



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

“ Z A R A G O Z A ”

**Estudio químico y evaluación
antimicrobacteriana de
*Calliandra houstoniana***

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO
(FARMACIA)**

**P R E S E N T A :
ALEJANDRO GUTIÉRREZ VEGA**

DIRECTORA DE TESIS:

DRA: MARIA ADELINA JIMÉNEZ ARELLANES

ASESOR DE TESIS:

M. en C. ARTURO EDUARDO CANO FLORES



MEXICO, D. F.; MAYO, 2006



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.



El presente trabajo se realizo en **La Unidad de Investigación Médica en Farmacología de Productos Naturales, del Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional, Siglo XXI, IMSS** bajo la asesoría de la Dra. María Adelina Jiménez Arrellanes.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Mariana Meckes Fischer, 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 la facilidades otorgadas en la parte química del proyecto.

A la Dra. María Adelina Jiménez Arellanes, por dirigir este proyecto de tesis y contribuir en mi formación académica, por su paciencia, dedicación y enseñanza.

Al M. en C. Arturo Eduardo Cano Flores, por el asesoramiento de la tesis, apoyo y guía en el trámite escolar.

A la Dra. Ruth Parra, colaboradora de La Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas, del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional, Siglo XXI (IMSS), por las facilidades otorgadas para la realización de los ensayos biológicos de la actividad antimicrobiana por el Método Radiorespirométrico Bactec TB-460.

A la Biol. Rosalba León Díaz, por el apoyo en la elaboración del ensayo biológico.

A la M. en C. Abigail Aguilar Contreras, por la identificación de *C. houstoniana*.

A los Sinodales del Examen Profesional:

Presidente	M. en C. Arturo Eduardo Cano Flores
Vocal	Dra. María Adelina Jiménez Arellanes
Secretario	Q. María Guadalupe Miranda Jimeno
Suplente	Q. Encarnación María Estela Jiménez
Suplente	Q.F.B. Gabriel Alejandro Romero Díaz

por sus comentarios del proyecto, así como su valioso tiempo invertido en la revisión.

A mis compañeros de la UIM, FPN: Alma David, Vianey Nava, Víctor Hugo Álvarez, Isaac Alejandro Álvarez, Rosalba León, Teresa Luna, Manuela Muhlia, Martha Juárez y Rosa Virginia García; por compartir los momentos de convivencia y tolerancia en el área de trabajo. A Claudia Velázquez y Elizabeth Barbosa, por compartir sus conocimientos y su apoyo. A Iván Martínez, gracias por tu intermediación para mi acceso a ésta Unidad.

DEDICATORIAS:

A Dios, por darme la oportunidad de brindarme la vida y llegar a esta meta.

A mi padres, ya que sin ellos no estaría y sería la persona que soy.

*A mi abuela; Sra. Aurora Domínguez Hernández,
por brindarme una educación y enseñanza en la vida.*

*Le doy gracias a Dios; a la mujer que le dio la vida a un ser
y que este ser, sea la persona con quién decidí caminar juntos en esta vida,
compartiendo los grandes momentos, tanto personal como familiar
y que siempre ha estado a mi lado.*

A Tí quién dedico este éxito, que ambos hemos logrado.

*Gracias a la Sra. Margarita Antúnez Aroche,
por brindarme su cariño y comprensión, en los momentos más difíciles de mi vida
por darme una parte de su vida para aconsejarme y guiarme en ésta.*

*A mis amigos de la Preparatoria # 3, “Justo Sierra”; por que siempre hemos estado tanto
en los momentos malos como en los buenos, gracias por brindarme su amistad:
Verónica Castro, Ivonne Hernández, Verónica Santiago, Alma Cabral, Ana Isabel
Barroso, Gabriela Rodríguez, Sara Gabriela Valdez, Miguel Pérez, David Gallegos,
Rubén Zamorano, José Manuel Narváez, José Luis Espinoza, Alfredo Domínguez, Luis
Enrique Jaimes y Roberto Lara.*

*A mis amigos de la Facultad de Zaragoza: por tenerme la tolerancia y paciencia:
Laura Séptimo, Erika Cortés, Dulce Briones.*

*A mi amiga y compañera:
Gladys Pérez Rodríguez
por brindarme su apoyo en la elaboración de mi proyecto de tesis
y en las participaciones en los congresos, gracias.*

*A mis maestros de la Facultad,
quienes compartieron conmigo sus conocimientos y experiencias, para
perfilarme como un profesional con ética y principios;
en particular al Q.F.B. Mauro Arrieta Sánchez, Q.F.B. Rocío Breceda Hernández y
a todos los que colaboran en la Planta Piloto de la Facultad.*

INDICE GENERAL

Numeración

Resumen.....	i
I.- Antecedentes.....	1
I.1.- Epidemiología Mundial.....	1
I.2.- Epidemiología en México.....	9
I.3.- <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	12
I.4.- Plantas medicinales como posible fuente de agentes antimicobacterianos.....	17
I.5.- Compuestos con actividad antimicobacteriana.....	20
I.6.- Generalidades del Género <i>Calliandra</i>	28
I.6.1.- Aspecto botánico.....	28
I.6.2.- Aspecto etnobotánico.....	30
I.6.3.- Investigación química.....	31
I.6.4.- Investigación biológica y farmacológica.....	31
II.- Planteamiento del Problema.....	32
III.- Objetivo General.....	33
III.1.- Objetivos Particulares.....	33
IV.- Hipótesis.....	34
V.- Metodología.....	35
V.1.- Selección.....	35
V.2.- Colecta e Identificación del Material Vegetal.....	35
V.3.- Preparación de Extractos.....	35
V.4.- Actividad antimicobacterina por el método radiorespirométrico automatizado (Bactec TB-460).....	36
V.4.1.- Preparación de muestras.....	36
V.4.2.- Preparación del inóculo.....	36
V.5.- Fraccionamiento químico biodirigido del extracto hexánico.....	37
V.6.- Separación secundaria de las fracciones más activas (F4-F8).....	40

V.6.1.- Fracción F5.....	40
V.6.2.- Fracción F4.....	41
V.6.3.- Fracción F6.....	42
V.6.4.- Fracción F7.....	44
V.6.5.- Fracción F8.....	45
V.6.6.- Fracción F3.....	46
V.7.- Fraccionamiento del extracto metanólico de <i>C. houstoniana</i>	47
V.7.1.- Fracción F1.....	49
V.7.2.- Fracciones F2 y F3.....	49
VI.- Resultados y discusión.....	50
VI.1.- Compuestos aislados del extracto hexánico de <i>C. houstoniana</i>	50
VI.2.- Preparación de los extractos de <i>C. houstoniana</i>	52
VI.3.- Actividad antimicobacteriana de <i>C. houstoniana</i>	53
VI.4.- Fraccionamiento químico biodirigido del extracto activo y los componentes en las diferentes fracciones.....	55
VI.5.- Aislamiento, caracterización y evaluación biológica de compuestos.....	56
VII.- Conclusión.....	63
Bibliografía.....	65
Anexo I.....	83
Cromatogramas y espectros.....	83

RESUMEN

La tuberculosis (TB) es un grave problema de salud pública y se calcula que una tercera parte de la población mundial está infectada por *Mycobacterium tuberculosis*, y presenta el riesgo de desarrollar la enfermedad producida por un solo agente patógeno, siendo esta la segunda causa de muerte. En 1993, se consideró a la TB como emergencia mundial por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y no ha sido controlada debido a las dificultades en su diagnóstico y tratamiento; en el 2005 a nivel mundial existían entre 10.2-11.9 millones de personas infectadas y la predicción para el 2020 es que aproximadamente 70 millones de individuos morirán por TB; por lo tanto, se espera que entre 1998 y 2030, se reporten 225 millones de nuevos casos y morirán 79 millones por esta causa.

En el país se tiene el problema por TB aunado a la presencia de cepas multidrogoresistentes (MDR) de *M. tuberculosis*, propiciando el aumento de casos y dificultando su tratamiento. La presencia de estas cepas, hacen que los tratamientos actuales sean poco efectivos, más costosos, prolongados y con severos efectos secundarios, por lo que la TB en México constituye una de las 20 causas de muerte. Otro factor importante que contribuye al aumento de los casos de TB, es la presencia de enfermedades que comprometen el sistema inmunológico como por ejemplo el SIDA y el cáncer entre otras.

La OMS promueve una estrategia de lucha contra la TB basada en la detección rápida de los casos, mediante la identificación de los pacientes infectados y la administración supervisada de los fármacos [programa Tratamiento Acortado Estrictamente Supervisado (TAES)]; sin embargo, uno de los aspectos más problemáticos en el tratamiento de la TB, es el rápido desarrollo de resistencia.

Con base a lo anterior se ha intensificado la búsqueda de nuevos agentes antituberculosos, a partir de diferentes fuentes naturales con miras a obtener compuestos activos y/o que coadyuven en el tratamiento de la enfermedad. Dentro de las fuentes naturales se encuentra

Calliandra houstoniana, especie vegetal que se utiliza para el tratamiento de tos seca, pulmonía y/o padecimientos relacionados con la TB.

En el presente trabajo se describe la evaluación antimicobacteriana del extracto hexánico de las partes aéreas de esta especie y el aislamiento de los compuestos responsables de la actividad biológica, empleando diversos métodos cromatográficos y como ensayo biológico el método radiorespirométrico Bactec TB-460. Este proceso permitió detectar que el extracto hexánico inhibió el crecimiento de *M. tuberculosis* H₃₇Rv presentando un 94.72%, a la concentración de 100 µg/mL. El fraccionamiento químico-biodirigido del extracto permitió detectar que la actividad se presenta en las fracciones F(4-6), F7 y F8, las cuales presentaron un 89.76, 71.0 y 99.45% de inhibición a 100 µg/mL.

De la fracción F(4-6) se aisló β-amirina, estigmasterol, β-sitosterol y la mezcla de α y β-amirina, los cuales son responsables de la actividad. La fracción F7 se sometió a un análisis por HPLC aislándose la partenólida como principal componente, siendo la responsable de la actividad, mientras en la fracción F8 se aisló el ácido ursólico como compuesto mayoritario y responsable del efecto antimicobacteriano. Adicionalmente en la fracción F3, se detectó la presencia del acetato de β-amirina, una mezcla de ceras y el óxido de cariofileno. La caracterización química de los compuestos, se realizó mediante análisis de los espectros de Resonancia Magnética Nuclear Protónica (RMN-H¹), Infrarrojo (IR), Espectrometría de Masas (EM) y Cromatografía de Gases Acoplado a Espectrometría de Masas (CG - EM).

La investigación químico-biodirigida de ésta especie medicinal, permitió validar parcialmente su uso etnobotánico para tratar tos, tos seca, pulmonía y/o padecimientos relacionados con la TB y permitió aislar e identificar la estructura química de los compuestos responsables en el efecto antimicobacteriano.

I.- ANTECEDENTES

I.1.- EPIDEMIOLOGÍA MUNDIAL

La tuberculosis (TB) es un grave problema de salud pública y se estima que una tercera parte de la población mundial esta infectada por *Mycobacterium tuberculosis*, y en riesgo de desarrollar la enfermedad.^[1-3] En 1993, se consideró a la TB como emergencia mundial por la Organización Mundial de la Salud (OMS)^[3,6-7] y es una de las enfermedades no controladas debido a las dificultades en su diagnóstico y tratamiento^[8] y es la segunda causa de muerte producida por un solo agente patógeno.^[3-5]

La TB como una infección latente y/o progresiva, es la primera causa de muerte tanto en países industrializados como en países en vías de desarrollo.^[9-10] A nivel mundial, México ocupa el octavo lugar como causa de muerte por esta infección.^[10] Informes de la OMS, indican que la TB ocasiona de dos a tres millones de muertes anuales en el mundo. En 1998, se reportaron 8.8 millones de casos, de los cuales murieron entre 2-3 millones de personas.^[9,11] Hasta el 2000, en el mundo existían un total de 90 millones de casos nuevos y 30 millones de muertes por esta causa. La tasa de prevalencia en el ámbito mundial es de 61.8 casos por cada 100,000 habitantes;^[12-12] en naciones Asiáticas y en el África Subsahariana tienen un aumento de más de 300 casos por cada 100,000 habitantes, teniendo casi el 50% de personas coinfectadas por *M. tuberculosis*^[9] y en América se presentan 34.2 casos por cada 100,000 habitantes.^[12-13] En términos globales la OMS señalo que América Latina tiene una incidencia de 80 casos activos por cada 100,000 habitantes y que la tendencia a la reducción es menor al 5% anual en algunos países y nula en otros.^[14] Se estimó que para el año 2005 a nivel mundial hubieron entre 10.2^[15] a 11.9 millones de personas infectadas y la predicción para el 2020 es que aproximadamente 70 millones de individuos morirán por TB;^[16] por lo tanto, se espera que entre 1998 y 2030, se reporten 225 millones de casos nuevos y existirán 79 millones de muertes; cifras que aumentarán si no se toman medidas necesarias para su control.^[17] La OMS promueve una estrategia de lucha contra la TB basada en la detección rápida de los casos, mediante la identificación de los pacientes infectados y la administración supervisada de los fármacos.^[17-18]

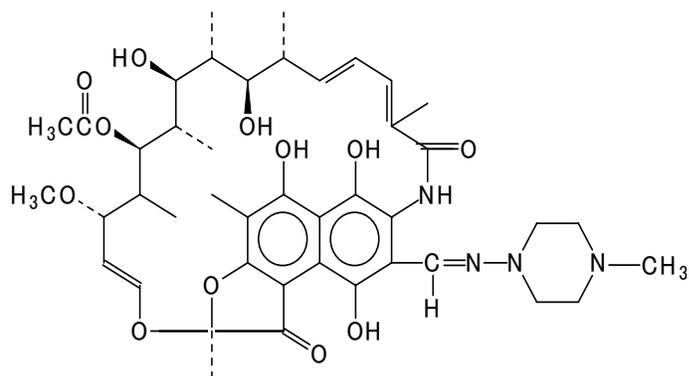
El tratamiento inicial recomendado por la OMS, involucra la administración de cuatro fármacos de primera línea* siendo: H, R, Z y E o S (Figura 1) por dos meses, seguido de H y R por cuatro meses o H y E por seis meses.^[16,19] En caso que el tratamiento con fármacos de primera línea no resulte favorable, se recomienda la administración de la mezcla de fármacos de primera y de segunda línea; pero estos tratamientos son muy costosos y presentan reacciones secundarias severas, además que en muchas ocasiones no se cuentan con estos.

Uno de los aspectos más problemáticos en el tratamiento de la TB, es el desarrollo rápido de resistencia a fármacos. En 1997, la OMS y la Unión Internacional Contra la Tuberculosis y Enfermedades Pulmonares (UICTEP) informaron la prevalencia de resistencia a medicamentos antituberculosos de primera línea (H, R, Z y E) en 55 países.^[17] En promedio, la resistencia primaria a cualquier droga fue de 9.9 a 10.4% y de 1.4 a 5.3% en el caso de la Multidrogoresistencia (MDR),^[7,17] y el problema de MDR en casos nuevos es grave en países como Estonia, Latvia y República Dominicana.^[20] Otro informe emitido en el 2000, donde se incluyeron 58 países, indicó que la prevalencia de resistencia a los fármacos fue del 10.75%, en nuevos casos^[20] con resistencia principalmente a H y R (base de TAES)^[15] y del 1.0% en casos de MDR.^[20]

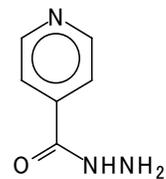
El aumento de los casos de TB se debe a los siguientes factores:

a) tratamientos y diagnósticos inadecuados,^[6,21-22] b) abandono de tratamientos,^[21] c) migración,^[6,21] d) enfermedades que comprometen el sistema inmunológico como el SIDA,^[6,22-23] cáncer, diabetes mellitus,^[6,9] desnutrición,^[9] alcoholismo,^[6] e) problemas socioeconómicos,^[6,9,21] f) aparición de cepas MDR,^[21,23] g) deficiencias estructurales y de la organización del programa de control de la TB,^[21] h) contacto con personas con TB resistentes a fármacos.^[9]

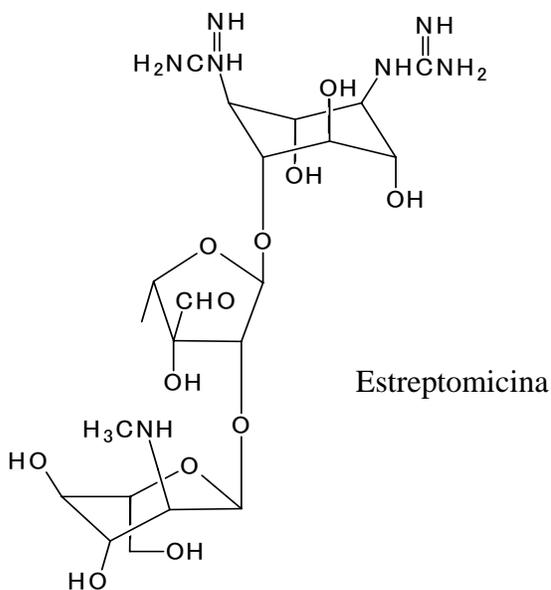
***Fármacos de primera línea:** Son aquellos que combinan el máximo nivel de eficiencia con un grado aceptable de toxicidad; estos incluyen isoniazida (H), rifampicina (R), pirazinamida (Z), etambutol (E) y estreptomomicina (S).



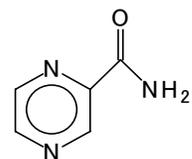
Rifampicina



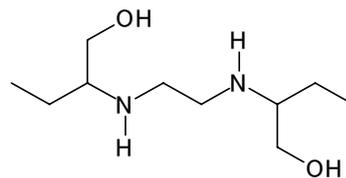
Isoniazida



Estreptomicina



Pirazinamida



Etambutol

Figura 1. Fármacos antituberculosos de primera línea.

Adicionalmente se presentan factores con mayor impacto en el aumento de casos MDR-TB, como:^[21]

a) tratamientos en las recaídas con fármacos de primera línea, b) falta de fármacos secundarios para el tratamiento de pacientes con MDR, c) falta de laboratorios capaces de determinar drogoresistencia (DR), d) factores extrapersonales que contribuyen a la falta de adherencia al

tratamiento antituberculoso (barreras culturales y acceso de tiempo, distancia, disponibilidad y costo del transporte).

Uno de los programas establecidos por la OMS y UICTEP en 1997, es el DOTS (Directly Observed Treatment Short-Course) o el Tratamiento Acortado Estrictamente Supervisado conocido en América Latina como TAES,^[17] como estrategia para disminuir la tasa de TB (en un 80%) y la frecuencia de aparición de cepas MDR tanto en países industrializados como en vías de desarrollo.^[24-25] Sin embargo, se ha planteado mejorar la estrategia, expandiendo el programa TAES al resto del mundo para el control total del problema; siendo más accesible para los pacientes con casos drogables, previniendo el desarrollo de DR.^[12,17,20,27] Es por ello que el problema de DR, atribuido a la presencia de estas cepas, agrava el perfil de la TB, siendo necesaria la combinación de fármacos de primera y segunda línea.^[10,30]

Por otra parte, la presencia y aparición de cepas MDR es muy frecuente y va en aumento, esto se ve claramente en Países como: Argentina, Bangladesh, China, Cuba, Estonia, India, Irán, Israel, Italia, Latvia, Monzabique, Rusia, República Dominicana, el sur de África y México,^[11-12,28-29] donde los tratamientos son cada vez más prolongados, poco eficaces y costosos, representando un problema de magnitud global.^[25,19,29]

La resistencia se desarrolla por dos vías: primaria y adquirida.* En promedio, en un estudio realizado en 35 países, la resistencia primaria fue de 9.9% y la MDR primaria es de 1.4%.^[7] Estos resultados reflejan los problemas en la aplicación y seguimiento del programa TAES, por lo que casos crónicos se ha acumulado, presentándose resistencia primaria y secundaria en un 23.0% de casos.^[15] Es así que se presenta entre el 10 y 20% de resistencia a un fármaco o más en la mayor parte del mundo y particularmente en Tailandia, China y Rusia con incidencias superiores al 25% de resistencia primaria.^[9]

* **La resistencia primaria:** es cuando las cepas son resistentes a uno o más fármacos antituberculosos (H y R) sin un tratamiento previo; mientras que **La resistencia adquirida:** aparece por los tratamientos inadecuados, o por abandono de estos.^[16]

En un estudio realizado entre 1997-1999, en Lima Perú; se encontraron cepas resistentes a seis ó más fármacos, por lo que se utilizan esquemas de tratamiento individualizado con fármacos de segunda línea, basándose en los resultados de las pruebas de drogosensibilidad^[21] y al emplearse estos fármacos, la MDR prevaleció en un 16% después del tratamiento de los casos nuevos de TB; por lo que el Programa (Peruano) Nacional de Tuberculosis propone introducir y estandarizar el régimen del tratamiento con estos fármacos.^[31]

En 2001, se implementó una nueva estrategia TAES PLUS principalmente para casos de MDR, donde los pacientes que no respondan al tratamiento del TAES, deben sujetarse a este programa con el cual se espera una efectividad del 60% al 80%. Este estrategia se ha implementado en aquellos lugares donde la MDR es elevado (Perú, Latvia, Estonia, Filipinas y Rusia).^[20,27,31] Éste nuevo tratamiento consiste en la administración de fármacos de segunda línea* : K, CPX, ETM, Z y E (Figura 2), por un periodo de 18 meses (en régimen diario) y únicamente en los tres primeros meses se administra K.^[31]

Con los escasos datos epidemiológicos disponibles sobre MDR-TB, existen regiones específicas donde el problema es severo. Un modelo matemático, planteado en el 2000, indicó que el 3.2% de los casos nuevos a nivel mundial eran TB-MDR. La implementación del TAES, debería prevenir la presencia de estas cepas; y el uso de fármacos de segunda línea para el tratamiento de pacientes con MDR, son herramientas importantes para el control de la TB, sobre todo en los casos de MDR.^[20] Sin embargo, no ha sido posible aplicar lo anterior en países de mediano o bajos recursos, por lo que la OMS ha establecido una estrategia piloto (TAES PLUS), que facilita el acceso a fármacos de segunda línea.^[21] Los países que presentan esta problemática de MDR son: China, Rusia, Estonia, Latvia, Israel, Irán, Momzabique, India, Perú, México, entre otros. (Tabla 1).^[20] El Programa de Control de Tuberculosis (PCT), ha implementado este esquema en China, Bangladesh y Nicaragua, reportándose tasas de éxito del

* **Fármacos de segunda línea:** son aquellos que a causa de la resistencia microbiana o de factores relacionados con el paciente se pueden utilizar, etionamida (ETM), ácido aminosalicílico (PAS), cicloserina (CS), amikacina (AK), kanamicina (K), ciprofloxacina (CPX), capromicina (CM), ofloxacina (O), protionamida (P) y clofacimina (C).

81.1% utilizando K, O, P, C, ETM, Z e H por tres meses, seguido de 12 meses de O, P, ETM, H y Z y 6 meses de P y ETM.^[17]

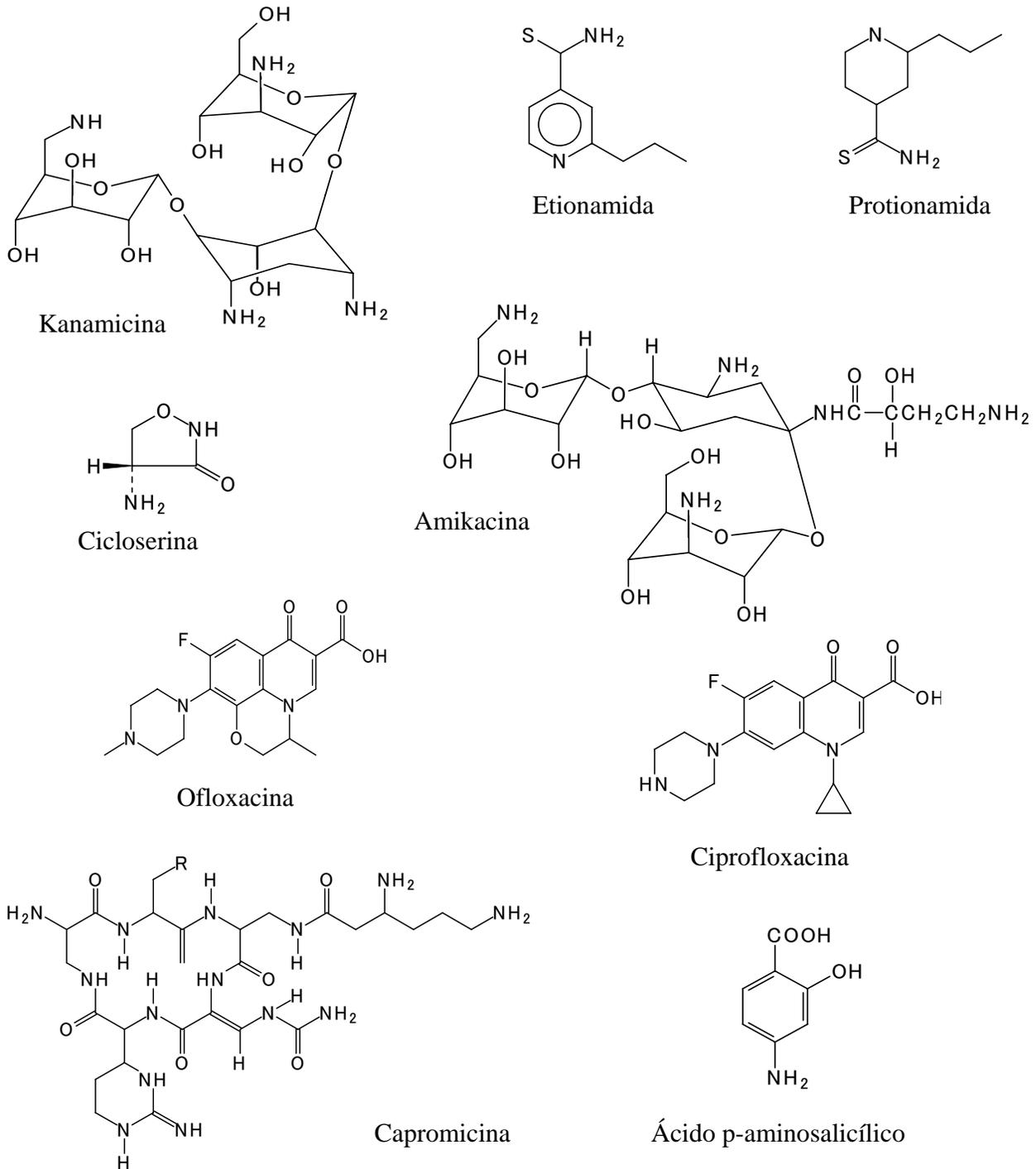


Figura 2. Fármacos antituberculosos de segunda línea.

Por otro lado, se ha informado sobre la incidencia alarmante de MDR en América Latina, por ejemplo en el periodo 1994-2002 se reportó, en Argentina (4.6 %), Bolivia (1.2%), Brasil (0.9%), Cuba (0.7%), Perú (2.5%), Puerto Rico (1.9%), República Dominicana (6.6%),^[32] Colombia (0.5%), Chile (0.4%), México (2.4%), Nicaragua (1.2%), Uruguay (1.7%)^[29] de casos y en general se presenta más del 15% de resistencia a los fármacos de primera línea.

Tabla 1. Prevalencia de drogo-resistencia en casos nuevos de tuberculosis, en algunos países.

País	Número de Pacientes	% de Drogo-susceptibilidad	% en MDR
Estonia	377	63.1	14.1
Latvia	789	70.1	9.0
Rusia:			
Ivanovo	222	67.6	9.0
Tomsk	417	71.0	6.5
Latvia	789	70.1	9.0
China:			
Henan	646	65.0	10.8
Zhejiang	802	85.2	4.5
Israel	307	80.8	8.1
Irán	666	84.1	5.0
India	384	81.3	3.4
Mamzabique	1028	79.3	3.5
Marruecos (Casablanca)	510	91.4	2.2
Perú	1879	82.0	3.0
Puerto Rico	160	88.8	2.5
México (Baja California, Oaxaca y Sinaloa)	334	85.9	2.4
Nicaragua	564	84.4	1.2
Estados Unidos	12063	88.0	1.2

Informe por Espinal *et al.*, 2001.

La OMS y UICTEP, reporta MDR en nuevos casos de TB en Argentina (4.6%), República Dominicana (6.6%), Perú (2.5%);^[32-33] adicionalmente se presentan casos de MDR en retratamiento, principalmente en Bolivia (4.7%) y Argentina (22.2%).^[33]

Tabla 2. Principal cobertura del DOTS/TAES en países priorizados con prevalencia de MDR TB.

País	No. Casos de TB	Cobertura DOTS (%)	Fármacos de Primera Línea		Resistencia a Cualquier Fármaco	
			% de Drogo-susceptibilidad	% en MDR	% de Drogo-susceptibilidad	% en MDR
Bolivia	9,272	50	74.5	1.2	58.9	4.7
Brasil	78,628	10	91.4	0.9	85.6	6.1
República Dominicana	5,320	10	59.4	6.6	47.9	19.7
México	19,802	50	85.9	2.4	58.9	22.4
Perú	41,730	100	84.6	2.5	64.0	15.7

Reportado por Organización Panamericana de la Salud, 2003^[34] y Pablos-Mendez *et al.*, 2003.

En 2001, las cifras más altas de resistencia se registraron en República Dominicana y Ecuador; en el 2003 en Argentina y en Costa Rica se presentó una tasa de incidencia de 30.5 y 17.35 casos por 100,000 habitantes.^[35]

I.2.- EPIDEMIOLOGÍA EN MÉXICO

En México, la TB constituye una de las 20 principales causas de muerte,^[36] estando en tercer lugar después de neumonías y de las infecciones intestinales^[14,17] y es la primera causa de mortalidad por un sólo agente infeccioso,^[37] además ocupa el noveno lugar por DR; estableciéndose como un problema de salud pública de gran magnitud,^[13,38] ubicando al país entre los 13 con mayor prevalencia de TB, según reportó la OMS (1996 y 1997).^[39] Los estados con mayor incidencia son: Baja California, Oaxaca y Sinaloa, según un estudio realizado en 1997, con una incidencia de 25.0 casos por cada 100,000 habitantes.^[12] Otros datos estadísticos, reportan que en la semana 43 del año 2001 se presentaron 12,552 casos a nivel nacional, registrándose mayor incidencia en los estados de Veracruz, Chiapas, Guerrero, Distrito Federal y Nuevo León,^[36] Esta problemática obliga a abordar este padecimiento de manera integral, pues su difícil control hace imprescindible la vigilancia mediante un equipo multidisciplinario de salud para incidir sobre este proceso de salud-enfermedad.^[13] Chiapas ocupa desde hace 10 años, el primer lugar en casos de TB. Durante 1995 se presentaron 325 muertes en 1,527 casos nuevos, aportando el 7% de incidencia y el 9.4% del total de defunciones por esta causa.^[40]

En la actualidad, el control del padecimiento es difícil debido a la co-infección con el virus inmunodeficiencia humana (VIH) especialmente en los casos de DR.^[23,40] La infección con VIH favorece la infección por *M. tuberculosis* favoreciendo la interacción entre ambas enfermedades, por lo que la TB activa es mucho más alto para los casos de VIH (10% por año) que el de los infectados únicamente por *M. tuberculosis* (0.2% por año).^[9]

A nivel nacional se registra una tasa de mortalidad de 5.8 casos por cada 100,000 habitantes, mientras que para el estado de Nuevo León, la tasa se eleva a 6.2 casos por 100,000 habitantes, esto sólo en 1992.^[13] En 1996 el número de casos aumentó, particularmente en el estado de Morelos, donde se le consideró como un problema reemergente presentándose 19.4 casos por cada 100,000 habitantes.^[37] De acuerdo con los informes del Programa de Prevención y Control de la Tuberculosis; en la última década se han presentado por lo menos 27,000 casos adicionales (en 1998), por lo que en este estado se han aplicado los lineamientos señalados por

la Norma Oficial Mexicana, para la Prevención y Control de la Tuberculosis en la Atención Primaria a la Salud; que se basa en la vacunación, el diagnóstico mediante baciloscopías y el tratamiento supervisado con fármacos; y además analizar de manera retrospectiva la eficacia y la eficiencia del tratamiento.^[37]

En Veracruz, la morbilidad es de 30.9 casos por cada 100,000 habitantes y el rango de mortalidad es de 8.0 casos por cada 100,000 habitantes; comparando estos rangos a nivel nacional se tiene que es de 18.2 y 4.4 casos por cada 100,000 respectivamente. Estos datos son el resultado del estudio realizado en los municipios de Orizaba, Río Blanco, Nogales, Ciudad Mendoza e Iztaczoquitlán.^[41] En 1999, la incidencia de TB en este estado fue de 23.2 casos por cada 100,000 habitantes siendo la más alta a nivel nacional (13.1 casos por cada 100 000).^[24] Otros reportes realizados en Orizaba han documentado que el 21% de casos de TB diagnosticados no son notificados,^[42] sin embargo se indica que la DR se presentó en un 42.6 casos por cada 100,000 en baciloscopía positiva y el 2.7% en pacientes con TB/HIV-1 seropositivo, por lo que la OMS implementa el programa TAES.^[43]

El programa TAES recomendado por la OMS, es la principal herramienta para el control de la TB,^[44] éste programa garantiza que los pacientes sean tratados con H, R y Z durante dos meses, continuando con H y R por otros cuatro meses. En caso de retratamiento, se adiciona ETM o S para su tratamiento y así disminuir la TB, pero la resistencia antimicrobiana ha provocado el fracaso del tratamiento,^[24] además de la inclusión (sin previa prueba de drogasensibilidad) de pacientes ya resistentes a H y R, ha resultado al incluir pacientes con fármacos de mayor actividad bactericida adquiriéndose cepas aún más resistentes (a Z y ETM).^[7] Sin embargo, se ha demostrado que la aplicación del TAES lleva eventualmente, a la disminución de las tasas de incidencia de TB y casi del 100% de la frecuencia sobre la aparición de cepas DR, aunque hay excepciones, probablemente esta estrategia no sea suficiente para controlar el problema, sobre todo cuando se presenta casos de MDR;^[24] y la adquisición acelerada de resistencia a H y R.^[7]

Un estudio realizado en Oaxaca, Sinaloa y Baja California durante 1997, se registraron 23,575 casos de manera oficial, 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 más fármacos. Además, se encontró que el 12% de ellos presentaron resistencia a H, el

43% con retratamiento fueron resistentes al mismo fármaco y un 22% presentó MDR.^[12] La resistencia a uno o más fármacos de primera línea en casos nuevos fue de 12.9% y en los casos de retratamiento fue de 50.5%^[12,17,44] y la MDR, es de 2.4% de casos nuevos y en 22.4% de los retratamientos.^[12,40] En Baja California se ha registrado tasas entre 6 y 17% de MDR, y específicamente en Tijuana presenta una tasa de 13% y en el sur de México, se tienen informes de una tasa de fracasos de 55% y una mortalidad de 28% por MDR-TB en casos tratados con fármacos de primera línea.^[8]

En el municipio de Huauchinango, Puebla; dos terceras partes de su población están infectadas por *M. tuberculosis* y la mayoría presentan MDR a los fármacos de primera línea. La frecuencia de resistencia a H fue del 12%, a R fue de 4% y 2.5% de resistencia a H y R.^[45]

Un estudio más reciente realizado en Orizaba, Veracruz muestra una tasa de MDR de 29.1%, con una resistencia primaria de 21% y resistencia secundaria del 79%.^[6] Entre 1998-2000, se presentaron 62,089 muertes por TB;^[46-47] estos datos indican fallas preocupantes en el seguimiento del programa de control de la TB en México, por lo que es urgente ampliar la cobertura TAES,^[6] ya que está en áreas piloto* cubriendo sólo el 50% del territorio estatal.^[12] En Orizaba, aplicando el programa TAES de forma adecuada se logró una curación del 79% de los casos nuevos y el 62% de los casos de retratamiento.^[17]

* Se recomienda en primera fase del tratamiento (conocido como **intensiva**) el uso de tres fármacos (H, R y Z), por 10 semanas y una segunda fase (conocido como **sostén**) donde se administra H y R por 15 semanas.^[12]

I.3.- *Mycobacterium tuberculosis**

El género *Mycobacterium* está formado por bacilos (recto y delgado) aerobios no formadores de esporas e inmóviles.^[48-49,51] La pared celular es rica en lípidos, razón por la que son resistentes a muchos desinfectantes y tinciones. La pared es compleja y esta formada por un esqueleto de peptidoglucano y moléculas de arabinogalactonomicolato unidas por enlaces covalentes y cubiertas por lípidos como los ácidos micólicos y polipéptidos. El 25.0% del peso seco de las micobacterias esta compuesto por lípidos, como glucolípidos complejos, peptidoglucolípidos y el factor cordón (6,6''-dimicolato de trehalosa), siendo éste último el que le confiere virulencia a las cepas. El esqueleto de peptidoglucano es uniforme para todas las especies de micobacterias y fundamental para proporcionar rigidez a la pared celular.^[48-49]

Las tinciones principales para detectar a la micobacterias son: Ziel-Neelsen y Kinyoun; ambas utilizan una mezcla de fucsina♦ con fenol. Otra técnica, es con fluorocromo (auronamina y rodamina), estos colorantes se unen a la pared celular. Los bacilos teñidos con fluorocromo son de color amarillo brillante y las tinciones realizadas con fucsina son de color rojo que no decoloran con soluciones ácidas/alcohólicas, de donde proviene el nombre de **bacilos ácido-alcoholresistentes**.^[48-49]

Las infecciones humanas son producidas por diferentes especies como: *M. tuberculosis*, *M. avium-intracellulare*, *M. kansasii*, *M. fortuitum*, *M. chelonae*, *M. leprae*, *M. africanum*, *M. simiae*, *M. flavescens*, *M. xenopi*, *M. ulcerans*, *M. haemophilum*, *M. genavense* y *M. bovis*, entre otras especies.^[50-51] La mayoría de infecciones provocadas por *M. bovis* son debidas al consumo de leche contaminada. El agente más común de provocar la TB es *M. tuberculosis*; sin embargo, en paciente inmunocomprometidos (SIDA) la enfermedad es provocada por *M. avium-intracellulare*, *M. chelonae*, *M. simiae*, *M. genavense*, *M. haemophilum*, *M. africanum*, *M. scrofulaceum* y/o *M. xenopi*.^[50]

* **Robert Koch**; Médico y bacteriólogo alemán. Descubrió el bacilo de la tuberculosis (1882), llamado **bacilo de Koch**.^[50]

♦ Debido a su alto contenido lipídico, las paredes celulares de las micobacterias su superficie es **hidrófoba**, tienen la capacidad única de ligarse a la **fucsina**, no siendo decoloradas por el ácido-alcohol.^[52]

El aislamiento de micobacterias (ej. *M. tuberculosis*, *M. avium-intracellulares*) requiere de una incubación de 3 hasta 8 semanas, ya que son de crecimiento lento y como característica principal forman colonias no pigmentadas; requieren medios de crecimiento específico como Löwenstein-Jensen, Modificación de Gruft del medio de Löwenstein-Jensen,^[5,48-49,52] medio Middlebrook 7H9,^[48-49,52] 7H10, 7H11^[5] y 7H12, 7H11 selectivo -medio de Mitchison-.^[48-49,52] Para muestras expectorantes, se recomienda usar medio Lowenstein-Jensen y para el diagnóstico de drogasusceptibilidad se utiliza el medio Ziehl-Neelsen, recomendados por la OMS y UICTEP,^[3] todos ellos contienen sales definidas, vitaminas, cofactores, ácidos oleico, albúmina, catalasa, glicerol, glucosa y verde de malaquita; el medio 7H11 contiene caseína hidrolizada.^[48-49,52]

La vía de infección es aérea y consiste en inhalación de aire con partículas infectadas con micobacterias*, que alcanzan los alvéolos y penetran en los macrófagos, donde son diseminados a los ganglios linfáticos y a otros tejidos (médula ósea, bazo, riñones, huesos, sistema nervioso central), siendo los pulmones los mayormente afectados.^[5] Además de la TB pulmonar, se presenta diferentes tipos: la endobronquial,^[53] extrapulmonar,^[5,53] meningea,^[5,53,56] osea,^[53] genitourinaria,^[53] gastrointestinal,^[53] abdominal,^[5] medula espinal [5] cervical,^[56] pericardial^[5,53] y pleural.^[5,53]

Por otro lado, el incremento de la TB se debe a la susceptibilidad de ciertos grupos, siendo los factores de riesgo más comunes: diabetes mellitus, prolongación de la terapia con adenocorticosteroides,^[54-55] terapias inmunosupresivos, algunas enfermedades hematológicas y reticuloendoteliales e insuficiencia renal.^[54]

En la actualidad, la TB es una causa importante de morbilidad y mortalidad significativa en países con recursos limitados; de hecho, *M. tuberculosis* y otras micobacterias (*M. avium-intracellular* y *M. kansasii*) provocan en ocasiones una enfermedad fulminante y diseminada en pacientes inmunodeprimidos.^[48]

* La respuesta histológica a la infección y el crecimiento de las **micobacterias** se caracteriza por una inflamación granulomatosa. Una vez que se produce la infección inicial del tejido se acumulan los **macrófagos** y los leucocitos polimorfonucleares.^[48]

El sistema inmunológico juega un papel importante en el desarrollo de la enfermedad, ya que en muchos casos la TB es latente y en otros es progresiva, provocando la destrucción de tejido pulmonar, los signos y síntomas clínicos de la TB, dependen del órgano infectado,^[48] constituyendo un problema para el diagnóstico.

La habilidad de *M. tuberculosis* para provocar la enfermedad depende de su factor de virulencia, el cual permite a la micobacteria entrar y sobrevivir indefinidamente en los macrófagos. La micobacteria dentro del macrófago, es capaz de evadir la respuesta inmunológica humana y mantenerse viva por tiempo prolongado. Los macrófagos, las células T y quimiocinas juegan un papel importante en la respuesta del huésped a la infección, es decir, los macrófagos sirven como células huésped para la multiplicación de *M. tuberculosis*. La activación de los macrófagos permite la erradicación de estas bacterias y ocurre cuando diversos mediadores solubles (citocinas) producidas por linfocitos T activan los mecanismos bactericidas de las células. El interferón-gamma (IFN- γ) y otras citocinas como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α)^[9,14] son producidos en respuesta a proteínas y al lipoarabinomano de *M. tuberculosis*,^[9] la interleucina-1 (IL-1) y la interleucina-6 (IL-6) son producidas por macrófagos infectados con *M. tuberculosis* y por linfocitos expuestos a productos micobacterianos.^[9,14] Este microorganismo produce una regulación positiva en la expresión de los genes que codifican estos mediadores, evidenciado en monocitos cultivados de enfermos de TB.^[9]

Los macrófagos también producen otras citocinas: interleucina-10 (IL-10) y el factor beta transformadora del crecimiento (TGF- β). El TGF- β , está presente en la lesiones granulomatosas de los paciente tuberculosos y es producida por monocitos humanos después de la estimulación con *M. tuberculosis*, es decir, inhibe la respuesta de células T a *M. tuberculosis* y también participa en la desactivación del macrófago al inhibir la producción del elevado nivel de expresión de vía sintetasa de óxido nítrico inducida por IFN- γ y esta es clave en el control de la infección por *M. tuberculosis*.^[55-56]

Los individuos con deficiencias en los genes del IFN- γ o del receptor del IFN- γ están en riesgo de padecer infecciones micobacterianas graves. La falta de IFN- γ favorece el crecimiento sin control del bacilo en los órganos,^[55] mientras tanto IL-10 puede suprimir la función de los macrófagos, indirectamente al inhibir la producción de citocinas por monocitos y linfocitos, y directamente disminuir la liberación de radicales libres de oxígeno. Los monocitos de la sangre de pacientes con TB no presentan aumento en la producción de IL-10 pero si lo presentan los macrófagos que se encuentran en la lesión tuberculosa; por lo tanto, TGF- β suprime la proliferación de células T, es decir que estas células no pueden realizar su función, en controlar y eliminar la micobacteria, ya que no emigran al sitio de infección y no interactúan con las células (que presentan antígenos) favoreciendo el crecimiento intracelular de *M. tuberculosis*, por lo que suprime la producción de TNF- α , IL-1, IL-6 y la liberación de radicales libres de oxígeno; es decir, que el TNF- α se requiere para generar la respuesta granulomatosa y para una inmunidad celular.^[55]

La eliminación intracelular de *M. tuberculosis* está mediada por la producción de óxido nítrico inducida por el TNF- α ; sin esta inducción *M. tuberculosis* crece sin control. Mientras *M. tuberculosis* induce la secreción de TNF- α en los macrófagos, en células dendríticas y en las células T; esta citoquina se requiere para el control de la infección aguda por *M. tuberculosis*. El TNF- α ha sido también implicado en la respuesta patológica del huésped a la infección y es a menudo nombrado como un factor importante en la destrucción mediada por el huésped del tejido pulmonar.^[55]

Por otro lado, IL-6 suprime la respuesta de las células T, es decir, que los macrófagos infectados son incapaces de estimular las respuestas de células T a un antígeno no relacionado y este efecto puede ser revertido parcialmente por la neutralización de la IL-6,^[55] ya que es importante en la respuesta innata inicial al patógeno y la liberación de radicales libres de oxígeno^[14,56] y estos radicales libres, óxidos nítrico sintetasa; no tienen una elevada producción de óxido nítrico por los macrófagos y por lo tanto activa el mecanismo antimicrobiano, esto se ha comprobado en la detección inmunohistoquímica, con un elevado nivel de óxido nítrico sintetasa indicible (iNOS) en macrófagos obtenidos por lavado pulmon-alveolar de individuos

con tuberculosis pulmonar activa,^[55] por lo que hay evidencia de que los monocitos de la sangre periférica y los macrófagos del granuloma pulmonar de pacientes con TB activa liberan TGF- β .^[14,56]

Dado el incremento de este padecimiento, hacen que las campañas de control implementadas para erradicar la enfermedad sean de alto costo y poco satisfactorias. Por otro lado, los fármacos existentes son cada vez menos eficaces para tratar la enfermedad, lo que ha despertado el interés por buscar nuevas sustancias tanto de origen natural como sintético para tratar la TB.

I.4.- PLANTAS MEDICINALES COMO POSIBLE FUENTE DE AGENTES ANTIMICOBACTERIANOS

Los compuestos puros obtenidos de plantas medicinales tienen gran importancia. Desde la antigüedad se sabe que especies vegetales se han usado para curar diversas enfermedades. Así por ejemplo, se tienen evidencias escritas que numerosas civilizaciones antiguas como: la China, Hindú, Norte de África, la Egiptia; usaban las plantas como remedio para curar diversos padecimientos.^[57] Un escrito proveniente de Mesopotamia del año 2600 a. c. describe aproximadamente 1,000 plantas que usaban como remedio tradicional (por ejemplo, el aceite de *Cedrus sp*, *Cupressus sempervirens*, *Glycyrrhiza glabra* y *Papaver somniferum*) y que en la actualidad se siguen usando para el tratamiento de tos, resfriado, infecciones parasitarias e inflamación.^[58] Por otro lado, la materia médica China, describe datos de 1,100 años a. c. sobre 52 prescripciones, se usaban diversas plantas como agentes medicinales. Así mismo, el sistema Ayurvético Hindú registra datos de aproximadamente 1,000 años a. c. sobre especies medicinales.^[58]

En 1984, aproximadamente el 25% de los fármacos administrados (tanto en Estados Unidos como en Canadá) provenían de compuestos obtenidos de plantas.^[59-60] En 1993, Balandrin y col. describen que más del 50% de los fármacos usados en la clínica, provienen de productos naturales (derivados y análogos) y el 25% de estos provienen de plantas superiores. Investigaciones realizadas en especies vegetales, tomando como punto de partida el uso tradicional de las plantas, han permitido obtener compuestos para uso terapéutico en la medicina moderna. En este sentido, podemos mencionar que las plantas son una fuente importante de principios activos o prototipos moleculares para combatir enfermedades graves a nivel mundial.^[61]

Del 5 al 10% de las plantas superiores, se han investigado desde el punto de vista químico^[61] y un porcentaje menor se ha investigado desde el punto de vista farmacológico y/o biológico. Se estima que del 14-28% de plantas superiores son usados en la medicina tradicional y el 15% de los angiospérmicas han sido investigados químicamente, por otro lado el 74% de estos han sido farmacológicamente activos obtenidos de plantas.^[50,60]

Así por ejemplo, algunos compuestos de importancia farmacológica como la quinina (antimalárico), artemisinina (antipalúdico), taxol (anticancerígeno), cocaína (anestésico), digoxina (glucósido cardiotónico), reserpina (antihipertensivo), camptotecina (anticancerígeno) y otros, han sido aislados de plantas.^[50,59,61] Otros ejemplos importantes se describen en la Tabla 3, donde se muestra algunos principios activos y su fuente, así como el uso en la terapéutica, de la especie vegetal.^[62]

Tabla 3. Acción y usos de fármacos de plantas en correlación con su empleo tradicional.

Planta	Uso tradicional	Fármaco	Acción Clínica
<i>Ephedra simca</i>	Bronquitis crónica	Efedrina	Simpaticomimético
<i>Piper methysticum</i>	Eufórico	Kawaina	Tranquilizante
<i>Amnis visnaga</i>	Asma	Kelina	Broncodilatador
<i>Vinca minor</i>	Trastornos cardiovasculares	Vincamina	Estimulante cerebral
<i>Papever somniferum</i>	Sedante; analgésico	Papaverina	Relajante del músculo liso
<i>Theobroma cacao</i>	Diurético	Teobromina	Diurético, vasodilatador

La importancia del estudio de los productos naturales radica en la contribución para la terapéutica tradicional, constituyendo una fuente importante en la obtención de extractos, así como de principios activos puros. Fransworth y col. aislaron 119 compuestos de 90 especies medicinales y del 74 al 77% de los compuestos eran responsables de la actividad farmacológica.^[58,63]

La búsqueda de compuestos activos de origen natural decayó por mucho tiempo, dado el auge sobre la síntesis de muchas sustancias, similares a los de origen natural, con mayor eficacia y menor costo. Pero, el surgimiento de las enfermedades que se creían erradicadas como: enfermedades infecciosas (parasitarias, malaria, paludismo, TB, etc), están ocasionando problemas graves de salud, ya que presentan resistencia a los fármacos existentes y los programas o tratamientos propuestos son poco eficaces, de elevados costos, muy prolongados presentando reacciones secundarias muy severas. Por lo tanto, las plantas ocupan una posición

predominante y la herbolaria es la práctica terapéutica que utiliza plantas medicinales, teniendo una amplia trayectoria a lo largo de la historia de México y en el Mundo, constituyendo el recurso más conocido y accesible para grandes masas de la población.^[64] La extraordinaria riqueza florística (26,500 especies y aproximadamente 9,500 endémicas), ubica a México en el cuarto lugar mundial; lo que ha permitido que se desarrolle la medicina tradicional desde épocas prehispánicas,^[65-66] desarrollándose una línea de investigación farmacológica, siendo una fuente de materia prima para la obtención de fármacos.^[57,62]

Debido a la presencia de diversas enfermedades que constituyen graves problemas de salud a nivel mundial; numerosos grupos de investigación se han dado a la tarea de explorar el potencial de diversas fuentes naturales como las plantas medicinales, microorganismos terrestres^[67-69] y marinos.^[70-71] Los esquemas que siguen para realizar la búsqueda de compuestos con actividad farmacológica^[64] en general se basan, en seleccionar la especie objeto de estudio, utilizando el criterio etnobotánico^[60] y realizar el estudio fitoquímico biorigido.^[72-73]

Dada la problemática de la TB a nivel mundial; diversos grupos de investigación están explorando el potencial antimicobacteriano de diversas fuentes naturales (entre ellas las plantas medicinales) enfocadas a encontrar nuevos principios activos, que sean menos tóxicos y más eficaces.^[61,73]

Algunas plantas son utilizadas para el tratamiento de la TB, por lo que han sido objeto de investigación de tipo químico-bidirigido, obteniéndose así los principios activos.^[75,78-79] Estas investigaciones se han enfocado a la búsqueda de compuestos en extractos, que inhiban el crecimiento de cepas micobacterianas.^[69] Por ejemplo, se aislaron el (E)-fitol y ergosterol-5,8-endoperoxido, inhibiendo a la cepa *M. tuberculosis* H₃₇Rv a una CMI de 2 y 1 µg/mL, obtenidos de los extractos MeOH/hojas de *Luecas volkensii*^{76]} y MeOH/aéreas de *Ajuga remota*,^[79] respectivamente; siendo estos los de mayor actividad antimicobacteriana, en la relación siguiente se mencionan otros ejemplos.

I.5.- COMPUESTOS CON ACTIVIDAD ANTIMICOBACTERIANA

La siguiente relación, presenta la CMI, de aquellos compuestos y/o extractos con actividad antimicobacteriana; utilizando diferentes ensayos biológicos:

Fuente	Extracto/Parte usada	Ensayo biológico	Cepa de micobacteria	Compuesto activo	CMI (µg/mL)	Referencia
<i>Tetradenia riparia</i>	EtOH/hojas	Proporción en agar	<i>M. tuberculosis</i> 3526, 3533	8(14)15-sandara-copimaradien-7α-18-diol	25-100	[67]
<i>Borrichia frutensis</i>	CH ₂ Cl ₂ /flores	Radiorespirométrico BACTEC 460	<i>M. tuberculosis</i> H ₃₇ Rv	(24R)-24,25-epoxicicloartan-3-ona	8.0	[80]
				(3β, 24R)-24,25-epoxicicloartan-3-ol	8.0	
<i>Adhatoda vasica</i>	^a /hojas	Difusión en disco	<i>M. tuberculosis</i>	ambroxol	64	[81]
				bromhexina	128	
<i>Juniperus procera</i>	EtOH/corteza	Proporción en agar	<i>M. intracellulare</i> <i>M. xenopei</i> <i>M. chelonei</i> <i>M. smegmatis</i>	7β-hidroxiabieta-8,13-dien-11,12-diona	1.25	[82]
<i>Arctotis auriculata</i>	Éter de petróleo/hojas	Difusión en disco	<i>M. smegmatis</i>	-	8500	[83]
<i>Helichrysum crispum</i>	H ₂ O/hojas	Difusión en disco	<i>M. smegmatis</i>	-	10000	[83]
<i>Oplopanax horridus</i>	MeOH/corteza y raíz	Difusión en disco	<i>M. tuberculosis</i> <i>M. avium</i>	falcarinol	10.0©	[84]
			<i>M. tuberculosis</i> <i>M. avium</i>	falcarindiol	10.0©	
			<i>M. tuberculosis</i> <i>M. avium</i>	oplopandiol	20.0©	

Estudio químico y evaluación antimicobacteriana de Calliandra houstoniana

Fuente	Extracto/Parte usada	Ensayo biológico	Cepa de micobacteria	Compuesto activo	CMI (µg/mL)	Referencia
<i>Laurencia obtusa</i>	CH ₂ Cl ₂ /alga	Radiorespirométrico BACTEC 460	<i>M. tuberculosis</i> H ₃₇ Rv	allolaurinterol	16	[85]
<i>Ailanthus altissima</i>	^{a/a}	Radiorespirométrico BACTEC 460	<i>M. tuberculosis</i> H ₃₇ Rv	sinjulactona-K	12.5	[86]
<i>Salvia multicaules</i>	(CH ₃) ₂ O/raíz	Microdilución	<i>M. tuberculosis</i> H ₃₇ Rv	12-dimetilmulticaulina	0.46	[74]
				12-metil-5-dehidroacetilhorminona	0.89	
				2-dimetilmultiortoquinona	1.2	
				12-metil-5-dehidrohorminona	1.2	
				multiortoquinona muticalulina salvipimarona	2.0 5.6 7.3	
<i>Erigeron strigosus</i>	CH ₂ Cl ₂ /raíz	Radiorespirométrico BACTEC 460	<i>M. tuberculosis</i> <i>M. avium</i>	-	100	[87]
<i>Magnolia acuminata</i>	CH ₂ Cl ₂ /raíz y aérea	Radiorespirométrico BACTEC 460	<i>M. tuberculosis</i> <i>M. avium</i>	-	100	[87]
<i>Saussurea lappa</i>	CH ₂ Cl ₂ /raíz	Radiorespirométrico BACTEC 460	<i>M. tuberculosis</i> H ₃₇ Rv <i>M. avium</i>	dehidrocostus lactona	2	[87]
					16	
				<i>M. tuberculosis</i> H ₃₇ Rv	4α(15)-epoxido dehidrocostus lactona	
			10β(14)-epoxido dehidrocostus lactona	32		
<i>Solanum sodomaeum</i>	EtOH/bayas	-	<i>M. intracellulare</i>	solsodolina A	10	[88]

Estudio químico y evaluación antimicobacteriana de Calliandra houstoniana

Fuente	Extracto/Parte usada	Ensayo biológico	Cepa de micobacteria	Compuesto activo	CMI (µg/mL)	Referencia
<i>Magnolia grandiflora</i>	EtOH/hojas	Radiorespirométrico BACTEC 460	<i>M. tuberculosis</i> H ₃₇ Rv	partenólida	16	[75]
			<i>M. tuberculosis</i> H ₃₇ Rv	costunólida	32	
<i>Hydrastis canadensis</i>	EtOH/raíz	Radiorespirométrico BACTEC 460	<i>M. tuberculosis</i>	berberina	25	[89]
			<i>M. tuberculosis</i>		25	[91]
<i>Chrysoma pauciflosculosa</i>	^a /raíz	Radiorespirométrico BACTEC 460	<i>M. tuberculosis</i>	(2Z,8Z)-matricaria ester	50	[90]
			<i>M. avium</i>		25	
			<i>M. tuberculosis</i>	(2E,8Z)-matricaria ester	50	
			<i>M. avium</i>		50	
<i>Euthamia philadelphicus</i>	^a /raíz	Radiorespirométrico BACTEC 460	<i>M. tuberculosis</i>	(4Z,8Z)-matricaria ester	12.5	[90]
			<i>M. avium</i>		50	
<i>Solidago canadensis</i>	^a /raíz	Radiorespirométrico BACTEC 460	<i>M. tuberculosis</i>	(2Z)-8-dehydro-matricaria ester	25	[90]
			<i>M. avium</i>		25	
			<i>M. tuberculosis</i>	(2Z,8Z)-O-angelato	25	
			<i>M. avium</i>		25	
<i>Glycyrrhiza glabra</i>	^{a/a}	Radiorespirométrico BACTEC 460	<i>M. tuberculosis</i>	licoisoflavona	25	[91]
			<i>M. smegmatis</i>		50	
<i>Strobilanthes cusia</i>	^{a/a}	Radiorespirométrico BACTEC 460	<i>M. tuberculosis</i>	triptantrina	1	[91]
			<i>M. avium</i>		4	
			<i>M. smegmatis</i>		6	
<i>Leucas volkensii</i>	MeOH/hojas	Radiorespirométrico BACTEC 460	<i>M. tuberculosis</i> H ₃₇ Rv	(E)-fitol	2	[76]
			<i>M. avium</i>		2	
<i>Azorella madreporica</i>	Éter de petróleo/aéreas	Radiorespirométrico BACTEC 460	<i>M. tuberculosis</i> H ₃₇ Rv	9,12-ciclomulin-13-ol	20	[77]
			<i>M. tuberculosis</i> H ₃₇ Rv	mulin-9(10), 12(13)-dieno	20	

Estudio químico y evaluación antimicobacteriana de Calliandra houstoniana

Fuente	Extracto/Parte usada	Ensayo biológico	Cepa de micobacteria	Compuesto activo	CMI (µg/mL)	Referencia
<i>Ajuga remota</i>	MeOH/aéreas	Radiorespirométrico BACTEC 460	<i>M. tuberculosis</i> H ₃₇ Rv	5,8-endoperóxido del ergosterol	1	[79]
				Acetato del 5,8-endoperóxido del ergosterol	8	
<i>Melia volkensii</i>	MeOH/semillas	Radiorespirométrico BACTEC 460	<i>M. tuberculosis</i> H ₃₇ Rv	6β-hidroculactona	4	[92]
				12β-hidroxikulactona	16	
				kulonato	16	
<i>Inula helenium</i>	CH ₂ Cl ₂ /raíz	Radiorespirométrico BACTEC 460	<i>M. tuberculosis</i> H ₃₇ Rv	isolactona	32	[93]
				isoalantolactona	32	
<i>Rudbeckia subtomentosa</i>	CH ₂ Cl ₂ /raíz	Radiorespirométrico BACTEC 460	<i>M. tuberculosis</i> H ₃₇ Rv	aloolantolactona	32	[93]
<i>Galipea officinalis</i>	EtOH/corteza	Proporción en agar	<i>M. tuberculosis</i>	4-metoxi-2-pentilquinoleina	6.25	[94]
<i>Aspidosperma quebracho-blanco</i>	MeOH:CH ₂ Cl ₂ /aéreas	Radiorespirométrico BACTEC 460	<i>M. tuberculosis</i> H ₃₇ Rv	ácido ursólico	14.6	[78]
<i>Baccharis patagonica</i>	MeOH:CH ₂ Cl ₂ /aéreas	Radiorespirométrico BACTEC 460	<i>M. tuberculosis</i> H ₃₇ Rv	ácido oleanólico	29.18	[78]
<i>Sarmienta scandens</i>	MeOH:CH ₂ Cl ₂ /aéreas	Radiorespirométrico BACTEC 460	<i>M. tuberculosis</i> H ₃₇ Rv	zeorina	3.5	[78]
<i>Buddleja cordata</i> Subs. <i>Cordata</i>	MeOH:CH ₂ Cl ₂ /corteza de tallo	Radiorespirométrico BACTEC 460	<i>M. tuberculosis</i> H ₃₇ Rv	2[4'-hidroxifenil]-etil lignocerato	64	[95]
<i>Junellia tridens</i>	MeOH:CH ₂ Cl ₂ /aéreas	Radiorespirométrico BACTEC 460	<i>M. tuberculosis</i> H ₃₇ Rv	ácido oleanólico	16	[72]
				ácido 3-epioleanólico	16	

Estudio químico y evaluación antimicobacteriana de Calliandra houstoniana

Fuente	Extracto/Parte usada	Ensayo biológico	Cepa de micobacteria	Compuesto activo	CMI (µg/mL)	Referencia
<i>Acanthella klethra</i>	MeOH:CH ₂ Cl ₂ /esponja	Radiorespirométrico BACTEC 460	<i>M. tuberculosis</i> H ₃₇ Rv	axisonitrilo-3	2	[70]
<i>Cymbastela hooperi</i>	MeOH:CH ₂ Cl ₂ /esponja		<i>M. tuberculosis</i> H ₃₇ Rv <i>M. avium</i>	descloroelato	32 8	
<i>Laurencia rigida</i>	MeOH:CH ₂ Cl ₂ /alga		<i>M. tuberculosis</i> HB ₃₇ Rv <i>M. avium</i>	diisocianoadociano	8 8	
<i>Angelas sp sponge</i>	MeOH/esponja	Radiorespirométrico BACTEC 460	<i>M. tuberculosis</i> H ₃₇ Rv	agelasina F	3.13	[71]
<i>Erythrina indica</i>	MeOH:CH ₂ Cl ₂ /corteza de raíz	Radiorespirométrico BACTEC 460	<i>M. smegmatis</i>	indicantina B	18.5	[96]
<i>Ficus citrifolia</i>	EtOH/hojas	Radiorespirométrico BACTEC 460	<i>M. tuberculosis</i> H ₃₇ Rv	-	100	[97]
<i>Combretum molle</i>	(CH ₃) ₂ O/Corteza	Proporción en agar	<i>M. tuberculosis</i>	Punicalagina	1.0	[98]
<i>Viscum album</i>	Et ₂ O ^a	Método Colorimétrico Alamar Azul.	<i>M. tuberculosis</i> H ₃₇ Ra	-	200	[99]
<i>ssp austriacum</i>	Et ₂ O ^a			-	200	
<i>ssp abietis</i>	Et ₂ O ^a			-	200	
<i>ssp austriacum</i>	Éter de petróleo ^a			-	200	
<i>ssp habitéis</i>	Éter de petróleo ^a			-	200	

Estudio químico y evaluación antimicobacteriana de Calliandra houstoniana

Fuente	Extracto/Parte usada	Ensayo biológico	Cepa de micobacteria	Compuesto activo	CMI (µg/mL)	Referencia
<i>Lessonia nigrescens</i>	MeOH:CH ₂ Cl ₂ /aéreas	Radiorespirométrico BACTEC 460	<i>M. tuberculosis</i> H ₃₇ Rv	(24R)-saringosterol saringosterol (24S)-saringosterol	0.125 0.25 1.0	[100]
<i>Lippia turbinata</i>	MeOH:CH ₂ Cl ₂ /aéreas	Radiorespirométrico BACTEC 460	<i>M. tuberculosis</i> H ₃₇ Rv	ácido 3β,25-epoxido-3α,21α,dihidroxi-22β-angeloiloxiolean-12-ene-28-oico ácido camárico ácido rehmánnico	38 36 18	[101]
<i>Stemodia foliosa</i>	EtOH/tronco y hojas	Difusión en disco	<i>M. fortuitum</i>	O-n-pentil	10.0©	[102]
<i>Chinese licorice</i>	EtOH/raíz	Radiorespirométrico BACTEC 460	<i>M. tuberculosis</i> <i>M. bovis</i> <i>M. bovis</i> BCG <i>M. kansasii</i> <i>M. xenophii</i> <i>M. marinum</i>	licoalcona A	5-10 10-20 5-10	[103]
<i>Physalis angulata</i>	CHCl ₃ /aéreas	Método Colorimétrico Alamar Azul	<i>M. tuberculosis</i> H ₃₇ Rv	fisalina D	32	[104]
<i>Chaetomium globosum</i>	EtOAc/hongo	Método Colorimétrico Alamar Azul	<i>M. tuberculosis</i> H ₃₇ Ra	dicetopiperazina alcaloide echinulina chaetomanona	169.92♦ 216.62♦	[105]

Estudio químico y evaluación antimicobacteriana de Calliandra houstoniana

Fuente	Extracto/Parte usada	Ensayo biológico	Cepa de micobacteria	Compuesto activo	CMI (µg/mL)	Referencia
<i>Morinda citrifolia</i>	EtOH/hojas	Radiorespirométrico BACTEC 460	<i>M. tuberculosis</i> H ₃₇ Rv	(E)-fitol	32	[106]
				cicloartenol	64	
				campesta-5,7,22-trien-3β-ol	2.5	
<i>Amorphophallus bequaertii</i>	CH ₂ Cl ₂ /ramas	Radiorespirométrico BACTEC 460	<i>M. tuberculosis</i> H ₃₇ Rv	-	100	[61]
<i>Myrianthus arboreus</i>	CH ₂ Cl ₂ /corteza	Radiorespirométrico BACTEC 460	<i>M. tuberculosis</i> H ₃₇ Rv	-	100	[61]
<i>Sapium indicum</i>	Hex/fruto	Método Colorimétrico Alamar Azul	<i>M. tuberculosis</i> H ₃₇ Rv	sapintoxina A	3.12	[107]
<i>Heisteria accuminta</i>	CH ₂ Cl ₂ /tronco	Radiorespirométrico BACTEC 460	<i>M. tuberculosis</i>	-	10.0	[108]
<i>Nectandra hihua</i>	CH ₂ Cl ₂ /corteza			-	10.0	
<i>Senna oblicua</i>	CH ₂ Cl ₂ /fruto y tronco			-	10.0	
<i>Senna silvestres</i>	CH ₂ Cl ₂ /corteza			-	<6.25	
<i>Somera sabiceoides</i>	CH ₂ Cl ₂ /tronco			-	6.25	
<i>Zanthoxylum sprucei</i>	CH ₂ Cl ₂ /corteza			-	15	
<i>Calceolaria pinnifolia</i>	MeOH:CH ₂ Cl ₂ /aéreas	Método Colorimétrico Alamar Azul	<i>M. tuberculosis</i> H ₃₇ Rv	ácido 3 epi-ursólico	8	[73]
				ácido 3 epi-oleanólico	16	

Estudio químico y evaluación antimicobacteriana de Calliandra houstoniana

Fuente	Extracto/Parte usada	Ensayo biológico	Cepa de micobacteria	Compuesto activo	CMI (µg/mL)	Referencia
<i>Ruprechtia triflora</i>	MeOH:CH ₂ Cl ₂ /aéreas	Método Colorimétrico Alamar Azul	<i>M. tuberculosis</i> H ₃₇ Rv	5α,8α-epidioxiergost-6,22-dien-3β-ol	2	[73]
				5α,8α-epidioxistigmast-6,22-dien-3β-ol	2	
				4-en, 6β-ol, estigmastenona	2	

♦: µM; © µg/disc; ^a: no se describe la parte vegetal y/o extracto utilizado.

I.6.- GENERALIDADES DEL GENERO *Calliandra*

El género *Calliandra* pertenece a la familia Leguminosae, ésta familia es la segunda en cuanto a magnitud en el ámbito de las fanerógamas; comprendiendo 600 géneros y aproximadamente 12,000 especies.^[109-110] La mayoría de las leguminosas son alimenticias y algunas se utilizan para uso medicinal, por lo que se han investigado para conocer los principales constituyentes siendo estos: saponinas, glucósidos, alcaloides, taninos, polisacáridos, antraquinonas, amino ácidos, lectinas, isolectinas, proteínas, esteroides, neoflavonoides, flavonoides, isoflavonas, flavanoides, flavonas, índoles, resinas, triterpenos, lactonas sesquiterpénicas, sesquiterpenos, oxido de diterpenos, fenoles, polifenoles, etc.^[110]

Esta familia se divide en tres subfamilias: Papilionaceae, Mimosoideae y Caesalpinoideae que contienen aproximadamente: 3,777, 40 y 133 géneros, respectivamente.^[109-111] *C. houstoniana*, pertenece a la subfamilia Mimosoideae, cuyos miembros son árboles o arbustos que se hallan casi exclusivamente distribuidos en zonas tropicales y subtropicales de América;^[112-113] las hojas son generalmente bipinadas, flores regulares con inflorescencia en forma de brocha destacando por los estambres en número igual al de los pétalos y largamente salientes, más o menos unidos en la base, el color de estos estambres varía según la especie, los frutos son vainas;^[109,111-113] y los géneros importantes desde el punto de vista químico son: Mimosa con 450-500 especies^[110-111] y Acacia con 750-800 especies.^[110]

A la fecha, se han realizado algunos estudios de diferentes especies del género *Calliandra*, aislándose principalmente: alcaloides como el ácido piperólico y algunos derivados presentes en el extracto EtOH;^[114-122] como también aminoácidos,^[114-121] taninos^[123-125] y flavonoides.^[126]

I.6.1.- Aspecto botánico;

C. houstoniana (Mill.) Standl, pertenece a la familia Leguminosae y subfamilia mimosoideae. Es un arbusto de uno a tres metros de altura; los tallos tienen múltiples vellosidades, las hojas son alternas y bipinadas con hojuelas numerosas (Figura 3). La inflorescencia ésta en forma de

racimo terminal y pubescente; los estambres son muy largos de color rojo púrpura y unidos en su base; las flores son cabezuelas agrupadas en racimos y el fruto es una vaina pinosa y aguda con las valvas encorvadas hacia afuera cuando se abren. Florece de Mayo a Septiembre y abundan en matorrales secundarios de las tierras calientes y encinares de zonas templadas.^[109,127-131]

La especie comúnmente se conoce como: cabellos de ángel (Guanajuato); pambotano (Morelos, Valle de México y Veracruz) cabellitos de ángel o cabellitos de una vara (Morelos); tepachera o timbrillo (Valle de México); canela, hierba de canela o coquito (Oaxaca); cabellito (Sinaloa); charamusco (Tabasco); hierba de burro (Chiapas).^[109,127-129,132] *C. houstoniana*, se divide en tres subespecies que son: *houstoniana*, *alamosensis* y *stylesis*.^[133]



Figura 3. *Calliandra houstoniana*

I.6.2.- Aspectos etnobotánicos

Esta especie se utiliza para aliviar diversos padecimientos. En Michoacán, se utiliza para aliviar el “mal de orín”, de riñones y de vejiga. En Puebla, se utiliza para tratar la conjuntivitis; preparando una infusión con los estambres de las flores, para lavar los ojos diariamente. En Sinaloa, al masticar la corteza se endurecen las encías. En Sonora, la corteza y la raíz se usan para infecciones de los dientes y para tratar el paludismo. En Veracruz, se bebe el cocimiento de las hojas para padecimientos del corazón. En Quintana Roo, se dice que puede actuar como antipirético y el cocimiento de la raíz cura el ahíto, represión, ablanda el pecho, relaja el vientre, remedia la tos. Y en Chiapas es muy empleado para tratar la diarrea (con sangre y/o con moco).^[130-131] La corteza de la raíz fue usada en Europa para combatir las fiebres, especialmente las palúdicas y contiene un alcaloide que produce la muerte por detención del corazón en sístole; la raíz se emplea contra el humor colérico.^[109,127,129] La planta se uso como astringente,^[134] antipalúdica y tóxica, según informes por Máximo Martínez, en el siglo XX.^[130]

Algunas de estas especies son utilizados como: anticonvulsante (*C. portoricensis*),^[135-136] insecticida (*C. angustifolia*, *C. hematocephala* y *C. rubescens*),^[119-120] cálculos biliares y antimicrobiano (*C. californica*)^[137] y purgativo/antimicrobiano (*C. peninsulares*).^[137-138] También son utilizadas como expectorante otras leguminosas, entre ellas se encuentran: *Acacia sinutata* y *Glycyrrhiza glaba*.^[139] Y recientemente se describen en la literatura estudios sobre la actividad antimicobacteriana de diversas leguminosas, utilizando extractos crudos de CH₂Cl₂ de *Andira sp* (hojas) que inhiben en un 67%, *Cynometra bauhiniifolia* (corteza) un 88%, *Dalbergia sp.* (raíz) un 63%, *Eritrina fusca* (utilizando corteza y raíz) inhibiendo en un 63 y 54%, respectivamente; *Indigofera truxillensis* (partes aéreas) un 53%, *Senna silvestris* (corteza) un 94% y *S. obliqua* (tronco y fruto) un 90%; todas ellas inhiben el crecimiento de *M. tuberculosis* a la concentración de 50 µg/mL, empleando el método radiorespirométrico Bactec 460.^[108]

I.6.3- Investigación química

La especie *C. houstoniana* carece de estudios químicos; a la fecha, solo Miranda y Martínez (1952, 1992) identificaron: taninos (existe principalmente en la región cortical de la raíz), aceite esencial, grasa, resina, glucosa, almidón, glucósido (calliandreína), potasa, sosa, cal, magnesia, ácidos sulfúrico, ác. clorhídrico, ác. fosfórico, ác. silícico y ác. carbónico. De manera adicional, en la literatura citan que diferentes especies del género *Calliandra* han sido investigados desde el punto de vista químico donde principalmente se han aislado alcaloides como el ácido pipercolico, el ácido hidropipercolico y algunos derivados de este compuesto, que han sido aislados en los extractos etanólicos de *C. haematocephala*, *C. pittieri*, *C. angustifolia* y *C. confusa*.^[114-122] Otros compuestos aislados en el extracto de AcOEt de *C. californica*: flavonoides,^[126] taninos y saponinas.^[133]

I.6.4- Investigación biológica y farmacológica

En la literatura no se ha informado estudio farmacológico alguno de esta especie; sin embargo, se tiene registro que algunas especies del género, como *C. angustifolia*, inhibe el crecimiento de *M. tuberculosis* a la concentración de 50 µg/mL en un porcentaje menor del 50%, utilizando el extracto CH₂Cl₂ del tronco, al ser evaluado por el método radiorespirométrico Bactec 460.^[108] Además estudios realizados a esta especie, el extracto MeOH presenta acción fototóxica y efecto citotóxico.^[131] Otras especies de *Calliandra* presentan diferentes actividades, por ejemplo: actividad anticonvulsivante, efecto que se evaluó en los extractos acuosos de *C. portoricensis*.^[135-136]

Los extractos acuosos de *C. angustifolia* y *C. hematocephala* presenta actividad insecticida contra: *Spodoptera frugiperda*^[119] y el extracto MeOH:CHCl₃:H₂O de *C. rubescens* muestra esta misma actividad biológica contra *Phaseolus lunatus*.^[120] Los extractos etanólicos de las especies *C. californica* y *C. peninsulares*, mostraron actividad antimicrobiana siendo activos contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* y *Candida albicans*,^[137-138] y los extractos acuosos de *C. grandiflora* y *C. houstoniana* presentan actividad antiparasitaria y efecto sedativo sobre sistema nervioso.^[131]

II.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En el país se tiene un grave problema por TB, aunado a la presencia de cepas MDR de *M. tuberculosis*, propiciando el aumento de casos y dificultando su tratamiento. La presencia de éstas cepas, hacen que los tratamientos actuales sean poco efectivos, más costosos, prolongados y con efectos secundarios severos para el paciente. La TB en México constituye una de las 20 causas de muerte.^[36] Un factor importante que contribuye al aumento de los casos de TB, es la presencia de enfermedades que comprometen el sistema inmunológico como el SIDA y el cáncer entre otras.^[40] Con base en lo anterior, se ha intensificado la búsqueda de nuevos agentes antituberculosos, a partir de diferentes fuentes naturales con miras a obtener compuestos activos y/o moléculas que coadyuven al tratamiento de la enfermedad. Dentro de las fuentes naturales se encuentra *C. houstoniana*, especie vegetal que se utiliza para el tratamiento de tos seca, pulmonía y/o padecimientos relacionados con la TB.^[129,142]

III.- OBJETIVO GENERAL

Aislar y caracterizar los compuestos activos responsables de la actividad antimicrobacteriana presentes en el extracto hexánico de las partes aéreas de *C. houstoniana*.

III.1.- OBJETIVOS PARTICULARES

- Revisión bibliográfica sobre estudios químicos y biológicos del género *Calliandra* y especies relacionadas.
- Seleccionar y coleccionar el material vegetal, objeto de estudio.
- Realizar operaciones preliminares (secado y molienda del material vegetal).
- Preparar los extractos hexánico y metanólico (vía maceración).
- Evaluación antimicrobacteriana de los extractos hexánico y metabólico por el método radiorespirométrico Bactec 460.
- Realizar el fraccionamiento químico biodirigido de los extractos activos.
- Determinar la actividad antimicrobacteriana de cada grupo de fracciones obtenidas.
- Separar los compuestos presentes en las fracciones activas empleando diversas técnicas cromatográficas [cromatografía en columna (CC), cromatografía en capa fina (CCF) y CCF preparativa].
- Caracterización e identificación de los compuestos activos mediante el análisis de sus datos espectroscópicos (IR, RMN- H^1 , RMN- C^{13}) y espectrométricos (EM-IE, EM-IQ, CG-EM).
- Evaluación antimicrobacteriana de los compuestos puros.

IV.- HIPÓTESIS

Estudios químicos realizados en plantas del género *Calliandra* han indicado la presencia de sustancias como: flavonoides, taninos y alcaloides. Además, dentro de la medicina tradicional mexicana se le asocia para el tratamiento de enfermedades relacionadas con el aparato respiratorio, entonces el estudio químico-bio-dirigido del extracto hexánico de las partes aéreas de *C. houstoniana* y su evaluación antimicrobacteriana confirmarán su empleo como una alternativa de curación para el tratamiento de la TB.

V.- METODOLOGÍA

V.1.- Selección

C. houstoniana se seleccionó con base al criterio etnobotánico, tomando como punto de partida el uso popular de la planta en la medicina tradicional de nuestro país (Chiapas, Sinaloa, Chihuahua, Tabasco, Veracruz, Morelos, Valle de México, Oaxaca, Guanajuato, Hidalgo, Puebla, San Luis Potosí), para el tratamiento de tos seca y pulmonía.^[129-131,142]

V.2.- Colecta e Identificación del Material Vegetal

Una vez seleccionada la especie, se procedió a la colecta del material vegetal fresco (partes aéreas) en el camino de Tuxtla Gutiérrez a Ocosocuaula, Chiapas; en Septiembre del 2001. El material vegetal se colectó en una cantidad suficiente para preparar los extractos y realizar el estudio fitoquímico biodirigido. Un ejemplar se depositó en el herbario del IMSSM con el número de vaucher 13073, la identificación fue realizada por el grupo de la M. en C. Abigail Aguilar.

V.3.- Preparación de Extractos

Habiéndose colectada la planta, se procedió a limpiarlo y posteriormente se secaron las partes aéreas (flores, fruto, hojas, ramas y tallo) a temperatura ambiente y a 37% de humedad, bajo corriente de aire y protegiendo el vegetal de la acción directa de la luz solar. El material vegetal seco se fragmentó en un molino de cuchillas (modelo Tor Rey M-12) y se procedió a preparar cada uno de los extracto por vía maceración utilizando n-hexano y MeOH grado RA (Mallinckrodt) a temperatura ambiente, por periodos de una semana cada uno. El extracto hexánico se preparó a partir de 550.0 g de material vegetal y el metanólico se preparó con 275.0 g. Cada extracto se filtró y se eliminó el disolvente a presión reducida (335 mm Hg para el n-hexano y 337 mm Hg para el MeOH) en un rotavapor (Buchi 461 Water Bath acoplado a una bomba de vacío marca Buchi) a 40 °C. Este proceso permitió obtener los extractos crudos cuyos rendimientos se registraron con respecto al peso seco del material vegetal y cada uno fue sometido a evaluación biológica contra *M. tuberculosis* H₃₇Rv.

V.4.- Actividad antimicobacteriana por el método radiorespirométrico automatizado (BACTEC TB-460)

El método utilizado en este estudio, se basó en la metodología citada en la literatura.^[140,141] Este ensayo es ampliamente utilizado para determinar la actividad antimicobacteriana de sustancias de origen sintético o natural y es considerado como estándar de oro por la FDA para la búsqueda de compuestos con dicha actividad biológica.

La determinación por este método fue realizada de la siguiente manera: Se utilizaron frascos con 4 mL de medio líquido Middlebrook 7H9 (Becton Dickinson), el cual contiene un sustrato (ácido palmítico) marcado isotópicamente con ¹⁴C como fuente de carbono. Durante el crecimiento de la micobacteria, el ácido palmítico es metabolizado liberando ¹⁴CO₂ en la atmósfera por encima del medio líquido de la cámara cerrada, este es cuantificado diariamente en el equipo Bactec-460 automatizado (Becton Dickinson Diagnostic Instrument System John-Stan Laboratories, Towson, MD). El valor de ¹⁴CO₂ es proporcional a la cantidad de microorganismo presente en el medio y se registra como Índice de Crecimiento (IC) de la micobacteria en una escala de cero a 999. Los ensayos biológicos se realizaron por triplicado.

V.4.1.- Preparación de muestras

De cada muestra problema se toman 4 mg y se solubilizan en 1 mL de DMSO (4 mg/mL); de esta solución patrón se realizaron diluciones 1:2 (2 mg/mL), 1:4 (1 mg/mL) en DMSO; cada muestra se esterilizó por filtración empleando una membrana estéril de 0.22 µm de diámetro (Millex-FG, Millipore, Bedford, MA) y se guardaron en tubos Ependorff a temperatura de -70 °C hasta ser utilizados. De la solución patrón (4 mg/mL) y de las diluciones se tomaron 100 µL y por separado se adicionaron a 4 mL de medio 7H9 (Bactec 12B) obteniéndose así concentraciones finales en los viales de ensayo de 100, 50 y 25 µg/mL.

V.4.2.- Preparación del inóculo

El microorganismo empleado en este ensayo fue la cepa *M. tuberculosis* H₃₇Rv (ATCC 27294), previamente cultivado en el medio Middlebrook 7H9 (Bactec 12B), hasta obtener

un IC de 999, este se tomó como cultivo patrón. De esta suspensión se tomaron 100 µL y fueron adicionados a los 4 mL de medio 7H9 previamente inoculados con muestra problema, control de disolvente y/o fármaco de referencia (R 0.25 µg/mL). Una vez inoculados los viales con muestra problema y microorganismo, estos se incubaron a 37 °C, durante 7 ó 10 días hasta que el cultivo control alcanzó un IC de 999. Las lecturas del IC se realizan diariamente después del 3^{er} día de incubación. Cabe mencionar, que sí el control no alcanza el valor de IC = 999, el estudio se finaliza hasta el décimo día.

Se consideraron activas aquellas muestras que presentaron un porcentaje de inhibición de 99.9, sobre el crecimiento de *M. tuberculosis* H₃₇Rv a la concentración de 100 µg/mL o menor (50 y/o 25 µg/mL). Los porcentajes de inhibición fueron calculados con la siguiente fórmula:

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

En el caso de compuestos puros se siguió la misma metodología previamente descrita, con la única diferencia que estos fueron evaluados a la concentración de 100 µg/mL.

Una vez obtenidos los resultados de las evaluaciones biológicas de los extractos hexánico y metanólico se procedió a realizar el fraccionamiento químico.

V.5.- Fraccionamiento químico biodirigido del extracto hexánico

El fraccionamiento de este extracto, se realizó empleando cromatografía de adsorción en columna abierta, empacada con 50.2 g de gel de sílice (Silica gel 60, marca Merck malla 0.063-0-200 mm.) y como fase móvil, mezclas de disolventes con polaridad creciente. En la columna se aplicaron 5.0 g del extracto previamente solubilizado en una mezcla MeOH-CHCl₃ (1:1) y absorbidos en sílica gel (5.0 g). Este proceso permitió obtener un total de 32 fracciones de 100 mL cada uno, con diferente grado de polaridad. Las fracciones se concentraron a presión reducida y posteriormente se agruparon de acuerdo a la similitud que presentaban sus constituyentes en la CCF, al utilizar placas de aluminio recubiertas de gel

de sílice (Kieselgel 60 F₂₅₄, Merck); este último proceso permitió obtener 10 grupos de fracciones, F1-F10 (Diagrama 1). El peso de las fracciones reunidas y rendimientos de cada uno se describen en la Tabla 4.

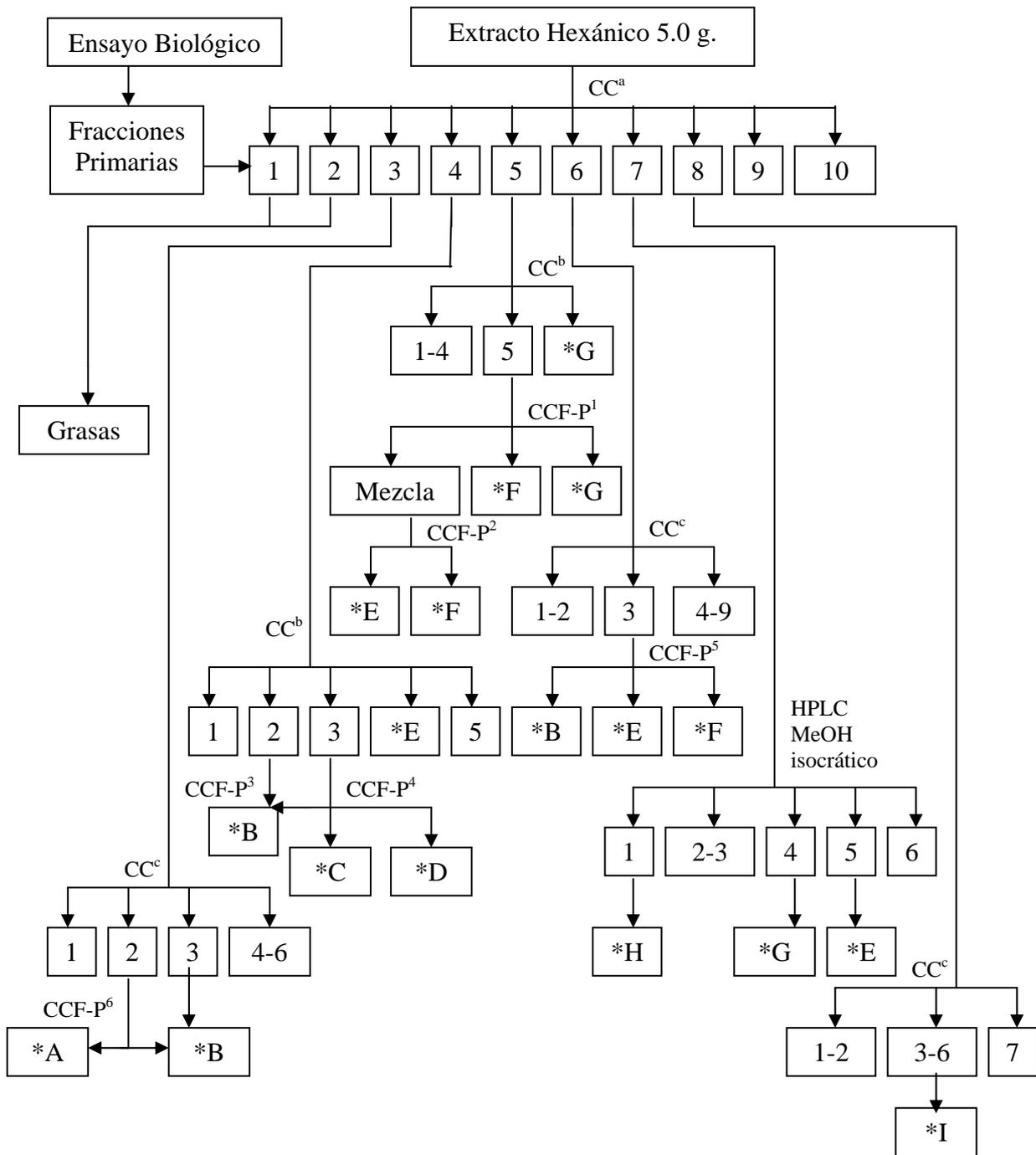
Las placas CCF se revelaron con ácido sulfúrico al 10% o con vainillina/EtOH al 1% y H₂SO₄/EtOH al 5% y posterior calentamiento. Cada grupo de fracciones primarias fue sometido a evaluación biológica, por el método radiorespirométrico. Cada ensayo se realizó por triplicado y se empleó como microorganismo de prueba *M. tuberculosis* H₃₇Rv. Los resultados de la evaluación antimicobacteriana demostraron que la actividad se concentraba en las fracciones F4-F8; por lo que estas fracciones primarias fueron objeto de un segundo fraccionamiento.

Tabla 4. Fraccionamiento primario del extracto hexánico de *C. houstoniana*.

Sistema de Elución	Fracc. Colectadas	Clave	Peso (mg)	Rendimiento (%)*
n-Hex (100 %)	1	F1	294.0	5.88
n-Hex-CHCl ₃ (8:2)	2 – 4	F2	1163.2	23.26
n-Hex-CHCl ₃ (8:2)	5 – 6	F3	366.1	7.32
n-Hex-CHCl ₃ (8:2)	7 – 8	F4	259.2	5.18
n-Hex-CHCl ₃ (8:2)	9 – 12	F5	315.0	6.3
n-Hex-CHCl ₃ (8:2)	13 – 15	F6	220.7	4.41
n-Hex-CHCl ₃ (8:2)	16 - 24	F7	669.8	13.39
n-Hex-CHCl ₃ (1:1)	25 – 27			
CHCl ₃ (100 %)	28 – 29	F8	352.0	7.04
CHCl ₃ (100 %)	30	F9	1203.4	24.06
CHCl ₃ -MeOH (1:1)	31 – 32	F10	236.6	4.73

* Rendimiento expresado respecto al extracto crudo

Diagrama 1. Fraccionamiento químico general del extracto hexánico de *C. houstoniana*.



***Compuestos aislados.** A: Acetato de β -amirina ($R_f=0.63$), B: Óxido de cariofileno ($R_f=0.55$), C: Mezcla de Ceras ($R_f=0.53$), D: Mezcla de α y β -amirina ($R_f=0.42$), E: β -amirina ($R_f=0.39$), F: Estigmasterol ($R_f=0.37$), G: β -sitosterol ($R_f=0.33$), H: Partenólida ($R_f=0.24$), I: Ácido ursólico ($R_f=0.22$).

R_f . Sistema de elución utilizado: n-Hex-AcOEt (8:2).

CCF-P¹. n-Hex-AcOEt (85:15); **CCF-P²**. n-Hex-CHCl₃ (8:2), n-Hex-MeOH (95:5); **CCF-P³**. n-Hex-AcOEt (95:5); **CCF-P⁴**. n-Hex-AcOEt (95:5), CHCl₃ (100%); **CCF-P⁵**. n-Hex-AcOEt (95:5), (8:2); **CCF-P⁶**. n-Hex-AcOEt (8:2).

CC^a. n-Hex-CHCl₃-MeOH; **CC^b**. n-Hex-AcOEt; **CC^c**. n-Hex-CHCl₃.

V.6.- Fraccionamiento secundario de las fracciones más activas (F4-F8)

V.6.1.- Fracción F5

El fraccionamiento secundario de F5, se realizó en cromatografía de adsorción en columna abierta, empacada con 6.0 g de gel de sílice y como fase móvil se emplearon diferentes sistemas de elución con polaridad creciente, obteniéndose un total de 19 fracciones de 15 mL cada una (Tabla 5). En esta columna se aplicaron 279.4 mg. Las fracciones obtenidas se agruparon en 6 grupos de la F5/1-F5/6 (Diagrama 1), los rendimientos se describen en la Tabla 5.

Tabla 5. Fraccionamiento secundario de la F5

Sistema de Elución	Fracc. Colectadas	Clave	Peso (mg)	Rendimiento (%)*
n-Hex (100 %)	1	F5/1	8.0	2.86
n-Hex-AcOEt (95:5)	2 – 3			
n-Hex-AcOEt (95:5)	4 – 6	F5/2	106.1	37.97
n-Hex-AcOEt (95:5)	7	F5/3	32.8	11.73
n-Hex-AcOEt (95:5)	8	F5/4	23.4	8.37
n-Hex-AcOEt (95:5)	9 - 13	F5/5	47.2	16.89
n-Hex-AcOEt (95:5) n-Hex-AcOEt (95:5)	14 - 17 18 - 19	F5/6	7.4	2.64

* Rendimiento expresado respecto al extracto crudo

En la fracción secundaria F5/5 se detectó la presencia de tres compuestos mayoritarios, los cuales fueron separados por CCF tipo preparativa, para ello se utilizaron 4 placas de 20 x 20 cm (sílice gel F₂₅₄, Merck) y como sistema de elución n-Hex-AcOEt (85:15), se hace mención que se eluyeron dos veces. De estas placas se obtuvieron 3 compuestos de interés que se procedieron a separar y purificar con CHCl₃. El disolvente fue eliminado a presión reducida, mediante este proceso se obtuvieron 16.5 mg de una mezcla (β -amirina y estigmasterol), 5.9 mg de estigmasterol y 6.1 mg de β -sitosterol, como se indica en el Diagrama 1. Los R_f de cada compuesto se describen en el anexo I.

La mezcla de β -amirina y estigmasterol fue sometida a CCF tipo preparativa de 20 x 20 cm (sílice gel F₂₅₄, Merck), para ello se utilizaron 2 placas y se emplearon dos sistemas de elución, primero n-Hex-CHCl₃ (8:2) y después se eluyó con n-Hex-MeOH (95:5), con la finalidad de purificarlo. Mediante este proceso se obtuvo 4.5 mg β -amirina y 7.4 mg de estigmasterol (Diagrama 1). Los R_f se describen en el anexo I.

V.6.2.- Fracción F4

El fraccionamiento secundario de F4, se realizó en cromatografía de adsorción en columna abierta, empacada con 6.0 g de gel de sílice y como fase móvil se emplearon diferentes sistemas de elución con polaridad creciente, obteniéndose un total de 40 fracciones de 20 mL cada una (Tabla 6). En esta columna se aplicaron 198.1 mg de muestra, las fracciones obtenidas se agruparon en 5 grupos de F4/1-F4/5 (Diagrama 1) y los rendimientos se describen en la Tabla 6.

Tabla 6. Fraccionamiento secundario de la F4

Sistema de Elución	Fracc. Colectadas	Clave	Peso (mg)	Rendimiento (%)*
n-Hex (100 %)	1 - 8	F4/1	1.6	0.80
n-Hex-AcOEt (95:5)	9 - 10	F4/2	34.1	17.21
n-Hex-AcOEt (95:5)	11 - 16	F4/3	87.4	44.11
n-Hex-AcOEt (95:5)	17 - 31	F4/4	48.4	24.43
n-Hex-AcOEt (95:5) n-Hex-AcOEt (1:1)	32 - 37 38 - 40	F4/5	17.1	8.63

* Rendimiento expresado respecto al extracto crudo

En la fracción secundaria F4/2 esta presente el óxido de cariofileno que fue purificado mediante CCF tipo preparativa; para lo cual se utilizaron 2 placas de 20 x 20 cm (sílice gel F₂₅₄, Merck) y como sistema de elución n-Hex-AcOEt (95:5), este proceso permitió obtener 7.2 mg con R_f de 0.55. Además, en la fracción F4/3 se detectó la presencia de tres compuestos, los cuales fueron purificados mediante CCF tipo preparativa; empleando 2 placas de 20 x 20 cm (sílice gel F₂₅₄, Merck) utilizando dos sistemas de elución, primero se

empleo n-Hex-AcOEt (95:5) y después esta misma placa se eluyó con CHCl_3 (100 %). Mediante este proceso se obtuvieron 4.5 mg de óxido de cariofileno, 5.5 mg de una mezcla de tres ceras y 55.4 mg de la mezcla de α y β -amirina (Diagrama 1). Los R_f de cada compuesto se describen en el anexo I.

V.6.3.- Fracción F6

169.6 mg de la fracción F6 fue objeto de cromatografía de adsorción en columna abierta, empacada con 5.1 g de gel de sílice y como fase móvil mezclas de eluyente de polaridad creciente, obteniéndose un total de 66 fracciones de 20 mL cada una (Tabla 7). Las fracciones obtenidas se agruparon en 9 grupos F6/1-F6/9 (Diagrama 1) de acuerdo a su similitud cromatográfica. Los rendimientos se describen en la Tabla 7.

Tabla 7. Fraccionamiento secundario de la F6

Sistema de Elución	Fracc. Colectadas	Clave	Peso (mg)	Rendimiento (%)*
n-Hex (100 %)	1 - 13	F6/1	3.1	1.82
n-Hex-CHCl ₃ (95:5)	14 - 23			
n-Hex-CHCl ₃ (9:1)	24 - 37			
n-Hex-CHCl ₃ (75:25)	38 - 40	F6/2	1.8	1.65
n-Hex-CHCl ₃ (75:25)	41 - 46	F6/3	87.6	51.65
n-Hex-CHCl ₃ (75:25)	47 - 48	F6/4	16.1	9.49
n-Hex-CHCl ₃ (6:4)	49 - 50			
n-Hex-CHCl ₃ (6:4)	51 - 53	F6/5	3.0	1.76
n-Hex-CHCl ₃ (1:1)	54 - 57			
n-Hex-CHCl ₃ (1:1)	58	F6/6	2.8	1.65
n-Hex-CHCl ₃ (25:75)	59 - 60			
n-Hex-CHCl ₃ (25:75)	61 - 62	F6/7	4.2	2.47
CHCl ₃ (100 %)	63			
CHCl ₃ (100 %)	64	F6/8	2.4	1.41
CHCl ₃ (100 %)	65 - 66	F6/9	3.6	2.12

* Rendimiento expresado respecto al extracto crudo

En la fracción secundaria F6/3 se detectó la presencia de tres compuestos mayoritarios, los cuales fueron separados por CCF tipo preparativa, por ello se utilizaron 2 placas de 20 x 20 cm (sílice gel F₂₅₄, Merck) utilizando dos sistemas de elución n-Hex-AcOEt (95:5 y 8:2). De estas placas se obtuvieron 3 compuestos de interés que se procedieron a separar y purificar con CHCl₃. El disolvente fue eliminado por presión reducida. Mediante este proceso se obtuvieron 12.3 mg de óxido de cariofileno ($R_f=0.55$), 13.0 mg de β -amirina ($R_f=0.39$) y 4.0 mg de estigmasterol ($R_f=0.37$), ver Diagrama 1.

V.6.4.- Fracción F7

En la fracción primaria F7 (activa) se detectó la presencia de una lactona sesquiterpénica al realizarle CCF y revelarlo con la mezcla de vainillina/EtOH al 1% y H₂SO₄/EtOH al 5%, por lo que se procedió a analizar la muestra por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC). Para ello se utilizó una columna semipreparativa fase reversa Spherisorh S10 ODS2 marca Water (10 X 250 mm) y como sistema de elución MeOH grado HPLC (J. T. Baker). Las condiciones de elución fue isocrático, variando mínimamente el flujo de 0.4 a 0.8 mL/min (ver Tabla 8), el tiempo de corrida fue de 60 minutos. La muestra a analizar se preparó a una concentración de 10 mg/mL en MeOH (grado HPLC, J. T. Baker) y de esta solución se realizaron inyecciones de 50 µL previamente filtrados en una precolumna Adsorbex RP 18 100MG (Merck). Bajo estas condiciones de trabajo se obtuvo un cromatograma con seis picos cuyos Tiempos de Retención (T_R) fueron de 3.63, 16.96, 21.29, 24.60, 29.28 y 37.00 minutos (cromatograma 5), posteriormente se realizaron inyecciones consecutivas para coleccionar picos por separado. Cada pico se concentró a presión reducida y se agruparon de acuerdo a la similitud que presentaban sus constituyentes en la CCF, al utilizar placas de aluminio recubiertas de gel de sílice (kieselgel 60 F₂₅₄, Merck), las placas se revelaron con vainillina/EtOH al 1% y H₂SO₄/EtOH al 5%; este último proceso permitió obtener seis grupos de fracciones FA'-FD, cabe mencionar que los picos con T_R 29.28 y 37.00 presentan el mismo perfil en CCF de unos compuestos ya obtenidos. El peso de las fracciones reunidas y el rendimiento de cada una se describen en la Tabla 9.

Minutos	% MeOH	Flujo (mL/min)
4	100	0.4
6	100	0.2
15	100	0.2
20	100	0.8

Tabla 9. Fraccionamiento secundario por HPLC de la F7

Tiempos de Retención	Fracc. Colectadas	Clave	Peso (mg)	Rendimiento (%)*
3.96	A'	FA'	11.2	11.2
12.49	A''	FA''	3.7	3.7
16.44	A'''	FA'''	3.0	3.0
21.51	B	FB	2.8	2.8
24.87	C	FC	3.0	3.0
29.62	D	FD	2.4	2.4

* Rendimiento expresado respecto al extracto crudo

En los picos de T_R de 3.63, 21.29 y 24.60 minutos, se detectó la presencia de tres compuestos mayoritarios, cuyos R_f fueron de 0.28, 0.33 y 0.39 respectivamente en CCF, en el sistema de elución n-Hex-AcOEt (8:2). El primer pico FA' (T_R 3.96) corresponde a la partenólida, el segundo pico FB (T_R 21.29) correspondió al β -sitosterol y el tercer pico FC (T_R 24.60) correspondió a la β -amirina. El resto de los picos presentes en esta muestra faltan por caracterizar.

V.6.5.- Fracción F8

290.0 mg de la fracción F8 fue objeto de cromatografía de adsorción en columna abierta, empacada con 8.7 g de gel de sílice y como fase móvil se emplearon diferentes sistemas de elución con polaridad creciente, obteniéndose un total de 47 fracciones de 25 mL cada una (Tabla 10). Las fracciones obtenidas se agruparon en 7 grupos de F8/1-F8/7 (Diagrama 1). La fracción F8/3-F8/6 fue objeto de un análisis de CG-EM (cromatograma 6) en donde se observa la presencia de un compuesto mayoritario que correspondió al ácido ursólico con R_f de 0.22 (ver anexo I).

Tabla 10. Fraccionamiento secundario de la F8

Sistema de Elución	Fracc. Colectadas	Clave	Peso (mg)	Rendimiento (%)*
n-Hex (100 %)	1 - 6	F8/1	9.6	3.31
n-Hex-CHCl ₃ (9:1)	7 - 10			
n-Hex-CHCl ₃ (75:25)	11 - 16			
n-Hex-CHCl ₃ (1:1)	17 - 26			
n-Hex-CHCl ₃ (25:75)	27 - 29			
n-Hex-CHCl ₃ (25:75)	30	F8/2	12.4	4.27
n-Hex-CHCl ₃ (25:75)	31	F8/3	30.6	10.55
n-Hex-CHCl ₃ (25:75)	32	F8/4	28.9	9.96
n-Hex-CHCl ₃ (25:75)	33 - 39	F8/5	98.2	33.86
n-Hex-CHCl ₃ (25:75) CHCl ₃ (100 %)	40 - 43 44 - 45	F8/6	18.7	6.44
CHCl ₃ (100 %)	46 - 47	F8/7	44.6	15.37

* Rendimiento expresado respecto al extracto crudo

V.6.6.-Fracción primaria F3

En la fracción primaria F3, se detectó la presencia de dos compuestos que fueron purificados por CC y CCF tipo preparativa, obteniendo de manera adicional 7.8 mg del óxido de cariofileno y 10.0 mg del acetato de β -amirina, cuyos R_f fueron de 0.55 y 0.63, respectivamente en el sistema de elución de n-Hex-AcOEt (8:2). Ambos compuestos fueron evaluados contra *M. tuberculosis*.

V.7.- Fraccionamiento del extracto metanólico de *C. houstoniana*

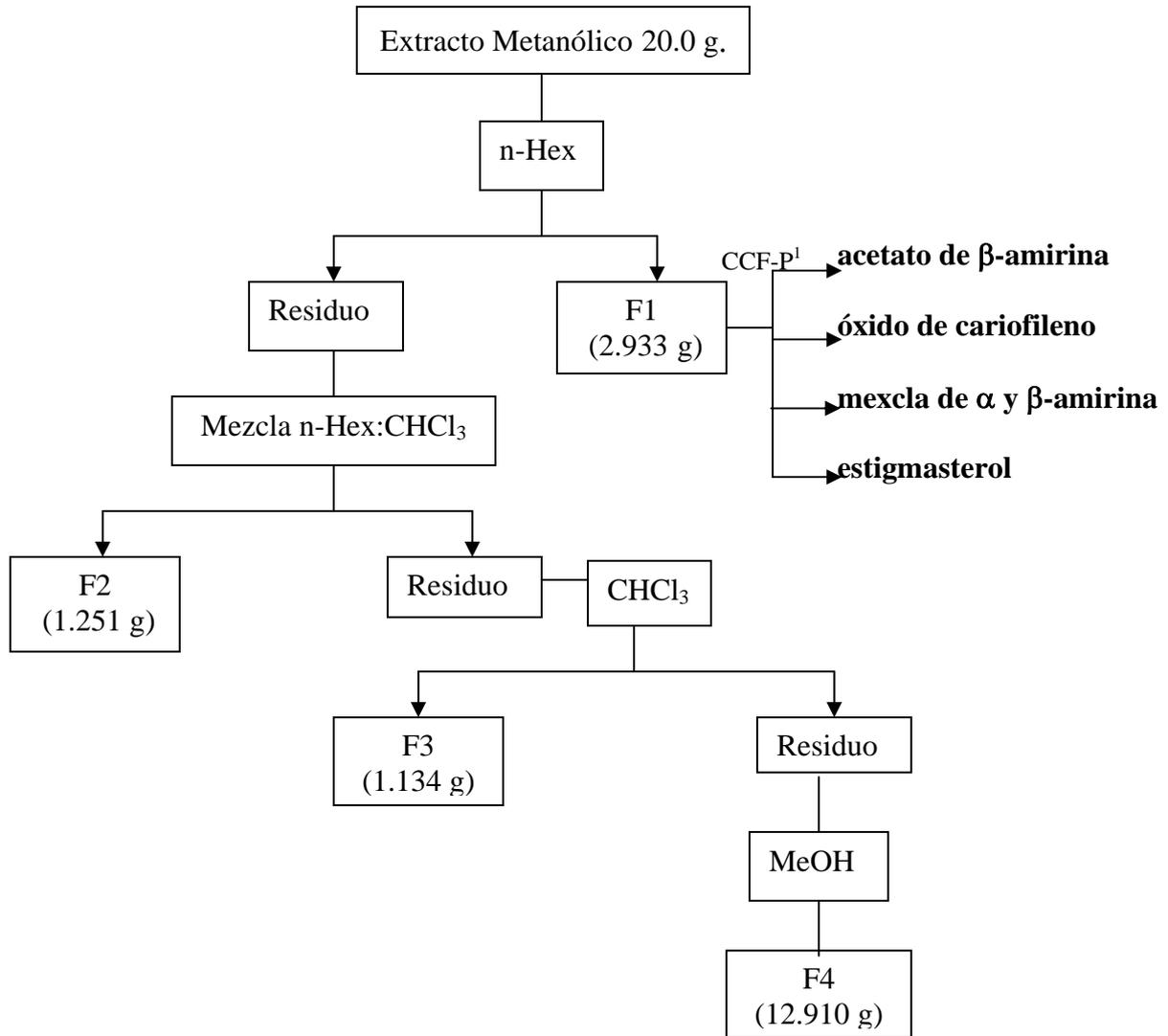
El extracto fue objeto de lavados sucesivos con disolventes de polaridad creciente; n-Hex, mezcla de n-Hex:CHCl₃, CHCl₃ y MeOH (Tabla 11). Para esto se utilizó 20.0 g del extracto y el disolvente a utilizar, esta mezcla se mantuvo en agitación por un tiempo de 30 minutos, enseguida se filtra el lavado (utilizando vacío), este filtrado se concentra a presión reducida y así se realizó sucesivamente con cada polaridad; las fracciones fueron agrupadas de acuerdo a la similitud que presentaban en la CCF al ser revelados con ácido sulfúrico al 10%. Este proceso permitió obtener 4 grupos de F1-F4 (Diagrama 2).

Tabla 11. Fraccionamiento del extracto metanólico de *C. houstoniana*

Sistema de Elución	Fracc. Colectadas	Clave	Peso (mg)	Rendimiento (%)*
n-Hex	1	F1	2933.4	14.50
n-Hex:CHCl ₃	2	F2	1251.7	6.18
CHCl ₃	3	F3	1134.9	5.60
MeOH	4	F4	12910.4	73.70

* Rendimiento expresado respecto al extracto crudo

Diagrama 2. Fraccionamiento del extracto metanólico *C. houstoniana*.



***Compuestos aislados.** A: Acetato de β -amirina ($R_f=0.63$), B: Óxido de cariofileno ($R_f=0.55$), D: Mezcla de α y β -amirina ($R_f=0.42$), F: Estigmasterol ($R_f=0.37$).

R_f . Sistema de elución utilizado: n-Hex-AcOEt (8:2).

CCF-P¹. n-Hex (100%), n-Hex-AcOEt (95:5).

V.7.1.- Fracción F1

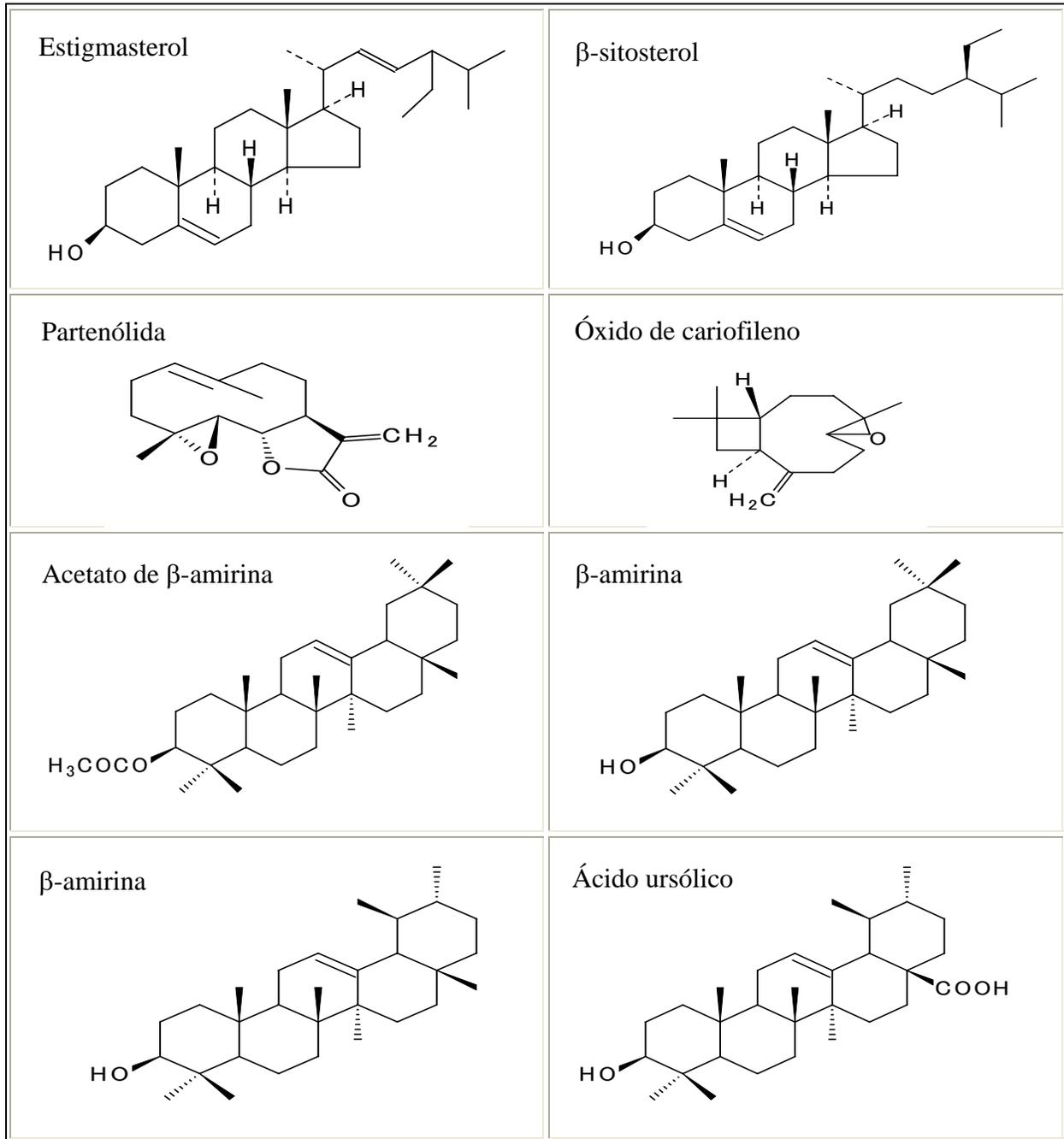
En la fracción F1, se detectó la presencia de cuatro compuestos que fueron purificados por CCF tipo preparativa obteniéndose 1.5 mg del acetato de β -amirina, 1.8 de óxido de cariofileno, 8.4 mg del estigmasterol y 13.4 mg de la mezcla de α y β -amirina (Diagrama 2), cuyos R_f fueron de 0.63, 0.55, 0.39 y 0.42 (Ver anexo I); estos compuestos fueron previamente aislados de las fracciones primarias del extracto hexánico.

V.7.2.- Fracciones F2 y F3

En las fracciones secundarias F2 y F3, se tiene la presencia de flavonas mismas que fueron detectados en CCF, eluidas con n-Hex-AcOEt (2:8) al ser revelados con ácido sulfúrico al 10%. Es por ello que estas fracciones fueron analizadas por HPLC utilizando una columna semipreparativa Spherisorb y como sistema de elución CH_3CN :Ác. formico al 5% (43:57) con flujo de 2 mL/min. Las condiciones analíticas no son las idóneas por lo que se realizaran pruebas adicionales para establecer las condiciones adecuadas (ver cromatograma 7).

VI.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

VI. 1.- Compuestos aislados del extracto hexánico de *C. houstoniana*



Estructura química de los compuestos aislados del extracto hexánico de *C. houstoniana*

Compuestos aislados del extracto hexánico de *C. houstoniana* probados en ensayo biológico.

Fracción	Compuesto Aislado	R _f ^a	Concentración (µg/mL)	% de Inhibición contra <i>M. tuberculosis</i> H ₃₇ Rv*
F3/2	Acetato de β-amirina	0.63	100	42.9
F3/3, F4/2, F4-3, F5, F6-3	Óxido de cariofileno	0.55	100	0.0
F3/2, F4/3	Por caracterizar (ceras: C ₂₄ , C ₂₆ y C ₂₈)	0.53	100	42.55
F4/3, F5	α y β-amirina (Mezcla)	0.42	100	41.2
F5/5, F6/3, F7C	β-amirina	0.39	100	36.9
F5/5, F6/3	Estigmasterol	0.37	100	51.7
F5/5, F6/3, F7B	β-sitosterol	0.33	100	4.92
F7A'	Partenólida	0.28	100	98.57
F8	Ácido ursólico	0.22	100	99.6

*Evaluación realizada por el método radiorespirométrico Bactec TB-460; ^aLos valores de R_f se calcularon empleando como sistema de elución n-Hex-AcOEt (8:2).

En la actualidad la TB es un problema grave de salud a nivel mundial y en México no es la excepción, siendo uno de los trece países con mayor incidencia.^[3,13,41] A nivel nacional se reportan aproximadamente 16,000 casos anuales y los estados con mayor incidencia son: Veracruz, Chiapas, Estado de México, Distrito Federal, con 16.0 casos por cada 100,000 habitantes.^[36] En la clínica se cuenta con fármacos antifímicos de primera y segunda línea; sin embargo, los efectos secundarios que ocasionan son severos y en muchas ocasiones son la causa de abandono del tratamiento. Por otro lado, la aparición y/o presencia de cepas de *M. tuberculosis* MDR es más frecuente lo que hace que cada vez sea más difícil de tratar y en ocasiones es provocada por diferentes cepas de micobacterias, como *M. avium*, *M. kansasii*, *M. leprae*, *M. bovis*, entre otras.^[50-51] Tomando en cuenta el grave problema que representa la TB y la pobre eficacia de los antifímicos existentes, diversos grupos de investigación incluyendo el nuestro, están enfocados en la búsqueda de fuentes alternas de compuestos activos contra cepas de micobacterias, principalmente con *M. tuberculosis*. En la Unidad de Investigación Médica en Farmacología de Productos Naturales del Hospital de Pediatría, se está desarrollando una línea de investigación permanente, encaminada a explorar el potencial antimicobacteriano de plantas medicinales de México. Como primer paso fue seleccionar las especies vegetales que se utilizan en la medicina tradicional de México para tratar la TB y/o síntomas relacionados con la enfermedad, posteriormente coleccionar las especies vegetales, se prepararon los extractos (hexánico y metanólicos) y se realizó la evaluación antimicobacteriana; dentro de las especies seleccionadas esta *C. houstoniana*.^[142]

C. houstoniana, es una especie utilizada en la medicina tradicional de nuestro país (Chiapas, Sinaloa, Chihuahua, Tabasco, Veracruz, Morelos, Valle de México, Oaxaca, Guanajuato, Hidalgo, Puebla, San Luis Potosí), para el tratamiento de tos, tos seca, pulmonía y problemas gastrointestinales.^[129-131]

VI.2.- Preparación de los extractos de *C. houstoniana*.

Los extractos hexánico y metanólico, se prepararon vía maceración, obteniéndose 9.20 g del hexánico (1.67%) y 53.20 g del metanólico (19.75%) (ver Tabla 12).

Tabla 12. Cantidad y rendimiento de cada extracto.

Muestra	Material Vegetal, seco y molido (g)	Peso de Extracto (g)	Rendimiento (%)*
Extracto n-hexano	550.0	9.2	1.67
Extracto MeOH	275.0	53.2	19.75

*El rendimiento se expresa respecto al peso de vegetal seco

VI.3.- Actividad antimicobacteriana de *C. houstoniana*.

Uno de los modelos biológicos más utilizados para la evaluación de la actividad antimicobacteriana de compuestos de origen natural, es el método radiorespirométrico Bactec TB-460.^[140] Existen otros ensayos que son menos utilizados, por ejemplo: el método de proporciones en agar,^[67,98] el método de difusión en disco,^[50,83] el microdilución y el método de agar en placa^[74,69] y el micrométodo colorimétrico de alamar azul “MABA”^[73,107].

Con el método radiorespirométrico se obtienen resultados confiables, reproducibles y es considerado por la FDA como estándar de oro para la búsqueda de agentes antimicobacterianos.^[140-141] Este ensayo ha sido utilizado para evaluar diversos extractos y/o compuestos aislados de diferentes especies medicinales, estos compuestos son responsables de inhibir el crecimiento de *M. tuberculosis* y otras cepas de micobacterias (*M. avium*, *M. smegmatis*, *M. bovis*, *M. kansasii*, *M. marinum*, *M. xenophii*).

En la relación presentada anteriormente de CMI (pag. 21), se describe la actividad de algunos extractos así como los compuestos aislados de estas especies vegetales. Por ejemplo, el extracto MeOH de *Melia volkensii* presentó una CMI de 100 µg/mL, y de éste extracto se aislaron el 6β-hidroxiculactona, 12β-hidroxiculactona, kulanato cuyas CMI's, fueron de 4, 16 y 16 µg/mL, respectivamente.^[92] Otras especies que resultaron muy activas contra *M. tuberculosis* fueron *Magnolia grandiflora* (extracto EtOH)^[75] y *Aspidorpema quebracho-blanco* (extracto MeOH:CH₂Cl₂),^[78] de donde se aislaron la partenólida (lactona sesquitépénica) y el ácido ursólico (triterpeno) cuyas CMI's fueron de 16 µg/mL y 32 µM respectivamente. Otras especies activas son: *Heisteria acuminata* (CMI=10 µg/mL), *Nectandra hihua* (CMI=10 µg/mL), *Senna oblicua* (CMI=10 µg/mL), *S. silvestris* (CMI=6.25 µg/mL) y *Somera sabiceoides* (CMI=6.25 µg/mL), cabe mencionar que de estas

últimas especies evaluadas no se informa de los compuestos responsables de la actividad biológica.^[108]

Otros de los ensayos recientemente utilizados, es el Método Colorimétrico Alamar Azul (MABA), mediante dicho ensayo se han evaluado numerosos extractos, entre los que se pueden mencionar la actividad del ácido 3 epi-ursólico y el ácido 3 epi-oleanólico que resultaron activas contra *M. tuberculosis*, y cuyas CMI's fueron de 4 y 16 µg/mL, respectivamente y fueron aislados de *Calceolaria pinnifolia*.^[73] Otras especies que resultaron activas son: *Physalis angulata* (extracto CHCl₃)^[104] y *Sapium indicum* (extracto n-hexano),^[107] de donde se aislaron la fisalina D (CMI=32.0) y sapintoxina A (CMI=3.12). De *Ruprechtia triflora* (extracto MeOH:CH₂Cl₂) se aislaron varios esteroides como: 5α,8α-epideioxiergost-6,22-dien-3β-ol, 5α,8α-epideioxistigmast-6,22-dien-3β-ol y estigamst-4-en-6β,ol-3-ona, cuyas CMI's contra *M. tuberculosis* H₃₇Rv fue de 2 µg/mL para los tres compuestos.^[73] Por este mismo ensayo, se da a conocer la actividad del extracto hexánico de *C. houstoniana* (partes aéreas) cuya CMI fue 200 µg/mL, además de la evaluación de 40 especies medicinales de México que se utilizan para tratar la TB o síntomas relacionados con dicho padecimiento.^[142]

Los resultados de la evaluación antimicobacteriana del extracto hexánico a 100 µg/mL sobre *M. tuberculosis* H₃₇Rv presentó un 94.72% de inhibición y el extracto metanólico no afectó el crecimiento de la micobacteria a esta misma concentración (Tabla 13), al ser evaluados por el método radiorespirométrico.

El presente trabajo es uno de los primeros donde se informa el efecto antimicobacteriano de los extractos hexánico y metanólico de *C. houstoniana*. En la literatura se indican los porcentajes de inhibición del extracto CH₂Cl₂ de *C. angustifolia* (tronco) inhibe en un porcentaje menor al 50% el crecimiento de *M. tuberculosis* a 50 µg/mL.^[108] Además, se informa que los extractos de CH₂Cl₂ de *Cynometra bauhinifolia* (corteza), *Senna silvestris* (corteza) y *S. obliqua* (tronco y fruto) presentan el 88, 94 y 90% de inhibición respectivamente, al ser evaluados a la concentración de 50 µg/mL empleando el método radiorespirométrico Bactec 460.^[142]

Otras actividades biológicas que se han descrito para el género *Calliandra*, es la actividad insecticida,^[119-120] antimicrobiana,^[126,138] anticonvulsivante,^[135-136] antiparasitaria^[131] y efecto sedativo sobre el sistema nervioso.^[131] Desde el punto de vista químico en el género *Calliandra*, solamente se ha descrito la presencia de derivados del ácido piperólico aislados de los extractos EtOH de partes aéreas de la planta.^[115-118,121]

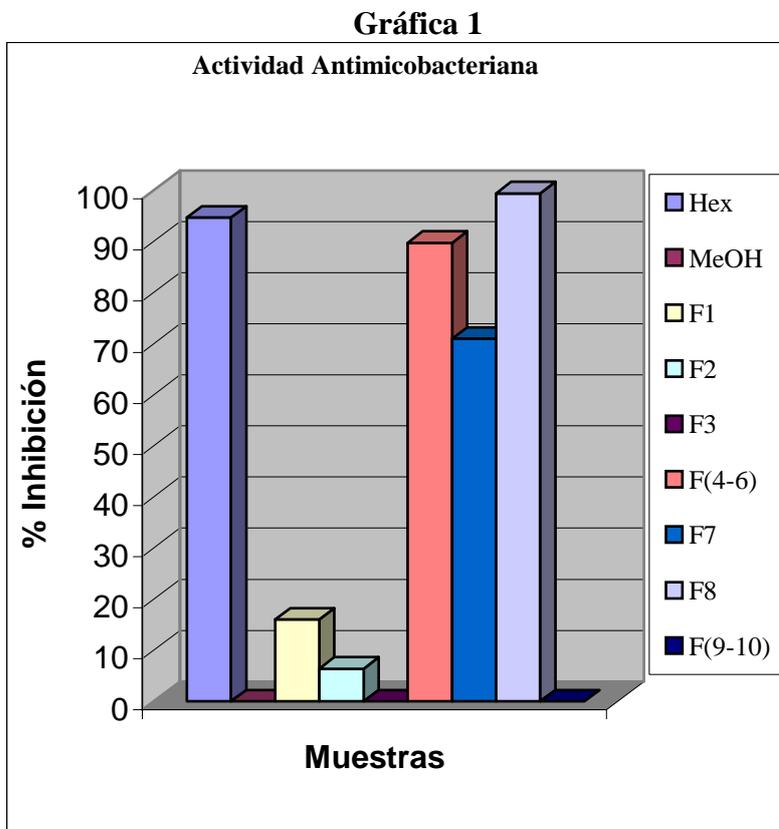
En el presente estudio se realizaron pruebas de CCF para detectar la presencia de derivados del ácido piperólico, esta búsqueda se realizó en las fracciones más polares de los extractos metanólico y hexánico usando como sistema de elución CHCl₃-MeOH (1:1) y como agente revelador Ninindrina;^[118,121] sin embargo, en las placas realizadas no se detectó la presencia de éste tipo de compuesto.

VI.4.- Fraccionamiento químico biodirigido del extracto activo y los componentes en las diferentes fracciones

Este proceso se realizó por CC de fase normal, mediante el cual se obtuvieron 10 grupos de fracciones primarias, mismas que fueron agrupadas de acuerdo a su perfil cromatográfico y sometidas a evaluación biológica a 100 µg/mL, por el método radiorespirométrico contra *M. tuberculosis* H₃₇Rv; encontrándose que las fracciones F4-F8 inhiben el crecimiento de la micobacteria. La fracción F8 inhibe en un 99.45% el crecimiento de *M. tuberculosis*, le sigue la fracción F4-6, inhibiendo en un 89.76% y la menos activa fue la fracción F7 presentando un 71.0% de inhibición (ver la Tabla 13 y Gráfica 1).

Tabla 13 y Gráfica 1. Resultados de la actividad antimicrobacteriana del extracto y fracciones primarias de *C. houstoniana* contra *M. tuberculosis* H₃₇Rv.

Tabla 13	
Muestra	% de inhibición [100 µg/mL]
Ext n-Hex	94.72
Ext. MeOH	0.0
F1	16.0
F2	6.4
F3	0.0
F(4-6)	89.76
F7	71.0
F8	99.45
F(9-10)	0.0



VI.5.- Aislamiento, caracterización y evaluación biológica de compuestos

Dada la actividad de la fracción F4-6 se procedió a separar los compuestos presentes en dichas fracciones por CC y CCF preparativa.

La fracción primaria F5 fue objeto de un análisis de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas CG-EM para conocer su perfil químico, en el cromatograma (1) se observa la presencia de óxido de cariofileno (PM 220) con T_R de 10.38 min, una mezcla de ceras con T_R de 14.63, 15.92, 17.59 y 19.95 min cuyos PM's son de 308 (C₂₂H₄₄), 336 (C₂₄H₄₈), 364 (C₂₆H₅₂), y 392 (C₂₈H₅₆), respectivamente; además, en el cromatograma se observa la presencia de estigmasterol (PM 412) con T_R de 23.42 min, β-sitosterol (PM 414) con T_R de 24.67 min y la mezcla de α y β-amirina (PM 426) con T_R 26.93 y 26.92 min. Con la finalidad de aislar estos compuestos se procedió a realizar un fraccionamiento secundario de donde se obtuvieron 6 grupos de fracciones (F5/1 a F5/6). En F5/5 se obtuvo la mezcla

de α y β -amirina ($R_f=0.39$), la mezcla de β -sitosterol ($R_f=0.33$) y estigmasterol ($R_f=0.37$); estos compuesto fueron identificados por CCF, empleando estándares de referencia (Sigma_Co). Los resultados de la evaluación biológica indicaron que los compuestos inhiben el crecimiento de *M. tuberculosis* H₃₇Rv; el β -sitosterol inhibe un 4.92%, la β -amirina en un 36.9%, el estigmasterol en un 51.7% y la mezcla de estos compuestos inhibió en un 74.3%; siendo los responsables de la actividad antimicobacteriana. La β -amirina y β -sitosterol, fueron previamente evaluados como agentes antimicobacterianos.*

De manera adicional, en las fracciones secundarias F5/3 y F5/4 se detectó la presencia de óxido de cariofileno, como compuesto mayoritario y una mezcla de tres ceras, los PM's fueron de 336 (C₂₄H₄₈), 364 (C₂₆H₅₂), y 392 (C₂₈H₅₆), esta mezcla de ceras es el componente principal de la fracción primaria F5. Los compuestos se identificaron mediante el análisis de sus EM (Cromatograma 2), los cuales presentaron el perfil típico para este tipo de compuestos.

Se continuó el fraccionamiento de la fracción primaria F4, en este proceso se obtuvieron 5 grupos de fracciones. De las fracciones secundarias F4/2 y F4/3 (cromatograma 3) se separaron tres compuestos mayoritarios por CCF de tipo preparativa, lográndose identificar dos de ellos; uno correspondió al óxido de cariofileno y el otro a la mezcla de α y β -amirina; que al evaluarlos contra *M. tuberculosis* (a la concentración 100 μ g/mL) se encontró que las mezcla de α y β -amirina inhibe un 41.2% el crecimiento de la micobacteria y el óxido de cariofileno resulto inactivo. En esta misma fracción está presente otro compuesto que no se pudo identificar estructuralmente por falta de muestra, ya que en el proceso de purificación se obtuvo únicamente 5.5 mg del compuesto;♦ resta por enriquecer este compuesto para proceder a su identificación química.

* Investigación realizada en la Unidad Médica en Farmacología de Productos Naturales, Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS, México; utilizando el método radiorespirométrico Bactec 460, compuestos obtendios de *Achillea millefolium* por Fernández V. J., (2001). Tesis de Maestría.^[143]

♦Este compuesto fue evaluado biológicamente por el método radiorespirométrico Bactec 460 y presentó un porcentaje de 41.9 de inhibición sobre el crecimiento de *M. tuberculosis* H₃₇Rv.

La fracción secundaria 4/3D fue objeto de análisis por CG-EM, en el cromatograma (4) se observó una mezcla de al menos seis compuestos, los cuales fueron identificados mediante el análisis de sus datos de EM. Los compuestos detectados se describen a continuación.

La fracción esta compuesta principalmente por una mezcla de ceras de diferente T_R (cromatograma 4), también se detectó la presencia del óxido de cariofileno con T_R de 9.45 min. El otro pico con T_R de 15.13 min presentó un PM de 336 que corresponde a una fórmula molecular (FM) de $C_{24}H_{48}$, el cual presenta el perfil de fragmentación típico para alquenos lineales, compuesto también detectado en la fracción F5/3 y F5/4. Los picos con T_R de 12.5, 14.1, 16.40, 18.13 y 24.6 min presentaron PM's de 280, 308, 364, 392 y 420, respectivamente y correspondieron a los compuestos con FM de $C_{20}H_{40}$, $C_{22}H_{44}$, $C_{26}H_{52}$, $C_{28}H_{56}$, $C_{30}H_{60}$, (cromatograma 4). Por último, los picos con T_R de 22.9 y 23.23 min, presentan un PM de 426, que al analizar el patrón de fragmentación se observó que presentan el perfil típico para los triterpenos y corresponde a β -amirina y α -amirina.^[144-145]

De manera adicional se realizó el fraccionamiento de la fracción primaria F6, mediante este proceso se obtuvieron 9 grupos de fracciones. En la fracción secundaria F6/3 se aislaron cantidades adicionales de óxido de cariofileno, β -amirina y estigmasterol mismos que previamente detectado en las fracciones F4 y F5 y también evaluados.

Respecto a las actividades biológicas descritas en la literatura científica para estos compuestos, podemos mencionar que el óxido de cariofileno 220.35 g/mol, es un sesquiterpeno aislado de numerosas especies medicinales^[147-150] y con diversas actividades biológicas entre ellas actividad antitumoral,^[148,151] antibacteriana,^[146-147,150] antifúngica,^[152] antiinflamatoria,^[153] antimalárica,^[154] antiprotozoaria^[155] y antiplasmódica.^[156]

Otro de los constituyentes aislados es el estigmasterol 414.0 g/mol, este es un esteroide y un constituyente común de diversas plantas.^[157-160] Dentro de las actividades biológicas reportadas para este compuesto son actividad antimicrobiana,^[161] antifúngica,^[161] analgésico,^[162] antiulcerogénica,^[162] hipoglucémica,^[162] inhibidor de la DNA polimerasa β -liasa,^[163] inhibidor de quimiocarcinogénesis,^[160] antiinflamatorio^[162,164] y antioxidante.^[165-167]

Otro de los constituyentes aislados es el β -sitosterol 414.72 g/mol, este compuesto es un esteroide y constituyente común de las plantas. Respecto a la actividad biológica presenta moderada actividad antitumoral,^[165] antifúngica,^[161] antimicrobiana,^[146,161,168] analgésico,^[162] antiinflamatorio,^[162] antiulcerogénica,^[162] hipoglucémico,^[162] inhibidor de la DNA polimerasa β -lasiada^[163] y como inhibidor de la elastasa de leucocitos humanos.^[169]

La α y β -amirina, son triterpenos presentes también en diferentes especies vegetales, se ha reportado que muestran diversas actividades biológicas; por ejemplo, α -amirina presenta actividad antimicrobiana,^[146,161] antifúngica,^[161] analgésica,^[162] antiinflamatorio,^[162,170] antiulcerogénico,^[162] hipoglucémico^[162] y, la β -amirina presenta actividad antiartrítica,^[171] antiinflamatorio,^[170] antimicrobiana,^[168,172,173] actividad citotóxica^[174] y como inhibidor de la elastasa de leucocitos humanos.^[169] La mezcla de α y β -amirina presenta actividad gastroprotectora.^[175]

Otra fracción que resultó activa fue F7, que al realizarle CCF se detectó la presencia de tres compuestos mayoritarios. Esta fracción se sometió a un análisis en HPLC; de donde se obtuvieron los compuestos con T_R 3.63, 21.29 y 24.60 minutos, las condiciones analíticas utilizadas se describen en la metodología. En el cromatograma (Cromatograma 5) se observa la presencia de tres picos mayoritarios que a continuación se describen:

El pico con T_R de 3.63 minutos correspondió a la partenólida que al ser evaluado contra *M. tuberculosis* H₃₇Rv presentó un 98.57% de inhibición a 100 μ g/mL, siendo este el compuesto responsable de la actividad biológica. Cabe mencionar que previamente se ha reportado la CMI (16.0 μ g/mL) para este compuesto al ser evaluado por el método radiorespirométrico Bactec 460, contra *M. tuberculosis* H₃₇Rv.^[75] El pico de T_R de 21.29 min correspondió a la β -amirina y el tercer pico de T_R de 24.60 min corresponde al β -sitosterol, compuestos que fueron obtenidos y evaluados en las fracciones anteriores. La partenólida se identificó por análisis de sus datos de RMN-¹H y de EM con lo previamente descrito (Espectro 1 y 2).

La partenólida 248.33 g/mol, es una lactona sesquiterpénica presente en varias especies vegetales^[75,176-178] y con diversas actividades biológicas presentando actividad antiinflamatoria,^[176-177,179-181] analgésica,^[179] inhibidor de la 5-hidroxytriptamina,^[182] anticancerígeno,^[75,183] herbicida,^[184] antifúngica y antibacteriana^[75] y antimigrañoso.^[75,185-186]

Otra fracción primaria que resultó activa fue F8, donde se aisló el ácido ursólico mediante un fraccionamiento secundario en CC-FN. El ácido ursólico se obtuvo de las fracciones secundarias F8/3 a F8/6, por análisis de CG-EM. En el cromatograma (cromatograma 6) se observó un solo pico con T_R 0.8 min y el EM registro un ión molecular de 456 que corresponde al ácido ursólico debido al patrón de fragmentación típico de triterpenos de tipo urseno (fragmentos de m/z 248, 203, 189 y 175);^[145] el fragmento de m/z de 203 se genera por una fragmentación Retro Diles Alder. Además se obtuvo el espectro de RMN-¹H (Espectro 3). Este compuesto inhibe en un 99.6% el crecimiento de *M. tuberculosis* H₃₇Rv al ser evaluado a 100 µg/mL. El ácido ursólico, se encuentra ampliamente distribuidos en el reino vegetal^[78,189] El ácido ursólico obtenido de la especie *A. quebracho-blanco* fue activo a la concentración de 32 µM (14.6 µg/mL), el resto de triterpenos evaluados como: zeorina, lupeol, ácido oleanólico, ácido betulínico 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 sustituyente presente 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.^[78] Otra conclusión importante de estos autores es que la actividad antimicobacteriana de algunas especies vegetales se debe a la presencia del lupeol, ácido oleanólico, ácido ursólico, o del ácido betulínico, entre otros triterpenos.

Por otra parte algunos autores informan actividad antiinflamatoria* en el modelo del edema plantar en rata inducido con carragenina,^[187,190,191] incluso describen su mecanismo de

* Se informa que el **ác. ursólico** presenta un $ID_{50} = 0.14 \text{ mM/cm}^2$, al ser evaluado en el modelo de inducción del edema con aceite de *Croton* en la oreja de ratón; el efecto fue de dos veces más potente que la

acción. Otras actividades biológicas que se han reportado son: hepatoprotectora,^[188,191] antitumoral,^[191-195] antimicrobiana,^[191] inmunomoduladora,^[196] antiviral,^[192,197] inhibe a la elastasa de leucocitos humanos,^[169] anticancerígeno,^[192,198] efecto protector contra la oxidación de lipoproteínas de baja densidad humana,^[199] citotóxica^[191] y es antagonista del factor transformador del crecimiento (TGF-β).^[189]

Es importante señalar que es la primera vez que se identifica la presencia de la partenólida y del ácido ursólico en *C. houstoniana*. Además este trabajo, es uno de los primeros que describe la composición química y el potencial antimicobacteriano de esta especie medicinal.

Adicionalmente, en la fracción primaria F3 se detectó la presencia de tres compuestos que se identificaron como: óxido de cariofileno, acetato de β-amirina y una mezcla de ceras[♦] de C₂₄, C₂₆, C₂₈ y C₃₀. El acetato de β-amirina inhibió en un 42.9% el crecimiento de la micobacteria al evaluarlos a 100 µg/mL. Es importante mencionar que el óxido de cariofileno fue el compuesto mayoritario de esta fracción y resulto inactivo contra *M. tuberculosis* H₃₇Rv y los otros compuestos estaban presentes en mínima cantidad por lo que la fracción fue inactiva (ver Tabla 13, Grafica 1).

Cabe señalar que es la primera vez que se reporta la actividad antimicobacteriana del acetato de β-amirina. Este es un triterpeno común en diferentes especies vegetales y cuyas actividades biológicas reportadas son: analgésico,^[200] antiinflamatorio,^[200] antiartrítico,^[171] antimicrobiano,^[167] antifúngico^[167] y anticancerígeno.^[201]

De manera adicional se realizó un análisis de CG-EM de las fracciones primarias F1 y F2, donde se observó la presencia de ceras. Estas fracciones presentaron porcentajes de inhibición muy bajos sobre el crecimiento de la micobacteria siendo de 16.0 y 6.4% respectivamente, a la concentración de 100 µg/mL.

indometacina (ID₅₀ = 026µM/cm²); se señala que este compuesto puede emplear como un control cualitativo en las preparaciones de referencia tópico.^[191]

*♦ Esta mezcla fue evaluada biológicamente por el método radiorespirométrico Bactec 460 y presentó un porcentaje de 42.55 de inhibición sobre el crecimiento de *M. tuberculosis* H₃₇Rv.*

Respecto a las fracciones del extracto metanólico, de la F1 se aislaron cuatro compuestos, los cuales se identificaron por CCF comparando los R_f con estándares de referencia (Sigma_Co), estos compuestos correspondieron a: óxido de cariofileno, acetado de β -amirina, mezcla de α y β -amirina y estigmasterol; que fueron previamente evaluados.

Por último, se detectaron flavonas por CCF en las fracciones F2 y F3 y se realizó un análisis por HPLC, el sistema empleado no fue el adecuado (cromatograma 7) pero estas fracciones no presentaron actividad antimicrobiana; sin embargo, se tiene reportado en la literatura que se aislaron tetrametoxiflavonas de las raíces de *C. californica* y fueron las responsables de la actividad antimicrobiana reportada para la especie.^[126] Resta por aislar y caracterizar estas flavonas presentes en estas fracciones.

VII.- CONCLUSIÓN

- El extracto hexánico de las partes aéreas (hojas, tallo, ramas, flores y fruto) de *C. houstoniana* (Leguminosae) inhibe el crecimiento de *M. tuberculosis* H₃₇Rv en 94.72%, a una concentración de 100 µg/mL, al ser evaluado por el método radiorespirométrico Bactec 460.
- El fraccionamiento químico-biodirigido del extracto hexánico vía cromatografía en columna permitió detectar que la actividad se presenta en las fracciones primarias F(4-6) con un 89.76%, la F7 con 71.0% y la F8 con 99.45% de inhibición, sobre el crecimiento de *M. tuberculosis* H₃₇Rv a 100 µg/mL.
- Debido a la actividad biológica observada en las fracciones, se procedió a separar los compuestos presentes en cada una de ellas. De la F(4-6) se aislaron la β-amirina, β-sitosterol, estigmasterol y la mezcla de α y β-amirina; los cuales son responsables de la actividad, inhibiendo el crecimiento de *M. tuberculosis* H₃₇Rv, al ser evaluados individualmente estos compuestos presentaron el 36.9, 4.92, 51.7 y 41.2% de inhibición. Adicionalmente se encuentra la mezcla de los cuatro compuestos (α y β-amirina, β-sitosterol y estigmasterol) que inhiben el 74.3%, siendo este el responsable indiscutible de la actividad de la fracción. La fracción F7 se sometió a un análisis por HPLC aislándose la partenólida como principal compuesto y responsable de la actividad presentada en esta fracción, inhibiendo en 98.57% contra *M. tuberculosis* H₃₇Rv a 100 µg/mL. Y en la fracción F8 se aisló el ácido ursólico como compuesto mayoritario, el cual inhibe el crecimiento de *M. tuberculosis* H₃₇Rv en un 99.6% a 100 µg/mL. Adicionalmente en la fracción primaria F3 se detectó la presencia del acetato de β-amirina presentando un 42.9% y una mezcla de ceras con un 42.55% de inhibición, sobre el crecimiento de *M. tuberculosis* H₃₇Rv al evaluarlo a 100 µg/mL y el óxido de cariofileno no afecta el crecimiento de la micobacteria a esta misma concentración.
- El análisis de CG-EM de las fracciones primarias F1 y F2, permitió detectar la presencia de ceras de 28 a 36 átomos de carbono, estas fracciones presentaron un porcentaje de 16.0 y 6.4% inhibición a la concentración de 100 µg/mL.

Estudio químico y evaluación antimicobacteriana de Calliandra houstoniana

- Los resultados obtenidos, permitieron determinar que la especie *C. houstoniana* constituye una fuente potencial de compuestos activos contra *M. tuberculosis* H₃₇Rv; y se valida parcialmente el uso de esta especie en la medicina tradicional de nuestro país.
- Este trabajo constituye el primero que informa acerca del estudio químico y farmacológico de la especie *Calliandra houstoniana*.

BIBLIOGRAFÍA

1. Hernández-Pando R., Jeyanathan M., Mengistu G., *et al.*, 2000. Persistence of DNA from *Mycobacterium tuberculosis* in Superficially Normal Lung Tissue During Latent Infection. *The Lancet*, **365**, 2113-2114.
2. Bierrenbach A. L., Cunha S. S., Barreto M. L., *et al.*, 2003. Tuberculin Reactivity in a Population of Schoolchildren with BCG Vaccination Coverage. *Revista Panamericana de Salud Pública*, **13**, [5], 285-293.
3. García-García M. L., 2003. Tuberculosis: Un problema de Actualidad. II) Epidemiología Molecular en México. *Gaceta Médica de México*, **139**, [5], 472-476.
4. Arriaga A. K., Orozco E. H., Aguilar L. D., *et al.*, 2002. Immunological and Pathological Comparative Analysis Between Experimental Latent Tuberculous Infection and Progressive Pulmonary Tuberculosis. *Clinica Experimental Immunology*, **128**, [2], 229-237.
5. Frieden T. R., Sterling T. R., Munsiff S. S., *et al.*, 2003. Tuberculosis. *The Lancet*, **362**, 887-899.
6. Sifuentes-Osornio J., García-García M. L., Small P. M., *et al.*, 2003. Tuberculosis: Un problema de Actualidad. III) Epidemiología de la Resistencia Antimicrobiana en *Mycobacterium tuberculosis* en México. *Gaceta Médica de México*, **139**, [5], 477-480.
7. Ponce de León A., 2000. Resistencia a Antimicrobianos en Tuberculosis: Mecanismos y Opciones Terapéuticas. *La Revista de Investigación Clínica*, **52**, [1], 72-79.
8. Ponce de León A. and Kato M. M., 1999. Hacia una Mejor Interpretación de la Información Generada por los Marcadores Moleculares en la Tuberculosis. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*, **19**, [2], 72-76.
9. Reyes C. A. and Bouza J. Y., 2003. La Tuberculosis en el Contexto del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida. Panorámica desde la Actual Evidencia. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias de México*, **16**, [2], 108-115.
10. García-García M. L. and Valdespino J. L., 2001. *Mycobacterium tuberculosis* en Pulmones sin Lesiones Tuberculosas, ¿Santuario Inmunológico? *La Revista de la Investigación Clínica*, **53**, [5], 460-461.

11. Dye C., Scheele S., Dolin P., *et al.*, 1999. Global Burden of Tuberculosis, Estimated Incidence, Prevalence, and Mortality by Country. *Journal of the American Medical Association*, **282**, [7], 677-686.
12. Granich R. M., Balandrano S., Santaella A. J., *et al.*, 2000. Survey of Drug Resistance of *Mycobacterium tuberculosis* in 3 Mexican States, 1997. *Archives International Medica*, **160**, 639-644.
13. Núñez-Rocha G. M., Salinas-Martínez A. M., Villarreal-Ríos E., *et al.*, 2000. Riesgo Nutricional en Pacientes con Tuberculosis Pulmonar: ¿Cuestión del Paciente o de los Servicios de Salud? *Salud Pública de México*, **42**, [3], 126-132.
14. Sada-Díaz E., 2003. Tuberculosis: Un problema de Actualidad. IV) La Respuesta Inmune en la Tuberculosis. *Gaceta Médica de México*, **139**, [5], 481-486.
15. Villalba-Caloca J., 2003. Tuberculosis: Un problema de Actualidad. I) Introducción. *Gaceta Médica de México*, **139**, [5], 471.
16. Raviglione M. C., Snider D. E. and Kochi A., 1995. Global Epidemiology of Tuberculosis, Morbidity and Mortality of a Worldwide Epidemic. *Journal of the American Medical Association*, **273**, [3], 220-224.
17. Salazar-Lezama M. A., 2003. Tuberculosis: Un problema de Actualidad. V) Tratamiento de la Tuberculosis Fármacorresistente. *Gaceta Médica de México*, **139**, [5], 487-490.
18. Migliori G. B., Ambrosetti M., Besozzi G., *et al.*, 1999. Relación Costo-Eficacia de las Políticas de Manejo Terapéutico de los Pacientes Tuberculosos en Italia. *Bulletin of the World Health Organization*, **77**, [6], 467-476.
19. Taylor J. P., Bergmire-Sweat D. and Suarez L., 1999. Epidemiology of Drug-resistant Tuberculosis in Texas. *American Journal of Epidemiology*, **149**, [4], 359-365.
20. Espinal M. A., 2003. The Global Situation of Multidrug-resistant Tuberculosis. *Tuberculosis*, **83**, 44-51.
21. Laniado-Laborín R. and Cabrales-Vargas N., 2003. Evolución Clínica de la Tuberculosis Multifármaco Resistente en Tijuana, Baja California. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias de México*, **16**, [2], 74-78.
22. Villalba-Caloca J., 2003. Tuberculosis: Un problema de Actualidad. VI) ¿Por qué no se ha Controlado la Tuberculosis en México? Visión del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias. *Gaceta Médica de México*, **139**, [5], 490-492.

23. Ostrosky-Zeichner L., Rangel-Frausto S., García-Romero E., *et al.*, 2000. Tuberculosis en Trabajadores de la Salud: Importancia de los Programas de Vigilancia y Control. *Salud Pública de México*, **42**, [1], 48-52.
24. García-García M. L., Sifuentes-Osornio J., Jiménez-Corona M. E. *et al.*, 2001. Resistencia de *Mycobacterium tuberculosis* a los Antimicrobianos en Orizaba, Veracruz. Implicaciones para el Programa de Prevención y Control de la Tuberculosis. *La Revista de Investigación Clínica*, **53**, [4], 315-323.
25. García-García M. L., Ponce-de-León A., Jiménez-Corona M. E., *et al.*, 2000. Clinical Consequences and Transmissibility of Drug-Resistant Tuberculosis in Southern Mexico. *Archives International Medica*, **160**, 630-636.
26. Walley J. D., Khan M. A., Newell J. N., *et al.*, 2001. Effectiveness of the Direct Observation Component of DOTS for Tuberculosis : a Randomised Controlled Trial in Pakistan. *The Lancet*, **357**, 664-669.
27. Raviglione M. C., 2003. The Tuberculosis Epidemic from 1992 to 2002. *Tuberculosis*, **83**, 4-14.
28. Amaya-Tapia G., Martín-Del Campo L., Aguirre-Avalos G., *et al.*, 2000. Primary and Acquired Resistance of *Mycobacterium tuberculosis* in Western Mexico. *Microbial Drug Resistance*, **6**, [2], 143-145.
29. Espinal M. A., Laszlo A., Simonsen L., *et al.*, 2001. Global Trends in Resistance to Antituberculosis Drugs. *The New England Journal of Medicine*, **344**, [17], 1294-1303.
30. Inderlied C. B., 1994. Antimycobacterial Susceptibility Testing: Present Practices and Future Trends. *European Journal Clinical Microbiology Infectious Diseases*, **13**, [11], 980-993.
31. Suárez P. G., Floyd K., Portocarrero J., *et al.*, 2002. Feasibility and Cost-effectiveness of Standardised Second-line Drug Treatment for Chronic Tuberculosis Patients: a National Cohort Study in Peru. *The Lancet*, **359**, 1980-1988.
32. Pablos-Méndez A., Raviglione M. C., Laszlo A., *et al.*, 1998. Global Surveillance for Antituberculosis-Drug Resistance, 1994-1997. *The New England Journal of Medicine*, **338**, [23], 1641-1649.
33. Espinal M. A., (2000). Epidemiology of Multidrug-resistant Tuberculosis in Low- and Middle-income Countries. In Resurgent and Emerging Infectious Diseases Multidrug-

- resistant Tuberculosis. Vol. I. Editores: Bastian I. and Portaels F. Kluwer Academic Publishers. USA, pp 29-44.
34. Organización Panamericana de la Salud (OPS), 2003. Tablas Estadísticas, TB en las Américas: Incidencia, Programas Nacionales, Cobertura de DOTS.
 35. Organización Panamericana de la Salud (OPS), 2004. Tuberculosis. Avances en el Control de la Tuberculosis en la Región de las Américas: 1995-2003. *Organización Panamericana de la Salud*, **7**, 1-8.
 36. Dirección General de Epidemiología. CEDI, 2001. Secretaria de Salud, México. Epidemiología, Sistema Único de Información, **43**, 11.
 37. García-García M. L., Mayar-Maya M. E., Ferreyra-Reyes L., *et al.*, 1998. Eficacia y Eficiencia del Tratamiento Antituberculoso en Jurisdicciones Sanitarias de Morelos. *Salud Pública de México*, **40**, [5], 421-429.
 38. Manjarrez-Morales E. M., Serrano-Montes V., Cano-Pérez G., *et al.*, 1993. Principales Causas de Abandono del Tratamiento Contra la Tuberculosis Pulmonar. *Gaceta Médica de México*. **129**, [1], 57-62.
 39. Dirección General de Epidemiología. CEDI, 2002. Secretaria de Salud, México. Epidemiología, Sistema Unico de Información, **41**, 4, 10, 11.
 40. Alvarez-Gordillo G. C. and Dorantes-Jimenez J. E., 1998. Tratamiento Acortado Estrictamente Supervisado para Tuberculosis Pulmonar. *Salud Pública de México*, **40**, 272-275.
 41. García-García M. L., Small P. M., García-Sancho C., *et al.*, 1999. Tuberculosis Epidemiology and Control in Veracruz, Mexico. *International Journal of Epidemiology*, **28**, 135-140.
 42. Báez-Saldaña R., Pérez-Padilla J. R., and Salazar-Lezama M. A., 2003. Discrepancias entre los Datos Ofrecidos por la Secretaría de Salud y la Organización Mundial de la Salud sobre Tuberculosis en México, 1981-1998. *Salud Pública de México*, **45**, [2], 78-83.
 43. García G. M. L., Ponce de León G. A., Sifuentes O. J., *et al.*, 2000. Classification of Drug-resistant Tuberculosis. *The Lancet*, **365**, 1930-1932.
 44. Álvarez-Gordillo G. C., Álvarez-Gordillo J. F., Donantes-Jiménez J. E., *et al.*, 2000. Percepciones y Prácticas Relacionadas con la Tuberculosis y la Adherencia al Tratamiento en Chiapas, México. *Salud Pública de México*, **42**, 520-527.

45. Kato-Maeda M., Sifuentes-Osornio J., Bobadilla-del-Valle, *et al.*, 1999. Drug Resistance Among Acid-fast Bacilli. *The Lancet*, **353**, 1709.
46. Salud Pública de México (SPM), 2001. Principales Resultados de la Estadística Sobre Mortalidad en México, 1999. *Salud Pública de México*, **43**, [1], 71.
47. Salud Pública de México (SPM), 2002. Principales Resultados de la Estadística Sobre Mortalidad en México, 1999. *Salud Pública de México*, **44**, [2], 164-165, 174-176, 184, 274, 572.
48. Murray P. R., Drew W. L., Kobayashi G. S., *et al.*, (1996). *Mycobacterium*. In Microbiología Médica. Mosby. Barcelona, España; pp 219-230.
49. Brooks G. F., Morse S. A. and Butell J. S., (1999). Micobacterias. In Microbiología Médica de Jawetz, Melnick y Adelberg. El Manual Moderno. 16ª. México, D. F.; pp 186-187, 343-355.
50. Newton S. M., Lau C. and Wright C. W., 2000. A Review of Antimycobacterial Natural Products. *Phytotherapy Research*, **14**, [5], 303-322.
51. Copp B. R., 2003. Antimycobacterial Natural Products. *Natural Products Reports*, **20**, [6], 535-557.
52. Koneman E. W., Allen S. D., Dowell V. R., *et al.*, (1997). Micobacterias. In Diagnóstico Microbiológico, Texto y Atlas Color. 3ª. Médica Panamericana. México, D. F.; pp 627.
53. American Thoracic Society, 1983. Treatment of Tuberculosis and other Mycobacterial Diseases. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, **127**, 790-796.
54. American Thoracic Society, 1994. Treatment of Tuberculosis and Tuberculosis Infection in Adults and Children. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, **149**, 1359-1374.
55. García-Sancho F. M. C. E., 2001. Respuesta Inmune a la Infección por *Mycobacterium tuberculosis*. Una Revisión de la Literatura. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias de México*, **14**, [2], 114-128.
56. Aung H., Tosí Z., McKenna S. M., *et al.*, 2000. Expression of Transforming Growth Factor- β But not Tumor Necrosis Factor- α , Interferon- γ , and Interleukin-4 in Granulomatous Lung Lesions in Tuberculosis. *Tubercle and Lung Disease*, **80**, [2], 61-67.

57. Phillipson D. J., 2001. Phytochemistry and Medicinal Plants. *Phytochemistry*, **56**, [3], 237-243.
58. Newman D. J., Cragg G. M. and Snader K. M., 2000. The Influence of Natural Products Upon Drug Discovery. *Natural Products Reports*, **17**, 215-234.
59. Balandrin M. F., Kinghorn D. and Farnsworth N. R., 1993. Human Medicinal Agents from Plants. Capitulo 1. Plant-Derived Natural Products in Drug Discovery and Development; *American Chemical Society*. pp 1-12
60. Eloff J. N., 1998. Which Extract Should be Used for the Screening and Isolation of Antimicrobial Components from Plants. *Journal of Ethnopharmacology*, **60**, 1-8.
61. Tshibangu J., Chifundera K., Kaminsky R., *et al.*, 2002. Screening of African Medicinal Plants for Antimicrobial and Enzyme Inhibitory Activity. *Journal of Ethnopharmacology*, **80**, 25-35.
62. Farnsworth N. R., Akerele O., Bingel A. S., *et al.*, 1989. Las Plantas Medicinales en la Terapéutica. *Bolletines of Sanidad Panamericana*, **107**, [4], 314-329.
63. Cragg G. M., Newman D. J. and Snader K. M., 1997. Natural Products in Drug Discovery Development. *Journal of Natural Products*, **60**, 52-60.
64. Hamburger M. and Hostettmann K., 1991. Bioctivity in Plantas: The Link Between Phytochemistry and Medicine. *Phytochemistry*, **30**, [12], 3864-3874.
65. Lozaya X., 1999. Un Paraíso de Plantas Medicinales. *Arqueología Mexicana*, **7**, [39], 14-21.
66. Rivera E., 1999. Investigaciòn Reciente Sobre Plantas Medicinales Mexicanas. *Arqueología Mexicana*, **7**, [39], 54-59.
67. Van Puyverde L., Ntawukiliyayo D. and Portaels F., 1994. *in vitro* Inhibition of Mycobacteria by Rwandese Medicinal Plants. *Phytotherapy Research*, **8**, 65-69.
68. Cantrell C. L., Nuñez I., Castañeda-Acosta J., *et al.*, 1998. Antimycobacterial Activities of Dehydrocostus Lactone and its Oxidation Products. *Journal of Natrual Products*, **61**, [10], 1181-1186.
69. Lall N. and Meyer J. J., 1999. *in vitro* Inhibition of Drug-resistant and Drug-sensitive Strains of *Mycobacterium tuberculosis* by Ethnobotanically Selected South African Plants. *Journal of Ethnopharmacology*, **66**, 347-354.

70. König G. M., Wright A. D. and Franzblau S. G., 2000. Assessment of Antimycobacterial Activity of a Series of Mainly Marine Derived Natural Products. *Planta Medica*, **66**, 337-342.
71. Mangalindan G. C., Talaue M. T., Cruz L. J., *et al.*, 2000. Agelasine F from a *Philippine Agelas* sp. Sponge Exhibits *in vitro* Antituberculosis Activity. *Planta Medica*, **66**, 364-365.
72. Caldwell C., Franzblau S., Suarez E., *et al.*, 2000. Oleanane Triterpenes from *Junellia tridens*. *Journal of Natural Products*, **63**, 1611-1614.
73. Woldemichael G., Franzblau S., Zhang F., *et al.*, 2003. Inhibitory Effect of Sterols from *Ruprechtia triflora* and Diterpenes from *Calceolaria pinnifolia* on the Growth of *Mycobacterium tuberculosis*. *Planta Medica*, **69**, 628-631.
74. Ulubelen A., Topcu G. and Johansson C., 1997. Norditerpenoids and Diterpenoids From *Salvia multicaulis* with Antituberculous Activity. *Journal of Natural Products*, **60**, 1275-1280.
75. Fischer N., Lu T., Cantrell C. L., *et al.*, 1998. Antimycobacterial Evaluation of Germacranolides in Honour of Professor G. H. Neil Towers 75th Birthday. *Phytochemistry*, **49**, [2], 559-564.
76. Rajab M., Cantrell C. L., Franzblau S., *et al.*, 1998. Antimycobacterial Activity of (E)-Phytol and Derivatives: A Preliminary Structure-Activity Study. *Planta Medica*, **64**, 2-4.
77. Wächter G., Franzblau S., Montenegro G., *et al.*, 1998. A New Antitubercular Mulinane Diterpenoid From *Azorella madroporica* Clos. *Journal of Natural Products*, **61**, 965-968.
78. Wächter G., Valcic S., Flagg M., *et al.*, 1999. Antitubercular Activity of Pentacyclic Triterpenoids from Plants of Argentina and Chile. *Phytomedicine*, **6**, [5], 341-345.
79. Cantrell C. L., Rajab M., Franzblau S., *et al.*, 1999. Antimycobacterial Ergosterol-5,8-endoperoxide from *Ajuga remota*. *Planta Medica*, **65**, 732-734.
80. Cantrell C. L., Lu T., Fronczek F., *et al.*, 1996. Antimycobacterial Cycloartanes from *Borrchia frutescens*. *Journal of Natural Products*, **59**, 1131-1136.
81. Greng J. M. and Snell N. J. C., 1996. Activity of Bromhexine and Ambrosol, Semi-synthetic Derivatives of Vasicine from the Indian Shrub *Adhatoda vasica*, Against *Mycobacterium tuberculosis in vitro*. *Journal of Ethnopharmacology*, **50**, [1], 49-53.
82. Muhammad I., Mossa J. S. and El-Feraly F. S., 1996. Additional Antibacterial Diterpenes from the Bark of *Juniperus procera*. *Phytotherapy Research*, **10**, [7], 604-607.

83. Salie F., Eagles P. and Leng H., 1996. Preliminary Antimicrobial Screening of four South African Asteraceae Species. *Journal of Ethnopharmacology*, **52**, 27-33.
84. Kobaisy M., Abramowski Z., Lerner L., *et al.*, 1997. Antimycobacterial Polyynes of Devil's Club (*Oplopanas horridus*), a North American Native Medicinal Plant. *Journal of Natural Products*, **60**, [11], 1210-1213.
85. König G. M. and Wright A. D., 1997. *Laurencia rigida*: Chemical Investigations of Its Antifouling Dichloromethane Extract. *Journal of Natural Products*, **60**, 967-970.
86. Rahman S., Fukamiya N., Okano M., *et al.*, 1997. Anti-tuberculosis Activity of Quassinoids. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, **45**, [9], 1527-1529.
87. Cantrell C. L., Fischer N. H., Urbtsch L., *et al.*, 1998. Antimycobacterial Crude Plant Extracts from South, Central, and North America. *Phytomedicine*, **5**, [2], 137-145.
88. El Sayed K. A., Hamann M. T., El Rahman H. A., *et al.*, 1998. New Pyrrole Alkaloids from *Salanum sodomaeum*. *Journal of Natural Products*, **61**, [6], 848-850.
89. Gentry E., Jampani H., Deshavarz-Shokri A., *et al.*, 1998. 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. *Journal of Natural Products*, **61**, 1187-1193.
90. Lu T., Cantrell C. L., Robbs S., *et al.*, 1998. Antimycobacterial Matricaria Esters and Lactones from Astereae Species. *Planta Medica*, **64**, 665-667.
91. Mitscher L. A. and Baker W. R., 1998. A Search for novel Chemotherapy Against Tuberculosis Amongst Natural Products. *Pure and Applied Chemistry*, **70**, [2], 365-371.
92. Cantrell C. L., Rajab M., Franzblau S., *et al.*, 1999. Antimycobacterial Triterpenes from *Melia volkensii*. *Journal of Natural Products*, **62**, 546-548.
93. Cantrell C. L., Abate L., Fronczek F., *et al.*, 1999. Antimycobacterial Eudesmolides from *Inula helenium* and *Rudbeckia subtomentosa*. *Planta Medica*, **65**, 351-355.
94. Houghton P. J., Wodemariam T. Z., Watanabe Y., *et al.*, 1999. Activity Against *Mycobacterium tuberculosis* of Alkaloid Constituents of Angostura Bark, *Galipea officinalis*. *Planta Medica*, **65**, [1], 250-254.
95. Acevedo L., Martínez E., Castañeda P., *et al.*, 2000. New Phenylethanoids from *Buddleja cordata* subsp. *cordata*. *Planta Medica*, **66**, 257-261.

96. Waffo A. K., Azebaze G. A., Nkengfack A. E., *et al.*, 2000. Indicanines B and C, Two Isoflavonoid Derivatives from the Root Bark of *Erythrina indica*. *Phytochemistry*, **53**, [8], 981-985.
97. Antoun M., Ramos Z., Vazquez J., *et al.*, 2001. Evaluation of the Flora of Puerto Rico for *in vitro* Antiplamodial and Antimycobacterial Activities. *Phytotherapy Research*, **15**, [7], 638-364.
98. Asres K., Bucar F., Edelsbrunner S., *et al.*, 2001. Investigations on Antimycobacterial Activity of Some Ethiopian Medicinal Plants. *Phytotherapy Research*, **15**, [4], 323-326.
99. Deliorman D., Ergun F., Sener B., *et al.*, 2001. Evaluation of Antimycobacterial Activity of *Viscum album*. *Pharmaceutical Biology*, **39**, [5], 381-383.
100. Wächter G., Franzblau S., Montenegro G., *et al.*, 2001. Inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* Growth by Saringosterol from *Lessonia nigrescens*. *Journal of Natural Products*, **64**, 1463-1464.
101. Wächter G., Valcic S., Franzblau S., *et al.*, 2001. Antitubercular Activity of Triterpenoids from *Lippia turbinata*. *Journal of Natural Products*, **64**, 37-41.
102. Dantas da Silva L. L., Nascimento M., Siqueira S. D. H., *et al.*, 2002. Antibacterial Activity of a Stearic Acid Derivative from *Stemodia foliosa*. *Planta Medica*, **68**, [2], 1137-1139.
103. Friis-Möller A., Chen M., Fursted K., *et al.*, 2002. *In Vitro* Antimycobacterial and Antilegionella Activity of Licochalcone A from *Chinese licoreice* Roots. *Planta Medica*, **68**, 416-419.
104. Januário A., Rodrigues E., Pietro R., *et al.*, 2002. Antimycobacterial *Physalins* from *Physalis angulata* L. (Solanaceae). *Phytotherapy Research*, **16**, [5], 445-448.
105. Kanokmedhakul S., Kanokmedhakul K., Phonkerd N., *et al.*, 2002. Antimycobacterial Anthraquinone-Chromanone Compound and Diketopiperazine Alkaloid from the Fungus *Chaetomium globosum*. *Planta Medica*, **68**, 834-836.
106. Saludes J., Garson M., Franzblau S., *et al.*, 2002. Antitubercular Constituents from the Hexane Fraction of *Morinda citrifolia* Linn. (Rubiaceae). *Phytotherapy Research*, **16**, [7], 683-685.

107. Chumkaew P., Karalai C., Ponglimanont C., *et al.*, 2003. Antimycobacterial Activity of Phorbol Esters from the Fruits of *Sapium indicum*. *Journal Natural of Products*, **66**, 540-543.
108. Graham J., Pendland S., Prause J., *et al.*, 2003. Antimycobacterial Evaluation of Peruvian Plants. *Phytomedicine*, **10**, 528-535.
109. Standley and Steyermark, 1946. Flora of Guatemala. *Fieldiana: Botany*, **24**, [5], 1-24.
110. Trease C. E. and Evans W. CH., (1991). Trease y Evans. Farmacognosia; 13^a; Interamericana McGraw-Hill; México, D. F.; pp 198, 200-202.
111. Sánchez S. O., (1980). La Flora del Valle de México; 6^a; Herrero; México, D. F.; pp 198. 203-204.
112. Bailey L. H., (1951). Manual of Cultivated Plants, Most Commonly Grown in the Continental United States and Canada. 5a. Macmillan Publishing Company; New York, United States of America; pp 592.
113. Lötschert W., (1983). Guía de las Plantas Tropicales; Omega S. A.; Barcelona, España; pp 49.
114. Marlier M., Dardenne G. A. and Casimir J., 1972. 4,5-dihydroxy-L-pipecolique a partir de *Calliandra haematocephala*. *Phytochemistry*, **11**, [8], 2597-2599.
115. Marlier M., Dardenne G. A. and Casimir J., 1979. (2S,4R)-carboxy-2-acetylamino-4-piperidine Dans les Feuilles de *Calliandra haematocephala*. *Phytochemistry*, **18**, [3], 479-481.
116. Bleecker A. B. and Romeo J. T., 1981. 2,4-*trans*-4,5-*trans*-4,5-dihydroxypipecolic acid and *cis*-5-hydroxypipecolic acid from Leaves of *Calliandra angustifolia* and Sap of *C. confusa*. *Phytochemistry*, **20**, [8], 1845-1846.
117. Bleecker A. B. and Romeo J. T., 1983. 2,4-*cis*-4,5-*cis*-4,5-dihydroxypipecolic acid-A Naturally Occurring Imino Acid from *Calliandra pittieri*. *Phytochemistry*, **22**, [4], 1025-1026.
118. Romeo J. T., Swain L. A. and Bleecker A. B., 1983. *cis*-4-hydroxypipecolic acid and 2,4-*cis*-4,5-*trans*-4,5-dihydroxypipecolic acid from *Calliandra*. *Phytochemistry*, **22**, [7], 1615-1617.
119. Romeo J. T., 1984. Insecticidal Imino Acid in Leaves of *Calliandra*. *Journal Systematics and Ecology*, **12**, [3], 293-297.

120. Romeo J. T. and Swain L. A., 1986. Persistence of Nonprotein Seed Amino Acid S-(β -carboxyethyl)-Cysteine in Young Leaves of *Calliandra rubescens*; Ecological Implications. *Journal of Chemical Ecology*, **12**, [11], 2089-2096.
121. Swain L. A. and Romeo J. T., 1988. Metabolism of Pipecolic Acid Derivatives in *Calliandra* and *Zapoteca*. *Phytochemistry*, **27**, [2], 397-399.
122. Morton T. C. and Romeo J. T., 1990. Preliminary Chemical Investigations of Costa Rican Inga Species Based on Non Protein Imino Acids. *Bulletin of the International Group for the Study of Mimosoideae*, **18**, 112-123.
123. Longland A. C., Theodorou M. K., Sanderson R., *et al.*, 1995. Non-starch Polysaccharide Composition and *in vitro* Fermentability of Tropical Forage Legumes Varying in Phenolic Content. *Animal Feed Science and Technology*, **55**, 161-177.
124. Jackson F. S. and Barry T. N., 1996. The Extractable and Bound Condensed Tannin Content of Leaves from Tropical Tree, Shrub and Forage Legumes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **71**, 103-110.
125. Jones R. J., Meyer J. H. F., and Bechaz M., *et al.*, 2000. An Approach to Screening Potential Pasture Species for Condensed Tannin Activity. *Animal Feed Science and Technology*, **85**, 269-277.
126. Encarnación D. R. and Ochoa A. N., 1994. Two New Flavones from *Calliandra californica*. *Journal of Natural Products*, **57**, [9], 1307-1309.
127. Miranda F., (1952). La Vegetación de Chiapas, 2^{da} Parte; Ediciones del Gobierno del Estado; Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México; pp 233.
128. Standley P. C., (1961). Trees and Shrubs of Mexico; Vol. 23; Smithsonian Institution; Washington; USA; pp 383-388.
129. Martínez M., (1992). Las Plantas Medicinales de México; 6^a; Ediciones Botas V; México, DF; pp 319-320, 494.
130. Argueta V. A., Cano A. L. and Rodarte M. E., (1994). Atlas, de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana; Vol. I; Instituto Nacional Indigenista; México, D. F.; pp 253.

131. Berlin E. and Berlin B., (1996). Medical Ethnobiology of the Highland Maya of Chiapas, Mexico; Princeton University Press-Princeton; New Jersey, United States of America; pp 209-215.
132. Martínez M., (1987). Catálogo de Nombres Vulgares y Científicos de Plantas Medicinales; Fondo de Cultura Económica; México, D. F.; pp 843,886.
133. Macqueen D. J. and Hernández H. M., 1997. A revision of *Calliandra* series *Racemosae* (*Leguminosae: Mimosoideae*); *Kew Bulletin*, **52**, 1: 1-50.
134. Johnson T., (1999). CRC Ethnobotany Desk Reference; CRC Pres; Washington, USA; pp 138.
135. Akah P. A. and Nwaiwu J. I., 1988. Anticonvulsant activity of Root and Stem Extracts of *Calliandra portoricensis*. *Journal of Ethnopharmacology*, **22**, 205-210.
136. Akah P. A., Nwambie A. I., Gamaniel K. S., *et al.*, 1997. Experimental Study of the Anticonvulsant Plant Used for Treatment of Infantile Convulsion in Nigeria; *Brain Research Bulletin*, **44**, [5], 611-613.
137. Encarnación D. R., Fort M. R. and Luis P. M., 1987. Tradicional Medicine of Baja California Sur (Mexico) II, *Journal of Ethnopharmacology*, **20**, 209-222.
138. Encarnación D. R. and Keer G. S., 1991. Antimicrobial Screening of Medicinal Plants from Baja California Sur, Mexico. *Journal of Ethnopharmacology*, **31**, 181-192.
139. Trease C. E. and Evans W. CH., (2002). Trease and Evans. Pharmacognosy; 15^a; W. B. Saunders; Pekín, China; pp 475.
140. Collins L. A. and Franzblau S.G., 1997. Microplate Alamar Blue Assay versus BACTEC 460 System for High-Throughput Screening of Compounds against *Mycobacterium tuberculosis* any *Mycobacterium avium*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **41**, [5], 1004-1009.
141. Cantrell C. L., Franszblau S. G. and Fischer N. H., 2001. Antimycobacterial Plant Terpenoids. *Planta Médica*, **67**, 685-694.
142. Jiménez-Arellanes A., Meckes M., Ramírez R., *et al.*, 2003. Activity Against Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Mexican Plants Used to Treat Respiratory Diseases. *Phytotherapy Research*, **17**, 903-908.

143. Fernández V. J., (2001). Efecto Antimicrobiano e Inmunomodulador de los Metabolitos Secundarios de *Achillea millefolium* (Asteraceae). Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias, UNAM.
144. Das M. C. and Mahato S. B., 1983. Triterpenoids. *Phytochemistry*, **22**, [5], 1071-1095.
145. Uddin A. V. and Atta-ur-Rahman, (1994). Handbook of Natural Products Data, Vol. II. Pentacyclic Triterpenoids. Elsevier. The Netherlands, Amsterdam, pp 1556. Ulubelen A., Topcu G., Eris C., *et al.*, 1994. Terpenoids from *Salvia sclarea*. *Phytochemistry*, **36**, [4], 971-974.
146. Ulubelen A., Topcu G., Eris C., *et al.*, 1994, Terpenoids from *Salvia sclarea*. *Phytochemistry*, **36**, [4], 971-974.
147. Cauladis M., Chinou I. B., Tzakou O., *et al.*, 2002. Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oil of *Ballota pseudodictamnus* L. Benth. *Phytotherapy Research*, **16**, [8], 723-726.
148. Legault J., Dahl W., Debiton E., *et al.*, 2003. Antitumor Activity of Balsam Fir Oil: Production of Reactive Oxygen Species Induced by α -Humulene as Possible Mechanism of Action. *Planta Medica*, **69**, 402-407.
149. Lin Wel-Yu, Kuo Yueh-Hsiung, Chang Ya-Ling, *et al.*, 2003. Anti-Platelet Aggregation and Chemical Constituents from the Rhizome of *Gynura japonica*. *Planta Medica*, **69**, 757-764.
150. Tzakou O. and Skaltsa H., 2003. Composition and Antibacterial Activity of the Essential Oil of *Satureja parnassica* subsp *parnassica*. *Planta Medica*, **69**, [3], 282-284.
151. Zheng Gua-Qiang, Kenney P. M. and Lam L. K., 1992. Sesquiterpenes from Clove (*Eugenia caryophyllata*) as Potential Anticarcinogenic Agents. *Journal of Natural Products*, **55**, [7], 999-1003.
152. Yang D., Michel L., Chaumont J. P., *et al.*, 1999. Use of Caryophyllene Oxide as an Antifungal Agent in an *in vitro* Experimental Model of Onychomycosis. *Mycopathologia*, **148**, [2], 79-82.
153. Shimizu M., Shogawa H., Matsuzawa T., *et al.*, 1990. Anti-inflammatory Constituents of Topically Applied Crude Drugs. IV. Constituents and Anti-inflammatory Effect of

- Paraguayan Crude Drug "Alhucema" (*Lavandula latifolia* Vill.). *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, **38**, [8], 2283-2284.
154. Fekam B. F., Ngouana V., Amvam Z. P., *et al.*, 2003. Composition and Anti-plasmodial Activities of Essential Oils from Some Cameroonian Medicinal Plants. *Phytochemistry*, **64**, [7], 1269-1275.
155. Calzada F., Cedillo-Rivera R. and Mata R., 2001. Antiprotozoal Activity of the Constituents of *Conyza filaginoides*. *Journal of Natural Products*, **64**, 671-673.
156. Nishiya K., Kimura T., Takeya K., *et al.*, 1992. Sesquiterpenoids and Iridoid Glycosides from *Valeriana fauriei*. *Phytochemistry*, **31**, [10], 3511-3514.
157. Torres-Santos E. C., Lopes D., Oliveira R. R., *et al.*, 2004. Antileishmanial Activity of Isolated Triterpenoids from *Pourouma guianensis*. *Phytomedicine*, **11**, [2-3], 114-120.
158. Rios M. Y., Aguilar-Guadarrama B. and Navarro V., 2003. Two New Benzofuranes from *Eupatorium aschembornianum* and Their Antimicrobial Activity. *Planta Medica*, **69**, [10], 967-970.
159. De-Eknamkul W. and Potduang B., 2003. Biosynthesis of β -sitosterol and Stigmasterol in *Croton sublyratus* Proceeds Via a Mixed Origin of Isoprene Units. *Phytochemistry*, **62**, [3], 389-398.
160. Ruan J., Zhao X., Cassady J. M., *et al.*, 2001. Study on the Constituents from Freeze-dried Power of Blackberries (*Rubus Ursinus*). *Zhong Yao Cai*, **24**, [9], 645-647.
161. Singh B. and Sing S., 2003. Antimicrobial Activity of Terpenoids from *Trichodesma amplexicaule* Roth. *Phytotherapy Research*, **17**, 814-816.
162. Aboutabl E. A., Nassar M. I., Elsakhawy F. M., *et al.*, 2002. Phytochemical and Pharmacological Studies on *Sideritis taurica* Stephan ex Wild. *Journal of Ethnopharmacology*, **82**, 177-184.
163. Chaturvedula P., Gao Z., Hecht S. M., *et al.*, 2003. A New Acylated Oleanane Triterpenoid from *Couepia polyandra* that Inhibits the Lyase Activity of DNA Polymerase β . *Journal of Natural Products*, **66**, 1463-1465.
164. El-Seedi H. R., Ringbom T., Torssell K., *et al.*, 2003. Constituents of *Hypericum laricifolium* and Their Cyclooxygenase (COX) Enzyme Activities. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, **51**, [12], 1439-1440.

165. Gao H., Wu L., Kuroyanagi M., *et al.*, 2003. Antitumor-Promoting Constituents from *Chaenomeles sinensis* Koehne and Their Activities in JB5 Mouse Epidermal Cells. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, **51**, [11], 1318-1321.
166. Yoshida Y. and Niki E., 2003. Antioxidant Effects of Phytosterol and its Components. *Journal Nutrilogy Science Vitaminology*, **49**, [4], 277-280.
167. Takeoka G. R. and Dao L. T., 2003. Antioxidant Constituents of Almond [*Prunus dulcis* (Mill.) D. A. Webb] Hulls. *Journal of the Agricultural Food and Chemistry*, **51**, [2], 496-501.
168. Singh B. and Dubey M. M., 2001. Estimation of Triterpenoids from *Heliotropium marifolium* Koen. ex Retz. *In vivo* and *In vitro*. I. Antimicrobial Screening. *Phytotherapy Research*, **15**, [3], 231-234.
169. Mitaine-Offer A. C, Hornebeck W., Sauvain M., *et al.*, 2002. Triterpenes and Phytosterols as Human Leucocyte Elastase Inhibitors. *Planta Medica*, **68**, 930-932.
170. Akihisa T., Yasukawa K., Oinuma H., *et al.*, 1996. Triterpene Alcohols from the Flowers of Compositae and Their Anti-inflammatory Effects. *Phytochemistry*, **43**, [6], 1255-1260.
171. Kweifio-Okai G. and Macrides T. A., 1992. Antilipoxygenase Activity of Amyrin Triterpenes. *Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology*, **78**, [3], 367-372.
172. Ramesh N., Viswanathan M. B., Saraswathy A., *et al.*, 2001. Phytochemical and Antimicrobial Studies on *Drynaria quercifolia*. *Fitoterapia*, **72**, [8], 934-936.
173. Manguro L. O., Ugi I. and Lemmen P., 2003. Further Bisabolenes and Demmarane Triterpenes of *Commiphora kua* Resin. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, **51**, [5], 479-482.
174. Xiao Y., Zheng Q., Zhang Q., *et al.*, 2003. Eudesmane Derivatives from *Leggera pterodonta*. *Fitoterapia*, **74**, [5], 459-463.
175. Navarrete A., Trejo-Miranda J. L. and Reyes-Trejo L., 2002. Principles of Root Bark of *Hippocratea excelsa* (Hippocrataceae) with Gastroprotective Activity. *Journal of Ethnopharmacology*, **79**, [3], 383-388.

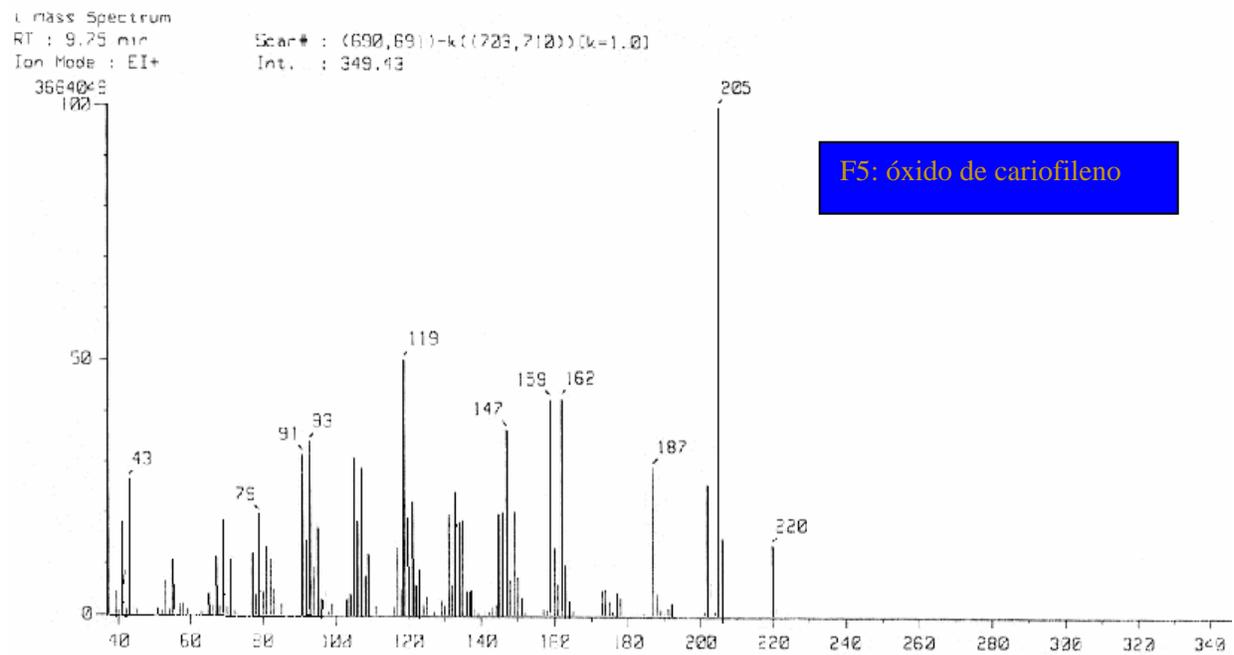
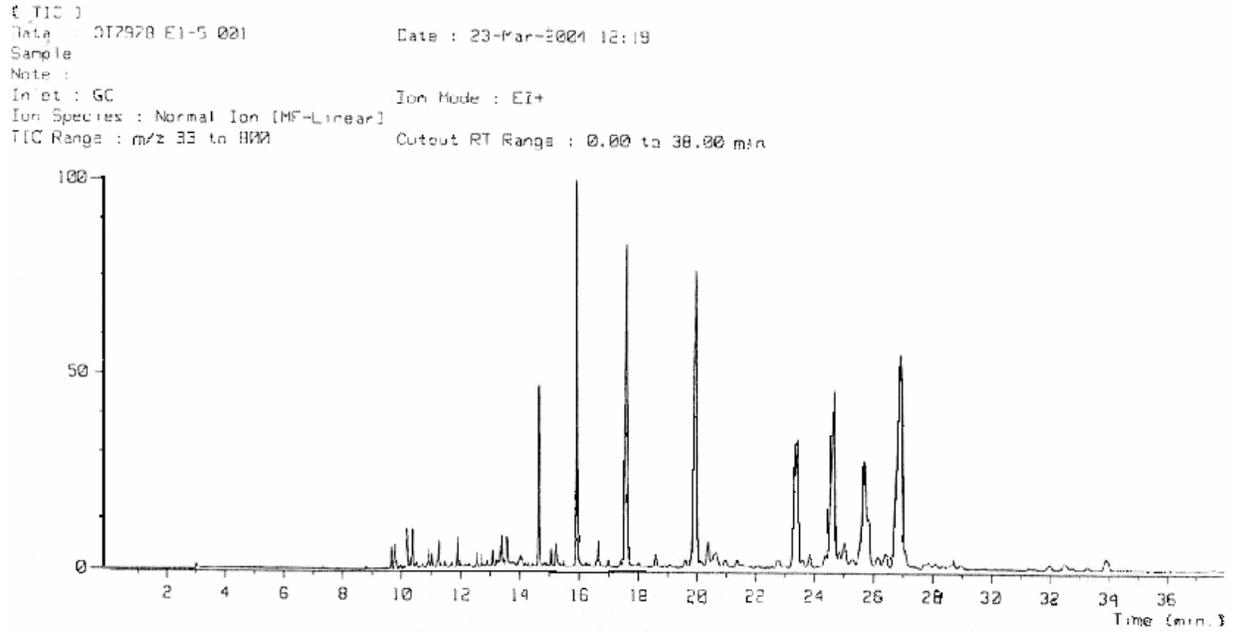
176. Li-Weber M., Giaisi M., Treiber M. K., *et al.*, 2002. The Anti-inflammatory Sesquiterpene Lactone Parthenolide Suppresses IL-4 Gene Expression in Peripheral Blood T Cells. *European Journal of Immunology*, **32**, [12], 3587-3597.
177. Neukirch H., Kancider N. C., Wiedermann C. J., *et al.*, 2003. Parthenolide and its Photochemically Synthesized 1(10)Z Isomer: Chemical Reactivity and Structure-Activity Relationship Studies in Human Leucocyte Chemotaxis. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, **11**, [7], 1503-1510.
178. García-Piñeres A. J., Castro V., Mora G., *et al.*, 2001. Cysteine 38 in p65/NF- κ B Plays a Crucial Role in DNA Binding Inhibition By Sesquiterpene Lactones. *Journal of Biological Chemistry*, **276**, [43], 39713-39720.
179. Naveen K. J. and Shrinivas K. K., 1999. Antinociceptive and Anti-Inflammatory Effects of *Tanacetum parthenium* L. Extract in Mice and Rats. *Journal of Ethnopharmacology*, **68**, 251-259.
180. Sabota R., Szwed M., Kasza A., *et al.*, 2000. Parthenolide Inhibits Activation of Signal Transducers and Activators of Transcription (STATs) Induced By Cytokines of the IL-6 Family. *Biochemical Biophysical Research Communications*, **267**, [1-3], 329-333.
181. Heinrich M., 2003. Ethnobotany and Natural Products: The Search For New Molecules, New Treatments of Old Diseases or a Better Understanding of Indigenous Cultures ?. *Current Topical Medicinal Chemistry*, **3**, [2], 141-154.
182. Mitra S., Datta A., Singh S. K., *et al.*, 2000. 5-hydroxytryptamine-Inhibiting Property of Feverfew: Role of Parthenolide Content. *Acta Pharmacology Sin.*, **21**. [12], 1106-1114.
183. Wen J., You K. R., Lee S. Y., *et al.*, 2002. Oxidative Stress-Mediated Apoptosis. The Anticancer Effect of the Sesquiterpene Lactone Parthenolide. *Journal of Biological Chemistry*, **277**, [41], 38954-38964.
184. Macias F. A., Galindo J. C., Castellano D., *et al.*, 1999. Sesquiterpene Lactones with Potencial Use as Natural Herbicide Models (I): *trans, trans*-germacranolides. *Journal of the Agricultural Food and Chemistry*, **47**, [10], 4407-4414.
185. Hendriks H., Anderson-Wildeboer Y., Engels G., *et al.*, 1997. The Content of Parthenolide and its Yield per Plant During the Growth of *Tanacetum parthenium*. *Planta Medica*, **63**, 356-359.

186. Khan S. I., Abourashed E. A., Khan I. A., *et al.*, 2003. Transport of Parthenolide Across Human Intestinal Cells (Caco-2). *Planta Medica*, **69**, [11], 1009-1012.
187. Recio M. C., Giner R. M., Máñez S., *et al.*, 1995. Investigations on the Steroidal Anti-Inflammatory Activity of Triterpenoids from *Diospyros leucomelas*. *Planta Medica*, **61**, 9-12.
188. Saraswat B., Visen P. K. S., and Agarwal D. P., 2000. Ursolic Acid Isolated from *Eucalyptus tereticornis* Protects Against Ethanol Toxicity in Isolated Rat Hepatocytes. *Phytotherapy Research*, **14**, [3], 163-166.
189. Yoshimura H., Sugawara K., Saito M., *et al.*, 2003. *in vitro* TGF- β 1 antagonistic Activity of Ursolic and Oleanolic Acids Isolated from *Clerodendranthus spicatus*. *Planta Medica*, **69**, 673-675.
190. Baricevic D., Sosa S., Loggia D. R., *et al.*, 2001. Topical Anti-inflammatory Activity of *Salvia officinalis* L. Leaves: The Relevance of Ursolic Acid. *Journal of Ethnopharmacology*, **75**, [2-3], 125-132.
191. Liu J., 1995. Pharmacology of Oleanolic Acid and Ursolic Acid. *Journal of Ethnopharmacology*, **49**, [2], 57-68.
192. Takeoka G., Dao L., Teranishi R., *et al.*, 2000. Identification of Three Triterpenoids in Almond hulls. *Journal of the Agricultural Food and Chemistry*, **48**, [8], 3437-3439.
193. Murphy B. T., MacKinnon S. L., Yan X., *et al.*, 2003. Identification of Triterpenes Hydroxycinnamates with *in vitro* Antitumor Activity from Whole Cranberry Fruit (*Vaccinium macrocarpon*). *Journal of the Agricultural Food and Chemistry*, **51**, [12], 3541-3545.
194. Banno N., Akihisa T., Tokuda H., *et al.*, 2004. Triterpene Acids from the Leaves of *Perilla frutescens* and Their Anti-inflammatory and Antitumor-promoting Effects. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, **68**, [1], 85-90.
195. Jung H. A., Chung H. Y., Jung J. H., *et al.*, 2004. A New Pentacyclic Triterpenoid Glucoside from *Prunus serrulata* var. *spontanea*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, **52**, [1], 157-159.

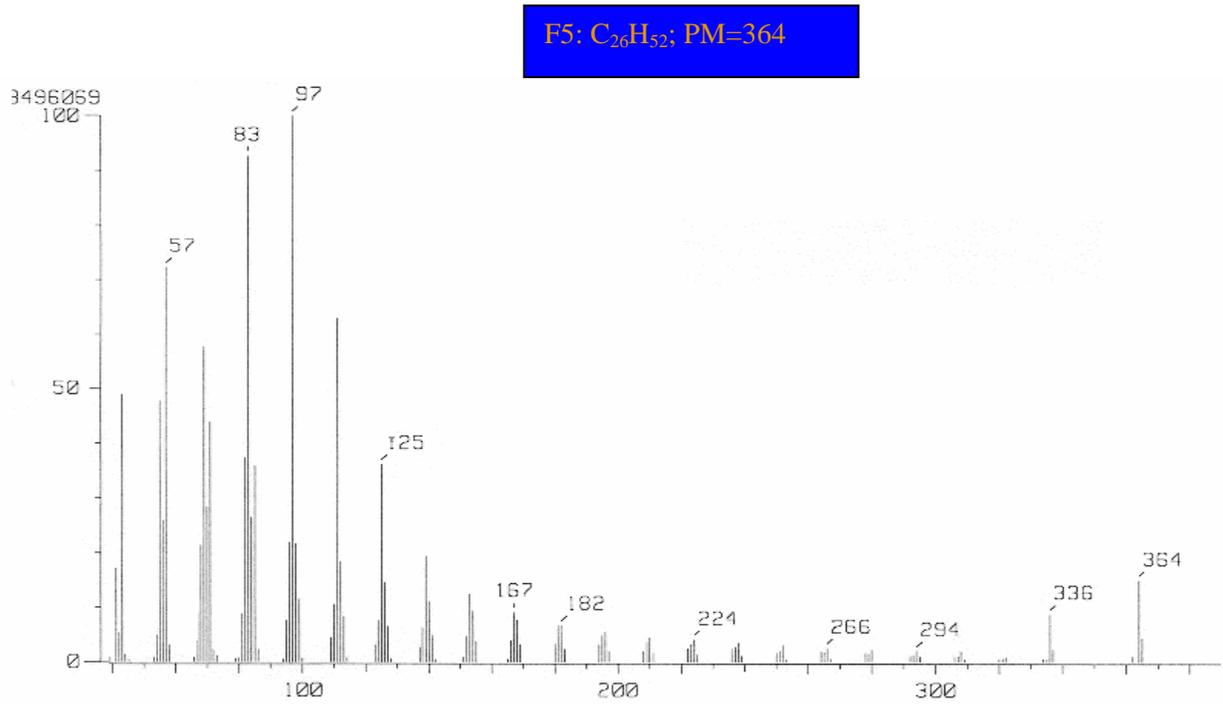
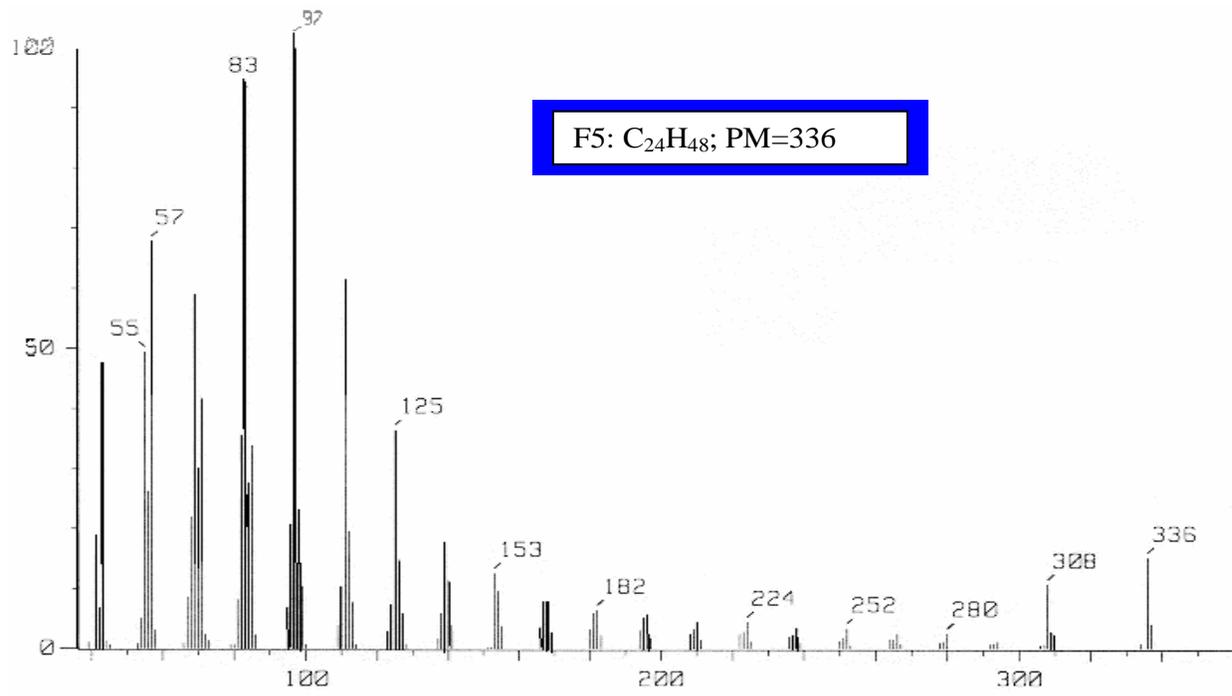
196. Raphael T. J. and Kuttan G., 2003. Effect of Naturally Occurring Triterpenoids Glycyrrhizic Acid, Ursolic Acid, Oleanolic acid and Nomilin on the Immune System. *Phytomedicine*, **10**, [6-7], 483-489.
197. Rücker G, Mayer R. and Shin-Kim J. S., 1991. Triterpene Saponins from the Chinese Drug "Daxueteng" (*Caulis sargentodoxae*). *Planta Medica*, **57**, 468-470.
198. Liu H., Shi Y., Wang D., *et al.*, 2003. MECC Determination of Oleanolic Acid and Ursolic Acid Isomers in *Ligustrum lucidum* Ait. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **32**, 479-485.
199. Andrikopoulos N. K., Kaliora A. C., Assimopoulou A. N., *et al.*, 2003. Biological Activity of Some Naturally Occurring Resins, Gums and Pigments Against *in vitro* LDL Oxidation. *Phytotherapy Research*, **17**, 501-507.
200. Krogh R., Kroth R., Berti C., *et al.*, 1999. Isolation and Identification of compounds with Antinociceptive Action from *Ipomoea pecaprae* (L.) R. Br. *Pharmazie*, **54**, [6], 464-466.
201. Chaturvedula P., Schilling J. K., Miller J. S., *et al.*, 2002. Two New Triterpene Esters from the Twigs of *Brachylaena ramiflora* from the Madagascar Rainforest. *Journal of Natural Products*, **65**, 1222-1224.

Anexo I.

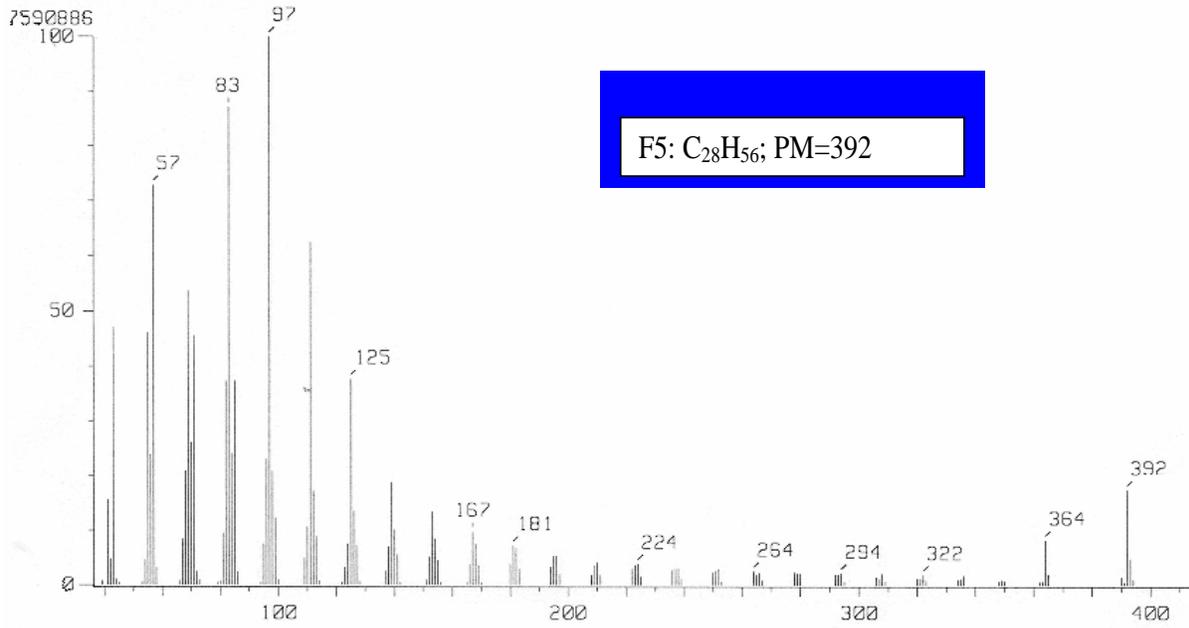
Cromatograma 1. Compuestos detectados en las fracciones secundarias F5-1 a F5-4



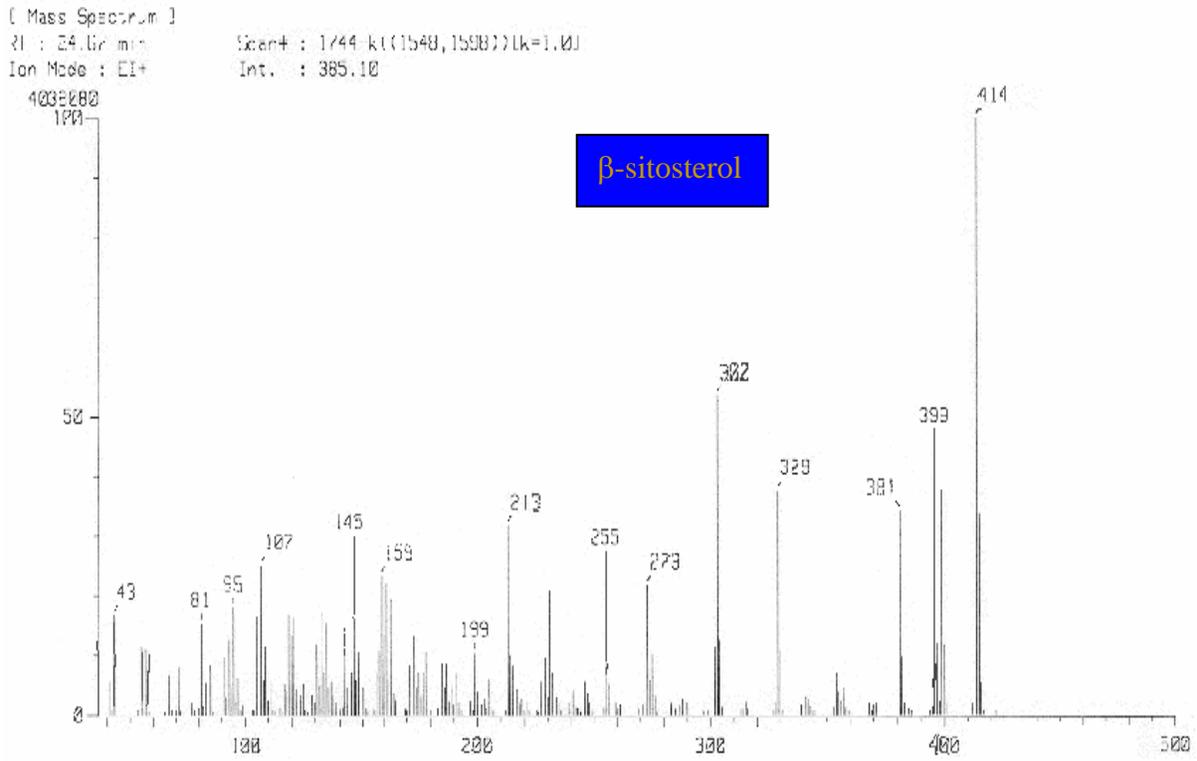
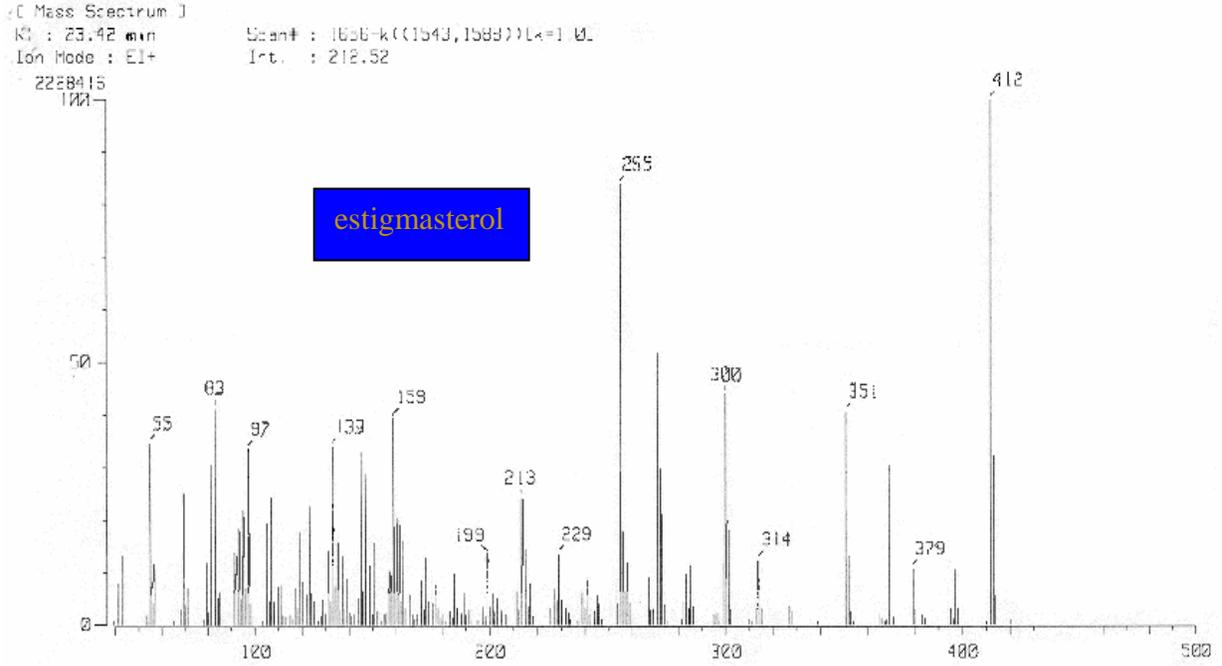
Cromatograma 1. (continuación).



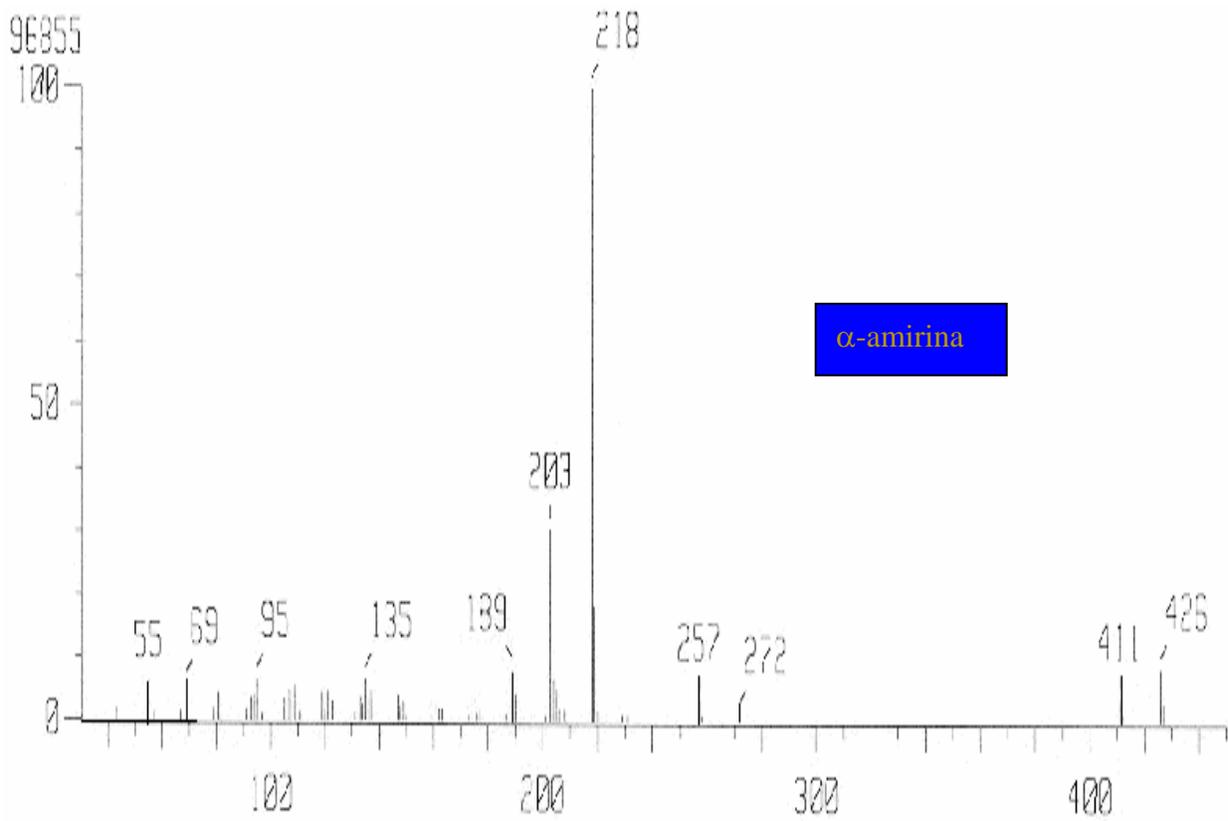
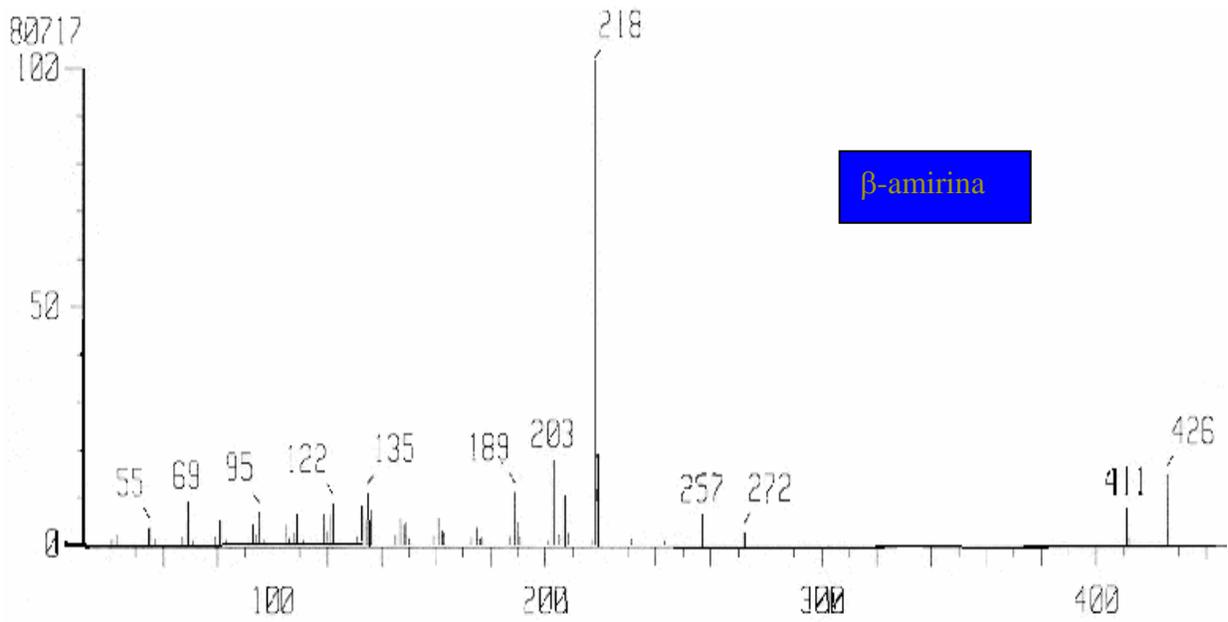
Cromatograma 1. (continuación).



Cromatograma 1. (continuación).

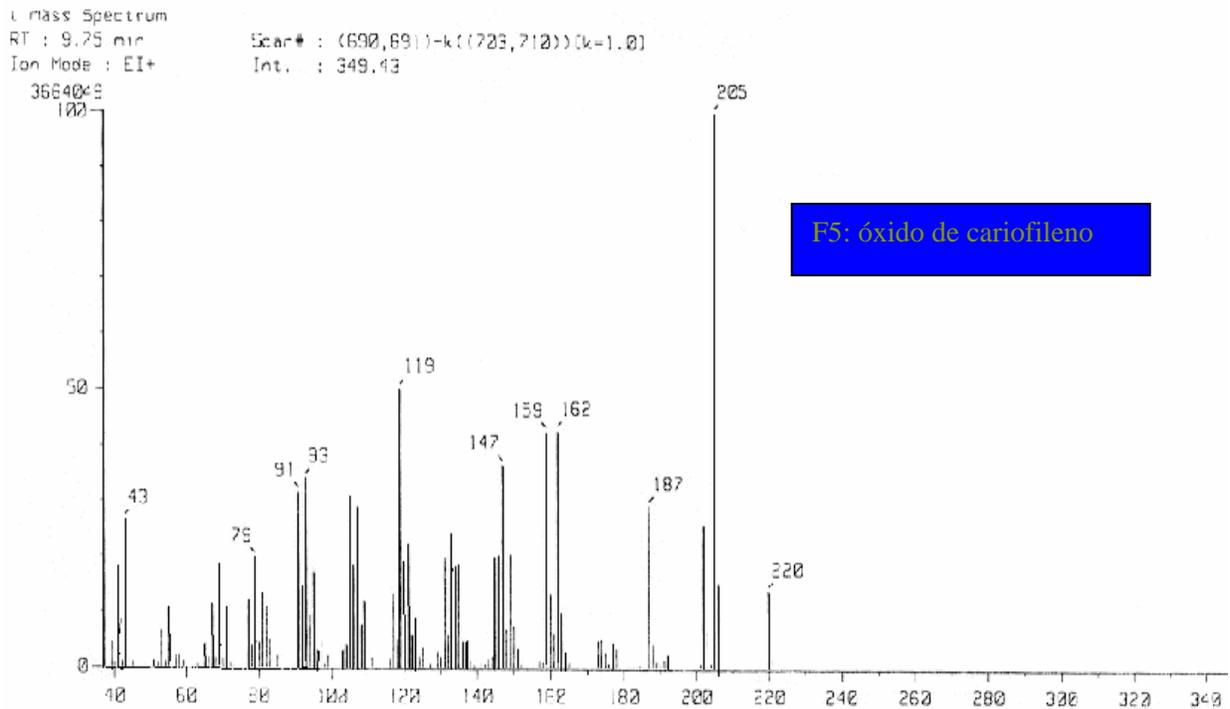
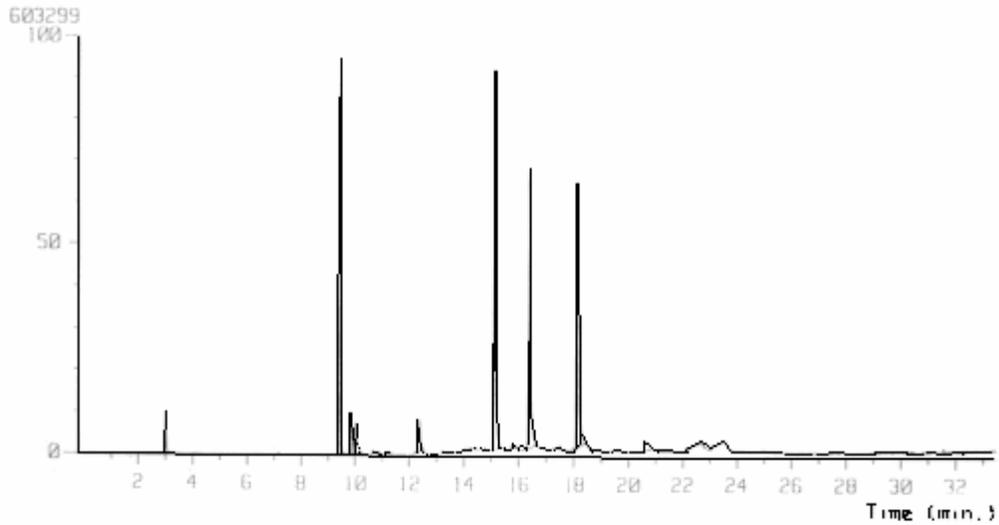


Cromatograma 1. (continuación).

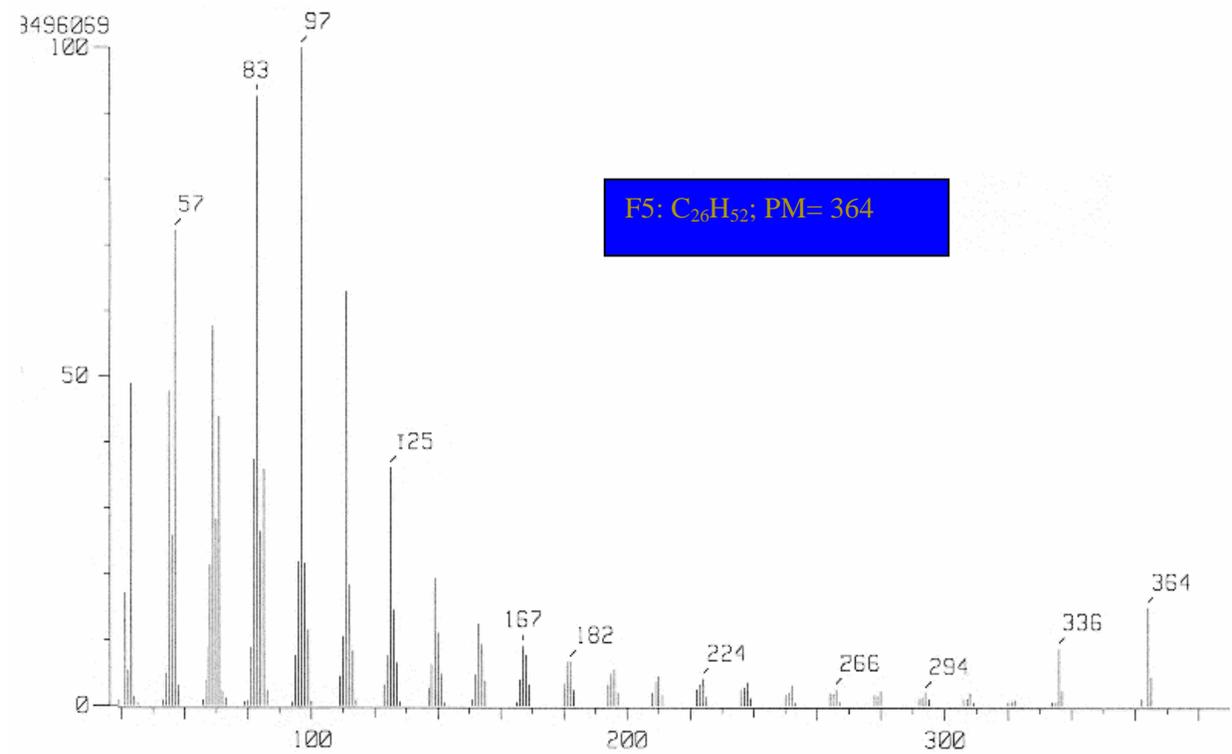
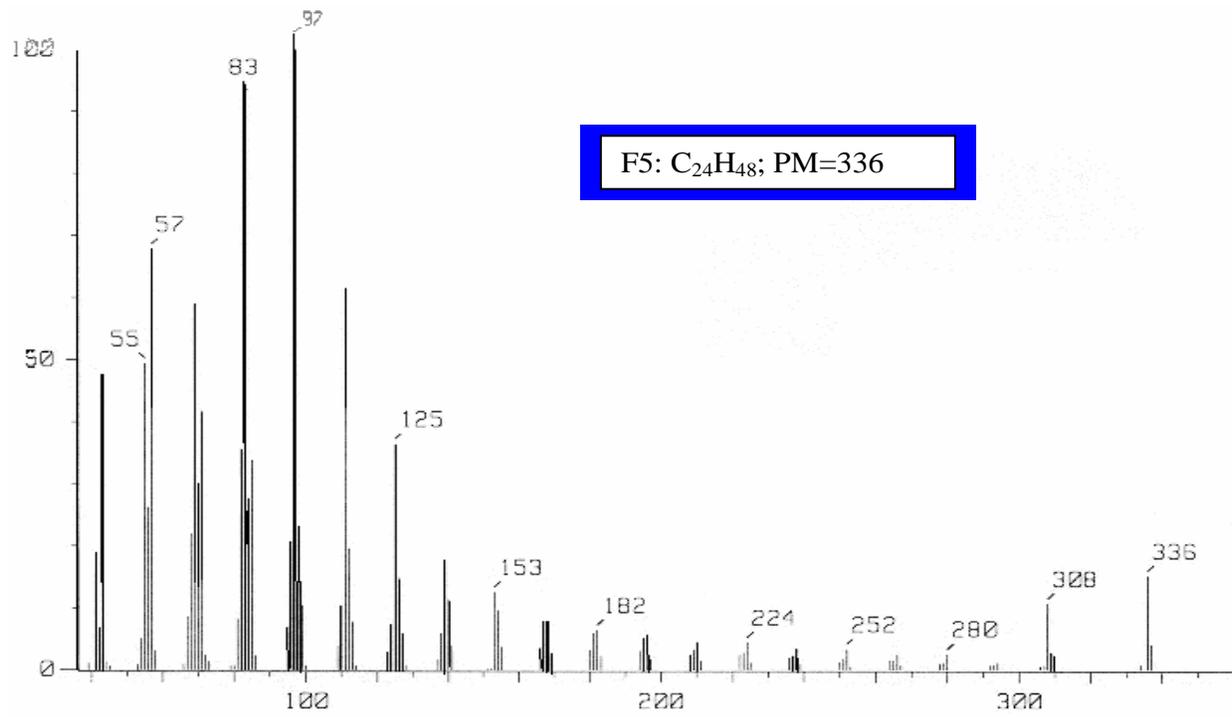


Cromatograma 2. Compuestos detectados en las fracciones F5/3 y F5/4

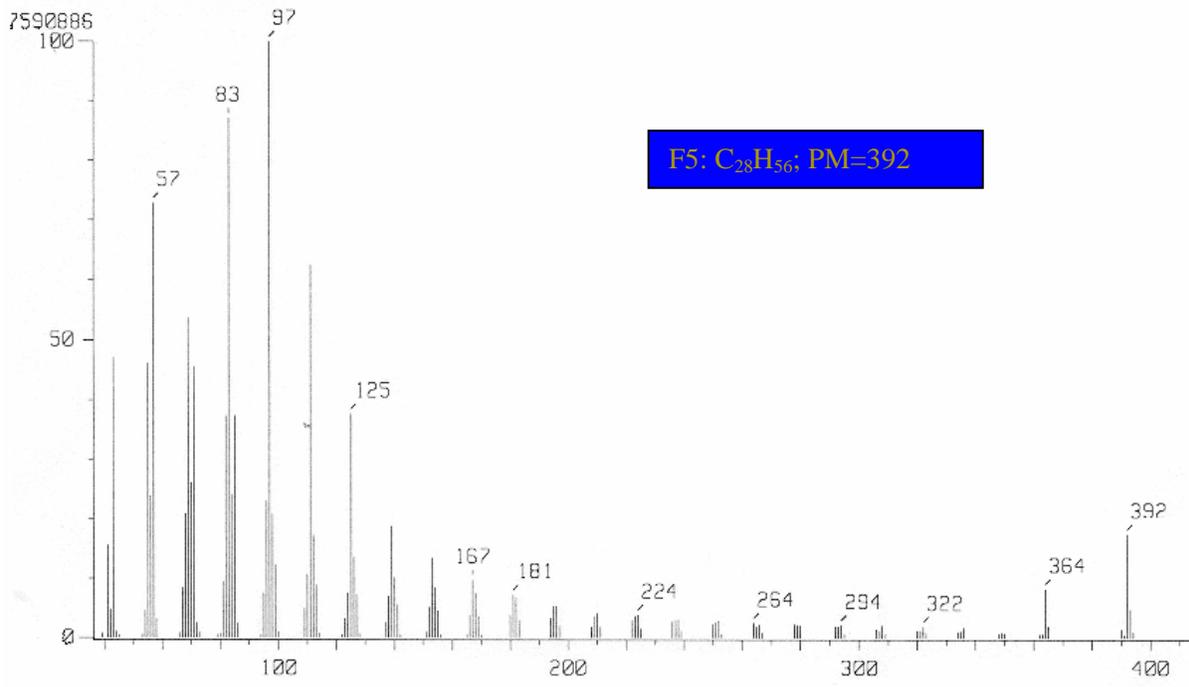
{ TIC }
Data : ADELINA Date : 10-Mar-103 12:38
Sample:
Note : USAI, Fac. de Quimica, UNAM.
Inlet : GC Ion Mode : EI+
Ion Species : Normal Ion TIC Range : m/z 33 to 800



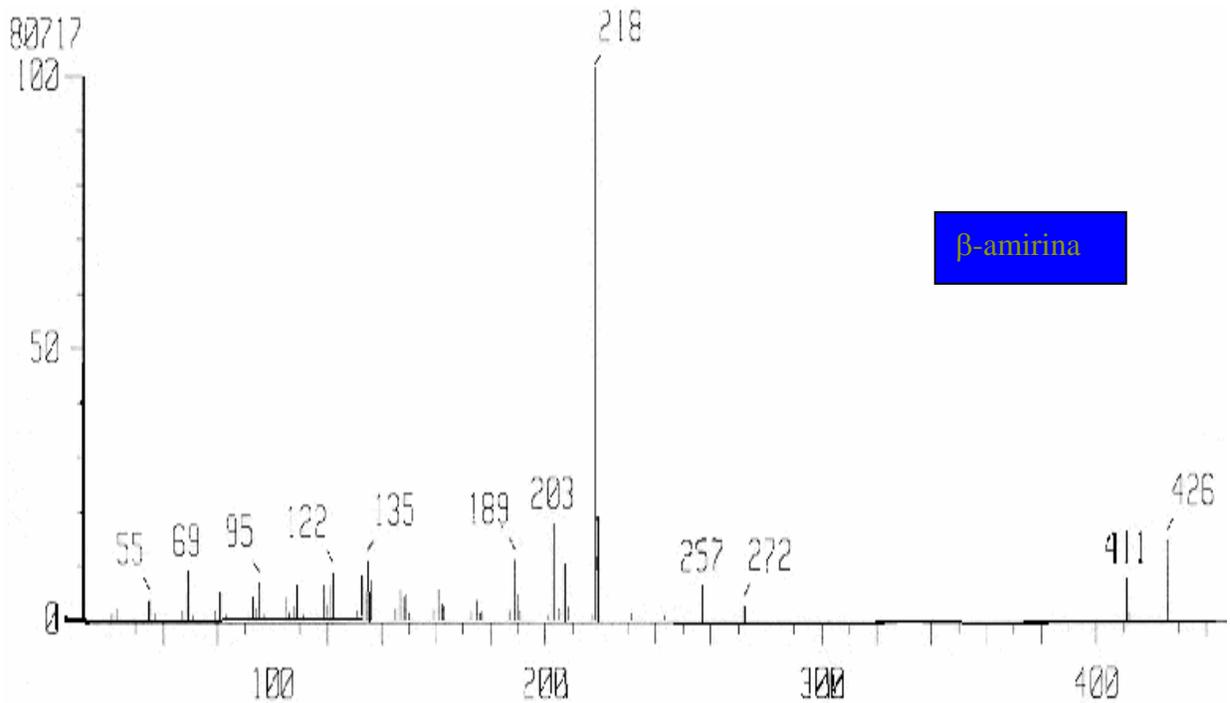
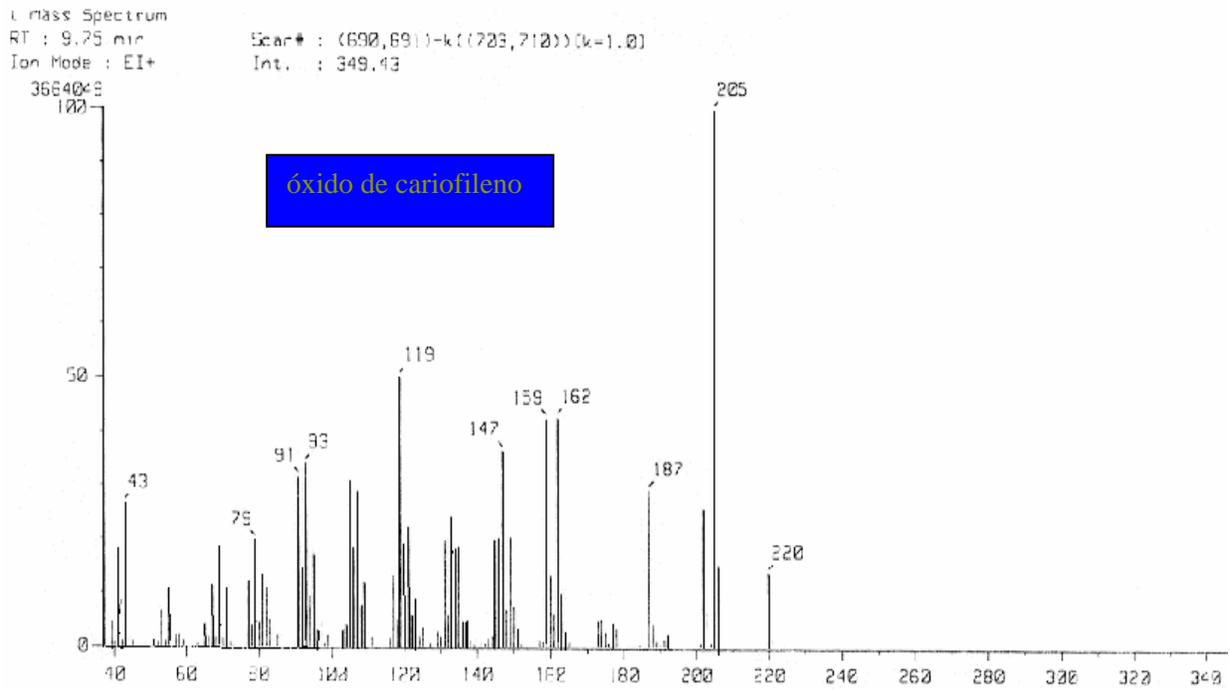
Cromatograma 2. (continuación).



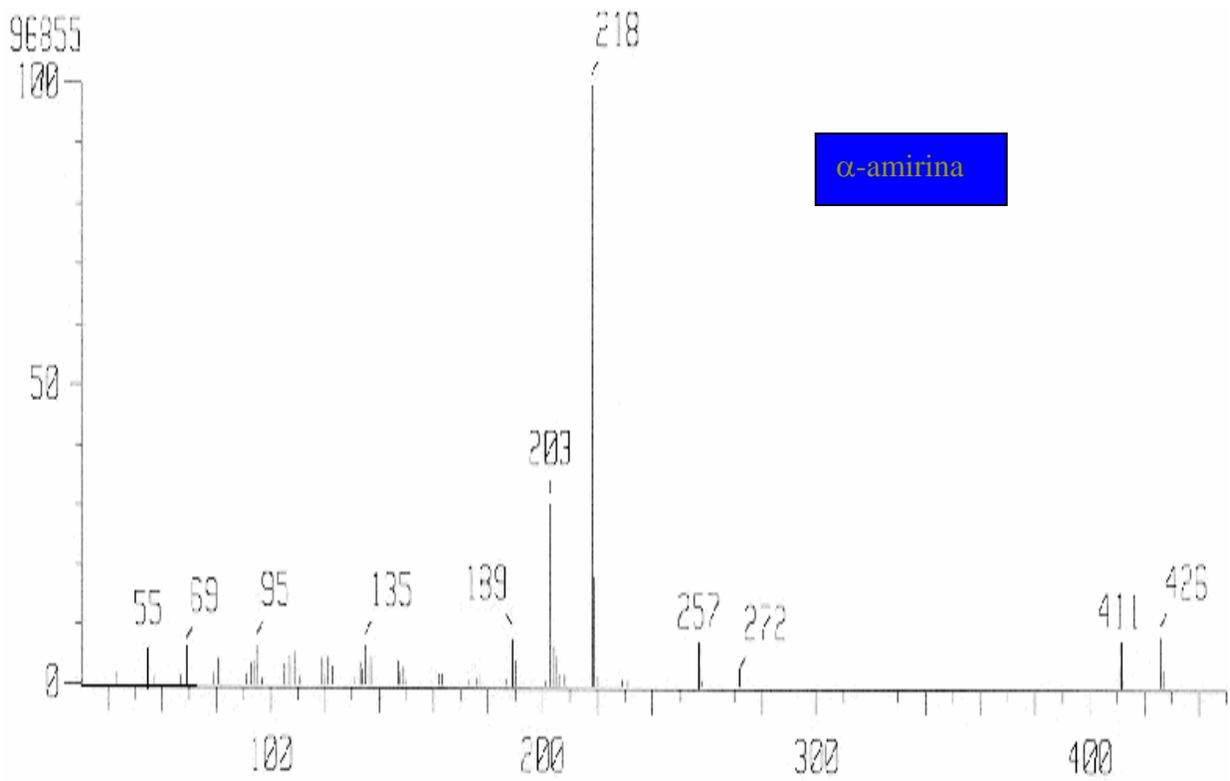
Cromatograma 2. (continuación).



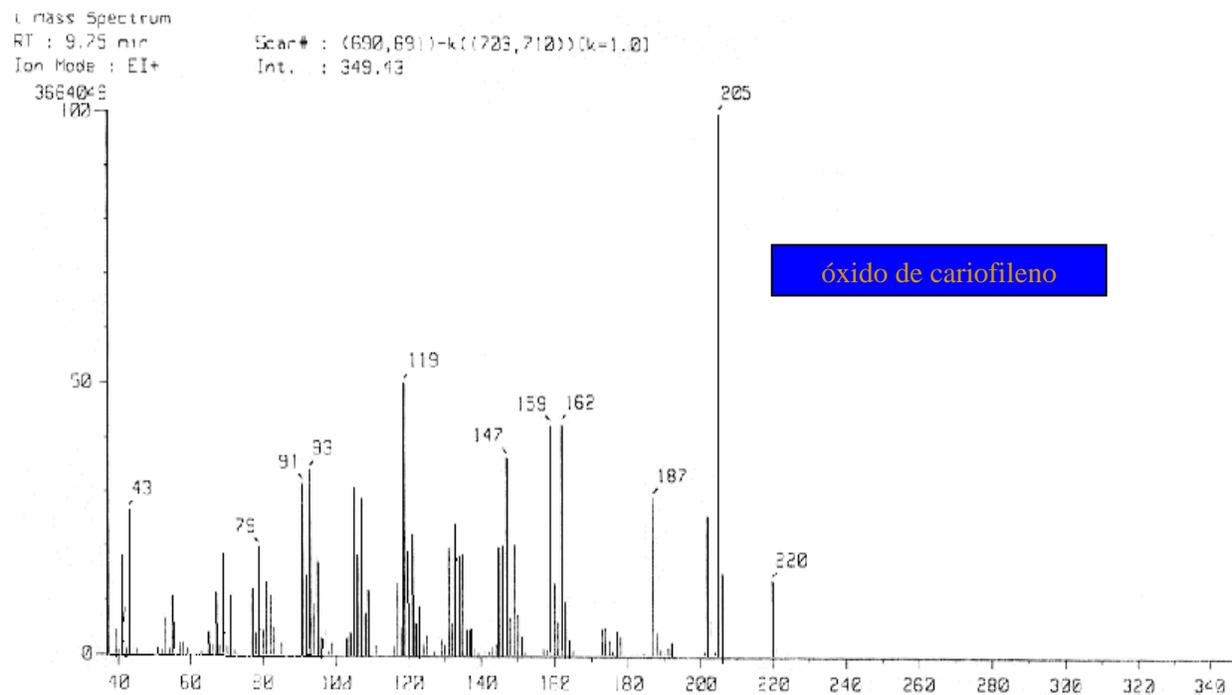
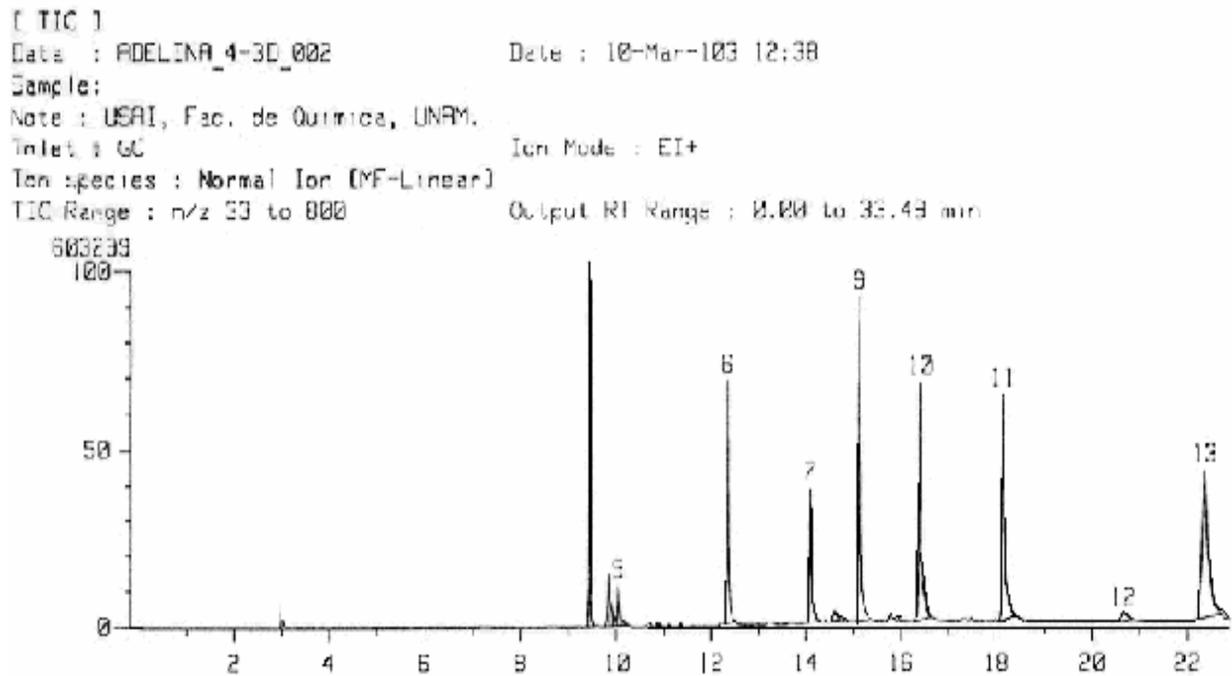
Cromatograma 3. Compuestos detectados en las fracciones secundarias F4/2 y F4/3.



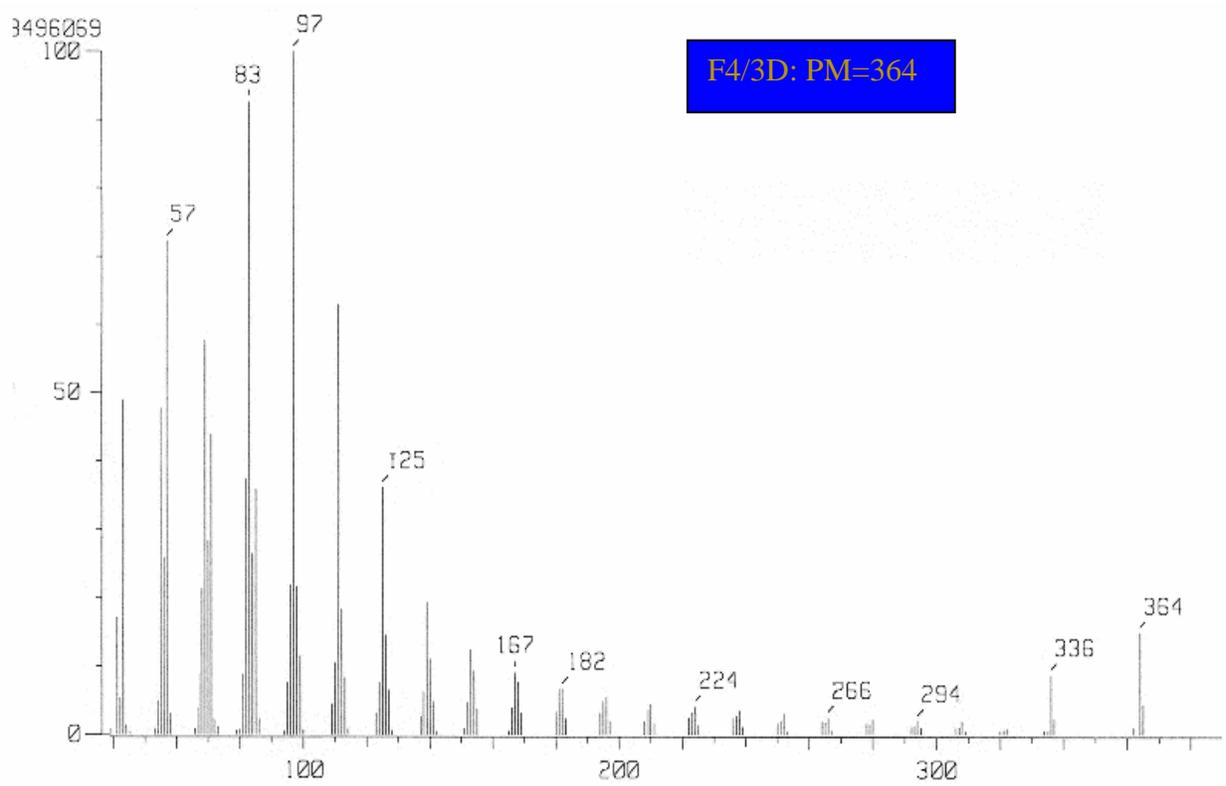
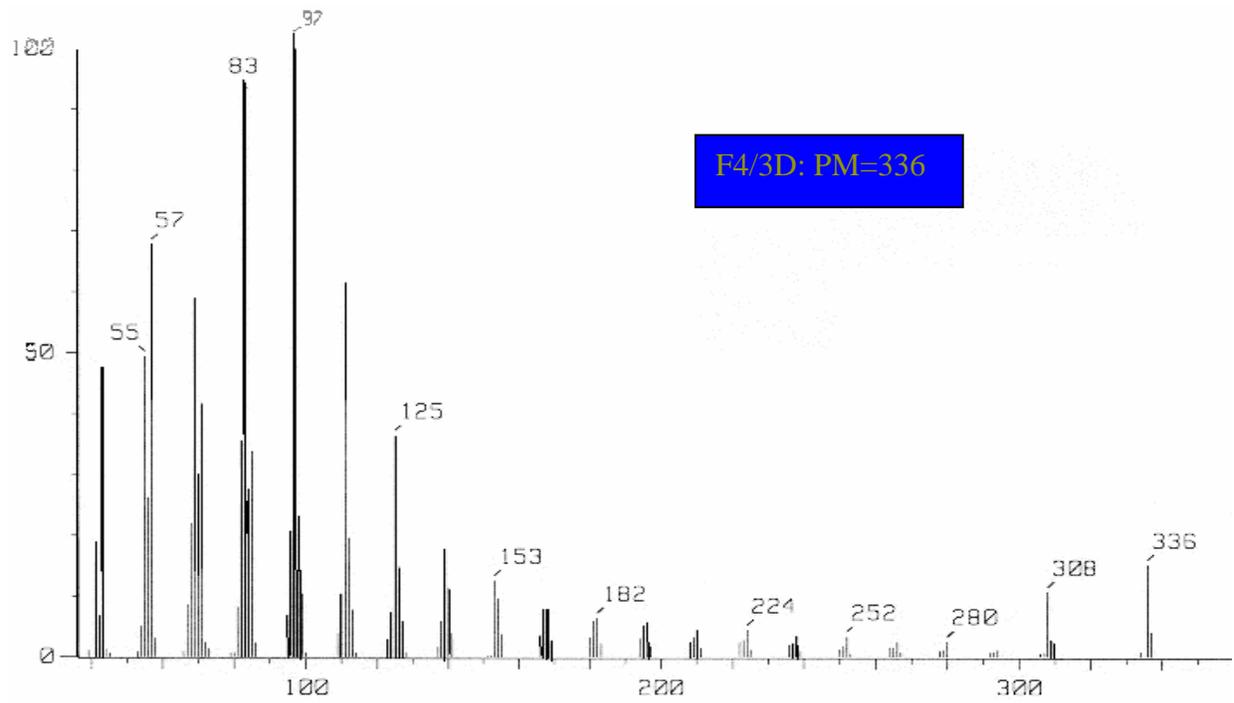
Cromatograma 3. (continuación).



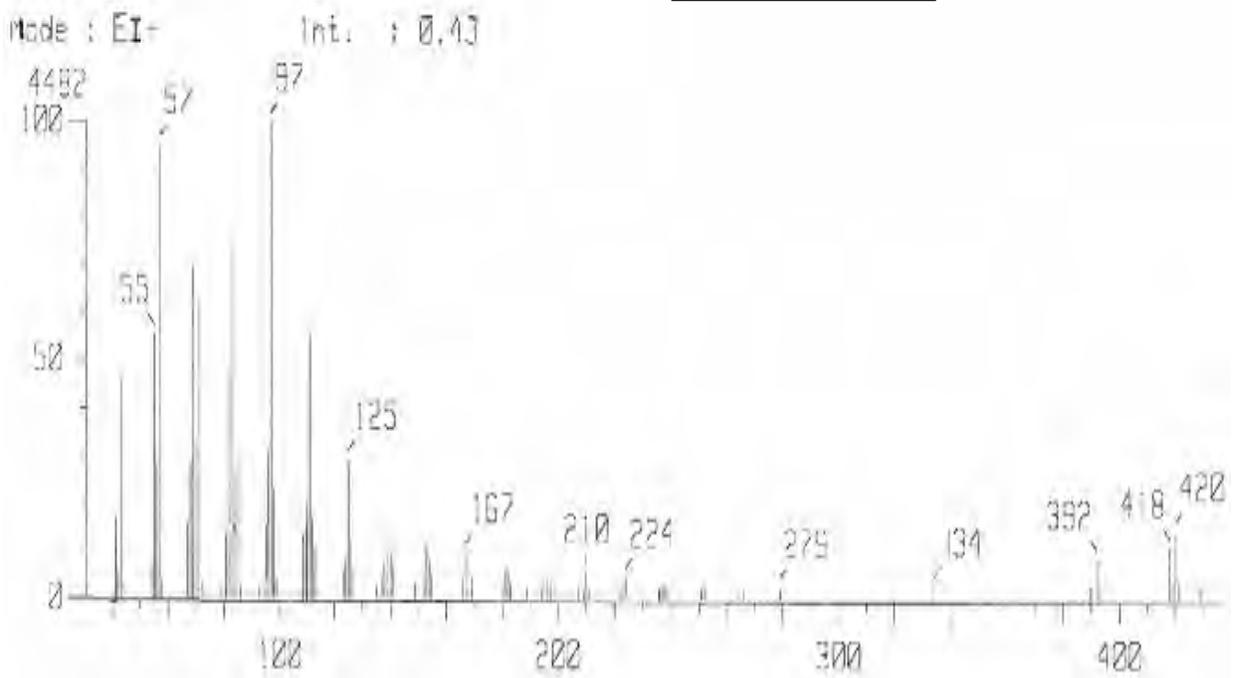
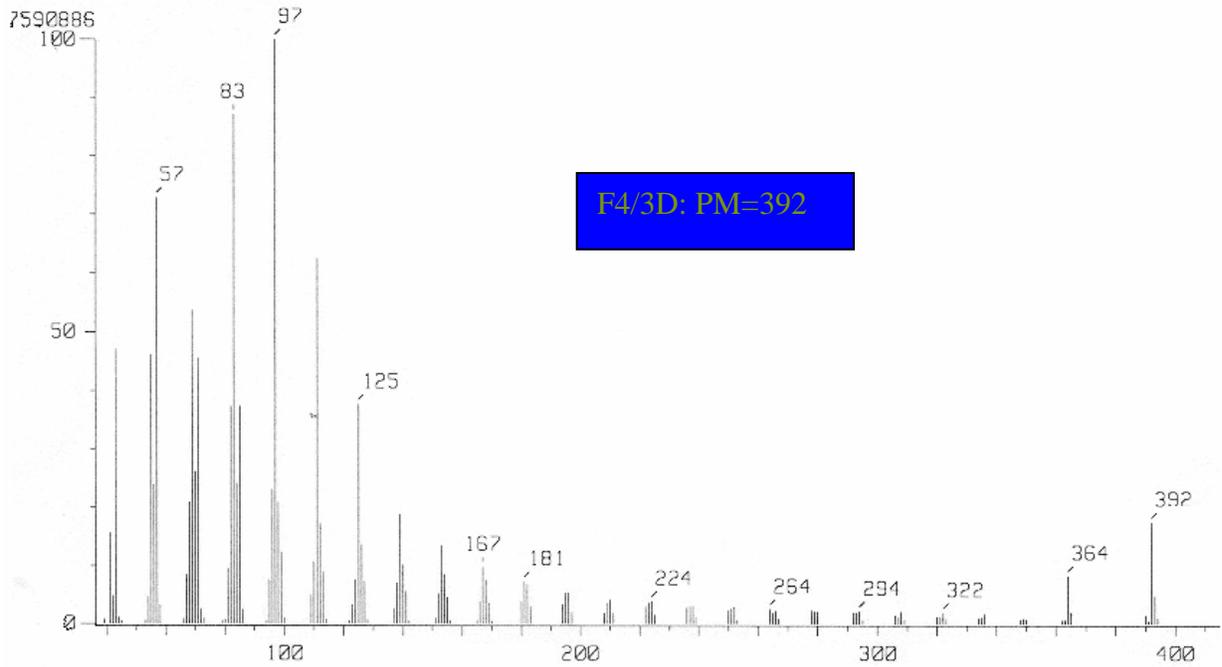
Cromatograma 4. Compuestos detectados en las fracciones secundarias F4/3D.



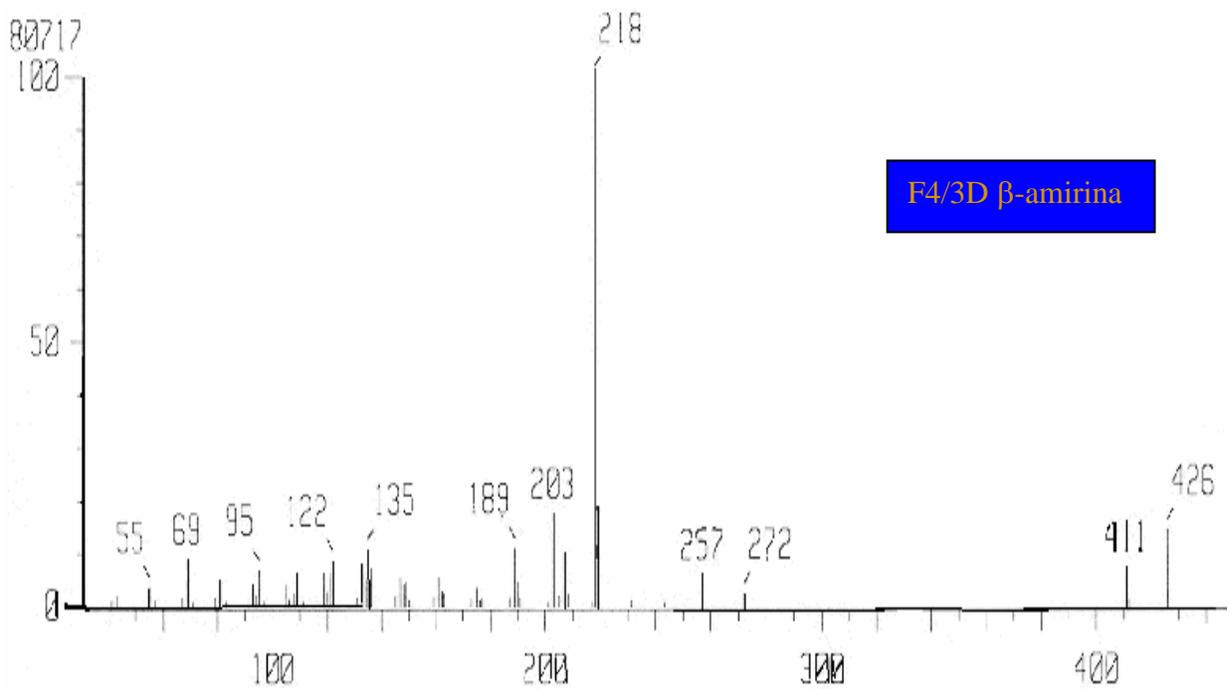
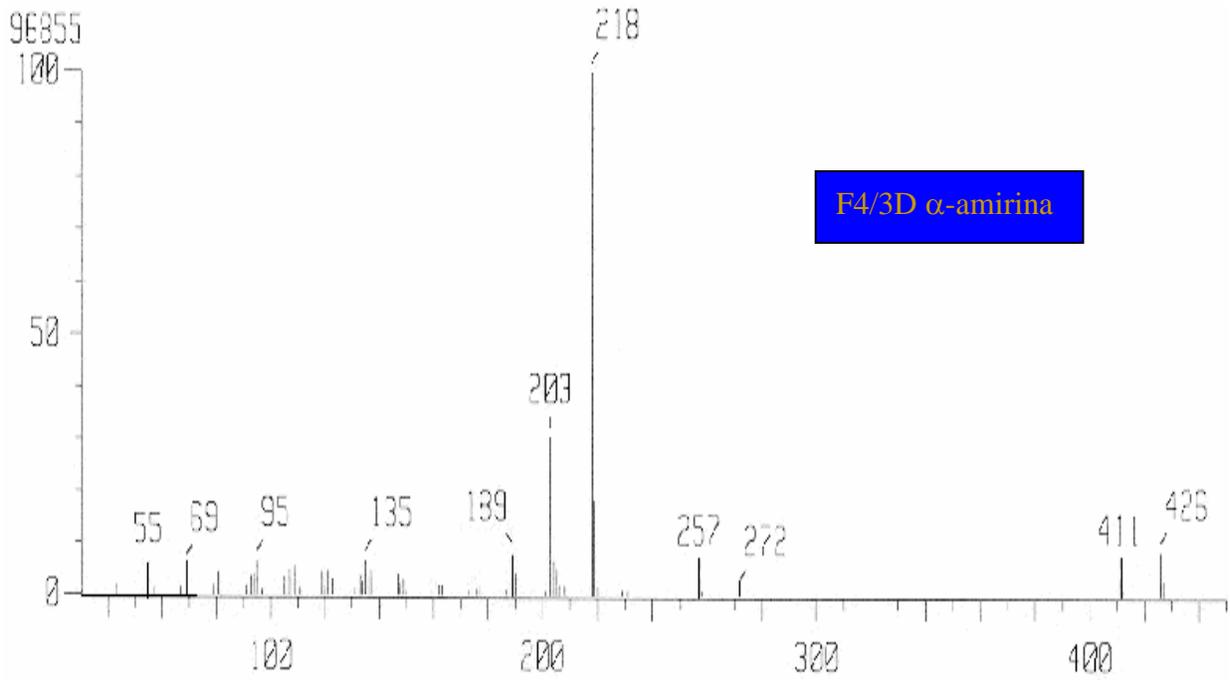
Cromatograma 4. (continuación).



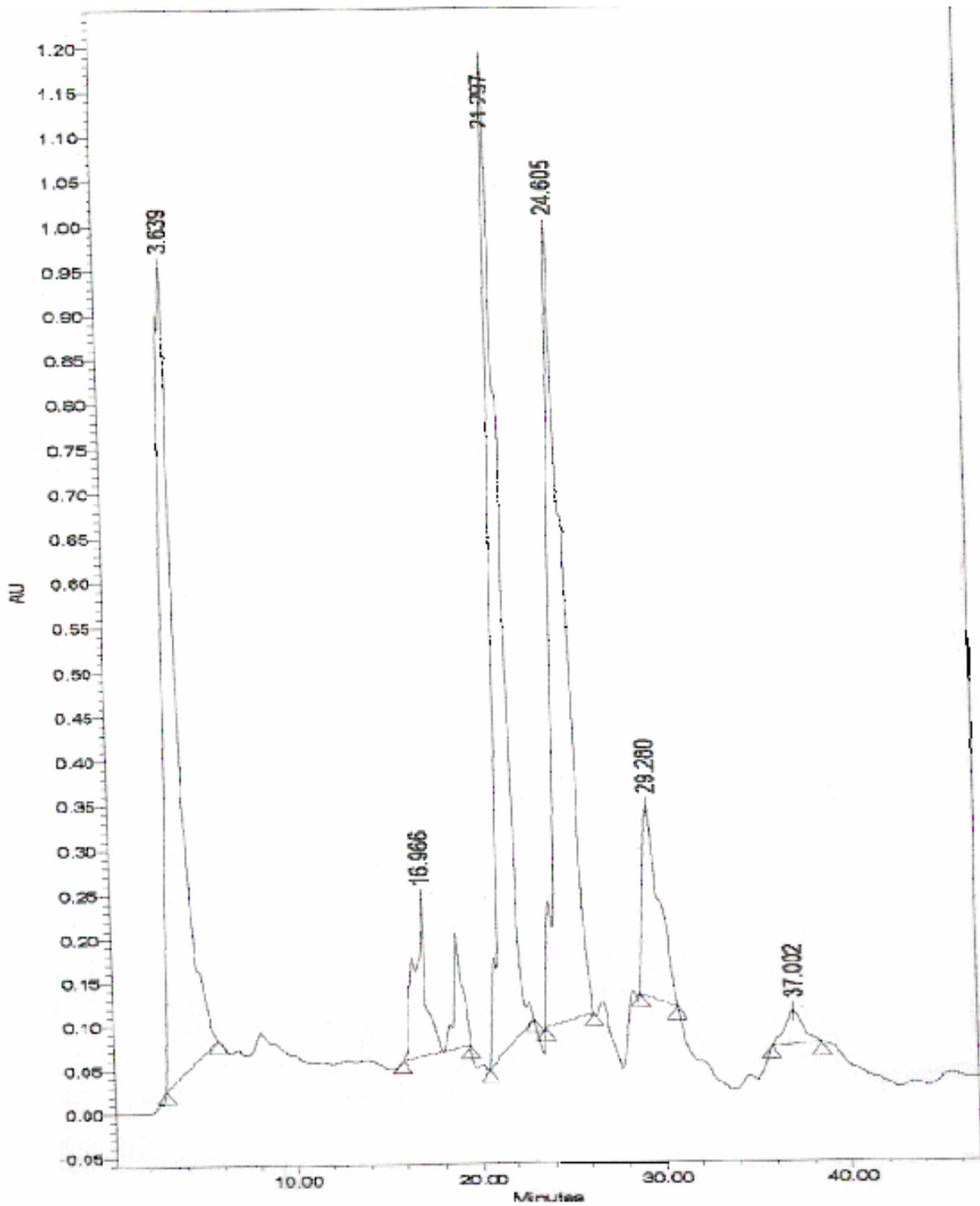
Cromatograma 4. (continuación).

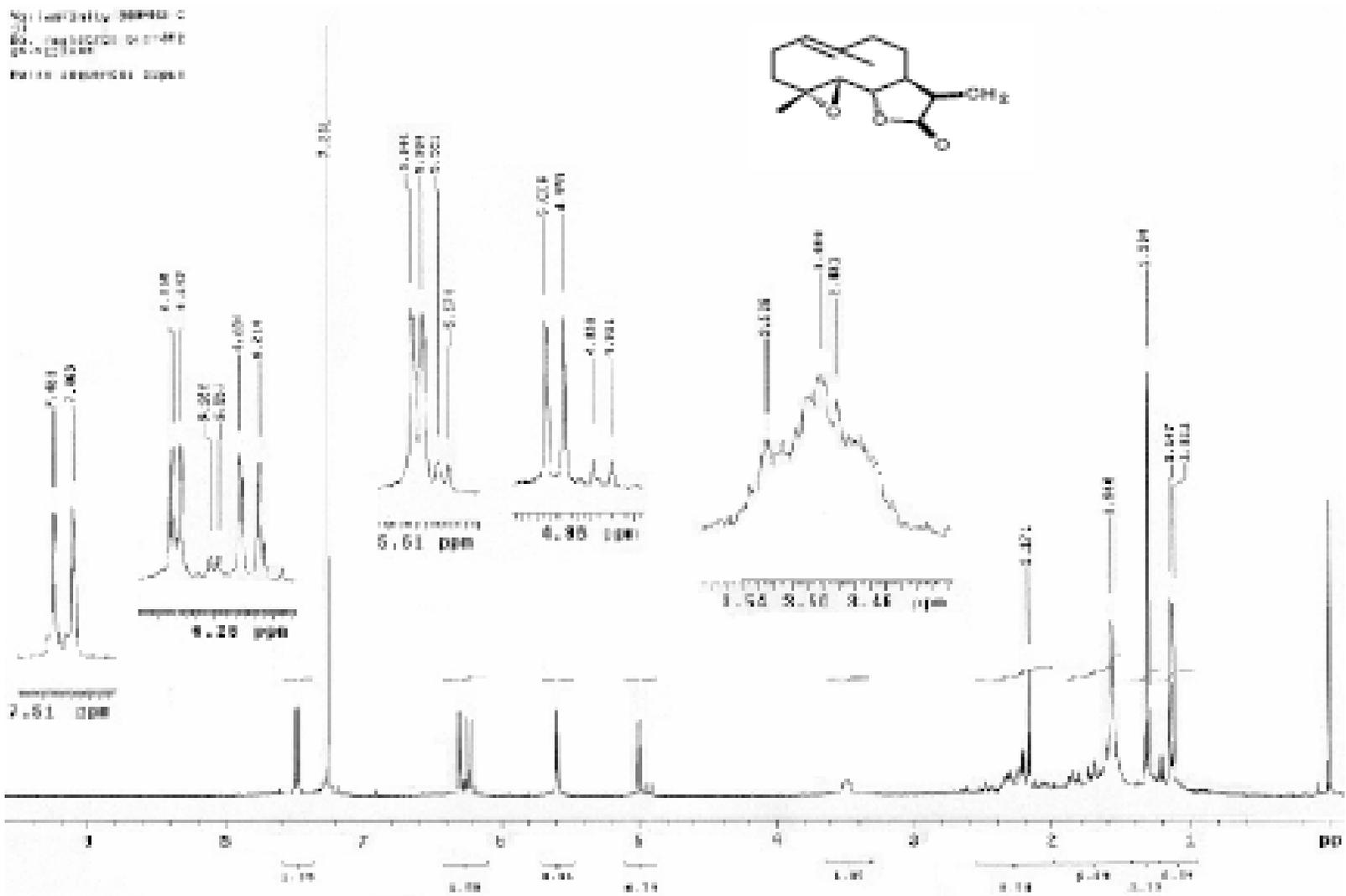


Cromatograma 4. (continuación).

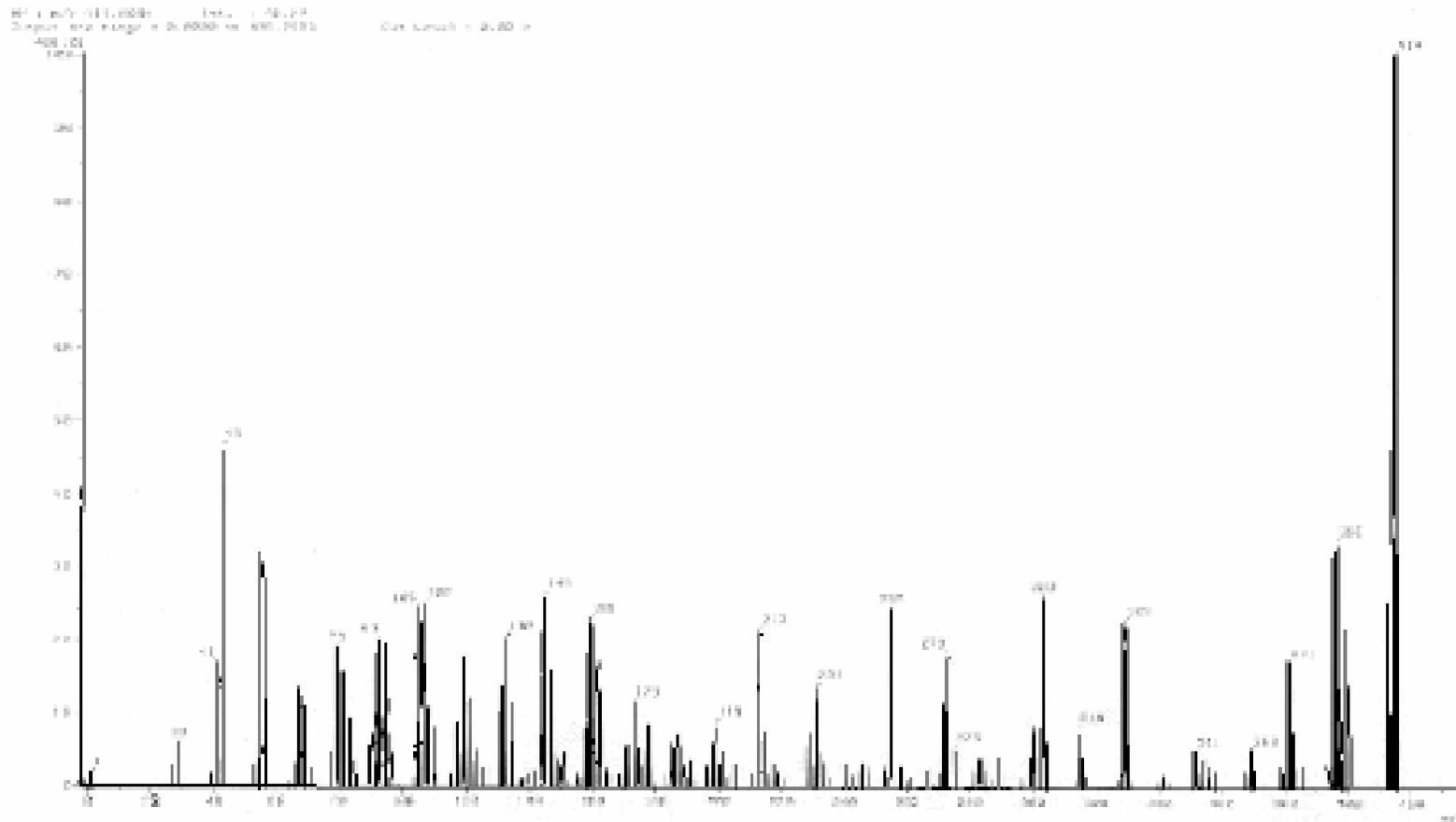


Cronograma 5. Análisis en HPLC de la F7 a 10 mg/mL.

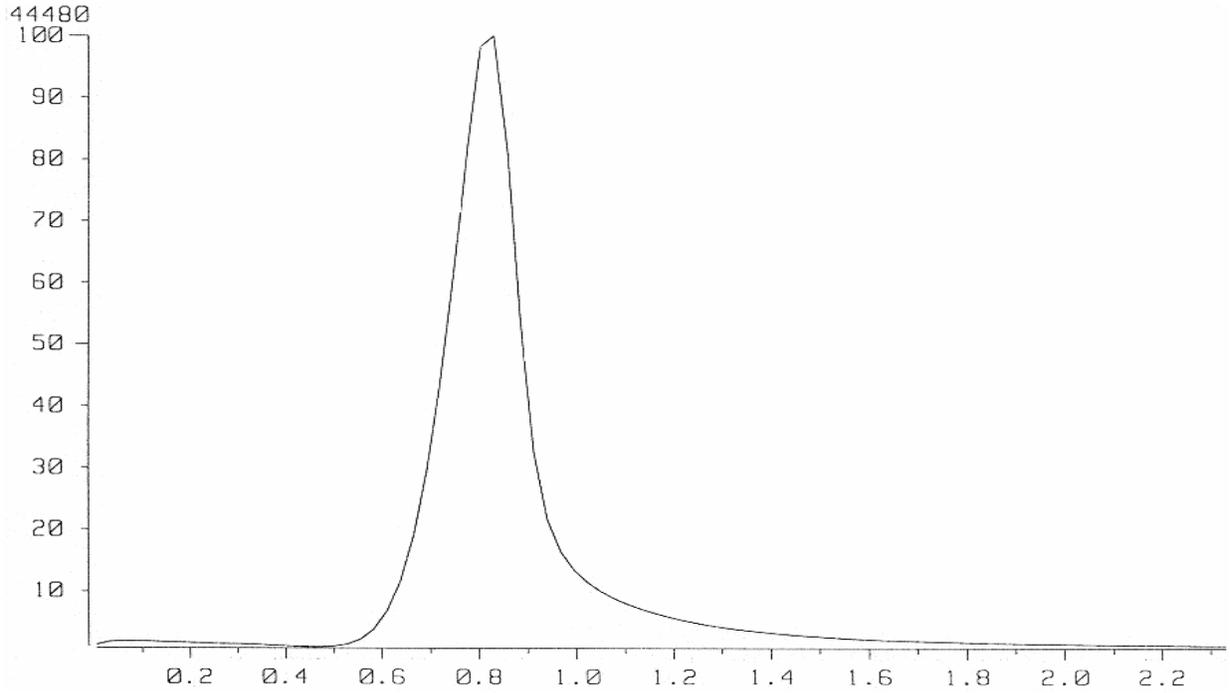




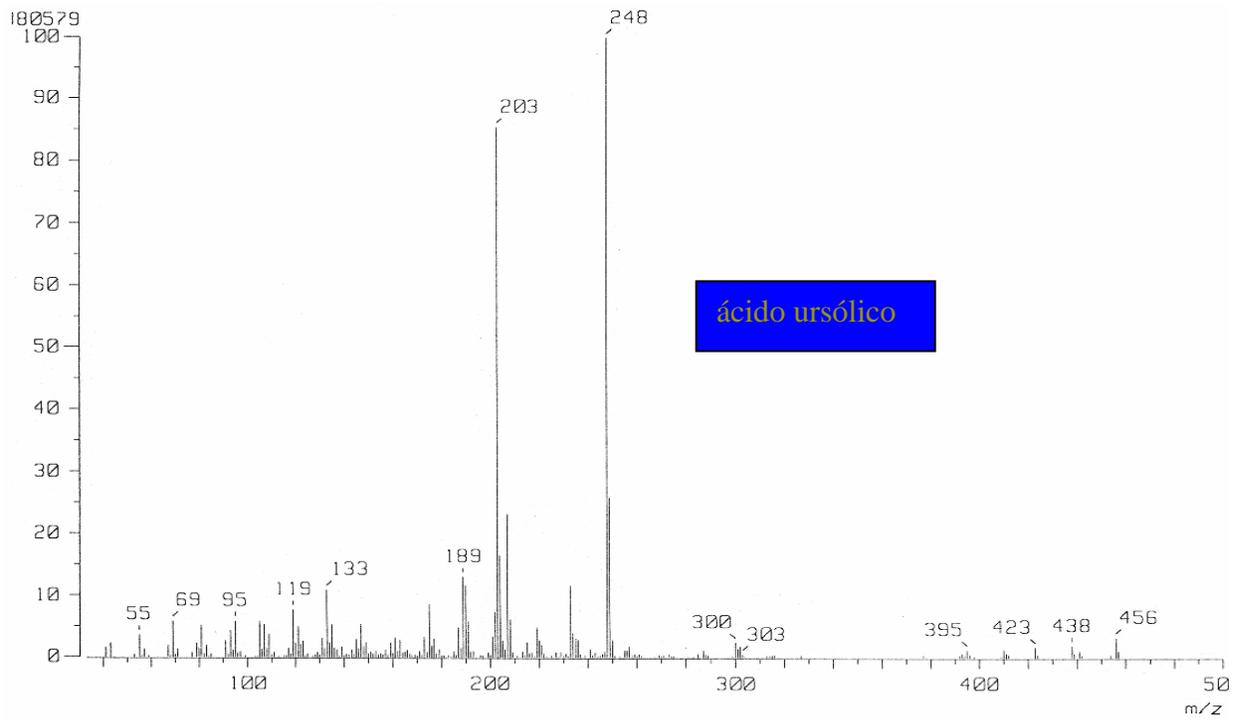
Espectro 1. Espectro de RMN-¹H de la partenólida



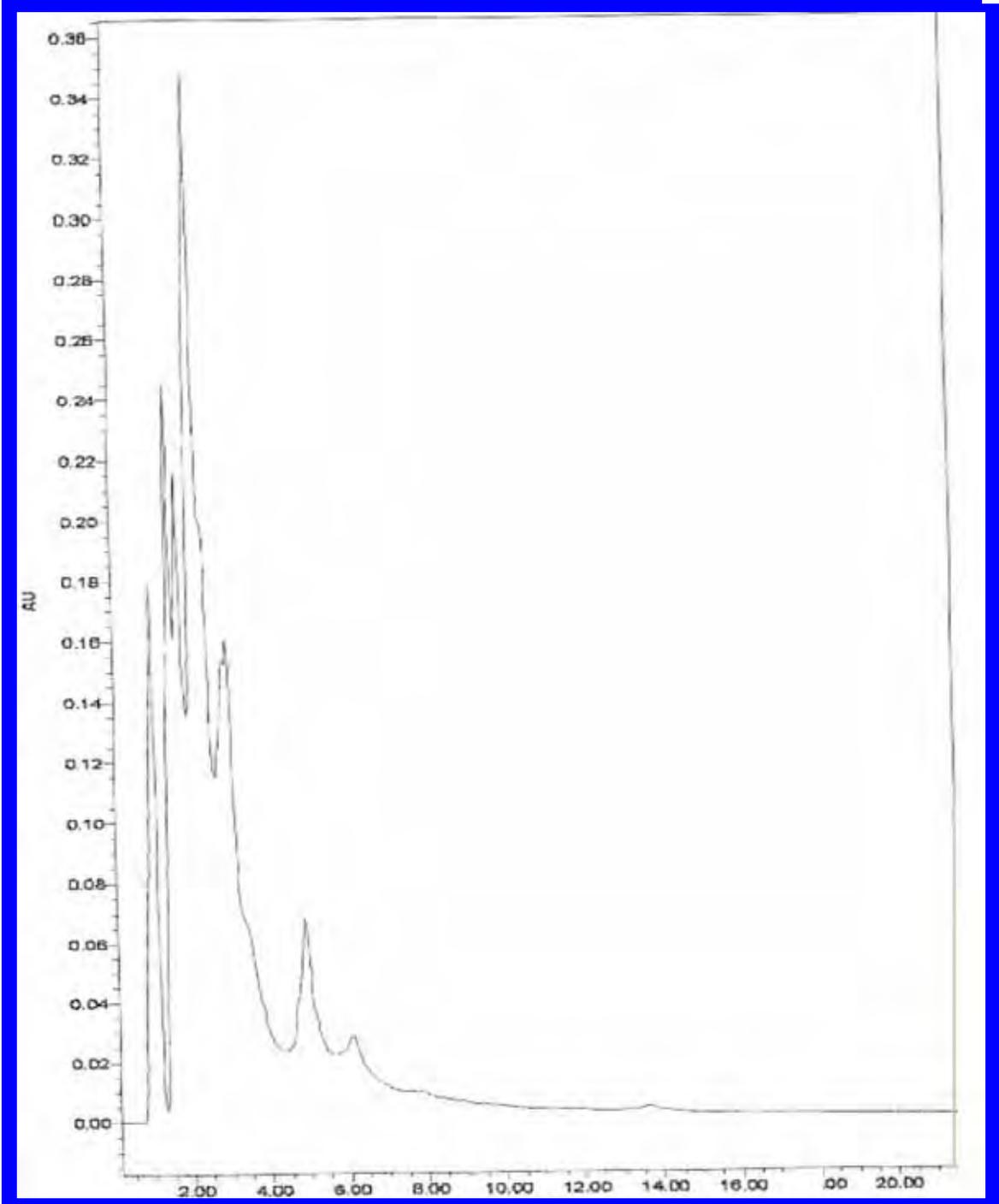
Cromatograma 6. Compuesto detectado en la fracción F8/3-F8/6.



Espectro 3. Espectro de masas del ácido ursólico obtenido de la fracción 8



Cromatograma 7. Análisis en HPLC de la F2 del extracto metanólico a 5 mg/mL



ABREVIATURAS

PAS	Ácido aminosalicílico
AK	Amikacina
CM	Capromicina
CS	Cicloserina
CPX	Ciprofloxacina
C	Clofacimina
CMI	Concentración mínima inhibitoria
CG-EM	Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de Masas
CCF	Cromatografía en capa fina
CC	Cromatografía en columna
DMSO	Dimetil sulfoxido
¹⁴ C ₂	Dióxido de Carbono-14
DOTS	Directly Observed Treatment Short-Course
DR	Drogoresistencia
EM-IE	Espectrometría de Masas por Impacto Electrónico
S	Estreptomicina
E	Etambutol
ETM	Etionamida
FR	Fármaco resistencia
FN	Fase Normal
FDA	Food Drug Administration
FM	Fórmula Molecular
°C	Grados celsius
IMSSM	Herbario del Instituto Mexicano del Seguro Social de México
IR	Infrarrojo
IC	Índice de Crecimiento
H	Isoniazida
K	Kanamicina
L	Microlitros
mg	Miligramos
mg/mL	Miligramos por mililitro
mL	Mililitro
mm	Milímetros
m	Milimicras
MDR	Multidrogoresistencia
O	Ofoxacina
OMS	Organización Mundial de la Salud
PM	Peso Molecular
Z	Pirazinamida
%	Por ciento
PCT	Programa de Control de Tuberculosis
P	Protionamida
RA	Reactivo analítico
RMN-C ¹³	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13
RMN-H ¹	Resonancia Magnética Nuclear Protónica
R	Rifampicina
SIDA	Síndrome inmunodeficiencia adquirida
T _R	Tiempo de Retención
TAES	Tratamiento Acortado Estrictamente Supervisado
TB	Tuberculosis
TB-MDR	Tuberculosis Multidrogoresistencia
UICTEP	Unión Internacional Contra la Tuberculosis y Enfermedades Pulmonares
VIH	Virus Inmunodeficiencia Humana