

METODOLOGIAS PARA EVALUAR *IN VITRO* LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE COMPUESTOS DE ORIGEN VEGETAL

Methodologies for evaluating the *In vitro* antibacterial activity of natural compounds of plant origin

RESUMEN

Los productos naturales, proveen oportunidades ilimitadas para el hallazgo de nuevos fármacos. En esta revisión se presentan algunas metodologías utilizadas para la evaluación de la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal.

PALABRAS CLAVES: actividad antibacteriana, plantas medicinales

ABSTRACT

Natural products provide unlimited opportunities for finding new drugs. In this review are some methodologies used for assessing the activity of antibacterial compounds of plant origin.

KEYWORDS: Antibacterial activity, Medicinal plants

Luz Stella Ramirez. PhD

Profesor Asociado.

Universidad Tecnológica de Pereira

Grupo de Investigaciones

Polifenoles-Cenivam-Utp

luramire@utp.edu.co

Darwin Marin Castaño.

Químico Industrial

Grupo de investigaciones

Polifenoles-Cenivam-Utp

Damian@gmail.com

1. INTRODUCCIÓN

Desde tiempos prehistóricos el hombre ha utilizado plantas con fines medicinales (curativos y preventivos), alimenticios y cosméticos. Actualmente, especies de plantas promisorias de uso etnofarmacológico son fuentes de información para el descubrimiento de posibles sustancias con importante actividad biológica [1].

Las sustancias derivadas de las plantas han alcanzado una gran proyección, propio de sus aplicaciones versátiles [2].

La emergencia de la resistencia bacteriana ha generado nuevos intereses en la búsqueda de medicamentos con poder antibacteriano, prueba de ello es el aumento en los últimos años del número de publicaciones, relacionando productos naturales y actividad antimicrobiana, centrándose las investigaciones en los productos naturales como fuentes de moléculas bioactivas [3, 4].

El desarrollo de la farmacéutica inicia con la identificación de principios activos, los análisis biológicos, la formulación de la dosis, seguida por estudios clínicos para establecer la seguridad, eficacia y perfil farmacológico de las nuevas drogas [5].

En esta revisión se presentan los criterios más relevantes que permitan estandarizar los procesos para la evaluación de la actividad antibacteriana. Los test de susceptibilidad antimicrobiana (AST) son una técnica esencial en muchas disciplinas de la ciencia, y son el primer paso hacia la búsqueda de nuevas drogas antiinfectivas [6].

2. METODOLOGIAS PARA EVALUAR LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

Diferentes métodos de laboratorio pueden ser usados para determinar *In vitro* la susceptibilidad de bacterias ante agentes microbianos, pero estos no son igualmente sensibles o no se basan en los mismos principios, permitiendo que los resultados sean influenciados por el método seleccionado, los microorganismos usados y el grado de solubilidad de cada compuesto evaluado. Los problemas generales inherentes a los ensayos antimicrobianos han sido discutidos por varios autores [7-10], de allí la importancia de conocer los estándares para estas pruebas de actividad biológica.

Los métodos para evaluar la actividad antibacteriana están clasificados, en tres grupos principales: Métodos de difusión, métodos de dilución y bioautografía, un cuarto método es el análisis conductimétrico, el cual detecta el crecimiento microbiano como un cambio en la conductividad eléctrica o impedancia del medio de cultivo [11]. De este último no se profundizará en esta revisión.

Las técnicas de difusión han sido ampliamente usadas para evaluar extractos de plantas con actividad antimicrobiana [12, 13].

En general se propone usar los métodos de difusión (en papel o en pozo) para estudiar compuestos polares, y los métodos de dilución para sustancias polares y no polares. De acuerdo a las investigaciones reportadas en el periodo entre 1980 y 2007, las técnicas más usadas se resumen en la tabla 1. Las metodologías aplicadas siempre consideran la estandarización de la concentración bacteriana a utilizar, con el ánimo de evitar un

crecimiento exhaustivo, que impida el análisis de los resultados o proporcione resultados errados lo cual puede variar significativamente la respuesta del extracto vegetal o aceite, indicando la necesidad de utilizar concentraciones mayores de éste para inhibir el crecimiento del microorganismo. La concentración de bacterias usada para el estudio de susceptibilidad en el laboratorio ha sido estandarizado en 5×10^5 unidades formadoras de colonias (ufc)/mL, lo cual equivale a un patrón de 0.5 en la escala de Mac Farland. Es recomendable tomar el inóculo de cultivos en la fase exponencial de crecimiento y siempre tomar 4 o 5 colonias de un cultivo puro para evitar seleccionar variantes atípicas [14].

Los medios de cultivo más utilizados en dichas técnicas son el agar Mueller Hinton y agar tripticasa soya, ya que sus componentes facilitan el crecimiento de diferentes cepas bacterianas y mayor difusión de las muestras [15]. Algunos investigadores utilizan el agar nutritivo [16].

Métodos de difusión

El método de difusión en agar, está apoyado por datos clínicos y de laboratorios; y presenta la ventaja que sus resultados son altamente reproducibles [17].

La técnica está basada en el método originalmente descrito por Bauer et al., (método de Kirby-Bauer). Este método de difusión en disco o en pozo fue estandarizado y es actualmente recomendado por el Subcomité de Ensayos de Susceptibilidad de NCCLS, de Estados Unidos. El fundamento de esta determinación es establecer, en forma cuantitativa, el efecto de un conjunto de sustancias, ensayados individualmente, sobre las cepas bacterianas que se aíslan de procesos infecciosos [18, 19]. El método se basa en la relación entre la concentración de la sustancia necesaria para inhibir una cepa bacteriana y el halo de inhibición de crecimiento en la superficie de una placa de agar con un medio de cultivo adecuado y sembrado homogéneamente con la bacteria a ensayar y sobre la cual se ha depositado un disco de papel filtro de 6 mm de diámetro, o se ha sembrado en pozo impregnado con una cantidad conocida de la sustancia [20, 21].

La técnica con sensidiscos presenta varias desventajas; una de ellas es la composición del papel filtro Whatman el cual se compone de celulosa (uniones b-(1-4) de monómeros de glucosa), los cuales tienen muchos grupos hidroxilos libres presentes en cada glucosa, haciendo que la superficie del disco sea hidrofílica [22], interviniendo directamente con algunos compuestos catiónicos de los productos naturales absorbiéndolos en la superficie del disco e impidiendo la difusión de estos en el agar, los compuestos apolares pueden no ser influenciados por dichos grupos hidroxilos y difundir fácilmente en el agar. Esto puede explicar en parte la más alta sensibilidad detectada cuando el método se utiliza directamente en pozo [23].

En el caso de evaluar varias sustancias los discos de papel filtro o los pozos deben ponerse en forma

equidistante. A continuación se procede a su incubación a la temperatura adecuada por 24 horas [24] luego se mide el halo de inhibición y se comparan los efectos de las distintas sustancias sobre el microorganismo estudiado, con el antibiótico control. La lectura de los resultados representa la actividad *In vitro* de la sustancia. Algunos autores refrigeran las cajas a 4°C para permitir la predifusión de los extractos antes de la incubación [25].

Método	Categorías	MIC $\mu\text{g/ml}$
Difusión en agar (discos)	S, I, R	No
Dilución en agar	S, I, R	Sí
Dilución en caldo	S, I, R	Sí
Métodos automatizados	S, I, R	Sí
E-test	S, I, R	Sí

Abreviaciones: S, susceptible; I, Intermedio; R, resistente; CIM, concentración inhibitoria mínima.

Tabla 1. Métodos para el estudio de susceptibilidad antimicrobiana

Es necesario señalar que el tamaño del halo de inhibición es influenciado por varios factores, entre ellos; medio de cultivo en que se realiza la prueba, capacidad de difusión del compuesto, cantidad de inóculo, tiempo de generación del microorganismo, sensibilidad al antibiótico, y período de incubación. Cualquier variación de estos factores puede afectar el resultado de la prueba, sin embargo, al emplear un procedimiento estándar es posible obtener resultados confiables.

Métodos de dilución

El método de dilución en agar o en caldo como test de susceptibilidad microbiana es utilizado para determinar la concentración mínima bactericida (MBC) [26] y la concentración mínima inhibitoria (MIC) [27, 28], la cual es definida como la concentración más baja de sustancia que puede inhibir el crecimiento visible de un microorganismo después de incubar por 24 horas, y la (MBCs) como la concentración más baja que puede prevenir el crecimiento de un organismo después de subcultivar en un medio libre del compuesto evaluado, estas variables son una herramienta para investigar nuevos antimicrobianos [29].

En la técnica de dilución en caldo, son utilizados tubos o microplacas (microdilución) que contienen concentraciones crecientes del extracto vegetal. El organismo en estudio es inoculado en los diferentes tubos o pozos de las microplacas y la MIC es determinada después de la incubación [30].

En el método de dilución en agar, las cajas se siembran por profundidad con una determinada concentración de

extracto vegetal, luego se inoculan con el microorganismo en estudio y se incuban por 24 horas, después de ésta, se examina si el microorganismo crece o no en cada una de las cajas, la principal desventaja de este método es la cantidad necesaria de muestra a evaluar.

Los métodos de microdilución en caldo son una técnica útil para determinar MIC, en un gran número de muestras. La ventaja sobre los métodos de difusión radica en un aumento de la sensibilidad para cantidades pequeñas, lo cual es importante cuando se trabaja con productos naturales, además permite diferenciar entre un efecto bactericida o bacteriostático [31].

Determinación de la MIC

La cuantificación de la actividad *in vitro* de los antimicrobianos se evalúa habitualmente mediante algunas de las variantes de los métodos de dilución. La MIC se ha establecido como "*gold Standard*" frente a otros métodos que evalúan susceptibilidad antimicrobiana; además de confirmar resistencias inusuales, da respuestas definitivas cuando el resultado obtenido por otros métodos es indeterminado [32].

Se puede realizar en microdilución para lo cual se escogen las placas que tienen 96 pocillos (12 mm x 8 mm), en las que se estudia en cada una de ellas, el mismo microorganismo, 8 antimicrobianos y 11 diluciones (la última columna se suele utilizar como control de crecimiento) o viceversa. Las placas de microdilución deben sellarse con adhesivo para evitar la evaporación del medio de cultivo cuando se incuben. Tras la incubación se observa la turbidez o se procede a la adición del bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazolium (MTT). Las células vivas y metabólicamente activas son capaces de reducir el MTT, de color amarillo en solución a formazán, compuesto insoluble que precipita en forma de cristales violeta, evidenciando de esta forma actividad metabólica [33].

El MTT, ha sido usado para visualizar la actividad de la enzima deshidrogenada, esta enzima remueve el hidrógeno del sustrato y lo transfiere al aceptor de hidrógenos, usualmente una coenzima. De la coenzima es transferido al MTT, el cual es reducido a un compuesto intensamente coloreado e insoluble en agua llamado formazán [34]. El formazán absorbe a una longitud de onda de 550 a 570 nm.

Estandarización del método para la determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (MIC).

Para las pruebas de actividad antimicrobiana en microplaca de 96 pozos, se preparan diferentes concentraciones de los aceites y/o extractos a ensayar, los cuales se mezclan con el medio de cultivo, el cual ha sido inoculado previamente con el microorganismo de prueba, se deja incubar y posteriormente se determina

por turbidez o por cambio de color con MTT el crecimiento o no del microorganismo, el pozo que contenga la menor concentración del agente que inhibe completamente el crecimiento define la MIC.

Como prueba confirmatoria se siembra por superficie en caja de petri con agar nutritivo, 20 µl del contenido del pozo, dejando incubar por 24 horas a 37 °C; para posteriormente realizar la lectura.

Otro método muy utilizado es la determinación de la concentración bactericida mínima o MBC también conocido como concentración letal mínima, la cual es definida como la concentración más baja del agente antimicrobiano necesaria para matar el 99% del inóculo inicial después de incubación por 24 horas bajo condiciones estandarizadas. Este ensayo es una prueba que se realiza generalmente como dilución en caldo empleando diluciones dobles, y se realiza posterior a la determinación de la MIC. Se comprueba sembrando de cada una de las diluciones por difusión en agar y se determina el número de ufc (Unidades formadoras de colonias/ml), puede ser determinado usando un método de macrodilución (1 o 2 ml por tubo) o por microdilución (0.1 o 0.2 ml por tubo), sin embargo el método por microdilución tiene más sensibilidad. El método estandarizado para alcanzar la MBC a través de microdilución en caldo se encuentra en el protocolo de NCCLS descrito como M -26 A [35].

En los bioensayos de actividad antibacteriana se deben tener en cuenta algunos aspectos:

El panel de microorganismos a evaluar siempre debe tener dentro de la batería, microorganismos gram positivos y gram negativos.

Las cepas ATCC son bien caracterizadas, aunque también se pueden utilizar aislamientos clínicos.

El inóculo se recomienda que este en el rango de 10^5 y 10^6 ufc/ml [36].

La concentración de los extractos a evaluar no debe exceder el rango de 1 mg/ml para extractos y 0.1 mg/ml para compuestos aislados [37].

Estudios cinéticos de letalidad bacteriana

Las curvas de letalidad se utilizan fundamentalmente para el estudio de nuevos antimicrobianos y para determinar el sinergismo/antagonismo de la combinación de dos o más sustancias administradas conjuntamente [38]. En las bacterias, donde estos ensayos están muy desarrollados y estandarizados, los datos que se han obtenido han ayudado a comprender el mecanismo de acción de los antimicrobianos. De hecho, la determinación de las curvas de mortalidad-tiempo, se ha convertido en una herramienta de trabajo para determinar los efectos de los antimicrobianos sobre las bacterias [39].

Las curvas de mortalidad suministran una información dinámica de la actividad bactericida, y sobre la relación entre la concentración de antimicrobiano y su actividad microbicida [40].

Este es un método que se realiza en caldo, donde la tasa de muerte de un inóculo fijo es determinado por la muestra control (microorganismo sin agente antibacteriano) y agentes antimicrobianos contenidos en tubos, los cuales se siembran a diferentes tiempos usualmente 0,4,8,10,12 y 24 horas de incubación y utilizando la dilución adecuada se determina el número de ufc / ml que se forma, al sembrar cada muestra en una placa de agar, multiplicando el número de colonias por la dilución ensayada se obtendrá el número de células supervivientes. Normalmente de cada concentración se ensayan dos o tres diluciones y el ensayo se realiza por triplicado [41]. Las curvas de mortalidad son construidas en papel semilogarítmico graficando en el eje de las ordenadas las ufc y en el eje de las abscisas el tiempo. Para determinar el efecto sinérgico o antagónico entre dos o más agentes antimicrobianos, las curvas son construidas a partir de una concentración fija de cada agente solo y en combinación, los resultados se comparan con el control; el cual está libre del agente antibacteriano[42].

Se dice que hay actividad sinérgica cuando se produce un aumento de la destrucción bacteriana de por lo menos 100 veces (>2 logaritmos en base 10) la producida por el antibiótico más activo, o si la actividad de los dos antimicrobianos es significativamente mayor que la suma de las actividades separadas. Si la acción bactericida observada difiere en menos de 10 veces la del fármaco más activo, el efecto es aditivo o autónomo [43]. Si hay un aumento en el crecimiento de más de 10^2 UFC/ml a las 24h en la curva de la asociación frente a la del antimicrobiano más activo en solitario se dice que hay un efecto antagónico[44].

El tiempo de letalidad ha sido usado ampliamente para la evaluación de nuevos agentes antimicrobianos y permite determinar la tolerancia o la actividad letal de agentes antibacterianos. Este método ha sido descrito en detalle en NCCLS M26A

Parámetros que se deben conocer antes de realizar la curva de letalidad-tiempo

Antes de realizar los estudios de letalidad-tiempo, hay una serie de parámetros que se deben conocer como son: i) la *CMI* del microorganismo en el medio de cultivo donde se va a determinar la curva de letalidad; ii) las *concentraciones* que se van a ensayar, normalmente suelen estudiarse las concentraciones comprendidas entre $1/2$ y $4 \times CMI$, iii) La *dinámica de crecimiento* del microorganismo, vi) el tiempo en que la concentración es bactericida, es decir el tiempo en el que el descenso de UFC es de 3 log con respecto al tiempo inicial y vii) el tiempo en que la diferencia en UFC entre el control y el antibiótico es de 3 log [39].

La relación entre la concentración y la letalidad se establece, calculando la tasa de crecimiento y/o letalidad de cada concentración. Esta tasa es la pendiente de la curva de letalidad y debe determinarse matemáticamente. Representa la velocidad a la que mueren las células y se mide en UFC/tiempo.

Bioautografía

Este ensayo puede representar una herramienta útil para la purificación de sustancias antibacterianas, o como una técnica de tamizaje fitoquímico preliminar, o un fraccionamiento bioguiado [45], realizando el ensayo a través de cromatogramas, que permitan la localización de los compuestos activos, incluso en matrices complejas como los derivados de productos naturales. Se puede definir como una variación de los métodos de difusión en agar, donde el analito es absorbido dentro de una placa de cromatografía delgada TLC [46]. El método consiste en colocar las muestras a evaluar en placas de TLC, seleccionar la fase móvil que de mejor separación, posteriormente esta placa es llevada y colocada en forma invertida sobre una caja de petri previamente inoculada con el microorganismo a evaluar, se deja de 8 a 12 horas en la nevera para facilitar la difusión de los extractos en el medio, luego se retira la placa y se lleva la caja a incubación según los requerimientos del microorganismo; luego se observa el halo de inhibición donde está el compuesto activo. Para visualizar mejor los resultados se puede utilizar alguna sal de tetrazolium [47-49].

Es importante tener en cuenta que solventes ácidos o demasiado alcalinos pueden permanecer en las placas de TLC, después del secado, inhibiendo el crecimiento bacteriano [50].

CONCLUSIONES

Se deben tener consideraciones generales para el estudio de la actividad antimicrobiana en extractos de plantas, aceites esenciales y de compuestos aislados a partir de ellos. Los parámetros más importantes son selección del material vegetal el cual se recomienda hacerlo a partir de perspectivas etnofarmacológicas, o criterios quimiotaquimicos, las técnicas empleadas para seleccionar las metodologías de acuerdo a la naturaleza del extracto, así para extractos no polares o sustancias que no difunden bien en el agar es más recomendable técnicas de dilución que las de difusión; medio de cultivo y microorganismos a evaluar, trabajos previos han demostrado que la composición del medio de cultivo puede influir la actividad de los extractos o compuestos evaluados.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] O. M. S., "Recomendaciones para gobiernos y consumidores acerca del uso de la medicina

- tradicional, complementaria y alternativa", *J. Public Health*, Vol. 16, pp. 218, 2004.
- [2] Baris O, Gulluce M, Sahin F, Ozer H, O. H. Kilic H, Sokmen M, O. T. . "Biological activities of the essential oil and methanol extract of *Achillea Biebersteinii* Afan. (Asteraceae). Turk." *J. Biol.*, Vol. 30, pp. 65, 2006.
- [3] M. C. Redo , J. L. Rios , A. Villar, "A review of some antimicrobial compounds isolated from medicinal plants reported in the literature 1978-1988", *Phytotherapy Research*, Vol. 3(4), pp. 117, 1989.
- [4] L. L. Silver, K. A. Bostian, "Discovery and development of new antibiotics: the problem of antibiotic resistance", *Antimicrob. Agents Chemother*, Vol. 37(3), pp. 377, 1993.
- [5] M. W. Iwu, A.R. Duncan, C. O. Okunji., "New antimicrobials of plant origin", *J. Janick (ed.)*, *Perspectives on new crops and new uses*. ASHS Press, Alexandria, VA., pp. 457, 1999.
- [6] Lampinen. J "Continuous Antimicrobial susceptibility testing in drug discovery. " *Drug Plus International*, 2005.
- [7] D. A. Vanden Berghe, A. J. Vlietinck, "Screening for antibacterial and antiviral agents. In Hostettmann, K (Ed). " *Methods in Plant Biochemistry Assay for Bioactivity*. Academic Press, London, Vol. 6, pp. 47, 1991.
- [8] M. D. Cole "Key antifungal, antibacterial and anti-insect assay – a critical review ", *Biochemical Systematics and Ecology*, Vol. 22, pp. 837, 1994.
- [9] J. L. Rios, M.C. Recio, A. Villar, "Screening methods for natural products with antimicrobial activity: a review of the literature", *Journal of Ethnopharmacology*, Vol. 23, pp. 127, 1988.
- [10] F. Hadacek, H. Greger, "Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice", *Phytochemical Analysis*, Vol. 11(3), pp. 137, 2000.
- [11] Sawai.J., D. R., Maekawa.Y., Y. T., K. H, "Indirect conductimetric assay of antibacterial activities", *Journal of industrial Microbiology and Technology*, Vol. 29, pp. 296, 2002.
- [12] Freixa B, Vila R, Vargas L, Lozano N, Adzet T, Caniguera S, " Screening for antifungal activity of nineteen Latin American plants", *Phytotherapy Research*, Vol. 12, (6), pp. 427, 1998.
- [13] Salie F, Eagles PFK, Lens HMJ, "Preliminary antimicrobial screening of four South African Asteraceae species", *Ethnopharmacology*, Vol. 52(1), pp. 27, 1996.
- [14] Anon, "Determination of minimum inhibitory concentration (MICs) of antibacterial agents by broth dilution", *Clinical Microbiology and Infection*, Vol. 9, pp. 1, 2003.
- [15] E. European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing, "Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by agar dilution", *Clinical Microbiology and Infection*, Vol. 6(9), pp. 509, 2000.
- [16] Doughari JH "Antimicrobial activity of *Tamarindus indica* Linn. Trop." *Pharmaceutical Research*, Vol. 5(2), pp. 597, 2006.
- [17] A. L. Barry, D. Amsterdam, M. B. Coyle, E. H. Gerlach, C. Thornsberry, H. R. W, "Simple Inoculum Standardizing System for Antimicrobial Disk Susceptibility Test." *J. Clin. Microbiology*, Vol. 10, pp. 910, 1979.
- [18] a. Comite` l'Antibiogramme de la Socie`te` Franc, deMicrobiologie., "Technical recommendations for in vitro susceptibility testing", *Clin Microbiol Infect*, Vol. 2, S11, 1996.
- [19] S. National Committee for Clinical Laboratory, "Prueba de susceptibilidad antimicrobiana por difusión en agar", *National Committee for Clinical Laboratory Standards*, Villanova, Pa., Vol. 17(1), 1997.
- [20] C. National, for, Clinical, Laboratory, Standards., *Manual de Control de Calidad en el Laboratorio Clínico*. (1998), pp. 7.18-7.21.
- [21] D. M. Hacek, D. C. Dressel, L. R. Peterson, "Highly Reproducible Bactericidal Activity Test Results by Using a Modified National Committee for Clinical Laboratory Standards Broth Macro-dilution Technique", *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 37(6), pp. 1881, 1999.
- [22] J. Grant Burgess, Elizabeth M. Jordan, Migena Bregu, Andrew Mearns-Spragg, K. G. Boyd, "Microbial antagonism: a neglected avenue of natural products research ", *Biotechnology*, Vol. 70(1-3), pp. 27, 1999.
- [23] C. Valgas;, S. M. d. Souza;, E. F. A. Smânia;, A. S. Jr., "Screening methods to determine antibacterial activity of natural products", *Brazilian Journal of Microbiology*, Vol. 38, pp. 369, 2007.
- [24] Mbata TI, Debiao L, Saikia A, , "Antibacterial activity of the crude extract of Chinese Green Tea", *African Journal of Biotechnology*, Vol. 7(19), pp. 1571, 2006.
- [25] Tepe B, Daferera D, Sökmen M, Polissiou M, S. A., "In vitro antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils and various extracts of *Thymus eigii* M. Zohary et P.H. Davis." *Agric Food Chem.*, Vol. 52(5), pp. 1132, 2004.
- [26] S. National Committee for Clinical Laboratory, "Methodology for the serum bactericidal test. Approved Guideline. Document M21-A, in press." *National Committee for Clinical Laboratory Standards*, Villanova, Pa.
- [27] C. M. Isada, L. K. Bernard, M. P. Goldman, L. D. Gray, J. A. Aberg, "Infectious Diseases Handbook including Antimicrobial Therapy & Diagnostic Test/Procedures.", pp. 163, 2001.

- [28] P. F. McDermott, S. M. Bodeis-Jones, T. R. Fritsche, R. N. Jones, R. D. Walker, "Broth microdilution susceptibility testing of *Campylobacter jejuni* and the determination of quality control ranges for fourteen antimicrobial agents." *Clinical Microbiology and Infection*, Vol. 43, pp. 6136, 2005.
- [29] Andrews.JM., "Determination of Minimum Inhibitory Concentration", *J Antimicrob Chemother*, Vol. 48(31), pp. 5, 2001.
- [30] J. M. Wilkinson, "Methods for Testing the Antimicrobial Activity of Extracts", *Modern Phytomedicine*, pp. 157-171, 2007.
- [31] Langfield RD, Scarano FJ, Heitzman ME, Kondo M, Hammond GB, Neto CC, "Use of a modified microplate bioassay method to investigate antibacterial activity in the Peruvian medicinal plant *Peperomia galiodes*", *J. Ethnopharmacol*, Vol. 94(2-3), pp. 279, 2004.
- [32] S. National Committee for Clinical Laboratory, "Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, 4th ed. Approved standard. Document M7-A4." *National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pa.*, 1997.
- [33] M.J.GIL, M.Manu., V. Martinez, A. González, I. Encio, C. Arteaga, M. Miglaccio, "Nuevos agentes antineoplásicos: diseño, síntesis y determinación experimental", *ANALES Sis San Navarra*, Vol. 22(3), pp. 85, 1999.
- [34] F. Moriartya, S. Elbornb, M. Tunneya, in *Journal of Microbiological Methods*. (2005), vol. 61, pp. 171– 179.
- [35] S. National Committee for Clinical Laboratory, "Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents. Approved Guideline. Document M26-A, in press." *National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pa.*
- [36] Paul cos, Arnold J Vlietnick, Dirk vanden Berghe, L. maes, "Antiinfective potential of natural products: How to develop a stronger in vitro proof of concept", *Ethnopharmacology*, Vol. 106, pp. 290, 2006.
- [37] J.L. Rios, M.C. Recio, "Medicinal plants and antimicrobial activity", *Ethnopharmacology*, Vol. 100, pp. 80, 2005.
- [38] J.L.M. Bellido, S. M. C. ., I. G. Garcia., M.A.A. Manzanares, M.N.G Zufiaurre, J. H. Rodríguez., "In Vitro activities of B lactamase inhibitor combinations against *Stenotrophomonas maltophilia*: correlation between methods for testing inhibitory activity, time kill curves, and bactericidal activity", *Antimicrobian. Agents Chemother*, Vol. 41, pp. 2612, 1997.
- [39] E. Cantón, J. Pemán, "Curvas de letalidad en antifúngicos", *Revista Iberoamericana de Micología*, Vol. 16, pp. 82, 1999.
- [40] A. Brady, R. Loughlin, D. Gilpin, P. Kearney, M. Tunney, "In vitro activity of tea-tree oil against clinical skin isolates of methicillin-resistant and -sensitive *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci growing planktonically and as biofilms", *J Med Microbiol*, Vol. 55(10), pp. 1375, 2006.
- [41] V. Lorian, "Antimicrobial combinations. In Lorian V (Ed. " *Antibiotics in Laboratory Medicine (Williams and Wilkins, MD, USA)*, pp. 339, 1996.
- [42] Jacqueline C., Caillon J, Le. M.V y cols, "In vitro activity of linezolid alone and in combination with gentamicin, vancomycin or rifampicin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by time-kill curve methods", *Antimicrob Chemother*, Vol. 51, pp. 857, 2003.
- [43] M.A. Pfaller, D. J. Sheehan, J. H. Rex, "Determination of fungicidal activities against Yeast and Molds: Lessons Learned from Bactericidal Testing and the Need for Standardization", *Clinical Microbiology Reviews*, pp. 268, 2004.
- [44] J. A. G. Rodríguez, R. Cantón, J. E. G. Sánchez, M. L. Gómez-Lus, L. M. Martínez, C. Rodríguez-Avial, J. Vila, in *Procedimientos en Microbiología Clínica* (2001).
- [45] Schmourlo G, Mendonca-Filho RR, Alviano CS, Costa SS, "Screening of antifungal agents using ethanol precipitation and bioautography of medicinal food plants." *Ethnopharmacology*, Vol. 96(3), pp. 563, 2004.
- [46] Ncube N. S, Afolayan A. J, Okoh A. I, "Assessment techniques of antimicrobial properties of natural compounds of plant origin: current methods and future trends", *African Journal of Biotechnology*, Vol. 7(12), pp. 1797, 2008.
- [47] W. J. Beghe, R. M. Kline, "The use of tetrazolium salts in bioautography procedures", *Chromatogr*, Vol. 64, pp. 182, 1972.
- [48] M. O. Hamburger, G. A. Cordell, "A direct bioautographic TLC assay for compounds possessing antibacterial activity", *Natural products*, Vol. 50, pp. 19, 1987.
- [49] Silva MTG, Simas SM, Batista TGFM, Cardarelli P, T. TCB, "Studies on antimicrobial activity, in-vitro, of *Physalis angulata* L. (Solanaceae) fraction and physalin B bringing out the importance of assay determination", *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, Vol. 100(7), pp. 779, 2005.
- [50] A Nostro, M.P Germanò, V. D'Angelo, A. Marino, M.A. Cannatelli, "Extraction methods and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity", *Letters in Applied Microbiology*, Vol. 30(5), pp. 379, 2000.