    |          |
|---------------|---|-------------------|--------|---------------|----------|----------|---------------|---------|---------|---------|----------|
|               |   |                   |        | 1             | 2        | 3        | 4             | 5       | 6       | 7       | 8        |
| 17            | <i>Conyza bonariensis</i> (L.) Crong.                             | Aérea             | C<br>D | ++<br>-+      | ++<br>-+ | ++<br>-+ | -<br>-        | -<br>-  | -<br>-  | -<br>-  | -<br>+   |
| 18            | <i>Conyza floribunda</i> H.B.K.                                   | Aérea             | C<br>D | -<br>-        | -<br>-   | +<br>-   | -<br>-        | -<br>-  | -<br>-  | -<br>-  | -<br>-   |
| 19            | <i>Dahlia imperialis</i> Roetz. ex. Ortges.                       | Aérea             | C<br>D | -<br>-        | -<br>-   | ++<br>-  | -<br>-        | -<br>-  | -<br>-  | -<br>-  | -<br>-   |
| 20            | <i>Diplostephium phyllicoides</i> H.B.K.                          | Aérea             | C<br>D | +<br>-        | ++<br>-  | ++<br>-  | -<br>-        | -<br>-  | -<br>-  | -<br>-  | -<br>-   |
| 21            | <i>Erechtites valerianifolia</i> (Wolf.)                          | Aérea             | C<br>D | -<br>-        | -<br>-   | -<br>-   | -<br>-        | -<br>-  | -<br>-  | -<br>-  | -<br>-   |
| 22            | <i>Eupatorium acuminatum</i> H.B.K.                               | Aérea             | C<br>D | -<br>-        | -<br>-   | +<br>-   | -<br>-        | -<br>-  | -<br>-  | -<br>-  | -<br>-   |
| 23            | <i>Eupatorium af. altidifolium</i> Zauss.                         | Aérea             | C<br>D | ++<br>++      | ++<br>++ | ++<br>+  | ++<br>-       | ++<br>- | ++<br>- | ++<br>- | ++<br>++ |
| 24            | <i>Eupatorium angustifolium</i> H.B.K.                            | Aérea             | C<br>D | ++<br>+       | ++<br>+  | ++<br>+  | -<br>-        | -<br>-  | -<br>-  | -<br>-  | +<br>++  |
| 25            | <i>Eupatorium densum</i> Benth.                                   | Aérea             | C<br>D | -<br>-        | -<br>-   | +<br>-   | -<br>-        | -<br>-  | -<br>-  | -<br>-  | -<br>-   |
| 26            | <i>Eupatorium glyptophlebium</i> Rob.                             | Aérea             | C<br>D | ++<br>++      | ++<br>++ | ++<br>++ | -<br>-        | -<br>-  | -<br>-  | -<br>-  | ++<br>+  |
| 27            | <i>Eupatorium gracilae</i> H.B.K. var. <i>epilabioides</i> Robin. | Aérea             | C<br>D | ++<br>++      | ++<br>+  | ++<br>+  | ++<br>+       | ++<br>- | ++<br>+ | ++<br>- | ++<br>++ |
| 28            | <i>Eupatorium morifolium</i> Mill.                                | Aérea             | C<br>D | ++<br>+       | ++<br>+  | ++<br>+  | -<br>-        | -<br>-  | -<br>-  | -<br>-  | ++<br>+  |
| 29            | <i>Eupatorium tacotanum</i> Klatt.                                | Aérea             | C<br>D | ++<br>++      | ++<br>++ | ++<br>++ | -<br>-        | -<br>-  | -<br>-  | -<br>-  | ++<br>++ |
| 30            | <i>Eupatorium tequendamense</i> Hieron                            | Aérea             | C<br>D | ++<br>++      | ++<br>++ | ++<br>++ | -<br>-        | -<br>-  | -<br>-  | -<br>-  | ++<br>++ |
| 31            | <i>Gnaphalium Graveolens</i> H.B.K.                               | Aérea             | C<br>D | -<br>-        | -<br>-   | -<br>-   | -<br>-        | -<br>-  | -<br>-  | -<br>-  | -<br>-   |
| 32            | <i>Hellopsisbuphtalmoides</i> (Jacq.) Dunal                       | Aérea             | C<br>D | -<br>-        | -<br>-   | -<br>-   | -<br>-        | -<br>-  | -<br>-  | -<br>-  | -<br>-   |
| 33            | <i>Hypochaeris radicata</i> L.                                    | Aérea             | C<br>D | -<br>-        | -<br>-   | -<br>-   | -<br>-        | -<br>-  | -<br>-  | -<br>-  | -<br>-   |
| 34            | <i>Hypochaeris radicata</i> L.                                    | Raíces            | C<br>D | -<br>-        | -<br>-   | -<br>-   | -<br>-        | -<br>-  | -<br>-  | -<br>-  | -<br>-   |
| 35            | <i>Mikania cordifolia</i> (L.) Willd.                             | Aérea             | C<br>D | +<br>-        | +<br>-   | +<br>-+  | -<br>-        | -<br>-  | -<br>-  | -<br>-  | -<br>-   |
| 36            | <i>Munnozia senecionidis</i> Benth.                               | Hojas             | C<br>D | -<br>-        | -<br>-   | +<br>-   | -<br>-        | -<br>-  | -<br>-  | -<br>-  | -<br>-   |
| 37            | <i>Munnozia senecionidis</i> Benth.                               | Aérea             | C<br>D | -<br>-        | -<br>-   | -<br>-   | -<br>-        | -<br>-  | -<br>-  | -<br>-  | -<br>-   |
| 38            | <i>Schistocarpha eupatorioides</i> (Fenzl.)                       | Aérea             | C<br>D | -<br>-        | +<br>-   | +<br>-   | -<br>-        | -<br>-  | -<br>-  | -<br>-  | -<br>-   |
| 39            | <i>Stelractina af. longipes</i> Blake                             | Aérea             | C<br>D | +<br>-        | +<br>-   | +<br>-   | -<br>-        | -<br>-  | -<br>-  | -<br>-  | -<br>-   |
| 40            | <i>Verbesina crassiramea</i>                                      | Aérea             | C<br>D | -<br>-        | -<br>-   | -<br>-   | -<br>-        | -<br>-  | -<br>-  | -<br>-  | -<br>-   |
| EUPHORBIACEAE |   |                   |        |               |          |          |               |         |         |         |          |
| 41            | <i>Croton mutislanus</i> H.B.K.                                   | Aérea             | C<br>D | -<br>-        | -<br>-   | +<br>-+  | -<br>-        | -<br>-  | -<br>-  | -<br>-  | -<br>-   |
| 42            | <i>Croton polycarpus</i> Benth.                                   | Aérea             | C<br>D | +<br>-        | +<br>-   | +<br>-   | -<br>-        | -<br>-  | -<br>-  | -<br>-  | -<br>-   |
| 43            | <i>Euphorbia caracasana</i> Boissier                              | Aérea             | C<br>D | +<br>-        | -<br>-   | ++<br>-  | -<br>-        | -<br>-  | -<br>-  | -<br>-  | -<br>-   |
| 44            | <i>Euphorbia caracasana</i> Boissier                              | Corteza del tallo | C<br>D | +<br>-        | -<br>-   | ++<br>-  | -<br>-        | -<br>-  | -<br>-  | -<br>-  | -<br>-   |
| LABIATAE      |   |                   |        |               |          |          |               |         |         |         |          |
| 45            | <i>Hyptis colombiana</i> Epling.                                  | Aérea             | C<br>D | ++<br>-+      | +<br>-   | +<br>-   | -<br>-        | -<br>-  | -<br>-  | -<br>-  | -<br>-   |
| 46            | <i>Hyptis mutabilis</i> (Rich.)                                   | Aérea             | C<br>D | ++<br>-+      | ++<br>-  | ++<br>-+ | -<br>-        | -<br>-  | -<br>-  | -<br>-  | -<br>-   |

Tabla II (Continuación)

| No.             | PLANTA                                 | Parte de Planta | S | GRAMPOSITIVOS |    |    |    |    |    |    | GRAMNEGATIVOS | A.R. 8 |
|-----------------|--|-----------------|---|---------------|----|----|----|----|----|----|---------------|--------|
|                 |  |                 |   | 1             | 2  | 3  | 4  | 5  | 6  | 7  |               |        |
| 47              | <i>Lepechinia conferta</i> (Benth.)    | Aérea           | C | ++            | ++ | ++ | +  | +  | +  | ++ | ++            |        |
|                 |  |                 | D | ++            | ++ | ++ | -  | -  | -  | ++ | ++            |        |
| 48              | <i>Salvia tillaefolia</i> Vahl.        | Aérea           | C | -             | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -             |        |
|                 |  |                 | D | -             | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -             |        |
| LEGUMINOSAE     |  |                 |   |               |    |    |    |    |    |    |               |        |
| 49              | <i>Dioclea sericea</i> H.B.K.          | Aérea           | C | +++           | +  | +  | -  | -  | -  | -  | -             |        |
|                 |  |                 | D | -             | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -             |        |
| 50              | <i>Indigofera suffruticosa</i> Mill.   | Aérea           | C | -             | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -             |        |
|                 |  |                 | D | -             | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -             |        |
| 51              | <i>Lupinus bogotensis</i> Benth.       | Aérea           | C | -             | -  | +  | -  | -  | -  | -  | -             |        |
|                 |  |                 | D | -             | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -             |        |
| 52              | <i>Polretia scandens</i> Vent.         | Aérea           | C | +             | +  | ++ | -  | -  | -  | -  | -             |        |
|                 |  |                 | D | -             | -  | -+ | -  | -  | -  | -  | -             |        |
| MELASTOMATACEAE |  |                 |   |               |    |    |    |    |    |    |               |        |
| 53              | <i>Bucquella glutinosa</i> (L.F.) D.C. | Aérea           | C | ++            | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++            |        |
|                 |  |                 | D | ++            | ++ | ++ | -  | -  | -  | ++ | -+            |        |
| PHYTOLACCACEAE  |  |                 |   |               |    |    |    |    |    |    |               |        |
| 54              | <i>Phytolacca bogotensis</i> H.B.K.    | Aérea           | C | -             | -  | ++ | -  | -  | -  | -  | -             |        |
|                 |  |                 | D | -             | -  | -+ | -  | -  | -  | -  | -             |        |
| POLYGALACEAE    |  |                 |   |               |    |    |    |    |    |    |               |        |
| 55              | <i>Monnina phytolacaeifolia</i> H.B.K. | Aérea           | C | -             | -+ | +  | -  | -  | -  | -  | -             |        |
|                 |  |                 | D | -             | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -             |        |
| SOLANACEAE      |  |                 |   |               |    |    |    |    |    |    |               |        |
| 56              | <i>Cestrum venosum</i> Willd.          | Aérea           | C | -             | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -             |        |
|                 |  |                 | D | -             | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -             |        |

S: Dilución del extracto etanólico.

C: Solución en la que 1 ml contiene los principios de 1g de planta seca.

D: Dilución decimal de C.

\*: Los números se refieren a los organismos de la TABLA I.

\*\*: El significado de los signos se explica en la TABLA III.

Tabla III

**CRITERIOS PARA CATALOGAR LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LAS MUESTRAS EVALUADAS POR EL METODO DE DILUCION EN AGAR.**

| Efecto observado                           | Símbolo | Catalogación |
|--|---------|--------------|
| Crecimiento similar a los controles        | -       | Inactivo     |
| Mediana o ligera reducción de la población | - +     | Inactivo     |
| Reducción significativa de la población    | +       | Activo       |
| Ausencia de crecimiento                    | ++      | Activo       |

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos con los extractos etanólicos C, se observa que un alto porcentaje de las plantas analizadas poseen actividad antibacteriana; así, de las 56 muestras evaluadas, 45 (80%) fueron activas frente a *Bacillus subtilis*, 32 (57%) frente a *Staphylococcus aureus* y *S. epidermidis* 13 (23%) frente al ácido resistente y 7 (10%) tuvieron actividad frente a los Gramnegativos. Estos porcentajes muestran

la gran posibilidad de utilizar las plantas superiores como nuevas fuentes de antibióticos, para lo cual es necesario seleccionar aquellos materiales que muestren mejores perspectivas para un estudio más profundo; con este fin se escogieron aquellas plantas que mantuvieron la actividad en el extracto etanólico diluido (D) y se evaluaron por el método de Difusión en Gel. Con los resultados obtenidos mediante esta evaluación se pueden establecer correlaciones del grado de actividad según lo han establecido Kirby y Bauer (31).

En la Tabla IV, los resultados de la evaluación se representan por un número que expresa el diámetro en milímetros de la zona de inhibición (incluido el diámetro del orificio: 8 mm); en todos los casos el resultado se refiere al promedio de dos determinaciones.

A las plantas evaluadas por difusión en gel se les declaró activas frente a una bacteria o un grupo bacteriano, cuando el halo de inhibición producido por la solución C fue superior a 17 mm, según lo han establecido Kirby y Bauer (31) para ensayos de susceptibilidad.

**Tabla IV**  
**RESULTADOS DE LA VALORACION POR DIFUSION EN GEL DE LAS PLANTAS**  
**QUE MOSTRARON ACTIVIDAD SIGNIFICATIVA EN LA EVALUACION**  
**POR DILUCION EN AGAR**

| Planta*<br>No. | S | GRAMPOSITIVOS |    |    | GRAMNEGATIVOS |    |    |    | A.R. | COMENTARIO***    |            |
|----------------|---|---------------|----|----|---------------|----|----|----|------|------------------|------------|
|                |   | 1**           | 2  | 3  | 4             | 5  | 6  | 7  | 8    | Activo frente a: | "Potencia" |
| 1              | C | 26            | 27 | 24 | 25            | 28 | 18 | 27 | 13   | Grampositivos    | Destacada  |
|                | M | 21            | 24 | 17 | 21            | 25 | 16 | 24 | 11   | Gramnegativos    |            |
|                | D | 19            | 20 | 15 | 15            | 20 | 13 | 20 | -    |                  |            |
| 4              | C | 21            | 23 | 24 | -             | 12 | -  | 11 | 11   |                  | Mediana    |
|                | M | 17            | 20 | 20 | -             | -  | -  | -  | -    | Grampositivos    |            |
|                | D | 15            | 16 | 16 | -             | -  | -  | -  | -    |                  |            |
| 9              | C | 19            | 23 | 17 | 15            | 15 | 14 | 20 | 25   | Grampositivos    | Mediana    |
|                | M | 16            | 18 | 12 | 11            | 12 | 12 | 16 | 15   | Ps. aeruginosa   |            |
|                | D | 15            | 16 | 10 | 10            | 11 | -  | 13 | 10   | Acido resistente |            |
| 10             | C | 20            | 20 | 19 | 10            | -  | -  | 14 | 25   | Grampositivos    | Mediana    |
|                | M | 19            | 19 | 17 | -             | -  | -  | 13 | 23   | Acido resistente |            |
|                | D | 16            | 15 | 15 | -             | -  | -  | 10 | 16   |                  |            |
| 11             | C | 24            | 24 | 22 | -             | -  | -  | -  | 24   | Grampositivos    | Buena      |
|                | M | 22            | 21 | 21 | -             | -  | -  | -  | 18   | Acido resistente |            |
|                | D | 19            | 19 | 19 | -             | -  | -  | -  | 16   |                  |            |
| 14             | C | 25            | 24 | 22 | -             | 12 | 12 | 15 | 26   | Grampositivos    | Buena      |
|                | M | 21            | 22 | 21 | -             | -  | -  | 13 | 23   | Acido resistente |            |
|                | D | 18            | 18 | 19 | -             | -  | -  | 12 | 15   |                  |            |
| 23             | C | 34            | 34 | 24 | 15            | 15 | 14 | 12 | 30   | Grampositivos    | Destacada  |
|                | M | 30            | 29 | 20 | 11            | 13 | 12 | -  | 23   | Acido resistente |            |
|                | D | 24            | 21 | 16 | -             | 10 | 11 | -  | 16   |                  |            |
| 24             | C | 22            | 20 | 20 | -             | 10 | 10 | 13 | 19   | Grampositivos    | Mediana    |
|                | M | 17            | 14 | 15 | -             | -  | 9  | 12 | 17   | Acido resistente |            |
|                | D | 15            | 13 | 14 | -             | -  | -  | 11 | 15   |                  |            |
| 26             | C | 23            | 19 | 24 | -             | -  | -  | -  | 26   | Grampositivos    | Buena      |
|                | M | 22            | 18 | 23 | -             | -  | -  | -  | 24   | Acido resistente |            |
|                | D | 18            | 16 | 19 | -             | -  | -  | -  | 17   |                  |            |
| 27             | C | 25            | 19 | 22 | 18            | 18 | 17 | 15 | 35   | Grampositivos    | Buena      |
|                | M | 20            | 16 | 16 | 14            | 14 | 14 | 12 | 25   | Gramnegativos    |            |
|                | D | 17            | 13 | 13 | 13            | 12 | 13 | 11 | 18   | Acido resistente |            |
| 28             | C | 21            | 18 | 23 | 11            | 12 | 12 | 12 | 28   | Grampositivos    | Mediana    |
|                | M | 20            | 15 | 19 | 10            | 11 | 10 | 11 | 18   | Acido resistente |            |
|                | D | 13            | 11 | 13 | 10            | -  | -  | 11 | 13   |                  |            |
| 29             | C | 24            | 24 | 22 | 11            | 11 | 11 | 11 | 33   | Grampositivos    | Buena      |
|                | M | 23            | 22 | 19 | 10            | 11 | 10 | 10 | 28   | Acido resistente |            |
|                | D | 19            | 19 | 15 | 10            | 10 | -  | -  | 18   |                  |            |
| 30             | C | 31            | 30 | 27 | -             | -  | -  | -  | 26   | Grampositivos    | Destacada  |
|                | M | 30            | 29 | 24 | -             | -  | -  | -  | 24   | Acido resistente |            |
|                | D | 28            | 26 | 20 | -             | -  | -  | -  | 22   |                  |            |
| 47             | C | 25            | 30 | 21 | 14            | 15 | 13 | 19 | 20   | Grampositivos    | Destacada  |
|                | M | 23            | 26 | 29 | 12            | 13 | -  | 17 | 16   | Ps. aeruginosa   |            |
|                | D | 20            | 23 | 17 | 10            | 12 | -  | 15 | 15   | Acido resistente |            |
| 53             | C | 29            | 32 | 26 | 17            | 19 | 17 | 20 | 15   | Grampositivos    | Buena      |
|                | M | 27            | 28 | 20 | 14            | 14 | 12 | 18 | 12   | Gramnegativos    |            |
|                | D | 19            | 23 | 18 | 12            | 12 | 10 | 15 | 10   |                  |            |

\*: Número de la planta de acuerdo con el orden establecido en la Tabla II

\*\* : Los números 1 a 8 se refieren a los organismos de la Tabla I

\*\*\*: El significado se explica en el texto y en la Tabla V

S: Dilución del extracto etanólico

C: Solución en la que 1 ml contiene los principios de 1g de planta seca

M: Dilución 3:7 de C (en la que 1 ml contiene lo extraído de 0.33 g de planta seca)

D: Dilución 1:9 de C (en la que 1 ml contiene lo extraído de 0.1 g de planta seca)

La "potencia" o grado de actividad de las plantas activas se catalogan de acuerdo con los criterios presentados en la Tabla V, que aunque algo arbitrarios, permiten establecer prioridades de selección para un estudio posterior tendiente al aislamiento de las sustancias responsables de la actividad antibacteriana.

De acuerdo con los resultados presentados

en las tablas II, IV y V, se obtuvieron los siguientes datos globales: de las 56 muestras analizadas, 15 (25%) mostraron actividad significativa. Las 15 muestras fueron bien activas frente a las bacterias Grampositivas, 12 (20%) de ellas fueron activas frente al *Mycobacterium fortuitum*; 4 (7%) sobre la *Pseudomonas aeruginosa* y 3 (6%) sobre las demás bacterias Gramnegativas.

Tabla V

CRITERIOS PARA CATALOGAR LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LAS PLANTAS EVALUADAS POR DIFUSION EN GEL

| POTENCIA  | Diámetro de la zona de inhibición |            | No. de muestras vegetales |
|-----------|-----------------------------------|------------|---------------------------|
|           | Solución D                        | Solución M |                           |
| Destacada | ≥ 20 mm                           |            | 4                         |
| Buena     | 17 - 19 mm                        |            | 6                         |
| Mediana   |                                   | ≥ 17 mm    | 5                         |

De las plantas que mostraron actividad se destacan las especies: *Eupatorium af. altidifolium* y *Eupatorium tequendamense* de la familia *Compositae*; *Raymondia quinduensis* de la familia *Annonaceae* y *Lepechinia conferta* de la familia *Labiatae*. Las anteriores plantas serán objeto de un estudio encaminado al aislamiento e identificación de las sustancias responsables de la actividad antibacteriana.

RESUMEN

Fue evaluada la actividad antibacteriana de extractos etanólicos de 56 plantas superiores por el método de dilución en agar frente a *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Salmonella*

*typhi*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Mycobacterium fortuitum*. Quince plantas que mostraron actividad antibacteriana significativa contra por lo menos tres microorganismos, fueron valoradas por el método de perforación en placa frente a las bacterias mencionadas, observándose una destacada actividad de las especies: *Eupatorium af. altidifolium* y *Eupatorium tequendamense* de la familia *Compositae*; *Raymondia quinduensis* de la familia *Annonaceae* y *Lepechinia conferta* de la familia *Labiatae*.

SUMMARY

The antibacterial activity of ethanolic extracts of 56 higher plants was evaluated by the method of agar dilution against *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Mycobacterium fortuitum*. Fifteen plants that exhibited significant antibacterial activity against at least three microorganism, were valuated by the method of diffusion in gel-perforation in plates against the same microorganisms. Remarkable activity of the following species: *Eupatorium af. altidifolium* y *Eupatorium tequendamense* of the family *Compositae*; *Raymondia quinduensis* of the family *Annonaceae* and *Lepechinia conferta* of the familia *Labiatae*.

BIBLIOGRAFIA

1. FLOREY, H.W., "Antibiotics", Vol. I, Oxford Medical Publications, London, 580-581, (1949).
2. FARNSWORTH, N.R., "Biological and Phytochemical Screening of plants", J. Pharm. Sci., 55, 225-269, (1966).
3. NOBUYOSHI, M. "Screening tests of plant extracts for antitumor and antibiotic action", Kumamoto Pharm. Bull., 7, 19-27, 1966. Chemical Abstracts, 66 84481e, (1967).
4. NICKELL, L.G., "Antimicrobial Activity of Vascular Plants", Economic Botany, 13, 281-282, (1959).
5. MALCON, S.A. and SOFOWORA, E.A., "Antimicrobial Activity of Selected Nigerian Folk Remedies and their Constituents Plants", Lloydia, 32 (4), 512-517, (1969).
6. PITTS, O.M., THOMPSON, H.S. and HOCH, J.H., "Antibacterial activity of *Solanum carolinense* L.", J. Pharm. Sci., 58, 379-389, (1969).
7. GAIND, K.N. and BUDHIRAJA, R.D., "Antibiotic activity of *Cassia occidentalis*", Indian J. Pharm., 28, 248-250, 1966. Chemical Abstracts, 66, 17052d, (1967).
8. BENJAMIN, T.V. and LAMIKARA, A., "Investigation of *Cassia alata*, a plant used in Nigeria in the treatment of skin diseases", Quart. J. Crude Drug Res, 19 (2), 93-96, (1981).
9. CHOGO, J.B. and GRANK, "Chemical composition and biological activity of the Tanzanian Plant *Ocimum suave*", J. of Natural Products, 44 (3), 308-311, (1981).
10. RODRIGUEZ, E. TOWERS, G.H.N. and MITCHEL, J.C., "Biological activities of sesquiterpene lactones", Phytochem., 15, 1573-1580, (1976).
11. LEE, K.H., IBUKA, and T., WU, R.Y. GEISSMAN, T.A., "Structure-antimicrobial activity relationship among the sesquiterpe-



- ne lactones and related compounds" *Phytochem.*, **16**, 1177-1181, (1977).
12. LEE, K.H., IBUKA, T. and WU, R.Y., "Beta unsubstituted cyclopentenone a structural requirement for antimicrobial and cytotoxic activities", *Chem. Pharm. Bull.*, **22**, 2206, (1974).
  13. CALZADA, J., CICCIO, J.F. and ECHANDI, G., "Antimicrobial Activity of the Heliangolide Chromolaenide and Related Sesquiterpene Lactones", *Phytochemistry*, **19**, 967-968, (1980).
  14. MITSCHER, L.A., SHOWALTER, H.D.H., SHIPCHANDLER, M.T., Lev, R.P. and Beal J.L., "Antimicrobial Agents from Higher Plants. IV *Zanthoxylum elephantiasis*. Isolation and Identification of Canthin-6-one", *Lloydia*, **35** (2), 177-180, (1972).
  15. MITSCHER, L.A., WU, W., DOSKOTCH, R.W. and BEAL J.L., "Antimicrobial Agents from Higher Plants II. Alkaloids from *Thalictrum rugosum*", *Lloydia*, **35** (2), 167-176, (1972).
  16. GHARBO, S.A., BEAL, J.L., DOSKOTCH, R.W. and MITSCHER, L.A., "Alkaloids of *Thalictrum* XIV. Isolation of Alkaloids Having Antimicrobial Activity from *Thalictrum polygamum*", *Lloydia*, **36** (3), 349-351, (1973).
  17. MITSCHER, L.A., BATHALA, M.S., CLARK, G.W. and BEAL, J.L., "Antimicrobial Agents from Higher Plants. The Quaternary Alkaloids of *Ptelea trifoliata*", *Lloydia*, **38** (2), 109-116, (1975).
  18. HUFFORD, Ch. D., SHARMA, A.S. and OGUNTINEIN, B.O., "Antibacterial and Antifungal Activity of Liriodenine and Related Oxoaporphine Alkaloids", *J. Pharm. Sci.*, **69** (10), 1180-1182, (1980). (Y referencias citadas).
  19. AL-SHAMMA, A., DRAKE, S.D., GUA-GLIARDI, L.E. MITSCHER, L.A. and SWAYZE, K.J., "Antimicrobial alkaloids from *Boehmeria cylindrica*", *Phytochemistry*, **21** (2), 485-487, (1981).
  20. TOWERS, G.N.N. and WAT, C.K., "Biological activity of polyacetylenes", *Rev. Latinoamer. Quim.*, **9**, 162-170, (1978).
  21. JURD, L., KING, A.D. and MIHARA, K., "Antimicrobial properties of umbelliferone derivatives", *Phytochem.*, **10**, 2965-2970. (1971).
  22. JURD, L., CORSE, J., KING, A.D., BAYNE, H. and MIHARA, K., "Antimicrobial properties of 6,7-dihydroxy-, 7,8-dihydroxy-, 6-hydroxy and 8-hydroxy coumarins", *Phytochem.*, **10** 2971-2974, (1971).
  23. MATHUR, S.B., "Terpenoids of *Mikania monagasensis* and their biological activities", *Rev. Latinoamer. Quim.*, **6**, 201-205, (1975).
  24. GONCALVES DE LIMA, O., MARINI-BETTOLO, G.B., DELLA-MONANCHE, F., DE BARROS, J.S., D'ALBURQUERQUE, I.L., MEDEIROS, G., LACERDA, A. e MARTINS, D. G., "Substancias antimicrobianas de plantas superiores. Comunicacao XXXII. Activade antimicrobiana e antineoplasica de produto identificado como 2-metoxi-6-n-pentil-p-benzoquinona (Primina), isolado de raizes de *Miconia sp.* (Melastomataceae)", *Rev. Inst. Antibiot. Univ. Recife*, **10** (1/2), 29-34, (1970).
  25. GONCALVES DE LIMA, O., MARINI-BETTOLO, G.B., DE BARROS, J.S., D'ALBURQUERQUE, I.L., BARROS, M.S., MARTINS, D.G. e DE OLIVEIRA, L.L., "Substancias antimicrobianas de plantas superiores. Comunicacao XXXIII. Primeiras observacoes sobre actividade antimicrobiana e antineoplasica de 2-metoxi-6-n-pentil-1, 4-dihidroxibenceno (Miconidina), isolada de extractos de raizes de *Miconia sp.* (Melastomataceae)". *Rev. Inst. Antibiot. Univ. Recife*, **10** (1/2), 35-39, (1970).
  26. KAVANAGH, F. *Analytical Microbiology*. Academic Press. New York & London, 2nd Ed. pag. 146-206, (1969).
  27. BARRY, A.L., "Procedures for testing antibiotics in agar media: Theoretical considerations". En: Lorian, V. (Editor). *Antibiotics in Laboratory Medicine*. Williams & Wilkins, Baltimore London, pag. 1-23, (1980).
  28. MITSCHER, L.A., LEW, R.P., BATHALA, M.S., WU, W.N. and BEAL, J.L., "Antimicrobial agents from higher plants I. Introduction rationale and methodology", *Lloydia* **35**, 157-166, (1972).
  29. BARRY, A.L., "Procedures for testing antibiotics in agar media: Theoretical considerations". En: Lorian V. (Editor). *Antibiotics in Laboratory Medicine*, Williams & Wilkins, Baltimore-London, pag. 7, (1980).
  30. HUGO, W.B., and RUSSELL, A.D., *Pharmaceutical Microbiology*, 1a. Ed., Blackwell Scientific Publications, Oxford, pag. 105, (1977).
  31. BAUER, A.W., KIRBY, W.M., SHERRIS, J. C., and TURCK, M. "Antibiotic susceptibility testing by standardized single disk method". *Am. J. Clin. Path.* **45** (4), 493-496, (1966).