



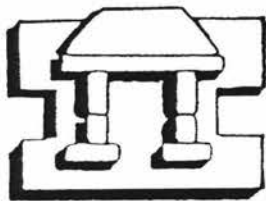
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA

ESTUDIO QUIMICO DE *Chamaedora tepejilote* Liebm ex
Mart CON ACTIVIDAD ANTITUBERCULOSA

PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G O
P R E S E N T A :
VICTOR HUGO ALVAREZ PEREZ

DIRECTORA DE TESIS: DRA. MARIA ADELINA JIMENEZ ARELLANES



IZTACALA

MEXICO, D. F.

2002



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.



U.N.A.M. CAMPUS



El presente trabajo se realizó en **La Unidad de Investigación Médica de Farmacología de Productos Naturales del Hospital de Pediatría, CMN SXXI, IMSS** bajo la asesoría de la Doctora María Adelina Jiménez Arrellanes.

Este trabajo fue financiado por CONACyT Proyecto No. 30702-N

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Mariana Meckes, jefa de la Unidad de Investigación Médica en Farmacología de Productos Naturales del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI (IMSS), lugar donde se realizó el presente trabajo y por las facilidades otorgadas.

A CONACyT por el financiamiento otorgado a través del proyecto N^o 30702-N.

A la Dra. María Adelina Jiménez Arellanes por dirigir este trabajo de Tesis y contribuir en nuestra formación académica, por su paciencia y ayuda que siempre mostró “Muchas gracias Doctora”

A la Dra. Ruth Parra de la UIM en Enfermedades Infecciosas, del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI (IMSS), por las facilidades otorgadas para la realización de los ensayos de actividad antimicobacteriana por el método radiorespirométrico Bactec TB-460.

A la M en C Abigaíl Aguilar Contreras por la identificación de *Chamaedora tepejilote* Liebm ex Mart.

A la Biol. María Edith Villafranco por facilitar la información etnobotánica y las sugerencias.

Al comité académico. M en C. Claudia Tzasna Hernández Delgado, M en C. Cesar Mateos Flores, M en C. Guillermo Avila y Biol. José luís Muñoz, por la revisión del trabajo escrito y observaciones valiosas que ayudaron a enriquecer esta Tesis.

A mi Mejor Amiga: Alma, por tu amistad sincera, paciencia, consejos, ¡ por no olvidarte de mí ¡ y sobre todo por que eres la mejor amiga que he tenido, ¡gracias!
AL Sr. Eduardo David por todas las facilidades que me dio, consejos, y más que nada por su valiosa amistad.

A Alejandro “ mi primo” por brindarme su apoyo en todo momento y por su apreciada amistad.

A mis compañeros de la UIM en Farmacología de Productos Naturales: Alejandro Gutiérrez, Ivan y Rosalva por compartir sus conocimientos y su apoyo.

De igual manera agradezco a todas las personas que siempre me han motivado a continuar con mucha estimación y recuerdo.....

¡GRACIAS!!

DEDICATORIAS

A **Dios**, por darme el fruto tan maravilloso que es la “*vida*” por permitirme llegar a esta meta, ¡ Gracias, señor!

A **mi Abuelo: Prof. Mariano Pérez** ⁺ por que su recuerdo me da la fuerza para superarme, se que hubieras estado muy orgulloso.

A **mi Papá: Bernardo Marquez** por el apoyo incondicional durante todos estos años, por sus sacrificios para brindarme una carrera profesional y por todos los consejos que me ha dado a lo largo de mi vida, gracias.

A la mujer que más admiraré toda mi vida, **Mi mamá: Isabel Pérez** por que con su apoyo, fuerza y valor me ha enseñado como seguir adelante y de su cariño he aprendido a querer a los demás.

A **mi Hermano: Ing. Armando** por que a pesar de todos los momentos difíciles que hemos vivido, hemos logrado salir adelante y por que en su vida profesional hay un futuro brillante y en su vida personal el futuro de un gran hombre “por que nunca te olvides de nosotros”

A **mi Hermana: Gris** gracias por tu paciencia, por todos los momentos compartidos (los felices y los tristes) y ayudarme en todo cuando lo necesite, con este ejemplo que es mi tesis, quiero mostrarte que uno vale por si mismo y que uno debe tener coraje para ser independiente “te aprecio mucho”

A **mi Amor: Guadalupe Ramos** te dedico mi tesis como muestra de un cariño absoluto que te tendré siempre ¡ gracias amor !

A **mi Familia:** por escucharme, motivarme y darme siempre un buen consejo gracias.

I NDICE

IZT.

| | Pág. |
|---|------|
| ABREVIATURAS | 1 |
| RESUMEN | 3 |
| I. INTRODUCCIÓN. | 5 |
| I.1. Generalidades de la tuberculosis en el Mundo y en México | 5 |
| I.2. Tratamientos para la tuberculosis | 9 |
| I.3. El problema de la multidrogoresistencia | 12 |
| I.4. Importancia farmacológica de las plantas medicinales | 16 |
| I.5. Las plantas medicinales como fuente potencial de compuestos activos contra cepas de <i>Mycobacterium</i> . | 18 |
| II. GENERALIDADES de <i>Chamaedora tepejilote</i> | 22 |
| II.1. Descripción botánica | 22 |
| II.2. Uso medicinal de <i>Ch. tepejilote</i> | 24 |
| II.3. Investigación química, biológica y/o farmacológica | 24 |
| III. JUSTIFICACIÓN | 25 |
| IV. OBJETIVO GENERAL | 26 |
| IV.1. OBJETIVOS PARTICULARES | 26 |
| V. METODOLOGÍA | 27 |
| V.1. Selección de la especie | 27 |
| V.2. Colecta del material vegetal | 27 |
| V.3. Operaciones preliminares y preparación de los extractos | 28 |

| | |
|--|----|
| V. 4. Actividad antimicobacteriana | 30 |
| V.4.1. Micrométodo colorimétrico de alamar azul | 30 |
| V.4.2. Método radiorespirométrico automatizado (Bactec TB-460) | 34 |
| V.5. Fraccionamiento biodirigido de los extractos activos de <i>Ch. tepejilote</i> | 36 |
| V.5.1. Extracto hexánico | 36 |
| V.5.2. Fraccionamiento químico de los extractos metanólico y acuoso. | 39 |
| V.6. Caracterización química de los compuestos activos | 41 |
| VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 42 |
| VI.1. Selección y colecta de la especie vegetal | 42 |
| VI.2. Operaciones preliminares | 43 |
| VI.3. Preparación de los extractos | 43 |
| VI.4. Actividad antimicobacteriana de los extractos hexánico y metanólico <i>Ch. tepejilote</i> | 44 |
| VI.5. Fraccionamiento químico biodirigido del extracto activo | 56 |
| VI.6. Aislamiento y caracterización de los compuestos presentes en las Fracciones activas | 60 |
| VI.7. Espectros | 67 |
| VII. Conclusión | 73 |
| VIII. Literatura citada | 75 |

*A*BREVIATURA

| | |
|---------------------------------|---|
| AcOEt | Acetato de etilo |
| OADC | Ácido oleico, albúmina, dextrosa y catalasa |
| H ₂ SO ₄ | Ácido sulfúrico |
| KBr | Bromuro de potasio |
| CHCl ₃ | Cloroformo |
| CMI | Concentración mínima inhibitoria |
| CG | Cromatografía de gases |
| ccf | Cromatografía en capa fina |
| CH ₂ Cl ₂ | Diclorometano |
| DMSO | Dimetilsulfoxido |
| DR | Drogoresistencia |
| EMIE | Espectrometría de masas por impacto electrónico |
| S | Streptomycin |
| E | Etambutol |
| EtOH | Etanol |
| EUA | Estados Unidos Americanos |
| °C | Grados Celsius |
| Hex | Hexano |
| h | Horas |
| GI | Índice de crecimiento |
| IR | Infrarrojo |
| INDRE | Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica |
| H | Isoniazida |
| MeOH | Metanol |
| µg | Microgramos |
| µg/mL | Microgramos por mililitros |
| mg | Miligramos |
| mL | Mililitros |

| | |
|------------------------|--|
| mL | Mililitros |
| MDR | Multidrogoresistencia |
| <i>M. avium</i> | <i>Mycobacterium avium</i> |
| <i>M. tuberculosis</i> | <i>Mycobacterium tuberculosis</i> |
| OMS | Organización Mundial de la Salud |
| OPS | Organización Panamericana de la Salud |
| Z | Pirazinamida |
| % | Por ciento |
| RMN- C ¹³ | Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13 |
| RMN-H ¹ | Resonancia Magnética Nuclear Protónica |
| R | Rifampicina |
| TR | Tiempo de retención |
| TAES | Tratamiento Acortado Estrictamente Supervisado |
| Tb | Tuberculosis |
| UFC | Unidad Formadora de Colonia |
| IUATLD | Unión Internacional Contra la Tuberculosis y Enfermedades Pulmonares |
| VIH | Virus de Inmuno Deficiencia Humana Adquirida |

RESUMEN

La incidencia y prevalencia de tuberculosis (Tb) está incrementándose enormemente, se estima que en este año habrá 10.2 millones de infectados y para el año 2005 existirán 11.9 millones. Las principales causas que ocasionan este problema son: a) diagnóstico y tratamientos inadecuados, b) presencia de cepas multidrogoresistentes, c) migración y d) enfermedades que comprometen el sistema inmunológico como el SIDA, entre otros factores. En una investigación realizada sobre multidrogoresistencia, México ocupa el noveno lugar y al Tb constituye una de las 20 causas de muerte en el país. La Dirección General de Epidemiología (Octubre del 2001) reportó que los Estados de Chiapas, Baja California, Guerrero, Jalisco, Nuevo León y Veracruz presentan mayor incidencia de Tb. Aunado a estos antecedentes, podemos mencionar que los agentes terapéuticos utilizados para tratar este padecimiento son escasos, poco eficaces y de alto costo. Estos problemas complican los programas que se diseñan para combatir la enfermedad.

Debido a la reemergencia de la tuberculosis, es urgente encontrar nuevas sustancias activas contra el bacilo o bien que actúen como coadyuvantes para el tratamiento de la enfermedad. La búsqueda de principios activos se realiza principalmente en fuentes de origen natural (plantas, microorganismos) o de origen sintético, mediante el empleo de diversos ensayos biológicos, los cuales permiten determinar la actividad de las sustancias sobre diferentes especies de *Mycobacterium*.

El presente trabajo tuvo como objetivo realizar la evaluación antimicobacteriana de los extractos hexánico, metanólico y acuoso de las hojas de *Chamaedora tepejilote* (Palmae) y aislar los compuestos responsables de la

actividad biológica, empleando diversos métodos cromatográficos y como ensayo biológico el micrométodo colorimétrico de alamar azul y el radiorespirométrico. Este proceso permitió detectar que el extracto hexánico y metanólico inhiben el crecimiento de *M. tuberculosis* H37Rv mostrando un porcentaje de inhibición 80.24 y 38.85% respectivamente, a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. El fraccionamiento químico biodirigido del extracto más activo (hexánico) permitió detectar que la actividad antimicobacteriana se concentraba en las fracciones F1 y F8, presentando un porcentaje de inhibición 65.04% y de 98.92%, respectivamente a la concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. En la fracción F1 se detectó la presencia de un compuesto mayoritario por análisis de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas. La fracción F8 fue sometida a una recromatografía en columna de fase normal, proceso que permitió obtener dos compuestos, los cuales se caracterizaron químicamente como ácido ursólico y el β -sitosterol. La caracterización química del ácido ursólico se realizó mediante análisis de los espectros de RMN- ^1H , masas, IR y EM. La evaluación antimicobacteriana del ácido ursólico demostró que este compuesto inhibe el crecimiento de *M. tuberculosis* H37Rv en un 99.6% a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

La investigación química biodirigida de la especie medicinal *Ch. tepejilote* permitió determinar que esta planta puede constituir una fuente potencial de compuestos activos contra *M. tuberculosis*, aunado que este trabajo es el primero que describe la investigación química y biológica de *Ch. tepejilote*, especie que es muy empleada en la medicina tradicional de Veracruz y Puebla para tratar tos, tos seca y pulmonía.

I. INTRODUCCIÓN

I.1. Generalidades de la tuberculosis en el Mundo y en México.

Mycobacterium tuberculosis, es el principal agente causal de la tuberculosis (Tb) en el humano, es un bacilo intracelular facultativo aeróbico, de crecimiento lento. La pared celular del bacilo contiene altas concentraciones de lípidos, estos componentes son los responsables de la tinción ácido-resistente de la bacteria con el colorante rojo carbolfucsina, por lo que este microorganismo también es llamado bacilo ácido-resistente y sin motilidad. En los ácidos grasos de la pared celular es donde se han detectado constituyentes como el factor cuerda, sulfolípidos entre otros, que le confieren propiedades virulentas al bacilo (Warren y Body, 1996).

Los báculos penetran en el organismo a través de las vías aéreas alcanzando los alvéolos, donde son fagocitados por los macrófagos y conducidos posteriormente al torrente sanguíneo y linfático (Warren y Body, 1996). Este mecanismo de infección hace que la enfermedad se transmita de persona a persona y que sea de fácil contagio (Brändli, 1998). Así por ejemplo, una persona con Tb puede contagiar de 10 a 15 personas a su alrededor; los bacilos al llegar al torrente circulatorio se alojan en los macrófagos, aunque

pueden alojarse en forma extracelular en diferentes órganos, principalmente en el pulmón.

En 1993, la Organización Mundial de la Salud (OMS) declaró que la Tb constituye un problema grave de salud a nivel mundial y México se encuentra en la lista de los trece países con mayor incidencia de esta enfermedad (Arbelaez *et al.*, 2000; OMS, 1997; Pietro *et al.*, 2000; Raviglione *et al.*, 1995). Además, reportaron que en 1998 se presentaron 8.8 millones de casos y murieron 2 millones de personas por esta enfermedad (Pietro *et al.*, 2000; Dye, 1999). Otras estimaciones, mencionan que más de 2 billones de personas son contagiadas por Tb cada año y están en riesgo de desarrollar la enfermedad (Orme *et al.*, 2001; Dye, 1999), por lo que se estima que para el año 2005 habrá 11.9 millones de personas infectadas y la predicción para el año 2020 es que aproximadamente 70 millones de personas morirán por Tb, cifras que aumentarían si no se toman medidas necesarias para su control debido a la presencia de cepas multidrogoresistentes (Raviglione *et al.*, 1995).

La revisión en la literatura acerca de la incidencia de Tb en el mundo varía, algunos autores reportan 61.8% de casos por cada 100 mil habitantes (Núñez-Rocha *et al.*, 2000). En la Tabla 1 se indica la incidencia de Tb en algunos países incluyendo México. De los pocos estudios epidemiológicos realizados en México, sobre la incidencia de la Tb se ha encontrado que esta enfermedad constituye una de las 20 causas más frecuentes de muerte en la población económicamente activa (Salud Pública México, 2001). En 1993, Chiapas ocupó

el primer lugar por mortalidad de Tb; reportándose una incidencia de 11.7 casos por cada 100 mil habitantes (Álvarez-Gordillo *et al.*, 1995).

Tabla 1. Incidencia de la tuberculosis

| PAIS | CASOS ^a . |
|-----------------|---|
| Indonesia | 49.0 |
| Sureste de Asia | 44.0 |
| Sur de África | 38.0 |
| India | 44.0 |
| Afganistán | 34.0 |
| China | 36.0 |
| América | 18.0 |
| EUA. | 10.5 (1992) 6.8 (1998) |
| Texas, EUA. | 12.5 |
| Perú | 2.5 |
| México | 13.1 17.0 ^b 19.4 ^c |
| Monterrey | 25.0 ^d 5.8 ^e 6.2 ^e |
| Veracruz | 23.3 ^a |

^a numero de casos por cada cien mil habitantes para 1996 (Dye *et al.*, 1999; Taylor *et al.*, 1999).

^{b,c} numero de casos por cada cien mil habitantes para 1996 (García-García *et al.*, 1998).

^d numero de casos por cada cien mil habitantes para 1997 y 1999 (Granich *et al.*, 2000); mismo numero reportado en 1992 (Sifuentes-Osornio *et al.*, 1995).

^e numero de casos por cada cien mil habitantes para 1992 (Núñez-Rocha *et al.*, 2000).

Un estudio realizado en nuestro país en 1997; reporta que Oaxaca, Sinaloa y Baja California presentaron un mayor número de casos por esta enfermedad, con una incidencia de 25/100,000 habitantes, registrándose 23,575 casos de manera oficial para ese año; de los cuales 17,917 (76%) fueron pacientes sin antecedentes a Tb y sin tratamiento previo y el 2.7% fueron pacientes con retratamiento presentando resistencia a dos o mas fármacos. De los casos reportados, se encontró que el 12% de ellos presentaron resistencia a

isoniazida y el 43% con retratamiento fueron resistentes a la misma droga y un 22% presentaron multidrogoresistencia (MDR) (Granich *et al.*, 2000).

García-García *et al.*, en 1998 reportaron una incidencia de 19.4/100,000 habitantes, este último resultado no coincide con lo reportado por otros autores para 1997 (Granich *et al.*, 2000; Sifuentes-Osornio *et al.*, 1995), lo que indica que los datos estadísticos sobre la prevalencia e incidencia de la Tb en México son escasos. Los datos estadísticos para México hasta Octubre (semana 43) del 2001; registra 12,552 nuevos casos de Tb a nivel nacional y los estados con mayor incidencia son: Veracruz con 1469 casos, Chiapas con 1239 casos, Baja California con 1074 Nuevo León con 850, Guerrero con 805, Oaxaca con 571 casos (DGE, 2001).

El aumento de los casos de Tb se debe a diversos factores como: a) tratamientos y diagnósticos inadecuados, b) abandono de los tratamientos, c) migración, d) problemas de desnutrición, e) hacinamiento, f) enfermedades que comprometen el sistema inmunológico como el SIDA, cáncer y diabetes mellitus g) los accesos inadecuados a sistemas de salud, h) deterioro o interrupción en los programas oficiales del control de la Tb, i) condiciones socioeconómicas bajas aunado al alto costo de los tratamientos y j) la aparición de cepas multidrogoresistentes (Álvarez-Gordillo *et al.*, 2000; Arbelaez *et al.*, 2000; Culliton, 1992; DeCock y Lucas, 1994; Orme *et al.*, 2001; Raviglione *et al.*, 1995). Otros factores de riesgo que incrementan el problema son: insuficiencia renal, las terapias prolongadas con adrenocorticoides, terapias

con inmunosupresivos, leucemia, alcoholismo, enfermedad de Hodgkin's, drogadicción, entre otras (American Thoracic Society 1994).

1.2. Tratamientos para la tuberculosis.

La Tb es un grave problema de salud en el mundo, difícil de erradicar, por lo cual la OMS recomienda implementar estrategias gubernamentales para su control y en 1993 inicio el programa de Tratamiento Acortado Estrictamente Supervisado conocido en México y Latinoamérica como TAES y por EUA es DOTS (Directly Observed Treatment Short-Course), este programa ha demostrado la cura de 80% de los casos; sin embargo, la presencia de cepas MDR son difíciles de tratar y erradicar. En la actualidad se cuenta con fármacos que se clasifican en: a) agentes de primera línea y b) agentes de segunda línea (Inderlied, 1994; Mandell y Sande, 1996).

a) AGENTES DE PRIMERA LÍNEA. Son aquellos que combinan el máximo nivel de eficiencia con un grado aceptable de toxicidad; éstos incluyen isoniazida (H), rifampicina (R), etambutol (E), estreptomycin (S) y pirazinamida (Z)

b) AGENTES DE SEGUNDA LINEA. Son aquellos que a causa de la resistencia microbiana o de factores relacionados con el paciente se pueden

utilizar; entre ellos podemos mencionar: etionamida, ácido aminosalicílico, cicloserina, amikacina, kanamicina y capreomicina.

El tratamiento inicial de la Tb principalmente recomendado a nivel mundial involucra la administración de 4 drogas de primera línea siendo estas, H, R, Z, y E o S por dos meses seguido; de H y R por cuatro meses o H y E por seis meses (Raviglione *et al.*, 1995; Taylor *et al.*, 1999). En caso de que el tratamiento con fármacos de primera línea no de resultados favorables se recomienda la administración de 5 fármacos tanto de primera y de segunda línea; sin embargo, estos tratamientos son muy costosos y provocan diversas reacciones secundarias lo que hace que frecuentemente sean abandonados.

Es importante mencionar que los fármacos de primera y segunda línea, son también empleados para tratar casos de Tb provocados por cepas diferentes de *Mycobacterium* (Tabla 2), como: *M. fortuitum*, *M. avium*, *M. bovis*, *M. leprae*, entre otros.

La Tb se presenta en diferentes formas siendo la mas común la pulmonar seguido de la extrapulmonar, pleural, endobranquial, meníngea, gastrointestinal y pericardial (American Thoracic Society, 1983).

Tabla 2. Fármacos de primera y segunda línea utilizados en el tratamiento de la Tb provocado por *M. tuberculosis* y otra cepas de *Mycobacterium* (Inderlied, 1994).

| Especies Mycobacterium | Primario | Secundario | Alternativas |
|--|---|---|-------------------------------|
| <i>M. tuberculosis</i> | isoniazida | ciprofloxacina | amikacina |
| <i>M. tuberculosis</i> | rifampicina | etionamida | ofloxacina |
| <i>M. bovis</i> | pirazinamida estreptomina etambutol | cicloserina | rifabutina esparfloxacina |
| <i>M. leprae</i> | dapsona rifampicina clofazimina | etionamida protonamida | claritromicina minociclina |
| Complejo MAC (<i>M. avium-intracellulare</i>) | azitromicina claritromicina etambutol | amikacina clofazimina ciprofloxacina ofloxacina rifampicina rifabutina | cicloserina estreptomina |
| <i>M. chelonae</i> | amikacina claritromicina | kanamicina | |
| <i>M. fortuitum</i> | amikacina cefoxitina | cefmetazola imipenium minociclina ciprofloxacina capreomicina kanamicina | |

En nuestro país, actualmente el programa TAES recomienda en la primera fase de tratamiento el uso de tres fármacos (H, R, Z) por diez semanas para todos los pacientes con diagnóstico nuevo de Tb y una segunda fase conocida como de sostén, donde se administra R e H por quince semanas, pero a nivel mundial el programa recomienda la administración de 4 drogas (Granich *et al.*, 2000).

I.3. El problema de la multidroresistencia.

La aparición de cepas de *M. tuberculosis* multidrogoresistentes es muy frecuente y provoca que los tratamientos actuales sean cada vez más costosos, prolongados y poco eficaces. En la literatura se describe que la resistencia se desarrolla por dos vías: *la primaria* y *la adquirida*. La primera se define como la presencia de cepas resistentes a una o más drogas antituberculosas sin un tratamiento previo, y *la adquirida* es aquella que se presenta por tratamientos inadecuados y/o por abandono del mismo, es decir cuando la micobacteria no es inhibida a las concentraciones de fármacos administrados y la persona diagnosticada con Tb requiere un tratamiento más severo y prolongado (Raviglone *et al.*, 1995).

Los cuatro principales mecanismos que median la resistencia bacteriana en general son: a) producción de enzimas que inactivan al fármaco; b) las bacterias sintetizan los sitios de acción contra los cuales el medicamento no tiene efecto, como es el caso de la proteína mutante en la subunidad ribosómica 30S que puede producir resistencia a estreptomicina y la metilación del RNA ribosómico 23S que induce resistencia a eritromicina; c) las bacterias modifican su permeabilidad de modo que no se logra una concentración intracelular eficaz del fármaco y d) la bacteria exporta drogas haciendo uso de la bomba de multidrogoresistencia que consiste en alterar el pH intra y extracelular. Este efecto se observa para el caso de los antibióticos de tipo quinolona. Además de estos mecanismos de resistencia descritos se presentan frecuentemente mutaciones genéticas en la micobacteria, ya sea mutación

cromosómica o por adquisición de un plásmido o un transposon, ocasionando que los tratamientos primarios con fármacos antituberculosos sean pocos eficaces (Warren y Ernest, 2000).

La prevalencia e incidencia de la multidrogoresistencia se observa en las diversas investigaciones de tipo epidemiológico realizadas por numerosos investigadores (Cooksey *et al.*, 2000; Granich *et al.*, 2000; Orme *et al.*, 2001; Raviglone *et al.*, 1995; Taylor *et al.*, 1999). La prevalencia de esta enfermedad en países en vías de desarrollo va en aumento debido a dos factores principalmente a) resistencia primaria a los fármacos antituberculosos y b) resistencia adquirida por tratamientos inadecuados (Álvarez-Gordillo *et al.*, 2000; Cooksey *et al.*, 2000; Granich *et al.*, 2000).

En un estudio realizado en Texas, de 1987 a 1996 sobre la drogoresistencia (DR) se reportaron 22,257 casos de Tb, el número de casos reportados en esta región fue de 1757 en 1987 y 2542 para 1994 (Taylor *et al.*, 1999), presentándose un promedio anual de incidencia de 12.5 casos por cada 100,000 habitantes; el 9% de los casos presentó resistencia al menos a un fármaco de primera línea (H, R, E, Z y S), el 4.6% presentó resistencia a H, el 2.3% a R, el 5% y 1.1% de los casos a S y E. La resistencia a S y H fue mas común seguido de H y R (Taylor *et al.*, 1999).

Sin embargo, la resistencia a H y R en Texas es más bajo que lo registrado en Nueva York en el periodo 1987 a 1991, donde el 26% de los casos presentaron resistencia a H y el 22% fue resistente a R (Taylor *et al.*, 1999). Esta ciudad ha

sido identificada como un área geográfica con altos niveles de DR, donde la prevalencia de coinfección en pacientes con Tb/VIH fue de 36.7% y el 20 al 30% de estos pacientes presentaron resistencia a H y del 16 a 19% de los casos presentaron MDR.

Por otro lado, un estudio realizado en 35 países del mundo de 1994 a 1997 se registraron 555 casos, encontrando que 7.3% demostró resistencia a H y S, 6.5% a R; con una prevalencia global de resistencia primaria de 1.4%, el 36% presentó resistencia adquirida y el 12.6% presentó MDR.

La Organización Panamericana de la Salud (OPS) y la OMS realizaron un estudio sobre la prevalencia de MDR en 10 países de Latinoamérica de 1986 a 1990, este trabajo indicó que México presentaba el 19.1% de resistencia a los fármacos primarios. El Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica (INDRE) en el periodo 1989-1993 evaluó 1811 casos de aislados clínicos de *M. tuberculosis* de varios estados, encontrando una resistencia primaria de 8.3% (Granich *et al.*, 2000). Al comparar los resultados de 35 países a nivel mundial que participaron en un programa global de vigilancia de DR a los antifímicos, la OMS y la Unión Internacional Contra la Tuberculosis y Enfermedades Pulmonares (IUATLD) en el periodo 1994-1997, encontró que México ocupó la novena posición por presencia de cepas resistentes de *M. tuberculosis*, con una resistencia primaria de 18.3% a uno de los cuatro fármacos primarios (H, R, Z, S o E) y el 4% presentó resistencia al menos a dos drogas. Al relacionar los niveles de resistencia entre los pacientes que recibieron un tratamiento previo, México se ubicaba en la sexta posición,

con una resistencia de 52% (Granich *et al.*, 2000). En 1995, Sifuentes-Osornio *et al.*, reportan que de 84 casos estudiados, el 30% mostró resistencia al menos a una droga, el 17% a dos drogas, el 9% a H, el 6% a R, el 2% a E, el 6% a H y R y el 6% presentó MDR.

I.4. Importancia farmacológica de las plantas medicinales.

La OMS reporta que el 80% de las personas que viven en países subdesarrollados hacen uso de la medicina tradicional; esto quiere decir que 3300 a 4000 millones de personas aproximadamente emplean plantas medicinales para aliviar sus padecimientos o sus necesidades primarias de salud. Así mismo, reconoce el valor de esta práctica terapéutica confiriéndole gran importancia en los sistemas públicos de la salud (Eloff, 1998; Farnsworth *et al.*, 1985). Diversas investigaciones sobre plantas medicinales han demostrado que estas constituyen una fuente potencial de compuestos activos, así por ejemplo Farnsworth *et al.*, en 1985 describió 119 principios activos obtenidos de 90 plantas medicinales, entre estos podemos mencionar a la pseudoefedrina y nor-pseudoefedrina con actividad simpaticomimético obtenida de *Ephedra sinica* Stapf; al timol con actividad antifúngica obtenido de *Thymus vulgaris* L; el tenepósido con actividad antitumoral obtenido de *Podophyllum peltatum* L, entre otros.

Los compuestos puros obtenidos de plantas medicinales tienen importancia en la medicina clásica occidental. En 1984, aproximadamente el 25% de los fármacos administrados en los EUA y Canadá se elaboraron a partir de productos naturales (Eloff, 1998). También se estima que del 14 al 28% de las plantas superiores son empleadas en la terapéutica tradicional de diversos países y solamente el 15% de las angiospermas han sido investigadas químicamente y el 74% de los componentes farmacológicamente activos de

plantas fue descubierto después de conocer el uso etnomédico de la planta (Eloff, 1998)

La herbolaria es la práctica terapéutica que utiliza plantas medicinales y aún constituye el recurso más conocido y accesible para grandes masas de la población mexicana. La extraordinaria riqueza florística (26,500 especies y aproximadamente 9500 endémicas), ubica a México en el cuarto lugar mundial; lo que ha permitido que se desarrolle la medicina tradicional desde épocas prehispánicas, un ejemplo sobre el registro del conocimiento medicinal de las plantas por los grupos indígenas lo podemos encontrar en el Manuscrito del Códice de la Cruz Badiano de 1552. Este documento describe el valor medicinal de casi 200 especies y la validación de este conocimiento empírico fue realizado por los investigadores de la Universidad de Utah en 1975, quienes trabajaron con 25 especies mencionadas en el Códice, comprobando que los principios activos extraídos de éstas poseen las propiedades terapéuticas (Rivera, 1999; Eloff, 1998, Lozoya, 1999).

La búsqueda de compuestos de origen natural decayó por mucho tiempo (1930-1970), dado el auge en la obtención de productos sintéticos aparentemente similares a los de origen natural, de mayor eficacia y más baratos. Sin embargo; el resurgimiento de enfermedades, que se creían erradicadas (como paludismo, malaria, diversas parasitosis, tuberculosis, lepra y enfermedades bacterianas), están ocasionando severos problemas de salud, presentándose en muchos casos resistencia a los fármacos, lo que hace que

muchos tratamientos sean poco eficaces, muy caros, más prolongados y en muchas ocasiones con efectos secundarios severos.

Debido a esta problemática en el área de la salud, en fechas recientes se ha incrementado las investigaciones desde el punto de vista químico y farmacológico de las plantas enfocadas a la búsqueda de nuevos principios activos o moléculas prototipo para el desarrollo de compuestos farmacológicamente activos, menos tóxicos, más selectivos y por lo tanto más eficaces (Cragg *et al.*, 1997).

I.5. Las plantas medicinales como fuente potencial de compuestos activos contra cepas de *Mycobacterium*.

Debido a la presencia de diversas enfermedades que constituyen graves problemas de salud a nivel mundial, como la tuberculosis; numerosos grupos de investigación se han dado a la tarea de explorar el potencial antimicobacteriano de diversas fuentes naturales como las plantas medicinales, microorganismos terrestres y marinos (Cantrell *et al.*, 1998; Gentry *et al.*, 1998; König *et al.*, 2000, Lall y Meyer, 1999; Van Puyvelde *et al.*, 1994).

Específicamente, algunas plantas medicinales utilizadas para el tratamiento de la tuberculosis y/o síntomas relacionados con el padecimiento, han sido objeto de investigaciones de tipo químico-biodirigido, lográndose aislar el o los principios activos (Cantrell *et al.*, 1999a; 1999b; 1996; Fischer *et al.*, 1998; Wätcher *et al.*, 1999).

Estas investigaciones se han enfocado a la búsqueda de compuestos antimicobacterianos en extractos de plantas medicinales, que inhiben diferentes cepas de micobacterias como *M. tuberculosis* H37Rv (la más utilizada), *M. avium*, *M. simiae*, *M. smegmatis* y *M. intracellulare*, así como cepas de aislados clínicos de *M. tuberculosis*. Por ejemplo, Van Puyvelde *et al.*, en 1994 reportó que los extractos etanólicos de *Tetradenia riparia* y *Bidens pilosa*, mostraron actividad a 500 µg/mL contra *M. tuberculosis* y solamente *T. riparia* y *Pentas longiflora* inhibieron el crecimiento de *M. simiae* a 1000 µg/mL. Al realizar el estudio químico-bio-dirigido de *T. riparia*, se aisló un diterpenodiol caracterizado químicamente como 8(14)15-sandaracopimaradiene-7 α ,18-diol que inhibió el crecimiento *M. tuberculosis*, *M. avium*, y *M. simiae* a 100 µg/mL (Van Puyvelde *et al.* , 1994).

Así mismo, de la evaluación de 230 extractos orgánicos de 118 especies medicinales colectadas en diferentes partes del continente Americano; se encontró que las especies *Chrysanthemum mexicanum*, *Erigeron annuus*, *E. strigosus*, *Euthamia leptoccephala*, *Rudbeckia subtomentosa*, *Solidago petiolaris*, *Magnolia acuminata* y *M. grandiflora* mostraron actividad a una concentración de 100 µg/mL contra *M. tuberculosis* y *M. avium*; por otro lado, los extractos de *Borreria frutescens*, *Solidago arguta*, *Aster praefectus*, *Calea divaricata*, *C. cardonae*, *C. berteriana*, *Echinacea arthrolobosa*, *Celtis laevigata*, *Gaillardia aestivalis*, *Heterotheca subaxillaris*, *Liatris oblongifolia* y *Polygonella fimbriata* mostraron actividad contra *M. tuberculosis* y moderada actividad contra *M. avium* a 100 µg/mL. El extracto de la raíz de *Euthamia leptoccephala* fue el menos activo, inhibiendo el crecimiento de *M. tuberculosis* y *M. avium* a 1000

$\mu\text{g/mL}$. La evaluación de estos extractos se realizó por el método radiorespirométrico (Cantrell *et al.*, 1998).

Otras investigaciones realizadas en fechas recientes, reportan que del extracto metanólico de las semillas de *Melia volkensii* se aisló el 12β -hidroxikulactona y el 6β -hidroxikulactona, siendo los responsables de la actividad antimicobacteriana mostrado por el extracto original. Estos compuestos inhibieron el crecimiento de *M. tuberculosis* H37Rv a las concentraciones de 16 y 4 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente, al ser evaluados por el método radiorespirométrico (Cantrell *et al.*, 1999a).

Por otro lado, del extracto metanólico de las partes aéreas de *Ajuga remota*, se aislaron los compuestos ergosterol-5,8-endoperoxido, acetato de ergosterol-5,8-endoperoxido, ergosterol y ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3 β -ol y los diterpenos clerodina, ajugarina I y II. El primer constituyente resultó el más activo con un CMI = 1 $\mu\text{g/mL}$ contra *M. tuberculosis* H37Rv; el siguiente compuesto fue activo a 8 $\mu\text{g/mL}$ y el resto de los compuestos no fueron activos a la máxima concentración evaluada (>128 $\mu\text{g/mL}$); la evaluación de estos compuestos se realizó por el método radiorespirométrico (Cantrell *et al.*, 1999b).

Una investigación realizada con especies vegetales del continente Africano encontraron que de un total de 14 extractos acetónicos, 12 de ellos resultaron activos contra *M. tuberculosis* H37Rv; siendo los extractos de *Croton pseudopulchellus*, *Ekebergia capensis*, *Euclea natalensis*, *Nidorella anomala* y *Polygala myrtifolia* los más activos (0.1 mg/mL), el extracto de *Maytenus*

senegalensis fue activo a 1.0 mg/mL, la evaluación se realizó por el método radiorespirométrico (Lall y Meyer, 1999).

Respecto a investigaciones realizadas en compuestos puros, se ha reportado la actividad de 19 triterpenoides pentacíclicos obtenidos por fraccionamiento biodirigido de las especies *Sarmienta scandens*, *Baccharis patagonica*, *Monttea aphylla*, *Aspidosperma quebracho-blanco*, *Acaena pinnatifida*, *Chuquiraga ulicina*. El triterpeno aislado de *S. scandens*; caracterizado como zeorina, fue el más activo; inhibiendo el crecimiento de *M. tuberculosis* H37Rv a una concentración de 8 μ M. Los ácidos pomólico y torméntico aislados de *A. pinnatifida* fueron activos contra *M. tuberculosis* a 32 μ M. De *A. quebracho-blanco* se aisló el ácido ursólico que fue activo contra *M. tuberculosis* a 32 μ M; esta misma actividad se observó para los triterpenos uvaol, ácido betúlinico y betulina (Wätcher *et al.*, 1999).

II. **G**ENERALIDADES DE *Chamaedora tepejilote*

II.1. Descripción botánica.

Chamaedora tepejilote Liebm ex Mart pertenece a la familia Palmae. Es una planta de ornato y de uso medicinal, popularmente conocida como tepejilote (con este mismo nombre común también se conoce a la especie *Ch. oblongata*, planta que de la misma manera es utilizada para tratar problemas de vías respiratorias como tos, tos ahogadora y anginas; Argueta *et al.*, 1989), palmillo dulce (centro América) palmilla, pacaya y palma comedora, mojtoy (tzetzal), liltampa (totonaca) entre otros (López, 1988; Martínez, 1989; Morales y Toledo, 1987). Es una palma fanerofita de aproximadamente 5 m de altura. El tallo es verde y delgado; las hojas son grandes, a veces alcanzan 1.10 m de largo y están divididas en segmentos, alternas y lanceoladas, las pinulas son pequeñas que nacen desde el vértice central y presentan una línea de color amarillo en el envés (Figura 1). Las flores son amarillas con frutos de color negro cuando maduran con pedicelos rojos.

En México, la especie se distribuye principalmente en selva alta subperennifolia (bosque tropical perennifolio) de Puebla, Veracruz y Oaxaca (López, 1988; Rzendowski, 1994). En una búsqueda en los Herbarios MEXU del Instituto de Biología de la UNAM, e IZTA de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM; se encontró que existen ejemplares colectados en algunas regiones de Veracruz, Oaxaca, Tabasco, Puebla, Chiapas y Colima, México: (Papantla,

Tuxtepec, Oaxaca; Ixtlán de Juárez, Oaxaca; Tehuantepec Oaxaca; Vicente Guerrero municipio de Teapa, Tabasco; Hidalgotitlán en el Estado de Coahuila, Regiones Zoque y Popoluca de Magallanes en Veracruz, en la Depresión Central y Sierra Madre del Sur del Estado de Chiapas).



Fig. 1. *Chamaedora tepejilote*

II.2. Uso medicinal de *Ch. tepejilote*.

En nuestro país, esta especie es empleada en la medicina tradicional, específicamente en el Estado de Veracruz donde el principal uso medicinal es para tratar la tos seca, para ello se prepara un té con las hojas junto con la hierba dulce (*Lippia dulcis*) y se toma el preparado como agua de tiempo (Comunicación personal, López)

La decocción de las hojas de *Ch. tepejilote* mezclado con canela y corteza de mora (*Morus alba* L.) es empleado para tratar la pulmonía por los grupos étnicos totonacas y tepehuas de Mecapalapa, municipio de Pantepec, Puebla (Aguilar *et al.* ., 1994; Díaz, 1976; López, 1988). En el Estado de Veracruz, los frutos de esta planta son comestibles (López, 1988).

II.3. Investigación química, biológica y/o farmacológica.

El género *Chamaedora* ha sido escasamente investigado desde el punto de vista químico, del extracto acuoso de las hojas de *Ch. elegans* se aisló una saponina esteroidal $5\alpha,25R$ -espirostano- $1\beta,3\alpha$ -diol (Rao y Álvarez, 1984), siendo este trabajo el único que describe la composición química de una especie del género.

Respecto a su actividad biológica y/o farmacológica, la especie fue objeto de una investigación previa donde se reportó que la planta inhibe el crecimiento *M. tuberculosis* H37Rv (Jiménez *et al.*, 2002)

III. **J**USTIFICACIÓN

La tuberculosis es una de las infecciones más extendidas en el mundo, constituyendo un grave problema de salud pública, especialmente en los países subdesarrollados, debido a que *Mycobacterium tuberculosis* y otras cepas de mycobacterias han adquirido con el tiempo resistencia a los antifímicos existentes, lo que hace que los tratamientos sean más prolongados, costosos y en muchas ocasiones con efectos secundarios severos. Por lo anterior, es evidente la necesidad de contribuir con investigaciones dirigidas hacia la búsqueda de nuevos compuestos activos contra *Mycobacterium tuberculosis* que sean más efectivos, menos tóxicos y más selectivos. En este sentido, en México existen muchas especies vegetales que son utilizadas en la medicina tradicional para tratar la Tb y/o padecimientos relacionados con la enfermedad; y que a la fecha no han sido objeto de investigación química y farmacológica alguna por lo que estas plantas pueden ser una fuente potencial para la obtención de nuevas estructuras prototipo o compuestos útiles para el desarrollo de agentes antifímicos.

IV. OBJETIVO GENERAL

Aislar y caracterizar los metabolitos secundarios responsables de la actividad antimicobacteriana presentes en *Chamaedora tepejilote*.

IV.1. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Seleccionar y coleccionar el material vegetal objeto de estudio.
2. Realizar las operaciones preliminares (secado y molienda) del material vegetal.
3. Preparar los extractos (hexánico, metanólico y acuoso) y evaluar la actividad antimicobacteriana de los mismos.
4. Realizar el fraccionamiento químico de los extractos de *Chamaedora tepejilote* que presentaron actividad antimicobacteriana.
6. Evaluar la actividad antimicobacteriana de las fracciones primarias.
7. Separar el o los compuesto(s) activo(s) empleando diversas técnicas cromatográficas y elucidar la estructura de los compuestos biológicamente activo(s) mediante métodos espectroscópicos y espectrométricos.

V. METODOLOGÍA

V.1. Selección de la especie

La especie *Ch. tepejilote* se seleccionó con base en el uso popular de la planta en la medicina tradicional de México para el tratamiento de tos, tos seca, pulmonía y padecimientos de vías respiratorias (Aguilar *et al.*, 1994; Hernández, 1988; López, 1988). En una investigación previa se reporta que *Ch. tepejilote* inhibe el crecimiento de *M. tuberculosis* H37Rv (Jiménez *et al.*, 2002).

V.2. Colecta del material vegetal

Una vez seleccionada la especie, se procedió a la colecta del material vegetal fresco (hojas) en el municipio de Coatepec, Veracruz, durante Marzo del 2001; con base en la información descrita sobre su distribución geográfica en nuestro país (López, 1988; Rzendowski, 1994). El material vegetal fresco se colectó en cantidad suficiente (aproximadamente 10 Kg) para realizar el estudio fitoquímico-bio-dirigido.

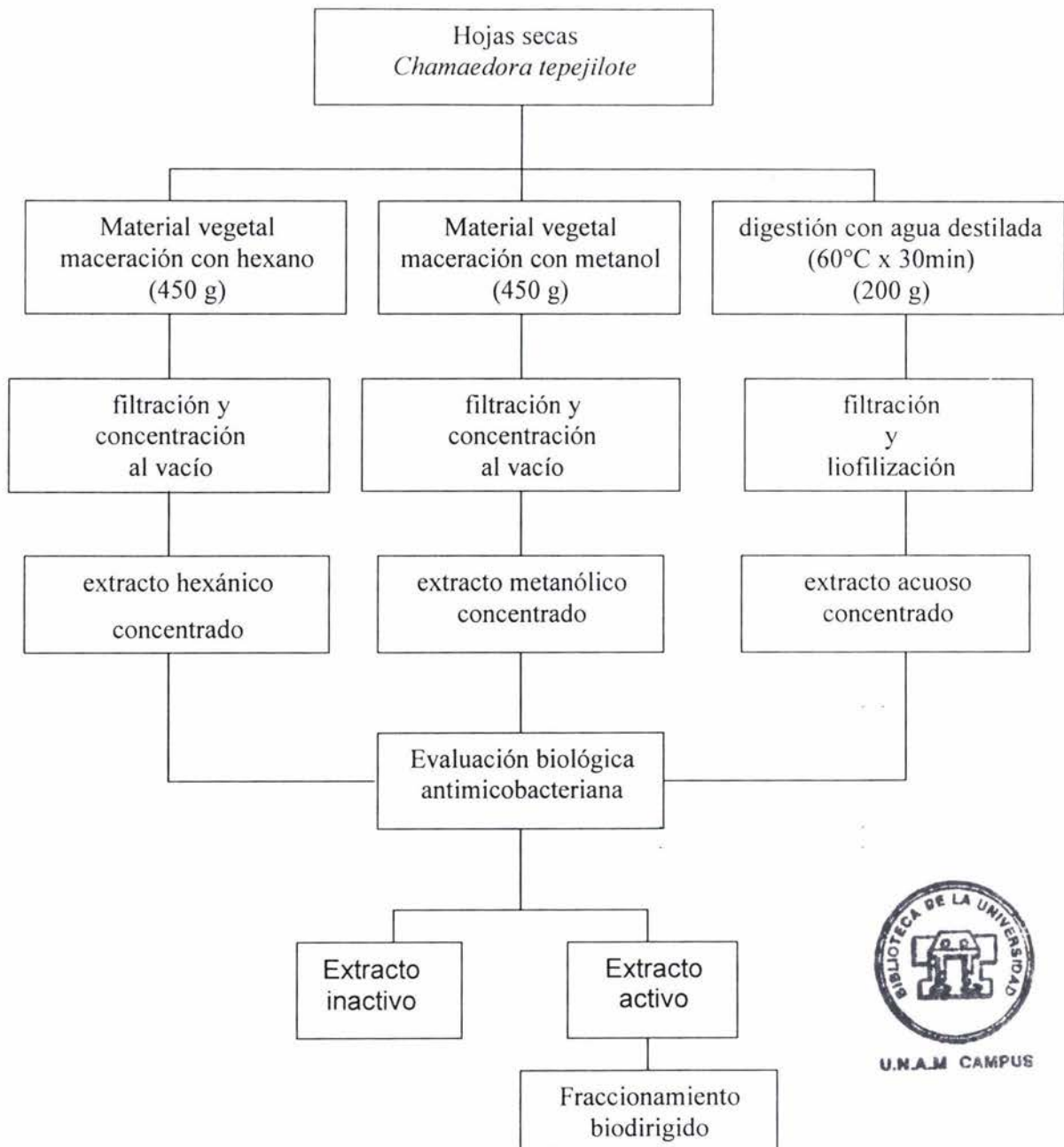
La identificación botánica de la especie fue realizada por la Dra. Abigail Aguilar, responsable del Herbario IMSSM del Instituto Mexicano del Seguro Social y un ejemplar fue depositado en el herbario antes mencionado (Nº de voucher: 140321).



V.3. Operaciones preliminares y preparación de los extractos.

El proceso de secado de las hojas de *Ch. tepejilote* se realizó a temperatura ambiente y a la sombra. El material vegetal seco se trituró en un molino de cuchillas (modelo Tor Rey M-12). Posteriormente, el material seco y molido se pesó y se dividió en tres partes, dos de 450 g y uno de 200 g para preparar por separado los extractos correspondientes (hexánico, metanólico y acuoso). En el caso de este trabajo se preparó el extracto hexánico y metanólico a partir de 450 g mediante maceración a temperatura ambiente con disolventes grado RA (Mallinckrodt), cada extracción se realizó por periodos de 24 horas (3 veces x 5 L). Los extractos se filtraron y concentraron por separado hasta sequedad bajo presión reducida (335 y 337 mm Hg para el hexano y el metanol, respectivamente) en un rotaevaporador marca Buchi 461 Water Bath a 40° y se registraron los rendimientos respecto al peso seco del material vegetal (Figura 2).

Así mismo, se preparó el extracto acuoso a partir de 200 g de material vegetal empleando el proceso de digestión con agua destilada a 60°C, lográndose obtener 34.86 g. El extracto fue llevado a sequedad por proceso de liofilización hasta eliminar por completo el agua.



IZT.

Figura 2. Preparación de los extractos.

V.4. Actividad antimicobacteriana.

V.4.1. Micrométodo colorimétrico de alamar azul

Este ensayo se realizó siguiendo la metodología previamente descrita por Collins y Franzblau, 1997 y Pietro *et al.*, 2001, bajo estrictas condiciones de esterilidad y para ello se emplearon microplacas transparentes estériles de 96 pozos (Falcón 3072, Becton Dickinson) con tapa (Figura 3) y como microorganismo de prueba se emplearon cepas de *M. tuberculosis* H37Rv (ATCC 27294), *M. avium* (ATCC 35717) y cuatro cepas monoresistentes de *M. tuberculosis* H37Rv: resistente a estreptomicina (ATCC 35820), resistente a isoniazida (ATCC 35822), resistente a etambutol (ATCC 35837) y resistente a rifampicina (ATCC 35838); el reactivo alamar azul fue obtenido de Biociencias Alamar, Accumed, Westlake, Ohio.

El fundamento de este ensayo radica en el cambio de color del alamar azul, el cual utiliza como sustancia indicadora de oxido-reducción el colorante resarzurina; este colorante permanece de color azul (estado oxidado) cuando no hay crecimiento bacteriano o no existe alteración del pH del medio donde se encuentra; por lo contrario cuando existe crecimiento bacteriano y se altera el pH del medio, el alamar azul cambia a un color rosa (estado reducido) (Yajko *et al.*, 1995).

Desarrollo del ensayo:

Los pozos de la periferia de la placa se les adicionó 200 μL de agua destilada con la finalidad de mantener la humedad durante el proceso de incubación. El resto de los pozos se utilizaron para el ensayo biológico (Figura 3). A cada pozo se le agregaron 100 μL de medio de cultivo Middlebrook 7H9 enriquecido con OADC (ácido oleico, albúmina, dextrosa y catalasa), 20 μL de la muestra problema (extracto, fracción o compuesto puro) o del control y posteriormente se le adiciono 100 μL de suspensión de *M. tuberculosis* a una concentración de 6×10^5 UFC/mL, el cual fue comparado con el tubo 1 del estándar de McFarland. Es importante mencionar que en cada ensayo se prepararon tres controles, uno de disolvente (**m**), otro de microorganismo sin droga (**b**) y el último de microorganismo diluido 1:100 (**d**).

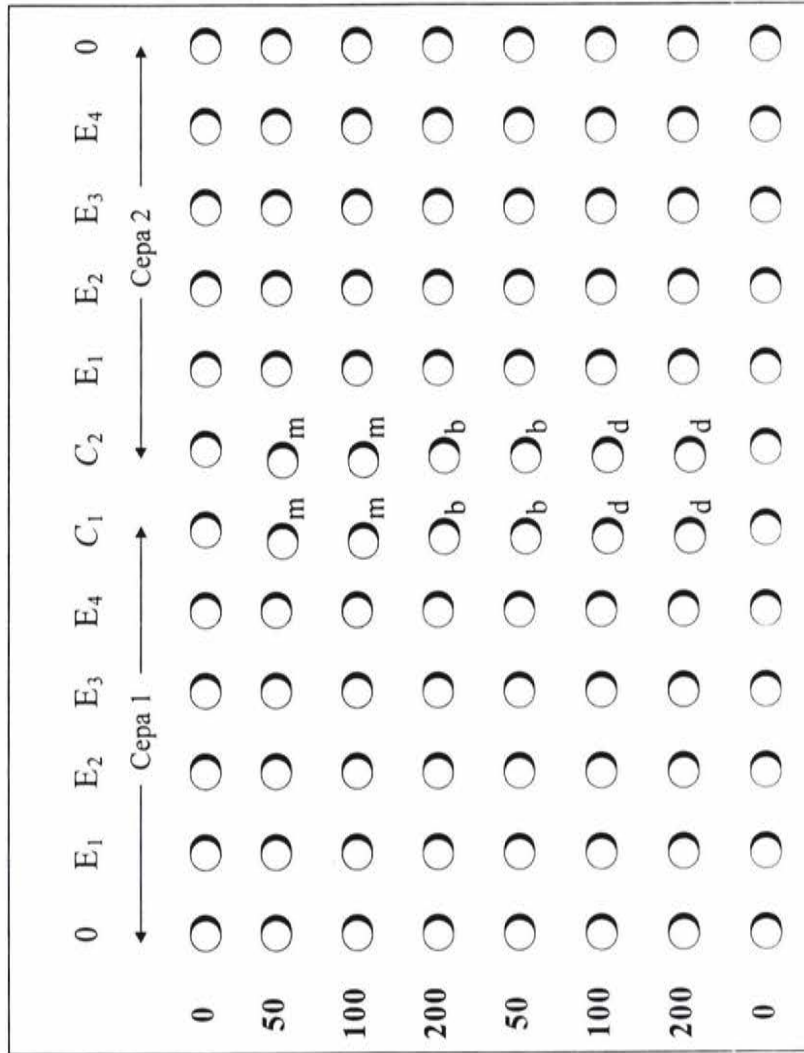
Las muestras problemas de tipo orgánico (extractos y fracciones) se solubilizaron en DMSO y las muestras acuosas en medio 7H9 y se evaluaron a las concentraciones de 200, 100 y 50 $\mu\text{g/mL}$ y por triplicado. En cada ensayo se emplearon 0.125 $\mu\text{g/mL}$ de rifampicina o etambutol como fármaco de referencia.

Las placas una vez inoculadas se incubaron a 37°C durante 5 días. Transcurrido el tiempo de incubación, el control **b** fue evaluado añadiendo al pozo 20 μL de solución 10x de alamar azul y 12.5 μL de tween 80 al 20%. Las placas se reincubaron por 24 h más a 37°C. La adición del alamar azul a este control sirve para observar el crecimiento óptimo de la micobacteria, el cambio de color de azul a rosa indica que hubo crecimiento de la micobacteria, por lo que se procede a agregar al resto de los pozos el tween 80 (12.5 μL) y el

alamar azul (20 μ L). Las microplacas se incubaron nuevamente a 37°C por 24 h, transcurrido este tiempo las placas fueron observadas en forma visual.

Los resultados fueron interpretados como positivos en aquellos casos donde el color del alamar azul permanece sin cambio después del último periodo de incubación, lo que indica que no hubo crecimiento de la micobacteria y su crecimiento fue inhibido por presencia del extracto o de la fracción. En aquellos pozos donde se presentó un cambio en la coloración (rosa), el resultado se toma como negativo, indicándonos que hubo crecimiento de la micobacteria y que el extracto no inhibe su desarrollo.

Figura 3. Microplaca de 96 pozos para determinar la actividad antimicrobacteriana por el micrométodo colorimétrico de alamar azul.



E₁, E₂, E₃ y E₄ = extractos, fracciones y/o compuestos; C₁ = controles de cepa 1; C₂ = controles de cepa 2; m = control de medio; b = control de bacteria sin droga; d = control de bacteria diluida

V.4.2. Método radiorespirométrico automatizado (Bactec TB-460)

Se realizó siguiendo la metodología descrita por Cantrell *et al.*, 1996, 1998, 1999a; Collins y Franzblau, 1997; Franzblau, 1998; Inderlled, 1994. Este método es ampliamente utilizado para determinar la actividad antimicobacteriana de sustancias de origen sintético o natural; el cual emplea un medio líquido (Becton Dickinson Bactec 7H12, 4 mL) que contiene como sustrato al ácido palmítico marcado isotópicamente con ^{14}C como fuente de carbono. Durante el crecimiento de la micobacteria, el ácido palmítico es metabolizado liberando $^{14}\text{CO}_2$ en la atmósfera por encima del medio líquido de la cámara cerrada y el equipo Bactec TB-460 automatizado (Becton Dickinson Diagnostic Instrument System John-Stan Laboratories, Towson, MD) mide la cantidad de $^{14}\text{CO}_2$ liberado. El valor de $^{14}\text{CO}_2$ es proporcional a la cantidad de microorganismo presente en el medio, de esta forma se registra el índice de crecimiento (GI) de la micobacteria en una escala de cero a 999. Es importante mencionar que el registro de $^{14}\text{CO}_2$ se determinó cada 24 h después del tercer día de incubación y hasta que el control de cultivo o de disolvente alcanzó un GI de 999. Por este ensayo biológico se realizó por triplicado y se empleó *M. tuberculosis* H37Rv (ATCC 27294)

De cada extracto seco (libre de disolvente) se tomaron 8 mg de peso seco y se solubilizaron en 1 mL de DMSO; esta solución patrón (8 mg/mL) se esterilizó por filtración empleando un filtro estéril de 0.22 μm de diámetro (Millex-FG, Millipore, Bedford, MA) y se almacenó a -80°C hasta ser utilizados. De esta muestra se realizaron diluciones 1:2 (4 mg/mL), 1:4 (2 mg/mL) y 1:8 (1 mg/mL) en DMSO. De la solución patrón (8 mg/mL) y de estas últimas diluciones se

tomaron 100 μL y por separado se adicionaron a 4 mL de medio 7H12 (Bactec 12B); obteniéndose así concentraciones finales en los viales de ensayo de 200, 100, 50 y 25 $\mu\text{g/mL}$.

Para el caso del ensayo de 400 $\mu\text{g/mL}$, se tomaron 200 μL de la solución patrón (8 mg/mL) y se adicionaron a 4 mL de medio 7H12 (Bactec 12B). En cada estudio se prepararon cuatro controles; dos de disolvente (DMSO), que recibieron 100 y 200 μL de DMSO, un tercer control fue el control positivo (rifampicina 0.125 $\mu\text{g/mL}$) y el cultivo control.

M. tuberculosis H37Rv fue previamente cultivado en el medio 7H12 (Bactec 12B) hasta alcanzar un GI de 999; del cual se tomaron 100 μL y se adicionaron a cada vial (controles y muestra problema), una vez inoculados los viales con muestra problema y microorganismos, estos se incubaron a 37°C por tres días consecutivos. La lectura de GI se determinó diariamente después de un periodo de incubación de tres días y se registraron hasta observar un GI de 999 en el control de DMSO, en caso de que el control no alcanzará este valor, el estudio finalizaba hasta el décimo día.

El porcentaje de inhibición fue calculado con la siguiente fórmula:

$$1 - (\text{GI muestra problema} / \text{GI control de disolvente}) \times 100.$$

Los resultados fueron interpretados como negativos en aquellos extractos donde hubo presencia de $^{14}\text{CO}_2$, lo que señala que hubo metabolismo activo y crecimiento de las micobacterias; por lo contrario, la falta de $^{14}\text{CO}_2$ indicó que el crecimiento de las micobacterias fue inhibida por los extractos.

En el caso de la evaluación de las fracciones y compuestos puros se siguió la misma metodología previamente descrita, con la única diferencia de que estos fueron evaluados a la concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

V.5. Fraccionamiento biodirigido de los extractos activos de *Chamaedora tepejilote*.

V.5.1. Extracto hexánico.

Una vez realizada la evaluación biológica de los extractos, se procedió a realizar el fraccionamiento químico-biodirigido del extracto que mostró mayor actividad. Como primer paso, se realizó el fraccionamiento del extracto hexánico (8.3 g) utilizando la cromatografía de adsorción en columna abierta, empacada con 83.02 g de sílica gel y como sistemas de elución se utilizaron mezclas de disolventes con grado creciente de polaridad, los cuales se describen en la Tabla 4. Este proceso permitió obtener un total de 64 fracciones de 250 mL cada una. El análisis de cromatografía en capa fina (ccf) se realizó siguiendo las técnicas convencionales, en este caso se utilizaron placas de aluminio recubiertas de gel de sílice (Kiesegel 60 F₂₅₄, Merck) y como agente cromogénico se utilizó ácido sulfúrico al 10%. El análisis cromatográfico permitió reunir las fracciones primarias en 10 grupos (F1-F10). Cada fracción primaria, fue sometida a evaluación biológica por el micrométodo colorimétrico de alamar azul y el radiorespirométrico. En el primer ensayo, las fracciones fueron evaluadas a tres diferentes concentraciones (50, 100 y 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y en el ensayo radiorespirométrico las fracciones fueron evaluadas a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Cada ensayo se realizó por triplicado y se empleó como organismo

de prueba *M. tuberculosis* H37Rv. Los resultados de la evaluación antimicobacteriana de las fracciones primarias por el micrométodo colorimétrico de alamar azul, demostraron que la actividad biológica se concentraba en la fracción F8, por lo que esta fracción primaria fue objeto de una segunda cromatografía en columna, los sistemas de elución empleados en esta recromatografía se describen en la Tabla 5.

Tabla 4. Fraccionamiento primario del extracto hexánico de *Ch. tepejilote*.

| ELUYENTE | % | FRACCIONES | | CLAVE | PESO mg | RENDIMIENTO % |
|-----------|-------|------------|----------|-------|------------|------------------|
| | | ELUIDAS | REUNIDAS | | | |
| Hex | 100 | 1-29 | 1-2* | | | |
| | | | 3-13 | F1 | 323.32 | 3.89 |
| | | | 14-26 | F2 | 37.58 | 0.452 |
| | | | 27-28 | F3 | 14.94 | 0.179 |
| Hex:AcOEt | 75:25 | 30-37 | 29-30 | F4 | 2381.7 | 28.68 |
| | | | 31-37 | F5 | 1025.11 | 12.34 |
| Hex:AcOEt | 50:50 | 38-44 | 38-45 | F6 | 718.87 | 8.65 |
| Hex:AcOEt | 25:75 | 45-53 | 46-56 | F7 | 277.14 | 3.33 |
| AcOEt | 100 | 54-64 | 57-59 | F8 | 2918.62 | 35.15 |
| | | | 60-61 | F9 | 90.54 | 1.09 |
| | | | 62-64 | F10 | 141.56 | 1.70 |

* Fracción desechada.

De la fracción activa F8 se colectaron un total de 39 fracciones secundarias de 250 mL cada una, las cuales fueron agrupadas de acuerdo a sus características cromatográficas en ccf. Este proceso generó un total de 11 grupos de fracciones secundarias (F8-A a F8-K). Del fraccionamiento secundario, la F8-E eluidas con Hex:AcOEt (90:10 y 80:20) y la F8-F eluidas con Hex:AcOEt (80:20) se obtuvieron 1.9 y 19.9 mg de un compuesto mayoritario.

Tabla 5. Fraccionamiento secundario de la fracción activa (F8) de *Ch. tepejilote*.

| ELUYENTE | % | FRACCIONES | | CLAVE | PESO (mg) |
|------------|-------|------------|----------|-------|-----------|
| | | ELUIDAS | REUNIDAS | | |
| Hex: AcOEt | 90:10 | 1-9 | 1 | F8-A | 51.8 |
| | | | 2 | F8-B | 53.6 |
| | | | 3-4 | F8-C | 18.0 |
| | | | 5-8 | F8-D | 19.3 |
| | | | 9 | F8-E | 1.9 |
| Hex: AcOEt | 80:20 | 10-14 | 10-11 | | |
| | | | 12-14 | F8-F | 19.9 |
| Hex: AcOEt | 70:30 | 15-19 | 15-19 | F8-G | 51.2 |
| | | | 20 | F8-H | 29.3 |
| Hex: AcOEt | 60:40 | 21-25 | 21-22 | | |
| | | | 23-25 | F8-I | 89.8 |
| Hex: AcOEt | 50:50 | 26-30 | 26-29 | | |
| | | | 30 | F8-J | 71.0 |
| Hex: AcOEt | 25:75 | 31-35 | 31-32 | | |
| | | | 33-35 | F8-K | 170.0 |
| AcOEt | 100% | 36-39 | 36-39 | | |

Cabe destacar, que en la fracción secundaria F8-A se detectó la presencia de β -sitosterol, al realizar ccf de tipo comparativa con una muestra comercial, presentando un Rf idéntico.

La evaluación antimicobacteriana por el método radiorespirométrico de las fracciones primarias indicó que, las fracciones F1 y F8 inhiben el crecimiento de la micobacteria a la concentración de 100 μ g/mL. Las fracciones primarias F3, F4 y F5 no afectaron el crecimiento de *M. tuberculosis* H37Rv a 100 μ g/mL y en estas fracciones se detectó la presencia de β -sitosterol, al ser comparado en ccf con una muestra comercial, presentando un Rf idéntico.

V.5.2. Fraccionamiento químico de los extractos metanólico y acuoso.

De manera adicional se realizó el fraccionamiento químico de los extractos metanólico y acuoso; dado que el primero de ellos presentó moderada actividad sobre el crecimiento de la micobacteria con un 38.85% de inhibición a 100 $\mu\text{g/mL}$

En primer término, se realizó el fraccionamiento químico del extracto metanólico, (10 g) utilizando cromatografía en columna de fase normal empacada con 100 g de silica gel y como sistemas de elución una mezcla de disolventes con diferente grado de polaridad. Este proceso permitió obtener un total de 35 fracciones de 218 mL c/u (Tabla 6).

De las fracciones eluidas con AcOEt 100% (fracción FE) se detectó la presencia del β -sitosterol al realizar ccf con una muestra auténtica y con la muestra previamente obtenida del extracto hexánico; de las fracciones eluidas con MeOH 100% (fracción FI) se detectó la presencia de β -D-glucositolsterol por análisis comparativo en ccf con una muestra auténtica del compuesto aislado previamente de la especie *Achillea millefolium*. Cabe hacer la aclaración que a la fecha no se han evaluado biológicamente las fracciones primarias del extracto metanólico contra *M. tuberculosis*.

Tabla 6. Fraccionamiento primario del extracto metanólico de *Ch. tepejilote*.

| ELUYENTE | % | FRACCIONES | CLAVE | PESO (mg) |
|------------|-------|------------|-------|-----------|
| Hex | 100 | 1 | FA | 148.8 |
| Hex: AcOEt | 75:25 | 2-4 | FB | 25.0 |
| Hex: AcOEt | 50:50 | 5-11 | FC | 79.3 |
| Hex: AcOEt | 25:75 | 12-14 | FD | 63.0 |
| AcOEt | 100 | 15-19 | FE | 275.9 |
| AcOEt:MeOH | 75:25 | 20-22 | FF | 8.9 |
| AcOEt:MeOH | 50:50 | 23-27 | FG | 24.3 |
| AcOEt:MeOH | 25:75 | 28-33 | FH | 467.58 |
| MeOH | 100 | 34-35 | FI | 3226.15 |

El extracto acuoso fue inactivo a la máxima concentración evaluada (200 $\mu\text{g/mL}$), pero en una investigación sobre el efecto antiinflamatorio del extracto se encontró que el extracto inhibe el proceso inflamatorio (David, 2002). De acuerdo con este antecedente, se decidió realizar el fraccionamiento químico del mismo, empleando para ello cromatografía abierta de fase reversa (100 g de sephadex LH20). En la columna se colocó 1 g del extracto acuoso y se empleó como sistemas de elución MeOH y EtOH (Tabla 7). Este proceso permitió obtener un total de 19 fracciones de 40 mL cada una. Cada fracción fue analizada por cromatografía de ccf de fase reversa (Merck RP-18, F_{254}), empleando como agente cromogénico ácido difenilbórico β -dietil amino éter (NP) y polietilenglicol (PEG) (Wagner, 1994), este proceso permitió reunir aquellas fracciones que presentaron similitud cromatográfica, resultando un total de 6 grupos (Tabla 7).

Tabla 7. Fraccionamiento primario del extracto acuoso de *Ch. tepejilote*.

| ELUYENTE | % | FRACCIONES | | PESO (mg) | RENDIMIENTO (%) |
|----------|-----|------------|--------------------|-----------|-------------------|
| | | ELUIDAS | REUNIDAS | | |
| MeOH | 100 | 1-10 | 1-5 | 3.96 | 0.477 |
| | | | 6-8 | 181.7 | 19.62 |
| | | | 9-10 ^a | 195.5 | 21.12 |
| EtOH | 100 | 11-19 | 11-12 | 29.41 | 3.17 |
| | | | 13-14 | 35.38 | 3.82 |
| | | | 15-19 ^a | 3.37 | 0.36 ^c |

^apresencia de glucoflavonoides

Los compuestos detectados en las fracciones primarias del extracto acuoso están en proceso de purificación para posteriormente realizar la caracterización química de los mismos.

V.6. Caracterización química de los compuestos activos.

La identificación química del compuesto aislado de las fracciones secundarias F8-E y F8-F se realizó mediante el análisis de los espectros de infrarrojo (IR), masas (EM) y resonancia magnética nuclear protónica (RMN-H¹). En el caso de los compuestos presentes en la fracción primaria F1 su identificación se realizó mediante un análisis de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG-EM), IR y RMN-H¹.

VI. **R**ESULTADOS Y **D**ISCUSIÓN

VI.1. Selección y colecta de la especie vegetal.

Este proceso se basó en la revisión de la literatura etnomédica y etnobotánica que existe sobre la medicina tradicional mexicana; así como, en la revisión de la información descrita en los ejemplares depositados en los Herbarios: IZTA de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala y MEXU del Instituto de Biología, ambas de la UNAM.

El criterio etnomédico que se tomó en cuenta en la selección de esta especie fue el uso que se le da en la medicina tradicional de nuestro país. La planta es empleada en los Estados de Veracruz y Puebla para tratar tos, tos seca, pulmonía. Al mismo tiempo, se realizó la revisión bibliográfica sobre los estudios químicos y biológicos, encontrándose que a la fecha no existe antecedente previo de tipo químico sobre esta especie. Respecto a los estudios biológicos, recientemente se reportó que el extracto hexánico de la especie presentó actividad antimicrobacteriana (Jiménez *et al.*, 2002). Tomando en cuenta estos antecedentes se decidió realizar la investigación química y antimicrobacteriana a partir de una nueva colecta con la finalidad de aislar los principios responsables de la actividad antimicrobacteriana.

VI.2. Operaciones preliminares.

Una vez colectadas las hojas de *Ch. tepejilote*, se llevó a cabo el proceso de limpieza, para eliminar tierra, basura y malezas; posteriormente el material se secó a temperatura ambiente y a la sombra, este proceso se realizó con el objetivo de inactivar los sistemas enzimáticos y evitar la alteración del contenido metabólico. Posteriormente, se procedió a moler el material vegetal para reducir el tamaño de muestra y de esta forma aumentar el área de contacto del disolvente con el material y poder realizar un proceso de extracción más eficiente.

VI.3. Preparación de los extractos.

Los extractos hexánico y metanólico se prepararon vía maceración con el respectivo disolvente. Del extracto hexánico se obtuvieron 10.44 g, obteniéndose un rendimiento de 2.34% y del extracto metanólico se obtuvo 38.12 g, con un rendimiento de 13.57%. De manera adicional se preparó el extracto acuoso, vía proceso de digestión obteniéndose 34.86 g con un rendimiento de 17.43%. Cabe mencionar que los rendimientos se expresan con relación al peso del material vegetal seco y molido.

VI.4. Actividad antimicobacteriana de los extractos hexánico y metanólico de *Ch. tepejilote*.

El micrométodo colorimétrico de alamar azul es muy empleado para determinar viabilidad celular de microorganismos como bacterias gram negativas y levaduras (Yajko *et al.*, 1995). Sin embargo, no es muy utilizado para la evaluación de productos naturales. Cabe señalar que a la fecha existe solamente un trabajo que emplea este ensayo biológico para la evaluación de productos naturales (Pietro *et al.*, 2001); dentro de los modelos biológicos mayormente utilizados para evaluar la actividad antimicobacteriana de extractos y compuestos de origen natural se emplea el método radiorespirométrico (Cantrell *et al.*, 1996; 1998; 1999a y 1999b) y métodos menos utilizados son el método de proporciones (Van Puyvelde *et al.*, 1994) y el método de agar en plato (Lall y Meyer, 1999).

El método radiorespirométrico es costoso por el uso de sustancias radiactivas, requiere de mayor tiempo para la obtención de resultados pero con la ventaja que es muy confiable, reproducible y muy empleado (Cantrell *et al.*, 1996; 1999a y 1999b; Collins y Franzblau, 1997; Franzblau *et al.*, 1998; Inderlied, 1994).

El micrométodo colorimétrico de alamar azul presenta ventajas importantes respecto al radiorespirométrico, ya que es un ensayo sencillo, rápido, reproducible y de bajo costo y nos permite determinar la susceptibilidad de diferentes cepas de micobacterias frente a sustancias de origen natural y sintético; dentro de los trabajos descritos en la literatura empleando este

ensayo para explorar la actividad de extractos de plantas podemos citar el realizado por Pietro *et al.*, 2000., donde se describe la evaluación antimicobacteriana de *Physalis angulata* que fue evaluado en un rango de concentración de 4000 a 625 $\mu\text{g/mL}$ para el extracto y de 2500 a 4 $\mu\text{g/mL}$ para las fracciones, empleando como organismos de prueba *M. tuberculosis* H37Rv, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. malmoense* y *M. kansasii*. Los resultados de la evaluación del extracto hidroalcohólico de las partes aéreas de *P. angulata* indicaron que inhibe el crecimiento de *M. tuberculosis* H37Rv a una concentración de 500 $\mu\text{g/mL}$ y la fracción A1-2912 del extracto clorofórmico de la misma planta resultó activo a 32 $\mu\text{g/mL}$ contra las mismas micobacterias y de 625 $\mu\text{g/mL}$ contra *M. avium*.

Tomando en cuenta que en la literatura se describen algunos métodos para determinar la actividad antimicobacteriana de extractos de plantas y que en un estudio previo (Jiménez *et al.*, 2002). se reportó que el extracto hexánico de *Ch. tepejilote* inhibe el crecimiento de *M. tuberculosis* donde emplearon el micrométodo colorimétrico de alamar azul. En el presente trabajo se decidió utilizar tanto el micrométodo colorimétrico de alamar azul y el radiorespirométrico para evaluar los extractos hexánico, metanólico y acuoso de las hojas de *Ch. tepejilote* de una nueva colecta.

Por el micrométodo colorimétrico del alamar azul, los extractos se evaluaron a tres diferentes concentraciones (200, 100 y 50 $\mu\text{g/mL}$) y por el método radiorespirométrico los extractos fueron evaluados a cinco concentraciones

diferentes (400, 200, 100, 50, 25 $\mu\text{g/mL}$), en cada caso los ensayos se realizaron por triplicado.

En primer término se describirán los resultados obtenidos por el micrométodo colorimétrico de alamar azul (Tabla 8). El extracto hexánico inhibió el crecimiento de *M. tuberculosis* H37Rv a la concentración de 200 $\mu\text{g/mL}$, mientras que el extracto metanólico y acuoso no presentaron actividad a esta misma concentración. Los resultados obtenidos de esta nueva colecta concuerdan con los previamente reportados para la especie vegetal (Jiménez *et al.*, 2002), en donde se encontró que únicamente el extracto hexánico mostró actividad antimicobacteriana.

Tabla 8. Resultados de la evaluación antimicobacteriana de los extractos de *Ch. tepejilote* contra *M. tuberculosis* H37Rv y *M. avium* por el micrométodo colorimétrico de alamar azul.

| Extracto | <i>M. tuberculosis</i> H37Rv ($\mu\text{g/mL}$) | <i>M. avium</i> ($\mu\text{g/mL}$) |
|--------------|--|--------------------------------------|
| Hexánico | 200 | >200 |
| Metanólico | >200 | >200 |
| Acuoso | >200 | >200 |
| Rifampicina* | 0.125 | - |

*Control positivo.

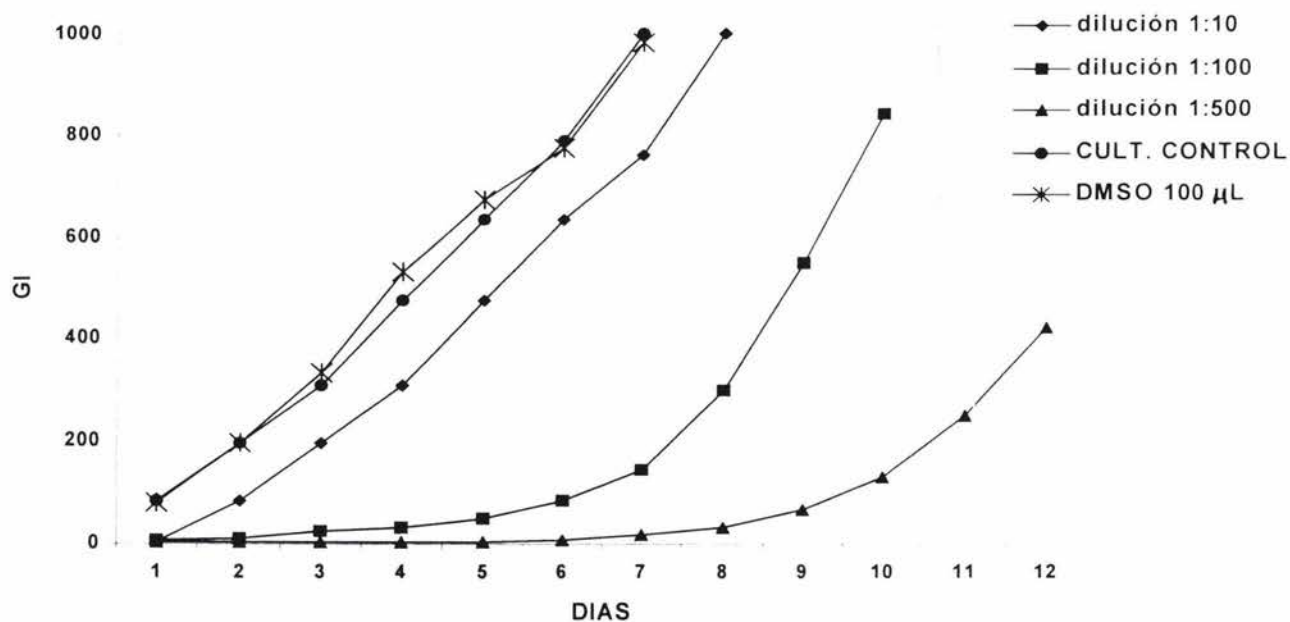
Es importante mencionar, que en este estudio, el extracto hexánico presentó actividad a 200 $\mu\text{g/mL}$, lo que nos indica que este ensayo biológico nos permite realizar evaluaciones en rangos de concentración más bajos que los reportados para *P. angulata* (Pietro *et al.*, 2000), donde evaluaron el extracto en un rango

de 4000 a 62.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, indicándose que el extracto fue activo a 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ por el micrométodo colorimétrico de alamar azul; sin embargo, en este estudio se pudo detectar actividad biológica a menor concentración.

El micrométodo colorimétrico de alamar azul es un modelo biológico y poco utilizado para evaluar extractos por lo que se decidió emplear el método radiorespirométrico automatizado Bactec TB-460 con la finalidad de corroborar la actividad antimicobacteriana encontrado en los extractos. Este último bioensayo, además de proporcionar resultados más exactos, es un modelo ampliamente utilizado para evaluar la actividad de los extractos y compuestos de origen natural (Cantrell *et al.*, 1996, 1998, 1999a, 1999b; Collins y Franzblau, 1997; Franzblau *et al.*, 1998).

En el presente trabajo se realizó la evaluación antimicobacteriana de los extractos hexánico, metanólico y acuoso y como control positivo rifampicina (0.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Como primer paso, se preparó el "cultivo semilla" de *M. tuberculosis*, los valores de GI de este cultivo se muestra en la Gráfica 1. Es muy importante recordar, que este ensayo consiste en medir diariamente el GI de las micobacterias, cuyos datos fueron registrados después de un periodo de incubación de tres días y hasta que el control y el control de disolvente (DMSO) alcanzó un GI de 999. tres extractos. Es importante señalar que el crecimiento de la micobacteria no se ve afectada por la presencia del DMSO (vehículo) y que el crecimiento máximo (con un GI de 999) se alcanza al séptimo día del ensayo. Una vez obtenido el "cultivo semilla" se procedió a realizar la evaluación de los tres extractos.

Las lecturas de GI obtenidas de la evaluación de los extractos (hexánico y metanólico) se muestran en la Tabla 9 y en la Gráfica 2 y 3. Como se puede observar en la gráfica 2, el extracto hexánico inhibe el crecimiento de la micobacteria y el extracto metanólico afecta este crecimiento pero en menor grado (Gráfica 3) respecto al control.

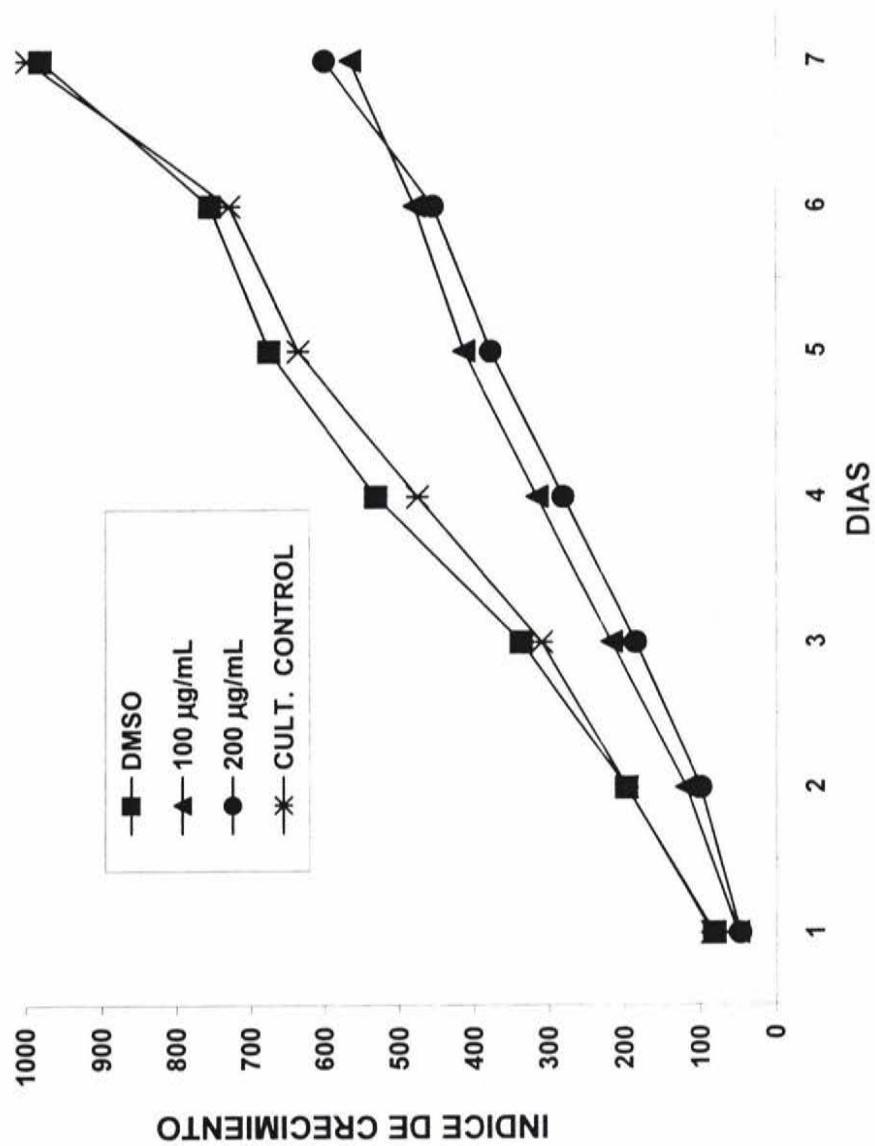


Gráfica 1. Curva de crecimiento de *M. tuberculosis* H37Rv.

Tabla 9. Resultados de la evaluación de los extractos de *Ch. tepejilote* contra *M. tuberculosis* H37Rv por el método radiorespirométrico.

| Índice de crecimiento | | | | | | | | | |
|-----------------------|--------------------------|-----|-----|-----|-----|-----------------|----------------------------|-----|------------------------|
| Días | Ext. Hexánico (µg/mL) | | | | | Control DMSO | Ext. metanólico (µg/mL) | | Ext. acuoso (µg/mL) |
| | 25 | 50 | 100 | 200 | 400 | | 100 | 200 | |
| 3 | 135 | 94 | 59 | 60 | 91 | 336 | 217 | 185 | 326 |
| 4 | 159 | 120 | 72 | 87 | 156 | 530 | 315 | 280 | 511 |
| 5 | 240 | 186 | 103 | 136 | 226 | 674 | 413 | 377 | 679 |
| 6 | 313 | 263 | 139 | 183 | 325 | 754 | 479 | 454 | 775 |
| 7 | 414 | 348 | 229 | 284 | 493 | 981 | 565 | 600 | 999 |

Gráfica 3. Efecto del extracto metanólico sobre el crecimiento de *M. tuberculosis* H37Rv



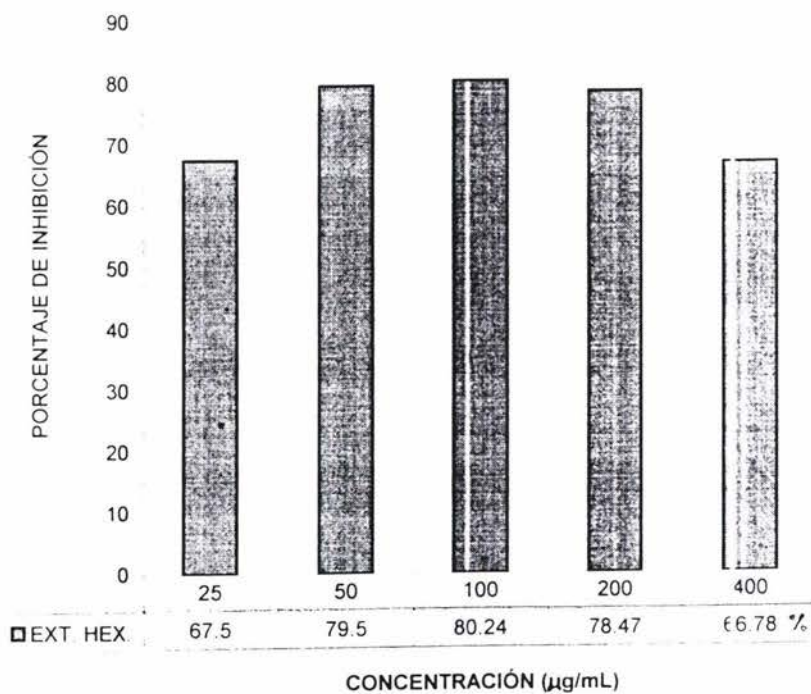
El porcentaje de inhibición de los extractos sobre *M. tuberculosis* se calcularon mediante la fórmula previamente descrita en la metodología. Los resultados indicaron que el extracto hexánico a las concentraciones de 25 $\mu\text{g/mL}$ inhibe un 67.5 y a 100 $\mu\text{g/mL}$ presentó un 80.24% de inhibición. Mientras que el extracto metanólico a la concentración de 100 y 200 $\mu\text{g/mL}$ mostró un 35.48% y un 38.82% de inhibición con respecto al control de DMSO (Gráfica 4, 5 y Tabla 10). Los resultados obtenidos por este método, indicaron que el extracto hexánico al ser evaluado a las concentraciones de 25 a 100 $\mu\text{g/mL}$ presenta un incremento en el porcentaje de inhibición dependiente de la concentración, pero al evaluarlo a las concentraciones mayores de 200 y 400 $\mu\text{g/mL}$ se observa un efecto independiente de la concentración; por ultimo los resultados encontrados al evaluar el extracto acuoso se observo que este no afecta el crecimiento de la micobacteria (Tabla 10).

Tabla 10. Porcentajes de inhibición de los extractos de *Ch. tepejilote* sobre el crecimiento de *M. tuberculosis* H37Rv.

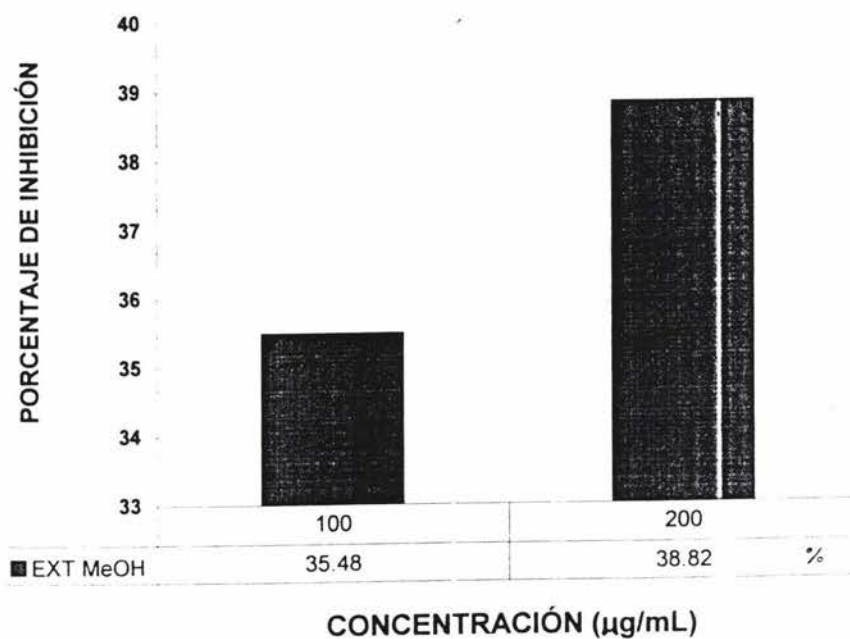
| | Ext. Hexánico ($\mu\text{g/mL}$) | | | | | Ext. metanólico ($\mu\text{g/mL}$) | | Ext. acuoso ($\mu\text{g/mL}$) |
|-----------------|---------------------------------------|------|-------|-------|-------|---|-------|-------------------------------------|
| | 25 | 50 | 100 | 200 | 400 | 100 | 200 | 100 |
| % de inhibición | 67.5 | 79.5 | 80.24 | 78.47 | 66.78 | 38.85 | 43.79 | 0 |

La comparación del efecto del extracto hexánico respecto al mostrado por el extracto metanólico, indica que el extracto de menor polaridad presenta mayor porcentaje de inhibición sobre el crecimiento de la micobacteria, lo que hace pensar que la actividad se debe principalmente a la presencia de compuestos

poco polares. Esta misma actividad se observó al evaluar los extractos por el micrométodo colorimétrico de alamar azul.



Gráfica 4. Porcentaje de inhibición del ext. hexánico de *Ch. tepejilote* sobre el crecimiento de *M. tuberculosis* H37Rv



Gráfica 5. Porcentaje de inhibición del ext. MeOH de *Ch. tepejilote* sobre el crecimiento de *M. tuberculosis* H37Rv.

La evaluación de los extractos por ambos métodos indicaron que el extracto hexánico fue el más activo; sin embargo, la actividad del extracto metanólico no fue detectada por el micrométodo colorimétrico de alamar azul, pero por el método radiorespirométrico se observó un porcentaje de inhibición considerable. Por lo que se confirma que el método radiorespirométrico es más sensible para detectar la actividad antimicobacteriana de extractos o compuestos de origen natural.

Es importante mencionar que por el método radiorespirométrico se ha reportado que numerosos extractos que inhiben completamente el crecimiento de las micobacterias a 100 $\mu\text{g/mL}$; entre las especies que podemos mencionar están los extractos metanólicos de *Borrichia frutescens*, *Chrysoma pauciflosculosa*, *Erigeron philadelphicus*, *Inula helenium*, *Magnolia grandiflora*, *M. acuminata*, *Azorella madreporica*, *Solidago petiolaris*, *S. arguta*, y *Melia volkensii*, las cuales mostraron un 99% de inhibición.

Tomando en cuenta que el extracto hexánico fue el que presentó mayor porcentaje de inhibición sobre el crecimiento de *M. tuberculosis* H37Rv por ambos métodos se decidió evaluar el efecto de este extracto sobre cuatro cepas mono-resistentes de *M. tuberculosis* H37Rv (H, R, S, y E) a tres diferentes concentraciones (50, 100 y 200 $\mu\text{g/mL}$) por el micrométodo colorimétrico de alamar azul.

Los resultados indicaron que este extracto inhibe únicamente el crecimiento de *M. tuberculosis* resistente a isoniazida y de *M. tuberculosis* resistente a

rifampicina a la concentración de 100 y 200 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (Tabla 11). Cabe destacar que en la literatura revisada, no existe trabajo alguno referente a la evaluación de efecto de los extractos de plantas sobre cepas mono-resistentes de *M. tuberculosis* y este trabajo puede considerarse como el primero que describe la actividad antimicobacteriana sobre cepas mono-resistentes de la especie *Ch. tepejilote*.

Tabla 11. Resultados de la evaluación antimicobacteriana del extracto hexánico sobre cuatro cepas mono-resistentes de *M. tuberculosis* por el micrométodo colorimétrico.

| Extracto | <i>M. tuberculosis</i> H37Rv ($\mu\text{g/mL}$) | | | |
|------------|---|----------------|----------------|----------------|
| | H ^a | R ^b | E ^c | S ^d |
| Hexánico | 100 | 200 | >200 | >200 |
| Metanólico | >200 | >200 | >200 | >200 |
| Acuoso | ND | ND | ND | ND |

^a*M. tuberculosis* resistente a isoniazida, ^b*M. tuberculosis* resistente a rifampicina

^c*M. tuberculosis* resistente a etambutol, ^d*M. tuberculosis* resistente a estreptomina

VI.5. Fraccionamiento químico biodirigido del extracto activo.

Una vez obtenidos los resultados de la evaluación biológica por el micrométodo colorimétrico de alamar azul y radiorespirométrico de los extractos, se procedió a realizar el fraccionamiento del extracto más activo (hexánico). Este proceso se llevó a cabo usando cromatografía en columna de fase normal empleando sílica gel como fase estacionaria y como fase móvil se utilizaron diferentes sistemas de elución con grado creciente de polaridad (Tabla 4, metodología). Este fraccionamiento permitió obtener 10 grupos de fracciones primarias, los cuales fueron reunidos de acuerdo a su perfil cromatográfico observado en ccf, utilizando como agente revelador H_2SO_4 al 10%. Cada grupo de fracción primaria (F1-F10) fue sometido a evaluación biológica empleando los mismos ensayos utilizados en la evaluación de los extractos. Para el caso del ensayo por el micrométodo colorimétrico de alamar azul, las fracciones fueron evaluadas a tres concentraciones (50, 100 y 200 $\mu g/mL$) y por el método radiorespirométrico las fracciones fueron evaluadas únicamente a 100 $\mu g/mL$ y en ambos casos se utilizó como microorganismo de prueba *M. tuberculosis* H37Rv.

Al evaluar las fracciones por el micrométodo colorimétrico de alamar azul, los resultados indicaron que la actividad biológica se concentraba en la fracción F8 (Tabla 12), resultando activa a 200 $\mu g/mL$.

Tabla 12. Resultados de la actividad antimicobacteriana de las fracciones primarias por el micrométodo colorimétrico de alamar azul de *Ch. tepejilote*.

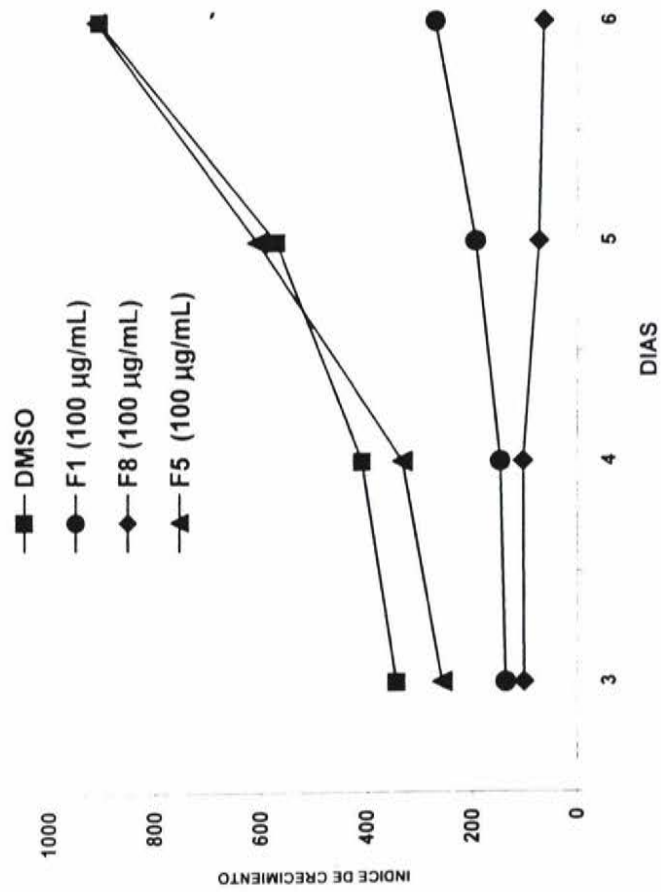
| FRACCIÓN PRIMARIA | <i>M. tuberculosis</i> H37Rv ($\mu\text{g/mL}$) |
|-------------------|---|
| F 1 | >200 |
| F 2 | >200 |
| F 3 | >200 |
| F 4 | >200 |
| F 5 | >200 |
| F 6 | >200 |
| F 7 | >200 |
| F 8 | 200 |
| F 9 | >200 |
| F 10 | >200 |
| Rifampicina* | 0.125 |

*control, positivo

Al realizar la evaluación antimicobacteriana de estas fracciones por el método radiorespirométrico se encontró que la fracción F1 y la F8 inhiben el crecimiento de la micobacteria. Las lecturas del índice de crecimiento obtenidos al evaluar estas fracciones primarias a 100 $\mu\text{g/mL}$ se muestra en la Tabla 13 y Gráfica 6, donde se observa que la fracción F1 y F8 afectan el crecimiento de la micobacteria, siendo la mas activa la F8.

Tabla 13. Resultados del índice de crecimiento de las fracciones primarias por el método radiorespirométrico.

| Días | Índice de crecimiento (GI) | | | | | |
|------|----------------------------|-----|------|-----|-----|-----|
| | Control DMSO | F1 | F3 | F5 | F7 | F8 |
| 0 | - | - | - | - | - | - |
| 1 | - | - | - | - | - | - |
| 2 | - | - | - | - | - | - |
| 3 | 345 | 138 | 3.67 | 258 | 258 | 163 |
| 4 | 411 | 148 | 4.43 | 334 | 334 | 105 |
| 5 | 573 | 195 | 571 | 609 | 609 | 74 |
| 6 | 909 | 271 | 862 | 914 | 914 | 65 |
| 7 | 999 | 290 | 999 | 999 | 999 | 50 |

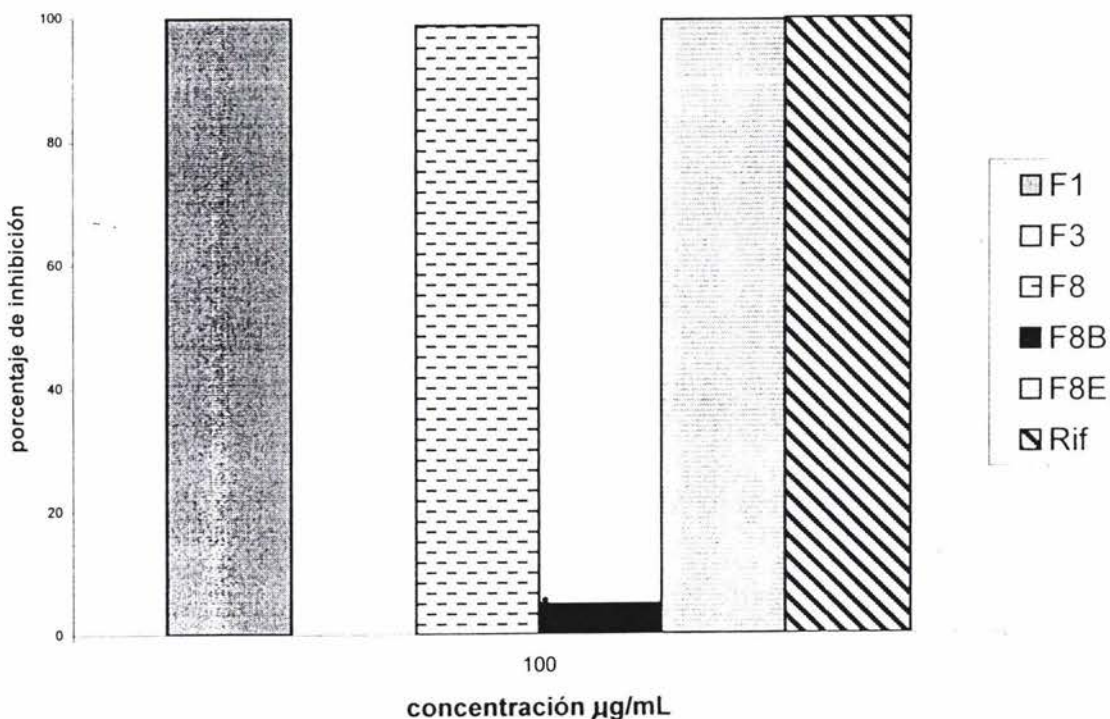


Gráfica 6. Efecto de las fracciones primarias de *Ch. tepejilote* sobre el crecimiento de *M. tuberculosis* H37Rv

Al calcular el porcentaje de inhibición respecto al control de DMSO se observó que la fracción F1 a 100 $\mu\text{g/mL}$ inhibe en un 65.04% el crecimiento de la micobacteria y la fracción F8 inhibe un 98.92% (Tabla 14 y Gráfica 7). El resto de las fracciones no afectaron el crecimiento de las micobacterias, ya que en todos los casos se presentó el 100% de crecimiento (0% de inhibición).

Tabla 14. Porcentajes de inhibición de las fracciones primarias sobre el crecimiento de *M. tuberculosis* H37Rv.

| | F1 | F3 | F5 | F7 | F8 |
|---------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| | 100 $\mu\text{g/mL}$ | 100 $\mu\text{g/mL}$ | 100 $\mu\text{g/mL}$ | 100 $\mu\text{g/mL}$ | 100 $\mu\text{g/mL}$ |
| de inhibición | 65.04% | 0.00% | 0.00% | 0.0% | 98.92% |



Gráfica 7. Porcentaje de Inhibición de las fracciones de *Ch. tepejilote* sobre el crecimiento de *M. tuberculosis* H37Rv.

Cabe mencionar que las fracciones primarias F2, F4, F6, F9 y F10 no fueron evaluadas por el método radiorespirométrico, ya que estas fracciones resultaron inactivas a la máxima concentración evaluada (200 $\mu\text{g/mL}$) por el micrométodo colorimétrico de alamar azul por falta de muestra y por que al realizar ccf de tipo comparativa se detectó la presencia de β -sitosterol en el compuesto mayoritario en las fracciones primarias F3, F4 y F5.

VI.6. Aislamiento y caracterización de los compuestos presentes en las fracciones activas.

La evaluación de las fracciones primarias indicaron que dos de ellas (F1 y F8) inhibían el crecimiento de *M. tuberculosis* H37Rv. En primer término, la fracción primaria F1 fue sometida a un análisis de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG-EM). El análisis del cromatograma obtenido (Figura 4) nos muestra que la fracción esta constituida por tres compuestos, con tiempo de retención (TR) de 19.73, 20.64 y 28.63 minutos, siendo el último el compuesto mayoritario. El espectro de masa para el compuesto mayoritario nos muestra un peso molecular de 410 que corresponde a un triterpeno con fórmula molecular de $\text{C}_{30}\text{H}_{50}$, el cual fue caracterizado químicamente como escualeno y está presente en un 80% en la fracción. Los otros dos compuestos son derivados del mismo y fueron caracterizados como farnesol con peso molecular de 222 y el éster metílico del ácido hexadecanoico cuyo peso molecular es de 272.

La identificación química del compuesto mayoritario se realizó por análisis del EM (Espectro 1) y de RMN-H¹ (Espectro 2) y por comparación de estos datos con los descritos en la literatura. Cabe mencionar que este compuesto al igual que el farnesol son intermediarios en la biosíntesis de triterpenos.

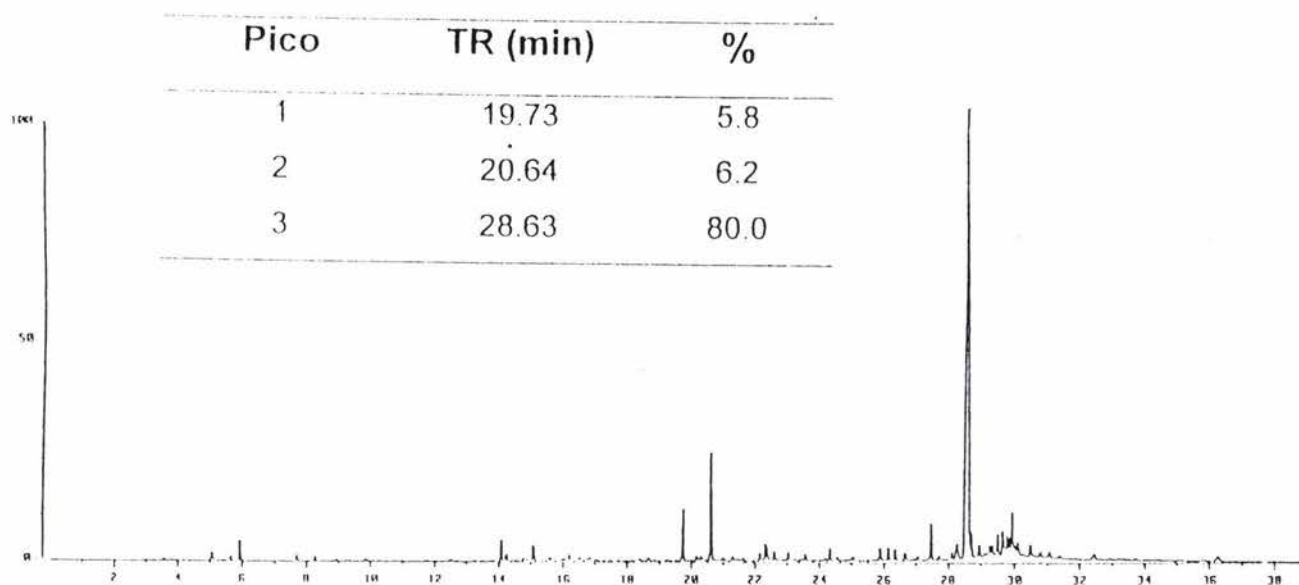


Figura 4. Cromatograma de la fracción primaria F1 de *Ch. tepejilote*

Por otro lado, dada la actividad observada en la fracción F8, se procedió a separar los compuestos presentes en la misma vía cromatografía en columna. Se tomaron 523 mg de la fracción F8 y fueron sembrados en una columna empacada con gel de sílice, el proceso de elución se describió en la Tabla 5 (ver metodología). En las fracciones secundarias (F8A) eluidas con Hex:AcOEt (90:10) se detectó la presencia de un compuesto mayoritario y en las fracciones (F8E y F8F) eluidas con Hex:AcOEt (90:10 y 80:20) respectivamente, se obtuvieron 1.9 y 19.9 mg de un polvo color crema con un punto de fusión de 280°-284°.

Cabe mencionar, que el compuesto presente en la fracción F8A correspondió al β -sitosterol, detectado también como compuesto mayoritario en las fracciones primarias F3, F4 y F5, este compuesto se identificó por comparación del Rf en ccf con una muestra auténtica empleando como sistema de elución Hex:CHCl₃ (70:30) o Hex:AcOEt (80:20) y como agente cromogénico el H₂SO₄ al 10%.

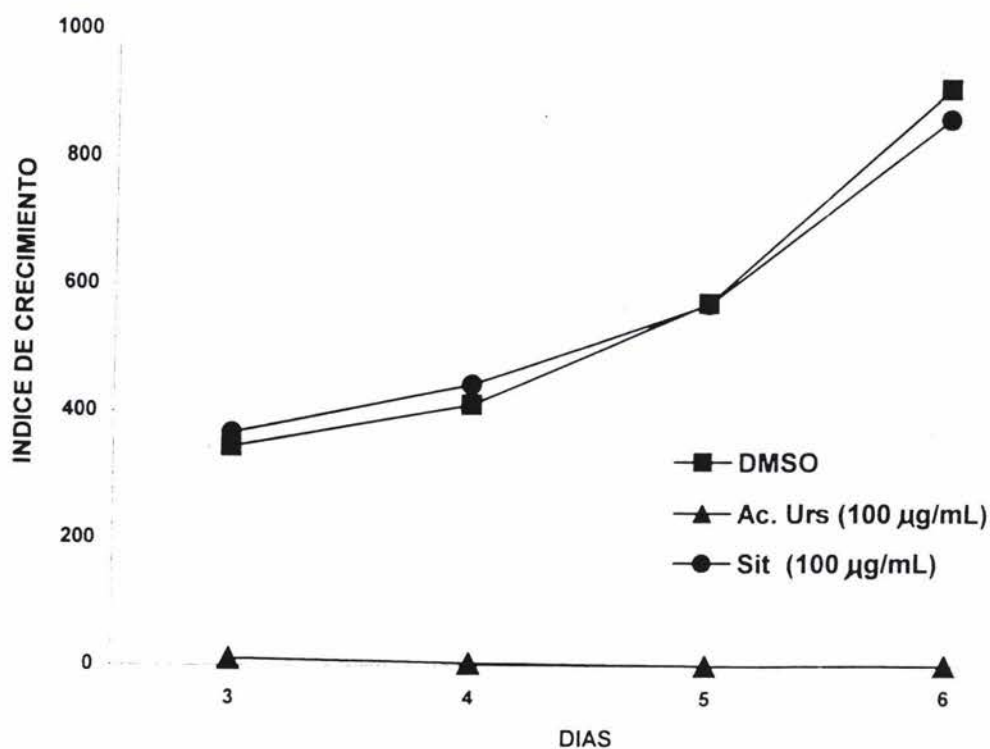
La identificación del compuesto presente en las fracciones secundarias F8E y F8F se realizó mediante el análisis de los datos de sus espectros de IR (Espectro 3), EM (Espectro 4) y RMN-H¹ (Espectro 5) que al ser comparados con los descritos en la literatura se observó que el compuesto correspondía al ácido ursólico.

Los dos compuestos (β -sitosterol y ácido ursólico) obtenidos de la F8 fueron sometidos a evaluación antimicobacteriana empleando el método radiorespirométrico a 100 μ g/mL y *M. tuberculosis* H37Rv como

microorganismo de prueba. Los resultados obtenidos al registrar los índices de crecimiento se muestran en la Tabla 15 y Gráfica 8.

Tabla 15. Resultados del índice de crecimiento de los compuestos puros de *Ch. tepejilote* sobre el crecimiento de *M. tuberculosis*.

| Índice de crecimiento (GI) | | | |
|----------------------------|-----------------------------|---------------------------|---------------------------------------|
| Días | Ácido Ursólico 100 µg/mL | β-sitosterol 100 µg/mL | Control de Rifampicina 0.125 µg/mL |
| 0 | - | - | - |
| 1 | - | - | - |
| 2 | - | - | - |
| 3 | 11 | 367 | 12 |
| 4 | 4 | 443 | 4 |
| 5 | 1 | 571 | 3 |
| 6 | 0 | 862 | 1 |



Gráfica 8. Efecto de los compuestos puros de *Ch. tepejilote* sobre el crecimiento de *M. tuberculosis* H37Rv

Al calcular el porcentaje de inhibición se encontró que el β -sitosterol no afecta el crecimiento de la micobacteria, ya que presentó un 4.92% de inhibición; por el contrario el compuesto aislado de las fracciones secundarias F8E y F8F caracterizado como ácido ursólico demostró una inhibición del 99.6% a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Tabla 16). El porcentaje de inhibición que presentó este compuesto, es similar al observado para el control positivo (rifampicina).

Tabla 16. Resultados de los porcentajes de inhibición sobre el crecimiento de *M. tuberculosis* H37Rv de los compuestos aislados de la F8.

| | Escualeno | β sitosterol | Acido Ursólico |
|-----------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| | 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ | 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ | 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ |
| % de inhibición | 65.04% | 4.92% | 99.6% |

Cabe mencionar que el ácido ursólico al igual que una serie de triterpenos, fueron evaluados en una investigación anterior por el método radiorespirométrico contra *M. tuberculosis* H37Rv donde se reporta que el compuesto obtenido de la especie *A. quebracho-blanco* fue activo a la concentración de 32 μM (14.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$), el resto de triterpenos evaluados como: zeorina, lupeol, ácido oleanólico, ácido betulinico entre otros, resultaron activos en un rango de concentración de 32 a 64 μM . La conclusión obtenida de la evaluación de estos triterpenos es que la actividad antimicobacteriana se debe básicamente a la estructura química que presentan estos compuestos y al tipo de sustituyentes presentes en la molécula, así por ejemplo un grupo hidroxilo en el anillo A o B junto con la presencia de un grupo ácido, al igual que la presencia de grupos hidroximetil, propenil o 2-hidroxipropil en el anillo E del

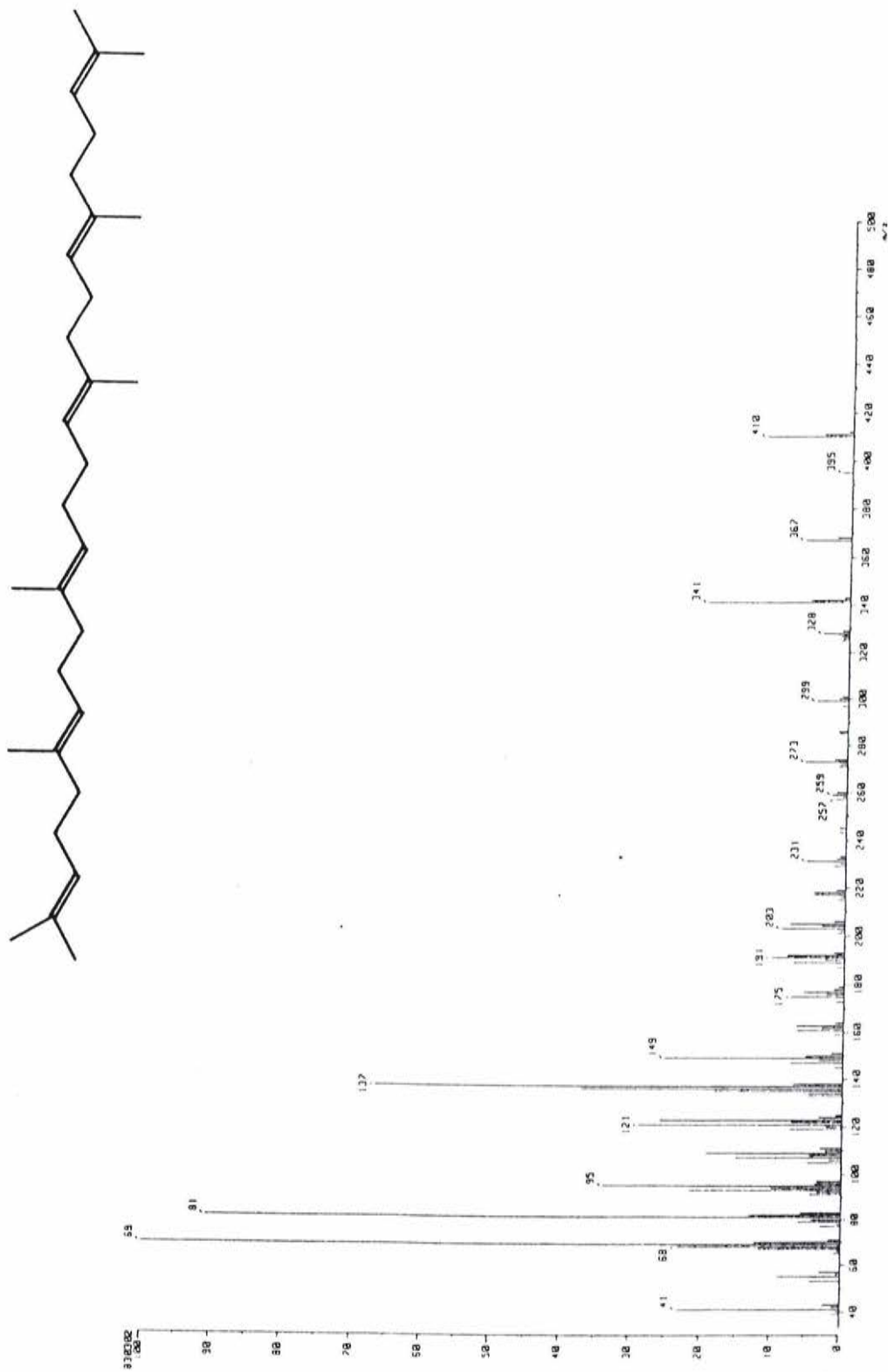
triterpeno son determinantes para obtener un efecto antimicobacteriano (Wächter *et al.*, 1999). Otra conclusión importante de estos autores es que la actividad antimicobacteriana de algunas especies vegetales se debe a la presencia de este tipo de compuestos (triterpenos) como lupeol, ácido oleanólico, ácido ursólico, ácido betúlinico, entre otros triterpenos.

Por otra parte, en la literatura se reportó que el ácido ursólico aislado de la especie *Salvia officinalis*, es el responsable de la actividad antiinflamatoria ($ID_{50} = 0.14 \mu\text{M}/\text{cm}^2$) al ser evaluado en el modelo de inducción del edema con aceite de Croton en la oreja del ratón. El efecto observado fue dos veces más potente que la indometacina ($ID_{50} = 0.26 \mu\text{M}/\text{cm}^2$), usado como fármaco no esteroidal (comercial) de referencia; en este trabajo, los autores señalan que el contenido de ácido ursólico puede emplearse como un control cualitativo en las preparaciones útiles en el tratamiento tópico de enfermedades inflamatorias (Baricevic *et al.*, 2001).

Otros autores reportan efecto antiinflamatoria de este compuesto aislado de *Pyrola rotundifolia*, al ser evaluado en el modelo del edema plantar en rata inducido con carragenina (Liu, 1995), incluso ya se ha descrito el mecanismo de acción de este compuesto como agente antiinflamatoria. El ácido ursólico, es un triterpeno ampliamente distribuido en el reino vegetal; al cual se le atribuyen otras actividades biológicas entre las que podemos citar: actividad hepatoprotectora, actividad antitumoral, actividad antimicrobiana y actividad citotóxica (Liu, 1995).

Es muy importante señalar que es la primera vez que se reporta la presencia de ácido ursólico en la especie *Ch. tepejilote*. Además este trabajo, es el primero que describe la composición química y el potencial biológico específicamente antimicobacteriano de la especie *Ch. tepejilote*.

VI.7. **E**SPECTROS

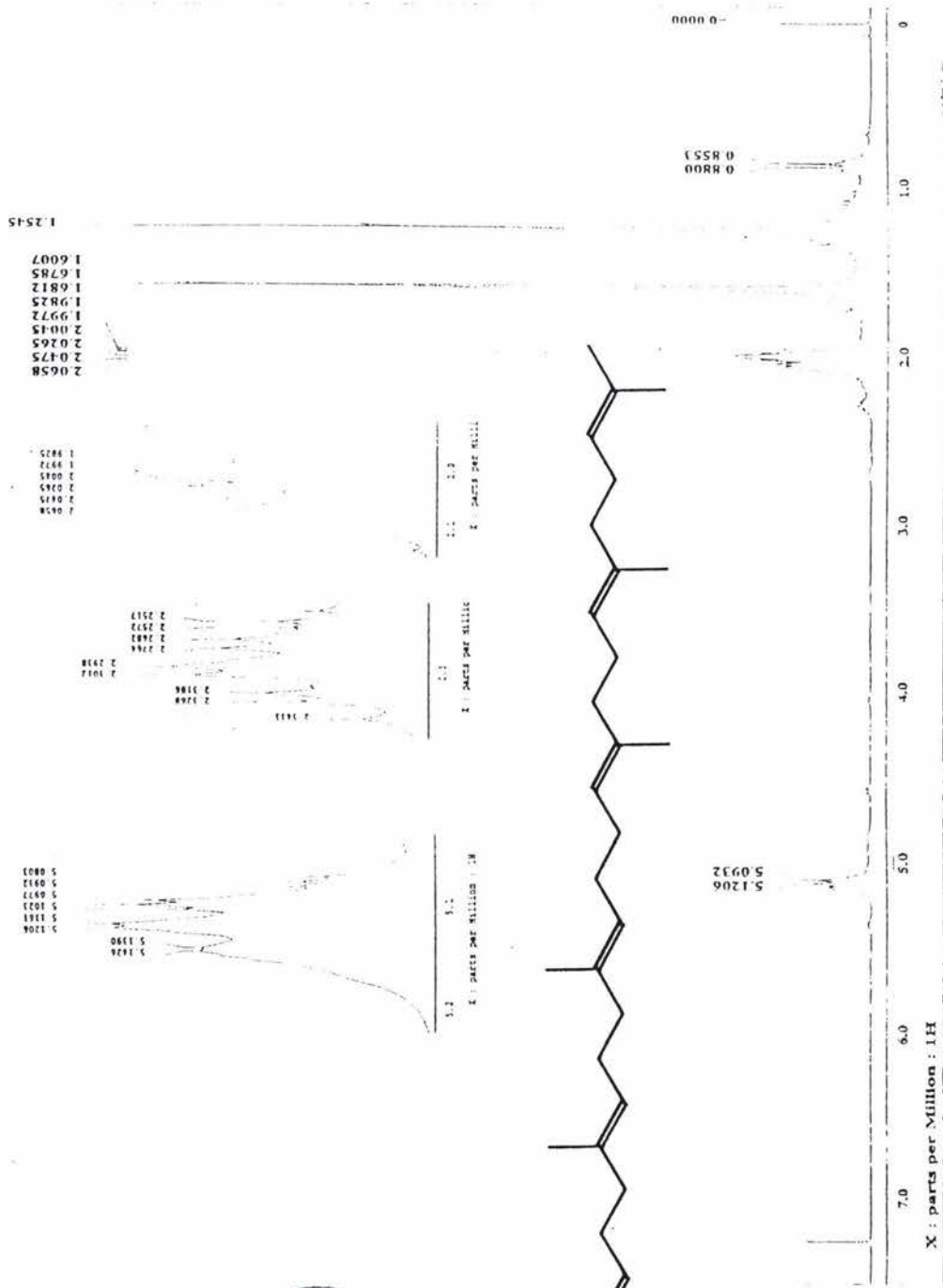


Espectro 1. Espectro de Masas del compuesto mayoritario de la fracción F1.

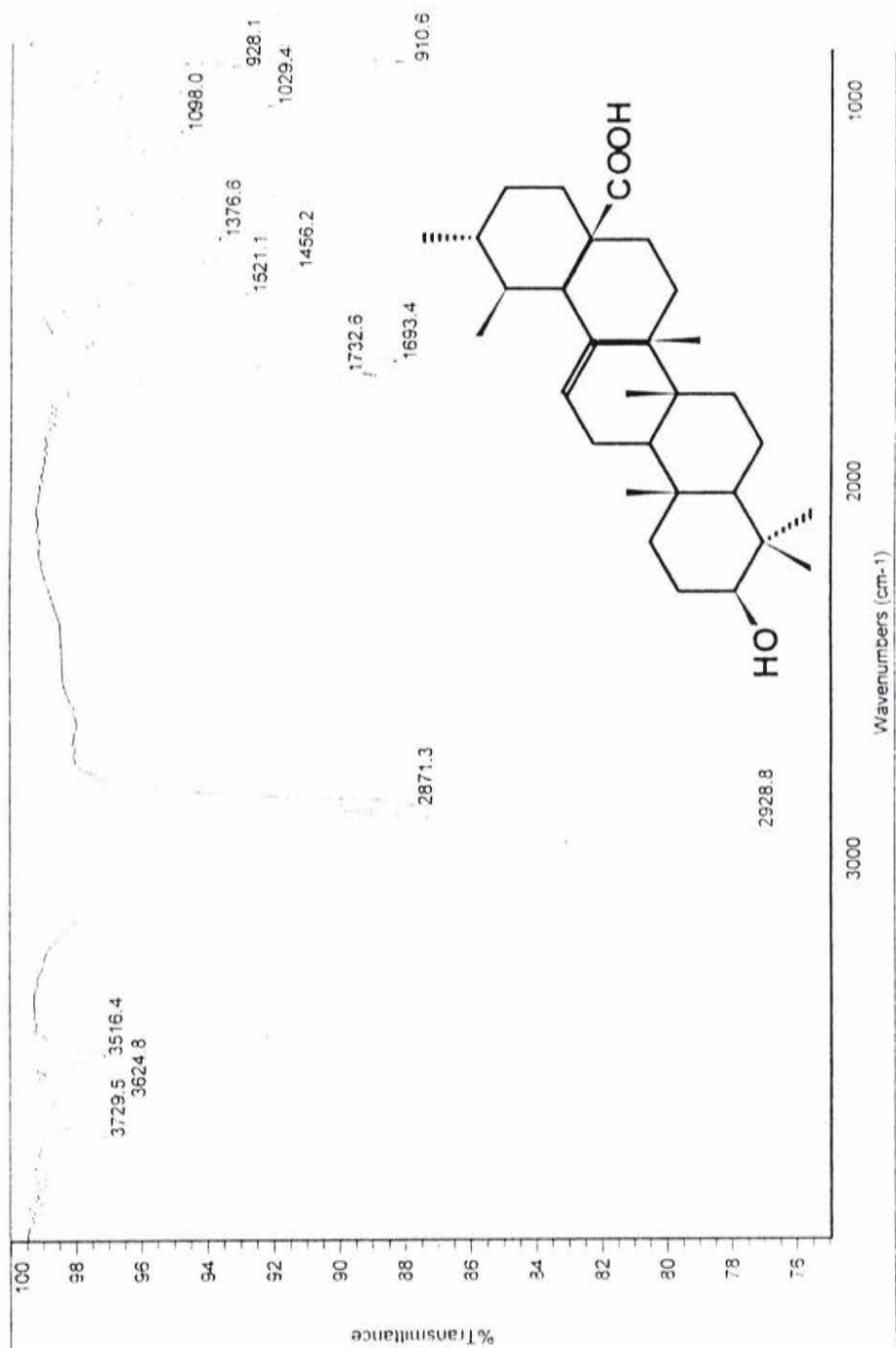
IZT.



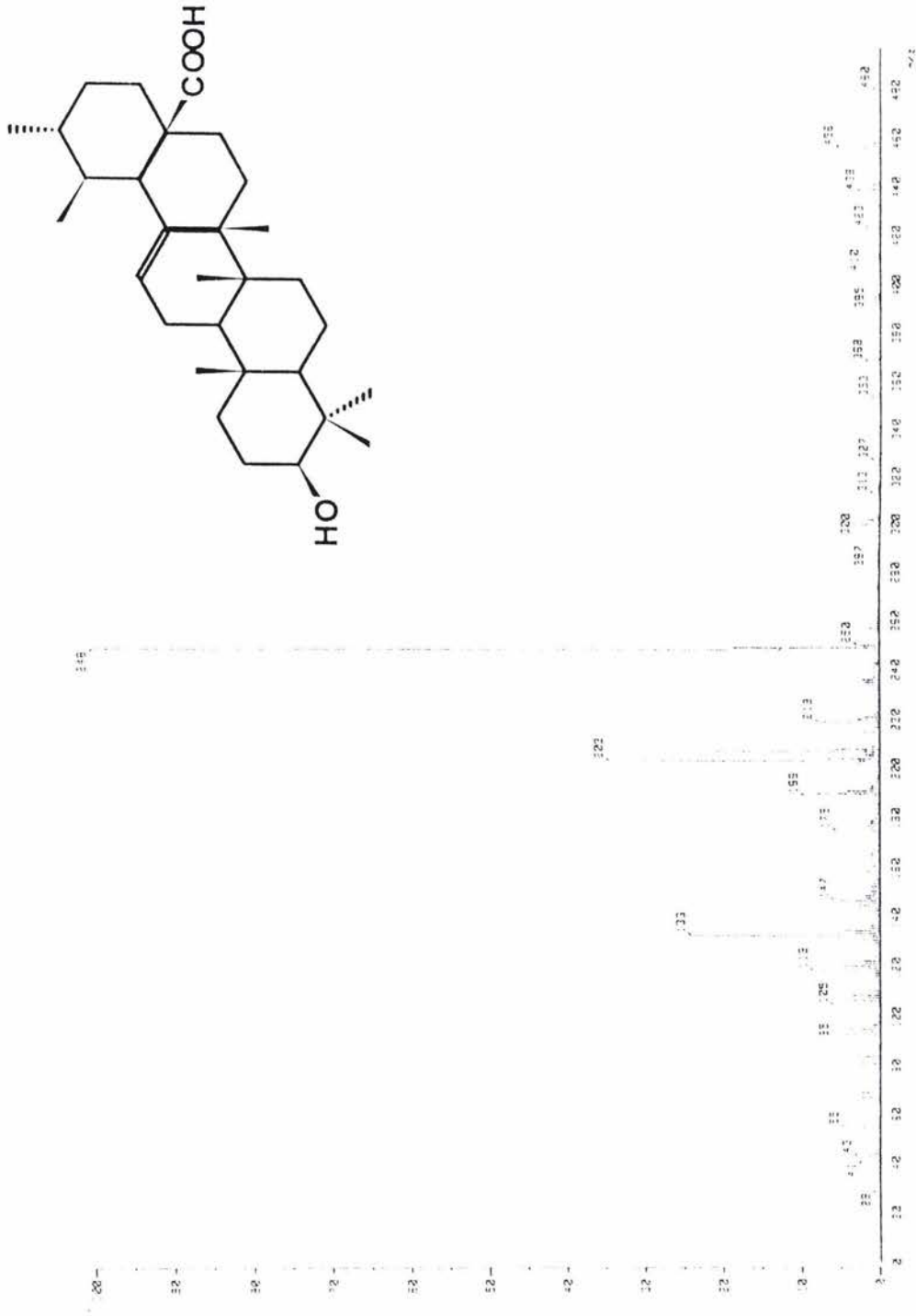
U.N.A.M. CAMPUS



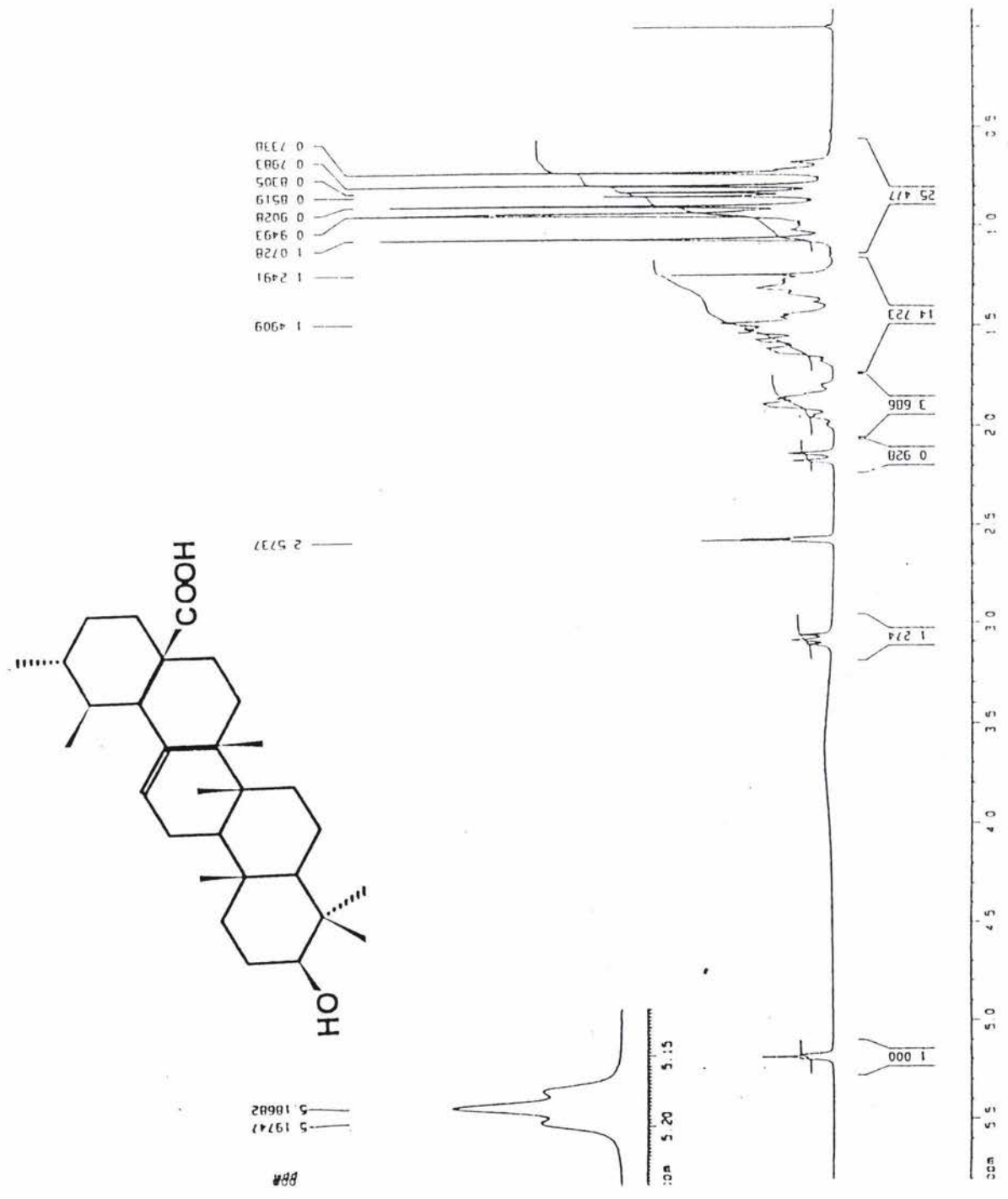
Espectro 2. Espectro de RMN-H¹ del compuesto mayoritario de la fracción F1.



Espectro 3. Espectro de IR del Ácido Ursólico.



Espectro 4 Espectro de Masas del Ácido Ursólico.



Espectro 5. Espectro de RMN-H¹ del Ácido Ursólico.

VII. CONCLUSIONES

1- Los extractos hexánico y metanólico de las hojas de *Chamaedora tepejilote* (Palmae) inhiben el crecimiento de *M. tuberculosis* H37Rv en 80.24 y 38.85% respectivamente, a una concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$, al ser evaluados por el método radiorespirométrico. Por el micrométodo colorimétrico de alamar azul mostró que únicamente el extracto hexánico resultó activo a 200 $\mu\text{g/mL}$.

2- EL método radiorespirométrico en comparación con el micrométodo colorimétrico de alamar azul es más recomendado para evaluar la actividad antimicobacteriana de los extractos y compuestos de origen natural; sin embargo, el segundo se recomienda para realizar una búsqueda preliminar de aquellos extractos con posible actividad antimicobacteriana por su costo y rapidez entre otras ventajas.

3- El fraccionamiento químico biodirigido del extracto hexánico vía cromatografía en columna permitió detectar que la actividad se presentaba en las fracciones primarias F1 y F8, las cuales presentaron un 65.04% y 98.92% de inhibición sobre el crecimiento de *M. tuberculosis* H37Rv a 100 $\mu\text{g/mL}$. Cabe mencionar que por el micrométodo colorimétrico de alamar azul únicamente la fracción F8 resultó activa (CMI = 200 $\mu\text{g/mL}$).

4- Debido a la actividad biológica observada en las fracciones (F1 y F8), se procedió a separar los compuestos presentes en cada una de ellas. De la F8 se aisló el ácido ursólico, el cual inhibe el crecimiento de *M. tuberculosis* H37Rv en un 99.6% a 100 µg/mL. La fracción F1 al someterla a un análisis de CG-EMIE se observó la presencia de tres compuestos en diferentes porcentajes, siendo el escualeno el compuesto mayoritario de la fracción, por lo que este compuesto es el responsables de inhibir el crecimiento de la micobacteria en un 65.04%. Cabe mencionar que de las fracciones primarias F3-5 se detectó la presencia del β-sitosterol, el cual presentó una inhibición del 4.92% sobre el crecimiento de *M. tuberculosis* H37Rv a la concentración de 100 µg/mL.

5- Los resultados obtenidos del presente trabajo permitieron determinar que la especie medicinal *Ch. tepejilote* constituye una fuente potencial de compuestos activos contra *M. tuberculosis* H37Rv y con este trabajo se valida en parte el uso de esta especie en la medicina tradicional de nuestro país.

6- El presente trabajo es el primero que describe la investigación química y biológica de esta especie que es utilizada para el tratamiento de tos, tos seca y pulmonía en la medicina tradicional de los estados de Oaxaca y Veracruz.

LITERATURA CITADA

- Aguilar A, Camacho JR, Chino S, Jácquez P, López ME. Herbario Medicinal del Instituto Mexicano del Seguro Social. Información Etnobotánica. IMSS. Mexico.1994 p 154.
- Álvarez-Gordillo GC, Alvarez-Gordillo JF, Donantes-Jiménez JE, Halperin-Frisch D. Percepciones y prácticas relacionadas con la Tuberculosis y la adherencia al tratamiento en Chiapas, México. **Salud Pública de México**. 2000; 42:520-527.
- Álvarez-Gordillo GC, Halperin-Frisch D, Blancarte-Melendres L, Vázquez-Castellanos. Factores de riesgo para resistencia a drogas antifímicas en Chiapas, México. **Salud Pública de México**. 1995; 37:408-416.
- American Thoracic Society. Treatment of tuberculosis and other Mycobacterial Diseases. **Am. Rev. Res. Dis**. 1983; 127:790-796.
- American Thoracic Society. Treatment of tuberculosis and Tuberculosis Infection in Adults and Children. **Am. J. Res. Crit. Care. Med**. 1994; 149:1359-1374.
- Arbelaez MP, Nelson KE, Muñoz A. BGH Vaccine effectiveness in preventing tuberculosis and its interaction with human immunodeficiency virus infection. **Int. J. Epidemiol**. 2000; 29: 1085-1091.

- Argueta VA, Cano AL, Rodarte ME. Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana. En: Zolla C. Instituto Nacional Indigenista. Vol. III. 1994. pp 669 -670
- Baricevic D, Sosa S, Della LR, Tubaro A, Simonovska B, Krasna A, Zupancic A. Topical anti-inflammatory activity of *Salvia officinalis* L. leaves: the relevance of ursolic acid. **J. Ethnopharmacol.** 2001; 75: 125-132.
- Brändli, O. The Clinical Presentation of Tuberculosis. **Respiration.** 1998; 65: 97-105.
- Cantrell CL, Lu T, Fronczek RF, Fischer NH. Antimycobacterial Cycloartanes from *Borrchia frutescens*. **J. Nat. Prod.** 1996; 59:1131-1136.
- Cantrell CL, Nuñez IS, Castañeda-Acosta J, Foroozesh M, Fronczek FR, Fischer NH, Franzblau SG. Antimycobacterial Activities of Dehydrocostus Lactone and Its Oxidation. **J. Nat. Prod.** 1998; 61: 1181- 1186.
- Cantrell CL, Rajab MS, Franzblau SG, Fischer NH. Antimicobacterial Triterpenes from *Melia volkensii* . **J. Nat. Prod.** 1999a; 62: 546-548.
- Cantrell CL, Rajab MS, Franzblau SG, Fronczek FR, Fischer NH. Antimycobacterial ergosterol-5,8-endoperoxide from *Ajuga remota*. **Planta Med.** 1999b; 65:732-734.
- Collins LA y Franzblau SG. Microplate Alamar Blue Assay versus BACTEC 460 system for high-throughput screening of compounds against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium*. **Antimicrob. Agents Chemother.** 1997; 41: 1004-1009.

- Cooksey R, Holloway B, Oldenburg M, Listenbee S, Miller C. Evaluation of the Invader Assay, a Linear Signal Amplification Method, for Identification of Mutations Associated with Resistance to Rifampin and Isoniazid in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrob. Agents Chemother.** 2000; 44: 1296-1301.
- Cragg G, Newman D, Snader K. Natural Products in Drug Discovery and Development. **J. Nat. Prod.** 1997; 60:52-60.
- Culliton, BJ. Drug- Resistant TB may bring epidemic. **Nature.** 1992; 356: 473.
- David RAD. Actividad antiinflamatoria de los extractos de siete plantas medicinales y el fraccionamiento químico de la especie *Larrea tridentata* (DC.) Cav. Tesis de Licenciatura. FES Iztacala, UNAM. 2002; pp 10-139.
- Decock KM y Lucas SB. Global challenge of Tuberculosis. **Lancet.** 1994; 344: 608.
- Díaz JL. Usos de las plantas medicinales de México. Instituto Mexicano Para el Estudio de las Plantas Medicinales. 1976; p 254.
- Dirección General de Epidemiología. CEDI, Secretaria de Salud, México. Epidemiología, Sistema Único de Información. 2001; 43:11.
- Dye C, Scheele S, Dolin P, Pathania V, Raviglione M. Global Burden of Tuberculosis. **JAMA.** 1999; 282:667-685.
- Eloff, JN. Which extract should be used for the screening and isolation of antimicrobial components from plants?. **J. Ethnopharmacol.** 1998; 60:1-8.

- Farnsworth NR, Akerele O, Bingel AS, Soejarto DA, Guo Z. Medicinal plants in therapy. **Bull WHO**.1985; 63:965-981.
- Fischer, HN. Structure and activity of anti-tuberculosis natural products. **Rev. Latinoamer. Quim**.1996; 24:65-68.
- Franzblau SG, Witzig RS, Mclaughlin JC, Torres P, Madico G, Hernández A, Degnan MT, Cook MB, Quenzer VK, Ferguson RM, Gilman RH. Rapid, Low-Technology MIC Determination With Clinical *Mycobacterium tuberculosis* Isolates by Using the Microplate Alamar Blue Assay. **J. Clin. Microbiol**. 1998; 32: 362-365.
- García-García ML, Mayar-Maya EM, Ferreyra-Reyes L, Palacios-Martínez M, Álvarez -García C, Valdespino-Gómez JL. Eficacia y eficiencia del tratamiento antituberculoso en jurisdicciones sanitarias de Morelos. **Salud Pública de México**.1998; 40: 421-429.
- Gentry EJ, Jampani HB, Keshavarz-Shokri A, Morton MD, Vander VD, Telikepalli H, Mitscher LA. Antitubercular Natural Products: Berberine from the Roots of Commercial *Hydrastis canadensis* Powder. Isolation of Inactive 8-Oxotetrahydrothalifendine, Canadine, β -Hydrastine, and Two New Quinic Acid Esters, Hycandinic Acid Esters-1 and -2. **J. Nat. Prod**. 1998; 61:1187-1193.
- Granich RM, Balandrano S, Santaella AJ, Binkin NJ, Castro KG, Marquez A, Anzaldo G, Zarate M, Jaime ML, Velázquez-Monroy O, Salazar L, Alvarez-Lucas C, Kuri P, Flisser A, Santos-Preciado J, Ruiz-Matus C, Tapia-Conyer R, Tappero JW. Survey of Drug Resistance of *M. tuberculosis* in 3 Mexican States1997. **Arch. Intern. Med**. 2000; 160: 639-644.

- Hernández LJA. Estudio sobre la herbolaria y medicina tradicional del municipio de Mizantla Veracruz. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM. 1988; pp 382-385.
- Hostettman K, Marson A, Wolfender JL. Strategy in the search for new biologically active plant constituents. In: *Phytochemistry of Plants Used in Traditional Medicine*, (Hostettmann K, Marston M, Maillard M, Hamburger Maillard M, Hamburguer M). *Phytochemistry of plants used in traditional Medicine*. Clarendon Press–Oxford. USA. 1995; pp 1-15.
- Hostettman K, Wolfender JL, Rodríguez S. Rapid detection and subsequent isolation of bioactive constituents of crude plants extracts. **Planta Med.** 1997; 63: 2-10.
- Inderlied, CB. Antimicrobial Susceptibility testing: present practices and future trends. **J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.** 1994;13:980-993.
- Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER). Secretaria de Salud (SSA). Control y tratamiento de la Tuberculosis Pulmonar. 5ª ed. Folletos de divulgación sobre temas de la patología respiratoria. México. 1994; pp 24-36.
- Jiménez-Arellanes A, Meckes M, Ramírez R, Torres J, Luna-Herrera J. Activity Against Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* In Mexican Plants Used To Treat Respiratory Diseases. **Antimicrob. Agents Chemother.** 2002; in press.

- Köning GM, Wright AD, Franzblau SG. Assesment of Antimycobacterial Activity of a Series of a Series of Mainly Marine Derived Natural Products. **Planta Med.** 2000; 66:337-342.
- Lall N y Meyer JJM. *In vitro* inhibition of drug-resistant and drug-sensitive strains of *Mycobacterium tuberculosis* by ethnobotanically selected South African plants. **J. Ethnopharmacol.** 1999; 66:347-354.
- Liu, J. Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. **J. Ethnopharmacol.**, 1995; 69: 57-68.
- López, VME. Contribución etnobotánica en plantas medicinales utilizadas por dos grupos étnicos de Mecapalapa, Municipio de Pantepec, Puebla. Tesis de Licenciatura. ENEP Iztacala, UNAM. 1988; pp 12-22.
- Lozoya, LX. Un Paraíso de Plantas Medicinales. **Arqueología Mexicana.** 1999; 39:14-23.
- Mandell GL. y Sande MA. Agentes antimicrobianos: Drogas usadas en la quimioterapia de la tuberculosis y lepra. En: Goodman and Gilman's; Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica. Ed. Médica Panamericana. 8ª. ed. México. 1996; pp 1111-1122.
- Martínez, M. Las Plantas Medicinales de México. 2ª. ed. Ed. Botas. México. 1989; p 459.
- Morales G. y Toledo. Contribución al estudio de la flora medicinal y medicina tradicional del municipio de Coxquihui, Ver. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM. México. 1987; pp 394-398.

- Nuñez-Rocha GM, Salinas-Martínez AM, Villareal-Rios E, Garza-Elizondo ME, González-Rodríguez F. Riesgo nutricional en pacientes con tuberculosis pulmonar: ¿Cuestión del paciente o de los servicios de salud?. **Salud Pública México**. 2000; 42: 126-132.
- Organización Mundial de la Salud. Anti-tuberculosis Drug Resistance in the World: The WHO/IUATLD Global Project on Anti-tuberculosis Drug Resistance Surveillance 1994-1997. Geneva, Switzerland. WHO Global Tuberculosis Programme; 1997. Report WHO/TB/97.229.
- Orme I, Secrist J, Anathan S, Kwong C, Maddry J, Reynolds R, Poffenberger A, Michael M, Miller L, Krahenbuh J, Adams L, Biswas A, Rouse D, Winfield D, Brooks J. Search for New Drugs for Treatment of Tuberculosis. **Antimicrob. Agents Chemother**. 2001; 45: 1943-1946.
- Pietro R.C.L.R, Kashima S, Sato D, Januário A, Franca S. In vitro antimycobacterial activities of *Physalis angulata* L. **Phytomed**. 2000; 7: 335-338.
- **Salud Pública México**. 2001; p 43. Principales causas de Mortalidad General, México, 1999.
- Rao KV y Alvarez FM. The Sapogenin Of *Chamaedora elegans*. **J. Nat. Prod**. 1984; 47: 413-418.
- Raviglione M, Snider D, Kochi A. Global Epidemiology of Tuberculosis. **JAMA**. 1995; 273: 220-226.
- Rivera, AE. Investigación reciente sobre plantas Medicinales Mexicanas. **Arqueología Mexicana**. 1999; 39: 54-59.

- Rzedowski, J. Vegetación de México. Ed. Limusa. 6^a. ed. 1994; pp 159-178.
- Sifuentes-Osornio J, Ponce de León LA, Camacho-Mezquita FE, Bobadilla del Valle JM, Infante-Suárez ML, Ramírez-Fernández N, Hernández-Gómez L, Nelson AM. Resistencia de *Mycobacterium tuberculosis* en pacientes Mexicanos. **Rev. Invest. Clin.** 1995; 47: 273-281.
- Taylor J, Bergmire D, Suarez L. Epidemiology of drug resistant tuberculosis in Texas. **Am. J. Epidemiol.** 1999; 149: 359-365.
- Van Puyvelde VL, Ntawukiliyayo JD, Portaels F. In Vitro Inhibition of Mycobacteria by Rwandese Medicinal Plants. **Phytother. Res.** 1994; 8: 65-69.
- Wächter GA, Valcic S, Flagg ML, Franzblau SG, Montenegro G, Suarez E, Timmermann BN. Antitubercular activity of pentacyclic from plants of Argentina and Chile. **Phytomed.** 1999; 6:341-345.
- Warren y Body. Bacteriología y Diagnostico En: Rossman M. (Editor). Tuberculosis. Asistencia Clínica y Nuevos desafíos. México: McGraw- Hill- Interamericana. 1996; pp 34-45.
- Warren y Jawetz. Microbiology e Inmunology. Ed. McGraw- Hill. 6^a ed. 2000; pp 134-143.
- Wagner H, Bladt S, Zgainski EM. Plant Drug Analysis. Ed. Translation of the German. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo. 1984; p 303.
- Yajko D, Majed J, Lancaster M, Sanders C, Cawthonl, Gee B, Babst A y Hadley K. Colorimetric Method for determining MIC_S of

antimicrobial agents for *Mycobacterium tuberculosis*. **J. Clin. Microbiol.** 1995; 41:1004-1009.