

00346

9



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

EFFECTO ANTIMICOBACTERIANO E
INMUNOMODULADOR DE LOS METABOLITOS
SECUNDARIOS DE *Achillea millefolium*
(ASTERACEA).

292851

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRA EN CIENCIAS

(BIOLOGÍA CELULAR)

P R E S E N T A

JACQUELINA FERNANDEZ VARGAS

DIRECTORA DE TESIS:
DRA. MARIA ADELINA JIMENEZ ARELLANES

MEXICO, D.F.

2001



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

División de Estudios de Posgrado

OFICIO FCIE/DEP/230/01

ASUNTO: Asignación de jurado

DRA. MARIA ADELINA JIMENEZ ARELLANES
P R E S E N T E


Por este conducto me permito comunicarle que ha sido ratificado(a) como Director(a) de Tesis del(a) alumno(a) **BIOL. JACQUELINA FERNANDEZ VARGAS**, quién desarrolló el trabajo de Tesis titulado: "Efecto antimicrobacteriano e inmunomodulador de los metabolitos secundarios de Achillea millefolium (Asteraceae)".

Así mismo comunico que el Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, ha asignado a los siguientes sinodales para dictaminar si el trabajo que ha desarrollado como tesis el(a) alumno(a) antes mencionado(a) tiene los méritos para obtener el grado de MAESTRO(A) EN CIENCIAS (Biología Celular).

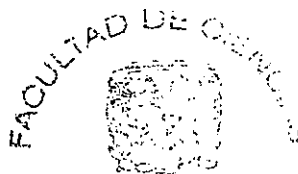
CARGO	GRADO,	NOMBRE COMPLETO
PRESIDENTE	DRA.	ANA LUISA ANAYA LANG
PRIMER VOCAL	DRA.	MARIA ADELINA JIMENEZ ARELLANES
SEGUNDO VOCAL	DR.	MARIANO MARTINEZ VAZQUEZ
TERCER VOCAL	DR.	ALFONSO ROMO DE VIVAR ROMO
SECRETARIO	DRA.	ROCIO CRUZ ORTEGA
SUPLENTE	M. EN C.	MONTSERRAT GISPERT CRUELLS
SUPLENTE	M. EN C.	ABIGAIL AGUILAR CONTRERAS

Sin más por el momento aprovecho la ocasión para enviarles un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., 14 de febrero de 2001
JEFE DE LA DIVISION


DRA. MARGARITA COLLAZO ORTEGA

MCO/ASR//mnm'



DIVISION DE ESTUDIOS
DE POSGRADO

AGRADACIMIENTOS

Para la Unidad de Investigación Médica en Farmacología de Productos Naturales del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social, lugar de realización del presente trabajo.

A CONACyT por el financiamiento otorgado al proyecto 30702-N.

Al CONACyT por la beca otorgada (no. de becario 130304), para la realización de los estudios de posgrado.

Al Fondo de Fomento a la Investigación del IMSS (FOFOI-IMSS) por el apoyo al proyecto FP-0038/717.

Por la beca del IMSS que recibí durante los años de 1999 y 2000, para la realización de este trabajo.

Con especial respeto y cariño a la Dra. Mariana Meckes, la cual me brindo su apoyo y confianza durante la realización de la Tesis.

Mi gratitud con especial afecto a la Dra. María Adelina Jiménez Arellanes, que me guió en la realización de este trabajo.

A la M en C Abigail Aguilar Contreras por su valiosa ayuda en la identificación de *Achillea millefolium* L.

Agradezco al laboratorio de Inmunoquímica II del Departamento de Inmunología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del IPN, y en especial a la Dra. Julieta Luna Herrera, por su asesoría y a la Q.F.B. Raquel Ramírez Muñoz, por la realización de los ensayos de actividad antimicobacteriana por el método colorimétrico del Alamar azul.

Por el apoyo otorgado por parte del personal de la Unidad de Investigación Médica en Genética Humana del Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI (IMSS).

A la M en C Imelda Velázquez Montes por el apoyo brindado en la adquisición de información científica.

Al jurado por su participación en la revisión y comentarios realizados a la presente tesis.

DEDICATORIAS

*El saber es la única riqueza de que no te pueden despojar los tiranos.
Sólo la muerte puede apagar la lámpara del conocimiento
que arde dentro de ti.
La verdadera riqueza de una nación no consiste en su oro ni en su plata,
sino en su saber, en su sabiduría y en la rectitud de sus hijos.
K. Gibrán*

Al creador del universo

A mis padres por todo su apoyo

Lucila Vargas Campos

Ascensión Fernández Torres

A mis hermanos

Lupita, César, Raquel y Gaby

A mi tía Elena y mi prima Alicia

*Con especial afecto a Lilián, Silvia, Gaby, Beatriz,
Raquel, Andrea y Susanita.*

A mis Amigos

INDICE

ABREVIATURAS.....	i
RESUMEN.....	ii
1. GENERALIDADES DE LA TUBERCULOSIS.....	1
1.1. Incidencia, prevalencia y mortalidad de la tuberculosis.....	1
1.2. Fármaco-resistencia de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	5
1.3. Tratamiento contra la Tuberculosis.....	6
1.4. Características morfológicas de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	10
1.5. Respuesta inmune y mecanismos de defensa contra <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	12
1.6. Las Plantas Medicinales como fuente potencial de compuestos activos contra <i>Mycobacterium tuberculosis</i> y otras especies.....	22
1.6.1. Métodos para la determinación de la susceptibilidad de diferentes cepas de <i>Mycobacterium</i> a diversos agentes antimicobacterianos.....	30
1.7. Importancia de sustancias inmunomoduladoras de origen vegetal.....	31
1.7.1. Métodos de estudio para la búsqueda de compuestos inmunomoduladores.....	36
2. GENERALIDADES DE <i>Achillea millefolium</i> L (Asteraceae).....	38
2.1. Características botánicas.....	38
2.2. Actividad Biológica.....	38
2.3. Estudios químicos.....	40
3. JUSTIFICACIÓN.....	43
4. OBJETIVO.....	44
4.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	44
5.1. HIPOTESIS.....	45
6. MATERIALES Y METODOS.....	46
6.1. Selección de la especie botánica.....	46
6.2. Colecta del material vegetal.....	46
6.3. Preparación de los extractos.....	46
6.4. Determinación de la actividad antimicobacteriana.....	48

6.5. Evaluación de la actividad inmunomoduladora.....	51
6.5.1. Aislamiento de neutrofilos.....	51
6.5.2. Opsonización de levaduras.....	52
6.5.3. Preparación de muestras problemas a evaluar.....	52
6.5.4. Determinación de la actividad fagocítica.....	52
6.6. Fraccionamiento químico del extracto hexánico.....	53
6.6.1. Aislamiento de los compuestos β -amirina y β -sitosterol.....	55
6.6.2. Aislamiento y caracterización de leucodina, matricarina y desacetilmatricarina.....	56
6.7. Fraccionamiento químico del extracto metanólico.....	56
6.7.1. Aislamiento de 7-metoxi-3,5,4'-trihidroxi- <i>flavona</i> y 5-hidroxi-5,6,7,3',4'- pentametoxi- <i>flavona</i>	57
7. RESULTADOS.....	58
7.1. Selección de la especie vegetal.....	58
7.2. Determinación de la actividad antimicobacteriana de los extractos hexánico, metanólico y acuoso.....	59
7.3. Fraccionamiento químico del extracto hexánico.....	60
7.4. Caracterización de los constituyentes presentes en el extracto hexánico de <i>A. millefolium</i>	61
7.5. Identificación de los compuestos aislados.....	63
7.5.1. Identificación de β -sitosterol y β -amirina.....	63
7.5.2. Identificación de la leucodina.....	66
7.5.3. Identificación de la matricarina.....	70
7.5.4. Identificación de la desacetilmatricarina.....	73
7.6. Determinación de los constituyentes presentes en el extracto metanólico de <i>A. millefolium</i>	79
7.6.1. Aislamiento de la 7-metoxi-3,5,4'-trihidroxi- <i>flavona</i> y 5-hidroxi-3,6,7,3',4'-pentametoxi- <i>flavona</i>	79
7.7. Evaluación biológica de los compuestos aislados del extracto hexánico de <i>A. Millefolium</i>	89
7.8. Determinación de la actividad inmunomoduladora de los extractos de	

<i>Achillea millefolium</i>	89
7.8.1. Actividad inmunomoduladora de los compuestos aislados de <i>Achillea millefolium</i>	92
8. DISCUSION.....	95
9. CONCLUSIONES.....	100
10. LITERATURA CONSULTADA.....	101

ABREVIATURAS

CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
CHCl ₃	Cloroformo
E	Etambutol
EDTA.	Acido etilendinitrilotetraacético sal disódica (dihidrato)
EMIE	Espectroscopía de masas de impacto electrónico
H	Isoniazida
Hex	Hexano
Hz	Hertz
I.R.	Infrarrojo
KBr	Bromuro de potasio
LAM	Lipoaminomanano
ManLAM	Lipoaminomanano con oligosacáridos de manosa
MeOH	Metanol
MN	Macrófago
MPO	Mieloperoxidasa
PMNs	Polimorfonucleares
R	Rifampicina
RMN- ¹³ C	Resonancia magnética nuclear de carbono 13
RMN- ¹ H	Resonancia magnética nuclear protónica
S	Streptomycin
TB	Tuberculosis
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana adquirido
Z	Pirazinamida

RESUMEN

La búsqueda de nuevos agentes antimicobacterianos ha aumentado en los últimos años debido al incremento a escala mundial de los casos de tuberculosis. Se han desarrollado diversas investigaciones encaminadas a explorar el efecto biológico de extractos de plantas sobre diferentes cepas de micobacterias, lo cual ha permitido encontrar diversas especies vegetales con actividad inhibitoria sobre *Mycobacterium tuberculosis* y de sustancias inmunomoduladoras que favorecen la respuesta del sistema inmunológico ante una infección provocada por este microorganismo.

El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar el potencial antimicobacteriano e inmunomodulador de los extractos y compuestos de la especie medicinal *Achillea millefolium* L. (Asteraceae).

Con el estudio de tipo biodirigido de la especie *A. millefolium* se obtuvieron tres extractos: hexánico, metanólico y acuoso, de los cuales el más activo fue el hexánico que mostró la mayor actividad inhibitoria contra *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. Para probar la actividad contra este microorganismo se utilizó el micrométodo colorimétrico de alamar azul a una concentración de 50 µg/mL, la actividad se fue perdiendo en el transcurso del fraccionamiento y con los compuestos aislados (leucodina, matricarina y desacetilmatricarina).

El efecto de la actividad inmunomoduladora de los tres extractos, se midió sobre la fagocitosis de levaduras por los neutrófilos. El proceso fagocítico fue inhibido, observándose que el extracto metanólico, acuoso y hexánico inhibieron el 69, 65 y 79%, respectivamente, a una concentración de 10 mg/mL.

Del fraccionamiento del extracto hexánico se encontró que los compuestos desacetilmatricarina, matricarina y leucodina a 5 mg/mL inhiben la capacidad fagocítica en un 45%, 33% y 65% respectivamente. Del extracto metanólico se aislaron los compuestos antes mencionados más dos flavonoides, los cuales activaron la capacidad fagocítica, siendo los valores de activación del 38% para la 7-metoxi-3,5,4'-trihidroxi-flavona y del 89% para la 5-hidroxi-3,6,7,3',4'-pentametoxiflavona a una concentración de 5 mg/mL.

Este tipo de estudios contribuyen a la búsqueda de nuevas estructuras químicas como agentes antimicobacterianos e inmunomoduladores de origen vegetal y validan el uso que tiene esta planta en la medicina tradicional de México.

1. GENERALIDADES DE LA TUBERCULOSIS

1.1. Incidencia, prevalencia y mortalidad de la tuberculosis

Los reportes del incremento de casos de tuberculosis han aumentado desde la década de los 80's, principalmente en cuatro regiones del mundo: Africa, Sudeste de Asia, el Oeste del Pacífico y el Este del Mediterráneo (Tabla I) (Raviglione *et al*, 1995).

Tabla I. Casos de tuberculosis notificados por la OMS (Raviglione *et al*, 1995).

Región	Número de casos en 1984-1986	Número de casos en 1989-1991
Africa	264 037	365 465
América	227 277	207 790
Mediterráneo del Este	212 872	281 182
Europa	307 617	242 643
Sudeste de Asia	1 338 896	1 874 950
Pacífico Oeste	600 185	826 507
Global	2 950 884	3 798 537

Un trabajo realizado por Dye y colaboradores en 1999 describe la incidencia, prevalencia y mortalidad de la tuberculosis (TB) que existía en 1997, donde se reportan 7.96 millones de nuevos casos de TB para ese año, de los cuales 3.52 millones (44%) presentaban infección pulmonar y el total de casos reportados de dicho padecimiento fue de 16.2 millones de personas en el mundo. Según estimaciones, en ese año existieron 1.87 millones de individuos infectados y el índice de mortalidad mundial fue de 23%, pero estos valores excedían hasta un 50% en algunos países africanos con alta incidencia de VIH. Además la prevalencia mundial de infección por *Mycobacterium* fue de 32% (1.86 millones de personas) para 1999. Asimismo, los autores reportaron que el 8 % de incidencia

de tuberculosis, ocurre en más de 5 países del sudeste asiático, mientras que 9 de los 10 países con mayor porcentaje de incidencia por capital se encuentra en Africa. La prevalencia de coinfección mundial de TB/VIH fue de 0.18% y 640 000 casos de incidencia de TB (8%) tenían la infección de VIH. En comparación, menos de la mitad (42%) de todos los casos de TB estimados y cerca de una tercera parte (37%) de casos positivos, fueron reportados por la OMS, (Figura 1. Dye *et al*, 1999)

Las notificaciones del incremento de casos de tuberculosis en Londres son similares a las que se observaron durante los primeros diez años de la epidemia en la ciudad de Nueva York. En esta ciudad, el número de casos difiere considerablemente dependiendo de ciertos factores, se observa que existe un aumento en áreas de condiciones socioeconómicas bajas y donde hay grandes poblaciones de inmigrantes. En Nueva York, la mayoría de los casos se localizan en el centro de Harlem (79 casos en 1980, a 170 en 1989 por cada 100 000 habitantes). En Londres, los sitios más afectados son Newhan, Tower Hamlets y Brent (77-99 casos por cada 100 000 habitantes). El número de pacientes infectados en los municipios de Londres ha aumentado de dos a tres veces más en 10 años. En las dos ciudades mencionadas anteriormente, el incremento de personas infectadas reportadas se ha encontrado entre los adultos jóvenes (15-25 años) en edad reproductiva (Hayward y Coker, 2000)

En Nueva York y Londres, muchos de los casos de tuberculosis reportados eran residentes de diverso origen, como hispanos, hindúes, africanos, etc. Por ejemplo, en la ciudad de Nueva York en 1994, 50% de los enfermos reportados con tuberculosis fueron identificados como afroamericanos; 26% fueron hispanos, 12% blancos residentes y el otro 12% restante correspondió a residentes de diferentes origen (orientales). Por otra parte en la ciudad de Londres en 1993, de los casos de tuberculosis reportados en ese año, el 40% de los enfermos eran hindúes, el 31% blancos residentes y el 29% restante de otro origen (africanos) (Hayward y Coker, 2000)

En Holanda la incidencia de la tuberculosis ha incrementado de 9.7 casos en 1984 a 11.8 casos en 1994 por cada 100 000 habitantes (Deutekom *et al*, 1997).

La incidencia de la tuberculosis, a escala mundial, se esperaba que aumentara de 8.8 millones de casos que había en 1995 a 10.2 millones de casos para el año 2000 y a 11.9 millones para el 2005 (Pilheu *et al*, 1998). Asimismo, en 1995 murieron 3 millones de personas y se esperaba que para el 2000 murieran 3.5 millones, cifra que sigue aumentando si no se toman las medidas necesarias para su control. De las muertes ocurridas por tuberculosis, solo el 4.6% se atribuyeron a la infección del virus de inmunodeficiencia humana (VIH) en 1990, esta proporción aumentó hasta más del 14% (500 mil muertes) en el año 2000 (Pilheu *et al*, 1998).

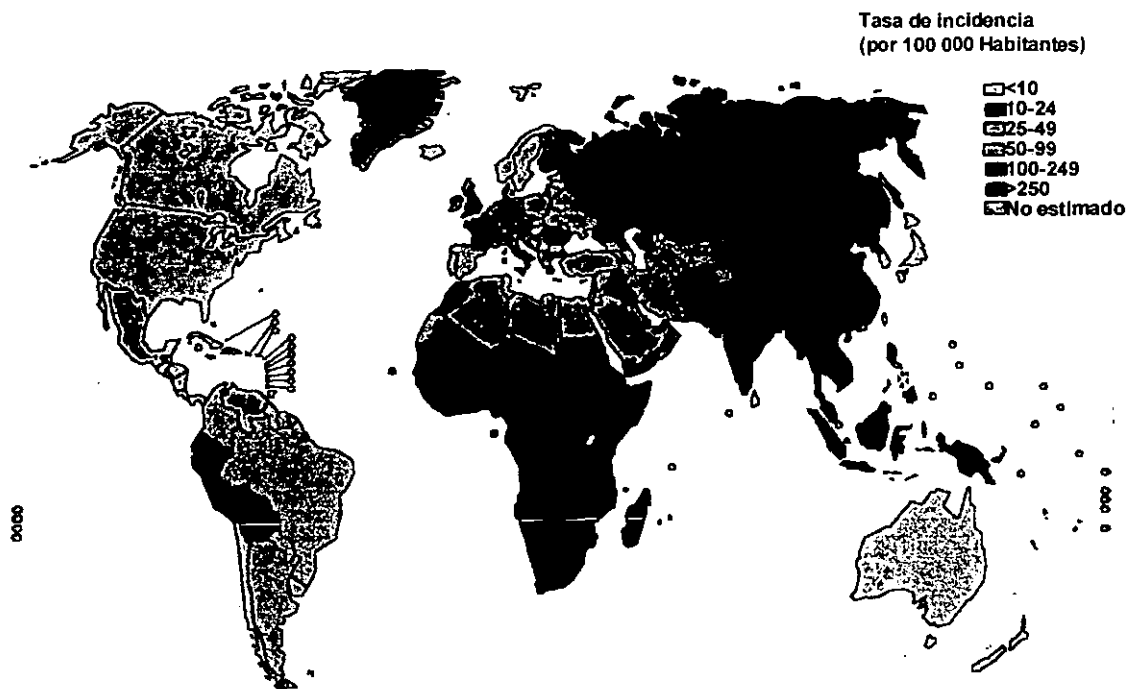


Figura 1. Número de casos estimados de Tuberculosis en 1997. (Tomada de Dye, 1999)

En el caso de México, Granich y col. reportan que en 1997, se presentaron 23 575 casos de tuberculosis, donde el índice fue de 25 casos por cada 100 000 habitantes; de los cuales 17 917 (76%) fueron pacientes sin antecedentes de tratamiento antituberculoso y el 2.7% eran resistentes a dos o más fármacos usados en un régimen con tres medicamentos (isoniazida (H), rifampicina (R) y pirazinamida (Z), además se encontró que 484 pacientes recibieron terapia con un solo fármaco (cualquiera de los tres fármacos reportados); en este caso, el tratamiento fue un fracaso. Asimismo, reportaron que solo 313 (1.8%) de los pacientes presentaron resistencia a más de tres fármacos (Granich *et al*, 2000).

De los pacientes que fueron tratados (5658 casos), 1358 de ellos (24 %) recibieron terapia con un solo fármaco y los que recibieron un régimen con 5 fármacos - isoniazida (H), rifampicina (R), pirazinamida (Z), estreptomina (S) y etambutol (E)- (741 casos) presentaron resistencia a más de 4 fármacos (Granich *et al*, 2000) Así mismo, el boletín de enero del 2000 publicado por la Dirección General de Epidemiología indica que la TB es una de las 20 primeras causas de muerte en el país y los estados con mayor incidencia son Baja California, Chiapas, Guerrero, Jalisco y Veracruz (Granich *et al*, 2000).

Por otro lado, al evaluar 10 países de Latinoamérica durante el periodo de 1986 a 1990, la Organización Panamericana de Salud y la OMS encontraron que México presentaba el 19.1% de resistencia a los fármacos primarios (H, R, Z, S y E) y entre 1989 a 1993 el Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica (INDRE) evaluó 1811 casos aislados clínicos de *M. tuberculosis* de diversos estados y encontró una resistencia primaria de 8.3% (Granich *et al*, 2000).

Al compararse los resultados de 35 países que participaron en un programa de vigilancia mundial de la fármaco-resistencia a los antifímicos (OMS/IUATLD) en el periodo de 1994 a 1997, se encontró que México ocupaba la novena posición por presencia de cepas de *M. tuberculosis* con resistencia primaria (18.3 %) a uno de

los cuatro fármacos (H, R, E y S). Cuando se compararon los niveles de resistencia entre pacientes que habían recibido tratamiento previo, México se encontraba en la sexta posición de los 35 países, con un 53 % de resistencia (Granich *et al*, 2000).

Los principales factores que contribuyen al incremento de la tuberculosis, son pobreza extrema, migración (Deutekom *et al*, 1997; Hayward y Coker, 2000), prescripciones medicas inadecuadas, cáncer, la presencia de enfermedades que comprometen el sistema inmune como la diabetes, VIH y alcoholismo entre otras; pero la mayor contribución al incremento del índice de mortalidad es la aparición de cepas de *M. tuberculosis* resistentes a uno o más fármacos antituberculosos utilizadas en la actualidad (Rattan *et al*, 1998).

1.2. Fármaco-resistencia de *Mycobacterium tuberculosis*

La fármaco-resistencia se refiere a la resistencia simultánea de las cepas de *Mycobacterium* a dos o más fármacos como la rifampicina e isoniazida; con o sin resistencia a otros fármacos. Rattan y colaboradores (1998) por análisis de genética y biología molecular, han demostrado que el bacilo puede adquirir la fármaco-resistencia por tres vías: a) alteración de los sitios de acción del fármaco a través de una mutación, b) por la sobreproducción de sitios de acción, c) por biotransformación del fármaco por el bacilo.

La fármaco-resistencia resulta primariamente de la acumulación de mutaciones individuales en los sitios de acción del fármaco en los genes del microorganismo. La probabilidad de resistencia es alta para fármacos antituberculosos poco efectivos como, tiacetazonás, etionamida, capreomicina, cicloserina y viomicina, es decir de una población de 10^3 bacilos de tuberculosis, uno puede ser resistente a los fármacos anteriores; mientras que para otros como isoniazida, estreptomycin, etambutol, kanamicina y ácido p-amino

salicílico, esta probabilidad es intermedia, $1/10^6$; y baja para fármacos como la rifampicina $1/10^8$. Consecuentemente, la probabilidad de una mutación es directamente proporcional a la carga bacteriana. Una carga de bacilos de 10^9 puede contener diversos mutantes resistentes a algún fármaco antituberculoso (Rattan *et al*, 1998).

1.3. Tratamiento contra la Tuberculosis

El tratamiento contra la tuberculosis pulmonar se da en tres etapas: 1) primario acortado, 2) primario reforzado y 3) retratamiento. Estos tratamientos deben ser administrados y controlados de acuerdo al programa denominado como tratamiento acortado estrictamente supervisado (TAES), el cual ofrece completa seguridad respecto de la ingestión de los medicamentos y asegura la curación (Proyecto de Modificación a la Norma Oficial Mexicana NOM-006-SSA2-1993).

Los medicamentos considerados como de primera línea que se utilizan en el tratamiento de la tuberculosis son: isoniazida (H), rifampicina (R), pirazinamida (Z), estreptomina (S) y etambutol (E), cuyas estructuras, mecanismos de acción, presentación, dosis y reacciones adversas se señalan en la Tabla II y III.

El TAES para la tuberculosis incluye los siguientes medicamentos: isoniazida (H), rifampicina (R), pirazinamida (Z); se aplica en todos los casos nuevos y aquellos que lo reanudan por un abandono o por primera recaída. Este esquema se lleva a cabo durante 25 semanas o hasta completar 105 dosis y está dividido en dos fases: fase intensiva 60 dosis (diario de lunes a sábado con H,R y Z), y fase de sostén 45 dosis (intermitente 3 veces a la semana con H y R) (Proyecto de modificación a la Norma Oficial Mexicana NOM-006-SSA2-1993).

El tratamiento primario reforzado es el que se aplica a todos los pacientes que hayan abandonado o recaído por segunda ocasión o que se asocien con

inmunodepresión (infección por VIH, diabéticos, con tratamiento inmunodepresor, etc.) y deberá ser administrado en forma supervisada durante 9 meses aproximadamente o hasta completar 144 dosis.

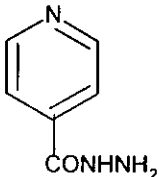
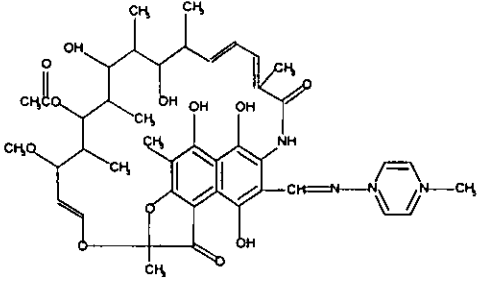
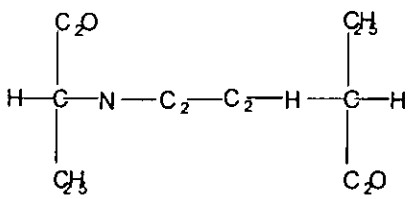
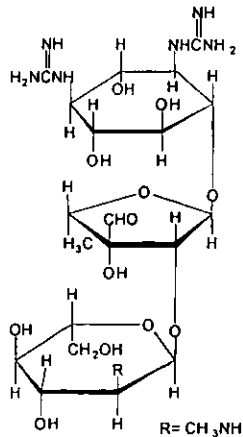
Los enfermos que fracasaron en los tratamientos anteriores fueron multitratados con persistencia de baciloscopía¹ positivas después del tercer mes de tratamiento regular, o con 2 baciloscopías positivas de meses consecutivos. Después de un periodo de baciloscopías negativas de bacilos, deberán confirmarse estos por cultivo, realizarse estudios de sensibilidad a medicamentos y referirse al especialista quien instituirá el esquema de retratamiento (Proyecto de modificación a la Norma Oficial Mexicana NOM-006-SSA2-1993).

El problema de la fármaco-resistencia en la tuberculosis es muy difícil de resolver y requiere mezclas de 5 medicamentos diferentes por un periodo de tratamiento largo (Tabla III). A veces, la intervención quirúrgica es necesaria para remover áreas destruidas del pulmón que son inaccesibles a los fármacos y que han sido muy infectadas por las micobacterias.

Dada la presencia o aparición cada vez más frecuente de cepas fármaco-resistentes de *M. tuberculosis* a los fármacos primarios clásicos o existentes, es necesario y urgente contribuir en la búsqueda de nuevos agentes (Lall *et al*, 1999).

¹Baciloscopía: Estudio microscópico de la secreción bronquial para determinar la eventual presencia del bacilo de la tuberculosis (*Mycobacterium tuberculosis*).

Tabla II. Antifímicos empleados en el tratamiento de la tuberculosis

MEDICAMENTO	MECANISMO DE ACCION
 <p style="text-align: center;">ISONIAZIDA</p>	<p>Inhibe la biosíntesis de ácidos micólicos constituyentes de la pared micobacteriana.</p> <p>La exposición o contacto con el fármaco hace que se pierda el carácter "ácido-resistente" (Mandell y Petri, 1996).</p>
 <p style="text-align: center;">RIFAMPICINA</p>	<p>El RNA micobacteriano se sintetiza sobre un molde de DNA (transcripción del DNA); este proceso se lleva a cabo por la acción de la enzima RNA polimerasa.</p> <p>La rifampicina interactúa específicamente con la subunidad β de la RNA polimerasa y bloquea el proceso de transcripción del DNA micobacteriano (Mandell y Petri, 1996).</p>
 <p style="text-align: center;">ETAMBUTOL</p>	<p>Interactúa con las proteínas EmbCAB codificadas por los genes <i>embC</i>, <i>embA</i> y <i>embB</i>, provocando la inactivación de la síntesis de arabinogalactanos de la pared celular de la micobacteria (Rattan <i>et al</i>, 1998).</p>
 <p style="text-align: center;">ESTREPTOMICINA</p>	<p>Interrumpe la decodificación del aminoacil-tRNA, inhibiendo la traducción del RNA mensajero (Rattan <i>et al</i>, 1998).</p>

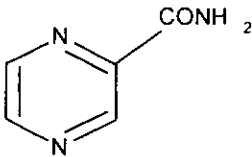
MEDICAMENTO	MECANISMO DE ACCION
 <p>PIRAZINAMIDA</p>	<p>Las enzimas involucradas en la síntesis de nucleótidos de piridina son los probables sitios de acción (Rattan <i>et al</i>, 1998).</p>

Tabla III. Medicamentos empleados en el tratamiento de la Tuberculosis: dosis y reacciones adversas.

Medicamentos	Clave IMSS	Presentación	Dosis máxima/día	Reacciones adversas
Isoniazida (H)	2404	Comp. 100 mg	300 mg	Neuropatía periférica Hepatitis
Rifampicina (R)	2409 2410	Cáp. 300 mg Jarabe 100 mg x 5 ml	600 mg	Hepatitis Hipersensibilidad Interacciones medicamentosas
Pirazinamida (Z)	2413	Comp. 500 mg	1.5-2 g	Gota Hepatitis
Estreptomina (S)	2403	Fco. Ámp. 1 g	1 g	Vértigo Hipoacusia Dermatosis
Etambutol (E)	2405	Comp. 400 mg	1200 mg	Alteración de la visión

1.4. Características morfológicas de *Mycobacterium tuberculosis*

El aspecto habitual del bacilo de la tuberculosis es el de un bastoncillo delgado ligeramente curvo o doblado, con extremidades redondeadas o cónicas. Su tamaño varía entre 0.2 y 0.6 X 1.0 y 10 μm (Figura 2); pueden observarse en cultivos, colonias formando algunas extensiones ramificadas y filamentosas (estructura parecida a una cuerda enredada) (Figura 3), pero suelen fragmentarse en bastoncillos o formas cocobacilares tras la manipulación (Warren y Body, 1996).

Las micobacterias son aerobias, ácido-resistentes y sin motilidad, no producen endosporas, conidios ni micelios aéreos. Aunque consideradas por lo general grampositivas, las micobacterias no se tiñen con la coloración de Gram. La coloración ácido-resistente, efectuada por el procedimiento con carbolfucsina o con la utilización de un fluorocromo, es la preferida para demostrar a los microorganismos por medio de microscopía (Figura 4 y 5) (Warren y Body, 1996).

La pared celular de las micobacterias (Figura 6) es rica en lípidos y está constituida por ácidos grasos α -alquílicos y β -hidroxílicos de peso molecular elevado; se han detectado constituyentes en la pared tales como el factor cuerda, sulfolípidos y micósidos, sustancias que actúan como factores de virulencia de la micobacteria. El factor cuerda, conocido ahora como dimicolato de trehalosa, tiene actividades tóxicas, pero es dudosa su función como factor de virulencia, dado que se encuentra principalmente en micobacterias no patógenas. La presencia de sulfolípidos en las cepas virulentas de *M. tuberculosis* intensifican la toxicidad del factor cuerda. Los micósidos de superficie (glucolípidos y glucopeptilípidos), específicos de cada especie de micobacteria, constituyen una zona transparente a los electrones alrededor de los microorganismos lo cual les confiere protección contra el medio) (Warren y Body, 1996).



Figura 2. Micrografía electrónica de *M. tuberculosis* (tomado de Weidman, 1999).

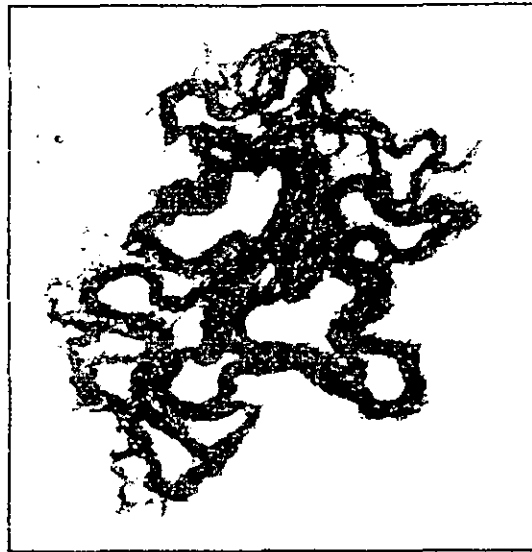


Figura 3. En medio de cultivo líquido, el microorganismo se adhiere, de lado a lado con otros, formando colonias con una estructura parecida a una cuerda enredada. Este fenómeno es característico de *M. tuberculosis* (tomado de Nester *et al*, 1998)



Figura 4. Micobacterias en nódulos linfáticos tuberculosos, teñidas mediante el procedimiento de Kinyoun. Este método se basa en la clásica tinción de carbolfuscina por la cual las micobacterias se tiñen de rojo (tomado de Koneman *et al*, 1988)

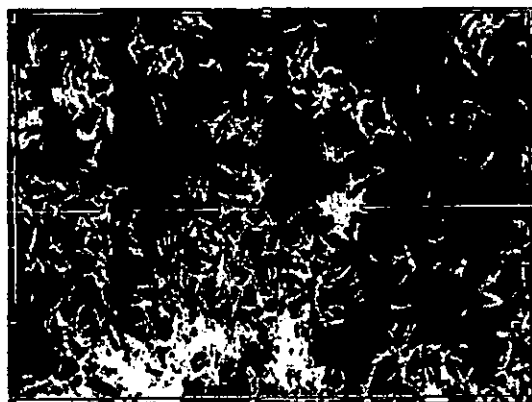


Figura 5. Microorganismos de *M. tuberculosis* teñidos con el fluorocromo auramina (tomado de Nester *et al*, 1998)

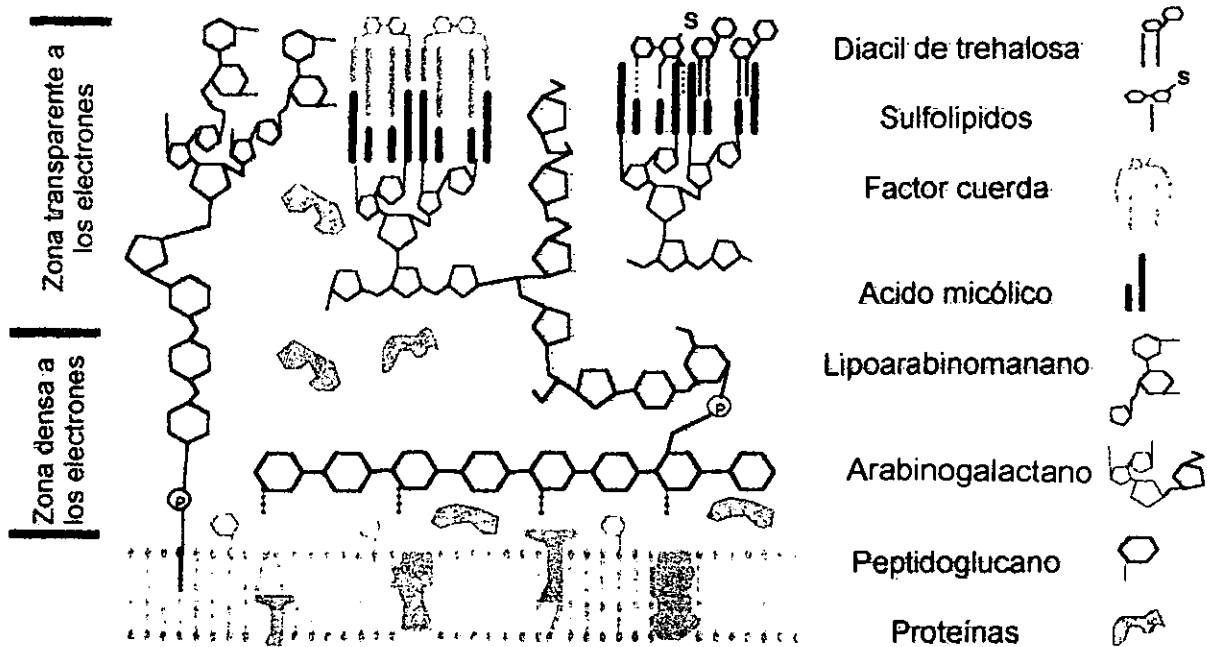


Figura 6. Estructura de la pared celular de *Mycobacterium tuberculosis* (tomado de McNeil et al, 1996)

El lipoarabinomanano (LAM) es otro constituyente de tipo polisacárido de la pared celular que puede actuar como factor de virulencia por sus diversas interacciones comprobadas con el sistema inmunológico del huésped. El LAM de *M. tuberculosis* virulento difiere del LAM de las micobacterias no patógenas, porque se encuentra intensificada su capacidad para estimular la producción del factor alfa de necrosis tumoral (FNT α) en los fagocitos mononucleares y funciona como aceptor de los radicales libres de oxígeno, entre otras propiedades (Ellner, 1996).

1.5. Respuesta inmune y mecanismos de defensa contra *Mycobacterium tuberculosis*

Los leucocitos polimorfonucleares neutrófilos (PMN) y los mononucleares macrófagos (MN), funcionando de manera coordinada, son en general suficientes para destruir a la mayoría de los gérmenes que invaden al organismo (Slots y Taubman, 1992).

Los PMN son más abundantes en sangre, son la primera línea de defensa celular contra microorganismos "sencillos" pero potencialmente patógenos (Slots y Taubman, 1992).

Los microorganismos estructuralmente más complicados, como es *M. tuberculosis*, resisten los efectos bactericidas de los PMN y son entonces recogidos por los macrófagos (Slots y Taubman, 1992).

La infección inicial de la TB, se transmite por el aire dado que *Mycobacterium tuberculosis* no contiene enzimas que le ayuden a penetrar por la mucosa y estos microorganismos deben adherirse a partículas pequeñas (menos de 5 μm) para penetrar a la zona alveolar. Aunque no se conoce la dosis infecciosa mínima de *M. tuberculosis* para los seres humanos, en conejos y cobayos puede bastar de uno a tres microorganismos para provocar la infección; los cuales son ingeridos por macrófagos alveolares y transportados hacia los ganglios linfáticos, ahí están contenidos en tubérculos pequeños: granulomas, que consisten en células epiteloideas, células gigantes y linfocitos (Figura 7). La formación de los granulomas es causada en parte por el factor cuerda (Figura 3 y 6). Con el tiempo, el centro de los tubérculos se necrosa y avanza para formar masas acelulares de restos, como queso, denominados material caseoso. La combinación de una sola lesión en el pulmón, a menudo exactamente por debajo de la pleura y del material caseoso en los ganglios linfáticos bronquiales se denomina complejo de Ghon (Fine, 1994).

La tuberculosis primaria puede seguir dos caminos.

1. En las personas sanas las infecciones provocadas por el bacilo, se curan de forma espontánea y se fibrosan o se calcifican. Estas lesiones en general persisten durante toda la vida y pueden verse años después en las radiografías de tórax como nódulos.
2. En las personas inmunocomprometidas, los microorganismos pueden invadir el torrente circulatorio e invadir cualquier órgano del cuerpo. Esto puede provocar una infección generalizada y potencialmente letal conocida como tuberculosis miliar diseminada (Fine, 1994).

A continuación se describen los procesos por el cual los PMN y MN se encargan de destruir a *M. tuberculosis*.

La fagocitosis es el engullimiento de células y partículas por células del cuerpo humano. Los dos tipos celulares responsables de la fagocitosis en nuestro organismo son los neutrófilos y los macrófagos (Figura 8) (Labro, 1994).

Los macrófagos provienen de la diferenciación de los monocitos de la sangre, y están presentes en todas partes del cuerpo, en el tejido conectivo.

El orden del proceso fagocítico ocurre de la siguiente manera, en cuanto los microorganismos penetran en los tejidos, se genera una reacción inflamatoria localizada por su interacción con los macrófagos residentes, mastocitos y factores humorales (sistema del complemento). Esto da lugar primero a una dilatación de los capilares y a un aumento de la permeabilidad, con la extravasación consiguiente de constituyentes del suero, especialmente de las proteínas del sistema del complemento (Labro, 1994).

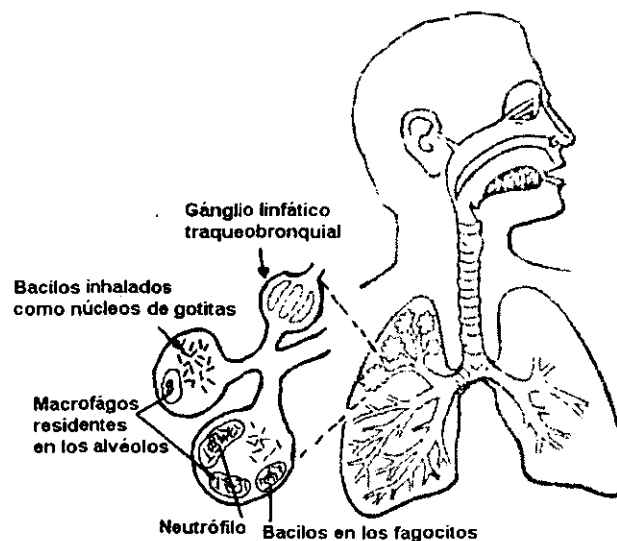


Figura 7. Los bacilos de la tuberculosis ingresan a través de las vías aéreas (Tomado de Spitznagel y Jacobs, 1994)

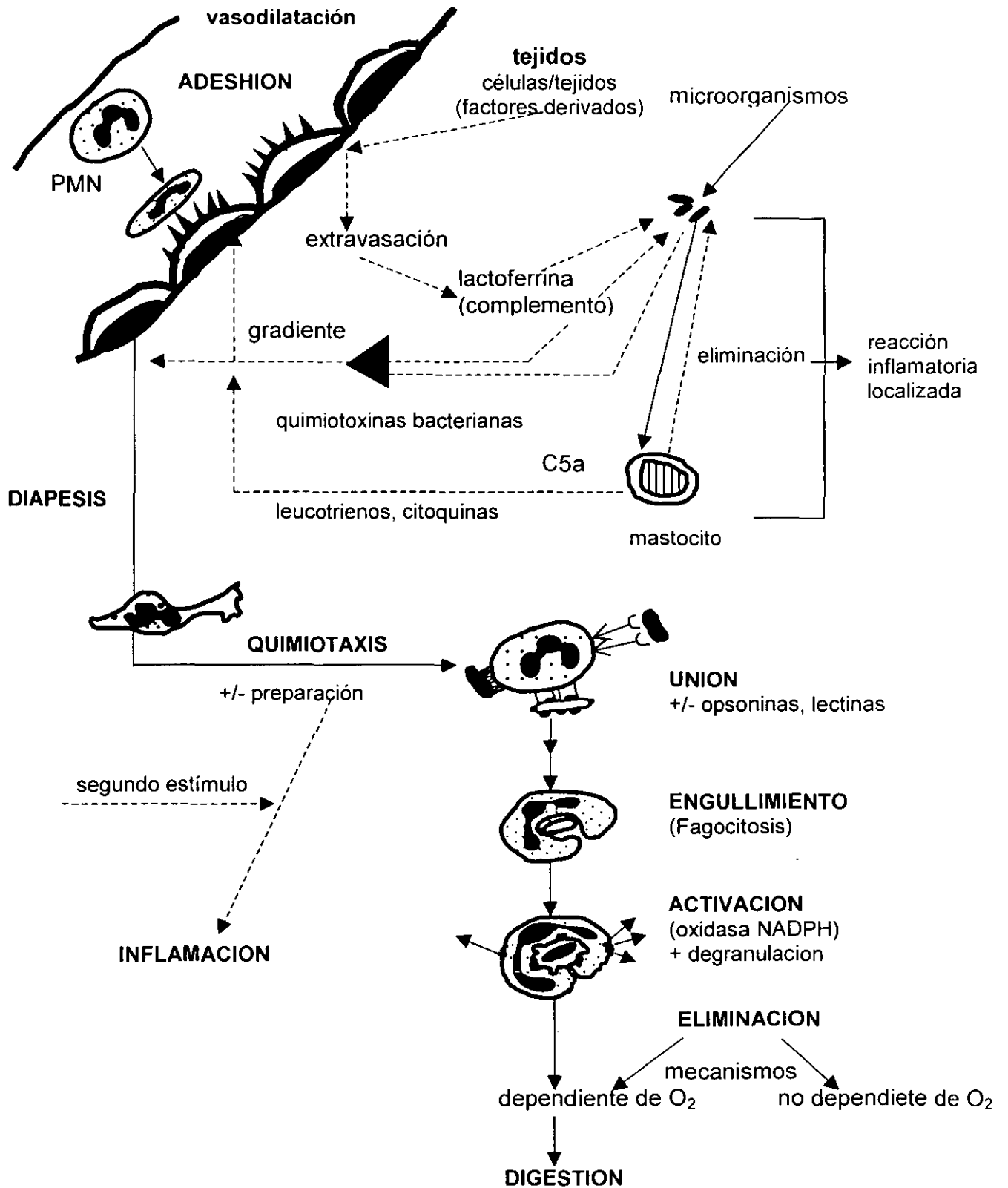


Figura 8. Mecanismos inespecíficos implicados en la inmunidad PMN (Explicación en el texto).

El complemento comprende una serie de proteínas que actúan para eliminar los microorganismos así como otros antígenos de los tejidos y la sangre. Esta labor se consigue o bien por el complemento por sí solo o mediante la colaboración de los componentes del complemento con anticuerpos y/o células que presentan receptores del complemento. Este sistema del complemento incluye cerca de 30 proteínas plasmáticas y de membrana (C3b, B, D, C5a, etc.); el cual tiene dos vías de activación, la clásica mediada por inmunoglobulinas (anticuerpos) y la alternativa que se produce de manera espontánea ante una invasión por microorganismos; además funciona en ausencia de anticuerpos (Labro, 1994).

La activación de la vía alternativa del complemento se inicia por la unión de la C3 a la superficie del microorganismo invasor, y aunado a esto, la hidrólisis del puente tioéster intramolecular de la C3, provocando cambios conformacionales de la C3 (que pasa a una conformación del tipo C3b). La molécula de tipo C3b reacciona con los factores B y D del complemento, para formar una convertasa C3b-Bb que se une a la superficie bacteriana. Las dos convertasas C3 (C4b 2a y C3b Bb) son homólogas y generan múltiples moléculas C3b, las cuales se unen a la superficie bacteriana (opsonización) y son reconocidas por receptores localizados en la membrana del neutrófilo, lo cual favorece la inducción de respuestas celulares como la fagocitosis (Labro, 1994).

Por otra parte el sistema del complemento C5a actúa como agente quimiotáctico para los PMN y los macrófagos, y como desencadenante de la desgranulación de los mastocitos. La lesión del tejido causada por las bacterias, activa el sistema de la coagulación y la formación de fibrina, lo que limita la diseminación bacteriana. Las cininas, los leucotrienos, las prostaglandinas y los productos de la desgranulación de los mastocitos aumentan el flujo sanguíneo en los lechos capilares locales y elevan la permeabilidad capilar, provocando que a continuación los PMN penetren en los tejidos por diapedesis (movilización por medio de la redistribución de sus microfilamentos citoplasmáticos y sus microtúbulos), dirigidos por el gradiente quimiotáctico y migren hacia el punto de la infección (quimiotaxis). El paso siguiente es la unión de los neutrófilos a los microorganismos invasores, que es favorecida por la organización (depósitos de los productos de

fragmentación del complemento C3b y/o inmunoglobulinas). Estas opsoninas son reconocidas por receptores específicos de la membrana del PMN y permiten una estrecha unión del PMN a la bacteria (Labro, 1994).

Después de esta adhesión, las bacterias son engullidas en el interior de una vacuola (fagosoma), la activación del PMN da lugar a la unión de un complejo sistema enzimático (NADPH oxidasa) (Labro, 1994).

Por otra parte los neutrófilos poseen gránulos que son lisosomas especializados, la mayor parte de los gránulos de los neutrófilos son de dos tipos:

1) Los gránulos azurófilos o primarios, contienen lisozima, elastasa, mieloperóxidasa (MPO) y diversas proteínas catiónicas.

2) Los gránulos específicos o secundarios contienen un citocromo, la proteína fijadora de hierro lactoferrina, la cual se une con la vitamina B₁₂ y una colagenasa; capta el hierro disponible e inhibe así el crecimiento de las bacterias, la capacidad de muchas bacterias para crecer depende de la disponibilidad de ese hierro libre (Tristram, 1994)

La fusión de los gránulos del PMN con el fagosoma (que así pasa a denominarse fagolisosoma) expone a la bacteria engullida a los distintos mecanismos líticos divididos en los siguientes grupos:

1) Mecanismos dependientes del oxígeno ó estallido respiratorio (transformación de O₂⁻ en variantes del oxígeno con más potencia de reacción mediante el sistema de la mieloperoxidasa (MPO) liberada a partir de los gránulos azurófilos)

La activación del proceso fagocítico del PMN da lugar a la activación de un complejo sistema enzimático, NADPH oxidasa; el cual se localiza en la membrana plasmática del neutrófilo; esta oxidasa reduce el oxígeno a anión superóxido O₂⁻, generándose radicales hidroxilo (OH[·]), y oxígeno (O₂), todos ellos potencialmente tóxicos. El anión superóxido es transformado en peróxido de hidrógeno (H₂O₂) por la siguiente reacción:



Esta reacción es muy rápida y está catalizada por la superóxido dismutasa; el peróxido de hidrógeno producto de esta reacción y la MPO, la cual se descarga de los gránulos azurófilos del neutrófilo al fagolisosoma, pueden actuar

conjuntamente sobre algunos aminoácidos para generar aldehídos que por su carácter tóxico dañan a la superficie bacteriana. A partir del H_2O_2 , de la MPO y de los haluros Cl^- , Br^- ó I^- , se producen otros oxidantes tóxicos como el hipoclorito (OCl^-), el hipobromito (OBr^-) y el hipoyodito (OI^-), los cuales son los encargados de la destrucción de los microorganismos (Labro, 1994).

2) Mecanismos independientes del oxígeno (lisozima, serprocidinas y lactoferrina). Tras la fusión de los lisosomas se producen cambios transitorios de pH; algunos microorganismos pueden destruirse por esta acidificación, aunque es más probable que tenga lugar al pH óptimo de diversas proteínas bactericidas, como es el caso de las serprocidinas, de tipo catiónico, las cuales son péptidos formados por 32-34 aminoácidos, ricos en cisteína y arginina, que provocan daño en la membrana de los microorganismos (Labro, 1994).

Otra proteína involucrada en este mecanismo de destrucción bacteriana, es la lisozima que hidroliza la pared celular bacteriana (Labro, 1994).

Se ha implicado también a otras diversas sustancias, tales como la lactoferrina, en el proceso destructivo. Esta proteína puede unirse al hierro y hacer a éste no apto para las bacterias, incluso a un pH ácido. Por consiguiente la capacidad de los polimorfos para destruir algunas bacterias se pierde si se produce una sobrecarga de hierro (Labro, 1994).

Tras matar al microorganismo, tiene lugar su digestión por una amplia variedad de enzimas hidrolíticas liberadas a partir de los gránulos.

Los macrófagos muestran una actividad bactericida similar, excepto por el tiempo de su respuesta, que es de horas para los macrófagos en comparación con unos minutos para los PMN (Labro, 1994).

Para que tenga lugar el proceso completo, los fagocitos deben ser totalmente activados por concentraciones óptimas de microorganismos opsonizados o no opsonizados. Sin embargo, antes de que el contacto con su objetivo induzca la activación, están preparados por la quimiotaxis y otras señales responsables de la adhesión al endotelio; esta situación de "pre-activación" se denomina cebado. Si las señales son excesivas, los fagocitos pueden activarse antes de alcanzar su objetivo previsto y liberar sus sustancias destructivas (enzimas y oxidantes) en los

tejidos circundantes, con la consiguiente lesión a las células y tejidos; éste es un mecanismo clave en la reacción inflamatoria excesiva que se asocia a menudo con las enfermedades infecciosas (Labro, 1994).

Mycobacterium tuberculosis es un patógeno facultativo intracelular de los fagocitos mononucleares (macrófagos). El paso inicial después de la entrada de la bacteria en la célula hospedera, es la fagocitosis, un proceso estimulado por interacciones específicas de receptores (Schlesinger *et al*, 1994).

La supervivencia de *M. tuberculosis* dentro del huésped depende de la capacidad del microorganismo para multiplicarse dentro de los macrófagos y los monocitos. La inmunidad del huésped a *M. tuberculosis* depende de que ocurra una respuesta celular antimicobacteriana vigorosa que active los macrófagos para que maten o restrinjan el crecimiento de los microorganismos intracelulares (Walker, 1999).

Al comienzo de la infección los macrófagos son atraídos a cada sitio infectado por generación de los factores quimiotácticos: factor del complemento C5a y proteína quimiotáctica de monocitos (MCP-1). Los linfocitos T son atraídos por la interleucina IL-8. Los macrófagos no estimulados fagocitan las micobacterias, pero no controlan la infección hasta que una respuesta inmunitaria mediada por células específica aparece por primera vez durante la 3ª a 10ª semana. Los macrófagos atraídos por MCP-1 estimula el estallido respiratorio en los macrófagos (Walker, 1999).

El mecanismo antimicobacteriano desencadenado por los macrófagos consisten en la producción de intermediarios reactivos de nitrógeno. La citotoxicidad de los macrófagos activados, se debe en gran medida a su capacidad para metabolizar la L-arginina. El metabolismo de la L-arginina genera óxido nítrico como producto colateral y citrulina como producto principal. En este caso se produce un radical como primer producto libre, el cual después reacciona con oxígeno y agua para generar nuevos intermediarios reactivos. Los intermediarios reactivos del nitrógeno, son productos de la oxidación del nitrógeno del grupo guanido de la L-arginina. Los productos más oxidados del nitrógeno pueden reaccionar con aminas para generar nitrosaminas, los análogos de las cloraminas de la vía de los intermediarios reactivos del oxígeno (Tristram, 1994).

El óxido nítrico y el anión superóxido son los productos de biosíntesis más pequeños que se conocen como moléculas bioactivas. Su tamaño tan pequeño, su lipofilicidad y su reactividad, los convierte en verdaderas balas moleculares capaces de penetrar la fuerte pared lipídica de las micobacterias (Schlesinger, 1994).

Aunado a este mecanismo antimicobacteriano, los linfocitos CD4⁺ se dividen en los fenotipos Th1 y Th2. Las células Th1 secretan interferón- γ e IL-2 en respuesta a estímulos antigénicos específicos, mientras que las células Th2 secretan IL-4, IL5, IL-6 e IL-10, las cuales activan a los linfocitos T y células asesinas (Walker, 1999). Animales infectados por *M. tuberculosis* producen de manera preferencial las colonias de células T de tipo Th1, y la expansión de estas colonias se relaciona con su capacidad para recuperarse de la infección. Además, hay por lo menos dos poblaciones de receptores para células T (TCR). La mayor parte de las células T expresa TCR α/β , pero una porción pequeña de las células T expresa TCR γ/δ . Casi todas las células T γ/δ son CD4⁻/CD8⁻ y son importantes en la recuperación de infecciones intracelulares. En los sujetos infectados con *M. tuberculosis* que no padecen la enfermedad, al parecer se expanden de manera preferencial las colonias de células γ/δ , aunque la respuesta principal de células T consiste de células T α/β (Walker, 1999).

Se sabe que los linfocitos T y las células asesinas naturales son importantes en la recuperación de la infección por *M. tuberculosis* porque matan a los macrófagos y monocitos infectados con el microorganismo (Walker, 1999).

A pesar de los mecanismo de defensa que realizan los PMN y los MN, ante la infección por *M. tuberculosis*, este logra sobrevivir y provocar la enfermedad, esto se debe a los siguientes factores:

1. Algunas cepas virulentas de *M. tuberculosis* (cepa Erdman) contienen en la parte terminal del lipoarabinomano, oligosacáridos de manosa (ManLAM). Algunos estudios han demostrado que ManLAM sirve como ligando a la micobacteria, para adherirse a los macrófagos. La interacción inicial entre ManLAM y los macrófagos involucra la unión a los receptores de manosa (RM).

Las unidades terminales de los manósidos de ManLAM se unen a RM y el C3 secretado por el macrófago puede también servir de sitio de adhesión para LAM. La directa interacción entre ManLaM y CR3 puede ocurrir por la unión de epitopes de carbohidratos a CR3 (Schlesinger, 1994).

2. El LAM puede inmovilizar los mecanismos dependientes del oxígeno, en dos vías: a) LAM atrapa los radicales tóxicos de oxígeno generados durante el estallido respiratorio del fagocito, y b) afecta el estallido oxidativo inhibiendo las enzimas que intervienen en éste.
3. Por otra parte, se sabe que ManLAM no es detectado por el macrófago y que la producción de oxido nítrico disminuye.
4. Muchas de las cepas virulentas de micobacterium tienen el factor cuerda, un glucolípido de trehalosa y ácido micólico que tiene diversas propiedades virulentas (por ejemplo, daña la membrana mitocondrial provocando fallas en la fosforilación oxidativa) (Schlesinger, 1994).
5. Otro factor, son los sulfolípidos que previenen la fusión fagosoma-lisosoma en los macrófagos, y por lo tanto, ayudan al establecimiento del bacilo dentro del macrófago evitando así la exposición ha hidrolasas lisosomales (Walker, 1999)
6. *M. tuberculosis* también posee la capacidad de producir altos niveles de amoníaco. La producción de amoníaco por *M. tuberculosis* puede debilitar la potencia de los mecanismos antimicobacterianos dependientes de L-arginina y de las enzimas lisosómicas, que funcionan mejor a un pH ácido (Chan, 1994). La habilidad de producir cantidades significativas de amoníaco permite al bacilo de la tuberculosis evadir el medio tóxico dentro de la vacuola lisosomal por (a) inhibición de la fusión del fagosoma con el lisosoma y (b) disminución de la actividad catalítica de las enzimas intralisosomales por alcalinización del medio (Chan, 1991).

1.6. Las Plantas Medicinales como fuente potencial de compuestos activos contra *Mycobacterium tuberculosis* y otras especies

La OMS estima que el 80% de la población que vive en países en vías de desarrollo casi exclusivamente emplea la medicina tradicional. Esto quiere decir que cerca de 3300 millones de personas usan plantas medicinales para aliviar algún padecimiento. Sin embargo, las especies vegetales deben ser estudiadas desde el punto de vista químico y biológico para validar su uso en la medicina tradicional (Eloff, 1998).

Los componentes medicinales de las plantas también juegan un papel importante en la medicina clásica occidental. En 1984, al menos el 25% de los fármacos administrados en los Estados Unidos y Canadá, se derivó ó elaboró a partir de productos naturales (Eloff, 1998).

En 1985, Farnsworth y colaboradores identificaron 119 metabolitos secundarios de plantas que son usados mundialmente como fármacos, y los cuales se muestran en la siguiente tabla:

Planta	Metabolito	Acción	Uso Tradicional
<i>Aesculus hippocastanum</i> L. (Sapindaceae)	Aescina (saponina triterpénica)	Antiinflamatorio	Inflamaciones
<i>Nicotiana tabacum</i> L. (Solanaceae)	Nicotina (alcaloide)	Insecticida	Narcótico
<i>Papaver somniferum</i> L. (Papaveraceae)	Morfina (alcaloide)	Analgésico	Analgésico, sedante
<i>Chinchona ledgeriana</i> (Rubiaceae)	Quinina (alcaloide)	Antimalarico, Antipirético.	Malaria

Además, se estima que del 14 al 28% de las plantas superiores, es empleado medicinalmente; y solo el 15% de todas las angiospermas, ha sido investigado químicamente y que el 74% de los componentes farmacológicamente activos de plantas, fue descubierto después de conocer el uso etnomédico de la planta (Eloff, 1998).

La herbolaria, nombre con el que se conoce a la práctica terapéutica que utiliza plantas medicinales, continúa vigente y tiene gran arraigo en nuestro país. Las plantas medicinales aún constituyen el recurso mas conocido y accesible para grandes núcleos de la población mexicana. La OMS reconoce el valor de esta práctica terapéutica y le otorga gran importancia en los esquemas o sistemas públicos para la salud (Huerta, 1999).

La extraordinaria riqueza florística de México (26500 especies conocidas, de las cuales aproximadamente 9500 son endémicas), lo ubica en el cuarto lugar mundial, y ha sido uno de los factores determinantes para que la herbolaria floreciera desde la época prehispánica. Además, buena parte de esos conocimientos prehispánicos han perdurado en invaluable documentos, como el Códice de la Cruz-Badiano (Libellus de Medicinalibus Indorum Herbis, de 1552), que fue dictado en náhuatl por el médico indígena Martín de la Cruz, traducido al latín por Juan Badiano e ilustrado con dibujos de las plantas en un estilo típicamente indígena. Estos conocimientos empíricos han sido transmitidos durante siglos por los indígenas que integran 56 grupos étnicos y que continúan siendo los depositarios de este legado. El rescate y la validación de estos conocimientos y recursos biológicos son recientes, pues datan apenas de hace 25 años (Huerta, 1999).

Actualmente se han registrado en México alrededor de 4000 especies con atributos medicinales, es decir el 15% de la flora total conocida (Huerta, 1999). Este número coincide con lo informado en varias regiones del mundo por especialistas en la materia, quienes consideran que una de cada siete especies posee alguna propiedad curativa. Sin embargo, se calcula que en México, y en todo el mundo, la validación química farmacológica y biomédica sólo se ha llevado a cabo en 5% de estas especies (Huerta, 1999)

Al presentarse un resurgimiento de enfermedades que se creían erradicadas (malaria, parasitosis diversas, tuberculosis, etc.), así como la creciente incidencia de cáncer y la aparición del mortal VIH, se ha considerado necesario y urgente intensificar la búsqueda de nuevas sustancias, particularmente en las plantas de las que se tienen pruebas de sus virtudes medicinales (Huerta, 1999).

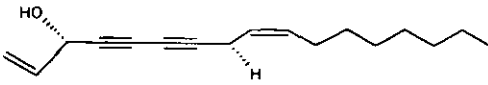
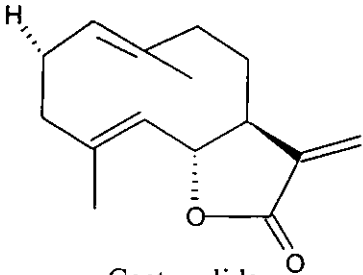
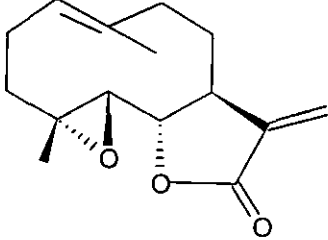
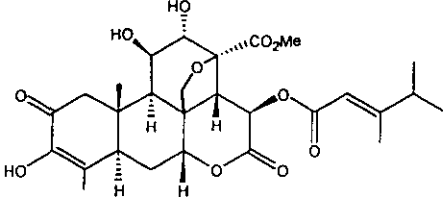
La búsqueda de agentes antimicobacterianos se ha concentrado en los últimos años en plantas superiores, dada su capacidad de biosintetizar numerosos compuestos, los cuales pueden proporcionar nuevas estructuras moleculares. (Huerta, 1999)

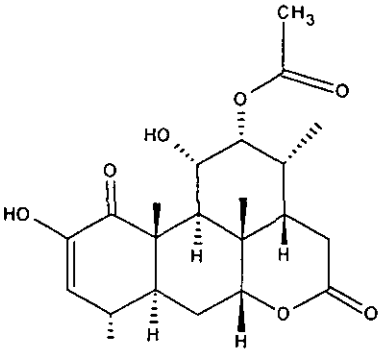
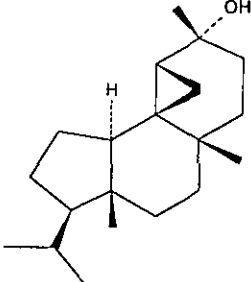
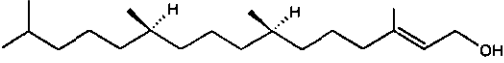
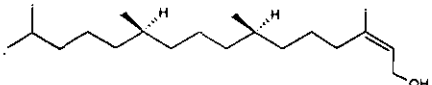
Diversas investigaciones encaminadas a explorar el efecto biológico de extractos de plantas sobre diferentes cepas de micobacterias, han permitido encontrar que, varias especies vegetales presentan actividad inhibitoria sobre el crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis*, así como de otras especies de este mismo género (McCutcheon *et al*, 1992 y Fischer *et al*, 1998).

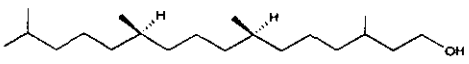
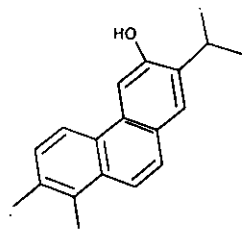
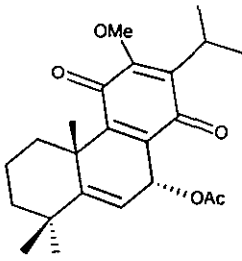
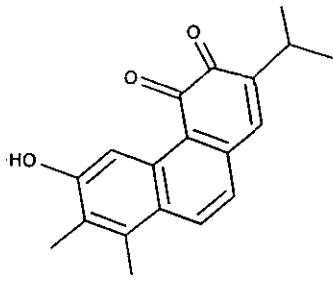
Diferentes grupos de investigadores están enfocados a la búsqueda de nuevos compuestos de origen vegetal con actividad antituberculosa, (Tabla IV), estas investigaciones, que se encuentran en etapas de estudio preliminares, y permitirán en un futuro el diseño de nuevas moléculas más selectivas y específicas capaces de inhibir el crecimiento de las micobacterias.

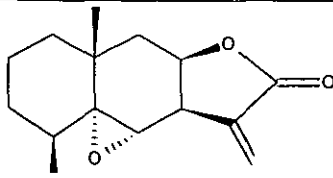
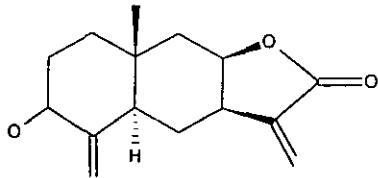
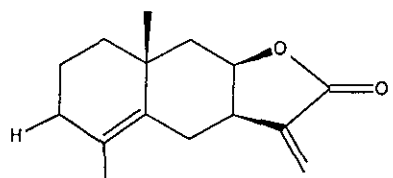
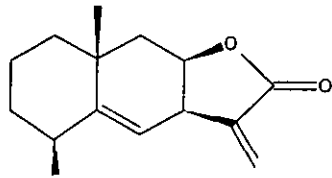
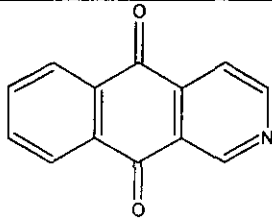
Por otro lado, los metabolitos secundarios de las plantas pueden actuar como agentes inmunomoduladores de la respuesta inmune ante una infección por microorganismos, como se mencionó anteriormente (Huerta, 1999).

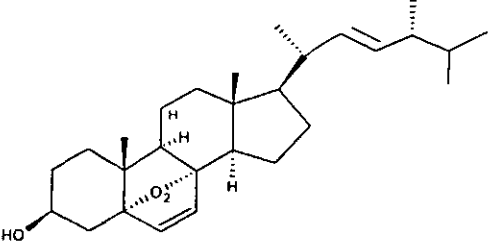
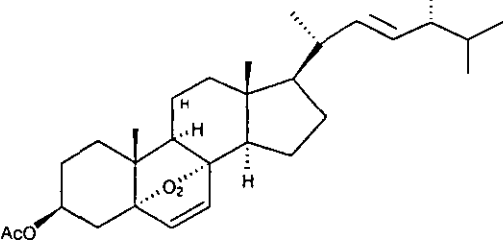
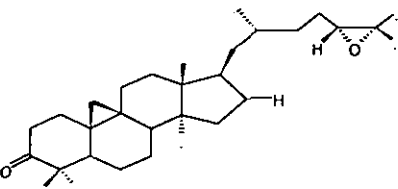
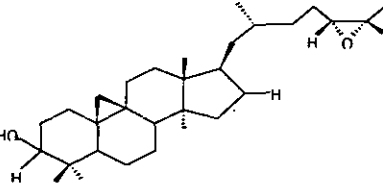
Tabla IV. Metabolitos secundarios con propiedades antimicobacterianas aislados de plantas medicinales.

METABOLITO SECUNDARIO	MYCOBACTERIA	REFERENCIA
 <p>Falcarinol <i>Oplopanax horridus</i> (Araliaceae)</p>	<p><i>M. tuberculosis</i> (Cepa Erdman, Colección Mycobacteriana Trudeau (T.M.C. 107) CMI 20 µg/disco <i>M. avium</i> (T.M.C. 724) CMI 20 µg/disco</p>	<p>Kobaisy <i>et al</i>, 1997</p>
 <p>Costunolida <i>Magnolia grandiflora</i> (Magnoliaceae)</p>	<p><i>M. tuberculosis</i> H37Rv CMI 32 µg/mL <i>M. avium</i> ATCC25291 CMI 128 µg/mL</p>	<p>Fischer <i>et al</i>, 1998</p>
 <p>Partenolida <i>Magnolia grandiflora</i> (Magnoliaceae)</p>	<p><i>M. tuberculosis</i> H37Rv CMI 16 µg/mL <i>M. avium</i> ATCC25291 CMI 64 µg/mL</p>	<p>Fischer <i>et al</i>, 1998</p>
 <p>Bruceantina <i>Brucea antidysenterica</i> (Simaroubaceae)</p>	<p><i>M. tuberculosis</i> H37Rv 9% de inhibición a 12.5 µg/mL</p>	<p>Rahman <i>et al</i> 1997</p>

METABOLITO SECUNDARIO	MYCOBACTERIA	REFERENCIA
 <p data-bbox="167 658 641 731">Shinjulactona-K <i>Ailanthus altissima</i> (Simaroubaceae)</p>	<p data-bbox="715 447 1011 551"><i>M. tuberculosis</i> H37Rv 9% de inhibición a 12.5 µg/mL</p>	<p data-bbox="1032 499 1271 530">Rahman <i>et al</i> 1997</p>
 <p data-bbox="187 1131 616 1203">9,12-Ciclomulin-13-ol <i>Azorella madreporica</i> (Apiaceae)</p>	<p data-bbox="715 934 1011 1038"><i>M. tuberculosis</i> H37Rv ATCC 27294 CMI 16 µg/mL</p>	<p data-bbox="1032 986 1286 1017">Wächter, <i>et al</i>, 1998</p>
 <p data-bbox="205 1384 595 1456">(E)-Fitol <i>Leucas volkensis</i> (Lamiaceae)</p>	<p data-bbox="715 1342 1011 1415"><i>M. tuberculosis</i> H37Rv CMI 2 µg/mL</p>	<p data-bbox="1032 1363 1256 1394">Rajab, <i>et al</i>, 1998</p>
 <p data-bbox="205 1670 595 1742">(Z)-Fitol <i>Leucas volkensis</i> (Lamiaceae)</p>	<p data-bbox="715 1628 1011 1701"><i>M. tuberculosis</i> H37Rv CMI 2 µg/mL</p>	<p data-bbox="1032 1649 1256 1680">Rajab, <i>et al</i>, 1998</p>

METABOLITO SECUNDARIO	MYCOBACTERIA	REFERENCIA
 <p>(3R,S,7R,11R)-Fitanol <i>Leucas volkensis</i> (Lamiaceae)</p>	<p><i>M. tuberculosis</i> H37Rv CMI 2 µg/mL</p>	<p>Rajab <i>et al</i>, 1998</p>
 <p>12-dimetilmulticaulina <i>Salvia multicaulis</i> (Lamiaceae)</p>	<p><i>M. tuberculosis</i> H37Rv CMI 0.46 µg/mL</p>	<p>Ulubelen <i>et al</i>, 1997</p>
 <p>12-metil-5-dehidroacetilhorminona <i>Salvia multicaulis</i> (Lamiaceae)</p>	<p><i>M. tuberculosis</i> H37Rv CMI 0.89 µg/mL</p>	<p>Ulubelen <i>et al</i>, 1997</p>
 <p>12-dimetilmultiortoquinona <i>Salvia multicaulis</i> (Lamiaceae)</p>	<p><i>M. tuberculosis</i> H37Rv CMI 1.2 µg/mL</p>	<p>Ulubelen <i>et al</i>, 1997</p>

METABOLITO SECUNDARIO	MYCOBACTERIA	REFERENCIA
 <p>5 α-epoxialantolactona <i>Montanoa speciosa</i> (Asteraceae)</p>	<p><i>M. tuberculosis</i> H37Rv CMI 8 $\mu\text{g/mL}$</p>	<p>Cantrell <i>et al</i>, 1999</p>
 <p>Encelin <i>Montanoa speciosa</i> (Asteraceae)</p>	<p><i>M. tuberculosis</i> H37Rv CMI 16 $\mu\text{g/mL}$</p>	<p>Cantrell <i>et al</i>, 1999</p>
 <p>Alloalantolactona <i>Rudbeckia subtomentosa</i> (Asteraceae)</p>	<p><i>M. tuberculosis</i> H37Rv CMI 32 $\mu\text{g/mL}$</p>	<p>Cantrell <i>et al</i>, 1999</p>
 <p>Alantolactona <i>Inula helenium</i> (Asteraceae)</p>	<p><i>M. tuberculosis</i> H37Rv CMI 32 $\mu\text{g/mL}$</p>	<p>Cantrell <i>et al</i>, 1999</p>
 <p>Ben[γ]isoquinolina-5,10-dione <i>Mitracarpus scaber</i> (Rutacea)</p>	<p><i>M. intracellulare</i> ATTC 23068 CMI 6.25 $\mu\text{g/mL}$</p>	<p>Okunade <i>et al</i>, 1999</p>

METABOLITO SECUNDARIO	MYCOBACTERIA	REFERENCIA
 <p>Ergosterol-5,8-endoperoxido <i>Ajuga remota</i> (Lamiaceae)</p>	<p><i>M. tuberculosis</i> H37Rv CMI 1 µg/mL</p>	<p>Cantrell <i>et al</i>, 1999</p>
 <p>Ergosterol-5,8-endoperoxido acetato <i>Ajuga remota</i> (Lamiaceae)</p>	<p><i>M. tuberculosis</i> H37Rv CMI 1 µg/mL</p>	<p>Cantrell <i>et al</i>, 1999</p>
 <p>(24R)-24,25-Epoxicicloartan-3-ona <i>Borrchia frutescens</i> (Asteraceae)</p>	<p><i>M. tuberculosis</i> H37Rv CMI 8 µg/mL</p>	<p>Cantrell <i>et al</i>, 1996</p>
 <p>(3β,24R)-24,25-Epoxicicloartan-3-ol <i>Borrchia frutescens</i> (Asteraceae)</p>	<p><i>M. tuberculosis</i> H37Rv CMI 8 µg/mL</p>	<p>Cantrell <i>et al</i>, 1996</p>

1.6.1. Métodos para la determinación de la susceptibilidad de diferentes cepas de *Mycobacterium* a diversos agentes antimicobacterianos

Existen diferentes técnicas que permiten el estudio de diferentes agentes antifímicos sobre el género *Mycobacterium*, de los cuales destacan:

a) Métodos de las proporciones: implica la inoculación de cantidades iguales de diferentes diluciones de un inóculo estándar de un aislado clínico de *Mycobacterium tuberculosis* sobre un medio de agar con o sin fármaco y requiere de un periodo de incubación de tres semanas. El crecimiento de la colonia micobacteriana en la ausencia y presencia de fármacos, es comparado y expresado en la forma de porcentaje. Si el crecimiento a cierta concentración "crítica" de un fármaco es $>1\%$, el aislado es considerado "clínicamente resistente". El método de las proporciones suministra resultados precisos y reproducibles para probar la actividad antimicobacteriana de los agentes primarios (H, R, Z, S y E) y secundarios (ciprofloxacina, ofloxacina, cicloserina, capreomicina, kanamicina, entre otras) (Inderlied, 1994).

b) Método radiométrico (BACTEC): se utiliza para la detección del crecimiento de micobacterias y utiliza un intermediario metabólico marcado ^{14}C (ácido palmítico- $1-^{14}\text{C}$). El hallazgo de $^{14}\text{CO}_2$ libre por encima de la fase líquida del cultivo en un sistema de cámara iónica automatizada (BACTEC®, Johnson Laboratories, Towson, MD) indica metabolismo activo y crecimiento de las micobacterias. Por el contrario, la falta $^{14}\text{CO}_2$ en un frasco-ampolla de metabolitos marcados con ^{14}C y de micobacterias viables indica la inhibición del crecimiento por algunos agentes, como fármacos antimicobacterianos (Konerman *et al*, 1988).

c) Método colorimétrico que utiliza el 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil bromuro de tetrazolio (MTT): el MTT es una sal de tetrazolio amarilla que se convierte a formazán, dando una coloración azul por acción de las deshidrogenasas de células vivas. Este ensayo se basa en la cantidad de formazán producido que es directamente proporcional al número de células vivas, en este caso, de micobacterias, y el periodo de incubación es de 8 días. Este método ha sido utilizado en pruebas de susceptibilidad del complejo *M. avium* y *M. tuberculosis*

con fármacos como la rifampicina y clofazimina (Gomez-Flores, *et al*, 1995 y Abate *et al.*, 1998).

d) Micrométodo colorimétrico de Alamar azul: En este ensayo se emplea un colorante que se utiliza comúnmente para determinar viabilidad celular, la resazurina, la cual funciona como indicador de una reacción de óxido reducción; donde este colorante en ausencia de metabolismo celular, en este caso bacteriano; presenta una coloración azul (oxidado) y en presencia de actividad metabólica, específicamente por la actividad enzimática de deshidrogenasas, cambia a un color rosa (reducido), este colorante es utilizado para determinar concentraciones mínimas inhibitorias para aislados de 14 días de *M. tuberculosis* en presencia de agentes antimicobacterianos primarios ó secundarios. Este método es económico, rápido y no utiliza radioactividad (Yakjo *et al*, 1995).

1.7. Importancia de sustancias inmunomoduladoras de origen vegetal

Los diferentes mecanismos de protección bacteriana desarrollados por *M. tuberculosis*, provocan que la eliminación de este patógeno no sea fácil, aunado a esto, la presencia de enfermedades que afectan el sistema inmunológico como SIDA, alcoholismo, diabetes, etc., provoca que la tuberculosis sea una enfermedad difícil de erradicar. Ante esta situación es necesaria la búsqueda de sustancias inmunomoduladoras de origen vegetal, para tratar de mejorar el sistema inmunológico ante este tipo de padecimientos.

Las sustancias inmunomoduladoras son aquellas capaces de provocar un efecto farmacológico sobre la respuesta humoral o celular del sistema inmune en los seres humanos, estas sustancias se pueden obtener a partir de microorganismos (Alurkar, 1997; Nachbaur, 1997 y Ounis, 1992), por síntesis química (Diasio y LoBuglio, 1996), de plantas (Labadie *et al*, 1989; Labadie, 1993 y Wagner y Proksch, 1995) y de animales (Wagner y Proksch, 1995). El efecto puede ser específico o no específico y cada factor, así como cada sistema funcional involucrado en la respuesta inmune, puede ser influenciado por varias vías

(Labadie, 1993), además, los inmunomoduladores pueden inducir una respuesta positiva (estimuladora) o negativa (supresora).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha descrito las características para las sustancias inmunomoduladoras:

- 1) Que los compuestos sean químicamente puros.
- 2) Que su degradación biológica sea rápida.
- 3) Que no sean carcinogénicos o cocarcinogénicos.
- 4) Que no tengan toxicidad aguda o crónica.
- 5) Que no presenten efectos farmacológicos adversos.
- 6) No deben presentar un efecto extremo como inmunomoduladores.
- 7) No deben causar efectos en cascada, es decir, sólo deben influenciar una parte del sistema inmune (Bauer, 1999).

En la respuesta del sistema inmune inespecífico, participan principalmente los fagocitos (granulocitos, macrófagos y monocitos), diferentes factores tales como el sistema del complemento y citocinas. Este sistema inespecífico, no posee un efecto de memoria y está involucrado en el mecanismo de la primera línea de defensa que ocurre después de la infección. En contraste, el sistema inmune específico requiere de varios días para activarse (Figura 9) (Bauer, 1999).

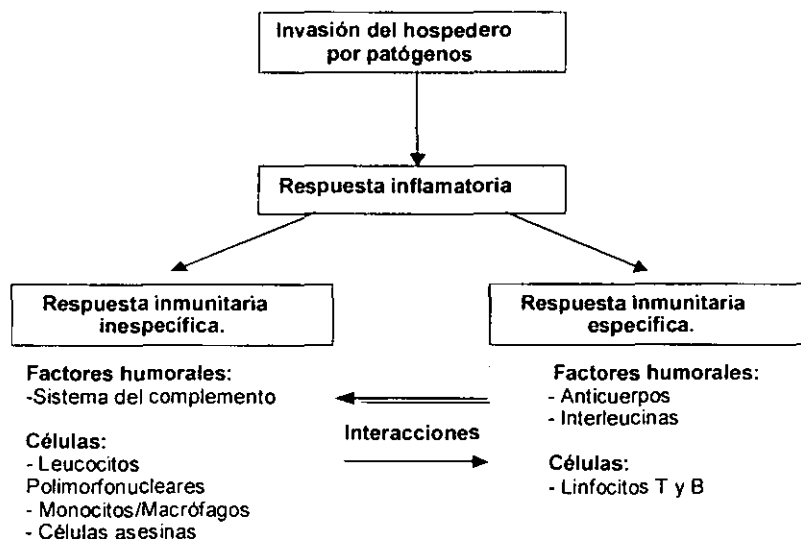


Figura 9. Composición del sistema inmunitario humano (Labadie *et al*, 1989)

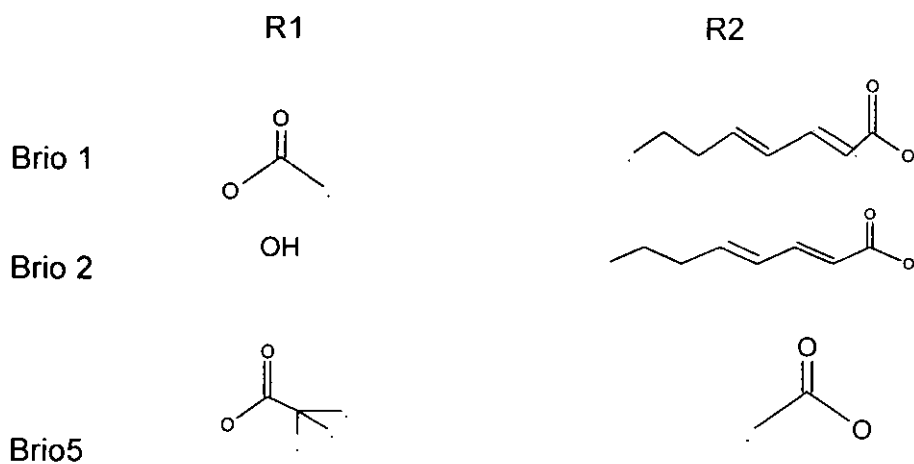
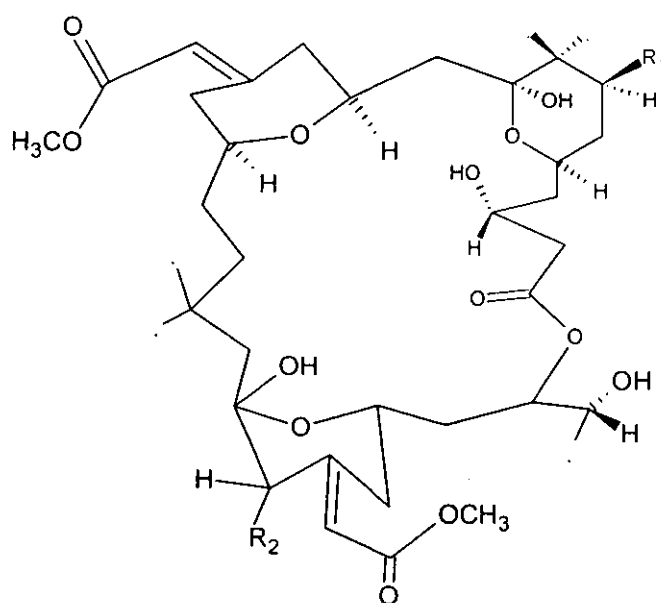
En la actualidad los inmunomoduladores de origen vegetal pueden emplearse de manera profiláctica o terapéutica y pueden ser aplicados a bajas dosis para obtener el efecto óptimo ya que estimulan temporalmente el sistema inmune deprimido y tienen una influencia primaria sobre los mecanismos de defensa inespecíficos (Wagner y Proksch, 1985).

El criterio de selección etnobotánico para la selección de especies vegetales, como candidatos para obtener compuestos con actividad inmunomoduladora, es el uso de éstas en la medicina tradicional, para el tratamiento de: asma, artritis, fiebre, bronquitis, enfermedades de tipo viral, helmintiasis, inflamaciones, erupciones de la piel y aquellos empleados en procesos infecciosos (Rezaeipoor *et al*, 1999; Benencia *et al*, 1995; Van der Nat *et al*, 1987).

Investigaciones preliminares han reportado que diferentes especies han mostrado una importante actividad inmunomoduladora, entre ellas tenemos a: *Melia azedarach*, (Meliaceae) (Courrégés *et al*, 1994), *Cedrela tubiflora* (Meliaceae) (Benencia *et al*, 1995), *Azadirachta indica* (Meliaceae) (Van der Nat *et al*, 1987), *Achillea talagonica* (Asteraceae) (Rezaeipoor, 1999), *Echinacea purpurea* (Asteraceae) (Wagner y Proksch, 1995), *Ulmus doidiana* (Ulmaceae) (Jun *et al*, 1998) y *Uncaria tomentosa* (Rubiaceae) (Lemaire *et al*, 1999). Todas ellas influyen sobre las funciones del sistema inmune como la: fagocitosis, proliferación de linfocitos T, liberación de citocinas (interferones, interleucinas, factor de necrosis tumoral) y activación ó inhibición del complemento.

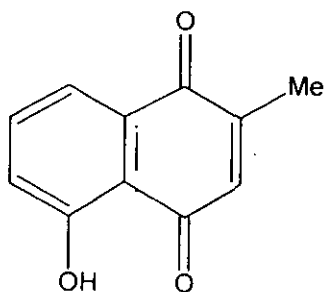
Los compuestos obtenidos que se han reportado con actividad inmunomoduladora se clasifican en dos clases (Wagner y Proksch, 1995); las estructuras de éstos compuestos se presentan en la figura 10.

1. Compuestos de bajo peso molecular, como: alcaloides (isoterpodina); terpenoides, quinonas (plumbagina); lactonas macrocíclicas (briostatinas) y compuestos fenólicos (ácido cicórico)
2. Compuestos de alto peso molecular: principalmente polisacáridos (pectinas) y glicoproteínas (lectinas).

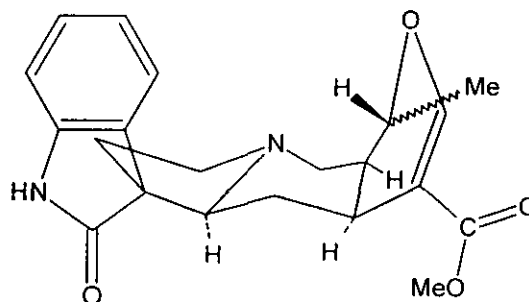


Briostatina
Bugula neritina (Bugulidae)

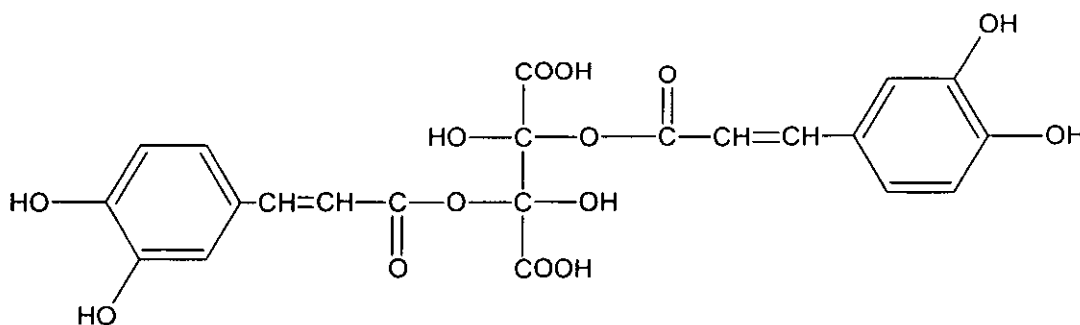
Figura 10. Compuestos con actividad inmunomoduladora (Wagner y Proksch, 1995).



Plumbagina
Plumbago ceylanicum
(Plumbaginaceae)



Isopterpodina
Uncaria tomentosa
(Rubiaceae)



Acido cicórico
Echinacea purpurea
(Asteraceae)

Figura 10. Compuestos con actividad inmunomoduladora (continuación).

1.7.1. Métodos de estudio para la búsqueda de compuestos inmunomoduladores

En la literatura científica se describen diferentes pruebas para la determinación del potencial inmunomodulador de distintas sustancias de origen vegetal, de las cuales se mencionan las dos más comunes:

1) La prueba más importante entre la variedad de ensayos inmunológicos disponibles en la actualidad, es aquella que permite la determinación del estado funcional y la eficiencia del sistema fagocítico mononuclear (Wagner y Proksch, 1985).

2) En segundo lugar están las pruebas que miden el efecto de los compuestos sobre las poblaciones celulares de linfocitos T, de las cuales describimos a continuación:

a. La prueba de aclaramiento de carbón coloidal: en esta técnica se determina la velocidad con respecto al tiempo de eliminación de partículas de carbón administradas intraperitonealmente, en animales experimentales (ratas) a los cuales se les había aplicado previamente algún fármaco. Esto es para determinar el efecto del fármaco sobre el proceso de fagocitosis de neutrófilos *in vivo*. En humanos, se utilizan emulsiones de soya (Lipofundina). Después de inyectar al animal el carbón coloidal, se deja transcurrir varios minutos (5, 10, 15, 20, etc.), procediéndose a recolectar muestras de sangre en cada uno de estos tiempos, y se hacen lecturas de cada una de éstas en el espectrofotómetro a 650 nm. Estas lecturas se comparan con las de otro animal tratado con fármaco y un animal sin haber tenido ningún tratamiento (Wagner y Proksch, 1985).

b. Otro modelo es el índice fagocítico: la actividad se determina *in vitro*, usando partículas de levadura opsonizadas y una fracción granulocítica derivada del suero humano. El método de bioluminescencia desarrollado más recientemente también usa granulocitos o macrófagos. Esta técnica determina

las cantidades de O_2 y H_2O_2 liberados durante la fagocitosis en presencia de partículas de zymosan (Wagner y Proksch, 1985).

- c. Inhibición de la migración de macrófagos: la cual mide la migración de los macrófagos y su inhibición en la presencia de un antígeno (por ejemplo, tuberculina). La inhibición del factor de la migración liberado por linfocitos activados, atrae a los macrófagos y éstos permanecen en los sitios de reacción (Wagner y Proksch, 1985).
- d. Transformación de linfocitos T: esta técnica indica el grado de blastogénesis de linfocitos T después de estar en contacto con el mitógeno. La velocidad de estimulación es medida por la incorporación de timidina [3H] en los linfocitos T, utilizando fitohemaglutinina como mitógeno control. Usando anticuerpos monoclonales e identificando células marcadas por fluorescencia, esto hace posible el monitoreo de subpoblaciones de linfocitos T (subgrupos) [Ly 1^+ , 2^- (células helper) y Ly 1^- , 2^+ , 3^+ (asesinas/células supresoras)]. Solo este tipo de mediciones permite la predicción de si una sustancia muestra predominantemente una actividad de estimulación o supresión, y de como la sustancia puede ser aplicada terapéuticamente (Wagner y Proksch, 1985).

2. GENERALIDADES DE *Achillea millefolium* L. (Asteraceae)

Los nombres comunes para *A. millefolium* son: milenrama, ciento en rama, mil en rama plumajillo, plumajo, plumilla, y real de oro; en Chiapas se le nombra como hecosh o necotes, (Aguilar-Contreras *et al*, 1998)

La planta pertenece a un conjunto de especies citogenética y químicamente polimórficas nativas de Europa, Asia Septentrional y América del Norte (Bisset, 1994).

A. millefolium se distribuye en Baja California, Chiapas, Distrito Federal, Durango, Estado de México, Hidalgo, Oaxaca, Puebla y Veracruz (Aguilar-Contreras *et al*, 1998).

En México se usa en el tratamiento del dolor de oído, en el cual se colocan externamente las hojas alrededor de la oreja (Aguilar-Contreras *et al*, 1998), en padecimientos como la tos, tos con flemas, tosferina, desordenes menstruales y afecciones gastrointestinales (Aguilar-Contreras *et al*, 1994).

2.1. Características botánicas

A. millefolium es una planta (Figura 11) perenne con rizomas horizontales, tallo simple vellosos de 30 a 90 cm de alto, hojas alternas, lineares-lanceoladas y pinnadas; el peciolo tiene una base dilatada, los últimos segmentos son lineares y generalmente con una punta cerdosa; la cima está compuesta en su mayor parte de una corona plana; tiene un conjunto de brácteas de forma ovoide de cerca de 5 mm de alto y radios de 4 a 6, pétalos de color blanco o rosa y bastantes aquenios (semillas) lineares (Hall, 1907).

2.2. Actividad Biológica

La revisión bibliográfica realizada sobre esta especie ha permitido encontrar que la planta ha sido objeto de diversas investigaciones las cuales se mencionan a continuación:

- 1- Actividad repelente contra el mosquito *Aedes aegypti* L. (Tunon *et al*, 1994).
- 2- Actividad antibacteriana contra *Escherichia coli*, *Mycobacter phlei*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* (McCutcheon *et al*, 1992).
- 3- Actividad antitumoral en células de ratón con leucemia P-388 *in vivo* (Tozyo *et al*, 1994)
- 4- Actividad antiinflamatoria, reducción de edema de la oreja derecha de ratón, inducido por aceite de croton (Zidorn *et al*, 1999).

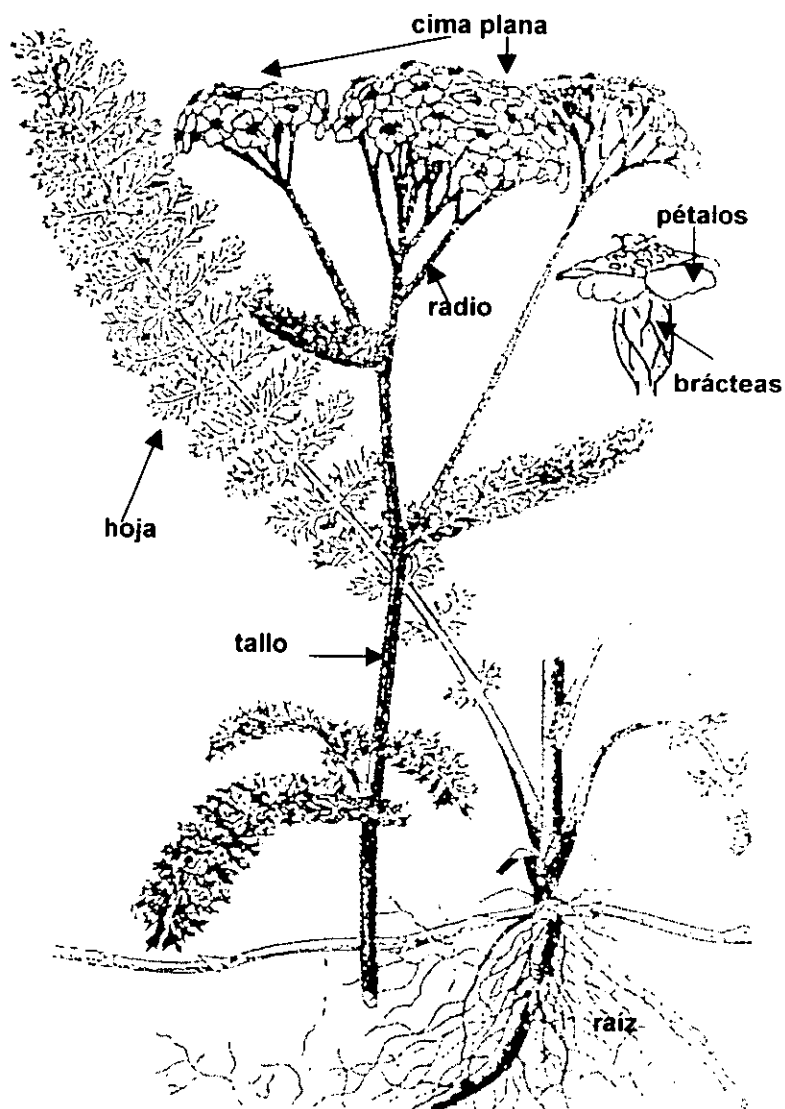


Figura 11. Especimen de *Achillea millefolium* L.

2.3. Estudios químicos

En las partes aéreas de la planta se han detectado diversos compuestos como: 1) terpenoides: azuleno, camazuleno; 2) lactonas sesquiterpénicas: achillicina, achillina, leucodina, matricarina, desacetilmatricarina, austricina, millefina, 3-oxa-achillicina, achillicina-8 α -acetoxi-artabsina, 8-angeloil egelolide (Kastner *et al*, 1994 y Romo de Vivar y Olmos, 1968); 3); sesquiterpenoides: ácido achimillico a, b y c (Tozyo *et al*, 1994) y 4); flavonoides: apigenina, artemetina, casticina, 5-hidroxi-3,6,7,4'-tetrametoxiflavona, luteolina, quercetina (Chandler *et al*, 1982) (Figura 12).

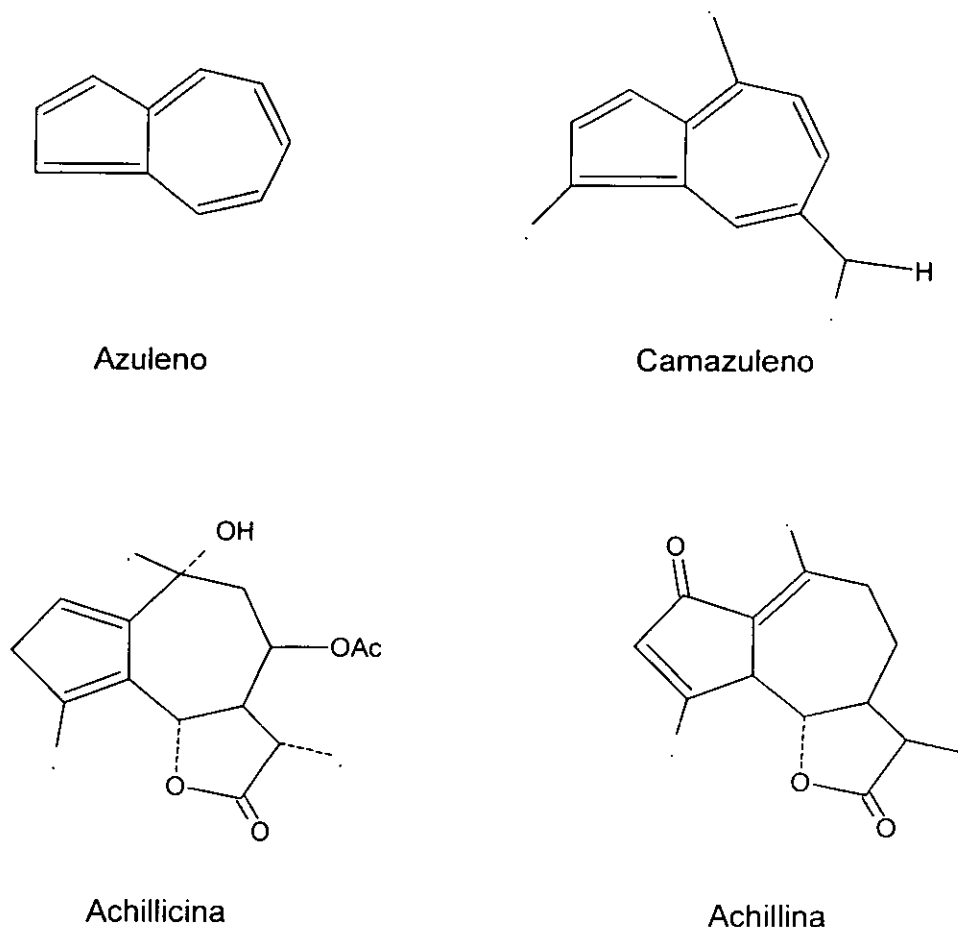
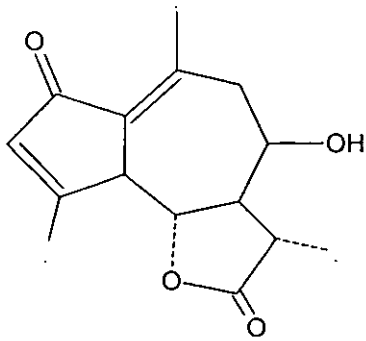
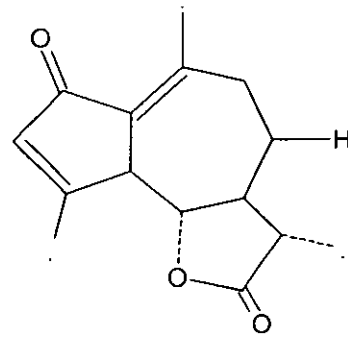


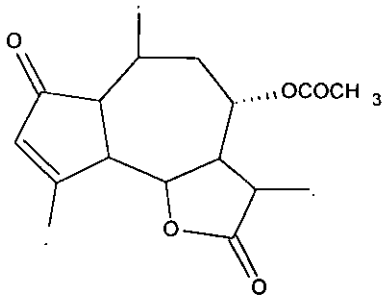
Figura 12. Metabolitos secundarios aislados de *Achillea millefolium* L.



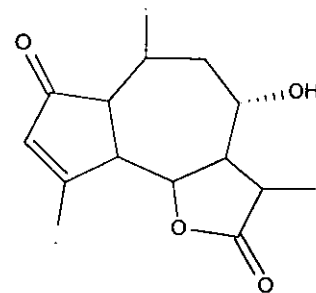
Austricina



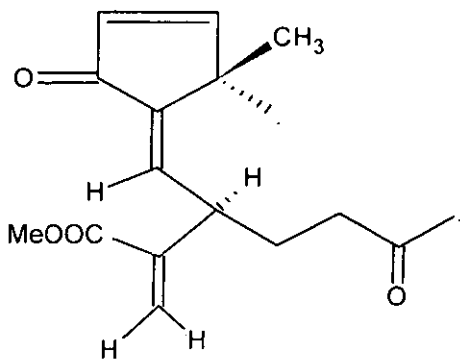
Leucodina



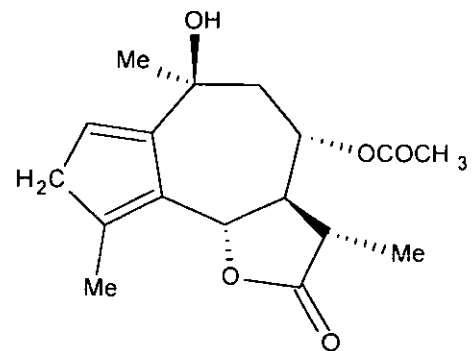
Matricarina



Desacetilmatricarina

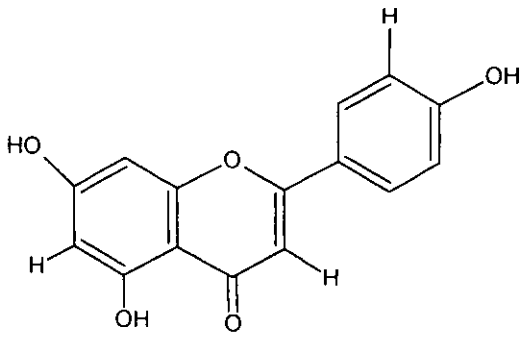


Acido achimillico A

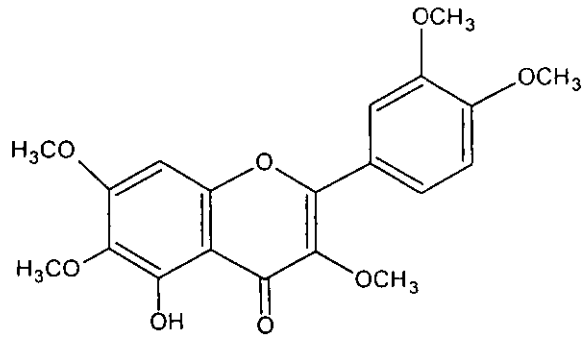


Achillicina-8α-acetoxi-artabsina

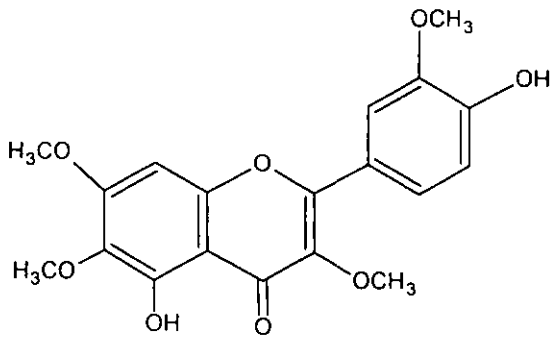
Figura 12. Metabolitos secundarios aislados de *Achillea millefolium* L.
(continuación).



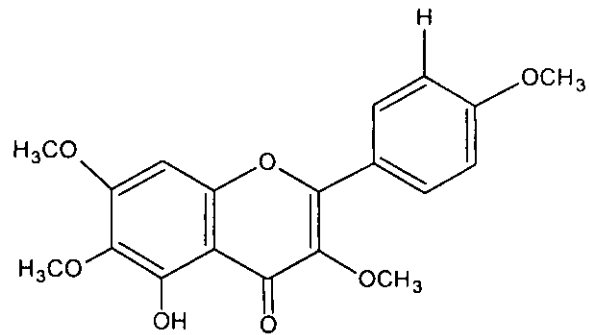
Apigenina



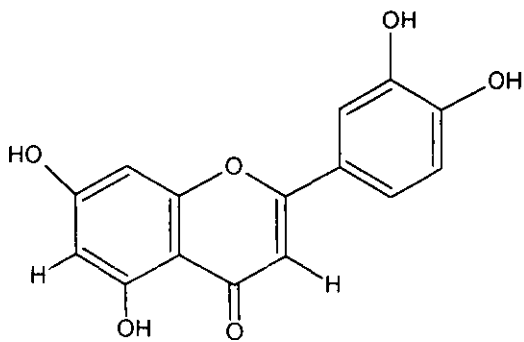
Artemetina



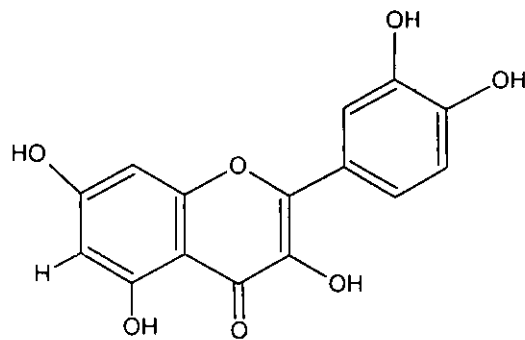
Casticina



5-Hidroxi-3,6,7,4'-tetrametoxiflavona



Luteolina



Quercetina

Figura 12. Metabolitos secundarios aislados de *Achillea millefolium* L.
(continuación).

3. JUSTIFICACIÓN

Uno de los graves problemas de salud en el mundo es el resurgimiento de la tuberculosis, que junto con el aumento de cepas fármaco-resistentes de *Mycobacterium tuberculosis* y la poca eficiencia de los agentes antifímicos, hace de esta enfermedad un problema grave de la salud. Por otro lado, las plantas medicinales constituyen una fuente inagotable de metabolitos secundarios que pueden proveer de nuevas estructuras, las cuales pueden constituir nuevos agentes terapéuticos útiles en el tratamiento de esta enfermedad, así como de sustancias inmunomoduladoras que modifiquen la respuesta inmune ante los procesos patogénicos durante la activación de la infección provocada por *M. tuberculosis*.

4. OBJETIVO

Realizar la investigación química de tipo biodirigido, de las partes aéreas de *Achillea millefolium* con la finalidad de explorar su potencialidad como agente antimicobacteriano e inmunoestimulante.

4.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Con la finalidad de cumplir con el objetivo principal se propusieron los siguientes objetivos específicos:

1. Revisar la información etnobotánica, química y farmacológica de *A. millefolium*.
2. Colectar, identificar y realizar el tratamiento preliminar para la preparación de los extractos de *A. millefolium*.
3. Realizar la extracción acuosa, metanólica y hexánica de *A. millefolium*.
4. Determinar la actividad antimicobacteriana de los extractos obtenidos en el inciso anterior.
5. Evaluar la actividad inmunomoduladora de los extractos: hexánico, metanólico y acuoso.
6. Realizar el fraccionamiento químico biodirigido del extracto más activo.
7. Evaluar la actividad antimicobacteriana de las fracciones primarias.
8. Aislamiento de los compuestos presentes en las fracciones activas por métodos cromatográficos (cromatografía en capa fina).
9. Caracterizar los compuestos mediante el empleo de métodos espectroscópicos y espectrométricos.
10. Evaluación de la actividad inmunomoduladora de los compuestos puros.

5.1. HIPOTESIS

Si la especie medicinal *Achillea millefolium* L., de la familia Asteraceae, sintetiza metabolitos secundarios, que de acuerdo a lo reportado para esta familia, se han identificado diversos compuestos como lactonas, triterpenos y flavonoles, los cuales tienen diferentes actividades biológicas, entonces el fraccionamiento químico de tipo biondirigido, de las partes aéreas de *A. millefolium*, permitirá el aislamiento y la caracterización estructural de los compuestos responsables de la actividad antimicobacteriana e inmunomoduladora de esta especie de planta.

6. MATERIALES Y METODOS

6.1. Selección de la especie botánica

El criterio etnobotánico, constituyó el punto de partida para la elección de la planta *Achillea millefolium*, tomando como base el uso que tiene la planta en la medicina tradicional para el tratamiento de enfermedades como: tos bronquitis, tuberculosis y diversos procesos infecciosos.

Esta información se obtuvo del análisis de 2 colecciones, la de Aguilar *et al*, 1994 y la de Argueta *et al*, 1994.

6.2. Colecta del material vegetal

Las partes aéreas de la planta fresca se adquirieron en el mercado de Sonora en México, D. F. en el mes de julio de 1998; posteriormente la planta fue clasificada por personal experto del Herbario del IMSS, y se realizó un ejemplar de herbario, que fue depositado en dicho herbario con la clave 13044.

6.3. Preparación de los extractos

Una vez colectado el material vegetal, se realizaron los procedimientos preliminares para su extracción:

La limpieza de la planta consistió en la eliminación de hojas secas, malezas, animales y basura que traía ésta al momento de la adquisición, realizado lo anterior, se extendió la planta a la sombra para que se fuera deshidratando lentamente a temperatura ambiente durante 15 días; al finalizar esto, se procedió a la molienda de la planta, utilizando para esto un molino de mano.

Los extractos se prepararon con el material vegetal limpio, seco y molido, por vía maceración con hexano (Sigma) (3 veces, c/u con 600 ml), metanol (Sigma) (3 veces, c/u con 600 m), y por proceso de digestión, se preparó el acuoso (250 ml agua). Para los extractos hexánico y metanólico se utilizaron 250 g de material vegetal y para la preparación del extracto acuoso se emplearon 100 g de material seco. Los extractos (hexánico, metanólico y acuoso) fueron filtrados y evaporados a sequedad mediante el empleo de un rotavapor (BÜCHI RE 111 Y R-114), proceso que permitió obtener los extractos orgánicos y acuoso concentrados libres de disolvente o agua (Figura 13).

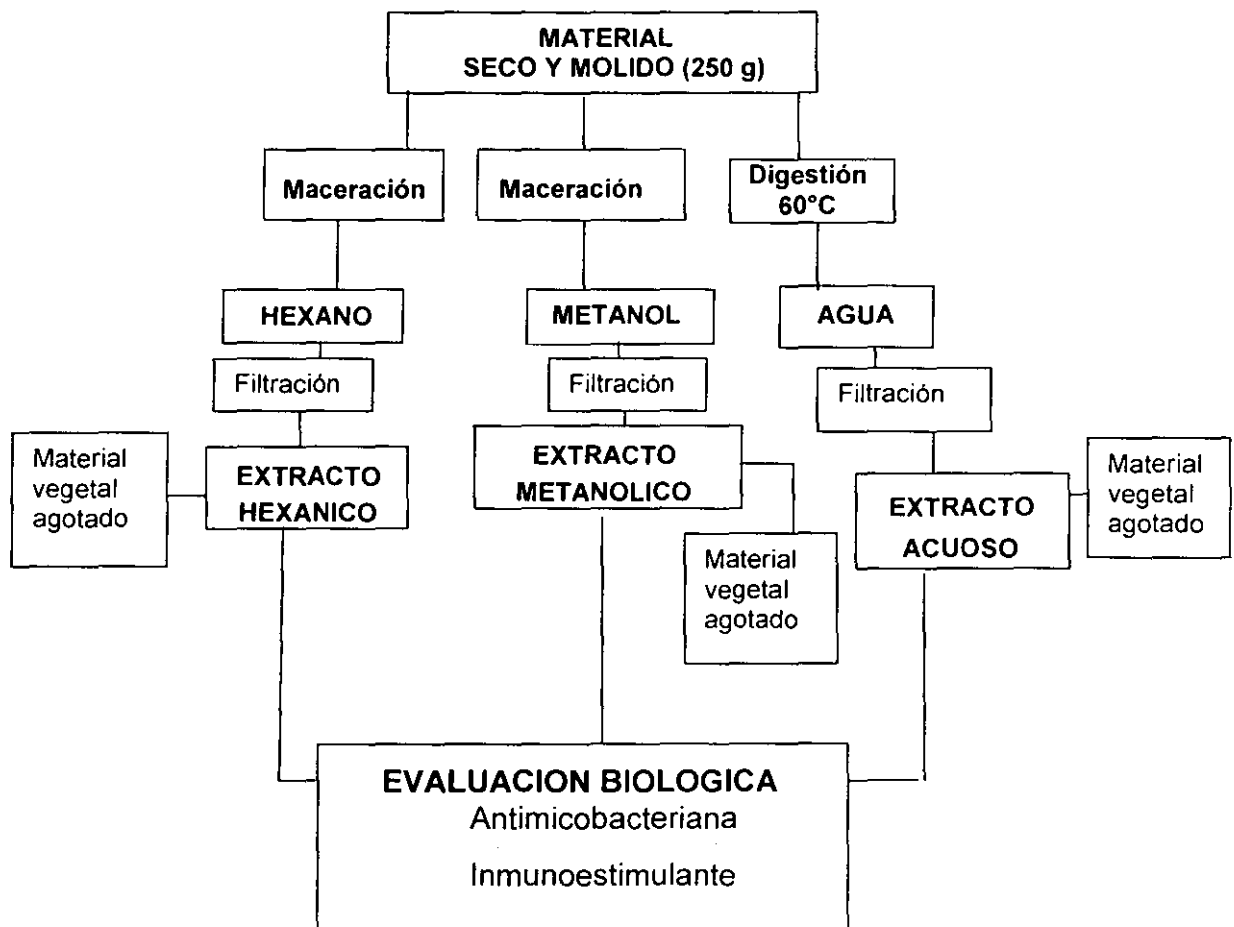


Figura 13. Obtención de extractos.

Del extracto hexánico se obtuvieron 29.9 g, que presentan un rendimiento del 11.96%, formándose al mismo tiempo, un precipitado (308.8 mg) con un rendimiento del 0.123%. En el caso del extracto metanólico se obtuvieron 99.8 g y un rendimiento del 39.9%, y para el caso del extracto acuoso se obtuvieron 13.22 g con un rendimiento del 13.22%.

Una vez obtenido los extractos, éstos se sometieron a evaluación biológica.

6.4. Determinación de la actividad antimicobacteriana

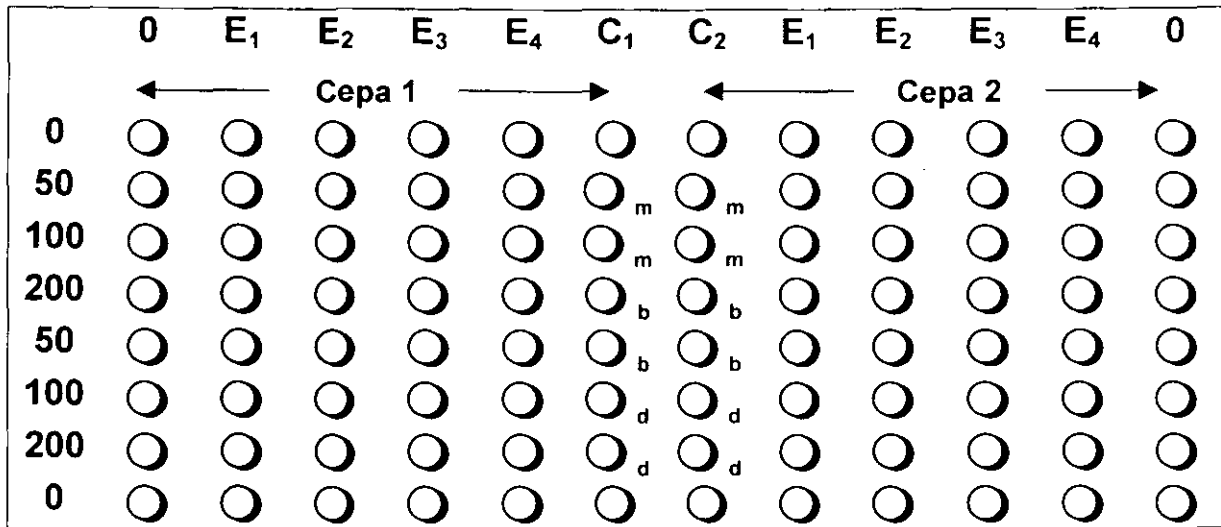
El colorante Alamar azul (resazurina), con propiedades de óxido-reducción es un indicador general de crecimiento celular y/o viabilidad; el color azul de la resazurina, indica estado oxidado y no fluoresce, pero se convierte a color rosa (resorufina) y fluoresce, cuando se reduce, indicando así la presencia de metabolismo (deshidrogenasas) (Collins *et al*, 1997). El crecimiento bacteriano puede, por lo tanto, ser medido con un fluorómetro, espectrofotómetro o determinado visualmente por el cambio de color (Collins *et al*, 1997).

El Alamar azul ha sido usado para cuantificar la proliferación de linfocitos, también ha sido utilizado para detección de cepas resistentes de *Staphylococcus aureus* a metilicina; resistencia de *Enterococci* a vancomicina y susceptibilidad de diferentes hongos a anfotericina B, fluconazol, flucitosina e itraconazol (Collins *et al*, 1997). Por otra parte, el micrométodo colorimétrico de Alamar azul permite determinar la susceptibilidad o resistencia de diferentes cepas de *Mycobacterium* a los agentes antimicobacterianos (Franzblau *et al*, 1998; Collins *et al*, 1997; Tiballi *et al*, 1995; Yajko *et al*, 1995).

Este procedimiento tiene actualmente gran difusión debido a que es rápido, reproducible, de bajo costo y adecuado para su utilización en el rastreo de la actividad anti-micobacteriana de agentes antifímicos (Franzblau *et al*, 1998; Collins *et al*, 1997; Tiballi *et al*, 1995; Yajko *et al*, 1995).

Para la realización del ensayo se utilizaron cepas de referencia de *M. tuberculosis* (H37Rv) y *M. avium*. Los microorganismos de prueba se hicieron crecer durante

siete días en el medio de cultivo Middlebrook 7H9 enriquecido con OADC (ácido oleico, albúmina, dextrosa y catalasa) (Difco, Dittroit. Mich), durante siete días a 37°C. Los extractos vegetales, fracciones y/o compuestos fueron solubilizados en DMSO (Sigma) y en microtubos estériles de 1 mL se prepararon las diluciones de las muestras a evaluar a las concentraciones deseadas (200, 100, 50 µg/mL). El ensayo biológico se realizó en una microplaca de 96 pozos (Evergreen 333-8000-01F) y en cada uno de los pozos se colocaron 100 µL de medio, 100 µL de suspensión bacteriana que contenía 6×10^3 unidades formadoras de colonias (UFC), la cual se ajusta comparando su turbidez con la del tubo no. 1 de McFarland, utilizando un nefelómetro (General Diagnostics, Morris Plains, NJ), y 20 µL del tratamiento, excepto los pozos de la periferia, a los cuales se les adicionó 100 µL de agua destilada estéril con la finalidad de mantener la humedad en la placa durante el proceso de incubación. En este ensayo se incluyeron los siguientes controles: un control con disolvente (m), uno sin muestra problema (b), y un tercero con el antibiótico (rifampicina o etambutol) (d) (Figura 14). Posteriormente las placas fueron incubadas a 37° C. Después de cinco días de incubación al control se le adicionaron 20 µL de tween-80 (Sigma) y 20 µL de alamar azul (Accumed International, Westlake, Ohio) y se incubó por 24 hrs más. Si el crecimiento y metabolismo de la bacteria es óptimo, el color del alamar azul vira al color rosa en este control. Al observarse este cambio de coloración, se procede a la adición de 20 µL de alamar azul y 20 µL de tween-80 al resto de los pozos de la placa, incluyendo el resto de los controles y se reincuba a 37°C durante 24 hrs más. En forma similar, se prepararon las muestras para la evaluación con la otra especie de micobacteria. Después de transcurrido el tiempo de incubación (7 días), se observó el cambio de coloración tanto en el control como en las muestras problema. El control positivo empleado en este caso fue rifampicina (Sigma) a 0.1 µg/mL las pruebas se realizaron por triplicado y bajo estrictas condiciones de esterilidad.



E₁, E₂, E₃ y E₄ = extractos: 50, 100 y 200 µg/mL

C₁ = controles de cepa 1

C₂ = controles de cepa 2

m = control con disolvente

b = sin muestra problema

d = con el antibiótico (rifampicina o etambutol)

0= con agua para mantener la humedad

Figura 14. Esquema de la microplaca utilizada en el ensayo de la determinación de la actividad antimicobacteriana.

6.5. Evaluación de la actividad inmunomoduladora

6.5.1. Aislamiento de neutrófilos

Para realizar este ensayo biológico se utilizó sangre de individuos clínicamente sanos. Como primer paso, se tomó 1 mL de una solución que contenía Dextran (peso molecular de 65 500, Sigma) al 6% con 10 mg de EDTA (Merck) y se adicionó a 4 ml de sangre total venosa. Esta mezcla se dejó incubar por una hora a 37°C; transcurrido este tiempo se procedió a separar cuidadosamente con un pipeta Pasteur el plasma rico en polimorfonucleares (PMNs) -neutrófilos-. Se colocaron cuidadosamente 1.5 ml de este plasma por las paredes de un tubo que contenía 1 mL de Lymphoprep (Ficoll hypaque, densidad: 1.077 ± 0.001 g/mL; Nycomed pharma AS, Oslo, Norway) y se centrifugó a 1500 r.p.m. en una centrifuga clinica durante 30 minutos a temperatura ambiente. Este proceso permitió la separación de los linfocitos (sobrenadante) y PMNs (botón) por gradiente de densidad (Benencia *et al*, 1994, 1995; Courrégés *et al*, 1994). Posteriormente se eliminó el sobrenadante con ayuda de una pipeta Pasteur y el botón restante se resuspendió en 500 μ l de medio RPML 1640 1X (L-glutamina y NaHCO_3) (In Vitro, S. A.). Esta mezcla se colocó en un tubo eppendorf (Axygen, T-200-Y) de 1.5 ml y se centrifugó a 12000 g (centrifuga Beckman, Avanti J-251) por un minuto, transcurrido el tiempo se eliminó el sobrenadante y se resuspendió nuevamente el botón, este proceso se repitió dos veces más con la finalidad de eliminar los residuos del Ficoll. Una vez aislados los neutrófilos se resuspendieron en el volumen necesario de medio RPML, con la finalidad de tener una concentración final de 5×10^4 células, las cuales se contaron utilizando una cámara de Neubauer y al mismo tiempo se evaluó la viabilidad de los PMNs empleando el colorante azul de Trypano al 0.4% (Sigma, USA); este colorante nos permite diferenciar las células vivas (en color naranja) de las células muertas (de color azul). Una vez aislados los neutrófilos se procedió a determinar la capacidad fagocítica de estas células en presencia de levaduras opsonizadas y con los

tratamientos, en este caso extractos, fracciones y/o compuestos puros (Benencia *et al*, 1994, 1995; Courrèges *et al*, 1994)

6.5.2. Opsonización de levaduras

Para este procedimiento se preparó una suspensión de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (adquirida en un centro comercial), la cual se preparó tomando 100 mg de levadura y adicionándoles 5 mL de solución salina fisiológica (SSI); se tomaron 200 μ L de esta mezcla, que contenían aproximadamente 10×10^6 levaduras, y se les agregaron 800 μ L de suero fresco obtenido de sujetos clínicamente sanos, y se incubaron durante 30 minutos a 37°C; transcurrido el tiempo de incubación se centrifugó a 2500 r.p.m. en una centrifuga clínica, por un minuto, y se procedió a retirar el sobrenadante; el botón restante se resuspendió con 200 μ L de medio RPML (Benencia *et al*, 1994).

6.5.3. Preparación de tratamientos a evaluar

Las muestras problema (extractos, fracciones y/o compuestos puros) se disolvieron en medio RPML. Las concentraciones evaluadas fueron de 0.025, 0.05, 0.5, 5.0 y 10.0 mg/mL.

6.5.4. Determinación de la actividad fagocítica

Se tomaron aproximadamente 1000 neutrófilos suspendidos en 50 μ L de medio RPML, a los cuales se les adicionaron 10 μ L de una suspensión de levaduras opsonizadas y 10 μ L de los tratamientos (extractos, fracciones y/o compuestos puros). Para este ensayo biológico se empleó ciclosporina 2.5 mg/mL, (Sandoz.

Switzerland) como control positivo. La mezcla de neutrófilos, levaduras opsonizadas y tratamiento se incubó durante 2 hr a 37° C. En este tipo de ensayo biológico es importante tomar en cuenta el tiempo de vida media de los PMNs, el cual es de 8 hrs; después del proceso de incubación se procedió a verificar la viabilidad celular y se realizó un frotis de cada una de las muestras, las cuales se tiñeron con colorante de Wright (Eric).

Se empleó un microscopio para contar 200 neutrófilos y el número de levaduras que habían sido fagocitadas por cada uno de ellos. En cada caso se obtuvo el promedio de levaduras fagocitadas por 800 PMNs, por cada tratamiento, esto se tomó como índice fagocítico. Se determinó el índice fagocítico del control y se comparó con el de los tratamientos. Cabe aclarar que este ensayo se realizó con cuatro repeticiones por tratamiento.

6.6. Fraccionamiento químico del extracto hexánico

Una vez realizada la evaluación biológica de los extractos hexánico, metanólico y acuoso (ver inciso 6.4. y 6.5.), se procedió a realizar el fraccionamiento químico del extracto que mostró mayor actividad biológica siguiendo los esquemas convencionales descritos en la literatura (Figura 15) (Hamburger y Hostettmann, 1991).

En primer término, se realizó el fraccionamiento del extracto hexánico (2.5 g) utilizando cromatografía en columna abierta, empleando como soporte 113 g de gel de sílice (Silica gel 60 de malla 70-230, Merck) y como sistemas de elución, una mezcla de disolventes con diferente polaridad (Hexano, Hex:CHCl₃, CHCl₃:MeOH y Metanol). Se colectaron 113 fracciones de 125 ml cada una, las cuales fueron reunidas según el perfil cromatográfico que mostraron al realizarles cromatografía en capa fina (Merck, DC-Fertigplatten Kaieselgel 60 F254), usando diferentes agentes cromogénicos: sulfato cérico amoniacal en ácido H₂SO₄ al 10% y mezcla de vainillina etanólica al 1% en H₂SO₄/etanólico al 5% (Wagner *et al*, 1984). De este proceso se generaron un total de 10 grupos de fracciones

primarias (A-J), las cuales fueron sometidas a la evaluación biológica. En la Tabla V se resume el proceso de fraccionamiento.

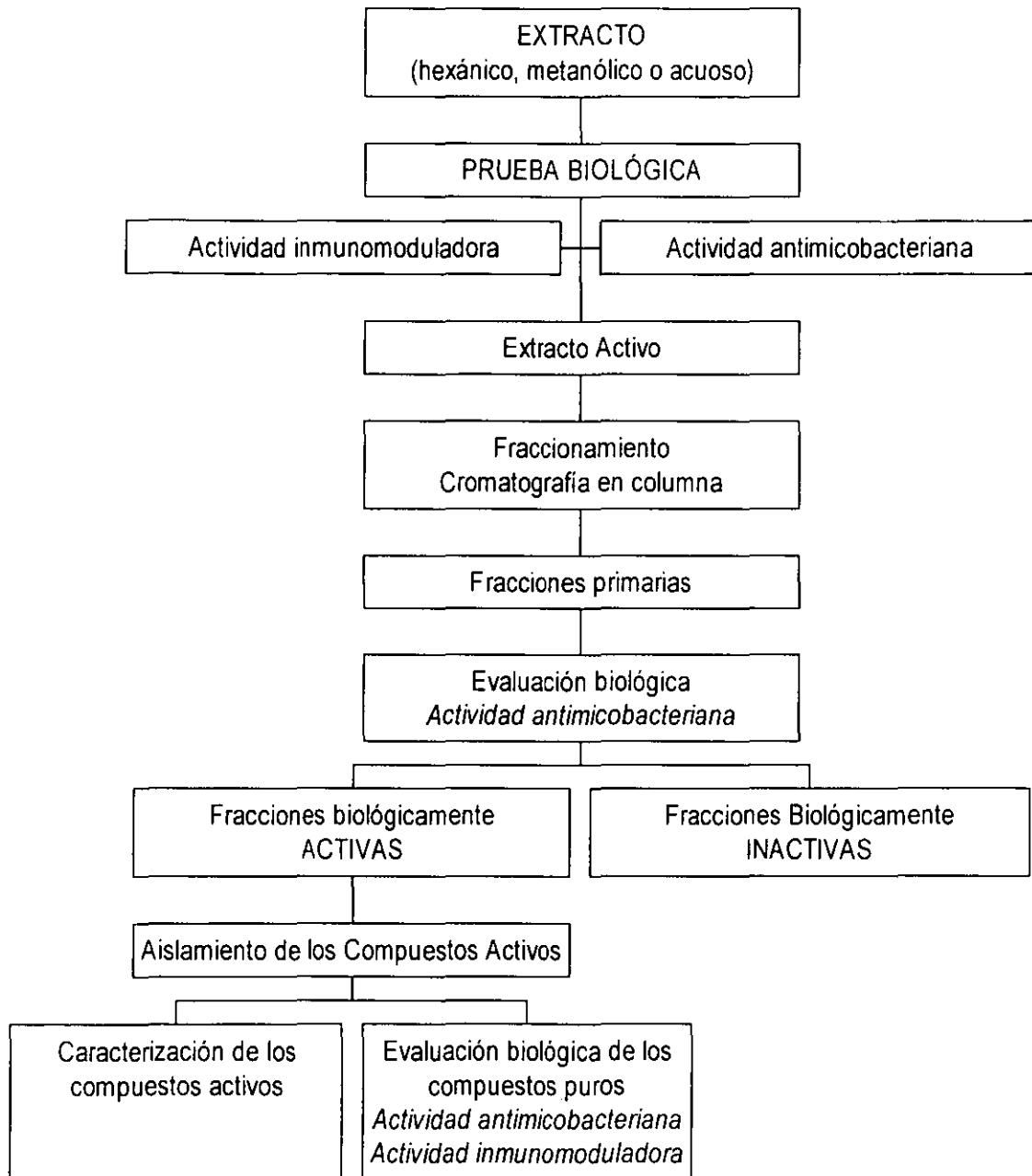


Figura 15. Fraccionamiento químico biodirigido de los extractos activos de *A. millefolium*

Tabla V. Fraccionamiento, por cromatografía en columna, del extracto hexánico de las partes aéreas de *Achillea millefolium* L.

Eluyente	Proporción (%)	Fracciones	Fracciones reunidas	Clave
Hexano	100	1-40	1-6	A
			7-46	B
Hex-CHCl ₃	90:10	41-54	47-54	C
Hex-CHCl ₃	80:20	55-83	55-61	D
			62-69	E
Hex-CHCl ₃	70:30	84-91	70-85	F
CHCl ₃ -Hex	70:30	92-100	86-102	G
CHCl ₃	100	101-110	103-109	H
CHCl ₃ -MeOH	30-70	111-113	110-111	I
			112-113	J

6.6.1. Aislamiento de los compuestos β -amirina y β -sitosterol

La fracción primaria D (450 mg), obtenida con una mezcla de eluyente Hex:CHCl₃ (80:20) presentó una consistencia cerosa, la cromatografía en capa fina con un sistema de elución Hex:AcOEt (90:10), reveló la presencia de dos compuestos mayoritarios. Mediante sucesivas cromatografías preparativas y cromatografías en capa fina con sistema de elución Hex:AcOEt (90:10), se aislaron los compuestos con clave D₁ y D₂.

Utilizando cromatografía comparativa con muestras conocidas de β -amirina y β -sitosterol se determinó que el compuesto D₁ correspondió a la β -amirina, y el compuesto D₂ se identificó como β -sitosterol,

De la fracción E de la columna original se cristalizó de manera espontánea un sólido blanco, el cuál al ser comparado con una muestra original de β -sitosterol (SIGMA) en cromatografía en capa fina, mostró ser el mismo compuesto.

6.6.2. Aislamiento y caracterización de leucodina, matricarina y desacetilmatricarina

En las fracciones primarias activas F, G y H, eluidas con mezcla de Hex:CHCl₃ (70:30, 30:70) y cloroformo (100%), se detectaron por cromatografía en capa fina, tres compuestos mayoritarios en diferentes concentraciones, empleando como agente cromogénico vainillina etanólica al 1% en mezcla de H₂SO₄/etanol al 5%. Para la separación de estos compuestos, se procedió a la realización de cromatografías preparativas utilizando como sistema de elución Hex:AcOEt (60:40), este proceso permitió el aislamiento de tres lactonas sesquiterpénicas, las cuales fueron caracterizadas, empleando métodos espectroscopios y espectrométricos, como: leucodina, matricarina y desacetilmatricarina, los tres compuestos se aislaron en forma de cristales blancos.

6.7. Fraccionamiento químico del extracto metanólico.

Basándose en los resultados de la evaluación biológica (inmunomoduladora) de los extractos, el segundo más activo, fue el extracto metanólico. Éste se fraccionó vía cromatografía abierta, utilizando 10 g de este extracto y como soporte 100 g de gel de sílice y los siguientes sistemas de elución: Hexano, Hex:CH₂Cl₂, CH₂Cl₂, CH₂Cl₂:MeOH y metanol. Se colectaron un total de 57 fracciones de 250 ml cada una y se analizaron por cromatografía en capa fina, uniéndose aquellas que presentaron homogeneidad cromatográfica. Este proceso generó un total de seis grupos de fracciones primarias (I - VI) las cuales fueron evaluadas biológicamente. En la fracción II y III se encontró presente la β-amirina y el β-sitosterol, en la fracción IV estaban presentes las tres lactonas previamente aisladas del extracto hexánico y en las fracción V se encontraban presentes 3 compuestos, dos de los cuales correspondían a flavonoles y el otro se identificó como β-glucositosterol; en la fracción VI se detectó la presencia de β-glucositosterol, arabinosa y sacarosa.

Estos últimos compuestos fueron detectados en cromatografía de capa fina e identificados por comparación con muestras de referencia de éstas (Sigma).

Tabla VI. Fraccionamiento vía cromatografía en columna del extracto metanólico de las partes aéreas de *Achillea millefolium* L.

Eluyente	Proporción (%)	Fracciones	Fracciones reunidas	Clave
Hexano	100	1-12	1-12	I
Hex-CH ₂ Cl ₂	50:50	13-29	13 14-19	II III
CH ₂ Cl ₂	100	30-41	24-40	IV
CH ₂ Cl ₂ -MeOH	50:50	42-55	41-46	V
Metanol	100	56-57	47-57	VI

6.7.1. Aislamiento de 7-metoxi-3,5,4'-trihidroxi-flavona y 5-hidroxi-3,6,7,3',4'-pentametoxiflavona

La fracción V, presentó de forma característica tres compuestos mayoritarios, dos de los cuales fueron identificados como flavonoles, utilizando el agente cromogénico H₂SO₄ al 10%, por lo que el aislamiento empleado fue de cromatografías preparativas y con el sistema de elución de Hex:AcOEt (55:45). Este proceso permitió el aislamiento de: 7-metoxi-3,5,4'-trihidroxi-flavona y 5-hidroxi-3,6,7,3',4'-pentametoxiflavona y otros compuestos que fueron identificados como β -glucositolsterol, β -D-glucositolsterol, arabinosa y sacarosa, por cromatografía comparativa con una muestra original (Sigma) de cada compuesto.

7. RESULTADOS

7.1. Selección de la especie vegetal

Este proceso se realizó con base en el análisis de la información etnobotánica descrita en dos colecciones, una perteneciente al herbario del IMSS (Aguilar-Contreras *et al*, 1994) y otra del Atlas de Plantas de la Medicina Tradicional de México (Argueta *et al*, 1994).

Los criterios etnomédicos que se tomaron en consideración para la selección de la especie vegetal, fueron términos descritos por los informantes tales como: tuberculosis, tosferina, tos convulsiva, tos con sangre, tos con hemorragia nasal, flemas, calentura, inflamación de la garganta y pecho, dolor de espalda y dolor de pulmón.

Asimismo, se realizó la revisión bibliográfica de la especie seleccionada (*Achillea millefolium*), encontrándose que la especie medicinal ha sido objeto de diversas investigaciones químicas (Kastner *et al*, 1994; Tozyo *et al*, 1994 y Chandler *et al*, 1982), y biológicas (Tunon *et al*, 1994; McCutcheon *et al*, 1992); sin embargo, a la fecha no había sido explorada su actividad antimicobacteriana (*M. tuberculosis* y *M. avium*), ni su actividad inmunomoduladora.

Con base en los datos descritos en la literatura, se decidió anexar otro criterio de selección, el quimiotaxonómico, considerando que en la literatura se han descrito algunas especies de la familia Asteraceae como: *Montanoa speciosa*, *Inula helenium* y *Rudbeckia subtomentosa*, entre otras, las cuales han mostrado una fuerte actividad contra *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv y *M. avium* ver Tabla IV.

7.2. Determinación de la actividad antimicobacteriana de los extractos hexánico, metanólico y acuoso

El criterio para determinar la actividad biológica inhibitoria de los extractos y fracciones, se determinó de manera cualitativa, observando únicamente el cambio de coloración que presentó el Alamar azul, el cual es un indicador de viabilidad celular, óxido-reductor. En ausencia de metabolismo bacteriano, el Alamar azul, permanece oxidado y presenta una coloración azul (oxidado) y en presencia de actividad metabólica, específicamente de deshidrogenasas bacterianas, el Alamar azul se reduce tomando una coloración rosa.

Los extractos que se consideraron activos contra *Mycobacterium tuberculosis* fueron aquellos que en presencia del microorganismo de prueba no indujeron cambio en la coloración del alamar azul oxidado, indicando así ausencia de crecimiento bacteriano. Los extractos que no fueron activos son los que permitieron el crecimiento bacteriano, indicado por el cambio de coloración que presentó el Alamar azul al reducirse (rosa).

Cabe señalar que este trabajo constituye uno de los primeros que utiliza el método colorimétrico de alamar azul como ensayo biológico para la evaluación de extractos de plantas, sin embargo éste método es empleado para determinar la actividad antimicobacteriana de sustancias de origen sintético (Collins *et al*, 1997).

La evaluación biológica de los extractos hexánico, metanólico y acuoso se realizó a tres diferentes concentraciones (200, 100 y 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla VII. El extracto hexánico inhibió el crecimiento de *M. tuberculosis* H37Rv a la concentración de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y el extracto metanólico inhibió el crecimiento de esta micobacteria a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, mientras que el extracto acuoso no presentó actividad sobre el microorganismo de prueba a la mayor concentración evaluada. Con respecto a la evaluación de los extractos contra *M. avium*, los resultados indican que el extracto hexánico presentó actividad, debido a

que inhibe el crecimiento de *M. avium* a la concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$; por otra parte, los extractos metanólico y acuoso de *A. millefolium* no inhibieron el crecimiento de *M. avium* a la máxima concentración evaluada (Tabla VII).

Tabla VII. Evaluación antimicobacteriana de los extractos de *Achillea millefolium*.

Extracto	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> ($\mu\text{g/mL}$)	<i>Mycobacterium avium</i> ($\mu\text{g/mL}$)
Hexánico	<50	100
Metanólico	100	200
Acuoso	>200	>200

* Rifampicina control positivo 1 $\mu\text{g/mL}$

Los resultados indicaron que el extracto hexánico y metanólico inhiben el crecimiento de *M. tuberculosis*, dado estos resultados se decidió realizar el fraccionamiento químico de tipo biodirigido de estos extractos.

7.3. Fraccionamiento químico del extracto hexánico

El fraccionamiento vía cromatografía en columna permitió obtener 10 grupos de fracciones [A-J], cada fracción se evaluó biológicamente obteniéndose diferentes valores de inhibición contra *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv y *Mycobacterium avium* (Tabla VIII).

Tabla VIII. Resultado de la actividad antimicobacteriana de las fracciones primarias del extracto hexánico de *Achillea millefolium*.

Muestra	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> ($\mu\text{g/mL}$)	<i>Mycobacterium avium</i> ($\mu\text{g/mL}$)
Fracción A	>200	>200
Fracción B	>200	>200
Fracción C	>200	>200
Fracción D	<200	>200
Fracción E	<200	>200
Fracción F	<50	100
Fracción G	100	100
Fracción H	100	200
Fracción I	>200	>200
Fracción J	>200	200

Los resultados obtenidos permitieron detectar que la actividad biológica del extracto hexánico se concentraba en las fracciones de mediana polaridad D, E, F, G y H. A estas fracciones se les realizó una cromatografía preparativa con la finalidad de aislar los compuestos presentes en estas fracciones.

7.4. Caracterización de los constituyentes presentes en el extracto hexánico de *A. millefolium*

El estudio biordirigido del extracto hexánico de *Achillea millefolium* condujo al aislamiento y caracterización de β -amirina, β -sitosterol y tres lactonas sesquiterpénicas. El rendimiento de los compuestos aislados del extracto hexánico se muestran en la Tabla IX.

Tabla IX. Rendimiento de los compuestos aislados del extracto hexánico de *Achillea millefolium*.

Compuesto	Cantidad obtenida por 2.5 g de extracto héxanico.	% en relación a 250 g de peso seco de la planta
β -amirina	83.1 mg	0.390
β -sitosterol	878 mg	4.2
Leucodina	44.6 mg	0.213
Matricarina	73.7 mg	0.352
Desacetilmatricarina	97.3 mg	0.465

7.5. Identificación de los compuestos aislados

7.5.1. Identificación de β -sitosterol y β -amirina

Estos dos compuestos fueron aislados de la fracción primaria D y E (Tabla VIII) obtenidas del extracto hexánico.

El β -sitosterol (Figura 16) precipitó en forma de cristales de las fracciones antes mencionadas, este compuesto es soluble en cloroformo; al realizar cromatografía en capa fina con una referencia de β -sitosterol comercial, presentó un R_f idéntico.

La β -amirina (Figura 16) fue purificada tras sucesivas cromatografías preparativas de la fracción primaria D empleando como sistema de elución Hex:AcOet (80:20). Este compuesto se aisló como un polvo blanco con un punto de fusión de 187-186°C, su peso molecular en el espectro de masa fue de 426 (Espectro 1). El espectro de RMN- ^1H del compuesto presentó un perfil típico para triterpenos con núcleo oleanano (Das y Mahato, 1983), el cual presenta señales para ocho grupos metilo y para una doble ligadura entre los carbonos 12 y 13 lo cual corresponde a lo reportado para la β -amirina (Espectro 2).

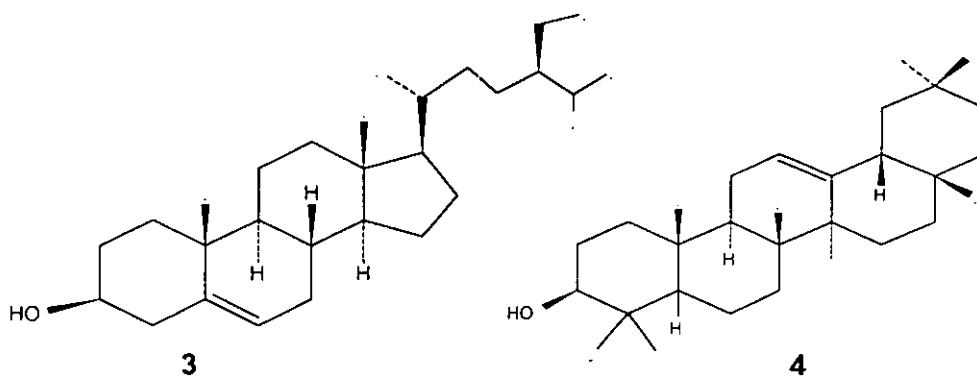
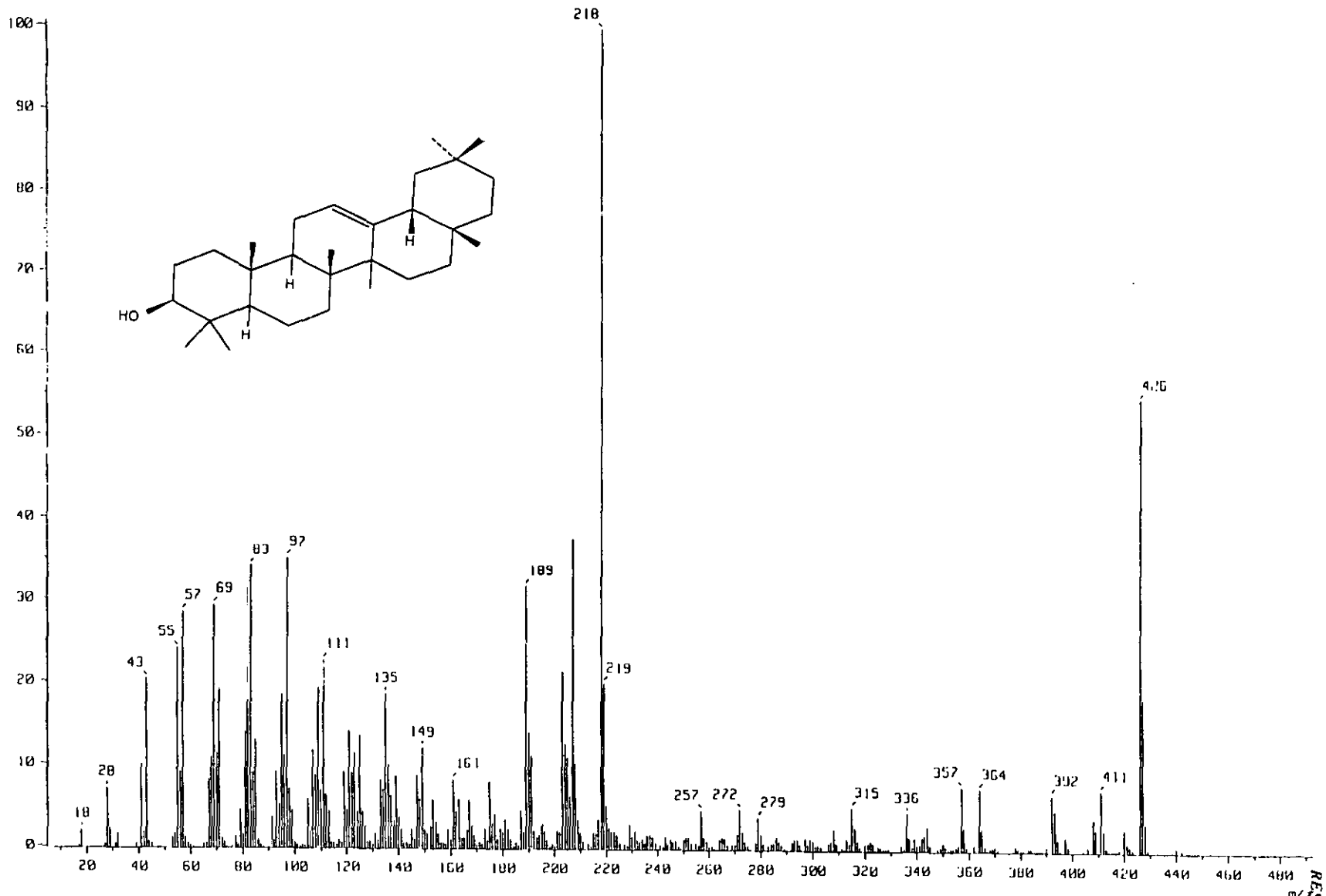
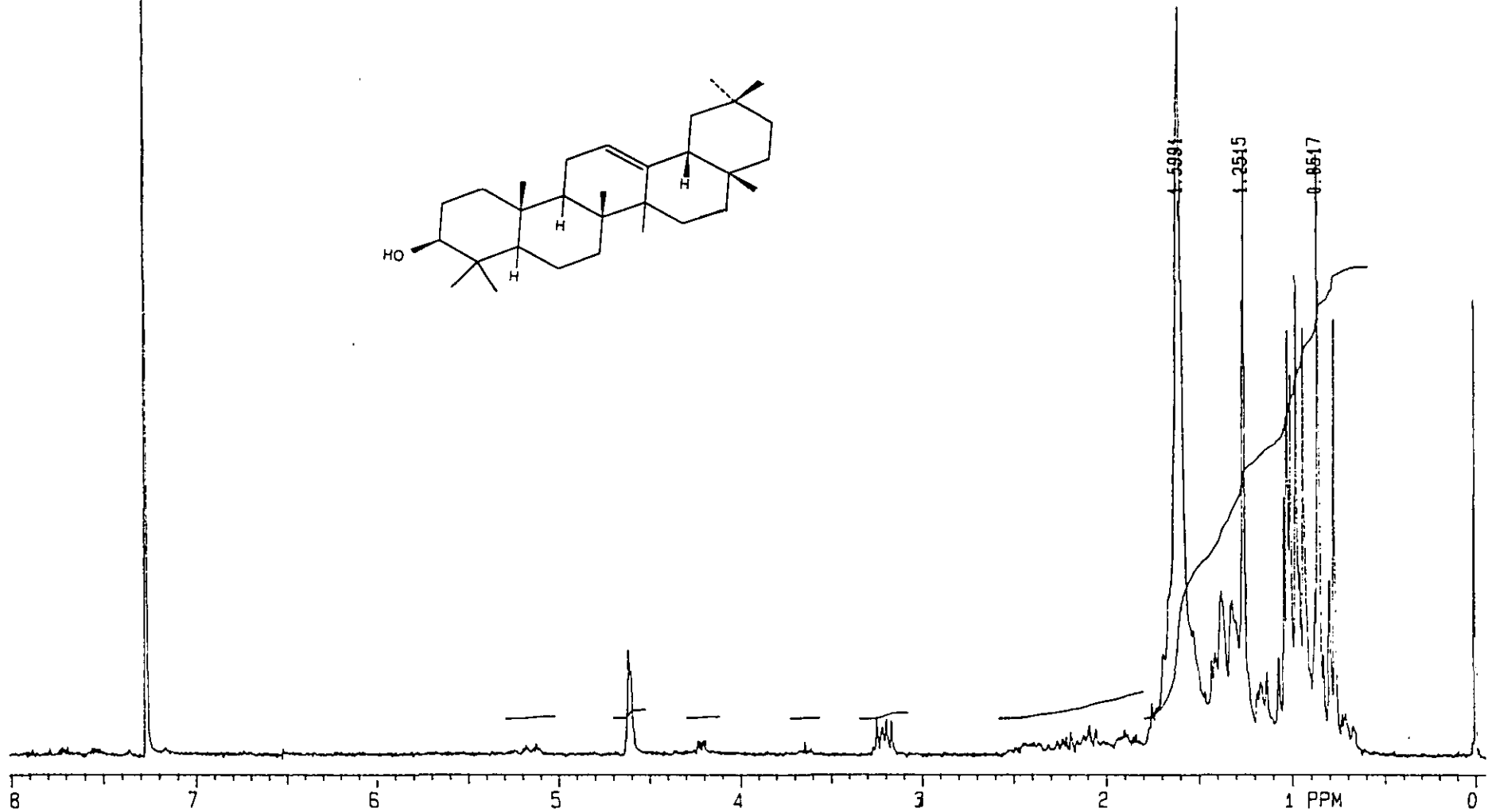
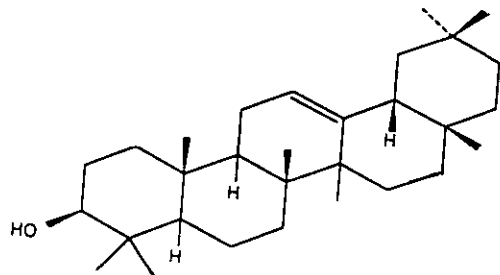


Figura 16. Estructura del β -sitosterol (3) y la β -amirina (4).



Espectro 1. EIME de la β -amirina.



Espectro 2. RMN- ^1H de la β -amirina.

7.5.2. Identificación de la leucodina

El compuesto se obtuvo de las fracciones F G y H; para su separación se utilizó cromatografía preparativa y el sistema de elución Hex:AcOEt (60:40); el compuesto precipitó en forma de cristales blancos los cuales se caracterizaron mediante el análisis de los datos de los espectros de masas (Espectro 3) y RMN-¹H (Espectro 4), que indicaron que el compuesto correspondía a una lactona sesquiterpénica, ya que presentaba las mismas señales características de la leucodina (Tabla X). Este metabolito previamente fue aislado en diferentes especies, como *Achillea millefolium*, *Achillea eriophora*, *Artemisia leukodes*, *Artemisia tridentata*, *Artemisia tridentata var tridentata*, *Artemisia austriaca*, *Stevia pilosa* (Martínez y Muñoz-Zamora, 1988) y *Taraxacum platycarpum* (Ho et al, 1998). La estructura de este compuesto se determinó por rayos x (Figura 17 y 18).

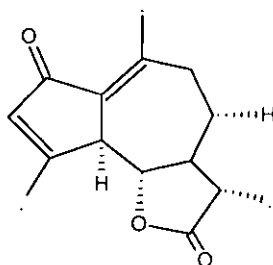
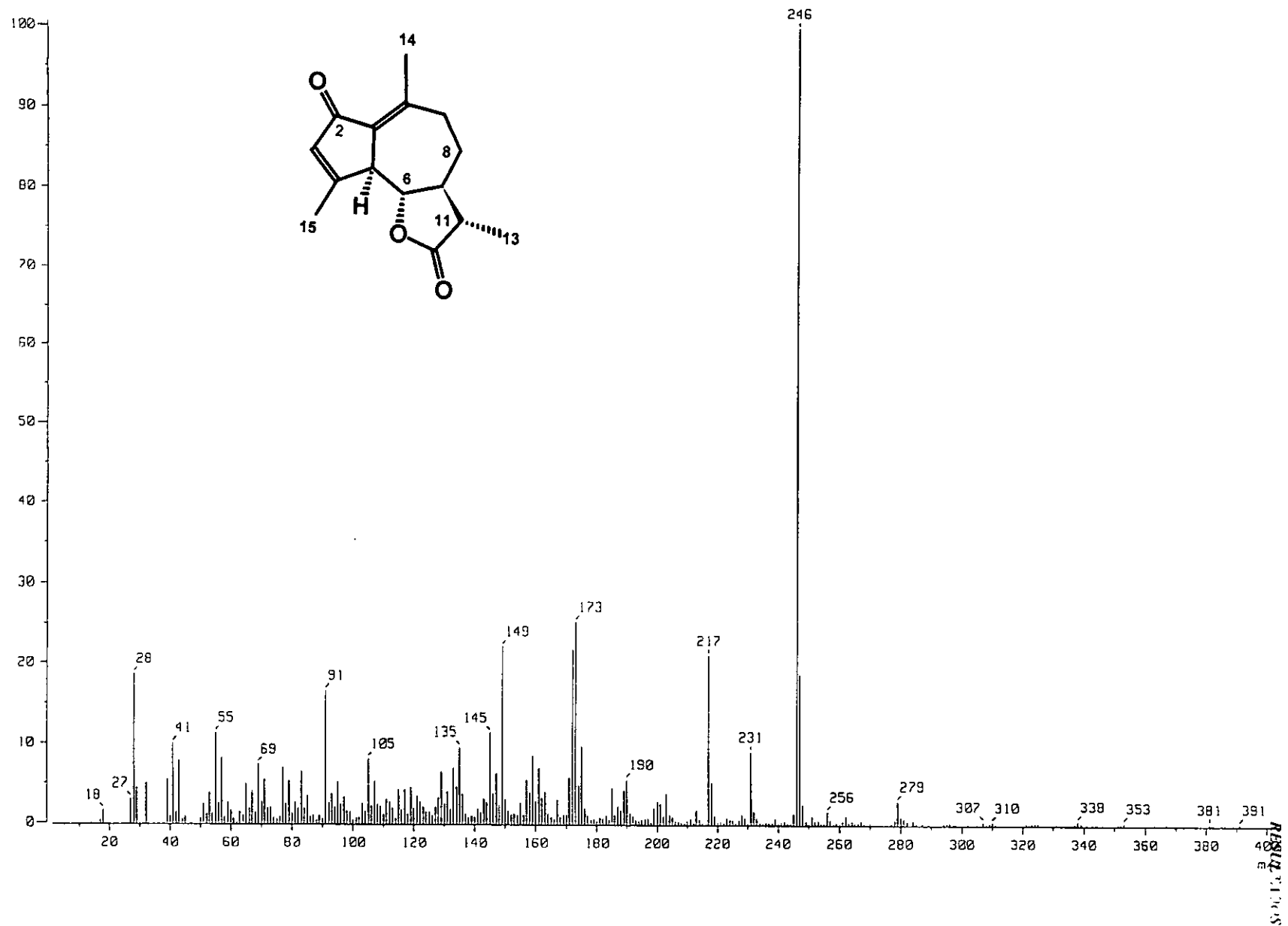
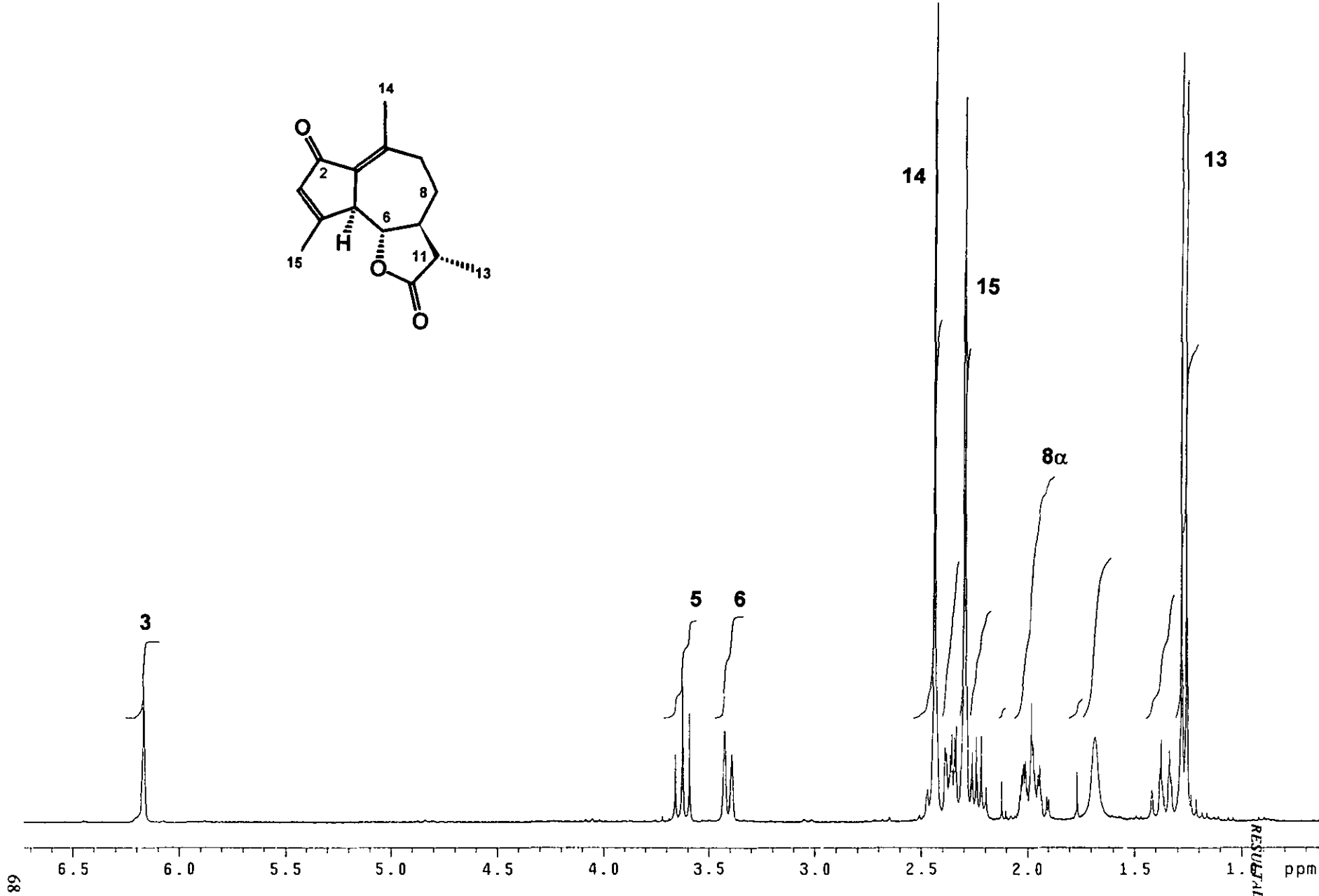
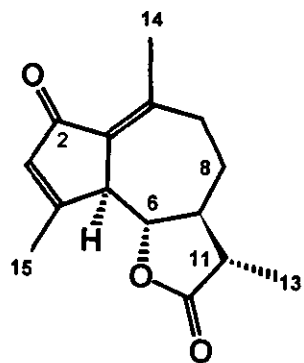


Figura 17. Estructura de la leucodina.

Tabla X. Constantes espectroscópicas y espectrométricas de la leucodina.	
Masas (Espectro 3)	C ₁₅ H ₁₈ O ₃ , PM 246 [M ⁺ -15]
RMN- ¹ H (Espectro 4)	6.19 (d, J ₃₋₁₅ =2.0 Hz, H-3); 3.43 (d, J ₅₋₆ =10.1 Hz, H-5); 3.64 (t, J ₆₋₇ =9.7 Hz, H-6); 1.96 (m, J _{7-8β} =11.9 Hz, H-7); 1.38 (m, J _{8α-8β} =13.2 Hz, H-8β); 2.04 (m, J _{8α-9α} =1.3 Hz, H-8α); 2.37 (d, J _{8β-9α} = 12.9 Hz, H-9β); 2.44 (ddd, J _{8β-9β} =13 Hz, H-9α); 2.27 (d, J ₁₁₋₁₃ =6.8 Hz, H-11); 1.29 (d, J ₁₁₋₁₃ =6.8 Hz, H-13); 2.45 (s, H-14); 2.31 (d, H-15);



Espectro 3. EIME de la leucodina.



Espectro 4. RMN-¹H de la leucodina

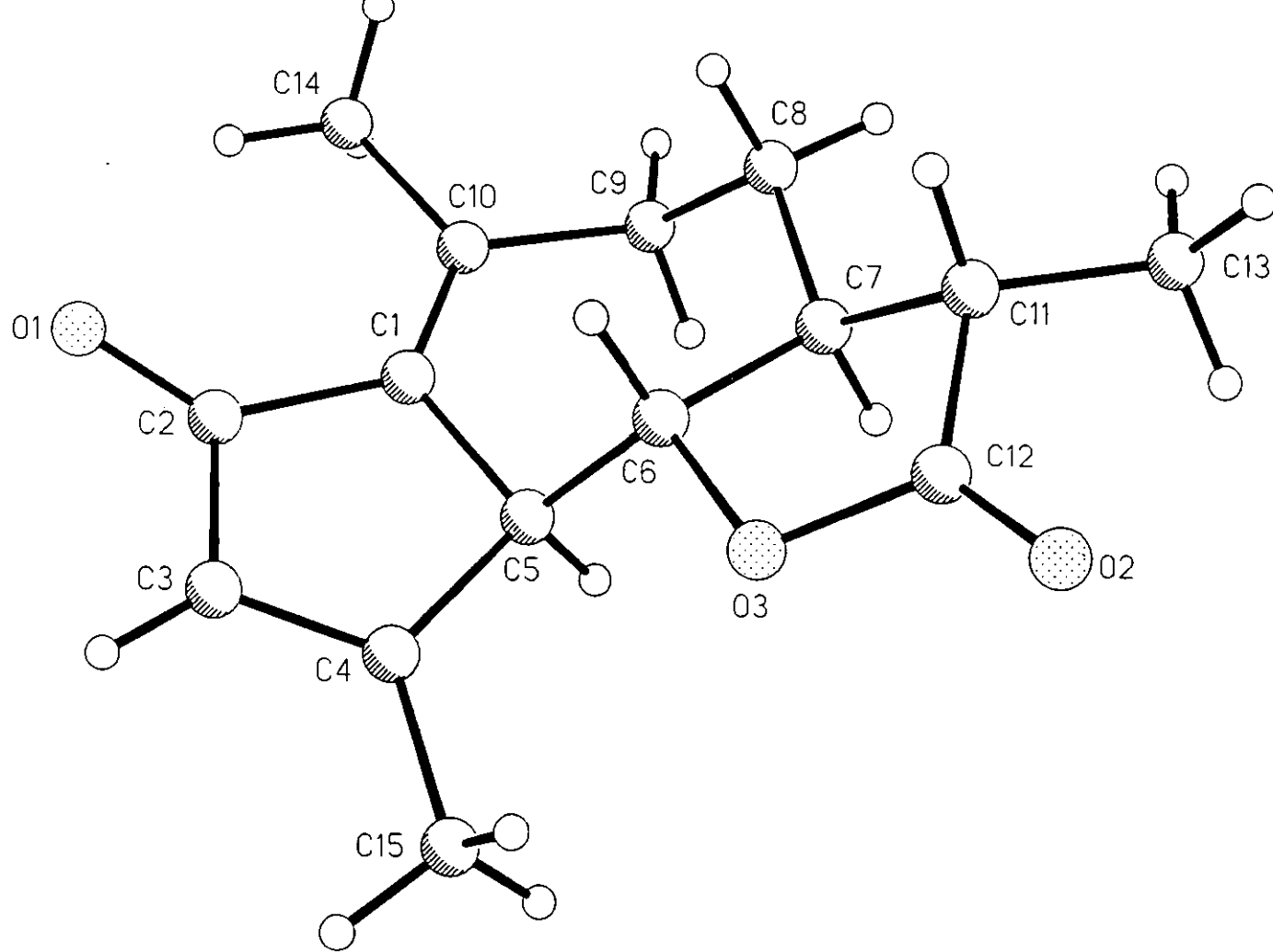


Figura 18. Estructura de Rayos X de la Leucodina

7.5.3. Identificación de la matricarina

Este compuesto se purificó como un polvo blanco con un punto de fusión de 274-277°C, mediante sucesivas cromatografías en placa preparativa de las fracciones F, G y H, empleando como sistema de elución Hex:AcOEt (60:40), los compuestos presentes en las fracciones, dieron positivo para la presencia de lactonas al revelar la placa con vainillina y H₂SO₄ disueltos en etanol (Wagner *et al*, 1984). Este compuesto presenta un peso molecular en el espectro de masas, de 304 (Espectro 5); se identificó como matricarina (Tabla XI y Figura 19). Al analizar el espectro de RMN-¹H (Espectro 6) y al comparar el espectro de RMN-¹H de la leucodina, se observó que la matricarina presentó una señal en δ 2.44 típica para un grupo acetilo y la de un triplete en 4.83, señales que no estuvieron presentes en el espectro de la leucodina, lo que indicaba que el compuesto está sustituido en el carbono 8; los datos de este compuesto se corroboraron con los datos descritos en la literatura (Martínez y Muñoz-Zamora, 1988).

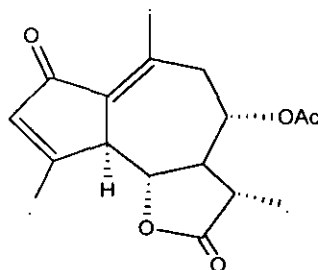
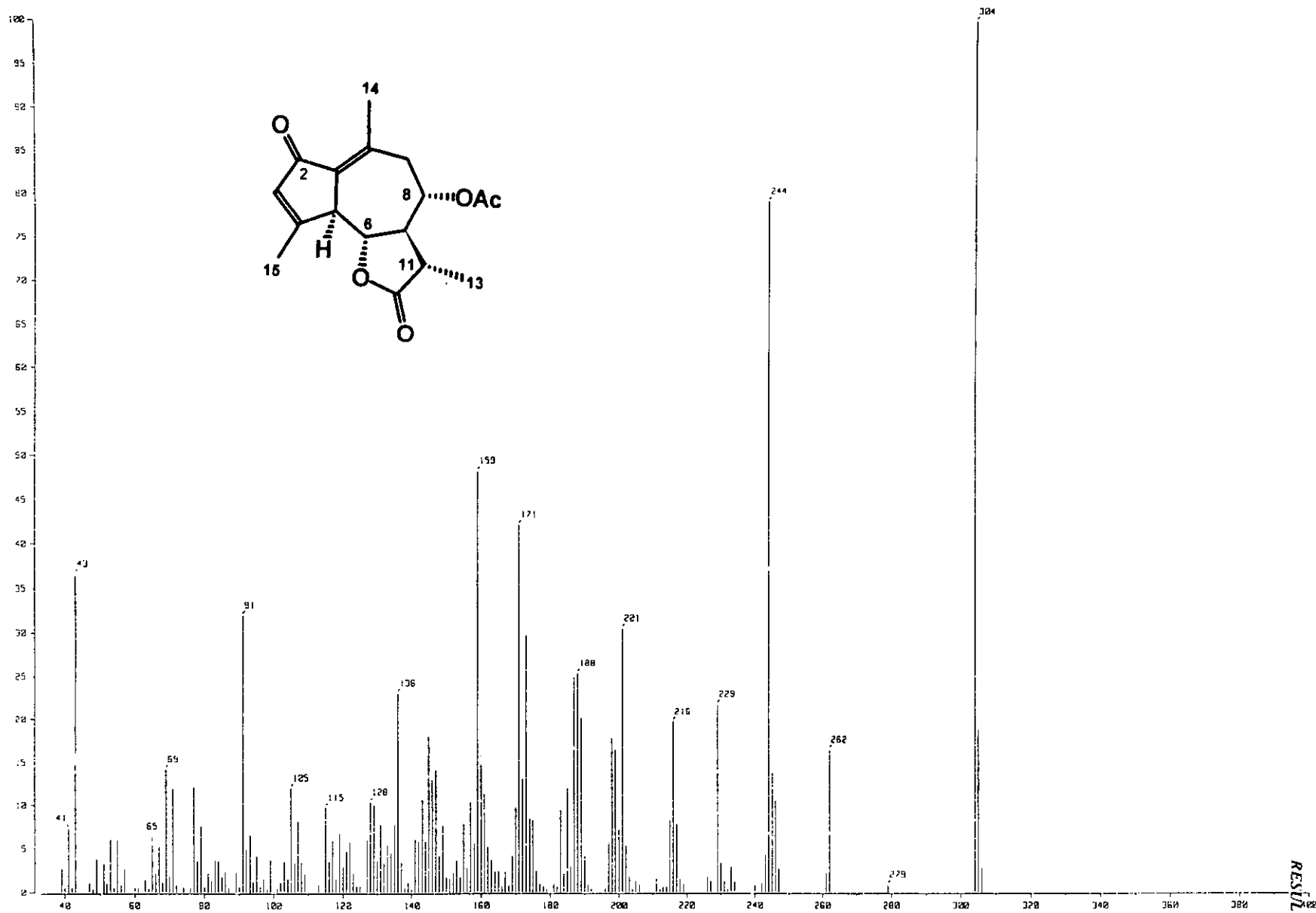
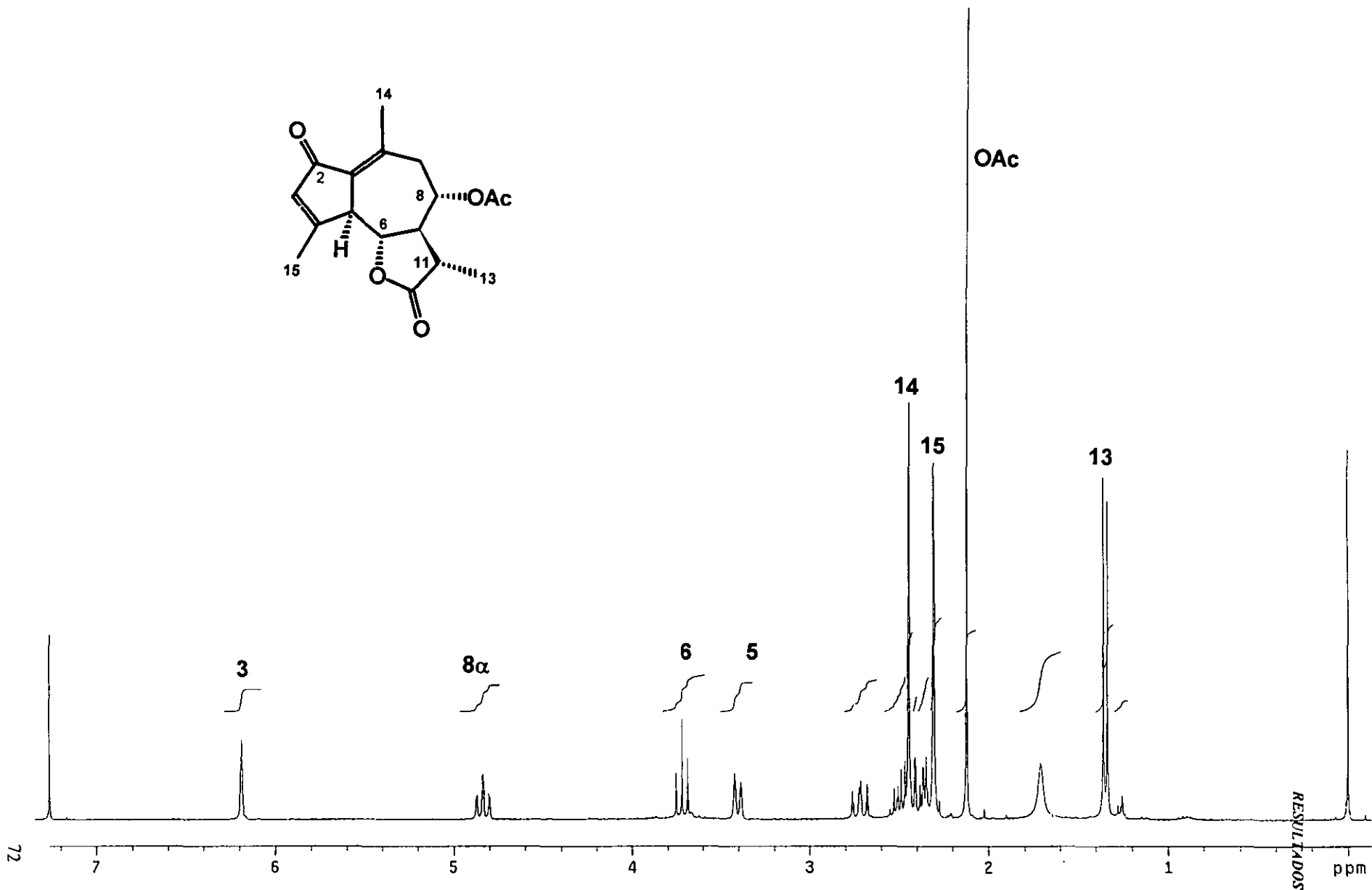
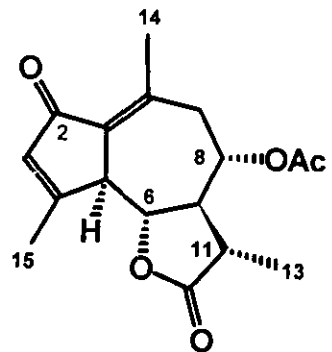


Figura 19. Estructura de la matricarina.

Tabla XI. Constantes espectroscópicas y espectrométricas de la matricarina.	
Masas (Espectro 5)	C ₁₂ H ₂₀ O ₅ , PM 304
RMN- ¹ H (Espectro 6)	6.18 (d, J ₃₋₁₅ =2.5 Hz, H-3); 3.72 (d, J ₅₋₆ =10.2 Hz, H-6); 3.42 (d, J ₅₋₆ =10.2 Hz, H-5); 2.36 (d, J ₆₋₇ =10.5 Hz, H-7); 4.83 (t, J _{7-8β} =10.3 Hz, H-8 β); 2.71 (J _{9α-9β} =14.1 Hz, H-9 α); 2.50 (d, J ₇₋₁₁ =11.6 Hz, H-11); 1.34 (d, J ₁₁₋₁₃ =6.8 Hz, H-13); 2.44 (s, H-14); 2.30 (d, H-15);



Espectro 5. EIME de la matricarina



Espectro 6. RMN-¹H de la matricarina

7.5.4. Identificación de la desacetilmatricarina

Este compuesto se aisló en forma de cristales como agujas blancas translúcidas y presentó un punto de fusión de 108-110°C; es soluble en cloroformo, acetato de etilo y acetona. El compuesto se detectó en las fracciones F, G y H y se aisló empleando cromatografía de capa fina en sistemas de elución Hex:AcOet (60:40) y usando como agente cromogénico vainillina/ácido sulfúrico disueltos en etanol (Wagner *et al*, 1984).

En el espectro de masas se observó un ion molecular de 262 que corresponde a la fórmula molecular de $C_{15}H_{18}O_4$. (Espectro 7). El análisis global de los datos obtenidos del espectro de Infrarrojo (Espectro 8), RMN- 1H (Espectro 9), RMN- ^{13}C (Espectro 10) y los datos del espectro de masas (Tabla XII) indicaban claramente que el compuesto correspondía a una lactona sesquiterpénica con núcleo guaianólido; y comparándolo con los datos reportados en la literatura (Martínez y Muñoz-Zamora, 1988), este compuesto se pudo identificar como la desacetilmatricarina (Figura 20), compuesto que ha sido aislado previamente de *Taraxacum platycarpum* (Ho *et al*, 1998).

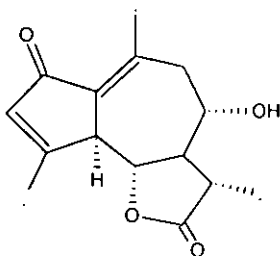
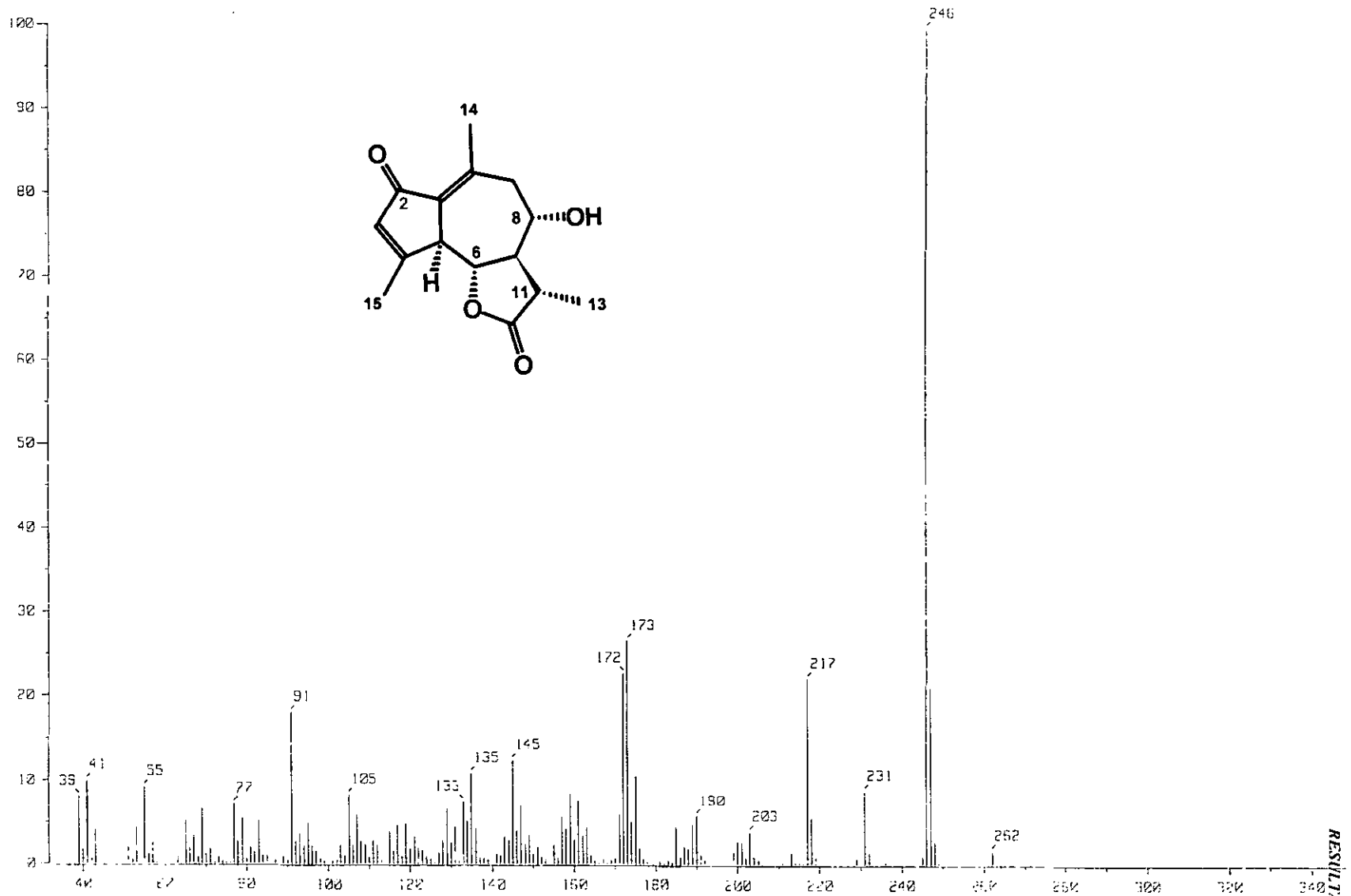


Figura 20. Estructura de la desacetilmatricarina.

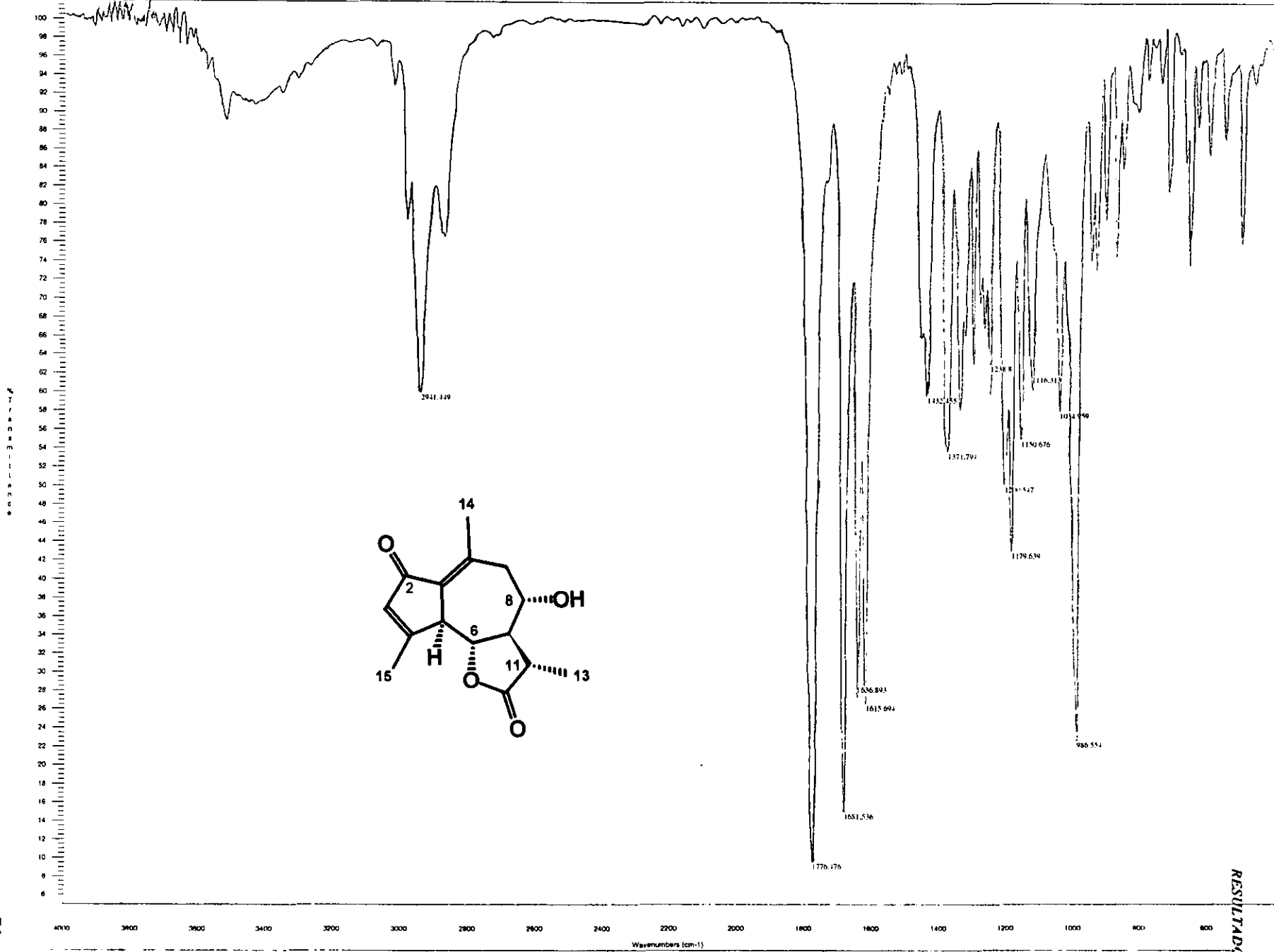
Tabla XII. Constantes espectroscópicas y espectroméricas de la desacetilmatricarina.	
Masas (Espectro 7)	PM 262 [M], 246 [$M^+ - 16$], 231 [$M^+ - 16 - 15$]
IR ν_{max} (KBr) cm^{-1} (Espectro 8)	2941, 1432, 986 (C-H); 1681, 1636, 1615 (C=C); 1776 (C=O); 1179, 1238, 1200, 1150, 1116, 1034 (C-O).

RMN- ¹ H (Espectro 9)	6.16 (d, $J_{3-15}=2.5$ Hz, H-3); 3.38 (d, $J_{5-6}=10.2$ Hz, H-5); 3.61 (t, $J_{5-6}=10.2$ Hz, H-6); 2.13 (d, $J_{6-7}=10.5$ Hz, H-7); 3.80 (t, $J_{7-8\beta}=10.3$ Hz, H-8 β); 2.37 (d, $J_{8\beta-9\alpha}=11$ Hz, H-9 β); 2.80 (d, $J_{8\beta-9\beta}=2$ y $J_{9\alpha-9\beta}=14.1$ Hz, H-9 α); 2.60(d, $J_{7-11}=11.6$ Hz, H-11); 1.54(d, $J_{11-13}=6.8$ Hz, H-13); 2.42(s, H-14); 2.34(d, H-15);
RMN- ¹³ C (Espectro 10)	195.92(C-2), 177.53(C-12), 169.92(C-4), 152.09(C-10), 135.55(C-3), 131.88 (C-1), 84.21(C-6), 56.38(C-8), 52.56(C-7), 51.96(C-5), 41.11(C-9), 37.55(C-11), 25.97(C-14), 19.25(C-15), 12.25(C-13).

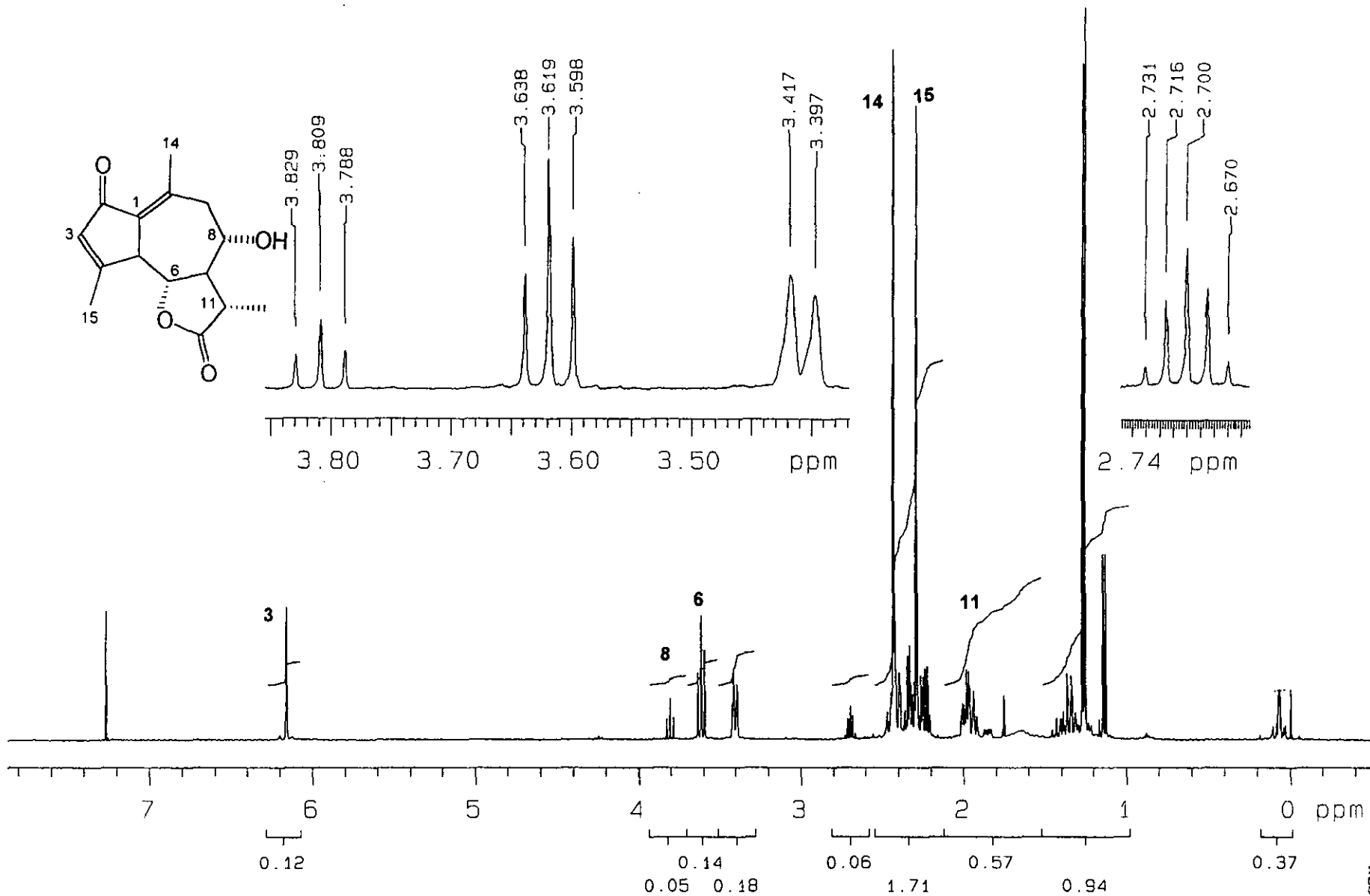


Espectro 7. EIME de la desacetilmatricarina

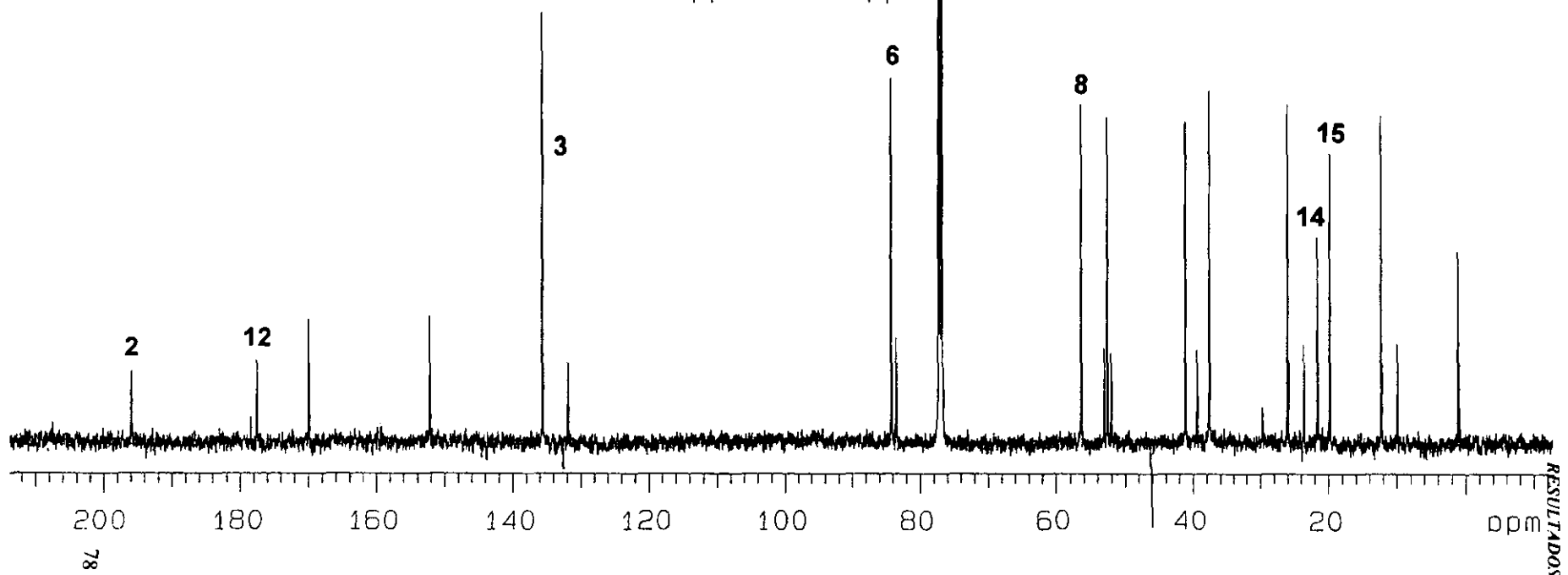
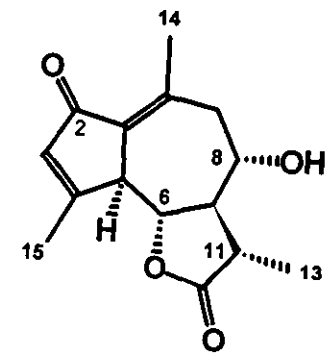
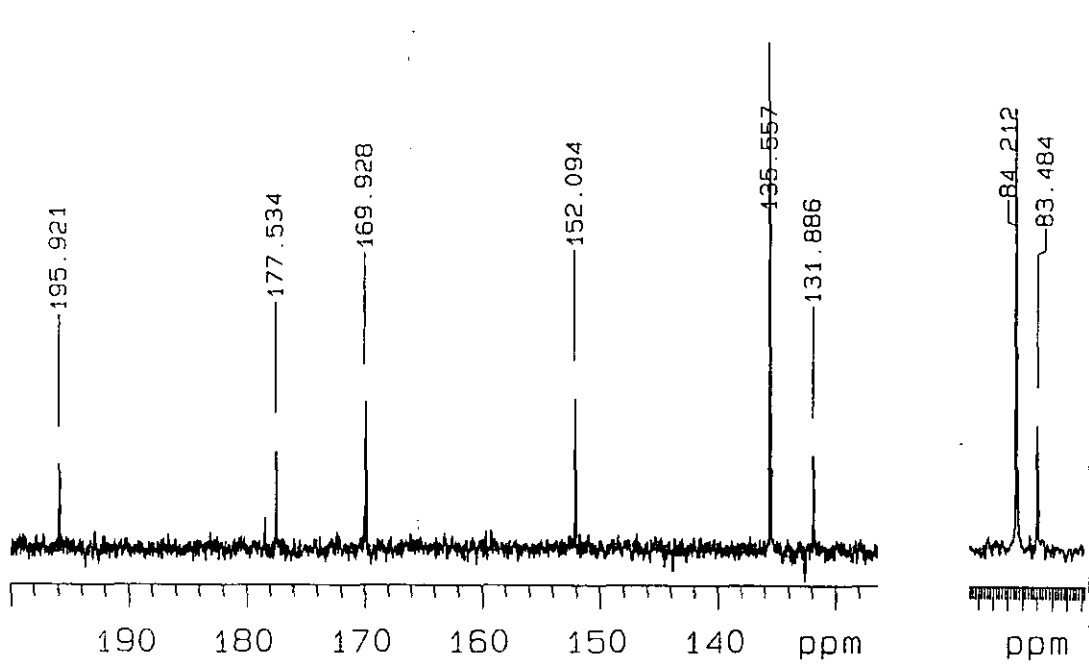
Transmittance



Espectro 8. IR de la desacetylmatricarina



Espectro 9. RMN-¹H de la desacetilmatricarina



Espectro 10. RMN-¹³C de la desacetilmatricarina

RESULTADOS

7.6. Determinación de los constituyentes presentes en el extracto metanólico de *A. millefolium*

7.6.1. Aislamiento de la 7-metoxi-3,5,4'-trihidroxi flavona y 5-hidroxi-3,6,7,3',4'-pentametoxiflavona

Se procedió al aislamiento de los productos mayoritarios presentes en la fracción V (Tabla XIII); en las fracciones restantes estaban presentes los compuestos: β -amirina, β -sitosterol, arabinosa, sacarosa y β -D-glucositolsterol.

Tabla XIII. Rendimiento de los flavonoides aislados del extracto metanólico de *Achillea millefolium*.

Compuesto	Cantidad obtenida por 10 g de extracto metanólico.	% en relación a 250 g de peso seco de la planta
7-metoxi-3,5,4'-trihidroxi flavona	5 mg	0.020%
5-hidroxi-3,6,7,3',4'-pentametoxiflavona	5 mg	0.020%

Por otra parte, la fracción V presentó, de forma característica, dos compuestos mayoritarios de tipo flavonol detectados con H_2SO_4 al 10% (agente cromogénico) y posteriormente, se procedió a la separación vía cromatografía preparativa, empleando como sistema de elución Hex-AcOEt (55:45), lo que permitió el aislamiento de un primer compuesto con peso molecular de 300, con fórmula molecular $C_{16}H_{12}O_6$ y cuya estructura molecular se determinó por el análisis de sus datos de RMN¹H (espectro 12) y espectro de masas (espectro 11)(Tabla XIV). Estos datos permitieron identificarlo como 7-metoxi-3,5,4'-trihidroxi flavona (Figura

21). En la figura 22 se muestra el esquema de fragmentación típico para este tipo de compuestos.

Con la finalidad de determinar inequívocamente la ubicación de los grupos hidroxilos en la molécula, se realizó la acetilación de ésta empleando para ello anhídrido acético y piridina, el resultado de este proceso permitió obtener el derivado triacetilado que se aprecia en el espectro 13.

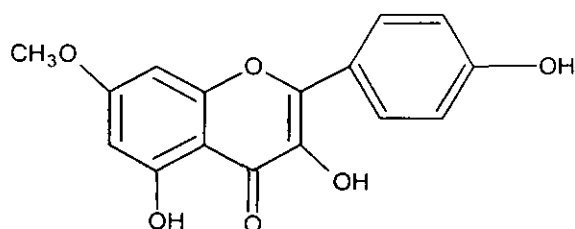


Figura 21. Estructura de la 7-metoxi-3,5,4'-trihidroxi flavona.

Tabla XIV. Constantes espectroscópicas y espectrométricas de la 7-metoxi-3,5,4'-trihidroxi flavona.	
Masas (Espectro 11)	PM 300 [M], 166, 167, 138, 118, 121, 94, 93.
RMN- ¹ H (Espectro 12)	7.85 (d, J _{2'-6} =8.7 Hz, H-2' y H-6'); 6.97 (d, J _{3'-5} =9.0 Hz, H-3' y H-5'); 6.45 (d, J=1.8 Hz, H-8); 6.20 (d, J=1.5 Hz, H-6)

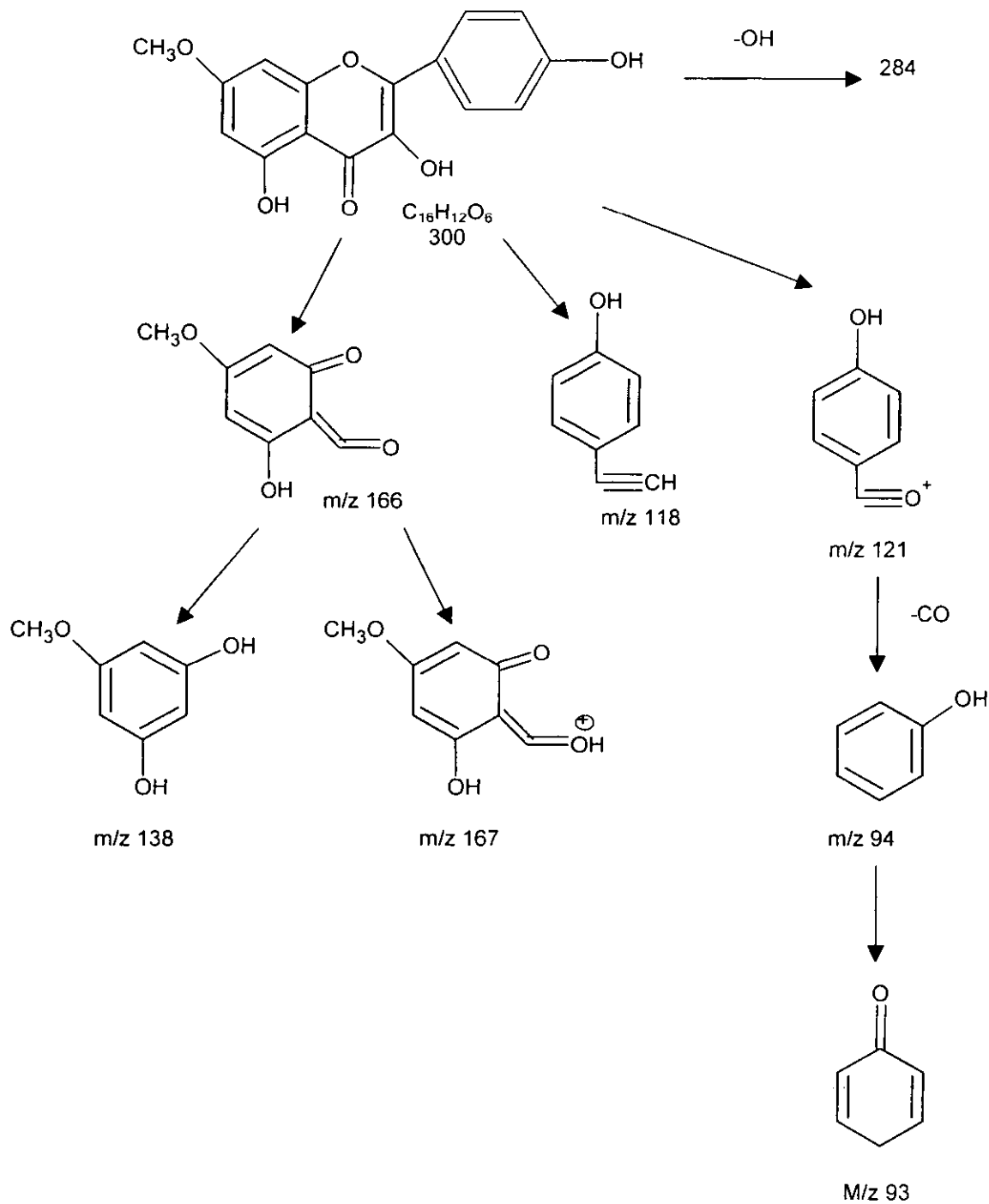
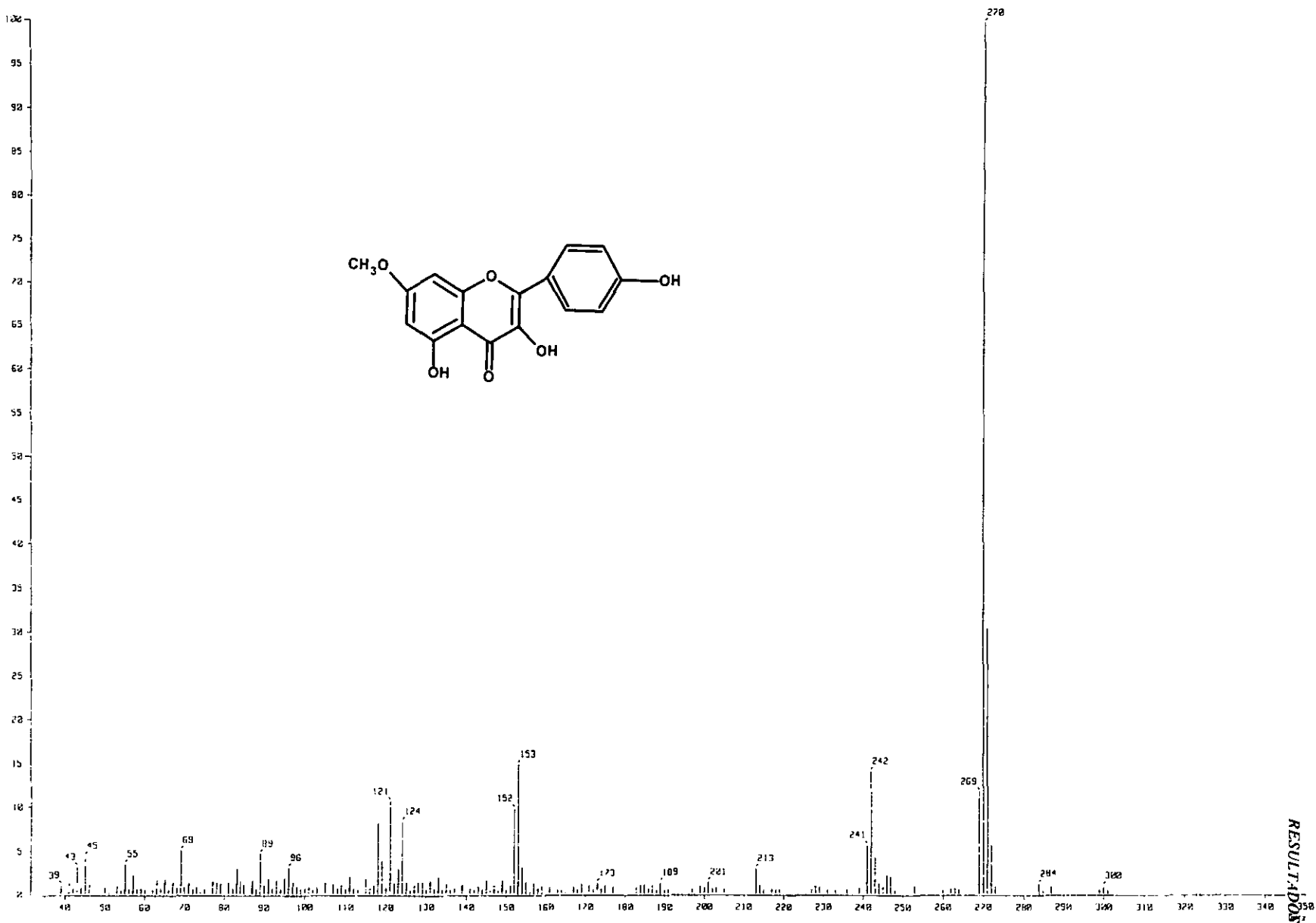
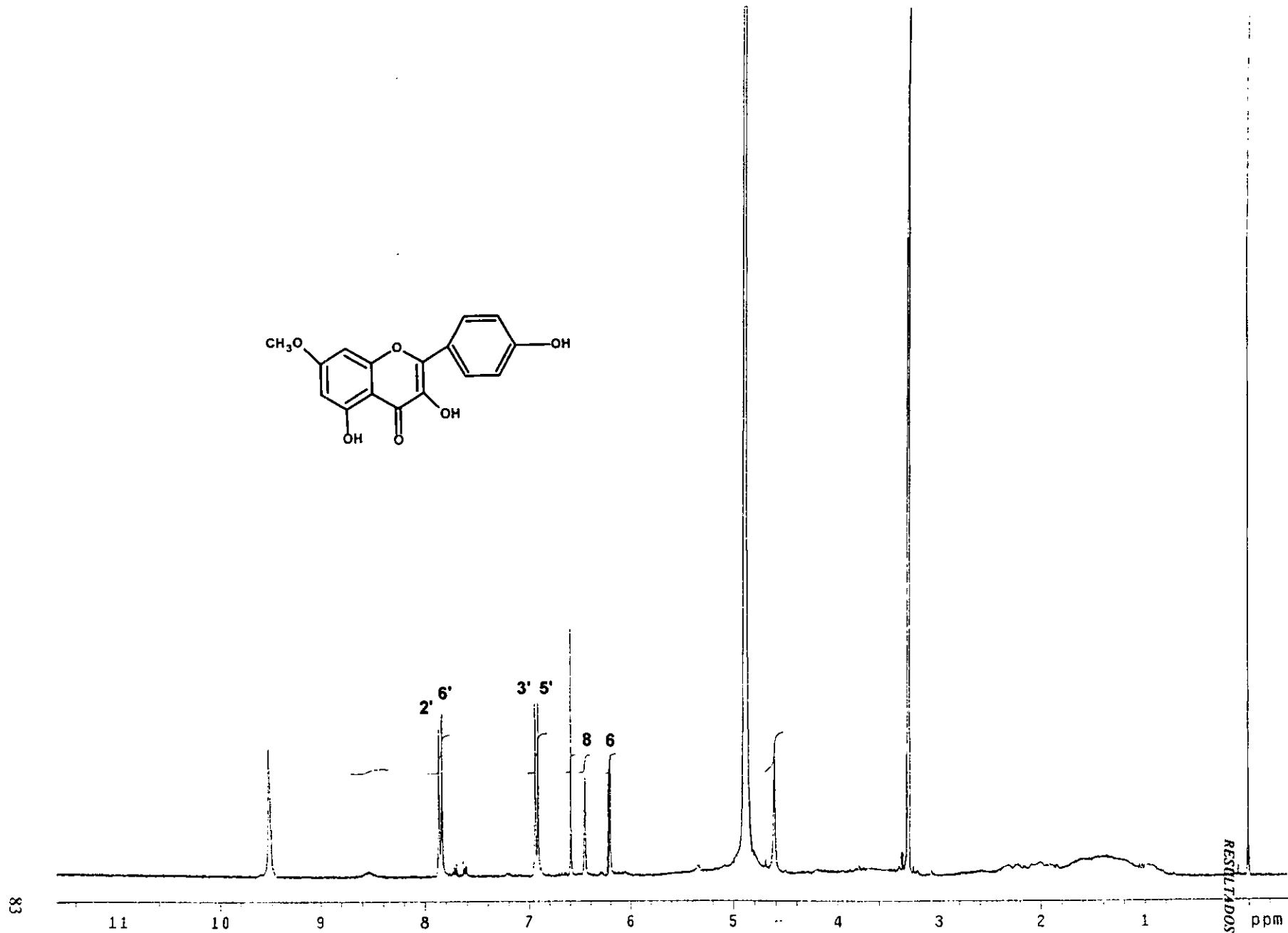
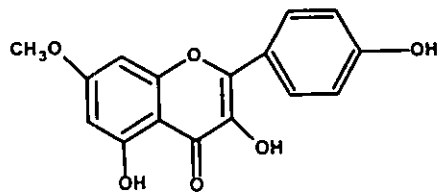


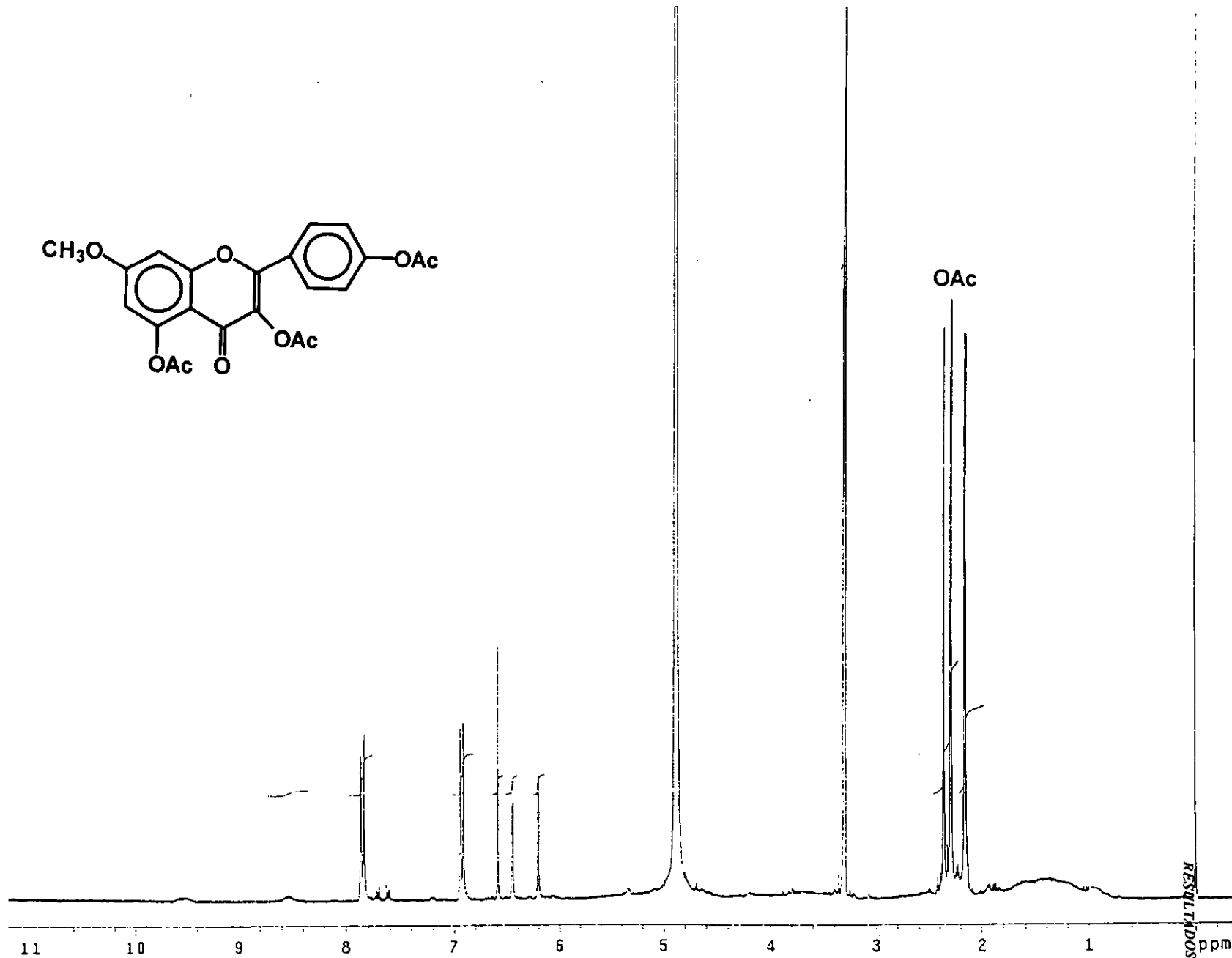
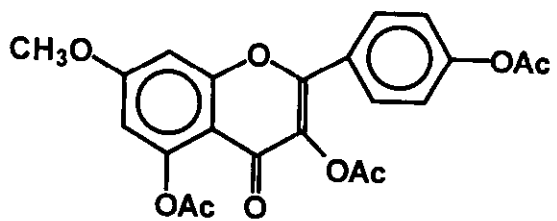
Figura 22. Patrón de fragmentación del 7-metoxi-3,5,4'-trihidroxi-flavona



Espectro 11. EIME de la 7-metoxi-3,5,4'-trihidroxi flavona



Espectro 12. RMN-¹H de la 7-metoxi-3,5,4'-trihidroxi-flavona



Espectro 13. RMN-¹H de la molécula acetilada de la 7-metoxi-3,5,4'-trihidroxi flavona

Otro de los flavonoides aislados de la fracción V, fue un compuesto con un peso molecular de 388 (Espectro 14) y una fórmula $C_{20}H_{20}O_8$. Al analizar los datos del espectro de RMN^1H (Espectro 15), se detectó la presencia de una segunda flavona con cinco grupos metoxilos, al comparar los datos de RMN^1H con los reportados en la literatura (Ahmed et al, 1989), se identificó al compuesto como 5-hidroxi-3,6,7,3',4'-pentametoxiflavona (Figura 23). Los datos espectroscópicos y espectrométricos se muestran en la Tabla XV y el patrón de fragmentación típico para este compuesto se indica en la Figura 24.

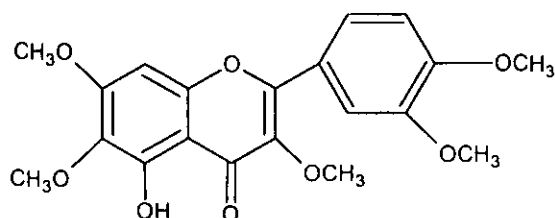


Figura 23. Estructura de la 5-hidroxi-3,6,7,3',4'-pentametoxiflavona

Tabla XV. Constantes espectroscópicas y espectrométricas de la 5-hidroxi-3,6,7,3',4'-pentametoxiflavona.	
Masas (Espectro 14)	PM 388 [M], 387 [M ⁺ -H], 345[M ⁺ -CH ₃ CO], 196, 197, 170, 138, 162, 165.
RMN^1H (Espectro 15)	7.72 (s, H-2'); 7.12 (d, J=9.0 Hz, H-5); 6.81 (H-8); 3.94 (H-7); 3.92 (H-4'); 3.92 (H-3'); 3.83 (H-6); 3.82 (H-3).

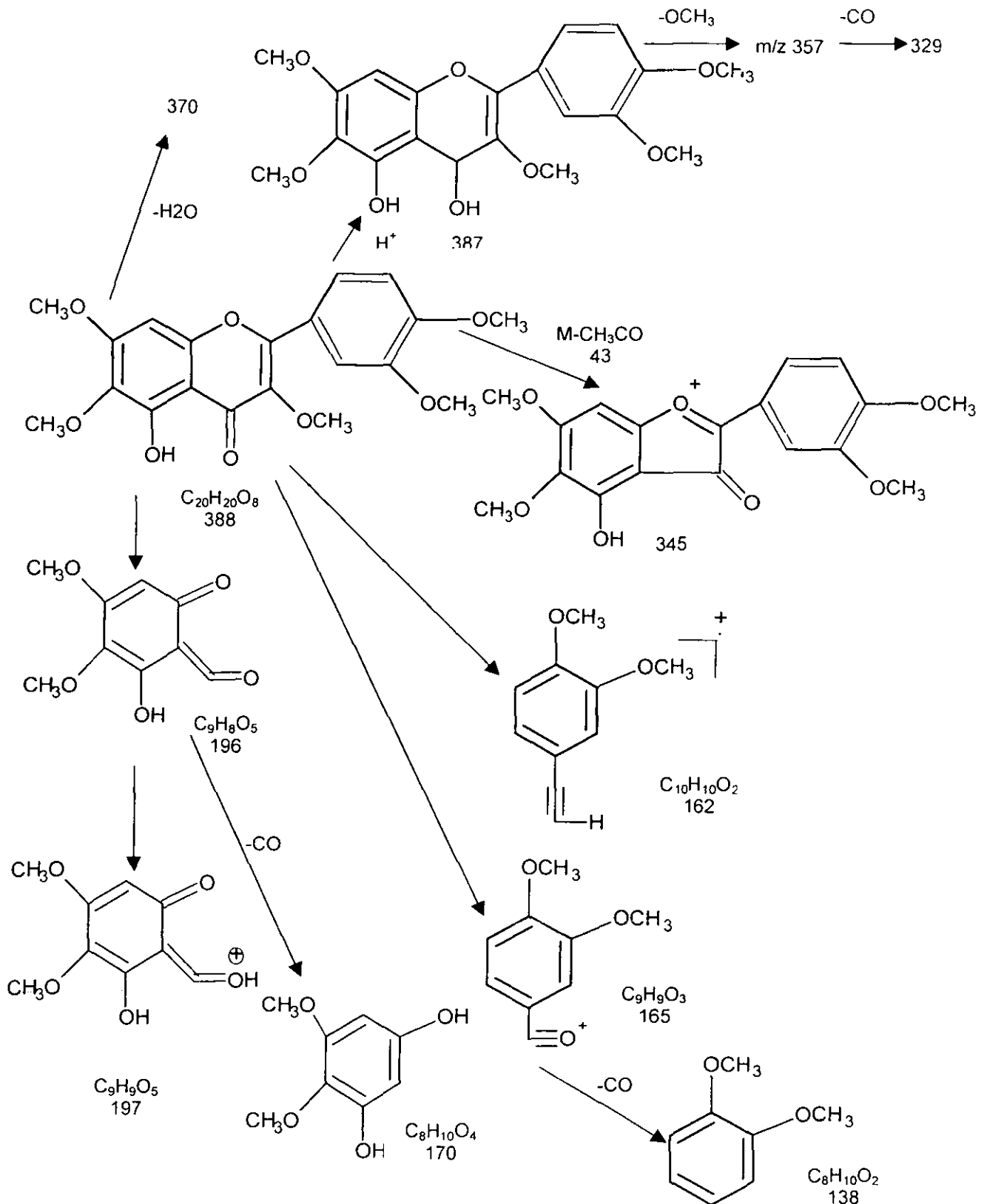
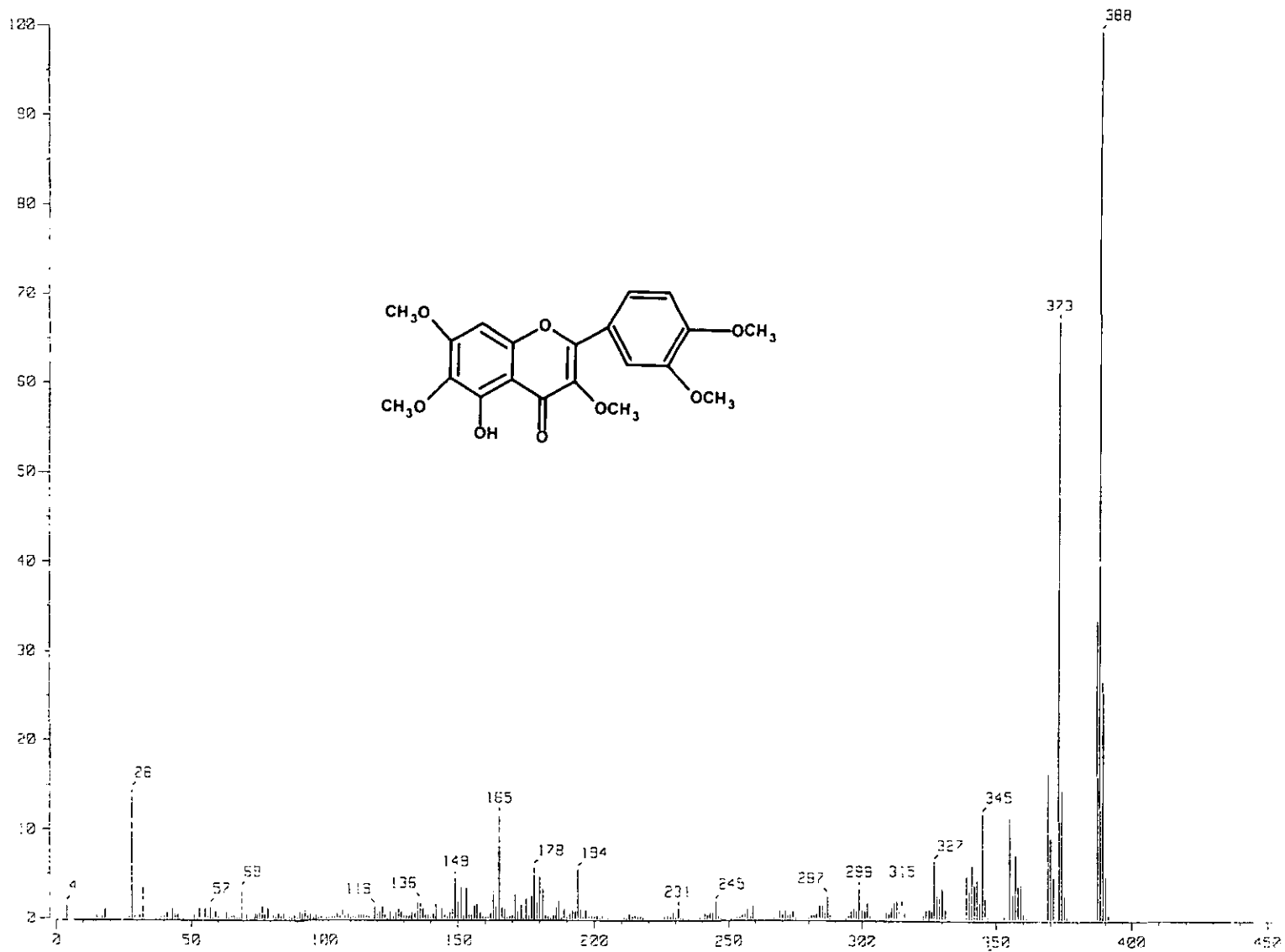
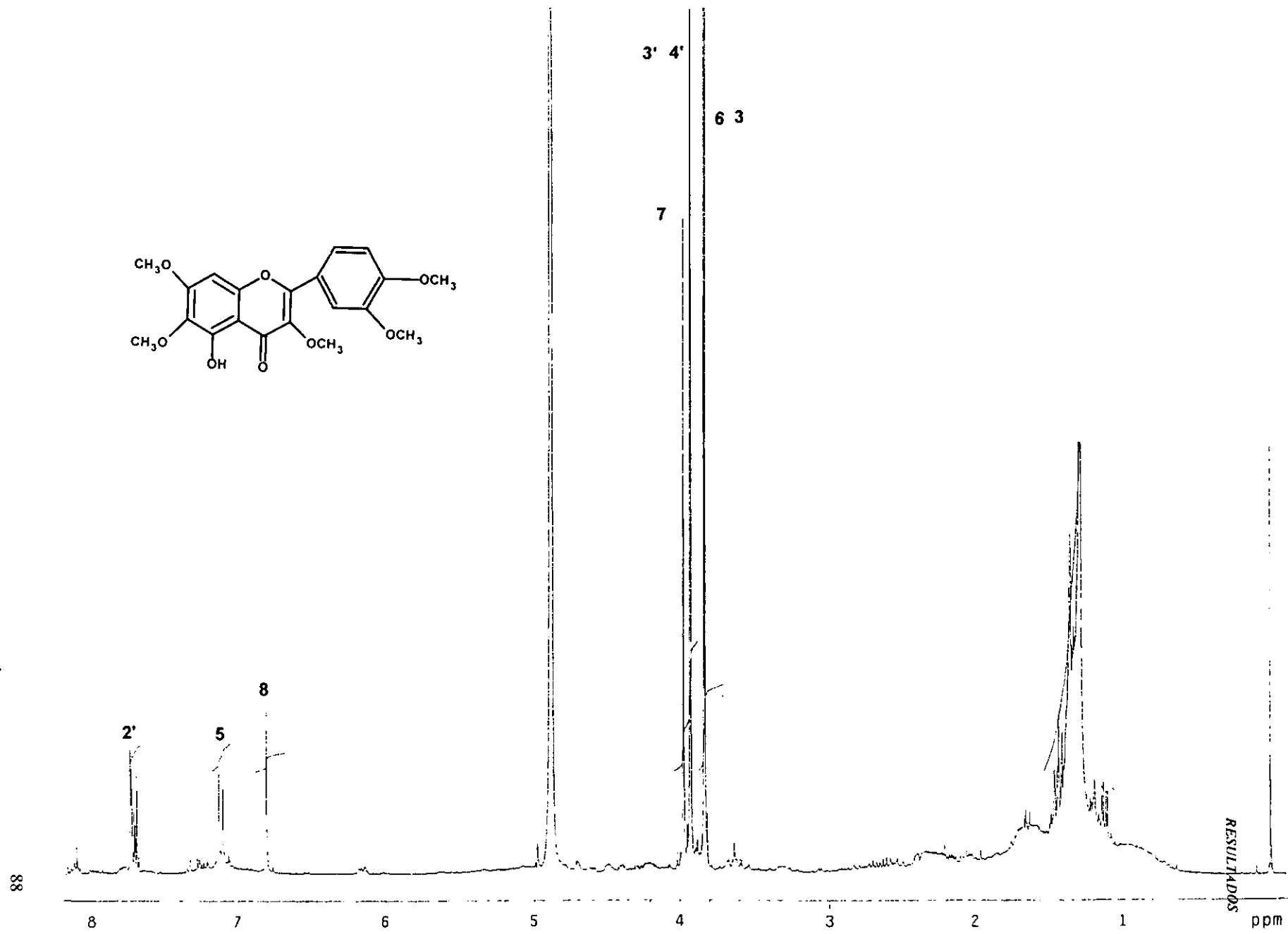
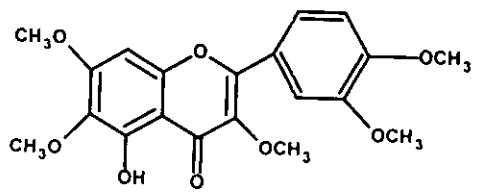


Figura 24. Patrón de fragmentación del 5-hidroxi-3,6,7,3',4'-pentametoxiflavona



Espectro 14. EIME de la 5-hidroxi-3,6,7,3',4'-pentametoxilavona.



Espectro 15. RMN-¹H de la 5-hidroxi-3,6,7,3',4'-pentametoxiflavona

7.7. Evaluación biológica de los compuestos aislados del extracto hexánico y metanólico de *A. millefolium*

Los compuestos aislados de las fracciones D, E, F, G y H del extracto hexánico, fueron sometidos a evaluación antimicobacteriana, empleando como microorganismo de prueba a *M. tuberculosis* H37Rv y el micrométodo colorimétrico de Alamar azul.

La β -amirina, β -sitosterol, leucodina, matricarina y desacetilmatricarina, obtenidas del extracto hexánico de *A. millefolium*, no presentaron actividad inhibitoria sobre *M. tuberculosis*, a la máxima concentración evaluada (200 μ g/mL).

Por otra parte los compuestos 5-hidroxi-3,6,7,3',4'-pentametoxiflavona y 7-metoxi-3,5,4'-trihidroxiflavona, aislados de la fracción V del extracto metanólico, no presentaron actividad antimicobacteriana, a la concentración de 200 μ g/mL.

7.8. Determinación de la actividad inmunomoduladora de los extractos de *Achillea millefolium*

Con base en los resultados obtenidos en la determinación de la actividad antimicobacteriana de los extractos hexánico, metanólico y acuoso de *Achillea millefolium*, se decidió explorar el potencial inmunomodulador de estos extractos. Esta actividad biológica nos permite de manera preliminar explorar si la especie medicinal *A. millefolium* biosintetiza compuestos capaces de alterar en forma positiva o negativa la respuesta inmunitaria inespecífica.

En este estudio se determinó el efecto de los extractos aislados de *A. millefolium* sobre la respuesta inmune de tipo inespecífica; la cual es la primera en responder ante un proceso infeccioso, los principales tipos celulares que intervienen en esta respuesta, son los neutrófilos; éste tipo celular va a encargarse de la eliminación de los patógenos, por diversos procesos que tendrán lugar en el fagolisosoma, durante el proceso de fagocitosis.

La destrucción de microorganismos patógenos va a inducir la liberación de sustancias nocivas como aminas vasoactivas, proteasas plasmáticas, metabolitos del ácido araquidónico, etc., que van a desencadenar una respuesta inflamatoria en el tejido adyacente al foco de infección (Wrba y Pecher, 1996).

En este ensayo biológico se empleó como control positivo la ciclosporina, la cual es una sustancia utilizada como inmunosupresor, para evitar y tratar el rechazo de un órgano transplantado (riñón ó hígado), ya que posee un efecto inhibitor selectivo en los linfocitos T y suprime la respuesta celular.

La concentración evaluada en este caso fue de 2.5 mg/mL, la cual presentó una inhibición de la fagocitosis del 100% en los neutrófilos.

Cabe aclarar que se evaluó la viabilidad de los neutrófilos con el colorante azul de Tripano, después de realizada la incubación con los tratamientos, esto fue para determinar que el compuesto no tuviera un efecto citotóxico sobre los neutrófilos y que por ese motivo influyera en el proceso de fagocitosis.

Al evaluarse la viabilidad en todos los casos estudiados, se pudo comprobar que los neutrófilos permanecieron viables aun después de los tratamientos (extractos, fracciones y compuestos); esto nos permitió detectar que los neutrófilos no fueron afectados y que los tratamientos únicamente influenciaron en el proceso de la fagocitosis.

Los resultados de la actividad inmunomoduladora de los extractos, se aprecian en la gráfica 1 y la Tabla XVI, donde se observa que al incubar los neutrófilos por 2 horas en presencia de los extractos a diferentes concentraciones, el número promedio de levaduras fagocitadas (índice fagocítico), fue disminuyendo al ir aumentando la concentración de los tratamientos, respecto al control.

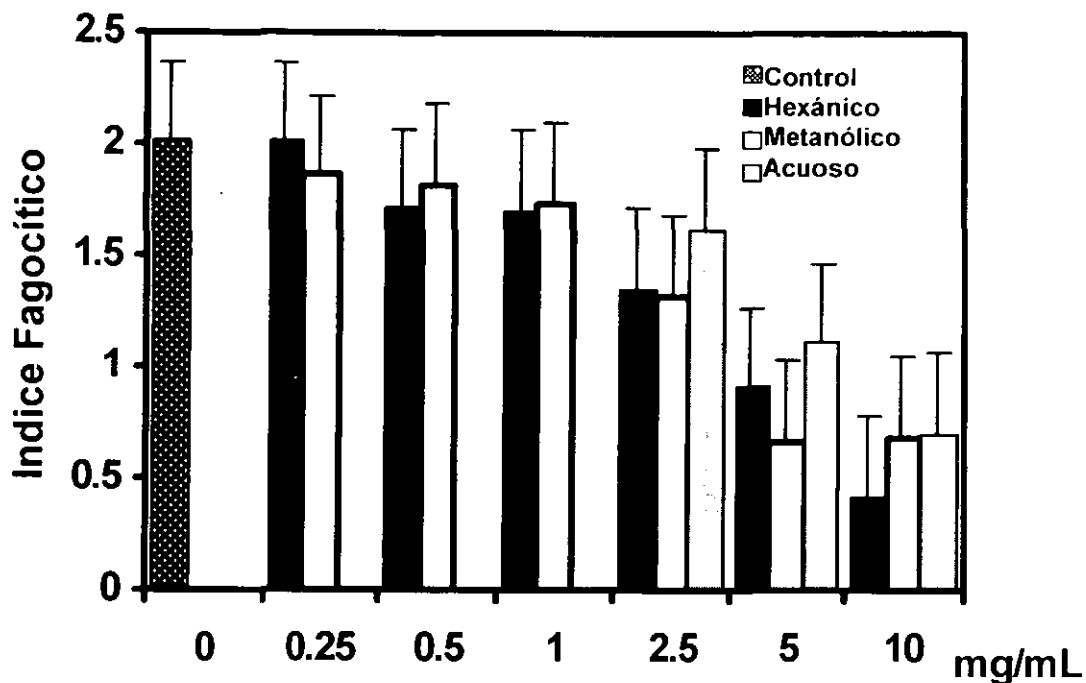
Tabla XVI. Efecto de los extractos de *Achillea millefolium* sobre la actividad fagocítica de los neutrófilos.

Concentración [mg/mL]	% de inhibición de la fagocitosis		
	Ext. hexánico	Ext. metanólico	Ext. acuoso
Control	0	0	0
0.25	4	7	-
0.5	15	9	-
1	15	13	-
2.5	33	34	20
5	55	67	45
10	79	69	65
Control positivo: 2.5 mg/mL de ciclosporina % de inhibición de la fagocitosis 100%			

Los tres extractos inhibieron el proceso fagocítico (Tabla XVI), siendo el extracto hexánico el que presentó una mayor inhibición sobre la fagocitosis, a la concentración de 10 mg/mL. El promedio de levaduras fagocitadas por cada neutrófilo con el extracto hexánico fue de 0.42 levaduras, respecto al control que tuvo un índice fagocítico de 2.01 levaduras (gráfica 1).

Este ensayo preliminar permitió explorar el efecto inmunomodulador, demostrando que el extracto metanólico fue el segundo más activo, presentando un índice fagocítico de 0.69 levaduras por célula a la concentración máxima evaluada de 10 mg/mL; y por último, el extracto que presentó un efecto parecido fue el acuoso, observándose que el promedio de levaduras fagocitadas por cada neutrófilo fue de 0.7.

De acuerdo a los resultados podemos decir que el efecto observado es dependiente de la concentración y que el extracto con mayor actividad es el hexánico.

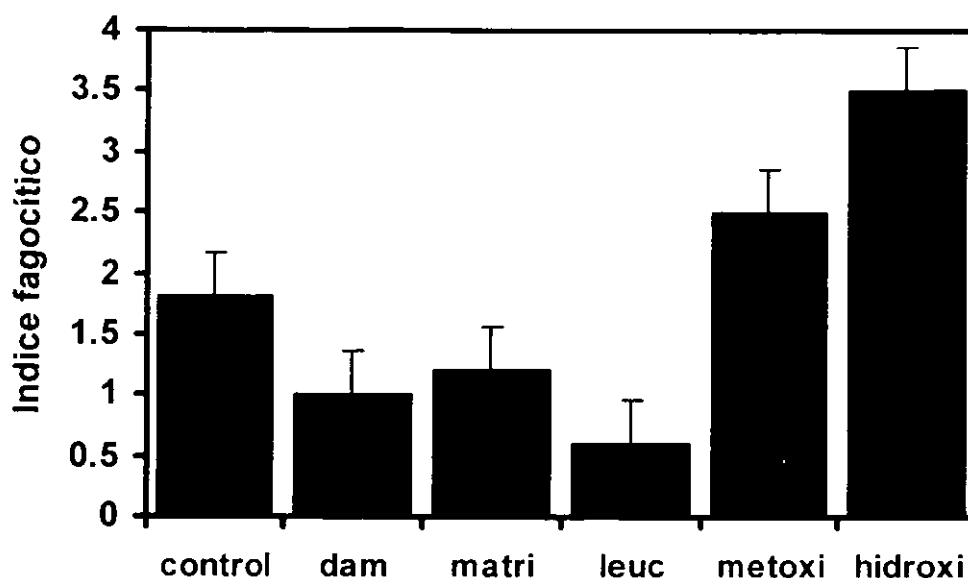


Gráfica 1. Efecto de los tres extractos a diferentes concentraciones de *A. millefolium* sobre la actividad fagocítica de los neutrófilos (índice fagocítico \pm D. S.) en cuatro repeticiones.

7.8.1. Actividad inmunomoduladora de los compuestos aislados de *Achillea millefolium*

Una vez analizados los extractos, se procedió a evaluar, a diferentes concentraciones los compuestos mayoritarios presentes en el extracto metanólico, el cual fue el que presentó la segunda mayor actividad inhibitoria, en el proceso fagocítico de los neutrófilos.

La especie *A. millefolium*, sintetiza compuestos que presentan una actividad inhibitoria sobre el proceso fagocítico de los neutrófilos (lactonas sesquiterpénicas) y otros compuestos (flavonoides), que incrementan la capacidad de fagocitosis de los neutrófilos, como se observa en la gráfica 2.



Gráfica 2. Efecto de 5mg/mL de los compuestos desacetilmatricarina (dam), matricarina (matri), leucodina (leuc), 7-metoxi-3,5,4'-trihidroxi-flavona (metoxi) y 5-hidroxi-3,6,7,3',4'-pentametoxiflavona (hidroxi); sobre la fagocitosis de neutrófilos (valor del control 1.8).

Como se muestra en la Tabla XVII, la incubación de los PMNs por dos horas en presencia de los compuestos: desacetilmatricarina, matricarina y leucodina a 5 mg/mL, da por resultado una inhibición máxima de la capacidad fagocítica de los neutrófilos. El compuesto que causó mayor inhibición fue la leucodina, con una inhibición del 65%, seguido de la desacetilmatricarina con un 45% de inhibición, mientras que la matricarina causó un 33% de inhibición. Como se mencionó anteriormente, los compuestos presentes en este extracto eran los mismos que los que fueron aislados del extracto hexánico, excepto los compuestos presentes en la fracción V los cuales fueron caracterizados como: 7-metoxi-3,5,4'-trihidroxi-flavona y 5-hidroxi-3,6,7,3',4'-pentametoxiflavona, β -glucositolsterol, sacarosa y arabinosa.

De los compuestos detectados en la fracción V y VI, se consideró pertinente evaluar los flavonoides, considerando que este tipo de compuestos alteran el sistema inmunológico (Middleton, 1993), este tipo de estructuras químicas no han

sido reportadas como agentes inmunomoduladores y los pocos trabajos que hay, están relacionados con una actividad parecida y han sido realizados con extractos de tipo acuoso los cuales presentan un efecto inhibitor (Benencia *et al*, 1995 y Courrégés *et al*, 1994).

El extracto metanólico fue el segundo más activo en inhibir la fagocitosis (Tabla XVIII), de ahí que se procediera a evaluar a los dos flavonoles por separado, los cuales presentaron un efecto inmunomodulador de tipo positivo, estimulando la fagocitosis de los neutrófilos, siendo los valores de activación del 38% para el 7-metoxi-3,5,4'-trihidroxisflavona, a una concentración de 5 mg/mL y de 89% para la 5-hidroxi-3,6,7,3',4'-pentametoxiflavona a 5 mg/mL.

Tabla XVII. Efecto de los compuestos de *Achillea millefolium* sobre la capacidad fagocítica de los neutrófilos.

Extracto hexánico		
Compuesto	Concentración	% de inhibición de la fagocitosis
Leucodina	5 mg/mL	65
Matricarina	5 mg/mL	33
Desacetilmatricarina	5 mg/mL	45
ciclosporina*	2.5 mg/mL	94

*Control positivo

Extracto metanólico		
Compuesto	Concentración	% de estimulación de la fagocitosis
7-metoxi-3,5,4'-trihidroxisflavona	5 mg/mL	38
5-hidroxi-3,6,7,3',4'-pentametoxiflavona	5 mg/mL	89

8. DISCUSION

Achillea millefolium fue seleccionada para este estudio tomando en consideración su uso en la medicina tradicional mexicana como remedio para tratar la tuberculosis y la tos. El antecedente sobre los efectos farmacológicos que tiene esta especie y otras del mismo género, indican que *A. millefolium* tiene propiedades antiinflamatorias, antibacterianas, y antifúngicas, entre otras.

Sin embargo, a la fecha no se había explorado la actividad antimicobacteriana de la especie. Esto llevó a proponer el estudio de los efectos antimicobacterianos e inmunomodulador de la especie; iniciando con la evaluación biológica de los extractos hexánico, metanólico y acuoso; posteriormente se realizó el aislamiento de los constituyentes presentes en los extractos activos.

Dentro de los ensayos biológicos mayormente empleados para explorar la actividad antimicobacteriana de sustancias de origen sintético o natural, se encuentra el método radiospirométrico Bactec 460, método que emplea sustancias radioactivas y requiere de mucho tiempo para obtener resultados (más de 14 días), además de tener costos elevados (Fischer, 1996 y Cantrell, 1999). Por esta razón, en este proyecto de investigación, se empleó un método alternativo para determinar la actividad antimicobacteriana de extractos y compuestos de *A. millefolium*. El ensayo biológico de Alamar azul utilizado en el presente estudio presenta ventajas importantes en el rastreo de actividades biológicas en los extractos de productos naturales y por otra parte, es un ensayo sencillo y rápido que permite obtener resultados en menos de 14 días. La estandarización del método del alamar azul, fue parte importante en el desarrollo de este trabajo.

El fraccionamiento químico del extracto más activo (hexánico), permitió obtener 10 fracciones primarias que al momento de ser evaluadas biológicamente, se detectó que la actividad se concentraba en la fracción F, por lo que se procedió al aislamiento de los compuestos obtenidos en ella, sin embargo, también las fracciones D, E, G y H presentaron un efecto inhibitor sobre el crecimiento de *M. tuberculosis* a una concentración mayor que el observado para el extracto.

Dada la actividad observada en las fracciones, se procedió al aislamiento de los compuestos presentes en ellas, proceso que permitió obtener tres lactonas sesquiterpénicas (desacetilmatricarina, matricarina y leucodina), así como de la β -amirina y β -sitosterol; una vez obtenidos los compuestos se procedió a evaluarlos biológicamente, por separado.

Ninguno de los compuestos obtenidos del extracto hexánico inhibieron el crecimiento de *M. tuberculosis* a la máxima concentración evaluada (200 μ g/mL) lo que indica que siendo éstos los compuestos mayoritarios en el extracto, no son los responsables de la actividad biológica cuando se prueban por separado. Es importante mencionar que las estructuras de las lactonas sesquiterpénicas con núcleo germacrano y eudesmano, han demostrado tener una importante actividad antimicobacteriana, debido a que presentan un núcleo α -metilen γ -lactona en la posición 6-7 y/o 7-8, sin embargo, esta actividad se ve incrementada cuando las lactonas sesquiterpénicas presentan un grupo epóxido en los carbonos 4-5 (Fischer *et al*, 1998 y Cantrell *et al*, 1999).

En nuestro caso las lactonas aisladas presentaron un núcleo guaianólido, que no tienen el anillo α -metilen γ -lactona y ni un grupo epóxido. A la fecha estas lactonas, aquí descritas no han sido reportadas como agentes antimicobacterianos, siendo esta investigación la primera en estudiar la actividad antimicobacteriana de estas estructuras. Los pocos trabajos reportados para este tipo de lactonas han sido únicamente de tipo químico y no existe mucha bibliografía respecto a su actividad biológica (Martínez y Zamora, 1988; Ho *et al*, 1998; Tan, 1999 y Romo de Vivar y Olmos, 1968). Lo que se ha reportado, se refiere a su actividad anti-alérgica, pues inhiben el proceso de exocitosis en células cebadas y con ello la liberación de agentes inflamatorios, los cuales contribuyen a los síntomas principales de la respuesta alérgica, como son la formación de edemas y constricción bronquial, principalmente (Ho *et al*, 1998).

Las lactonas que presentan el mismo tipo de núcleo guaianólido, como es el caso de la achillina presentan actividad de tipo antiinflamatoria, Zidorn, 1999 reporta

que cuando se aplica este compuesto reduce el tamaño de un edema, en la oreja de ratones.

Es importante resaltar que en ocasiones la mezcla de los constituyentes es la que presenta la bioactividad, misma que se pierde al separarlos en forma individual. Aunque los resultados en este estudio no son concluyentes, se podría asumir que la actividad inicial del extracto hexánico se debe a la mezcla de los compuestos o bien a la presencia de algún otro compuesto minoritario, aún no detectado.

Del extracto metanólico con una actividad de tipo inhibitoria inicial de 100 µg/mL, contra *M. tuberculosis*, se aislaron en menor cantidad (Tabla XIII) las lactonas arriba descritas, dos flavonoides, el β-glucositolsterol y los azúcares arabinosa y sacarosa. Los flavonoides fueron caracterizados como 7-metoxi-3,5,4'-trihidroxi-flavona y 5-hidroxi-3,6,7,3',4'-pentametoxiflavona. En la literatura no hay reportes sobre la actividad antimicobacteriana de los flavonoides y estos últimos compuestos aislados al ser evaluados biológicamente, no presentaron actividad; lo que sugiere que el efecto del extracto metanólico, al igual que el del extracto hexánico pudiera relacionarse con la presencia de la mezcla de lactonas.

En el proceso infeccioso producido por *Mycobacterium tuberculosis*, el sistema inmunológico no-específico, juega un papel importante para eliminar el microorganismo invasor, afectando la actividad fagocítica de las células polimorfonucleares (neutrófilos). La información etnobotánica sobre el uso de *Achillea millefolium* en el tratamiento de la tuberculosis podría relacionarse con propiedades inmunomoduladoras más que con un efecto específico de la planta sobre la micobacteria.

Por lo anterior, se decidió determinar el efecto inmunomodulador de los extractos sobre la actividad fagocítica de los neutrófilos, empleando para ello un ensayo biológico sencillo, rápido y de bajo costo; el cual permite determinar de manera preliminar el efecto de extractos o compuestos sobre la actividad fagocítica (Benencia *et al*, 1994). En este sentido, la evaluación de los extractos (hexánico, metanólico y acuoso) y de los compuestos puros aislados fueron interesantes. Por un lado tenemos que los extractos presentaron un efecto inhibitor de la

fagocitosis, siendo el extracto hexánico el más activo, seguido del metanólico y por último el acuoso.

En cambio las lactonas sesquiterpénicas inhibieron la actividad fagocítica de los neutrófilos, observándose un comportamiento similar al que mostró la ciclosporina, usada en este estudio como fármaco de referencia. La ciclosporina se ha utilizado en la clínica como un inmunosupresor en los trasplantes de órganos, actuando como un inhibidor de la actividad fagocítica del sistema retículo endotelial.

En la literatura se ha reportado, que este tipo de lactonas, provocan un efecto contrario en otro tipo de células; en este caso se han descrito como agentes anti-alérgicos, la desacetilmatricarina y la leucodina (Ho et al, 1998) atribuyéndose a la primera su mayor actividad inhibitoria la presencia de un grupo hidroxilo en la posición 8, la cual esta ausente en la segunda (Figuras 17 y 20).

Las lactonas sesquiterpénicas aisladas del extracto hexánico de *A. millefolium* inhiben el proceso fagocítico; posiblemente este efecto se debe a que estos compuestos se unen a algunos receptores de los factores quimiotácticos de la superficie de la membrana del neutrófilo, ocasionando que el proceso quimiotáctico sea inhibido y provocando así una disminución de la fagocitosis, como se aprecia en los resultados (Tabla XVII).

Por otra parte, los flavonoides puros presentaron la actividad opuesta, fueron inmunoestimulantes, aunque éstos se encontraban en bajas concentraciones en el extracto metanólico, por lo que el efecto del extracto crudo, se atribuye fundamentalmente, a la presencia de las lactonas.

Respecto a la actividad inmunomoduladora evaluada en este trabajo, no existen reportes respecto a la actividad fagocítica para los flavonoides. Sin embargo, se sabe que los flavonoides en especial la quercetina (ver figura 12) ha sido reportada como un compuesto que inhibe los mecanismos dependientes del oxígeno para eliminar microorganismos, en especial al sistema de la MPO, así como la inhibición de la formación de radicales libres de oxígeno; cabe señalar que esta actividad se atribuye a la presencia de los grupos hidroxilos presentes en la molécula (Middleton y Kandaswami, 1993).

La presencia de los diferentes sustituyentes presentes en los flavonoles, es característica para cada compuesto ya que la 7-metoxi-3,5,4'-trihidroxi-7,8-dihidroflavona presenta un solo grupo metoxilo y tres grupos hidroxilos en su molécula, mientras que la 5-hidroxi-3,6,7,3',4'-pentametoxiflavona tiene un grupo hidroxilo y cinco metoxilos (ver figuras 21 y 23). Esta diferencia estructural hace que la respuesta en la actividad fagocítica se vea incrementada por la presencia de un mayor número de sustituyentes de tipo metoxilo en la estructura molecular, en relación con la estructura que solo presenta un solo grupo metoxilo.

Por otra parte, podríamos decir que los receptores de membrana del neutrófilo reconocen a los flavonoides y posiblemente provocan que funcionen como factores quimiotácticos, permitiendo así que el neutrófilo aumente su capacidad de reconocimiento de las levaduras opsonizadas (Tristram, 1994)

La búsqueda de agentes anti-infecciosos e inmunomoduladores es necesaria particularmente por el incremento de la tuberculosis en el mundo y el aumento de la resistencia de los bacilos que la provocan, y a los fármacos diversos utilizados para su combate. Asimismo es muy importante el estudio inmunomodulador de algunas plantas medicinales utilizadas para controlar las afecciones que podrían relacionarse con la tuberculosis.

9. CONCLUSIONES

1. El extracto hexánico y metanólico de *Achillea millefolium* tienen moderada actividad antimicobacteriana contra la cepa de referencia H37Rv y presentan un efecto inhibitor sobre la fagocitosis de los neutrófilos *in vitro*.
2. Los compuestos aislados del extracto hexánico se caracterizaron estructuralmente como lactonas sesquiterpénicas de tipo guaianólido (desacetilmatricarina, matricarina y leucodina), y como β -sitosterol y β -amirina.
3. Ninguno de los compuestos puros y mayoritarios en este extracto presentó actividad contra la cepa de referencia *M. tuberculosis* H37Rv.
4. Por otro lado, las lactonas sesquiterpénicas provocaron la inhibición del proceso fagocítico de los neutrófilos.
5. Del extracto metanólico, con menor actividad antimicobacteriana que el extracto hexánico, se aislaron las mismas lactonas sesquiterpénicas, más dos flavonoides (7-metoxi-3,5,4'-trihidroxiflavona y 5-hidroxi-3,6,7,3',4'-pentametoxiflavona), β -glucositolsterol y dos azúcares (arabinosa y sacarosa).
6. Los flavonoides no fueron activos contra la cepa de referencia de *M. tuberculosis* H37Rv, pero presentaron actividad inmunoestimulante ya que incrementaron las propiedades fagocíticas de los neutrófilos *in vitro*.

10. LITERATURA CONSULTADA

1. Abate G, Mshana R y Miörner H. Evaluation of a colorimetric assay based on 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) for rapid detection of rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J tuberc lung dis*. 1998; **2**(12): 1011-1016.
2. Aguilar-Contreras A, Camacho-Pulido JR, Chino-Vergas S, Jácquez-Rios P y López-Villafranco ME. Herbario Medicinal del Instituto Mexicano del Seguro Social. Información Etnobotánica. 1994, 1ª edición, México: IMSS, p 253.
3. Aguilar-Contreras A, Camacho-Pulido JR, Chino-Vargas S, Jácquez-Rios P y López-Villafranco ME. Plantas Medicinales del Herbario IMSS: Su distribución por enfermedades. 1998, 1ª edición. México: Grupo Roche syntex de México, S. A. de C.V., p 74.
4. Ahmed A, Ali A, Mbry T. Flavonoid aglycones from *Jasonia montana*. *Phytochemistry*. 1989; **28**(2): 665-667.
5. Alurkar V y Kamat R. Immunomodulatory properties of porins of some members of the family Enterobacteriaceae. *Infection and Immunity*. 1997; **65**(6): 2382-2388.
6. Argueta V A, Cano A LM y Rodarte ME. Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana. Tomo I-III. 1994, México: INI.
7. Bauer R. Herbal Immunomodulators. En: Lozoya X, Gómez E y Bruner M, editores. The phytopharmaceuticals of the next century. 3^{er} Simposio IMSS-Farmasa/Schwabe. 1999, México: Farmasa/Schwabe; p 33-54.
8. Benecia F, Courrèges M, Massouh E y Coulombié F. Effect of *Melia azedarach* L. Leaf extracts on human complement and polymorphonuclear leukocytes. *Journal of Ethnopharmacology*. 1994; **41**: 53-57.
9. Benencia F, Courrèges M, Nores M y Coulombié F. Immunomodulatory activities of *Cedrela tubiflora* leaf aqueous extracts. *Journal of Ethnopharmacology*. 1995; **49**: 133-139.
10. Bisset NG, Herbal Drugs and Phytopharmaceuticals. 1994, London: CRC Press, p 342-344.

11. Cantrell C, Lu T, Fronczek R y Fischer H. Antimycobacterial Cycloartanes from *Borrchia frutescens*. *J. Nat. Prod.* 1996; **59**:1131-1136.
12. Cantrell C, Rajab M, Franzblau S, Fronczek F y Fischer N. Antimycobacterial Ergosterol-5,8-endoperoxide from *Ajuga remota*. *Planta Medica.* 1999; **65**: 732-734.
13. Collins L, Franzblau S. Microplate Alamar Blue Assay Versus BACTEC 460 System for High-Throughput Screening of Compounds against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium*. *Antimicrob. Agents and Chemother.* 1997; **41**(5): 1004-1009.
14. Courrèges M, Benecia F, Coto C, Massouh E y Coulombié F. In vitro antiphagocytic effect of *Melia azedarach* leaf extracts on mouse peritoneal exudate cells. *Journal of Ethnopharmacology.* 1994; **43**:135-140.
15. Chan J, Fan X, Hunter S, Brennan P y Bloom B. Lipoarabinomannan a possible virulence factor involved in persistence of *Mycobacterium tuberculosis* with macrophages. *Infect. Immun.* 1991; **59**: 1755-1761.
16. Chan J, Kaufmann H. Immune Mechanisms of protection: from tuberculosis pathogenesis, protection and control. 1994, Washington D. C: ASM Press, p 393.
17. Chandler R, Hooper S y Harvey M. Ethnobotany and phytochemistry of Yarrow, *Achillea millefolium*, Compositae En: Economic Botany. Vol. 36, no. 2, 1982, New York: Botanical Garden, p 203-223.
18. Das, M y Mahato S. Triterpenoids. *Phytochemistry.* 1983; **22** (5): 1071-1095.
19. Deutekom H, Gerritsen J, van Soolingen D, van Ameijden E, van Embden J y Coutinho A. A molecular Epidemiological Approach to studying the transmission of tuberculosis in Amsterdam. *Clinical Infectious Disease.* 1997; **25**: 1071-1077.
20. Diasio R y LoBuglio A. Inmunomoduladores: fármacos inmunosupresores e inmunoestimulantes. En: Goodman & Gilman A, Ruddon R, Molinof P, Limbird L y Hardman J, editores. Las bases farmacológicas de la terapeutica, Vol II. 1996, México: McGraw-Hill interamericana, p 1371-1387.
21. Dye C, Scheele S, Dolin P, Pathania V y Raviglione M. Global Burden of Tuberculosis. *JAMA.* 1999; **282**:667-685.

22. Ellner J. Patogénesis e inmunología En: Rossman M, editor. Tuberculosis. Asistencia Clínica y Nuevos desafíos. 1996, México: Mc Graw-Hill-Interamericana, p 16-36.
23. Ellof J. Which extracts should be used for the screening and isolation of antimicrobial components from plants? *Journal of Ethnopharmacology*. 1998; **60**: 1-8.
24. Fine P. Immunities in and to tuberculosis. Implications for pathogenesis and vaccination. In: Porter J. D. H. y McAdam K. P. W, editores. Tuberculosis: Back to the Future. 1994, John Wiley & Sons Ltd, p 53-78.
25. Fischer N, Lu T, Cantrell C, Castañeda-Acosta J, Quijano L y Franzblau S. Antimycobacterial evaluation of germacranolides. *Phytochemistry*. 1998; **49**:559-564.
26. Fischer NH. Structure and activity of anti-tuberculosis natural products. *Rev. Latinoamer. Quím*. 1996; **24**: 65-68.
27. Fransworth N, Akerele O, Bingel A, Soejarto D y Guo Z. Medicinal plants in therapy. *Bulletin of the World Health Organization*. 1985; **63**(6): 965-981.
28. Franzblau S, Witzig R, McLaughlin J, Torres P, Madico G, Hernández A, Degnan M, Cook M, Quenzer V, Ferguso R y Gilman R. Rapid, low-technology MIC determination with clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates by using the microplate alamar blue assay. *Journal of Clinical Microbiology*. 1998; **36**(2): 362-366.
29. Gomez-Flores R, Gupta S, Tamez-Guerra R y Metha R. Determination of MICs for *Mycobacterium avium*-M. intracellulare Complex in liquid Medium by a Colorimetric Method. *Journal of Clinical Microbiology*. 1995; **33**(7): 1842-1846.
30. Granich M., Balandrano S, Santaella A, Binkin N, Castro K, Anzaldo G, Zarate, Jaimes M, Velazquez-Monroy O, Salazar L, Alvarez-Lucas C, *et al*. Survey of Drug Resistance of *Mycobacterium tuberculosis* in 3 Mexican states 1997. *Arch. Intern. Med*. 2000; **160**(13): 639-644.
31. Hall. Compositae of Southern California. *University of California Publications in Botany*. 1907; **3**: 211.

32. Hamburger M y Hostettmann. Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. *Phytochemistry*. 1991; **30**(12): 3864-3874.
33. Hayward A y Coker R. Could a tuberculosis epidemic occur in London as it did in New York. *Emerging Infectious Diseases*. 2000; **6**(1): 1-5.
34. Ho C, Choi E, Yoo G, Kim K, Ryu S. Desacetylmatricarin, an Anti-allergic component from *Taraxacum platycarpum*. *Planta Medica*. 1998; **64**: 577-578.
35. Huerta C. La Herbolaria: mito o realidad. [última modificación 1999], citado en agosto del 2000. <http://xolo.conabio.gob.mx/biodiversitas/huerta.html>
36. Hwang D, Fischer N, Jang B, Tak H, Kim J y Lee W. Inhibition of the Expresión of inducible Cyclooxygenase and proinflammatory Cytokenes by Sesquiterpene Lactones in Macrophages Correlates with the inhibition of MAP Kinases. *Biochemical and Biophysical research communications*. 1996; **226**: 810-818.
37. Inderlied C B. Antimycobacterial susceptibility testing: present practices and future trends. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis*. 1994; **13**(11): 980-993.
38. Jun C, Pae H, Kim Y, Jeong S, Yoo J, Lee E, Choi B, Chae S, Park R, Chung H. Inhibition of nitric oxide synthesis by butanol fraction of the methanol extract *Ulmus dadiviana* in murine macrophages. *Journal of Ethnopharmacology*. 1998; **62**: 129-135.
39. Kastner S, Gargula K, Budesinsky M, Haslinger E, Juenitsch J y Kubela W. Artabsin and 3.oxa-artabsin derivatives from *Achillea millefolium* Species. *Phytochemistry*. 1994; **36**(6): 1449-1451.
40. Kobaisy M, Abramowski Z, Lermer L, Saxena G, Hancock R y Towers G. Antimycobacterial Polynes of Devil's Club (*Oploplanax horridus*), a North American Native Medicinal Plant. *J. Nat. Prod*. 1997; **60**: 1210-1213.
41. Koneman E, Allen S, Dowell V, Janda W, Sommers H y Washington W. Diagnóstico microbiológico. 1992, México: Panamericana, p 85.
42. Labadie R, van der Nat J, Simons J, Kroes B, Kosasi S, van der Berg A, Hart L, van der Sluis W, Abeysekera A, Bamunuarachchi A y De Silva K. An Ethnopharmacognostic Approach to the Search for immunomodulators of plant origin. *Planta Medica*. 1989; **55**: 339-348.

43. Labadie R. Immunomodulatory compounds. En: Colegate S y Molyneux R, editores. *Bioactive Natural Products*. 1993, London: CRC press, p 279-317.
44. Labro MT. Defensas corporales e infección. 1994, 1ª edición. USA: Hoechst, p 7-17.
45. Lall N y Meyer J. In vitro inhibition of drug-resistant and drug-sensitive strains of *Mycobacterium tuberculosis* by ethnobotanically selected South African plants. *Journal of Ethnopharmacology*. 1999; **66**: 347-354.
46. Lee H, Kim N, Jang M, Son H, Kim K, Sohn D, Lee S, Ryu J. A Sesquiterpene, Dehydrocostus Lactone, Inhibits the expression of inducible nitric oxide synthase and TNF- α in LPS-Activated Macrophages. *Planta Medica*. 1999; **65**: 104-108.
47. Lemaire I, Assinewe V, Cano P, Awang D y Wagner J. Stimulation of interleukin-1 and -6 production in alveolar macrophages by the neotropical liana, *Uncaria tomentosa* (Uña de Gato). *Journal of Ethnopharmacology*. 1999; **64**: 109-115.
48. Mandell G y Petri W. Fármacos antimicobacterianos. En: Goodman & Gilman A, Ruddon R, Molinof P, Limbird L y Hardman J, editores. *Las bases farmacológicas de la terapéutica*, Vol II. 1996, México: McGraw-Hill interamericana, p 1225-1245.
49. Marles R, Pazos-Sanoa L, Compadre C, Pezzuto J, Bloszyk E y Arnason T. Sesquiterpene Lactones Revisited En: Arnason T, *et al*, editores. *Phytochemistry of Medicinal Plants*. 1995, New York: Plenum Press, p 334-351.
50. McCutcheon AR, Ellis SM, Hancock REW y Towers GHN.. Antibiotic screening of medicinal plants of the British Columbian native peoples. *Journal of Ethnopharmacology*. 1992; **37**: 213-223.
51. McNeil M, Besra G y Brennan P. Chemistry of the Mycobacterial cell wall En: Rom W, editor. *Tuberculosis*. 1996, 1ª edición. Nueva York: Little, Brown and Company, p 179.
52. Middleton E. y Kandaswami C. The impact of plant flavonoids on mammalian biology: implications for immunity, inflammation and cancer. En: Harborne JB,

- editor. The flavonoids: Advances in research since 1986. 1993, London: Champan & Hall, p 620-653.
53. Nachabur D, Herold M, Eibl B, Glassl H, Schwaighofer H, Huber C, Gächter A. A comparative study of the in vitro immunomodulatory activity of human intact immunoglobulin (7S IVIG), F (ab')₂ fragments (5S IVIG) and Fc fragments. Evidence for post-transcriptional IL-2 modulation. *Immunology*. 1997; **90**: 212-218.
54. Nester E, Roberts C, Pearsall N, Anderson D, Nester M. Microbiology a human perspective. 1998, 2ª edición. USA: Mc Graw-Hill, p 233-537.
55. Okunade A, Clark A, Hufford C y Oguntimein B. Azzantraquinone: An antimicrobial Alkaloid from *Mitracarpus scaber*. *Planta Medica*. 1999; **65**: 447-448.
56. Ounis I. Determination of the antiinfectious activity of RU 41740 (Biostim) as an Example of an immunomodulator. En: Friedman H *et al*, editores. Microbial Infections. 1992, New York: Plenum Press, p. 165- 175.
57. Pilheu JA. Tuberculosis 2000: problems and solutions. *Int. J. Tuberc. Lung Dis*. 1998; **2**(9): 696-703.
58. Proyecto de modificación a la norma oficial mexicana NOM-006-SSA2-1993, Para la prevención y control de la tuberculosis en la atención primaria a la salud. 1998, México: S.S.A. p 1-22.
59. Rahman S, Fukamiya N, Okano M, Tagahara K y Lee K. Anti-tuberculosis Activity of Quassinoids. *Chem. Pharm. Bull*. 1997; **45**: 1527-1529.
60. Rajab M, Cantrell C, Franzblau S y Fischer N. Antimycobacterial Activity of (E)-Phytol and derivates: A preliminary Structure-Activity Study. *Planta Medica*. 1998; **64**: 2-4.
61. Rattan A; Kalia A, y Ahmad N. Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis*: Molecular Perspectives. *Emerging infectious Diseases*. 1998; **4**: 1-18.
62. Raviglione M, Snider D y Kochi A. Global Epidemiology of Tuberculosis. *JAMA*. 1995; **273**(3): 220-226.

63. Rezaeipoor R, Saeidnia S y Kamalinejad M. Immunosuppressive activity of *Achillea talagonica* on humoral immune responses in experimental animals. *Journal of Ethnopharmacology*. 1999; **65**: 273-276.
64. Romo de Vivar A y Olmos F. Estudio químico de *Achillea millefolium* L. *Rev. Soc. Quím. Méx.* 1968; **12**(5): 212A - 213A.
65. Schlesinger L, Hull S y Kaufman T. Binding of the Terminal mannosyl Units of lipoarabinomannan from a virulent strain of *Mycobacterium tuberculosis* to Human Macrophages. *Journal of immunology*. 1994, **152**: 4070-4078.
66. Slots J y Taubman MA. Contemporary Oral Microbiology and Immunology. 1992, Chicago: Mosby Year Book. p 135.
67. Spitznagel J y Jacobs W. Micobacterias: tuberculosis y lepra En: Eisenstein B y Guerra H, editores. Microbiología. Mecanismos de las enfermedades infecciosas. 1994, 2ª edición, Buenos Aires: Panamericana, p 337-344.
68. Tan R, Wolfender J, Tu T, Zheng W, Yang L, Gafner S, Hostettmann K. Mono- and sesquiterpenes and antifungal constituents from *Artemisia* species. *Planta Medica*. 1999, **65**: 64-67.
69. Tiballi R, He X, Zarins L, Revankar S y Kauffman C. Use of a colorimetric system for yeast susceptibility testing. *Journal of Clinical Microbiology*. 1995; **33**(4):915-917.
70. Tozoy T, Yoshimura Y, Sakurai K, Uchida N, Takeda Y, Nakai H y Ishii H. Novel Antitumor Sesquiterpenoids in *Achillea millefolium*. *Chem. Pharm. Bull.* 1994; **42**(5): 1096-1100.
71. Tristram G. Fagocitos: neutrófilos y macrófagos. En: Stiles D, Abba I, Tristram G, editores. Inmunología básica y clínica. 1994, México: Manual moderno, p 13-27.
72. Tunón H, Thorsell W y Bohlin L. Mosquito Repelling Activity of Compounds occurring in *Achillea millefolium* L. (Asteraceae). *Economic Botany*. 1994; **48** (2): 111-120.
73. Ulubelen A, Topcu G y Johansson C. Norditerpenoids from *Salvia multicaulis* with Antituberculosis Activity. *J. Nat. Prod.* 1997; **60**:1275-1280.

74. Van Der Nat JM, Klerx, Van Dijk H De Silva K y Labadie R. Immunomodulatory activity of an aqueous extract of *Azadirachta indica* stem bark. *Journal of Ethnopharmacology*. 1987; **19**: 125-131.
75. Wächter G, Franzblau S, Montenegro G, Suarez E, Fortunato H, Saavedra E y Timmermann N. A new Antitubercular Mulinane Diterpenoid from *Azorella madreporica* Clos. *J. Nat. Prod.* 1998; **61**: 965-968.
76. Wagner H y Proksch A. Immunostimulants and adaptogens from plants. En: Arnason J, Mata R, Romeo J, editores. *Phytochemistry of Medicinal Plants*. vol 29. 1995, New York: Plenum Press, p 1-17.
77. Wagner H y Proksch A. Immunostimulatory Drugs of Fungi and Higher Plants En: *Economic and Medicinal plant Research*. Vol. I. 1985, London: Academic Press Inc., p 113-153.
78. Wagner H, Blatt S y Zgainski EM. *Plant Drug Analysis*. 1984, Berlin: Springer-Verlag, p. 320.
79. Walker S. *Microbiología*. 1999, 1ª edición. México: Mc Graw-Hill Interamericana, p 190-196.
80. Warren y Body. *Bacteriología y Diagnóstico*. En: Rossman M, editor. *Tuberculosis. Asistencia Clínica y Nuevos desafíos*. 1996, México: Mc Graw-Hill-Interamericana, p 37-39.
81. Weidman J. *Mycobacterium tuberculosis*. [última modificación 1999], citado 28 marzo 2001. <http://www.plu.edu/~weidmaja>
82. Wrba H y Pecher O. *Enzimas. Sustancias del futuro*. 1996, España: Edika Med, p 64-77.
83. Yajko D, Majed J, Lancaster M, Sanders C, Cawthon L, Gee B, Babst A y Hadley K. Colorimetric Method for determining MICs of antimicrobial agents for *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Clinical Microbiology*. 1995; **41**(5): 1004-1009.
84. Zidorn C, Dirsch V, Rüngeler P, Sosa S, Loggia RD, Melfort I, Pahl H, Vollmar A y Stuppner H. Anti-Inflammatory Activities of Hypocretenolides from *Leontodon hispidus*. *Planta Medica*. 1999; **65**: 704-708.