Contribución al estudio de los antibióticos procedentes de líquenes

POR

F. BUSTINZA y A. CABALLERO LOPEZ

Laboratorio de Fisiología Vegetal.—Jardín Botánico de Madrid

(Trabajo entregado el 14 de marzo de 1948)

Cuando comenzaron nuestras investigaciones, a fines de octubre de 1947, sobre la exploración de la actividad antibacteriana de este grupo de plantas, teníamos referencia de los trabajos de Burkholder y colaboradores (1) (2) y del trabajo de Marshak. Burkholder y Evans, en su trabajo publicado en 1945 (2), dan cuenta de haber ensayado alrededor de un centenar de especies de líquenes y de que el extracto de *Usnea florida* es activo frente a *B. subtilis*, *B. mycoides* y *Sarcina lutea*, pero que no lo es frente a *St. aureus* ni frente a *Eschèrichia coli*. Ensayaron también la actividad del ácido úsnico a saturación en el agua, pues es prácticamente insoluble en ese disolvente, y observaron que es activo frente al *B. subtilis*, pero inactivo frente a *Esch. coli* y *Staphylococcus aureus*, y señalan también que muchas especies de líquenes que no

(1) P. R. Burkholder, A. W. Evans, I. McVeigh and H. K. Thornton. *Antibiotic activity of lichens*. Proceedings National Academy of Sciences. Vol. 30, N.° 9, p. 250-255, 1944.

(2) P. R. Burkholder and Alexander W. Evans. *Further studies of the antibiotic activity of lichens*, «Bulletin of the Torrey Botanical Club». Vol. 72. N.° 2, p. 157-164, 1945.

contienen ácido úsnico son capaces de inhibir al *B. subtilis* y también que el ácido úsnico no explica la inhibición del *Staphylococcus aureus* por muchos líquenes.

Marshak publicó en enero de 1947 (3) su interesante trabajo sobre la *ramalina*, sustancia que obtuvo a partir del líquen *Ramalina reticulata*, y cuya acción antibacteriana estudió adicionando los cristales de ramalina, sustancia prácticamente insoluble en el agua, a los medios de cultivo a diferentes concentraciones, y observando que a la concentración de 1/50.000 inhibe completamente a las estirpes humanas de *Mycob. tuberculosis*, pero que frente a algunas estirpes de *Mycob. hominis* es capaz de producir inhibición parcial incluso a la dilución de 1/ en 2.000.000 y que la estirpe de *Mycobacterium avium* es más resistente, pues necesita concentraciones de 1/20.000 de ramalina para que la inhibición sea completa.

Este trabajo de Marshak avivó nuestro interés por explorar la actividad antibacteriana de los líquenes, que fué despertado por la comunicación que nos hizo en el mes de septiembre del año 1946 el señor don Santiago Gallego, presidente del Colegio Oficial de Farmacéuticos de la provincia de Soria, diciéndonos que en Abejar utilizan el líquen *Usnea barbata* como secante y antiséptico para las grietas y escoceduras de los pies (4).

Habíamos recolectado el líquen *Evernia furfuracea* sobre pinos en Navas del Marqués y la *Evernia prunastri* y una pequeña cantidad de *Usnea barbata* en el valle de Navacerrada sobre pinos.

Con cada líquen preparamos un extracto, utilizando como vehículo una disolución acuosa de tampón fosfatos a un pH 7 y trituramos 1 g. de líquen con 10 c. c. del tampón en pequeño mortero y empleando arena fina de cuarzo estéril para favorecer el desgarre celular. Después de unos quince minutos de macera-

---

(3) A. Marshak. *A. crystalline antibacterial substance from the lichen Ramalina reticulata*, «Extracs from Public Health Reports». Vol. 62, n.º 1, january 3, 1947, p. 3-19.

(4) Queremos expresar nuestra gratitud al Sr. D. Santiago Gallego por la generosidad con que siempre ha respondido a nuestras peticiones de *Usnea barbata*, a D. Francisco Pérez de San Román por la ayuda que nos prestó en los primeros ensayos de exploración de la actividad antibacteriana de algunos líquenes, y a D. Juan Daza por su cooperación en las operaciones manuales.

ción filtramos a través de un tejido de nylon y empleamos los extractos para las pruebas de actividad antibacteriana.

Comenzamos por trabajar solamente con dos bacterias: *Staphytococcus aureus* H. y *Escherichia coli*, estirpe N. R. R. L. B. 686.

Empleamos como medio de cultivo agar-tampón fosfatos a un pH 7 y sembramos las placas por el método de inundación con cultivos de veinticuatro horas en caldo de los citados gérmenes; se deseca la superficie de las placas sembradas en estufa a 37° durante una a dos horas y adoptando las precauciones necesarias para evitar las contaminaciones.

Sobre las placas sembradas se practican con perforador metálico estéril los pocillos, en cuyo interior se colocan los extractos de líquenes, obtenidos como anteriormente hemos indicado, y se incuban las placas en estufa a 37° durante dieciocho a veinticuatro horas.

Frente a *Escherichia coli* ninguno de los extractos ensayados resultó activo, y frente a *Staphylococcus aureus* solamente apreciamos actividad clara en nuestros primeros ensayos con el extracto de *Evernia furfuracea*.

Como el género *Evernia* está próximo al *Ramalina*, de una de cuyas especies, la *R. reticulata*, obtuvo Marshak los cristales del antibiótico, al que llamó *ramalina*, decidimos seguir la técnica de Marshak para aislar la ramalina, y procedimos a la extracción con alcohol + acetona (1 + 2) en caliente y a reflujo; filtramos en caliente y concentramos en el vacío, y al enfriar el concentrado se precipitaron unos cristales aciculares, que recogimos y que eran de color amarillento, y los purificamos por tres cristalizaciones sucesivas, empleando como disolvente la acetona, y así obtuvimos cristales aciculares blancos y cuyo punto de fusión fué de 193°-194°. Y aunque el color de nuestros cristales no era el amarillo indicado por Marshak para su ramalina, la coincidencia de que el punto de fusión correspondía al de la ramalina nos hizo pensar en si se trataría de esta sustancia. Intentamos determinar su poder rotatorio en disolución clorofórmica y no apreciamos ninguna desviación y, en cambio, la ramalina de Marshak era fuertemente dextrogira (5).

(5) Antes de precipitarse los primeros cristales aciculares y también simul-

A continuación exploramos la actividad antibacteriana de los cristales obtenidos dispersándolos en una disolución tampón fosfatos a pH 7, y también obteniendo la sal sódica y empleando su disolución acuosa, pero no apreciamos ninguna actividad frente al *Mycobacterium phlei*, estirpe 525 del N. C. T. C.

Todas estas observaciones nos llevaron a la conclusión de que el ácido orgánico que habíamos aislado de *Evernia furfuracea* no era la ramalina, aunque tenía con ésta la coincidencia del punto de fusión, se obtenía por la misma técnica y su solubilidad era parecida.

El líquido madre de donde se obtuvieron los cristales se siguió concentrando y cuando estaba muy concentrado se precipitó una sustancia amorfa de color gris ligeramente pardo, y que resultó algo activa frente a *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium phlei* y *B. mycoides*, estirpe N. R. R. L. B. 615.

De esta sustancia amorfa separamos con éter de petróleo una fracción lipoide, que nos dió intensamente las reacciones del ergosterol (Salkowsky y Liebermann-Burchard), y dicha fracción ergosterínica, disuelta en aceite de oliva, resultó con ligera actividad frente a *St. aureus*, *B. mycoides* y *Mycob. phlei*.

Entre tanto habíamos observado que extractos de líquenes inactivos frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* presentaban actividad frente a *B. mycoides* y *Mycobacterium phlei*, y por ello decidimos explorar la actividad antibacteriana de nuevos extractos crudos de los diferentes líquenes que teníamos recolectados y utilizando, además de las placas con *Esch. coli* y *St. aureus*, placas con *B. mycoides* y placas con *Mycob. phlei* (6).

---

táneamente con ellos se precipitó una sustancia algo menos soluble que esos cristales y que resultó inactiva en los ensayos.

(6) De nuestra experiencia en la exploración de la actividad antibacteriana de líquenes y también de diversas plantas fanerógamas, deducimos la conveniencia de estudiar la actividad de sus extractos frente cuando menos a cuatro gérmenes: un coco Gram positivo que puede ser el *Staphylococcus aureus*, un bacilo Gram negativo como *Escherichia coli*, un bacilo ácido resistente como *Mycobacterium phlei* y un bacilo Gram positivo que puede ser el *B. mycoides* o el *B. subtilis*, pues de limitarse la exploración al *St. aureus* y *Esch. coli*, nos exponemos a que desechemos para la investigación ulterior a especies que siendo inactivas frente a esos dos gérmenes, sean, en cambio, muy activas frente a otros microbios.

A continuación presentamos las pruebas fotográficas de algunas de las experiencias que hemos realizado.

Foto núm. 1.—Corresponde a la placa sembrada con *Staphylococcus aureus* H. (7):
Pocillos 1 y 3.—Contienen extracto de *Usnea barbata.*
» 2 y 4.—Contienen extracto de *Evernia prunastri.*
» 5.—Contiene extracto de *Evernia furfuracea.*

Resultados.—El extracto de *Usnea barbata* produce una ligera inhibición. El extracto de *Evernia prunasti* no inhibe, y el extracto de *Evernia furfuracea* produce inhibición marcada.

Observación.—Con otra estirpe de *Staphylococcus aureus*, estirpe N. R. R. L. B. 313, los resultados han sido idénticos.

Foto núm. 2.—Corresponde a la placa sembrada con *B. mycoides:*
Pocillos 1 y 3.—Contienen extracto de *Usnea barbata.*
» 2 y 4.—Contienen extracto de *Evernia prunastri.*
» 5.—Contiene extracto de *Evernia furfuracea.*

Resultados.—Los extractos de *Usnea barbata* y de *Evernia prunastri* inhiben claramente y con igual intensidad.

El extracto de *Evernia furfuracea* es también activo, aunque algo menos que los otros dos.

Observación.—Con *Bacillus licheniformis*, estirpe núm. 7198, N. C. T. C., los resultados han sido idénticos (8).

Foto núm. 3.—Corresponde a placa sembrada con *Mycobacterium phlei:*
Pocillos 1 y 3.—Contienen extracto de *Usnea barbata.*
» 2 y 4.—Contienen extracto de *Evernia prunastri.*
» 5.—Contiene extracto de *Evernia furfuracea.*

Resultados.—Todos los extractos son activos, correspondiendo la mayor actividad al extracto de *Usnea barbata.*

Como los ensayos con estos tres extractos de líquenes frente a *Escherichia coli* han resultado repetidamente negativos, no presentamos la prueba fotográfica.

Ensayos con fracciones aisladas de Evernia prunastri.

Unos 25 gramos de líquen seco se extraen a reflujo, con un total de 250 c. c. de acetona + alcohol (2 + 1); se filtra en ca-

(7) En las fotos correspondientes a placas con cinco pocillos, la numeración es idéntica a la de esta fotografía.

(8) Esta estirpe nos la remitió amablemente el Dr. E. S. Duthie.

liente y al enfriarse se origina solamente ligera turbidez. Se concentra al vacío y al enfriarse lentamente se consigue separar pequeña cantidad de cristales amarillos no aciculares. La disolución se deja evaporar al aire sobre el radiador y al cabo de unos días se empieza a depositar una sustancia amorfa a simple vista y de color ligeramente amarillento, y que examinada al microscopio aparece formada por dos clases de cristales, unos blancos, y unas agujas amarillas, que creemos puedan ser de ácido úsnico. Evaporado a sequedad el líquido sobrante deja un residuo bastante grande aceitoso y de color amarillo rojizo.

Para ensayar la actividad de esas tres fracciones, como son insolubles en el agua, se prepararon las sales sódicas, hirviendo cada fracción con agua alcalinizada con NaOH.

La primera fracción toma un color amarillo más intenso y distinto del que toma la sal sódica del ácido úsnico.

La segunda fracción no se disuelve totalmente, tomando la disolución ligero color amarillento..

La tercera fracción tampoco se disuelve totalmente (¿lipoides?), pero obtenemos una disolución transparente de color amarillo más oscuro que la segunda.

Las tres disoluciones quedan para los ensayos a una concentración aproximada de 1 por 100.

A continuación presentamos dos fotografías correspondientes a algunos de nuestros ensayos:

Foto núm. 4.—Placa sembrada con *Staphylococcus aureus* H.
Pocillos 1 y 4.—Contienen disolución acuosa de la sal sódica de la fracción núm. 1.
» 2 y 5.—Contienen disolución acuosa de la sal sódica de la fracción núm. 2.
» 3 y 6.—Contienen disolución acuosa de la sal sódica de la fracción núm. 3.
» 7.—Contiene una disolución acuosa de usnicato sódico al 1 por 1.000 (9).

Resultados.—Todas las fracciones son algo activas. La fracción número 2, en la cual hemos observado la presencia de ácido úsnico, es la más activa, y su actividad es igual o ligeramente superior a la de una disolución de usnicato sódico al 1 por 1.000.

---

(9) Este usnicato sódico lo preparamos a partir de ácido úsnico aislado de *Usnea barbata*, según detallamos más adelante.

Foto núm. 5.—Placa sembrada con *Mycobacterium tuberculosis avium* (10).

Pocillos 1 y 4.—Contienen disolución acuosa de la sal sódica de la fracción núm. 1.

» 2 y 5.—Contienen disolución acuosa de la sal sódica de la fracción núm. 2.

» 3 y 6.—Contienen disolución acuosa de la sal sódica de la fracción núm. 3.

» 7.—Contiene una disolución acuosa de usnicato sódico al 1 por 1.000.

Resultados.—Las tres fracciones son activas, siendo muy activa la fracción número 2, cuya actividad es del orden de la actividad de la disolución del usnicato sódico al 1 por 1.000.

En esta fracción número 2 hemos podido reconocer la presencia de ácido úsnico mezclado con otro ácido orgánico.

Observación.—El diámetro de esta placa y el de la correspondiente a la foto núm. 4, es de 12 cm.

Aislamiento de ácido úsnico dextrogiro a partir de Usnea barbata *L., obtención de usnicatos y estudio de sus propiedades antibacterianas.*

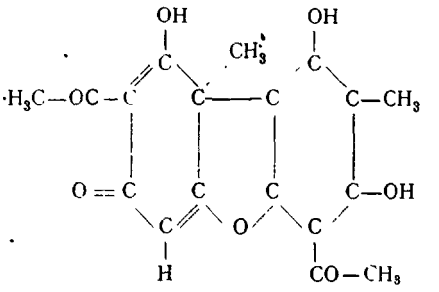
Como las experiencias con los extractos crudos de *Usnea barbata* acusaban buena actividad frente a *Mycobacterium phlei*, y disponiendo de cierta cantidad de aquel líquen, decidimos aplicar la técnica de extracción de ácidos liquénicos (11), empleando como disolvente alcohol + acetona (1 + 2), y conseguimos obtener agujas amarillas, que purificamos tres veces por disolución en acetona seguida de la correspondiente cristalización, y determinado el punto de fusión resultó ser 193°-194°. Determinamos el poder rotatorio en disolución clorofórmica y vimos que era fuertemente dextrogiro de + 490°.

Como en la bibliografía (11) ya viene indicada la *Usnea barbata* como líquen que contiene ácido úsnico destrogiro, supusimos que el producto que habíamos aislado y purificado era dicho ácido, ya que, en efecto, coincidían todas sus propiedades: color, punto de fusión, alto poder rotatorio, solubilidad, etc.

---

(10) Esta estirpe de *Mycobacterium* nos fué facilitada por el Dr. Pérez Pardo, del I. N. de Sanidad.

(11) G. Klein. *Handbuch der Pflanzen Analyse. Spezielle Analyse. Zweiter Teil. Organische Stoffe.* II Flechtenstoffe. (Flechtensäuren von Dr. R. Brieger, p. 413.



Acido úsnico $C_{18}H_{16}O_7$
Fórmula estructural propuesta por Curd y Robertson (según V. C. Barry y Cort, *Nature, 6,* XII, págs. 800, 1947).

A fines de noviembre de 1947 recibimos un segundo trabajo del doctor Marshak (12) y colaboradores, en el que dan cuenta de que su *ramalina* es idéntica con el ácido úsnico ($C_{18}H_{16}O_7$), y esto nos hizo prestar especial atención al ácido úsnico que habíamos obtenido de *Usnea barbata*, y decidimos obtener mayor cantidad para poder seguir con más detalle nuestras investigaciones. Y así logramos en nuevas extracciones obtener ácido úsnico de *Usnea barbata* procedente de Abejar (Soria), con rendimientos que oscilaron entre 3,8 y 4,10 por 100 (13).

Con el ácido úsnico obtenido realizamos algunos ensayos de actividad antibacteriana a diferentes concentraciones en medio líquido caldo nutritivo (14) y frente a *Staphylococcus aureus*, estirpe 313, del N. R. R. L., y frente a *Mycobacterium phlei*, y agregando el ácido úsnico previamente pulverizado al medio de cultivo, esterilizando nuevamente y sembrando después con cultivos de veinticua-

---

(12) A. Marshak, G. T. Barry and L. C. Craig. *Antibiotic compound isolated from the Lichen Ramalina reticulata*, «Science». Vol. 106, p. 394-395 (1947).

(13) Aunque nuestros trabajos han sido realizados principalmente con *Usnea barbata* procedente de Abejar, en cierto momento en que nos faltó material recurrimos a una pequeña cantidad de *Usnea barbata* que habíamos recolectado en el Valle de Navacerrada y conseguimos también obtener pequeña cantidad de ácido úsnico y con rendimientos aproximadamente del 3,8 por 100.

(14) Este caldo nutritivo se preparó con peptona Merck, 5 grs.; cloruro sódico, 5 grs.; extracto de carne Liebig, 3 grs. y agua para 1.000 c. c., ajustar el pH a 7 y esterilizar a una atmósfera durante veinte minutos.

tro horas en caldo de los gérmenes anteriormente mencionados, y observamos que el *Mycobacterium phlei* era más sensible que el *St. aureus*, pues el primero no creció en los tubos con 1/100.000 de ácido úsnico, y en tanto que el *St. aureus* creció algo en el tubo con 1/100.000 de ácido úsnico, pero no se desarrolló en los tubos con 1/50.000 de dicho ácido.

A continuación presentamos una fotografía que refleja uno de nuestros ensayos con ácido úsnico frente al *Staphylococcus aureus:*

Foto núm. 9.—Corresponde a experiencias con ácido úsnico y *Staphylococcus aureus*, estirpe 313, N. R. R. L.

Tubo C.—Es el tubo control con caldo nutritivo y sin ácido úsnico.
» 1.—Contiene ácido úsnico a la concentración de 1/100.000.
» 2.—Contiene ácido úsnico a la concentración de 1/50.000.
» 3.—Contiene ácido úsnico a la concentración de 1/20.000.
» Uc.—Contiene solamente caldo con ácido úsnico (es decir, que no se ha sembrado en este tubo el *St. aureus*).

Resultados.—El *Staphylococcus aureus* sembrado ha quedado inhibido completamente a la concentración de 1 en 20.000 y 1 en 50.000 y parcialmente inhibido a la concentración de 1 en 100.000.

La fotografía fué tomada a los cuatro días de iniciada la experiencia.

Observación.—Aunque se advierte ligera opalinidad en la parte inferior de los tubos 2, 3 y Uc, es debida a que por transparencia se ve el fondo iluminado.

Como la insolubilidad en el agua del ácido úsnico era un grave inconveniente para el estudio de su actividad antibacteriana, decidimos obtener su sal sódica correspondiente y la logramos con facilidad, sorprendiéndonos que fuera soluble en el etanol.

Con el usnicato sódico obtenido realizamos un primer ensayo, que consistió en colocar unas gotas de su disolución al 1 por 1.000 en el pocillo central de una placa con agar tampón glicerina sembrado con *Mycobacterium tuberculosis avium* procedente de un cultivo de cuarenta y ocho horas en medio líquido Dubos (15). Incu-

(15) Hemos preparado el medio de Dubos empleando *Tween 80* en proporción de 0,05 por 100, *albúmina cristalina* de plasma bovino en proporción de 0.5 por 100 e *hidrolizado enzimático de caseína* en proporción de 2 por 1.000. Hemos comprobado que el *Mycobacterium avium* crece muy rápidamente en este medio y en 48 horas hay ya cultivo abundante. El *Mycobacterium tuberculosis hominis H 37 Rv*, en primer cultivo en Dubos tarda unos seis a

bamos a 37° y a las veinticuatro horas nos encontramos con una clara zona de inhibición de 32 milímetros de diámetro, conforme se puede observar en la fotografía número 10, tomada a las cuarenta y ocho horas de puesta en marcha la experiencia para que la superficie del cultivo fuera más densa, pero sin que la zona de inhibición experimentara variación con respecto a la observada a las veinticuatro horas.

También ensayamos la actividad del usnicato sódico a diferentes concentraciones en medios líquidos, caldo glicerinado y medio Dubos sobre *Mycobacterium tuberculosis avium* y *Mycobacterium tuberculosis hominis*, estirpe H37Rv.

Se esterilizó la disolución de usnicato sódico por filtración por filtro Seitz y se agregó asépticamente en la cantidad conveniente a los medios de cultivo.

Las dos estirpes de *Mycobacterium* se sembraron procedentes de cultivos en medio Dubos, la estirpe aviar de un cultivo de cuarenta y ocho horas y la estirpe humana de un cultivo de seis días. En todos los tubos se pusieron el mismo número de gotas del cultivo.

A continuación presentamos algunas fotografías correspondientes a algunos de nuestros ensayos:

Foto núm. 11.—Experiencias con *Mycobacterium tuberculosis avium* y usnicato sódico. Medio de cultivo Dubos.
Tubos Av C.—Tubos de control sin usnicato sódico.
» Av 1.—Contiene usnicato sódico a la concentración de 1 en 20.000
» Av 2.—Contiene usnicato sódico a la concentración de 1 en 100.000.
» Av 3.—Contiene usnicato sódico a la concentración de 1 en 400.000.

Resultados.—Se aprecia claramente que a la concentración de 1 en 20.000 la inhibición del *Myc. avium* ha sido completa y que a la

---

ocho días para lograr un crecimiento regular, pero en las resiembras son suficientes cuatro o cinco días para obtener una buena turbidez.

El *Tween 80* nos fué facilitado por Atlas Powder and Co. de Wilmington, la albúmina cristalina de plasma bovino la Armour and Co. de Chicago y como hidrolizado de proteína empleamos el Optimo Protein Hyrolysate facilitado por S. B. Penick and Co. de N. Y.

(Véase R. J. Dubos and G. Middlebrook. *Media for tubercule bacilli*, «The American Review of Tuberculosis». Vol LVI. N.° 4, p. 334-345, 1947.)

concentración de 1 en 100.000 el crecimiento es tan intenso como en los tubos de control.

Foto núm. 12.—Experiencias con *Mycobacterium tuberculosis hominis* H37Rv (16) y usnicato sódico. Medio de cultivo Dubos:
Tubos RvH37-C.—Tubos de control sin usnicato sódico.
» RvH37-1.—Contiene usnicato sódico a la concentración de 1 en 20.000.
» RvH37-2.—Contiene usnicato sódico a la concentración de 1 en 100.000.
» RvH37-3.—Contiene usnicato sódico a la concentración de 1 en 400.000.

Resultados.—Se aprecia claramente que a la concentración de 1 en 20.000 la inhibición del *Mycobacterium hominis*, estirpe H37Rv, es completa y que a la concentración de 1 en 100.000 el crecimiente es normal.

En otra serie de experiencias con *Mycobacterium Tuberculosis hominis* H37Rv y empleando disoluciones de usnicato sódico al 1/20.000, 1/40.000, 1/50.000, 1/75.000 y 1/100.000, y 2 tubos de control sin usnicato sódico, se logró inhibición completa en los tubos al 1/20.000 y al 1/40.000 de usnicato sódico e inhibición parcial al 1/50.000 y crecimientos normales al 1/75.000 y al 1/100.000.

Foto núm. 13.—Experiencias con *Mycobacterium tuberculosis avium* y usnicato sódico. Medio de cultivo caldo glicerinado.
Tubos Av C.—No contienen usnicato sódico.
» Av 1.—Contiene usnicato sódico a la concentración de 1 en 20.000.
» Av 2.—Contiene usnicato sódico a la concentración de 1 en 50.000.
» Av 3.—Contiene usnicato sódico a la concentración de 1 en 100.000.
» Av 4.—Contiene usnicato sódico a la concentración de 1 en 200.000.
» Av 5.—Contiene usnicato sódico a la concentración de 1 en 400.000.
» Av 6.—Contiene usnicato sódico a la concentración de 1 en 500.000.

Resultados.—En el tubo con usnicato sódico a la concentración de 1 en 500.000, el *Mycobacterium avium* ha crecido tan intensamente como en los tubos control sin usnicato sódico.

La inhibición es completa hasta la concentración de 1 en 100.000.

---

(16) El *Mycobacterium tuberculosis hominis H37Rv* nos fué amablemente enviado por el Dr. W. Steenken, Jr., Jefe del The Trudeau Laboratory en Trudeau, N. Y.

La inhibición es parcial a las concentraciones de 1 en 200.000 y 1 en 400.000.

Observación.—Esta foto fué tomada a los dieciséis días de iniciada la experiencia.

Estas experiencias se repitieron con *Mycobacterium hominis*, estirpe H37Rv, también en caldo glicerinado, y se consiguió inhibición completa a la dilución de 1 en 500.000 (17).

De nuestras experiencias con usnicato sódico y *Mycobacterium avium* y *Mycob. hominis* en medio Dubos y en caldo glicerinado se deduce que la naturaleza del medio influye grandemente en la sensibilidad de los gérmenes ensayados frente al usnicato sódico.

En esta situación estaban nuestras investigaciones cuando recibimos del doctor A. Stoll, a fines de enero de 1948, dos trabajos sobre antibióticos en líquenes (18), que se los habíamos pedido a raíz de leer en el segundo trabajo de Marshak una referencia a un trabajo del citado investigador suizo.

En sus trabajos da cuenta Stoll de haber ensayado la actividad antibacteriana de diversos líquenes, así como el haber obtenido el ácido úsnico racémico a partir del líquen *Cetraria Islandica*, y resalta también la gran actividad *antimycobacterium* de los ácidos úsnicos, e indica que la sal sódica del ácido úsnico levogiro es activa frente a *Mycobacterium tuberculosis hominis* a la concentración de 1/320.000 y excepcionalmente en un caso a la concentración de 1 en 800.000, y con respecto a la estirpe de *Myc. avium* que utilizó le resultó con inhibición completa a la dilución de usnicato sódico al 1/250.000, inhibición parcial a 1/320.000 y crecimiento normal en los tubos con usnicato sódico al 1/400.000 (19).

---

(17) V. C. Barry y colaboradores en su trabajo *Antitubercular activity of Diphenyl ethers and related compounds*, «Nature». Vol. 160, p. 800 (1947) señalan para el ácido úsnico actividad frente a *Mycobacterium tuberculosis* a la dilución de 1/500.000 y llaman la atención sobre la circunstancia de que el ácido úsnico tiene el esqueleto estructural del difenilenóxido

(18) A. Stoll, J. Renz und A. Brack. *Antibiotika aus Flechten*, «Experientia». Vol. III/3. 1947, p. 111, y *Die antibakterielle Wirkung der Usninsaure auf Mykobakterien und andere Mikroorganismen*, «Experientia». Vol. III/3. 1947. p 115.

(19) Stoll y colaboradores, en este mismo trabajo, presentan un cuadro con el contenido en ácido úsnico de diversos líquenes y la cifra más alta que

Por la circunstancia de estar trabajando en nuestro laboratorio con *Streptomyces griseus*, a partir de cuyo cultivo habíamos obtenido el clorhidrato de estreptomicina impuro, y de estar ensayando la actividad antibacteriana de la sal que habíamos obtenido, comprobamos su gran actividad *anti-Mycobacterium*, lo que no era nada más sino confirmar lo que tan brillantemente habían descubierto Waksman y Schatz, y habiendo observado en nuestros ensayos, como antes hemos señalado, la gran actividad *anti-Mycobacterium* del usnicato sódico, pensamos en que siendo la estreptomicina una base sería interesante ver si formaba una sal con el ácido úsnico, en cuyo caso en un solo cuerpo se habrían reunido dos antibióticos, ácido úsnico y estreptomicina, ambos muy activos frente a los *Mycobacterium*.

Y con esta idea directriz agregamos una disolución acuosa de usnicato sódico a una disolución de nuestro clorhidrato de estreptomicina, y vimos que se producía una precipitación que pensamos podría ser de un usnicato, pero como nuestro clorhidrato de estreptomicina tenía bastante cantidad de cloruro sódico y clorhidratos de otras bases, que naturalmente podrían también reaccionar con el usnicato sódico, decidimos volver a hacer el ensayo utilizando como fuente de estreptomicina el clorhidrato de estreptomicina lote 7R776 de Merck & Co., y cuya actividad era de 625 unidades por miligramo (20).

Preparamos una disolución saturada de usnicato sódico en agua y la fuimos adicionando sobre una disolución acuosa del clohridrato de estreptomicina al 5 por 100, y vimos que se producía un precipitado blanco. Este precipitado fué lavado varias veces con agua destilada, en el que apenas es soluble, y lo desecamos a la temperatura de unos 20° en el vacío, y obtuvimos un polvo blanco ligeramente amarillento, el que a pesar de varios intentos no logramos cristalizar.

¿Qué podría ser ese precipitado?

---

dan para especies del género *Usnea* es la de 1,80 por 100 para la *Usnea florida Wigg*, y 1,50 por 100 para *Usnea hirta Wigg*, y 1,15 por 100 para *Usnea dasypoga Röhl*.

(20) Este clorhidrato de estreptomicina lo recibimos del Dr. R. E. Gruber, de Merck & Co. Inc. E. U.

Inmediatamente pensamos en que el producto obtenido tenía que ser un compuesto de ácido úsnico y estreptomicina, pues al agregar usnicato sódico sobre el clorhidrato de estreptomicina no cabe más que se forme cloruro sódico soluble y un derivado del ácido úsnico con la base allí presente, que es la estreptomicina, y para cerciorarnos de la presencia de estreptomicina en el nuevo cuerpo obtenido, ensayamos su actividad *in vitro* frente a *Escherichia coli* y comprobamos que era activo, y como el ácido úsnico ni el usnicato sódico son activos frente a *Esch. coli*, confirmamos nuestra suposición de que habíamos obtenido *un usnicato de estreptomicina.*

Determinado el punto de fusión del cuerpo obtenido vimos que a la temperatura de 194°-195° a que funde el ácido úsnico no se fundía y que a 212° empieza a ablandarse, pero que a 320° sigue sin fundir totalmente, pero ya muy carbonizado.

Dada la existencia en las moléculas del ácido úsnico y de la estreptomicina de varios posibles puntos de unión entre ambas, creemos que pueden resultar diferentes derivados entre el ácido úsnico y la estreptomicina, investigación que hasta el presente no hemos podido desarrollar, pero nos inclinamos a esa suposición porque en las condiciones en que hemos trabajado en estos ensayos previos la precipitación de la estreptomicina no es total y hasta pensamos en que pueda ser posible la formación de un derivado hidrosoluble de ácido úsnico y de estreptomicina, y además, como diversos investigadores han señalado la existencia de más de una estreptomicina, también puede suceder que sean diferentes los usnicatos respectivos.

Y con el nuevo cuerpo obtenido, que estimamos es un usnicato de estreptomicina o una mezcla de usnicatos (?), procedimos a realizar ensayos de actividad antibacteriana, y a continuación presentamos las fotografías correspondientes a algunas de nuestras experiencias.

Foto núm. 14.—Placa con agar tampón fosfatos glicerina, sembrada con *Mycobacterium avium* procedente de un cultivo de veinticuatro horas en medio Dubos:

Pocillos 1 y 3.—Contienen usnicato de estreptomicina a saturación en tampón fosfatos a pH 7.

» 2 y 4.—Contienen usnicato sódico al 1 por 10.000.

» 5.—Contiene usnicato sódico al 1 por 20.000.

Resultados.—Se aprecia la gran actividad del usnicato de estrep-

tomicina, a pesar de su escasa solubilidad, y que el usnicato sódico es activo aun a la dilución de 1 en 20.000.

Foto núm. 15.—Placa con agar tampón fosfatos glicerina, sembrada con *Mycobacterium hominis*, estirpe virulenta H37Rv, procedente de un cultivo de seis días en medio líquido Dubos:

Pocillos 1 y 3.—Contienen usnicato de estreptomicina a saturación en tampón fosfatos a pH 7.

» 2 y 4.—Contienen usnicato sódico al 1 por 10.000.

» 5.—Contiene usnicato sódico al 1 por 20.000.

Resultados.—El usnicato de estreptomicina es activo frente a esta estirpe virulenta de *Mycob. hominis* y las disoluciones de usnicato sódico al 1 por 10.000 y al 1 por 20.000 también son activas, aunque en esta experiencia resultan menos activas frente a este *Mycobacterium* en comparación con el aviar.

Observación.—El medio de cultivo de esta placa es agar tampón fosfatos con 5 por 100 de glicerina y la siembra se hizo a partir de un cultivo de seis días de *Mycob. hominis*, estirpe H37Rv, en medio líquido de Dubos, con *tween* 80 y albúmina bovina. Nos sorprendió el crecimiento tan rápido, pues en veinticuatro horas se desarrolló la placa cuya fotografía presentamos. Se hicieron preparaciones que se tiñeron y se comprobó al microscopio que el germen que se había desarrollado en la placa era ácido-alcohol resistente y con la morfología del H37Rv que habíamos sembrado, lo que nos hizo descartar la posibilidad de una contaminación.

Foto núm. 16.—Placa sembrada con *Bacillus mycoides*.

En los pocillos hay iguales disoluciones que en las placas de las fotos 14 y 15.

Resultados.—El usnicato de estreptomicina es muy activo frente a *B. Mycoides*. Las disoluciones de usnicato sódico son también muy activas.

Foto núm. 17.—Placa sembrada con *Staphylococcus aureus* H.:

En los pocillos se han puesto las mismas disoluciones que en las placas de las fotos 10 y 11.

Resultados.—Similares a los anteriores, pero se aprecia una menor actividad de las disoluciones de usnicato sódico frente a esta bacteria en comparación con los resultados obtenidos frente a *B. mycoides* y *Mycobacterium avium*.

Foto núm. 18.—Placa sembrada con *Mycobacterium tuberculosis avium*:

Pocillos 1 y 3.—Contienen usnicato de estreptomicina disuelta en propileno glicol al 1 por 1.000.

» 2 y 4.—Contienen suspensión de usnicato de estreptomicina al 1 por 1.000 en tampón fosfatos de pH 7.

» 5 (el central).—Contiene propileno glicol (21).

---

(21) Queremos expresar nuestra gratitud a Carbide and Carbon Chemicals

Resultados.—Se aprecia la gran actividad de la disolución de usnicato de estreptomicina en propileno glicol, disolvente en el cual se disuelve bien aquella sustancia a la concentración del 1 por 1.000. Esta foto fué tomada a las veinticuatro horas.

Observación.—A las cuarenta y ocho horas las zonas de inhibición de los pocillos 1 y 3 habían alcanzado hasta el pocillo central y, en cambio, se apreció perfectamente el crecimiento alrededor del pocillo central entre éste y las zonas de inhibición alrededor de los pocillos 2 y 4, o sea que el propileno glicol no inhibió el crecimiento del *Mycobacterium avium.*

Foto núm. 19.—Placa sembrada con *Mycobacterium tuberculosis hominis*, estirpe H37Rv, en medio Dubos:

Pocillos 1 y 3.—Contienen usnicato de estreptomicina en propileno glicol al 1 por 1.000.
» 2 y 4.—Contienen suspensiones de usnicato de estreptomicina al 1 por 1.000 en tampón fosfatos de pH 7.
» central.—Contiene propileno glicol.

Fotografía tomada a los tres días.

Resultado.—Se aprecia que la siembra ha sido efectuada con una suspensión muy diluída de bacilos, pues las colonias aparecen aisladas. Pero, sin embargo, se aprecia claramente que esas colonias limitan las zonas de inhibición producidas por el usnicato de estreptomicina. Podría caber la duda de si el propileno glicol inhibía o no, pero junto al pocillo central se han desarrollado algunas colonias y otras experiencias con siembras más densas de bacilos tuberculosos nos han revelado que el propileno glicol no inhibe su crecimiento.

Foto núm. 20.—Placa sembrada con *Mycobacterium tuberculosis avium.*

Pocillo 1.—Contiene propileno glicol.
» 2.—Contiene una dispersión de usnicato de estreptomicina en aceite de oliva a la concentración de 1 por 1.000.
» 3.—Contiene usnicato de estreptomicina en propileno glicol al 1 por 1.000.
» 4.—Contiene usnicato de estreptomicina disperso en tampón fosfatos de pH 7 y a la concentración de 1 por 1.000.

Resultados.—El propileno glicol no inhibe el desarrollo de *Mycobacterium avium*, y con respecto al usnicato de estreptomicina se confirman los resultados de la foto 18 y además que disperso en aceite el usnicato de estreptomicina es también activo.

Foto núm. 21.—Placa sembrada con *Mycobacterium phlei:*

---

de New York por habernos facilitado el propileno glicol empleado en estos ensayos.

Los pocillos contienen los mismos líquidos que en la placa correspondiente a la fotografía número 20.

Resultados.—El usnicato de estreptomicina es más activo disuelto en propileno glicol, pero es también activo en dispersión oleosa y disperso en tampón fosfatos a pH 7.

Foto núm. 22.—Placa sembrada con *Mycobacterium avium:*

Pocillo 1.—Contiene usnicato de estreptomicina al 1 por 1.000 en propileno glicol.

» 2.—Contiene usnicato sódico al 1 por 1.000 en propileno glicol.

» 3.—Contiene ácido úsnico al 1 por 1.000 en propileno glicol.

» 4.—Contiene propileno glicol.

Resultados.—La inhibición lograda con el usnicato de estreptomicina es similar a la lograda con el usnicato y el ácido úsnico.

Este resultado nos hizo pensar en si toda la actividad que estábamos observando en el producto que hemos llamado usnicato de estreptomicina residía exclusivamente en el ácido úsnico. Pero antes hemos indicado que comprobamos que es activo ese usnicato de estreptomicina sobre *Escherichia coli* y que, en cambio, no lo son en las mismas condiciones ni el usnicato sódico ni el ácido úsnico, pero decidimos repetir nuevamente los ensayos.

Preparamos una placa sembrada con *Escherichia coli* y colocamos en los pocillos 1 y 3 usnicato de estreptomicina al 1 por 1.000, disuelto en propileno glicol; en el pocillo 2 usnicato sódico al 1 por 1.000 en propileno glicol y en el 4 ácido úsnico al 1 por 1.000 en propileno glicol, y en el pocillo 5 solamente propileno glicol, y observamos que el propileno glicol inhibe a *Escherichia coli* y por esta razón y como las diferencias no eran muy acusadas le dimos valor negativo a esta experiencia.

Entonces decidimos operar sin propileno glicol y utilizando dos medios de cultivo: uno agar tampón fosfatos a pH 7 y el otro el medio que se recomienda para las valoraciones de estreptomicina en placa *Bacto Streptomycin Assay agar*, que tiene un pH final de 8,0, y los resultados pueden apreciarse en las fotografías 23 y 24.

Foto núm. 23.—Placa sembrada con *Escherichia coli*. Medio de cultivo agar tampón fosfato a pH 7:

Pocillos 1 y 3.—Contienen usnicato de estreptomicina disperso al 1 por 1.000 en tampón fosfatos a pH 7.

» 2.—Contiene usnicato sódico al 1 por 1.000 en agua a un pH final 7.

» 4.—Contiene ácido úsnico disperso al 1 por 1.000 en tampón fosfatos a pH 7.

» 5.—Contiene cinco unidades de estreptomicina disuelta en agua neutra.

Resultados.—Hay inhibición en los pocillos 1 y 3, que contie-

nen usnicato de estreptomicina, y el pocillo de control, con estreptomicina. El usnicato sódico y el ácido úsnico no inhiben a esta estirpe de *Escherichia coli*.

La inhibición lograda tanto con la estreptomicina como con el usnicato de estreptomicina no es muy destacada, pero es manifiesta.

Foto núm. 24.—Placa sembrada con *Escherichia coli*. Medio de cultivo *Bacto Streptomycin Assay agar* a pH 8.

En los pocillos se han colocado los mismos líquidos que en la placa de la fotografía número 23.

Resultados.—Se aprecia que la inhibición producida en este medio por el usnicato de estreptomicina y por la estreptomicina sobre *Escherichia coli* ha mejorado con respecto al medio a un pH 7, utilizado en la placa de la fotografía número 23.

Como vemos, el usnicato sódico y el ácido úsnico siguen siendo inactivos frente a *Escherichia coli*.

Estas experiencias, repetidas varias veces con idéntico resultado, nos demuestran que en el producto obtenido hay algo más que ácido úsnico, pues éste es inactivo frente a *Escherichia coli*, y naturalmente, por la forma de obtenerlo inferimos que la actividad anti-coli es debida a la fracción de estreptomicina que contiene.

Desde luego, en la placa no se revela con una gran actividad frente a *Escherichia coli*, pero no olvidemos que estamos operando con una sustancia prácticamente insoluble en el agua, pero esa sustancia tenemos la impresión de que en contacto con los líquidos orgánicos que contienen cloruro sódico y fosfatos alcalinos irá lentamente cediendo la estreptomicina y el ácido úsnico.

Ante la evidencia de que el producto obtenido contenía una parte que no es ácido úsnico, decidimos repetir la experiencia correspondiente a la fotografía número 22, pero cambiando el medio de cultivo, que allí fué agar tampón fosfatos glicerinado, por *Bacto Streptomycin Assay agar* con 5 por 100 de glicerina.

Foto núm. 25.—Placa sembrada con *Mycobacterium avium*. Medio de cultivo *Bacto Streptomycin Assay agar*, con 5 por 100 de glicerina.

Pocillo 1.—Contiene usnicato de estreptomicina al 1 por 1.000 en propileno glicol.

» 2.—Contiene usnicato sódico al 1 por 1.000 en propileno glicol.

Pocillo 3.—Contiene ácido úsnico al 1 por 1.000 en propileno glicol.
» 4.—Contiene propileno glicol.

Resultados.—La zona de inhibición correspondiente al pocillo 1 que contiene el usnicato de estreptomicina es mayor que las zonas correspondientes al usnicato sódico y al ácido úsnico, y bien entendido que a peso igual hay menos ácido úsnico en el pocillo 1 que en el 2 o en el 3.

Comprendemos que hay muchos problemas por resolver y aclarar en relación con este derivado del ácido úsnico y de la estreptomicina que hemos obtenido, pero creemos que pueden interesar a otros grupos de investigadores las observaciones hasta ahora realizadas, y por eso las hemos presentado con la mayor concisión posible.

CONCLUSIONES

Los extractos de *Usnea barbata*, *Evernia furfuracea* y *Evernia prunastri* son activos frente a *Bacillus mycoides* y *Mycobacterium phlei* e inactivos frente a *Escherichia coli*.

El extracto de *Evernia furfuracea* es activo y el extracto de *Usnea barbata* es débilmente activo frente a *Staphylococcus aureus*.

De la *Evernia furfuracea* hemos obtenido un ácido orgánico cristalizado, cuyo punto de fusión es 193°-194°.

Hemos obtenido de *Evernia furfuracea* una fracción rica en ergosterol y que reveló ligera actividad frente a *Staphylococcus aureus*, *B. mycoides* y *Mycobacterium phlei*.

De la *Evernia prunasti* hemos separado tres fracciones que contienen ácidos orgánicos, y sus sales sódicas son activas frente a *Staphylococcus aureus* y *Mycobacterium tuberculosis avium*, resultando más activa la fracción que llamamos 2, y en la cual existe el ácido úsnico.

De la *Usnea barbata* hemos aislado el ácido úsnico dextrogiro, con rendimientos entre 3,80 y 4,10 por 100, referido a materia seca.

Dicho ácido úsnico es activo en cultivos líquidos frente a *Staphylococcus aureus* y *Mycobacterium phlei*. Al *Staphylococcus aureus* le inhibe completamente a la dilución de 1/20.000 y 1 en 50.000 y parcialmente a la dilución de 1/100.000, en tanto que frente a

Mycobacterium phlei se logró inhibición completa a la dilución de 1/100.000.

Hemos obtenido el usnicato sódico cristalizado y hemos observado su gran actividad *anti-Mycobacterium* en placas de cultivo y en medios líquidos.

En caldo glicerinado el *Mycobacterium avium* queda inhibido completamente a la dilución de 1/100.000, parcialmente inhibido a las diluciones de 1/200.000 y 1/400.000, pero crece normalmente a la dilución de 1/500.000, en tanto que en medio Dubos el crecimiento de esa misma estirpe fué normal a la dilución de 1/100.000 y la inhibición fué completa a 1/20.000, y con respecto al *Mycobacterium hominis*, estirpe virulenta H37Rv, y en medio Dubos a la dilución de 1/75.000 el crecimiento fué normal y la inhibición completa a 1/40.000.

El usnicato sódico es también activo frente a *Staphylococcus aureus*, *B. mycoides* y *Mycobacterium phlei*.

El ácido úsnico disperso en disolución tampón de fosfatos a pH 7 o disuelto en propileno glicol y el usnicato sódico disuelto en agua o en propileno glicol se revelan en las placas de cultivo y frente a *Mycobacterium avium* y *Mycobacterium tuberculosis hominis* como dotados de gran actividad, y con la particularidad de que las zonas de inhibición son de una gran limpidez, circunstancia que no hemos observado siempre con otras sustancias *anti-Mycobacterium*.

Hemos obtenido un cuerpo que estimamos es un usnicato o una mezcla de usnicatos de estreptomicina, sustancia prácticamente insoluble en el agua y que no hemos podido cristalizar hasta el presente.

Las dispersiones en tampón fosfatos a pH 7 de ese usnicato de estreptomicina son activas en las placas frente a *Mycobacterium phlei*, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium hominis*, *B. mycoides*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

Este usnicato de estreptomicina se disuelve bien en propileno glicol y a la concentración de 1 por 1.000 resulta muy activo en las placas frente a los diversos *Mycobacterium* ensayados: *avium*, *hominis* y *phlei*.

Dada la insolubilidad de este usnicato de estreptomicina en agua estimamos que las inhibiciones logradas con sus dispersio-

nes en disolución tampón de fosfatos a pH 7 en las placas sembradas con *Mycobacterium, Staphylococcus aureus, B. mycoides* y *Escherichia coli* no responden a la actividad que probablemente pudiera tener esta sustancia *in vivo*, pues creemos que en presencia del fosfato sódico y del cloruro sódico presentes en los líquidos del organismo se irá desdoblando este usnicato lentamente en clorhidrato o fosfato de estreptomicina y en usnicato sódico, sustancias ambas activas frente a diversas bacterias, pero muy especialmente frente a los *Mycobacterium*.

CONCLUSIONS

The crude extracts from *Usnea barbata*, *Evernia furfuracea* and *Evernia prunastri* are active against *Bacillus mycoides*, *Mycobacterium phlei*, but not against *Escherichia coli*.

The crude extract from *Evernia furfuracea* is active and the extract from *Usnea barbata* is weakly active against *Staphylococcus aureus*.

From *Evernia furfuracea* we have obtained a crystalline organic acid with a melting point of 193°-194°.

From *Evernia furfuracea* we have obtained a fraction very rich in ergosterol that has some activity against *Staphylococcus aureus*, *B. mycoides* and *Mycobacterium phlei*.

From *Evernia prunastri* we have separated three fractions that have organic acids and its sodium salts are active against *Staphylococcus aureus* and *Mycobacterium tuberculosis avium* but the more active fraction is the one that we call number two in which there is usnic acid.

From *Usnea barbata* we have isolated usnic acid dextrogvre, with yields from 3.80 to 4.10 per cent of dry material.

This usnic acid is active in liquid medium against *Staphylococcus aureus* and *Mycobacterium phlei*. *Staphylococcus aureus* is inhibited completely at the dilutions of 1/20.000 and 1/50.000 of usnic acid and partially inhibited at the dilution of 1/100.000 and in the case of *Mycobacterium phlei* the inhibition was complete at a concentration of usnic acid of 1/100.000.

We have obtained crystalline sodium usnicate and we have

observed its great activity against *Mycobacterium* in culture plates and in fluid mediums.

In glycerinated broth *Mycobacterium avium* is completely inhibited by sodium usnicate at the dilution of 1/100.000 is partially inhibited at the concentrations of 1/200.000 and 1/400.000 but it grows normaly at the dilution of 1/500.000, but in Dubos fluid medium the growth of *Mycobacterium avium* was normal; at the dilution of 1/100.000 and was completely inhibited at the dilution of 1/20.000.

In glicerinated broth *Mycobacterium hominis* H37Rv was completely inhibited at the concentration of sodium usnicate at the dilution of 1/500.000 and in Dubos fluid medium the growth of this strain was normal at the dilution of 1/75.000 of sodium usnicate but the inhibition was complete at 1/40.000.

Sodium usnicate is also active against *Staphylococcus aureus*, *B. mycoides* and *Mycobacterium phlei*.

Usnic acid dispersed in tampon phosphates at pH 7 or dissolved in propylene glycol and sodium usnicate dissolved in water or in propylene glycol are very active in culture plate against *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium hominis* and with the peculiarity that the zones of inhibition are always very clear, circumstance that we have not been able to observe always with other *anti-Mycobacterium* substances.

We have obtained a substance that we believe is an usnicate of streptomycin or a mixture of usnicates of that base and it is practically insoluble in water and till now we have not been able to crystallize it.

The dispersions in tampon phosphate at pH 7 of this usnicate of streptomycin are active in culture plates against *Mycobacterium phlei*, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium hominis*, *B. mycoides*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*.

This usnicate of streptomycin is soluble in propylene glycol and at the concentration of 1 in 1,000 it is very active in the culture plates against the *Mycobacterium* tested: *avium*, *hominis* and *phlei*.

As this usnicate of streptomycin is insoluble in water we think that the inhibition obtained with the dispersions of that substance in tampon phosphates at pH 7 in the plates seeded with *Mycobacterium*, *Staphylococcus aureus*, *B. mycoides* and *Escherichia coli*

does not correspond with the activity that this substance may probably have *in vivo*, because in the presence of sodium phosphate and sodium chloride of the fluids of the organism we believe that this usnicate of streptomycin will be slowly desdoubled in sodium usnicate and chlorhydrate or phosphate of streptomycin and both substances are active against different bacteria but specially against *Mycobacterium*.

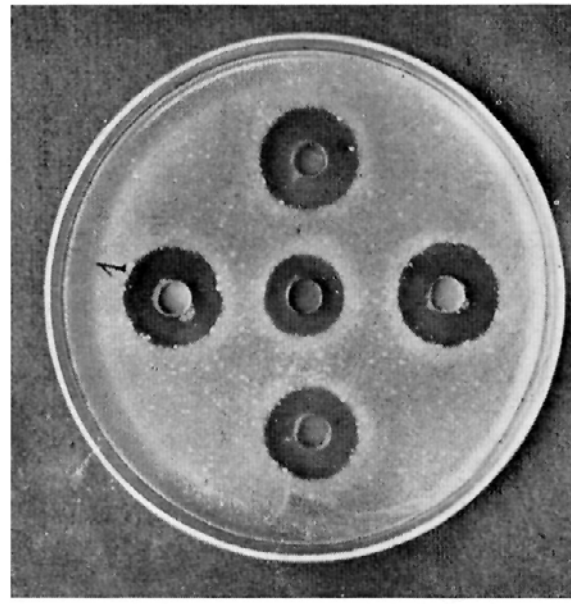


Fig. 2.—Placa sembrada con *B. mycoides*. Los pocillos 1 y 3 contienen extracto de *Usnea barbata*. Los pocillos 2 y 4 contienen extracto de *Evernia prunastri* y el pocillo 5 contiene extracto de *Evernia furfuracea*.

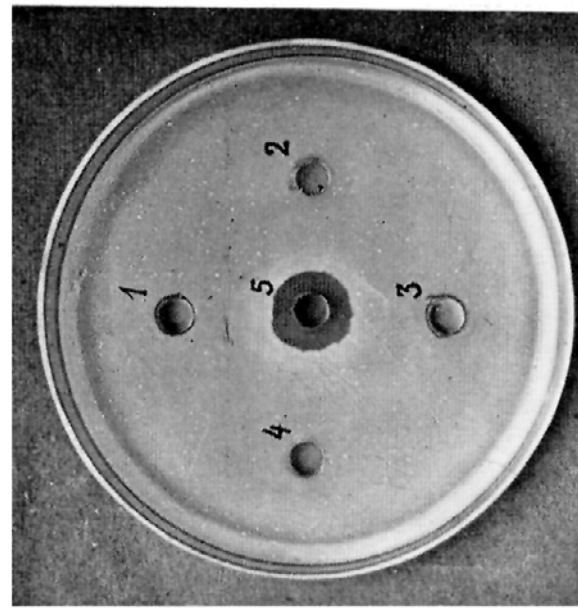


Fig. 1.—Placa sembrada con *Staphylococcus aureus H*. Los pocillos 1 y 3 contienen extracto de *Usnea barbata*. Los pocillos 2 y 4 contienen extracto de *Evernia prunastri* y el pocillo 5 contiene extracto de *Evernia furfuracea*.

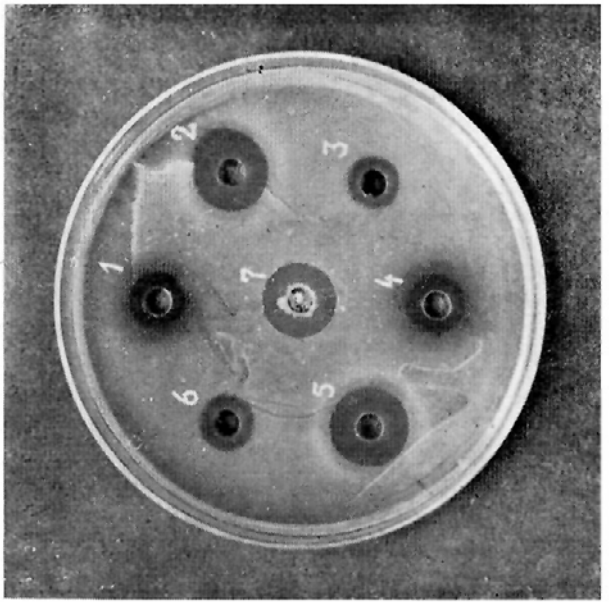


Fig. 4.—Placa sembrada con *Staphylococcus aureus H.* Los pocillos 1 y 4 contienen la sal sódica de la fracción número 1 de *Evernia prunastri.* Los pocillos 2 y 5 contienen la sal sódica de la fracción núm. 2 de *E. prunastri* y los pocillos 3 y 6 contienen la sal sódica de la fracción núm. 3 de *E. prunastri.* El pocillo 7 contiene disolución acuosa de usnicato sódico al 1 por 1.000.

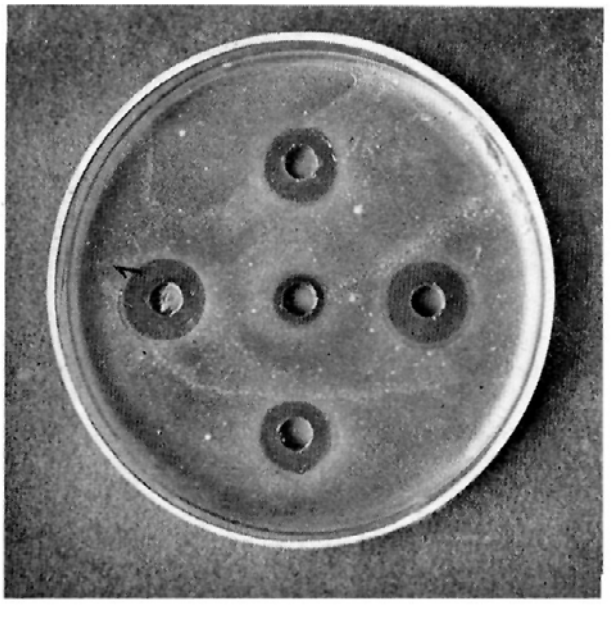


Fig. 3.—Placa sembrada con *Mycobacterium phlei.* Los pocillos 1 y 3 contienen extracto de *Usnea barbata.* Los pocillos 2 y 4 contienen extracto de *Evernia prunastri* y el pocillo 5 contiene extracto de *Evernia furfuracea.*

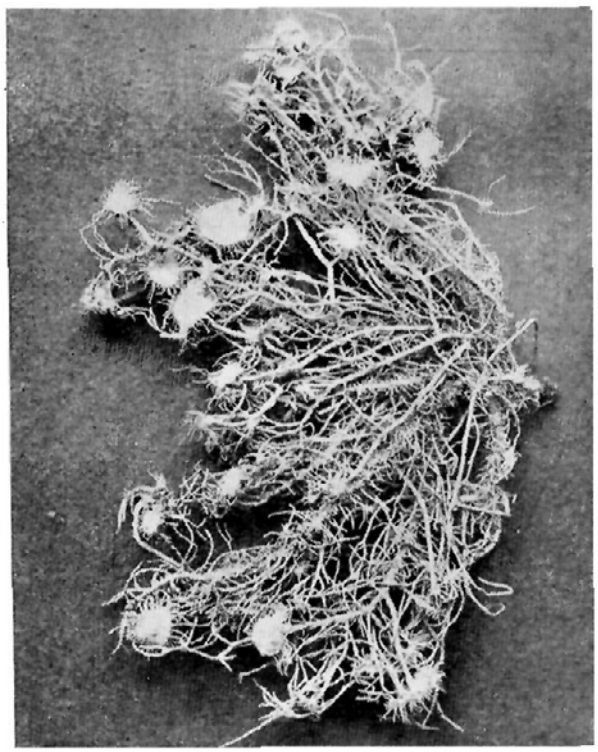


Fig. 6.—Ejemplar de *Usnea barbata L.* procedente de Abejar (Soria) en el cual se aprecian sus típicos apotecios.

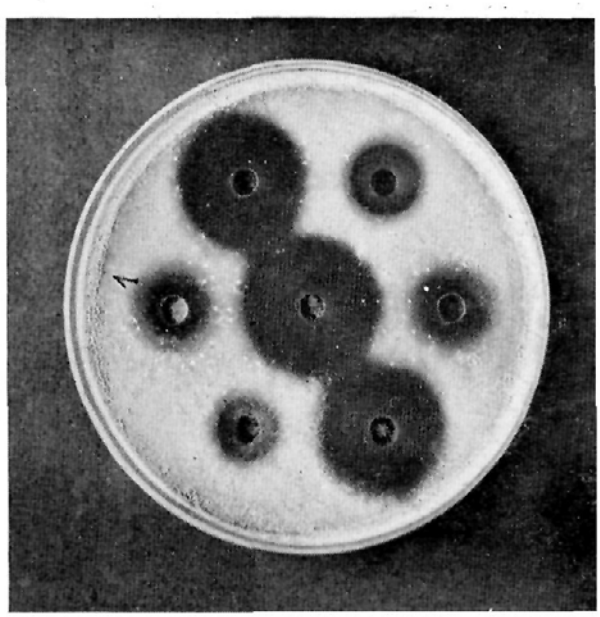


Fig. 5.—Placa sembrada con *Mycobacterium tuberculosis avium.*

Los pocillos 1 y 4 contienen la sal sódica de la fracción número 1 de *Evernia prunastri.* Los pocillos 2 y 5 contienen la sal sódica de la fracción núm. 2 de *E. prunastri* y los pocillos 3 y 6 contienen la sal sódica de la fracción núm. 3 de *E. prunastri.* El pocillo 7 contiene disolución acuosa de usnicato sódico al 1 por 1.000.

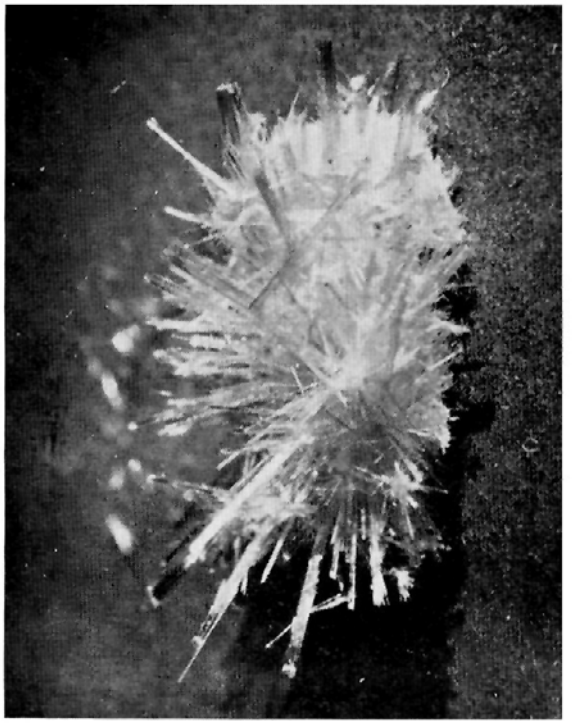


Fig. 8.—Bello grupo de grandes cristales de ácido úsnico obtenidos por tercera cristalización.

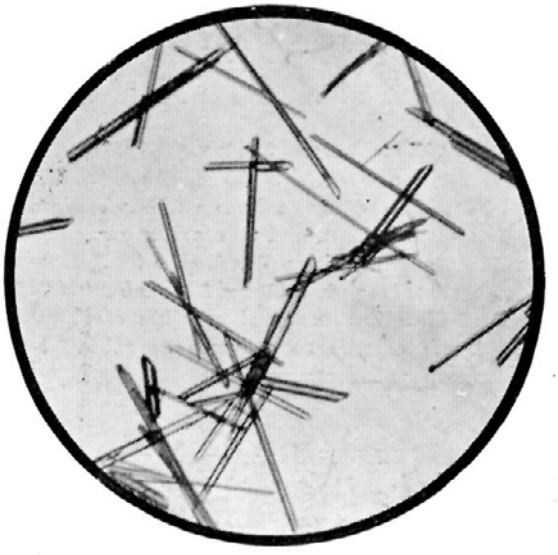


Fig. 7.—Microfotografía a pocos aumentos de cristales aciculares de ácido úsnico dextrogiro, obtenidos de *Usnea barbata*.

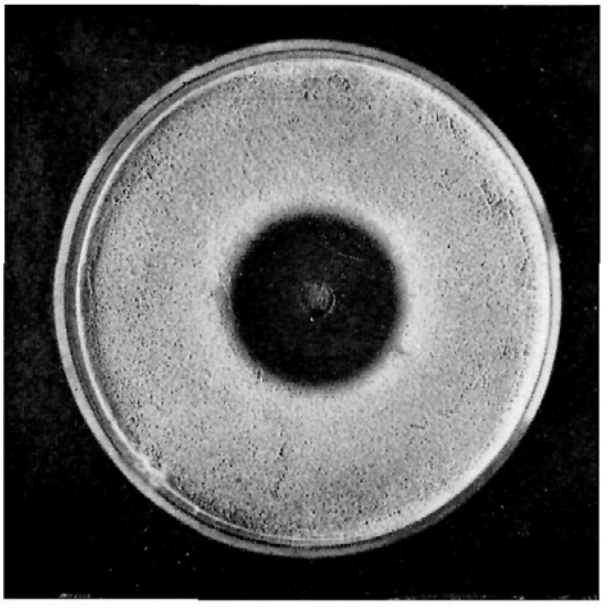


Fig. 10.—Placa sembrada con *Mycobacterium tuberculosis avium*.

En el pocillo se ha colocado una disolución acuosa de usnicato sódico al 1 por 1.000.

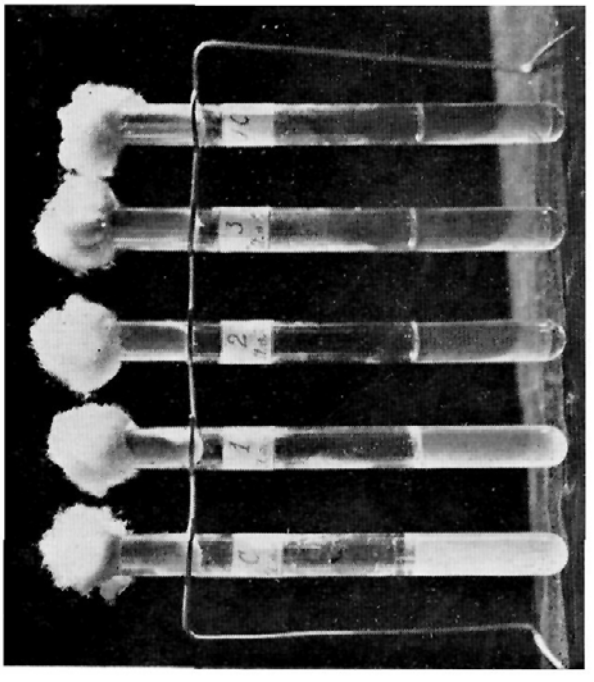


Fig. 9.—Experiencias con ácido úsnico y *Staphylococcus aureus* estirpe 313 NRRL. C, tubo control sin ácido úsnico; 1, contiene ácido úsnico a la concentración de 1 por 100.000; 2, contiene ácido úsnico a la concentración de 1 por 50.000 y 3, contiene ácido úsnico a 1 por 20.000. Tubo *Uc.* solamente contiene caldo y ácido úsnico.

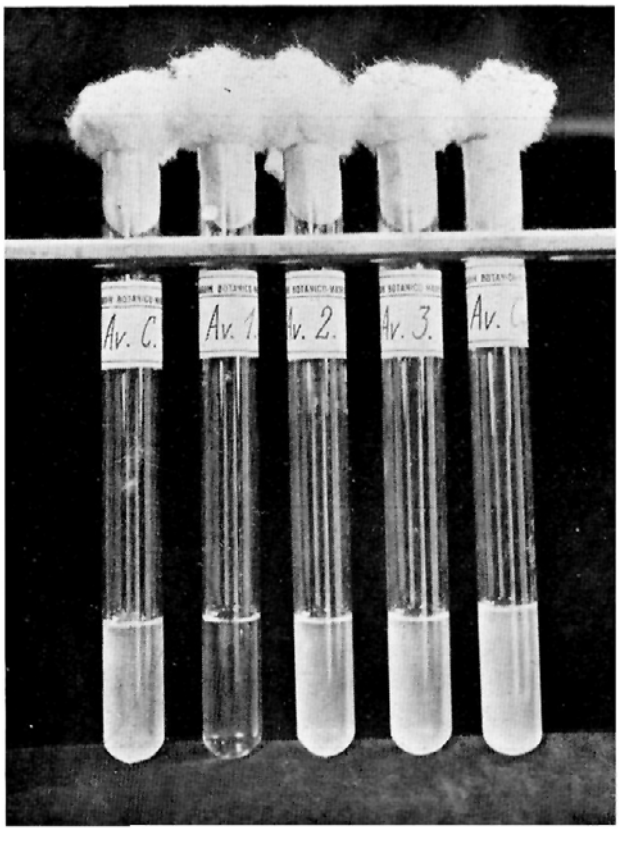


Fig. 11.—Experiencias con *Mycobacterium tuberculosis avium* y usnicato sódico. Medio de cultivo: el de Dubos. El tubo Av. C no contiene usnicato sódico. El tubo Av. 1 contiene usnicato sódico a la concentración de 1 en 20.000. El tubo Av. 2 contiene usnicato sódico a la concentración de 1 en 100.000 y el tubo Av. 3 contiene usnicato sódico a la concentración de 1 en 400.000. La inhibición es completa en el tubo con 1 en 20.000 de usnicato sódico.

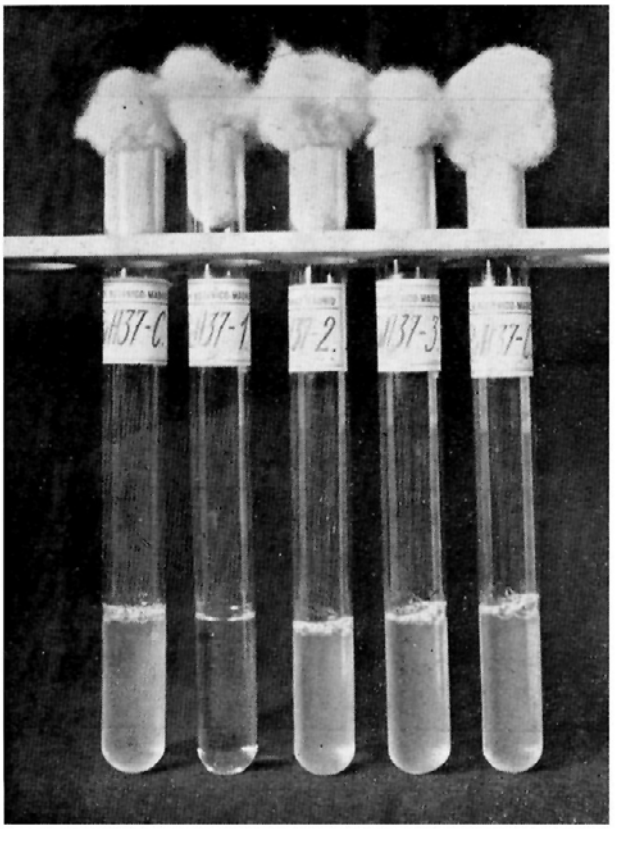


Fig. 12.—Experiencias con *Mycobacterium tuberculosis hominis H.* 37 Rv. y usnicato sódico. Medio de cultivo: el de Dubos. Los tubos H. 37 C no contienen usnicato sódico. El tubo 1 contiene usnicato sódico a la concentración de 1 en 20.000. El tubo 2 contiene usnicato sódico 1 en 100.000 y el tubo 3 contiene usnicato sódico 1 en 400.000. La inhibición es completa en el tubo 1 con usnicato sódico a la concentración de 1 en 20.000.

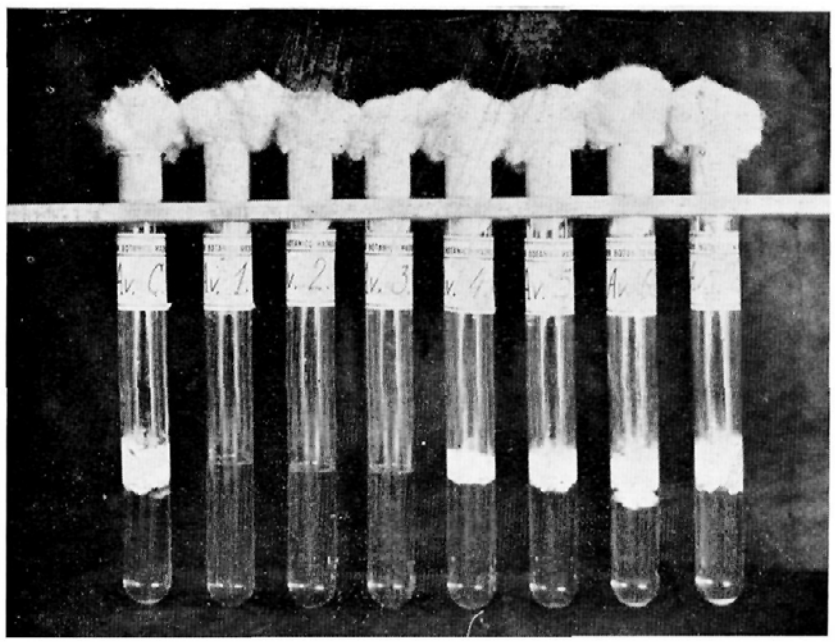


Fig. 13.—Experiencias con *Mycobacterium tuberculosis avium* y usnicato sódico. Medio de cultivo: Caldo glicerinado.

El tubo Av. 1 contiene usnicato sódico al 1 en 20.000
El tubo Av. 2 » » » al 1 en 50.000
El tubo Av. 3 » » » al 1 en 100.000
El tubo Av. 4 » » » al 1 en 200.000
El tubo Av. 5 » » » al 1 en 400.000
El tubo Av. 6 » » » al 1 en 500.000

Hay inhibición completa hasta la concentración de 1 en 100.000 inclusive.

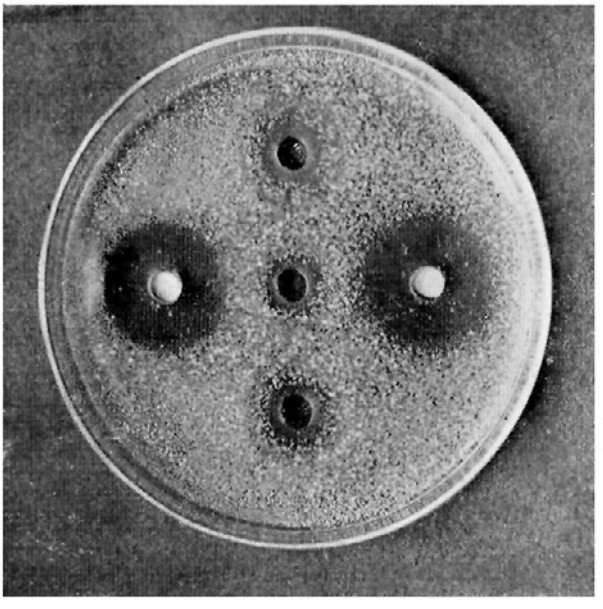


Fig. 15.—Placa sembrada con *Mycobacterium hominis H. 37 Rv.*

Los pocillos 1 y 3 contienen usnicato de estreptomicina a saturación en tampón fosfato a pH 7. Los pocillos 2 y 4 contienen usnicato sódico al 1 por 10.000. El pocillo 5 contiene usnicato sódico al 1 por 20.000.

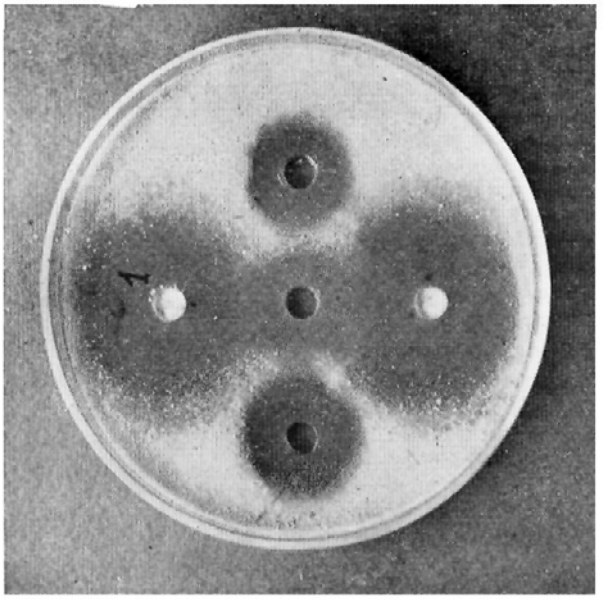


Fig. 14.—Placa sembrada con *Mycobacterium avium.*

Los pocillos 1 y 3 contienen usnicato de estreptomicina a saturación en tampón fosfatos a pH 7. Los pocillos 2 y 4 contienen usnicato sódico al 1 por 10.000. El pocillo 5 contiene usnicato sódico al 1 por 20.000.

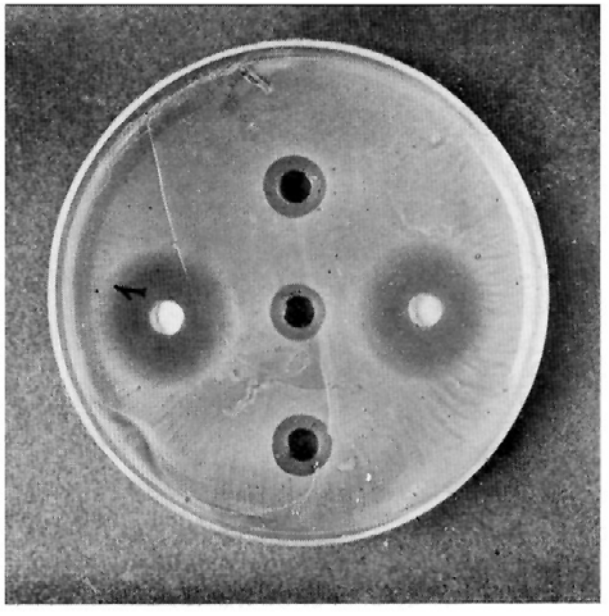


Fig. 17.—Placa sembrada con *Staphylococcus aureus*. *H*. Los pocillos contienen los mismos líquidos que los correspondientes a las placas de las fotografías 14 y 15.

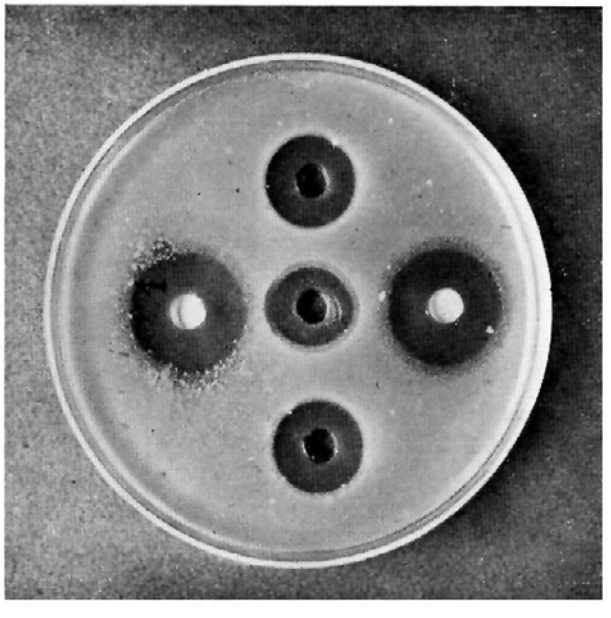


Fig. 16.—Placa sembrada con *Bacillus mycoides*. Los pocillos contienen los mismos líquidos que los correspondientes a las placas de las fotografías 14 y 15.

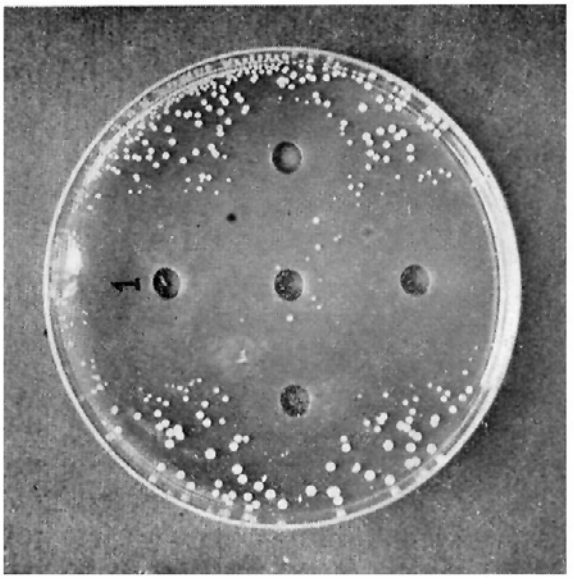


Fig. 19.—Placa sembrada con *Mycobacterium hominis H. 37 Rv.*

Los pocillos contienen los mismos líquidos que los correspondientes a la placa de la fotografía 18.

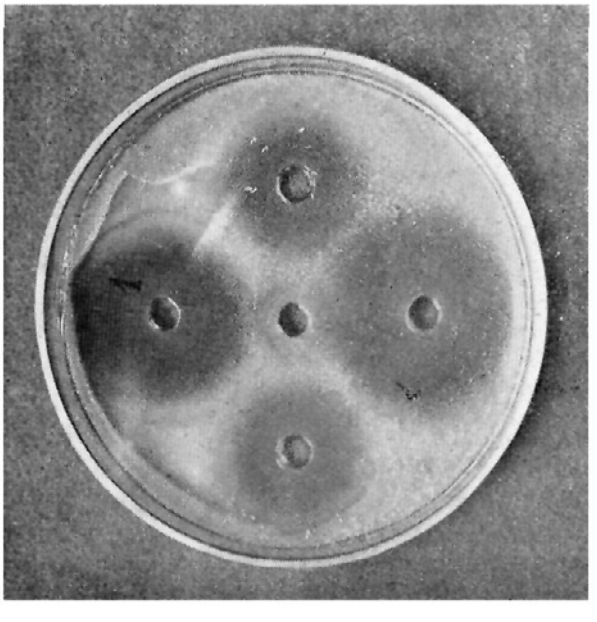


Fig. 18.—Placa sembrada con *Mycobacterium tuberculosis avium.*

Los pocillos 1 y 3 contienen usnicato de estreptomicina en propileno glicol al 1 por 1.000. Los pocillos 2 y 4 contienen suspensión de usnicato de estreptomicina al 1 por 1.000 en tampón fosfato de pH 7. El pocillo 5 (el central) contiene propileno glicol.

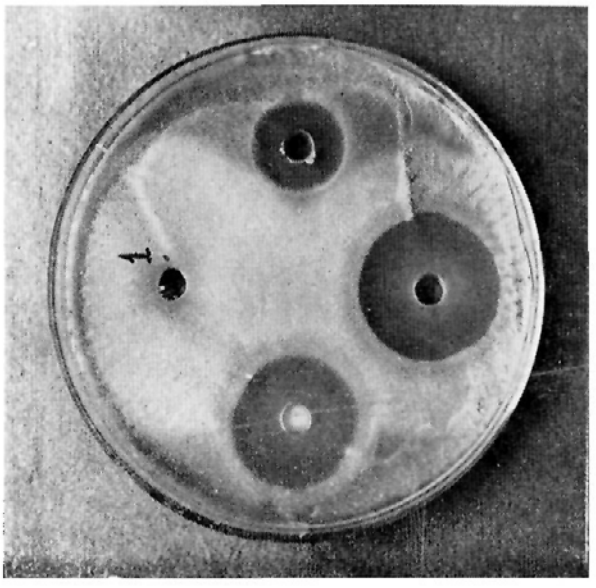


Fig. 21.—Placa sembrada con *Mycobacterium phlei*. Los pocillos contienen los mismos líquidos que en la placa correspondiente a la fotografía núm. 20.

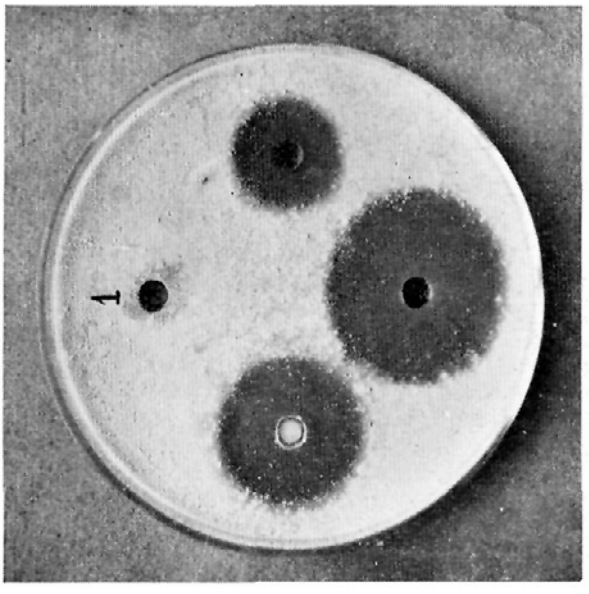


Fig. 20.—Placa sembrada con *Mycobacterium tuberculosis avium*.

El pocillo 1 contiene propileno glicol; el pocillo 2 contiene usnicato de estreptomicina en aceite de oliva al 1 por 1.000; el pocillo 3 contiene usnicato de estreptomicina en propileno glicol al 1 por 1.000 y el pocillo 4 contiene usnicato de estreptomicina disperso en tampón fosfato a pH 7 y a la concentración del 1 por 1.000.

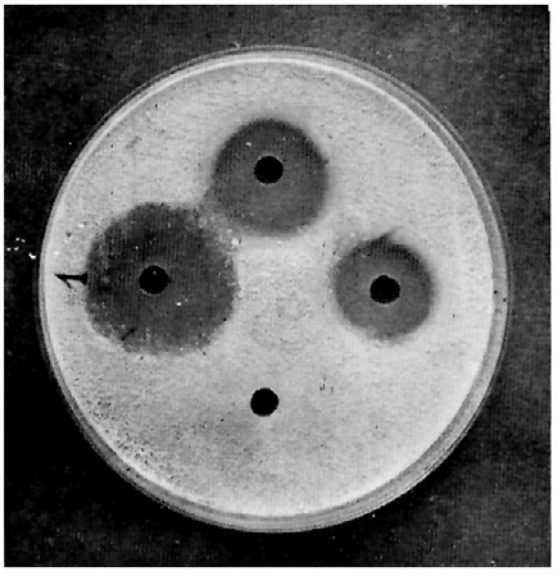


Fig. 25.—Placa sembrada con *Mycobacterium avium*. Medio de cultivo Bacto Streptomycin agar con 5 por 100 de glicerina.

El pocillo 1 contiene usnicato de estreptomicina en propileno glicol al 1 por 1.000, el pocillo 2 contiene usnicato sódico al 1 por 1.000 en propileno glicol, el pocillo 3 contiene ácido úsnico al 1 por 1.000 en propileno glicol y el pocillo 4 contiene propileno glicol.

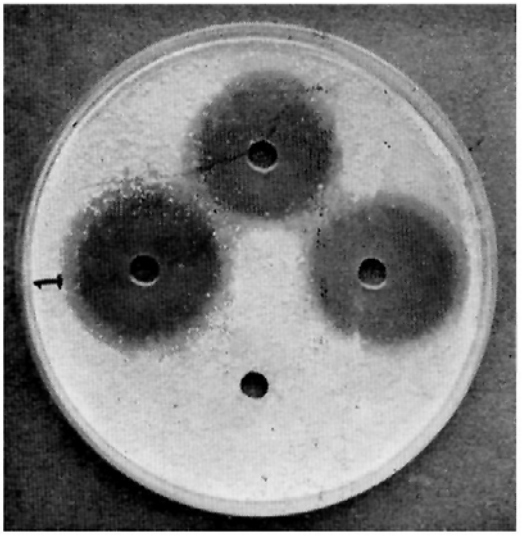


Fig. 22.—Placa sembrada con *Mycobacterium avium*. El pocillo 1 contiene usnicato de estreptomicina al 1 por 1.000 disuelto en propileno glicol, el pocillo 2 contiene usnicato sódico al 1 por 1.000 en propileno glicol, el pocillo 3 contiene ácido úsnico al 1 por 1.000 en propileno glicol y el pocillo 4 contiene propileno glicol.

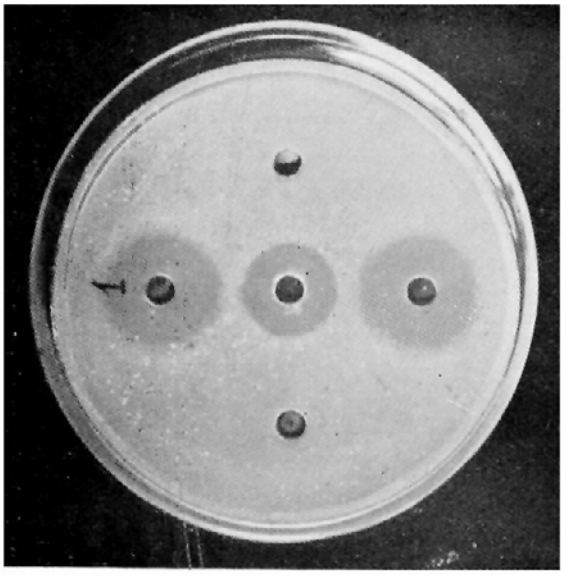


Fig. 24.—Placa sembrada con *Escherichia coli*. Medio de cultivo Bacto Streptomycin Assay agar.
Los pocillos contienen los mismos líquidos que los correspondientes a la placa de la fig. núm. 23.

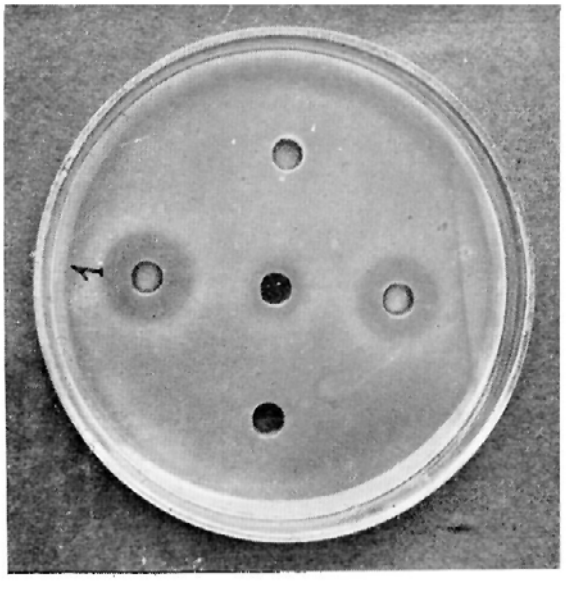


Fig. 23.—Placa sembrada con *Escherichia coli*.
Los pocillos 1 y 3 contienen usnicato de estreptomicina disperso en tampón fosfatos a un pH 7, el pocillo 2 contiene usnicato sódico al 1 por 1.000 en agua a un pH final de 7, el pocillo 4 contiene ácido úsnico disperso al 1 por 1.000 en tampón fosfatos a pH 7 y el pocillo 5 contiene 5 unidades de estreptomicina disuelta en agua neutra.