



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA

“ESTUDIO QUIMICO DE *Juniperus communis* L.
(*Cupressaceae*) CON ACTIVIDAD
ANTIMICOBACTERIANA *IN VITRO*”

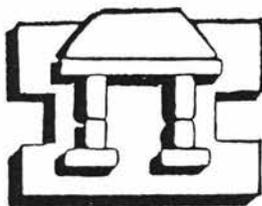
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A :

ALEJANDRO FRAGOSO ALVAREZ



IZTACALA

DIRECTORA DE TESIS: DRA. MA. ADELINA JIMENEZ ARELLANES

MEXICO, D. F.

2003



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.

*J*URADO ASIGNADO

Presidente	Dr. Rafael Lira Saade
Vocal	Dra. Ma. Adelina Jiménez Arellanes
Secretario	M. en C. Gloria Garduño Solórzano
1er suplente	Biol. Edith López Villafranco
2do suplente	Biol. Ma. de los Ángeles García Gómez

*T*UTOR

Dra. Ma. Adelina Jiménez Arellanes

*S*USTENTANTE

Alejandro Fragoso Álvarez

*D*EDICATORIAS

- A mis padres *Pedro Fragoso Galindo* y *Concepción Álvarez Jasso* por dedicarme todo su tiempo y brindarme los primeros conocimientos en mi vida, pero por sobretodo el darme unos hermanos maravillosos.
- A mi hermana *Emma Laura* por cuidar de toda la familia y por darnos lo mejor de su vida. Si hubiera alguien consentido en la familia, estoy seguro que todos votaríamos por ti, por que eres un ejemplo para todos y por que para mi siempre serás como una segunda madre.
- A mi hermano *Pedro*, el cual mostró un corazón bondadoso y siempre me brindo su apoyo incondicionalmente. Gracias hermano por que siempre he podido contar contigo.
- A mi hermano *José Luis*, por apoyarme en mis estudios, por que siempre se preocupo por mi y por enseñarme lo que significa un hermano. Por que aún recuerdas con alegría cuando ibas por mi al kinder. Gracias por todo hermano.
- A mis hermanos *Miguel, Pablo, Carlos* y *Hugo* con los cuales conviví la mayor parte de mi niñez y que en esta ocasión, no quiero separarlos para decirles gracias por todas las alegrías que compartieron junto a mi, por esos momentos de apoyo que me brindaron y por sentirme parte importante de su vida.
- A mis sobrinos *José Luis, Jonathan, Miguel Ángel, Richtopher Edgar, Leslie Elizabeth, Karen Beatriz, Karla Lidé, Pablo, Víctor Pedro, Brian, Brandon*, y a la pequeña *Daniela Sarahi* por traer alegrías y esperanzas a la familia Fragoso.

Si volviera a nacer pediré que me concediera una dicha de tenerlos nuevamente como mi familia, ya que me siento orgulloso de cada uno de ustedes.

- Al señor *Eduardo David* y *Rosy Rivera* por el apoyo incondicional que me brindaron, por compartir momentos importantes de su vida, muchas gracias, por que son parte importante de mi vida.
- A la familia *Escalera* (*Angelica, Gino* y mi amiguito *Jaeh*) por brindarme su afecto y cariño, a todos ustedes los aprecio y los quiero.
- A la mujer que se acerco a mi vida en una reunión de amigos y que hoy no se ha separado de mi lado, a la mujer que le debo de agradecer mucho porque fue parte importante en la elaboración de esta tesis, a mi Alma que siempre me apoya en todo. Gracias por todo, chiquita: *Alma Delia David Rivera.*

*A*GRADECIMIENTOS

- A la *Dra. Adelina Jiménez Arellanes* por darme la oportunidad de realizar mi tesis en el Hospital de Pediatría del Hospital Centro Médico Nacional Siglo XXI, por su apoyo y comentarios realizados a lo largo de este trabajo.
- A la *Dra. Ruth Parra* del Laboratorio de Parasitología del Hospital Centro Médico Nacional Siglo XXI, por su colaboración en los ensayos biológicos de este trabajo.
- Al Jurado designado para la revisión de mi tesis: *Dr. Rafael Lira Saade, M. en C. Gloria Garduño Solórzano, Biol. Edith López Villafranco* y *Biol. Ma. de los Ángeles García Gómez*.
- A la *M. en C. Abigail Aguilar Contreras* por su colaboración en la identificación y registro de la planta seleccionada para este estudio.
- A mis Amigos de la Preparatoria y Compañeros del Equipo de Buceo ("Mocodivers"), con los cuales compartí buenos momentos de mi vida: *Hugo, José Luis, Enrique, Francisco, Izhar, Juan* (frijol) y *Alberto* (Toby).
- A mis compañeros de la FES Iztacala por su amistad que me han brindado: *Ignacio* (Nacho), *Jesús, Gabriel, Adrián Elier, Agustín, Yemin, Roberto* (chibebo), y a los "choros" : *Miguel, Hugo, Horacio, Emilio, Fernando* y *Ricardo* (Tiny).
- Finalmente, a todas las personas que convivieron conmigo en el laboratorio y que hicieron muy grata mi estancia en el hospital. De manera especial a *Alejandro Gutiérrez*.

Gracias a la Vida

Gracias a la Vida
que me ha dado tanto.

Me dio dos luceros
que cuando los abro,
perfecto distingo
lo negro del blanco
y en el alto cielo
su fondo estrellado
y en las multitudes
la mujer que amo.

Gracias a la Vida
que me ha dado tanto.

Me ha dado el sonido
y el abecedario
con el, las palabras
que pienso y declaro
madre, amigo, hermano
y luz alumbrando
la ruta del alma de la que
yo amo.

Gracias a la Vida,
que me ha dado tanto.

Me dio el corazón
que agita su marco
cuando miro el fruto

del cerebro humano,
cuando miro al bueno
tan lejos del malo,
cuando miro el fondo
de sus ojos claros.

Gracias a la Vida,
que me ha dado tanto.

Me ha dado la risa
y me ha dado el llanto.
así yo distingo
dicha de quebranto,
los dos materiales
que forman mi canto,
el canto de ustedes
que es el mismo canto,
el canto de todos
que es mi propio canto.

Gracias a la Vida

Gracias a la Vida

Alberto Cortez



El desarrollo experimental del estudio se realizó en la **Unidad de Investigación Médica en Farmacología de Productos Naturales** del Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), con la asesoría de la Dra. Adelina Jiménez Arellanes.

A BREVIATURAS

¹⁴ C	Carbono catorce
°C	Grados centígrados
ccf	Cromatografía en capa fina
¹⁴ CO ₂	Dióxido de carbono catorce
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
CMIs	Concentraciones Mínimas Inhibitorias
DMSO	Dimetilsulfóxido
DOTS	Directly Observed Treatment Short Course
EM	Espectro de Masas
EMB	Etambutol
g	Gramo
GI	Índice de Crecimiento
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Resolución
hrs	Horas
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
IMSSM	Herbario IMSS
INH	Isoniazida
IR	Infrarrojo
kg	Kilogramo
LB	Liebermann-Burchard
<i>M. avium</i>	<i>Mycobacterium avium</i>
<i>M. bovis</i>	<i>Mycobacterium bovis</i>
<i>M. fortuitum</i>	<i>Mycobacterium fortuitum</i>
<i>M. intracellulare</i>	<i>Mycobacterium intracellulare</i>
<i>M. tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MABA	Micrométodo Colorimétrico de Alamar Azul
MDR	Multidrogoresistencia
MDRTb	Tuberculosis Multidrogoresistente
NP y PEG	Difenilboriloxietilamina y Polietilenglicol
O ₂	Oxígeno
OADC	Ácido Oleico, Albúmina, Dextrosa y Catalasa
OMS	Organización Mundial de la Salud
PAS	Ácido p-aminosalicílico
PM	Peso molecular
PZA	Pirazinamida
RFM	Rifampicina
RMN-C ¹³	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13
RMN-H ¹	Resonancia Magnética Nuclear Protónica o de Hidrógeno
S	Streptomycin

SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
TAES	Tratamiento Acortado Estrictamente Supervisado
Tb	Tuberculosis
Tween 20 o 80	Polioxietileno sorbitan mono-laurato u oleato
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
UV	Ultravioleta
$\mu\text{g/mL}$	Microgramos sobre mililitros
μL	Microlitros

ÍNDICE

	página
RESUMEN IZT.	1
1) INTRODUCCIÓN	3
1.1) ANTECEDENTES DE LAS PLANTAS MEDICINALES EN MÉXICO	3
1.2) PLANTAS MEDICINALES COMO FUENTE POTENCIAL DE COMPUESTOS ANTITUBERCULOSOS	6
1.3) GENERALIDADES DE LA TUBERCULOSIS	9
1.4) GENERALIDADES DE <i>Juniperus communis</i>	14
a) Aspectos botánicos	
b) Aspectos químicos	
c) Aspectos etnobotánicos	
d) Aspectos biológicos	
2) JUSTIFICACIÓN	21
3) OBJETIVOS	22
Objetivo General	
Objetivos Particulares	
4) METODOLOGÍA	23
1) Selección	
2) Colecta e Identificación del material vegetal	

- 3) Operaciones preeliminares y preparación de los extractos
- 4) Ensayos biológicos
- 5) Fraccionamiento químicos
- 6) Aislamiento de los compuestos activos
- 7) Caracterización de los compuestos activos

5) RESULTADOS Y DISCUSIÓN	34
6) CONCLUSIONES	51
7) CITAS BIBLIOGRÁFICAS	53
8) ANEXO DE ESPECTROS	63

RESUMEN

La especie *Juniperus communis* L. (Cupressaceae) es conocida popularmente como enebro o sabino, y en México es utilizada para tratar problemas de vías respiratorias, tos y pulmonía. Sin embargo, no existen estudios farmacológicos o químicos que apoyen las propiedades atribuidas a esta especie, por lo que el objetivo del presente trabajo fue obtener los compuestos responsables de inhibir el crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, presentes en el extracto metanólico de *J. communis*. El extracto se obtuvo vía maceración con metanol y adicionalmente con hexano. Posteriormente, los extractos fueron objeto de evaluación biológica por el micrométodo colorimétrico de alamar azul (MABA) y por el método radiorespirométrico Bactec, empleando como microorganismos de prueba *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv y *M. avium*. El extracto metanólico fue objeto de un fraccionamiento químico-biodirigido empleando cromatografía en columna abierta y como sistemas de elución mezclas de solventes con grado creciente de polaridad; mientras que el extracto hexánico es objeto de otra investigación. Las muestras problema fueron solubilizadas en DMSO y evaluadas a 100 µg/mL. Los resultados obtenidos indicaron que la evaluación del extracto metanólico de *J. communis* a 100 µg/mL inhibe en un 60% el crecimiento de *M. tuberculosis* por el método radiorespirométrico Bactec, y por el método

colorimétrico de alamar azul a 50 µg/mL. El fraccionamiento del extracto metanólico permitió la obtención de 18 grupos de fracciones primarias, mismas que al ser evaluadas por el método radiorespirométrico, empleando *M. tuberculosis* H37Rv, indicaron que las fracciones de polaridad intermedia (F 3-5, F 6-7 y F 8) inhibieron el crecimiento de la micobacteria en un 90-99% a 100 µg/mL. Las fracciones polares (F-10, F-13, F-15 y F-17) presentan porcentajes de inhibición menores al 30% a la misma concentración. De las fracciones activas se aislaron dos compuestos mayoritarios que fueron caracterizados químicamente como diterpenos. La actividad antimicobacteriana demostrada en el presente estudio químico-biodirigido de *J. communis* permite considerar a esta especie como posible fuente potencial de compuestos activos contra *M. tuberculosis*.

1) *I*NTRODUCCIÓN

1.1) **I**MPORTANCIA DE LAS PLANTAS MEDICINALES EN MÉXICO

En la actualidad en México, la medicina tradicional popular es utilizada por al menos dos terceras partes de la población para tratar y curar diversas enfermedades. Cabe mencionar, que aproximadamente 109 plantas medicinales de las 140 más utilizadas por la población son empleadas para curar problemas gastrointestinales, de la piel y respiratorias (Rojas *et al.*, 2001).

El uso de las plantas medicinales como un recurso para el alivio de las enfermedades, puede trazar una regresión de cientos o miles de años. Los documentos más antiguos que contienen una buena parte de los conocimientos sobre la medicina tradicional mexicana, que registran algunas de las plantas utilizadas para tratar enfermedades y además anexa sus ilustraciones, podemos mencionar a los códices de la Cruz-Badiano y el Códice Florentino (Gallardo, 1983).

Por otra parte, la medicina tradicional popular no comparte los principios de la medicina moderna. Sin embargo, se han evaluado algunas plantas medicinales

encontrándose que casi 85% de estos remedios vegetales contienen sustancias químicas responsables del efecto curativo para el cual se utilizan. Las plantas contienen miles o millones de constituyentes, producto de su metabolismo primario y secundario (Farnsworth *et al.*, 1989; Testa *et al.*, 1993).

El proceso que se lleva a cabo para el aislamiento de los principios activos y la evaluación de la actividad farmacológica, es por lo tanto, factible y requiere de una colaboración multidisciplinaria entre botánicos, químicos, farmacólogos, toxicólogos y otros (Testa *et al.*, 1993).

Después de siglos del uso empírico de las preparaciones herbolarias, el primer aislamiento de los principios activos fueron los alcaloides como la morfina aislada del fruto de la amapola (*Papaver somniferum*) con propiedades narcóticas, la estrocnina extraída de las semillas de la nuez vómica (*Strychnos nux-vomica*) son utilizadas para problemas visuales y auditivos; la quinina aislada de la corteza del árbol de la quina (*Cinchona*), fue por más de tres siglos la única sustancia disponible para tratar la malaria (Farnsworth *et al.*, 1989; Testa *et al.*, 1993; Balandrin *et al.*, 1993; Newman *et al.*, 2000).

A principios del siglo XIX, se inició una nueva era en la investigación de las plantas medicinales, como fuente potencial de compuestos biológicamente activos, ya que se prepararon los primeros derivados. Por ejemplo la heroína se preparó a partir de la morfina, y algunos productos naturales constituyeron materia prima para

encontrar nuevos fármacos, así como la cocaína que se extrae del arbusto *Erythroxylum coca* utilizado como anestésico local o como estimulante del Sistema Nervioso Central y el dicumarol es utilizado como anticoagulante y proviene del coumarina, producto natural presente en una gran cantidad de plantas (Farnsworth *et al.*, 1989; Testa *et al.*, 1993; Balandrin *et al.*, 1993; Newman *et al.*, 2000).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) señala que cerca del 80% de los habitantes a nivel mundial hacen uso de la medicina tradicional y que al menos el 25% de los fármacos administrados en los Estados Unidos y Canadá, se elaboraban a partir de productos naturales o su principio activo provienen de plantas superiores (Farnsworth *et al.*, 1989; Balandrin *et al.*, 1993; Eloff, 1998).

Al presentarse un resurgimiento de enfermedades que se creían erradicadas como la malaria, parasitosis diversas, la tuberculosis, la lepra, el sarampión, así como la creciente incidencia del cáncer y el VIH (Virus de Inmunodeficiencia Humana), entre otras enfermedades que comprometen el sistema inmunológico; se ha intensificado la búsqueda de nuevos compuestos útiles en la terapéutica, enfocándose principalmente en las plantas que tienen uso importante en la medicina tradicional popular (Rojas *et al.*, 2001).

1.2) **P** LANTAS MEDICINALES COMO FUENTE POTENCIAL DE COMPUESTOS ANTITUBERCULOSOS

La tuberculosis (Tb) es un serio problema de salud, ya que es una enfermedad contagiosa y epidémica en algunas regiones del mundo (Lall y Meyer, 1999). Dada la problemática que representa y la aparición de cepas multidrogoresistentes de *Mycobacterium tuberculosis* (MDRTb), es urgente la necesidad de contribuir a la búsqueda de compuestos activos y estructuras químicas novedosas para el desarrollo de nuevas drogas útiles en el tratamiento de esta enfermedad. La búsqueda de compuestos activos contra la Tb se realiza en fuentes de origen natural (Puyvelde *et al.*, 1994; Cantrell *et al.*, 1996; 1998a; 1999a; 1999b; Ulubelen *et al.*, 1997; Lall y Meyer, 1999) y sintéticos (Tomioka *et al.*, 1999; Orme *et al.*, 2001). Las principales fuentes de origen natural, lo constituyen las plantas medicinales, las cuales han sido sometidas a evaluaciones antimicobacterianas *in vitro*, utilizando como microorganismos de prueba *M. tuberculosis*, *M. avium* y en algunas ocasiones se han utilizado cepas resistentes.

Estos estudios han permitido demostrar que numerosos extractos íntegros inhiben el crecimiento de los microorganismos de prueba (Cantrell *et al.*, 1998a; 1999b; 2001). Los esquemas que siguen para realizar la búsqueda de compuestos con actividad antimicobacteriana y farmacológica en general se basan en seleccionar la especie objeto de estudio, utilizando el criterio etnobotánico y realizar el estudio fitoquímico biodirigido para aislar los compuestos responsables de la actividad

biológica y la caracterización química de estos compuestos se realiza mediante el análisis de los espectros de RMN-H¹ (Resonancia Magnética Nuclear Protónica), RMN-C¹³ (Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13) y EM (Espectro de Masas) (Hostettman *et al.*, 1997).

Investigaciones recientes con mira a explorar el potencial antimicrobiano de plantas medicinales han demostrado que varios tipos de metabolitos secundarios presentan esta actividad. Entre los metabolitos secundarios podemos mencionar a los sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos y derivados del fitol, con importante actividad antimicrobiana (Cantrell, 2001). En primer lugar mencionaremos a los sesquiterpenos como la costunolida extraída de la planta *Saussurea lappa* con un CMI de 32 µg/mL (Fischer *et al.*, 1998). De *Ambrosia confertiflora* se extrajeron los sesquiterpenos reinosina, santamarina, deacetilconfertiflorina con un CMI de 64, 64, 128 µg/mL, respectivamente (Cantrell *et al.*, 2001). La partenolida aislada de *Magnolia grandiflora* con un CMI de 16 µg/mL y la aromaticina obtenida de *Helenium aromaticin* con un CMI similar al anterior. Cabe hacer la aclaración, que en la literatura se citan numerosos sesquiterpenos aislados de diferentes especies medicinales con importante actividad antimicrobiana.

Otro grupo de metabolitos que han demostrado actividad antimicrobiana lo constituyen los diterpenos como el 12-demetilmulticaulina (CMI = 0.46 µg/mL), multicaulina (CMI = 5.6 µg/mL), el 12-demetilmultiortoquinona (CMI = 1.2 µg/mL),

multiortoquinona (CMI = 2.0 $\mu\text{g/mL}$), 12-metil-5-dehidrohorminona (CMI = 1.2 $\mu\text{g/mL}$), el 12-metil-5-dehidroacetilhorminona (CMI = 0.89 $\mu\text{g/mL}$) y la salvipimorona (CMI = 7.3 $\mu\text{g/mL}$), todos estos compuestos fueron aislados de *Salvia multicaulis* (Cantrell, 2001) y los ácidos juniperexcelsico y sandracopimarico con un CMI de 14.4 y 15.0 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, aislados de las bayas de *Juniperus excelsa* (Topçu *et al.*, 1999).

Además, otros terpenoides con buena actividad antimicobacteriana son los triterpenos como el ergosterol-5,8-endoperoxido extraído de *Ajuga remota* con un CMI de 1 $\mu\text{g/mL}$ (Cantrell *et al.*, 1999a). El 12 β -hidroxikulactona, 6 β -hidroxikulactona y el kulonato de *Melia volkensii*, presentan un CMI de 16, 4, 16 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (Cantrell *et al.*, 1999b). De *Borrchia frutescens* se extrajeron los triterpenos (24R)-24, 25-epoxicicloartan-3-ona, el (3 β ,24R)-4,25-epoxicicloartan-3-ol, el (3 β ,24R)-24,25-epoxicicloartan-3-ol acetato y el (23R)-3-oxolanosta-8,24-dien-23-ol, los cuales mostraron CMIs de 8, 8, 128 y 64 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (Cantrell *et al.*, 1996). De la planta *Lucas volkensii* se extrajo el fitol con un CMI de 2 $\mu\text{g/mL}$ y sus derivados sintéticos como fitol acetato, fitol metil éter y fitol amina, presentaron CMIs de 16, 16 y 32 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (Rajab *et al.*, 1998; Cantrell *et al.*, 2001). Todos estos compuestos fueron evaluados por el método radiorespirométrico Bactec y empleando *M. tuberculosis* H37Rv.

Es importante mencionar, que en la actualidad la evaluación antimicobacteriana de sustancias de origen natural y/o sintéticos se puede determinar mediante el

empleo de diversos ensayos, siendo los más utilizados, el método radiorespirométrico Bactec 460 (Lee y Heifets, 1987; Fischer, 1996; Cantrell *et al.*, 1998a; 1999a), el micrométodo colorimétrico de alamar azul (MABA) (Pietro *et al.*, 2000; Jiménez-Arellanes *et al.*, 2002) y el método de proporciones en agar (Lall y Meyer, 1999).

Por otra parte, con la finalidad de contribuir en la búsqueda de compuestos de origen vegetal con actividad antituberculosa, el presente trabajo propone realizar la investigación fitoquímica biodirigida del extracto metanólico de *Juniperus communis* L. Este trabajo se llevó a cabo tomando en cuenta un ensayo preliminar realizado con los extractos metanólico y hexánico de las partes aéreas de *J. communis*. Los resultados indicaron que los extractos inhiben el crecimiento de *M. tuberculosis* H37Rv a la concentración de 50 y 200 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente, por el método MABA y por el método BACTEC los extractos presentan un 66 % y 86 % de inhibición sobre el crecimiento de la misma bacteria a la concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$.

1.3 GENERALIDADES DE LA TUBERCULOSIS

La tuberculosis (Tb) en el humano es producida principalmente por el patógeno intracelular *Mycobacterium tuberculosis* variedad *hominis* y en la actualidad es también ocasionada por *M. avium*, *M. fortuitum*, *M. intracellulare* y *M. bovis*. La

incidencia de la Tb es debida a la inmunodepresión y de manera especial por la presencia del SIDA en cuyos casos *M. avium* se ha convertido en países como Estados Unidos en un patógeno oportunista frecuente y de difícil tratamiento variando exclusivamente con la capacidad infectiva de la persona enferma y de la proximidad del contacto (Casal *et al.*, 1999; Manual de Procedimientos, 1999).

M. tuberculosis es una bacteria estrictamente aeróbica que vive mejor en medios con tensiones fisiológicas altas de O₂ y pH de 6.5 a 7, se multiplica lentamente, cada 14 a 16 horas y no produce toxinas o sustancias químicas nocivas al organismo (American Thoracic Society, 1983).

La tuberculosis es una enfermedad que ataca principalmente los pulmones, conociéndose a esta como tuberculosis pulmonar (enfermedad más común), pero se pueden presentar otros tipos como la extrapulmonar, la meníngea, la renal, la ósea, la genitourinaria y la gastrointestinal (American Thoracic Society, 1983; Ostrosky-Zeichner *et al.*, 2000).

La enfermedad se transmite por vía aérea, donde el enfermo bacilífero contagia a la persona sana al aspirar el bacilo, alojándose en el pulmón, dando lugar a un proceso inflamatorio agudo que se traduce clínicamente como un cuadro gripal que dura aproximadamente una semana. Este fenómeno tiene dos posibilidades: la diseminación precoz abortiva, que en el 99% de los casos la micobacteria entra en circulación venosa o linfática, dejando una siembra de bacilos vivos virulentos

en casi todos los órganos y puede sobrevivir hasta 50 años, a esto se le conoce como primoinfección tuberculosa. La segunda, es la diseminación precoz y progresiva que evoluciona a enfermedad tuberculosa, siendo la meningitis tuberculosa la forma más grave y es la que causa la mayor mortalidad (Manual de Procedimientos, 1999).

Reportes de la OMS, indican que la tuberculosis ocasiona de dos a tres millones de muertes anuales en el mundo y se estima que una tercera parte de la población (2 billones de personas) han sido expuestas al bacilo de la Tb y esta en riesgo de desarrollar la enfermedad (Raviglone *et al.*, 1995; Dye *et al.*, 1999; Orme *et al.*, 2001). Por otro lado, la presencia de cepas multidrogoresistentes va en aumento (Taylor *et al.*, 1999), lo que hace que la enfermedad sea cada vez más difícil de tratar. Así por ejemplo, la resistencia a por lo menos una droga a aumentado en un 50 % en Dinamarca y Alemania desde 1996 y se ha duplicado en Nueva Zelanda. En Estonia, el porcentaje de cepas multidrogoresistentes, es decir que no responden al tratamiento convencional con fármacos de primera línea como isoniazida y rifampicina, aumentó del 13.5 % en 1997 a 18.1 % en 1999. Los casos de Tb están aumentando en China, India, Irán, Mozambique, Rusia, Israel, Italia y México (Raviglone *et al.*, 1995; Dye *et al.*, 1999; Taylor *et al.*, 1999; Granich *et al.*, 2000).

En México, la Tb pulmonar esta clasificada como la decimonovena causa de mortalidad, con 3229 defunciones por año, mostrando un incremento elevado en

los últimos cinco años. Las entidades federativas con mayor incidencia son: Coahuila, Guerrero, Jalisco, Chiapas, Durango, Veracruz, Tamaulipas, Tabasco, Nayarit, Nuevo León, Distrito Federal, Baja California, Sinaloa, Oaxaca y Puebla. Cabe señalar, que en este último estado, el municipio de Huauchinango, un laboratorio piloto registro 250 casos por cada 10 000 habitantes (Granich *et al.*, 2000; Dirección General de Estadística e Informática de la Secretaría de Salud, 2001). Reportes del 2002 del Boletín Semanal de Vigilancia Epidemiológica del IMSS (semana 51) registran 4 311 casos de Tb pulmonar y 979 casos de otro tipo. Por otro lado la DGE, para el 2001 reporto 12 573 casos de Tb y para la semana 39 del 2002 se tenían 11 467 casos siendo los estados de Veracruz, Nuevo León, Guerrero, Baja California Norte, Chiapas y Tamaulipas con mayor índice (Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica, 2002; Boletín Semanal de Vigilancia Epidemiológica, 2002).

El incremento de los casos se debe a diversos factores entre los que se pueden citar: a) fracaso de los tratamientos no supervisados que conlleva al abandono del mismo, b) migración de personas infectadas, c) problemas socioeconómicos, d) aparición de cepas multidrogoresistentes y e) la presencia de enfermedades que comprometen el sistema inmunológico como el SIDA, cáncer, diabetes (Pilheu, 1998; García-García *et al.*, 1998; Granich *et al.*, 2000; Alvarez-Gordillo *et al.*, 2000; Orme *et al.*, 2001).

La OMS en 1993 considera a la Tb como un problema reemergente, de tal manera que su control se ha implementado en el programa Tratamiento Acortado Estrictamente Supervisado conocido en México y en Latinoamérica como **TAES** y en otros países como EUA es conocido como **DOTS** (Directly Observed Treatment Short-Course), este programa ha demostrado una efectividad del 80% contra los casos de Tb en Estados Unidos y México; sin embargo, la presencia de cepas multidrogoresistentes (MDR) son difíciles de tratar y erradicar (Inderlied, 1994; Mandell y Sande, 1996; García-García *et al.*, 1998).

El problema de la fármacoresistencia agrava el tratamiento de la Tb por la presencia de cepas multidrogoresistentes, siendo necesaria la combinación de hasta cinco fármacos de primera línea para un tratamiento inicial (Inderlied, 1994; Granich *et al.*, 2000). En la actualidad, el tratamiento recomendado por la OMS es el uso supervisado de fármacos de primera línea como son: isoniazida (H), rifampicina (R), pirazinamida (Z), etambutol (E) o estreptomina (S). Estos fármacos son administrados a pacientes que nunca han recibido tratamiento, y al que lo reanuda después del primer abandono se les debe de administrar durante 25 semanas, hasta completar 105 dosis divididas en dos etapas: la fase intensiva con 60 dosis de (H, R, Z, E) y la fase de sostén con 45 dosis (3 veces a la semana con H, R).

Además, se cuenta con fármacos de segunda línea siendo: canamicina, capreomicina, amikacina, ácido p-aminosalícilico (PAS), etionamida, cicloserina,

quinolonas; los cuales se utilizan cuando existe una resistencia microbiana contra los agentes de primera línea. Cabe aclarar que el uso indebido de cualquiera de estos fármacos puede producir reacciones adversas como la alteración de la visión, vértigo, hipoacusia, dermatosis, gota, hepatitis, neuropatía; entre otras reacciones (American Thoracic Society, 1994; Inderlied, 1994; Núñez-Rocha *et al.*, 2000) y el costo de este tratamiento se incrementa considerablemente.

1.4) **G**ENERALIDADES DE *Juniperus communis*

A) ASPECTOS BOTÁNICOS:

Juniperus communis L. pertenece a la familia Cupressaceae. Es un arbusto bajo de 1 ó 2 m. de altura, muy rara vez aparece como arbolito con copa coniforme de hasta 15 m. Tiene hojas que persisten varios años, 10 a 20 mm de largo x 1 a 2 mm de ancho, punzantes, verdes grisáceas, en verticilos de tres piezas, con una franja blanca azulada en el haz. Las flores son dioicas, las masculinas en estróbilos ovoides amarillos y las femeninas son verdosas. Florece en primavera y no maduran sus gálbulos hasta el tercer año. Los gálbulos femeninos cuando maduran dan lugar a conos de 6 a 7 mm; con pedúnculos cortos, enmarcados, esféricos, formados por tres escamas seminíferas suculentas y soldadas, al principio verdes y el segundo año azules negruzcas (Fig. 1). *J. communis* se distribuye en Europa, específicamente sobre las montañas del sur en Asia (excepto en el oeste del Himalaya), en el noroeste de África y en América del

Norte, además de ser una especie naturalizada en México (Font, 1980; William y Thompson, 1981).

B) ASPECTOS QUÍMICOS:

La especie *J. communis* ha sido objeto de diversas investigaciones químicas donde se han aislado compuestos de diferentes partes de la planta, así como por ejemplo podemos citar que del aceite esencial se han aislado monoterpenos (α y β pineno, limoneno, terpinen 4-ol, sabineno, mirceno, 4-acetil-1,4-dimetil-1-ciclohexano, cineol), diterpenos (sugiol, xantoperol, ácido comúnico, ácido isocupresico, manool, 3 α -hidroximanool, 3 α -hidroxi-12, 13E-biformena), sesquiterpenos (α -candinol, (-)- α -candinol, β -elemen-7 α -ol, junenol, junicedrol, juniperol, longifoleno, tuyopseno, pigmeína, cariofileno y candinenos), alcoholes terpénicos. De manera adicional también se han aislado compuestos glucósidicos, ácidos orgánicos, lignanos, ceras, resinas, taninos y flavonoides de diferentes partes de la planta (Font, 1980; William y Thompson, 1981; Duke, 1988; Loew *et al.*, 1991; Glasby, 1991; Kagawa *et al.*, 1993).



EN. JUNIPERUS COMMUNIS L.

Fig. 1. *Juniperus communis*; 1, rama de una planta masculina con flores del sexo correspondiente; 2, flor masculina; 3, grano de polen; 4, rama de una planta femenina con flores del sexo correspondiente y gábulos de uno y dos años; 5, flor femenina con gotas receptoras de polen en los primordios seminales; 6, gábulos maduros; 7, corte transversal del gábulos maduros; 8, semilla; 9, flor. Foto: Kleinen Hexenküche.

C) ASPECTOS ETNOBOTANICOS:

En México, la planta se conoce popularmente como enebro, nebro, sabino y como Yoshu-nezu en Japón o hayrest en Estados Unidos (Font, 1980; William y Thompson, 1981; Frohne y Pfander, 1984). En la medicina tradicional de nuestro país, la planta es muy utilizada para tratar problemas de vías respiratorias, tos,

pulmonía. A nivel mundial, *J. communis* es ampliamente utilizada para tratar diversos padecimientos como el cáncer, diarrea, bronquitis, pulmonía, tos, resfriado, influenza, tosferina, parálisis, presión arterial, sistema circulatorio, tuberculosis, artritis, arteriosclerosis, gota, malestares estomacales, estimula el apetito, reducción de los niveles de colesterol, verrugas, problemas dermatológicos, afecciones en el oído, cálculo, trastornos de la menopausia, enfermedades urogenitales y venéreas, entre otros padecimientos (Font, 1980; William y Thompson, 1981; Duke, 1988; Turner, 1988; Loew *et al.*, 1991).

Además, en México los frutos se preparan en conserva y como condimento de distintos tipos de comida, utilizándolos como sustitutos de la pimienta (Loew *et al.*, 1991).

D) ASPECTOS BIOLÓGICOS:

Juniperus communis ha sido objeto de algunas investigaciones biológicas. Por ejemplo, sobre la actividad antibacteriana, se reporta que la mezcla de *J. communis*, *Urtica dioica*, *Achillaea millefolium* inhibe el crecimiento de *Streptococcus mitis* con una concentración mínima inhibitoria (CMI) de 1 mg/mL resultando inactiva para *Streptococcus mutans*, *Campylobacter rectus*, *Veillonella parvula* y *Fusobacterium nucleatum*. Además, presenta una CMI de 10 mg/mL contra *Actynomyces naeslundii* y *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (Van der Weijden *et al.*, 1998).

En investigaciones realizadas sobre el posible efecto contra la diabetes se demostró que el extracto acuoso de los gábulos de *J. communis* retarda el desarrollo de esta enfermedad en ratas tratadas con estreptozotina (Swanston-Flatt *et al.*, 1990). Por otro lado, el extracto etanólico de las gábulos de *J. communis* (20 mg/kg) presentó efecto hipoglucemiante, bajando los niveles de glucosa entre un 10 a 20% (Petlevski *et al.*, 2001).

La planta ha sido objeto de investigaciones adicionales donde se ha explorado su efecto como agente antimicrobiano y antifúngico. El extracto metanólico de las ramas de *J. communis* inhibió el crecimiento de *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Mycobacter phlei*, *Pseudomonas aeruginosa* H187, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* (McCutcheon *et al.*, 1992) y del mismo extracto, se aisló un triterpeno glicosídico con importante actividad fungicida contra *Candida* y *Aspergillus*, además presenta moderada actividad en ratas con candidiasis diseminada (Peláez *et al.*, 2000).

Esta planta ha sido evaluada *in vitro* como posible agente antiinflamatorio; sin embargo, los resultados demostraron que el extracto acuoso de la especie no inhibe la biosíntesis de prostaglandinas, ni la actividad de la enzima ciclooxigenasa (Tunon *et al.*, 1995).

Investigaciones realizadas en el polen de *J. communis*, se encontró que contiene ácido isocuprésico, compuesto que se describe como el responsable de provocar aborto en ganado (Gardner *et al.*, 1998).

Algunos estudios realizados respecto a la toxicidad, reportan que el terpeno 4-terpineol o terpinen-4-ol es el responsable de provocar un mejor funcionamiento e irritación en el riñón, además de originar un incremento en el volumen de orina (Duke, 1988; Houle y Babeux, 1994). Sin embargo, otras investigaciones sugieren que este compuesto puede bajar los niveles de ácido úrico, aunque se requiere de estudios adicionales para confirmar su acción (Markkanen *et al.*, 1981).

IZT.



Diversas investigaciones químicas y farmacológicas se han realizado sobre un número amplio de especies de *Juniperus*. Por ejemplo de *J. squamata* se aislaron los compuestos 14-acetoxicedrol, un derivado acetyl del sesquiterpeno 8,14-cedranediol, los cuales presentaron actividad vasorelajante y antiplaquetaria (Che-Ming *et al.*, 1994).

Así mismo de los frutos de la especie *Juniperus excelsa* fueron aislados diterpenos como el ácido isopimárico, ácido isocommunicado, ácido (-)-ent-trans comunicado y el ácido 3 α -acetoxilabda-8(17),13(16),14-trien-19-oico (ácido

juniperexcelsico) y el sesquiterpeno 4 α -hidroxicedrol (Topçu *et al.*, 1999). En este mismo trabajo se reporta la actividad antimicobacteriana del extracto hexánico, metanólico y de los compuestos ácido juniperexcelsico y ácido sandracopimarico, siendo las CMIs de 15.5, 17.0, 14.4 y 15.0 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente contra *M. tuberculosis* H37Rv, al ser evaluadas por el método radiorespirométrico Bactec 460.

2) *J*USTIFICACIÓN

La Tb constituye un serio problema de salud provocando un gran número de muertes en el mundo. Además las cepas de *M. tuberculosis* han desarrollado resistencia a los fármacos provocando que sea más difícil el tratamiento de la enfermedad.

México constituye uno de los trece países con mayor incidencia en el mundo y la presencia de cepas multidrogoresistentes va en aumento; por lo que es necesario y urgente buscar nuevos agentes terapéuticos para el tratamiento de la enfermedad; y las plantas medicinales de nuestro país constituyen una fuente importante de metabolitos secundarios que pueden proveer de nuevas estructuras o moléculas prototipo para el desarrollo de fármacos con actividad antimicobacteriana.

3) BJETIVO GENERAL

* Obtener los compuestos responsables de la actividad antimicrobacteriana del extracto metanólico de *Juniperus communis*.

BJETIVOS PARTICULARES

1. Evaluación antimicrobacteriana del extracto metanólico.
2. Fraccionamiento químico del extracto.
3. Evaluación antimicrobacteriana de las fracciones primarias y secundarias.
4. Separación y purificación de los compuestos en las fracciones activas.
5. Evaluación antimicrobacteriana de los compuestos puros.
6. Identificación química de los compuestos puros.

4) *M*ETODOLOGIA

1. Selección:

La especie *Juniperus communis* se seleccionó con base en el criterio etnobotánico, tomando como punto de partida el uso popular de la planta en la medicina tradicional. La planta es muy utilizada para tratar tos, bronquitis y problemas de vías respiratorias.

2. Colecta e identificación del material vegetal:

Una vez seleccionada la especie, se procedió a la colecta del material vegetal fresco (partes aéreas) en cantidad suficiente (10 kg). Se realizaron dos colectas, una en el Estado de Oaxaca y otra en Cuernavaca, Mor. La identificación botánica la realizó la M. en C. Abigail Aguilar, responsable del Herbario: IMSSM del Instituto Mexicano del Seguro Social y un ejemplar del Estado de Oaxaca fue depositado en el mismo Herbario (No. de voucher: 14414).

3. Operaciones preliminares y preparación de los extractos:

Posterior a la colecta, se llevó a cabo el proceso de limpieza con el fin de eliminar la tierra, la basura y las malezas. El secado de las hojas de *J. communis* se realizó a temperatura ambiente y a la sombra, con la finalidad de inactivar los sistemas enzimáticos y evitar la alteración del contenido metabólico. El material vegetal seco se fragmentó en un molino de cuchillas (modelo Tor Rey M-12), con el objeto de reducir el tamaño de muestra y de esta forma aumentar el área de contacto del disolvente con el material y poder realizar un proceso de extracción más eficiente.

El material seco y molido se dividió en 2 partes. Las dos porciones de material vegetal se extrajeron vía maceración a temperatura ambiente, con hexano y metanol grado RA (Mallinckodt) por periodos de 24 o 48 horas cada uno, repitiendo el mismo procedimiento 3 veces. Cada uno de los extractos se filtraron y concentraron a sequedad bajo presión reducida (335 y 337 mm Hg, respectivamente) en un rotaevaporador marca BUCHI RE 111 a 40°, y se registraron los rendimientos respecto al peso del material vegetal seco. Los extractos libres de solvente orgánico se sometieron a ensayo biológico (actividad antimicobacteriana) (Diagrama 1).

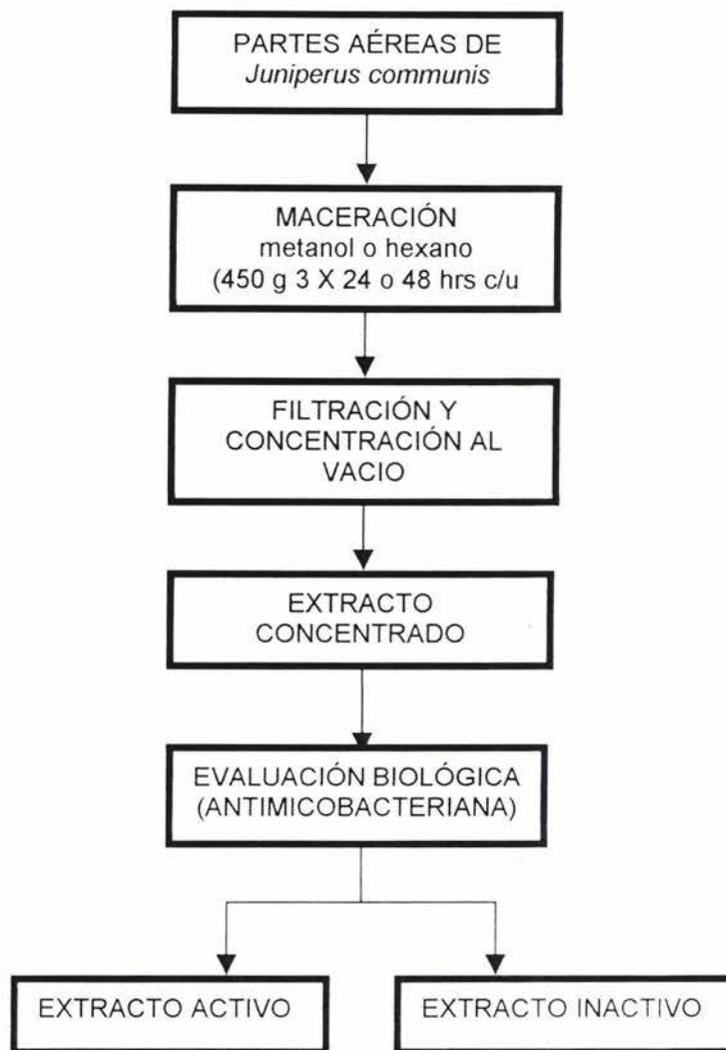


Diagrama 1. Preparación del extracto.

4. Ensayos biológicos:

a) Actividad antimicrobacteriana por el micrométodo colorimétrico de alamar azul

El micrométodo colorimétrico de alamar azul (MABA) se utilizó como prueba preliminar, por ser una técnica fácil de realizar, además de no requerir de equipo

especial, la lectura de la prueba es visual, consume menos tiempo que los métodos convencionales, es reproducible y de bajos costos (Collins y Franzblau, 1997; Pietro *et al.*, 2000).

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

Los pozos de la periferia de la microplaca (0) se les adicionó agua destilada con la finalidad de mantener la humedad durante el proceso de incubación (Fig. 2). El resto de los pozos fueron utilizados para el ensayo biológico. A cada pozo se le agregó 100 μ L de medio de cultivo Middlebrook 7H9 enriquecido con OADC (ácido oleico, albúmina, dextrosa y catalasa), 20 μ L de la muestra problema (extracto, fracción o compuesto puro) a evaluar o del control y posteriormente se le adicionó 100 μ L de suspensión de *M. tuberculosis* a una concentración de 6×10^5 UFC/mL (E₁-E₄). Es importante mencionar que para cada ensayo se prepararon dos columnas de cepa (C₁ y C₂), cada una con diferentes controles, uno de disolvente (m), otro de microorganismo sin droga (b) y el último como control positivo con rifampicina (d).

Las muestras problema de tipo orgánico (extractos y fracciones) fueron solubilizadas en DMSO. Cada una se evaluó a las concentraciones de 50, 100 y 200 $\mu\text{g/mL}$, en cada ensayo se emplearon 0.125 $\mu\text{g/mL}$ de rifampicina o etambutol como control positivo. Las placas fueron incubadas a 37°C por 5 días para *M. tuberculosis* y 2 días para *M. avium*. Transcurrido el tiempo de incubación, el control sin droga fue probado añadiendo al pozo 20 μL de solución de alamar azul y 12.5 μL de Tween 80 al 20%. Las placas fueron reincubadas por 24 hrs más a 37°C. Sí el crecimiento bacteriano es óptimo, el color del alamar azul en el control cambio a rosa, lo que nos permitió seguir con el procedimiento, que consistió en agregarle al resto de los pozos el Tween 80 y el alamar azul. Las microplacas se incubaron nuevamente a 37°C por 24 hrs, transcurrido este tiempo las placas fueron leídas en forma visual y/o fluorométricamente.

Los resultados fueron interpretados como positivos en aquellos casos donde el color del alamar azul permaneció sin cambio después del proceso de incubación, lo que indicó que no hubo crecimiento bacteriano y en aquellos pozos donde se presentó un cambio en la coloración (rosa) el resultado se tomó como negativo, lo cual indicó que los extractos no afectaron el desarrollo de las micobacterias (Collins y Franzblau, 1997).

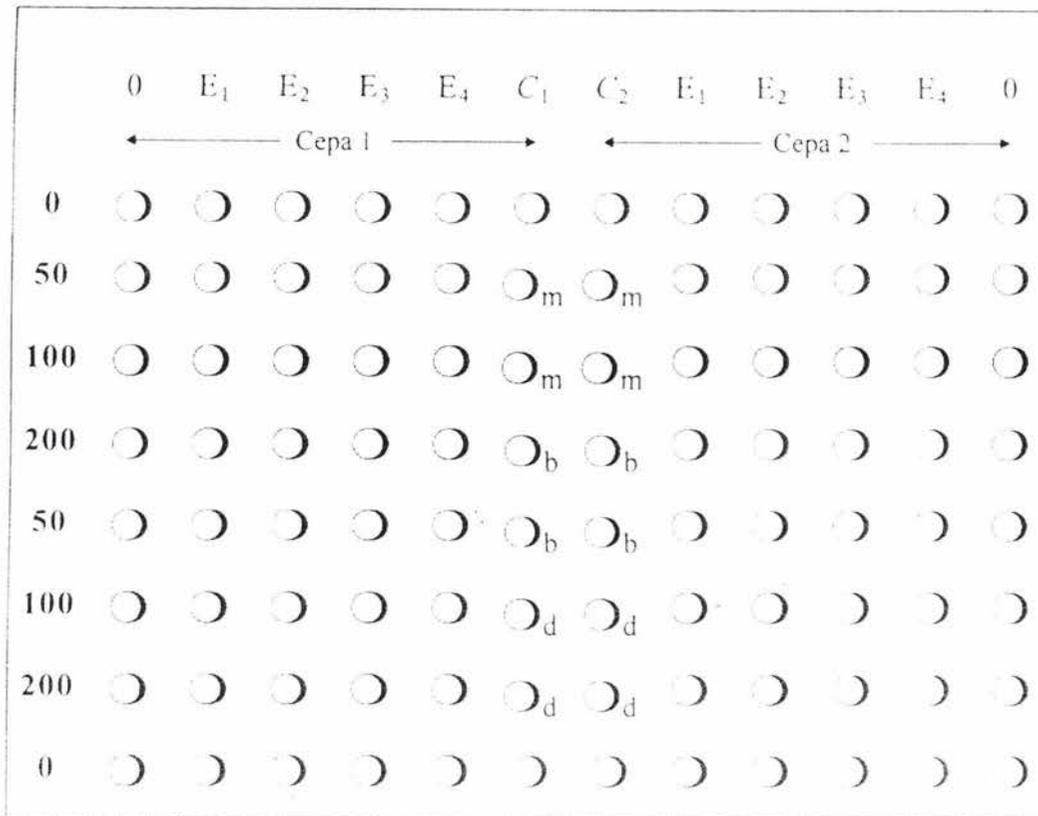


Fig. 2. Microplaca de 96 pozos para determinar la actividad antimicobacteriana por el micrométodo colorimétrico de alamar azul. E₁, E₂, E₃ y E₄: extractos, fracciones y/o compuestos; C₁: controles de cepa 1; C₂: controles de cepa 2; m: controles de medio; b: control de bacteria sin droga; d: control positivo-rifampicina.

b) Actividad antimicobacteriana por el método radiorespirométrico BACTEC

El método utilizado en este estudio, se basó en la metodología reportada en la literatura científica (Lee y Heifets, 1987; Inderlied, 1994; Cantrell *et al.*, 1996; 1998a; 1999a; Collins y Franzblau, 1997; Franzblau *et al.*, 1998). Este método es ampliamente utilizado para determinar la actividad antimicobacteriana de sustancias de origen sintético o natural. La determinación por este método fue realizada de la siguiente manera: El medio líquido (Becton Dickinson Bactec 7H12,

4 mL) contiene un sustrato (ácido palmítico) marcado isotópicamente con ^{14}C como fuente de carbono. Durante el crecimiento de la micobacteria el ácido palmítico es metabolizado liberando $^{14}\text{CO}_2$ en la atmósfera por encima del medio líquido de la cámara cerrada, el cual es cuantificado diariamente en un equipo Bactec TB-460 automatizado (Becton Dickinson Diagnostic Instrument System John-Stan Laboratories, Twoson, MD). El valor de $^{14}\text{CO}_2$ es proporcional a la cantidad de microorganismo presente en el medio, de esta forma se registra el Índice de Crecimiento (GI-Growth Index) de la micobacteria en una escala de cero a 999. Es importante mencionar que el registro de $^{14}\text{CO}_2$ se determina diariamente, después del tercer día de incubación hasta alcanzar un GI de 999 o hasta el 7° día de incubación. El ensayo biológico se realizó por triplicado y se empleo *M. tuberculosis* H37Rv (ATCC 27294) como microorganismo de prueba.

De cada extracto se tomaron 4 mg y se solubilizaron 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 guardó la muestra en tubos ependorff a -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 7H12 (Bactec 12B); obteniéndose así concentraciones finales en los viales de ensayo de 100, 50 y 25 $\mu\text{g/mL}$.

M. tuberculosis H37Rv fue previamente cultivado en el medio 7H12 (Bactec 12B), hasta obtener un GI de 999, el cual se tomo como cultivo semilla. De esta suspensión se tomaron 100 μ L y se adicionaron a cada vial (controles y muestra problema). Una vez inoculados los viales con la muestra problema y con los microorganismos, estos se incubaron a 37°C durante el ensayo. Las lecturas se tomaron después del tercer día de incubación hasta que el control alcanzo un GI de 999. Cabe mencionar, que en caso de que el control no alcance este valor el estudio se finalizó hasta el décimo día.

Los resultados se consideraron como negativos en aquellos extractos donde hubo presencia de $^{14}\text{CO}_2$, esto indico que hubo metabolismo activo y por ende un crecimiento de las micobacterias; por lo contrario, la falta $^{14}\text{CO}_2$ indicó que el crecimiento de las micobacterias fue inhibida por la presencia de los extractos o fracciones de prueba.

Los porcentajes de inhibición fueron calculados con la siguiente fórmula:

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

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 50 y 100 μ g/mL.

5. Fraccionamiento químico:

Una vez obtenidos los resultados de las evaluaciones biológicas de los extractos se procedió a realizar el fraccionamiento químico del extracto más activo siguiendo los esquemas convencionales para este tipo de investigación (Hostettman *et al.*, 1997).

El fraccionamiento del extracto de *J. communis* fue realizado empleando cromatografía de adsorción en columna abierta, empacada con gel de sílice (Sílica gel 60, malla 70-230 ASTM, Merck) relación 1:10 y como fase móvil se utilizaron mezclas de disolventes con polaridades crecientes (hexano, cloroformo, metanol).

El montaje de la columna se realizó en forma vertical y se taponea con un algodón humedecido con el disolvente adecuado. Después se le agregó la sílica sin el extracto, suspendida en el mismo disolvente que el algodón, con el fin de que no queden burbujas de aire que puedan "fracturar" la columna. Por último, se siembra el extracto absorbido en el 10% de la sílica gel, enseguida se coloca un tapón de algodón, para que al agregar el disolvente no se agite la muestra. Mediante este proceso se obtuvieron las fracciones correspondientes con diferentes volúmenes (125, 250, 500 ó 1000 mL).

Las fracciones se concentraron a presión reducida (hexano 335 mbar/hPa, cloroformo 474 mbar/hPa, metanol 337 mbar/hPa) y posteriormente se reunieron

aquellas que presentaban similitud en la cromatografía en placa delgada (Kieselgel 60 F254, Merck). La presencia de los compuestos en cada fracción se detectó mediante el uso de diversos agentes reveladores como ácido sulfúrico al 10%, el reactivo Liebermann-Burchard (LB), el cual esta compuesto de 5 mL de anhídrido acético y 5 mL de ácido sulfúrico que son adicionados cuidadosamente a 5 mL de etanol absoluto enfriado en hielo, NP (difetilboriloxietilamina en metanol al 1%) y PEG (polietilenglicol en etanol al 5%).

Una vez reunidas las fracciones, cada grupo fue sometido a evaluación biológica (antimicobacteriana) siguiendo los mismos ensayos utilizados para la evaluación de los extractos.

6. Aislamiento de los compuestos activos:

De aquellas fracciones que resultaron activas en los ensayos biológicos se realizó el aislamiento y purificación de los compuestos responsables de la actividad biológica, mediante el empleo de diversos métodos cromatográficos que incluye cromatografía en columna abierta y preparativa.

7. Caracterización de los compuestos activos:

La identificación química de los compuestos que resultaron activos en los ensayos biológicos, se realizó mediante el análisis de los espectros de Infrarrojo (IR),

ultravioleta (UV), resonancia magnética nuclear protónica o de hidrógeno (RMN- H^1) y resonancia magnética nuclear de carbono 13 (RMN- C^{13}).

5) *R*ESULTADOS Y *D*ISCUSIÓN

El material vegetal fue colectado en cantidad suficiente en el Estado de Oaxaca. Posteriormente, se prepararon los extractos hexánico y metanólico vía maceración, obteniendo 11.9 g del extracto hexánico y del extracto metanólico 82.4 g, con un rendimiento de 1.19 % y 8.24 %, respectivamente. Cabe mencionar que los rendimientos se expresan en relación al peso del material seco y molido.

Los extractos recién preparados y libres de solvente orgánico fueron sometidos nuevamente a evaluación antimicobacteriana a cuatro diferentes concentraciones (25, 50, 100 y 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por el método colorimétrico de alamar azul (MABA) y de manera adicional por el método radiorespirométrico Bactec a tres diferentes concentraciones (25, 50 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Para el primer ensayo se emplearon como microorganismo de prueba *M. tuberculosis* H37Rv y *M. avium*, y para el segundo ensayo se empleo solo *M. tuberculosis* H37Rv. Los resultados derivados de esta evaluación se muestran en las Tablas 1 y 2.

Tabla 1. Actividad antimicobacteriana de los extractos hexánico (Hex) y metanólico (MeOH) de *J. communis* contra *M. tuberculosis* H37Rv por el MABA.

EXTRACTO	CMI ($\mu\text{g/mL}$)	
	<i>M. avium</i>	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv
Hex	≤ 200	≤ 200
MeOH	≤ 50	≤ 50
Rifampicina*		0.25

*Control positivo

Tabla 2. Actividad antimicobacteriana de los extractos hexánico y metanólico de *J. communis* contra *M. tuberculosis* H37Rv por el método radiorespirométrico Bactec.

CONCENTRACIÓN $\mu\text{g/mL}$	EXT. HEXÁNICO			EXT. METANÓLICO		
	25	50	100	25	50	100
% DE INHIBICIÓN	38.0	56.0	86.2	60.0	55.5	66.3

En el caso de los resultados obtenidos por el MABA, se observa que el extracto MeOH de *J. communis* presenta una inhibición sobre el crecimiento de los dos microorganismos de prueba con un CMI menor de 50 $\mu\text{g/mL}$. Respecto, al extracto hexánico este fue el menos activo contra las dos cepas de micobacterias presentando un CMI de 200 $\mu\text{g/mL}$. Estos resultados comparados con los previamente reportados por Jiménez-Arellanes *et al.*, 2002 indican que el extracto metanólico resulto más activo; no así el extracto hexánico, el cual muestra menor actividad.

Por otro lado, los extractos recién preparados fueron evaluados por el método radiorespirométrico. Los resultados dados por este método nos indican que el extracto hexánico provocó una mayor inhibición que el extracto metanólico sobre el crecimiento de las micobacterias a la concentración de 100 µg/mL observándose que el extracto hexánico inhibe en un 86.2% y el metanólico en un 66.3%.

Analizando los resultados obtenidos por los ensayos MABA y Bactec se decidió realizar el fraccionamiento químico biodirigido del extracto MeOH. Es importante mencionar que el extracto hexánico es objeto también del fraccionamiento químico biodirigido, pero constituye tema de otro trabajo de tesis.

El fraccionamiento químico-biodirigido del extracto metanólico se realizó empleando cromatografía en columna empacada con sílica gel, de la cual se obtuvieron 45 fracciones de diferentes volúmenes (500 y 1000 mL). Las fracciones primarias fueron agrupadas en 18 grupos de acuerdo a la similitud cromatográfica que presentaron en ccf al ser reveladas con ácido sulfúrico acuoso (Tabla 3). Cabe destacar, que en las fracciones F 3-5 y F 6-7 se detectó la presencia de β -sitosterol, así como diterpenos, y en las fracciones F 17-18 se detectó la presencia de flavonoides al realizarles ccf comparativa con muestras comerciales y/o muestras de otras especies vegetales.

Tabla 3. Fraccionamiento primario del extracto metanólico de *J. communis*.

SISTEMA DE ELUCIÓN	%	FRACCIONES ELUIDAS	CLAVE	RENDIMIENTO %
Hex	100	1-15	F 1	1.6962
			F 2	4.2819
			F 3	2.2284
			F 4	1.4421
Hex-CHCl ₃	75:25	16-23	F 5	1.1068
			F 6	2.2118
			F 7	1.6348
Hex-CHCl ₃	50:50	24-33	F 8	4.3730
			F 9	1.424
			F 10	0.5388
			F 11	0.0238
Hex-CHCl ₃	25:75	34-38	F 12	0.2007
			F 13	1.5354
			F 14	0.3180
CHCl ₃	100	39-42	F 15	4.2894
CHCl ₃ -MeOH	50:50	43-46	F 16	39.7016
			F 17	24.6348
MeOH	100	47	F 18	0.4012

Las fracciones primarias fueron sometidas a evaluación antimicobacteriana a tres diferentes concentraciones (25, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$) con la finalidad de detectar en cual de ellas se concentraba la actividad (Tabla 4).

Tabla 4. Efecto de las fracciones primarias de *J. communis* sobre *M. tuberculosis* H37Rv por el método radiorespirométrico.

CONCENTRACIÓN μg/mL	% DE INHIBICIÓN					
	F 3-5	F 6-7	F 8-9	F 10-14	F 15	F 16-18
25	28	95.5	43	31	21.3	54.0
50	74	93.1	58	47	21.3	54.0
100	99.8	99.8	90.7	65.2	21.3	54.0

Los resultados del ensayo biológico por el método radiorespirométrico demostraron que la fracción F 6-7 presenta mayor porcentaje de inhibición sobre el crecimiento de *M. tuberculosis* a las tres diferentes concentraciones evaluadas. Sin embargo, las fracciones F 3-5 y F 8-9 inhiben en un 99.8 y 90.7 % el crecimiento de las micobacterias pero, solo a la concentración de 100 μg/mL. Respecto al resto de las fracciones, estas resultaron menos activas.

Estas fracciones primarias fueron evaluadas por el micrométodo colorimétrico de alamar azul y los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 5. Las fracciones que resultaron más activas fueron F 3-5 con CMI de 12.5 μg/mL, le siguen en actividad las fracciones F 8-9 con CMI de 25 μg/mL y la fracción F 6-7 presentó un CMI de 50 μg/mL. La fracción F 10-14 presentó actividad a 100 μg/mL y las fracciones F 15-17 no afectaron el crecimiento de *M. tuberculosis* H37Rv a la máxima concentración evaluada (200 μg/mL).

Tabla 5. Fracciones primarias de *J. communis* contra *M. tuberculosis* H37Rv por el MABA.

FRACCIÓN	CMI ($\mu\text{g/mL}$)
F 1	50
F 2	50
F 3-5	12.5
F 6-7	50
F 8-9	25
F 10-14	100
F 15-17	>200

Debido a que la fracción F 6-7 inhibió el crecimiento de *M. tuberculosis* al ser evaluados por el método radiorespirométrico y por el MABA, además de ser la fracción mayoritaria, esta fue objeto de una siguiente cromatografía en columna utilizando 1 g de muestra X 60 g de sílica (1:60), los sistemas de elución que se utilizaron fueron mezclas de hexano, cloroformo y metanol los cuales se describen en la Tabla 6.

Tabla 6. Fraccionamiento secundario de la fracción F 6-7.

SISTEMA DE ELUCIÓN	%	FRACCIONES ELUIDAS	CLAVE	RENDIMIENTO
Hex	100	1-19	F 6-7/1	0.5823
Hex-CHCl ₃	9:1	20-32	F 6-7/2	6.5200
Hex-CHCl ₃	8:2	33-35	F 6-7/3	98.1438
CHCl ₃	100	36		

Del fraccionamiento secundario se colectaron 36 fracciones secundarias de 250 mL cada una, estas se reunieron en 3 grupos de acuerdo a sus características cromatográficas en ccf. De las 3 fracciones reunidas, la fracción F 6-7/1 se detectó la presencia del compuesto β -sitosterol y β -amirina (Figura 3), al realizarle ccf comparativa con muestras auténticas aisladas previamente de *Achillea millefolium* presentando un Rf idéntico. Cabe mencionar, que estos dos compuestos fueron previamente evaluados contra *M. tuberculosis* H37Rv por el método radiorespirométrico presentando una inhibición de 4.72 % y 36.9 %, respectivamente (Álvarez, 2002) y por el método MABA el β -sitosterol presenta un CMI de 100 μ g/mL.

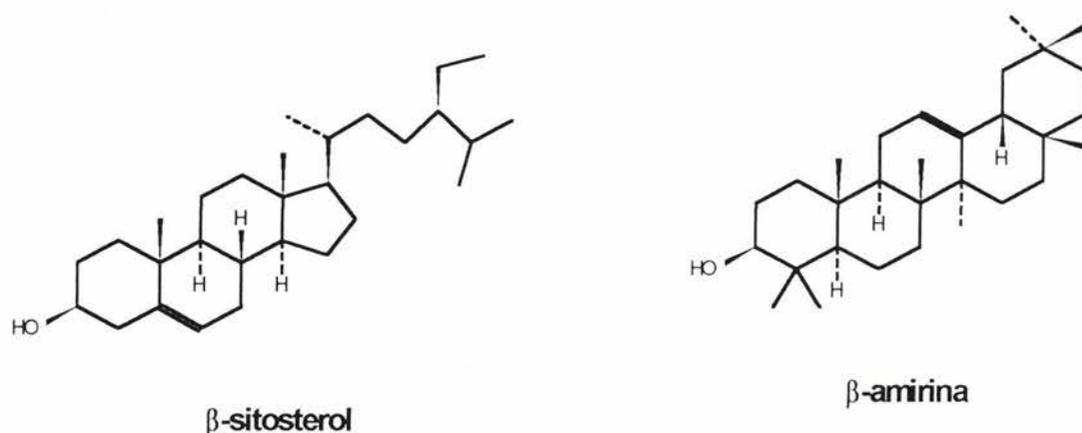


Figura 3. Estructura química del β -sitosterol y β -amirina

De la fracción secundaria F 6-7/2 se obtuvo un precipitado en forma de agujas de color blanco que presentó un punto de fusión de 125-132°C. Este compuesto fue enviado a RMN- H^1 y EM.

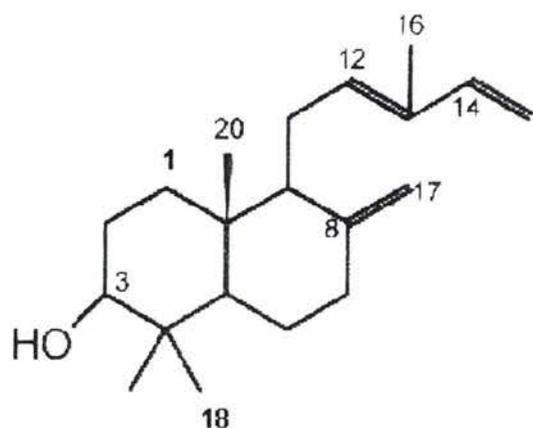
El espectro permitió identificar a este compuesto como *ent*-labda-8(17),12E,14-trien-3 α -ol (Figura 4) ya que se observó en el espectro de masas un PM de 288 (Espectro 1), que corresponde a una fórmula molecular de $C_{20}H_{32}O$. El espectro de RMN- H^1 (Espectro 2, 3 y 4) presenta señales características para diterpenos con núcleo *ent*-labdano, en el espectro podemos resaltar la presencia de señales para los hidrógenos de dos metilenos que corresponde a las dobles ligaduras presentes en los carbonos 8-17 y 14-15 (H-15, H-17), estas señales se observan en δ 4.88 y 5.04 y en 4.45 y 4.84 en forma de dobletes. Además, se observan

señales para tres hidrógenos que corresponde a los metinos ubicados en el C-3, C-12 y C-14, estas señales se observan en 3.24 (H-3), 5.38 (H-12) y en 6.35 (H-14); uno de ellos corresponde a un hidrógeno base del grupo hidroxilo (C-3) y las otras dos señales corresponden a los hidrógeno base de la doble ligadura presente en el C-12 y C-14. El resto del espectro es muy similar para diterpenos con este núcleo. Cabe mencionar que la identificación del compuesto se realizó por comparación de los datos de RMN-H¹ con los descritos en la literatura para compuestos similares como el del ácido 3 α -acetoxi-labda-8(17),13(16),14-trien-19-oico aislado de las bayas de *Juniperus excelsa* (Blechs Schmidt y Becker, 1992; Topçu *et al.*, 1999). La diferencia del compuesto 1 con este último es la posición de la doble ligadura y la ausencia del grupo carboxilo.

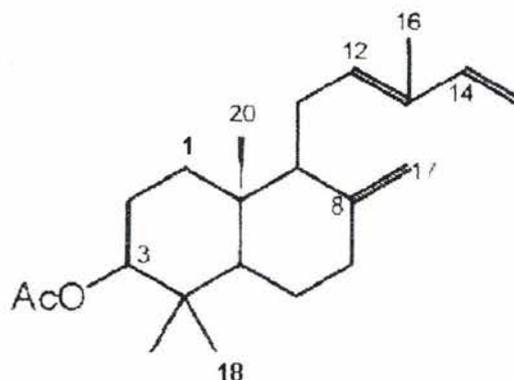
Las aguas madres de la fracción F 6-7/2 fueron solubilizadas en metanol caliente, este proceso permitió la precipitación de un polvo blanco con punto de fusión de 180-195°C, el cual fue enviado a RMN-H¹ para la obtención de su espectro. Este presenta señales similares al compuesto anterior con la única diferencia que este corresponde al derivado acetilado (Espectro 5, 6 y 7) presentando señales para el metino base del grupo acetoxi que se encuentra desplazado de δ 3.24 (compuesto 1) a δ 5.23, lo que indica que el grupo OH presente en el C-3 está sustituido por un grupo acetoxi y la señal para el grupo acetoxi aparece en δ 2.09 (Espectro 5 y 7). Al igual que el compuesto anterior, fue caracterizado químicamente como 3 α -acetoxi-*ent*-labda-8(17),12E,14-trieno

(Figura 4) al comparar sus datos con los reportados en la literatura (Blechsmidt y Becker, 1992).

Estos mismos compuestos están presentes en la fracción F 6-7/3 solo que en diferente cantidad. La presencia de estos diterpenos era de esperarse ya que en la literatura se ha reportado que el género *Juniperus* biosintetiza este tipo de metabolitos secundarios, y un compuesto parecido fue aislado de *J. excelsa* (Topçu *et al.*, 1999).



ent-labda-8(17),12E,14-trien-3 α -ol



3 α -acetoxi-ent-labda-8(17),12E,14-trieno

Figura 4. Estructura química de los compuestos *ent*-labda-8(17),12E,14-trien-3 α -ol (compuesto 1) y 3 α -acetoxi-*ent*-labda-8(17),12E,14-trieno (compuesto 2)

La fracción secundaria F 6-7/3 fue objeto de un fraccionamiento terciario proceso que permitió la obtención de 6 grupos de fracciones terciarias a las que se les realizó el análisis cromatográfico en capa fina (Tabla 7). Posteriormente, se realizó cromatografía comparativa con la muestra comercial de β -sitosterol, compuesto que estaba presente en la fracción F 6-7/3/2 al presentar un Rf idéntico. De esta misma fracción se obtuvieron los dos compuestos previamente aislados en la fracción F 6-7/2 (Figura 4).

Tabla 7. Fraccionamiento terciario de la fracción secundaria F 6-7/3.

SISTEMA DE ELUCIÓN	%	FRACCIONES ELUIDAS	CLAVE	RENDIMIENTO
Hex	100	1-2	F 6-7/3/1	0.1317
Hex-CHCl ₃	9:1	3-7	F 6-7/3/2	21.4558
			F 6-7/3/3	34.3081
Hex-CHCl ₃	8:2	8-13	F 6-7/3/4	14.3462
			F 6-7/3/5	42.8692.5
Hex-CHCl ₃	1:1	14-15		
CHCl ₃	100	16-17		
CHCl ₃ -MeOH	1:1	18-19	F 6-7/3/6	22.1339

Dado que la fracción primaria F 3-5 presentó importante actividad sobre el crecimiento de *M. tuberculosis* (99.8 % de inhibición y CMI = 12.5 μ g/mL) se decidió enriquecer dicha fracción por lo que se realizó el fraccionamiento de otros 25 g de extracto metanólico siguiendo la misma metodología de empaquetamiento descrito anteriormente, utilizando mezclas de disolventes en grado creciente de

polaridad como sistema de elución. Este proceso permitió obtener 2.35 g adicionales de la fracción.

Como siguiente paso, la fracción F 3-5 fue sometida a una cromatografía de adsorción en columna abierta colocando 3.24 g de muestra en 120 g de sílica gel (relación 1:40).

De este fraccionamiento secundario se obtuvieron 93 fracciones, de las cuales se reunieron en 26 grupos de acuerdo a su análisis cromatográfico en ccf. (Tabla 8).

Tabla 8. Fraccionamiento secundario de la fracción primaria F 3-5.

SISTEMA DE ELUCIÓN	%	FRACCIONES ELUIDAS	CLAVE	RENDIMIENTO
Hex	100	1-10	F 3-5A *	0.0056
Hex-CHCl ₃	9:1	11-42	F 3-5B	0.7101
			F 3-5C	0.0789
			F 3-5D	0.5185
			F 3-5E	5.6730
			F 3-5F	0.4790
			F 3-5G	6.115
			F 3-5H	4.7430
			F 3-5I	0.9666
Hex-CHCl ₃	8:2	43-63	F 3-5J	2.4687
			F 3-5K	0.5382
			F 3-5L	0.9356
			F 3-5M	0.9187
			F 3-5N	2.6350
			F 3-5Ñ	1.5246
Hex-CHCl ₃	1:1	64-77	F 3-5O	7.0258
			F 3-5P	2.2124
			F 3-5Q	0.9187
CHCl ₃	100	78-87	F 3-5R	0.4199
			F 3-5S	1.1160
			F 3-5T	0.6200
			F 3-5U	2.7026
			F 3-5V	1.8318
CHCl ₃ -MeOH	1:1	88-92	F 3-5W	0.3184
			F 3-5X	12.6171
MeOH	100	93	F 3-5Y	1.7585

*Muestra desechada

Las fracciones F 3-5B, F 3-5E y F 3-5F fueron sometidas a evaluación biológica a una concentración de 100 µg/mL por el método radiorespirométrico utilizando como microorganismos de prueba *M. tuberculosis* H37Rv.

Los resultados se muestran en la Tabla 9, donde se observa que solo las fracciones F 3-5E y F 3-5F inhiben el crecimiento de *M. tuberculosis* en un porcentaje de 52.7 y 36%, respectivamente. En la fracción F 3-5B esta presente el β -sitosterol como compuesto mayoritario, la fracción F 3-5E esta constituida por el compuesto *ent*-labda-8(17),12E,14-trien-3 α -ol y en la fracción secundaria F 3-5F esta presente un compuesto mayoritario que se encuentra en proceso de caracterización química. El espectro de RMN-H¹ (Espectro 8) para estos compuestos muestra señales para un diterpeno con núcleo *ent*-labdano.

Tabla 9. Evaluación biológica de los compuestos F 3-5B, F 3-5E y F 3-5F

CONCENTRACIÓN $\mu\text{g/mL}$	% DE INHIBICIÓN		
	F 3-5B	F3-5E	F 3-5F
100	0	52.7	36

Por otro lado, la fracción secundaria F 3-5H se metió en placas preparativas para purificar y separar los compuestos, utilizando como disolvente de elución cloroformo-éter etílico en una proporción de 8:2. De esta purificación se obtuvieron 4 compuestos, de los cuales 3 de ellos fueron objeto de evaluación biológica por el método radiorespirométrico a concentraciones de 50 y 100 $\mu\text{g/mL}$ utilizando como microorganismo de prueba *M. tuberculosis*. Los resultados se describen en la Tabla 10 indicando que los tres compuestos (F 3-5HI, F 3-5HII y F 3-5HIII) inhiben el crecimiento de *M. tuberculosis* en un 25, 61 y 42 % a la concentración de 100

µg/mL, respectivamente. Y a la concentración de 50 µg/mL presentaron menor porcentaje de inhibición.

El compuesto de la banda F 3-5HI fue caracterizado como el derivado acetilado de *ent*-labda-8(17),12E,14-trien-3 α -ol (compuesto 2), este compuesto inhibe el crecimiento de la micobacteria en un 25% a la concentración de 100 µg/mL. El compuesto con clave F 3-5HII corresponde a una mezcla de F 3-5HI y un compuesto adicional que esta en proceso de aislamiento para posterior caracterización, esta mezcla presenta un porcentaje de inhibición de 61%. El compuesto presente en la fracción F 3-5HIII está en proceso de caracterización química, este presento un 42% de inhibición sobre el crecimiento de *M. tuberculosis* H37Rv.

Tabla 10. Evaluación biológica de los compuestos F 3-5HI, F 3-5HII y F 3-5HIII.

CONCENTRACIÓN µg/mL	% DE INHIBICIÓN		
	F 3-5HI	F 3-5HII	F 3-5HIII
50	5	6	8
100	25	61	42

Las posibles estructuras químicas de estos compuestos se muestran en la Figura 5. Sin embargo, falta determinar inequívocamente las estructuras para lo cual se necesitan realizar experimentos adicionales de IR, UV, RMN-H¹, RMN-C¹³ y EM por lo que se requiere de obtener mayor cantidad de producto. De manera preliminar se anexan los espectros de RMN-H¹ y EM de este producto F 3-5HIII (Espectros 8 y 9).

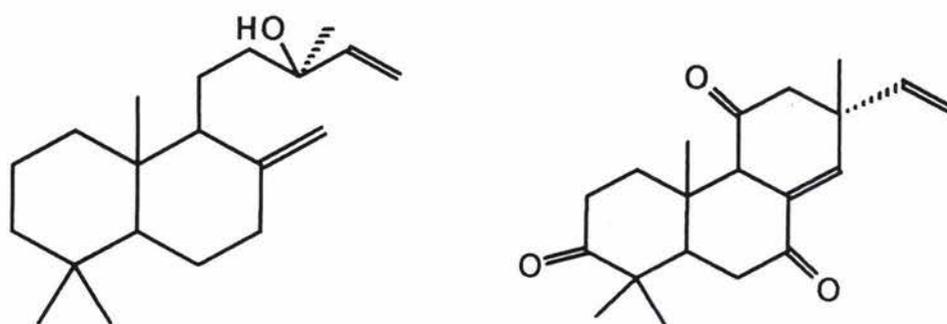


Figura 5. Posibles estructuras químicas de los compuestos de las bandas F 3-5HII y F 3-5HIII.

Es importante resaltar que algunos diterpenos han mostrado importante actividad antimicobacteriana en investigaciones anteriores al ser evaluados por el método radiorespirométrico contra *M. tuberculosis* H37Rv. El diterpeno 12-demetilmulticaulina aislado del extracto metanólico de *Salvia multicaulis* inhibe el crecimiento de *M. tuberculosis* a una concentración de 0.46 µg/mL y es comparado por su efectividad con el agente antituberculoso de primera línea rifampicina y es más activo que el etambutol. Otros diterpenos extraídos de *Salvia multicaulis* como la multicaulina, 12-demetilmultiortoquinona, multiortoquinona, 12-

metil-5-dehidrohorminona, 12-metil-5-dehidroacetilhorminona, salvipimarona, muestran actividad antimicobacteriana en un intervalo de concentración de 0.89 a 7.3 µg/mL (Cantrell *et al.*, 2001; Ulubelen *et al.*, 1997). Por otra parte, de *Juniperus excelsa* se reporta que los diterpenos: ácido sandracopimárico y el ácido juniperexelsico resultaron activos a las concentraciones de 15.0 y 14.4 µg/mL, respectivamente (Topçu *et al.*, 1999, Cantrell *et al.*, 2001). Estos compuestos fueron evaluados por el método radiorespirométrico Bactec y como microorganismo de prueba utilizaron *M. tuberculosis* H37Rv.

Por último, cabe mencionar que las fracciones de mayor polaridad F 14 y F 15-18 se detectó la presencia de flavonas a realizarles ccf y revelarlas con el reactivo NP/PEG. Estas flavonas corresponden a la quercetina y su derivado glucosilado, la quercetina 3-ramnosa. La identificación de estos compuestos se realizó por ccf con muestras comerciales auténticas y por HPLC (Espectro 10).

6) CONCLUSIONES

Las plantas son una fuente de recursos naturales que el hombre puede utilizar para encontrar nuevas sustancias químicas y/o moléculas prototipo para combatir microorganismos responsables de provocar enfermedades que se creían erradicadas, como la tuberculosis. Sin embargo, son pocas las investigaciones que se han hecho sobre este recurso natural, por lo que este trabajo contribuye de manera preliminar a conocer el potencial antimicobacteriano de las plantas medicinales usadas en México.

Los extractos hexánico y metanólico de las hojas de *Juniperus communis* inhiben el crecimiento de *M. tuberculosis* H37Rv en un 86.2 y 66.3% a la concentración de 100 µg/mL al ser evaluados por el método radiorespirométrico y por el método colorimétrico de alamar azul inhibieron a las micobacterias a una concentración de 200 y 50 µg/mL, respectivamente.

El fraccionamiento químico del extracto metanólico permitió obtener fracciones de diferente polaridad, detectándose que la actividad biológica se concentraba en las fracciones de polaridad intermedia. Siendo las fracciones F 3-5, F 6-7 y F 8-9 las que inhibieron el crecimiento de *M. tuberculosis* H37Rv entre un 90.0 y 99.8% a

una concentración de 100 µg/mL al evaluarlas por el método radiorespirométrico. Y resultaron las más activas por el método MABA con CMI de 12.5 a 50 µg/mL.

La separación de los compuesto responsables de la actividad antimicobacteriana se realizo mediante el uso de diferentes técnicas cromatográficas y la determinación de las estructuras química se hizo al analizar sus datos espectroscópicos y espectrométricos.

Por lo anterior, se concluye que la especie *Juniperus communis* representa una fuente potencial de compuestos activos contra *M. tuberculosis*. Sin embargo, se necesitan realizar estudios adicionales de tipo químico y biológico para determinar las estructuras químicas de los compuestos aislados y de otros compuestos que estén presentes en la fracciones F 6-7, y de esta manera conocer el potencial real de esta especie como agente antimicobacteriano.

7) *B*BIBLIOGRAFÍA

- Álvarez-Gordillo, G. C., Álvarez-Gordillo, J. F., Dorantes-Jiménez, J. E., Halperin-Frish, D. 2000. Percepciones y prácticas relacionadas con la tuberculosis y la adherencia al tratamiento en Chiapas, México. Salud Pública Méx. 42:520-528.
- Álvarez, P. V. H. 2002. Estudio Químico de *Chamaedora tepejilote Liebm ex Mart* Con Actividad Antituberculosa. Tesis de Licenciatura. F. E. S. Iztacala UNAM. México. P. 83.
- American Thoracic Society. 1983. Treatment of tuberculosis and other Mycobacterial Diseases. Am. Rev. Respir. Dis. 127:790-796.
- American Thoracic Society. 1994. Treatment of Tuberculosis Infection in Adults and Children. Respir. Crit. Care Med. 149:1359-1374.
- Balandrin, M. F., Kinghorn, A. D and Farnsworth, N. R. 1993. Plant-Derived Natural Products in Drug Discovery and Development. American Chemical Society. University of Illinois, Chicago, IL. 1-13 pp.
- Blechschmidt, M and Becker, H. 1992. Ent-Labdanes and Furanoditerpenes From The Liverwort *Jamesoniella autumnalis*. J. Nat. Prod. 55:111-121.
- Boletín Semanal de Vigilancia Epidemiológica. 2002. Instituto Mexicano del Seguro Social Dirección de Prestaciones Médicas. Semana 51. 2:8-11.

- Cantrell, C. L., Lu, T., Fronczek, F. R., Fischer, N. H. 1996. Antimycobacterial cycloartanes from *Borrchia frutescens*. J. Nat. Prod. 59:1131-1136.
- Cantrell, C. L., Fischer, N. H., Urbatsch, L., McGuire, M. S., Franzblau, S. G. 1998a. Antimycobacterial crude plant extracts from South, Central and North America. Phytomedicine 5:137-145.
- Cantrell, C. L., Núñez, I. S., Castañeda-Acosta, J., Foroozesh, M., Fronczek, F. R., Fischer, N. H., Franzblau, S. G. 1998b. Antimycobacterial activities of dehydrocostus lactone and its oxidation products. J. Nat. Prod. 61:1181-1186.
- Cantrell, C. L., Rajab, M. S., Franzblau, S. G., Fronczek, F. R., Fischer, N. H. 1999a. Antimycobacterial ergosterol-5,8-endoperoxide from *Ajuga remota*. Planta Méd. 65:732-734.
- Cantrell, C. L., Rajab, M. S., Franzblau, S. G., Fischer, N. H. 1999b. Antimycobacterial triterpenes from *Melia volkensii*. J. Nat. Prod. 62:546-548.
- Cantrell, C. L., Franzblau, S. G., Fischer, N. H. 2001. Antimycobacterial Plant Terpenoids. Planta Méd. 67:685-694.
- Casal, M., Guerrero, A., Martín, N., Moreno, S., Nogales, M. C. 1999. Diagnóstico Microbiológico de las infecciones por micobacterias. Procedimientos en Microbiología Clínica. Ed. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 1-42 pp.

- Collins, L. A., Franzblau, S. G. 1997. Microplate Alamar Blue Assay versus Bactec 460 System for high throughput screening of compounds against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41:1004-1009.
- Che-Ming, T., Chien-Huang, L., Yeuh-Hsiong, K., Yun-Lian, L., Tur-Fu, H. 1994. Antiplatelet and Vasorelaxing Actions of the Acetoxy Derivative of Cedranediol Isolated from *Juniperus squamata*. *Planta Méd.* 60:209-213.
- Duke, J. A. 1988. Handbook of Medical Herbs. 6^aed, Ed. CRC Press Inc, Boca Raton Florida. 156-157 pp.
- Dye, C., Scheele, S., Dolin, P., Pathania, V., Raviglione, M. 1999. Global Burden of Tuberculosis. *JAMA.* 282:667-685
- Eloff, J. N. 1998. Which extract should be used for the screening and isolation of antimicrobial components from plants? *J. Ethnopharm.* 60:1-8.
- Farnsworth, N. R., Akerele, O., Bingel, A. S., Soejarto, D. D., Guo, Z. 1989. Las plantas medicinales en la terapéutica. *Bulletin of Saint Panama* 107:314-329.
- Fischer, H. N. 1996. Structure and activity of anti-tuberculosis natural products. *Rev. Latinoamer. Quím.* 24: 65-68.
- Fischer, H. N., Lu, T., Cantrell, C. L., Castañeda-Acosta, J., Quijano, L., Franzblau, S. G. 1998. Antimycobacterial evaluation of germacranolides. *Phytochemistry* 49:559-564.
- Font, P. 1980. Plantas medicinales. 6^a ed. Ed. Labor. México. 82-84 pp.

- Franzblau, S. G., Witzing, R. S., McLaughlin, J. C., Torres, P., Madico, G., Hernández, A., Degnan, M. T., Cook, M. B., Quenzer, V. K., Ferguson, R. M., Gilman, R. H. 1998. Rapid, Low-Technology MIC Determination with Clinical *Mycobacterium tuberculosis* Isolates by Using the Microplate Alamar Blue Assay. *J. Clin. Microbiol.* 32:362-365.
- Frohne, D., Pfander, J. A. 1984. Colour of poisonous plants. Wolfe. 26 pp.
- Gallardo, V. M^a. C., Téllez, H. M^a. C., Vargas, V. M^a. S., Vásquez, G. L. 1983. Aspectos etnobotánicos y bacteriológicos en la medicina tradicional en los Altos de Chiapas. Tesis de Licenciatura. E. N. E. P. Iztacala UNAM. México. 211 pp.
- García-García, M. L., Mayar-Maya, M. E., Ferreyra-Reyes, L., Palacios-Martínez, M., Alvarez-García, C., Valdespino-Gómez, J. L. 1998. Eficacia y Eficiencia del tratamiento antituberculoso en jurisdicciones sanitarias de Morelos. *Salud Pública de Méx.* 40:421-429.
- Gardner, D. R., Panter, K. E., James, L. F., Stegelmeier, B. L. 1998. Abortifacient effects of *Lodgepole pine* (*Pinus contorta*) and *common Juniper* (*Juniperus communis*) on cattle. *Vet. Hum. Toxicol.* 40:260-263.
- Granich, M. R., Balandrano, S., Santaella, A. J., Binkin, N. J., Castro, K. G., Márquez, A., Anzaldo, G., Zarate, M., Jaimes, M. L., Velázquez-Monry, O., Salazar, L., Alvarez-Lucas, C., Kuri, P., Flisser, A., Santos-Preciado, J., Ruiz-Matus, C., Tapia- Conrey, R., Topper, J. W. 2000. Survey of Drug Resistance of *Mycobacterium tuberculosis* in 3 Mexican States 1997. *Arch. Intern. Med.* 160:639-644.

- Glasby, J. S. 1991. Dictionary of Plants. Containing secondary metabolites. Ed. Taylor and Francis Inc. 178 pp.
- Hostettmann, K., Wolfender, J. L., Rodríguez, S. 1997. Rapid detection and subsequent isolation of bioactive constituents of crude plant extracts. *Planta Méd.* 63:2-10.
- Houle, G., Babeux, P. 1994. Variations in rotting ability of cuttings and in seed characteristics of five populations of *Juniperus communis* var. *depressa* from subarctic Quebec. *Can. J. Bot.* 72:493-498.
- Inderlied, C. B. 1994. Antimicrobial susceptibility testing: present practices and future trends. *J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 13:980-993.
- Jiménez-Arellanes, A., Meckes, M., Ramírez, R., Torres, J., Luna-Herrera, J. 2002. Activity Against Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Mexican Plants used to treat Respiratory Diseases. *Antimicrob. Agents Chemother.* (in press).
- Kagawa, K., Takura, K., Uchida, K., Kakushi, H., Shike, T., Kikuchi, J., Nakai, H., Dorji, P., Subedi, L. 1993. Platelet Aggregation Inhibitors in a Bhutanese Medicinal Plant, Shug Chher. *Chem. Pharm. Bull.* 41:1604-1607.
- Lall, N., Meyer, J. J. M. 1999. *In vitro* inhibition of drug-resistant and drug-sensitive strains of *Mycobacterium tuberculosis* by ethnobotanically selected South African plants. *J. Ethnopharm.* 66:347-354.

- Lee, C. N., Heifets, L. B. 1987. Determination of Minimal Inhibitory Concentrations of Antituberculosis Drugs by Radiometric and Conventional Methods. *Am. Rev. Respir. Dis.* 136:349-352.
- Loew, D., Heimsoth, V., Kuntz, E., Schilcher, H. 1991. Fitofármacos, farmacología y clínica de los “diuréticos vegetales”. En: Diurético: Química, farmacología y terapéutica, incluida fitoterapia. Barcelona. Ed. Salvat. 233-259 pp.
- Mandell, G. L., Sande, M. A. 1996. Agentes antimicrobianos: Drogas usadas en la quimioterapia de la tuberculosis y lepra. 8^a ed. Ed. Médica Panamericana. México. 1111-1122 pp.
- Manual de Procedimientos. 1999. Programa de prevención y control de la Tuberculosis. *Secretaría de Salud*, Subsecretaría de prevención y control de enfermedades. Coordinación de vigilancia epidemiológica. Programa de prevención y control de Micobacterias. Ed. SSA. 1-3 pp.
- Markkanen, T., Markinen, M. L., Nikoskelainen, J. 1981. Antiherpetic agent from *Juniper* tree (*Juniperus communis*), its purification, identification and testing in primary human amnion cell cultures. *Drugs Exptl. Clin. Res.* 7:691-697.
- McCutcheon, A. R., Ellis, S. M., Hancock, R. E. W., Towers, G. H. N. 1992. Antibiotic screening of medicinal plants of the British Columbian native peoples. *J. Ethnopharm.* 37: 213-223.
- Newman, D. J., Cragg, G. M and Snader, K. M. 2000. The influence of natural products upon drug discovery. *Nat. Prod. Rep.* 17:215-234.

- Núñez-Rocha, G. M., Salinas-Martínez, A. M., Villarreal-Ríos, E., Garza-Elizondo, M. E., González-Rodríguez, F. 2000. Riesgo nutricional en pacientes con tuberculosis pulmonar. ¿Cuestión del paciente o de los servicios de salud. *Salud Pública Méx.* 42:126-132.
- Orme, I., Secrist, J., Anathan, S., Kwong, C., Maddry, J., Reynolds, R., Poffenberg, A., Michael, M., Miller, L., Krahenbuh, J., Adams, L., Biswas, A., Rouse, D., Winfield, D., Brooks, J. 2001. Search for New Drugs for Treatment of Tuberculosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45:1943-1946.
- Ostrosky-Zeichner, L., Rangel-Frausto, M. S., García-Romero, E., Vázquez, A., Ibarra, J. 2000. Tuberculosis en trabajadores de la salud: Importancia de los programas de vigilancia y control. *Salud Pública Méx.* 42:48-52.
- Peláez, F., Cabello, A., Platas, G., Diez, M. T., González del Val, A., Martan, I., Vicente, F., Bills, G. E., Gracobbe, R. A., Schwartz, R. E., Onish, J. C., Meinz, M. S., Abruzzo, G. K., Flattery, A. M., Kong, L., Kurtz, M. B. 2000. The discovery of enfumafungin, a novel antifungal compound produced by an endophytic *Hormonema* species biological activity and taxonomy of the producing organisms. *Syst. Appl. Microbiol.* 23:333-343.
- Petlevski, R., Hadzija, M., Slijepcevic, M., Juretic, D. 2001. Effect of antidiabetis herbal preparation on serum glucose and fructosamine in NOD mice. *J. Ethnopharm.* 75:181-184. **IZT.**
- Pietro, R. C. L. R., Kashima, S., Sato, D. N., Januário, A. H., Franca, S. C. 2000. *In Vitro* Antimycobacterial Activities of *Physalis angulata* L. *Phytomedicine.* 7:335-338.

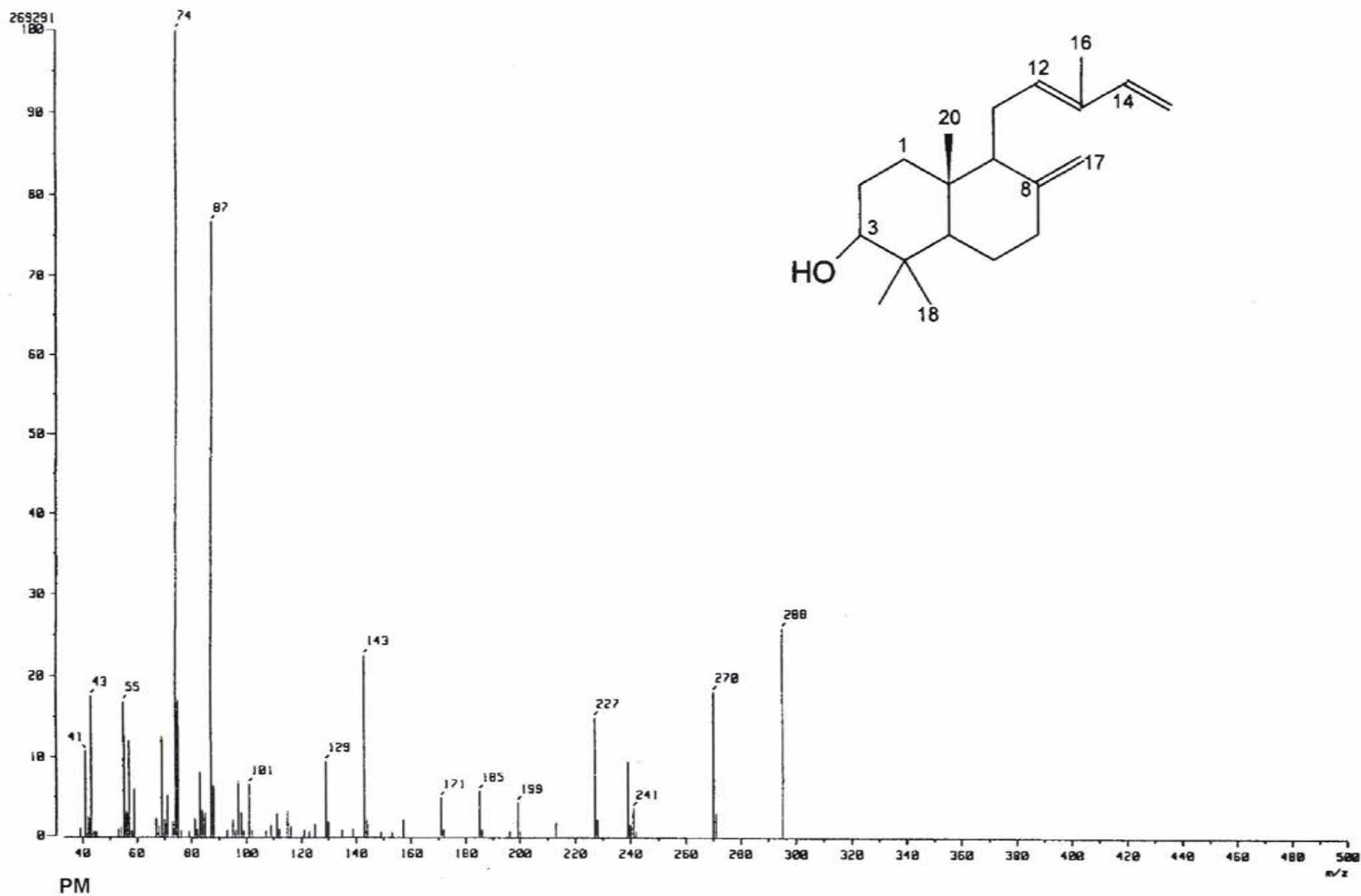


- Pilheu, J. A. 1998. Tuberculosis 2000: problems and solutions. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 29:696-703.
- Dirección General de Estadística e Informática de la Secretaría de Salud. 2001. Principales resultados de la estadística sobre mortalidad en México, 1999. *Salud Pública Méx.* 43:67-71.
- Puyvelde, V. L., Ntawukiliyayo, J. D., Portaels, F. 1994. *In vitro* Inhibition of Mycobacteria by Rwandese Medicinal Plants. *Phytother. Research.* 8:65-69.
- Rajab, M. S., Cantrell, C. L., Franzblau, S. G and Fischer, N. H. 1998. Antimicrobial Activity of (E)-Phytol and Derivates: A Preliminary Structure-Activity Study. *Planta Méd.* 64:2-4.
- Raviglione, M. C., Snider, D. E., Kochi, A. 1995. Global Epidemiology of Tuberculosis Morbidity and Mortality of a Worldwide Epidemic Special Communication. *JAMA.* 273:220-226.
- Rojas, G., Lévaro, J., Tortoriello, J., Navarro, V. 2001. Antimicrobial evaluation of certain plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of respiratory diseases. *J. Ethnopharm.* 74:97-101.
- Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. 2002. *Bol. Epidemiología. (Sist. Na. Vigilancia Epidemiol.).* Semana 41. 41:4-11.
- Swanston-Flatt, S. K., Day, C., Bailey, C. J., Flatt, P. R. 1990. Traditional plant treatments for diabetes. Studies in normal and streptozotocin diabetic mice. *Diabetologia* 33:462-464.
- Taylor, J. P., Bermire, S. D., Suárez, L. 1999. Epidemiology of drug-resistant tuberculosis in Texas. *Am. J. Epidemiology.* 49:359-365.

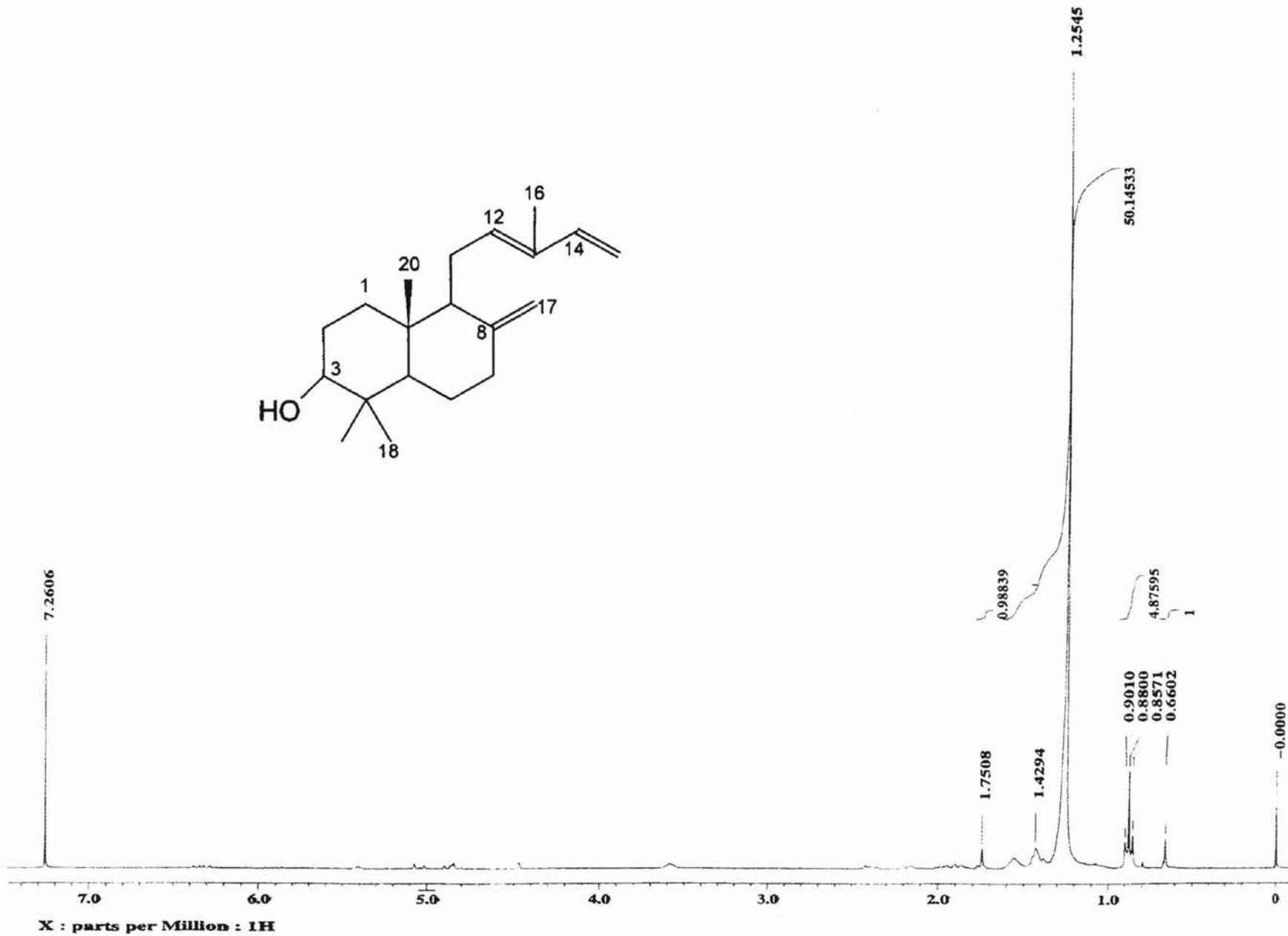
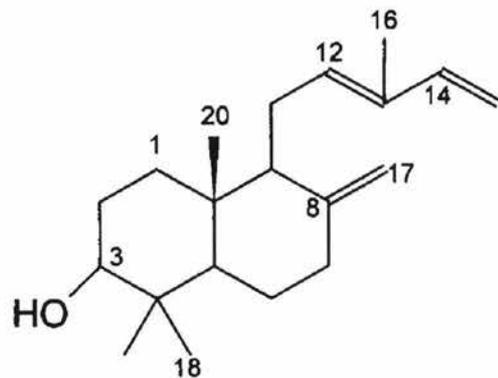
- Testa, B., Kyburz, E., Fuhrer, W., Giger, R. 1993. Perspectives in Medicinal Chemistry. Verlag Helvetica Chimica Acta, Basel. New York. 475-488 pp.
- Tomioka, H., Sato, K., Akaki, T., Kajitani, H., Kawahara, S., Sakatani, M. 1999. Comparative *in vitro* antimicrobial activities of the newly synthesized quinolone HSR-903, Sitafloxacin (DU-6859a), Gatifloxacin (AM-1155), and Levofloxacin against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium* complex. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43:3001-3004.
- Topçu, G., Erenler, R., Çakmak, O., Bozok, C. J., Çelik, C., Chai, H. B., Pezzuto, J. M. 1999. Diterpenos from the berries of *Juniperus excelsa*. *Phytochemistry* 50:1195-1199.
- Tunon, H., Olavsdotter, C., Bohlin, L. 1995. Evaluation of anti-inflammatory activity of some Swedish medicinal plants. Inhibition of prostaglandin biosynthesis and PAF-induced exocytosis. *J. Ethnopharm.* 48:61-76.
- Turner, N. J. 1988. Ethnobotany of Coniferous Trees in Thompson and Lillooet Interior Salish of British Columbia. *Economic Botany.* 42:177-194.
- Ulubelen, A., Topçu, G., Bozok, C. 1997. Norditerpenoids and diterpenoids from *Salvia multicaulis* with antituberculous activity. *J. Nat. Prod.* 60:1275-1280.
- Van der Weijden, G. A., Timmer, C. J., Timmerman, M. F., Reijerse, E., Mantel, M. S., Van der Velden, V. 1998. The effect of herbal extracts in an experimental mouthrinse on establish plaque and gingivitis. *J. Clin. Periodontol.* 25:399-403.

- William, A. R., Thompson, D. M. 1981. Guía práctica ilustrada de las plantas medicinales. Ed. Blume. España. 171 pp.

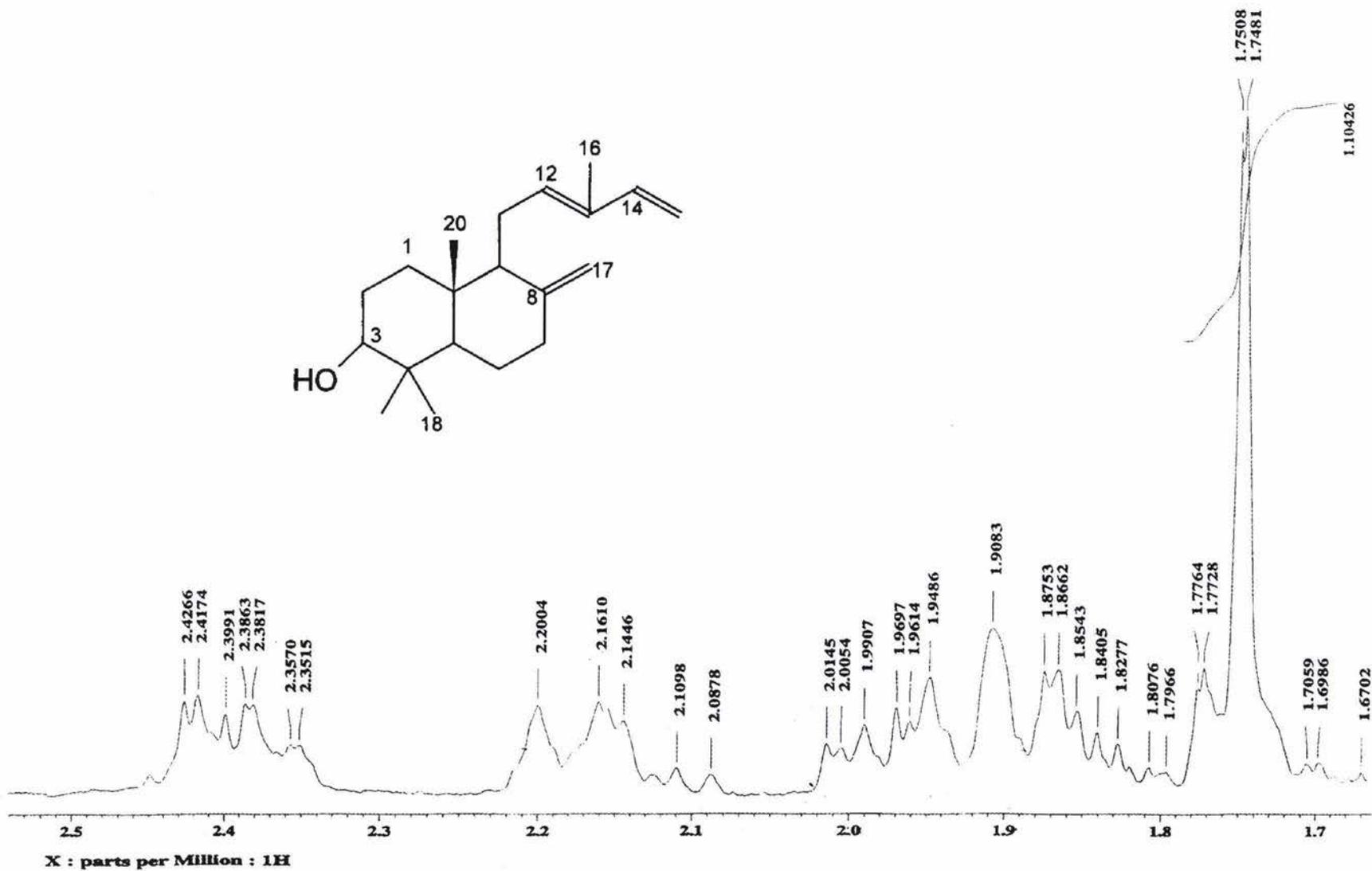
A NEXO DE *E* SPECTROS



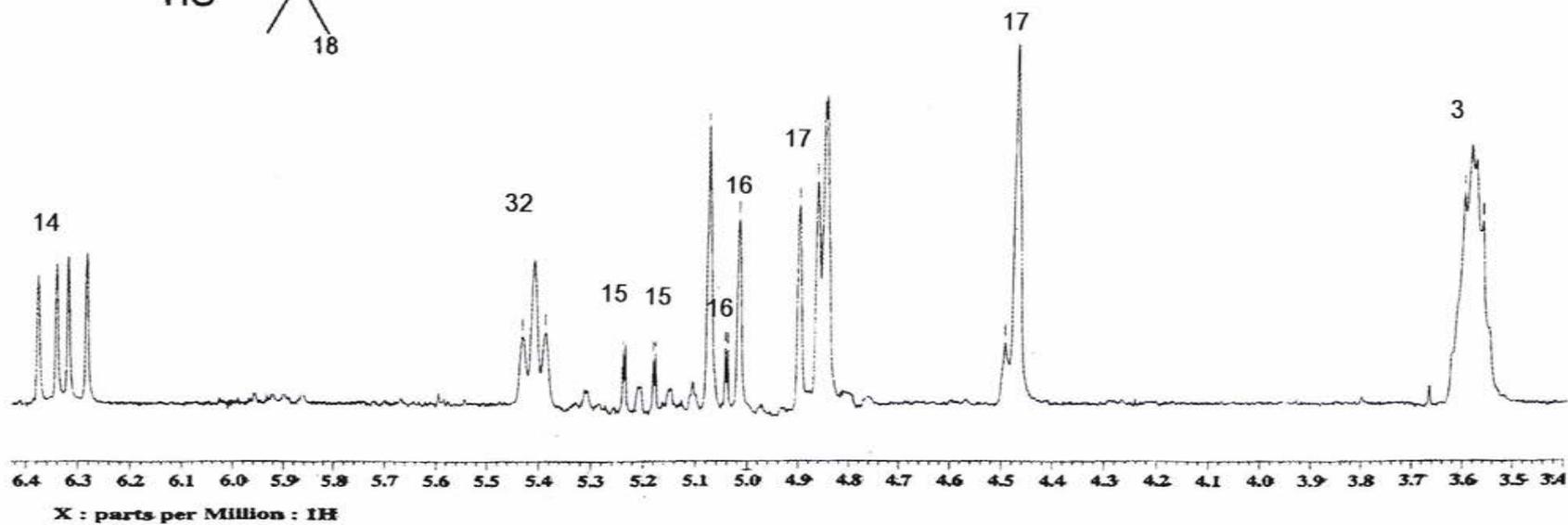
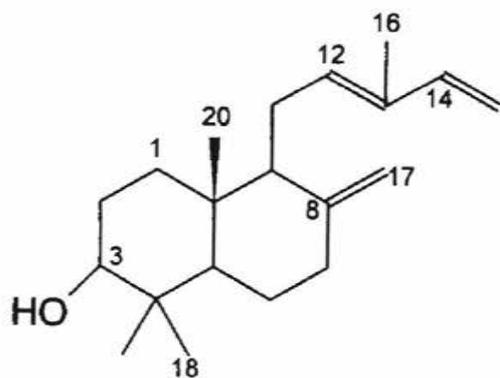
Espectro 1.- Espectro de masas del compuesto 1: ent-labda-8(17),12E,14-trien-3 α -ol.



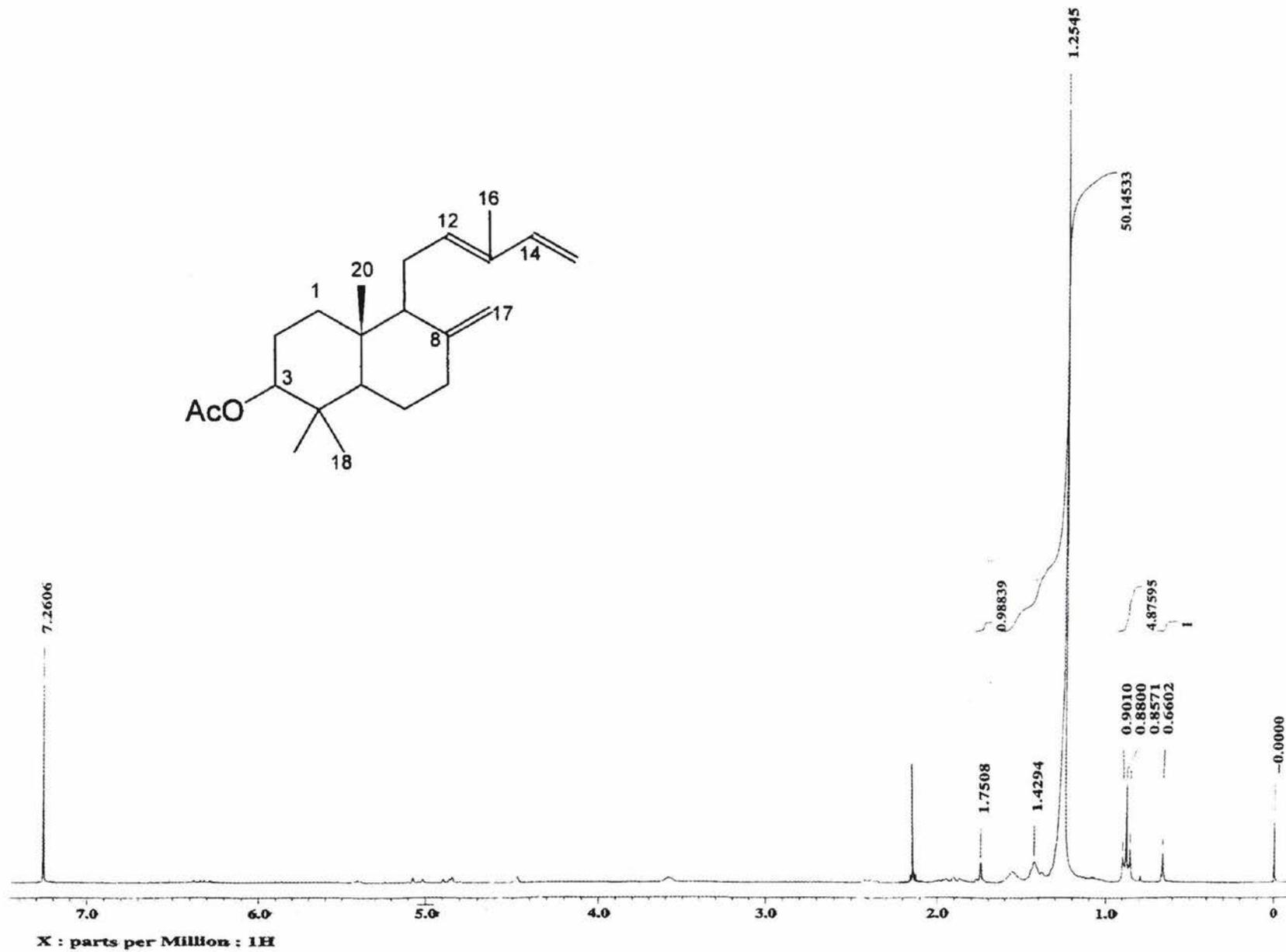
Espectro 2.-Espectro de RMN-H¹ del compuesto 1: ent-labda-8(17),12E,14-trien-3 α -ol.



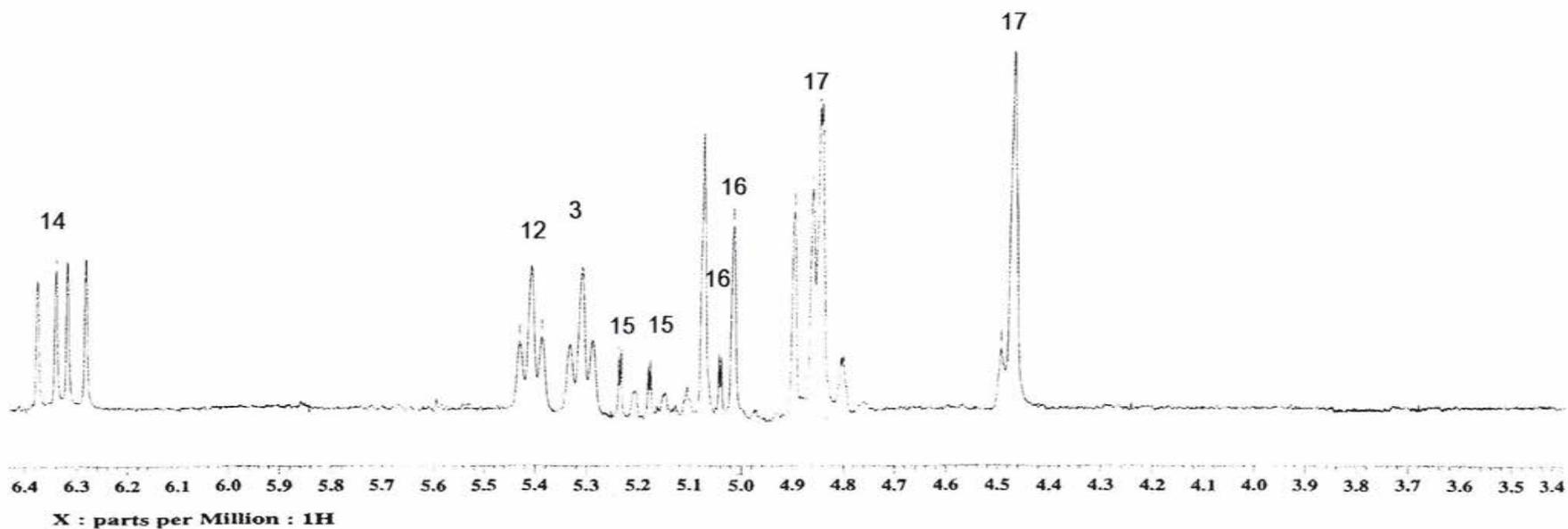
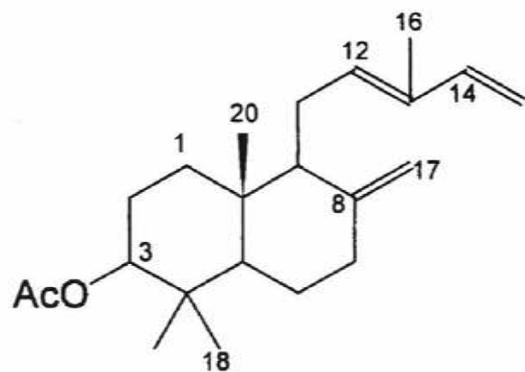
Espectro 3.-Espectro de RMN-H¹ del compuesto 1: ent-labda-8(17),12E,14-trien-3 α -ol.



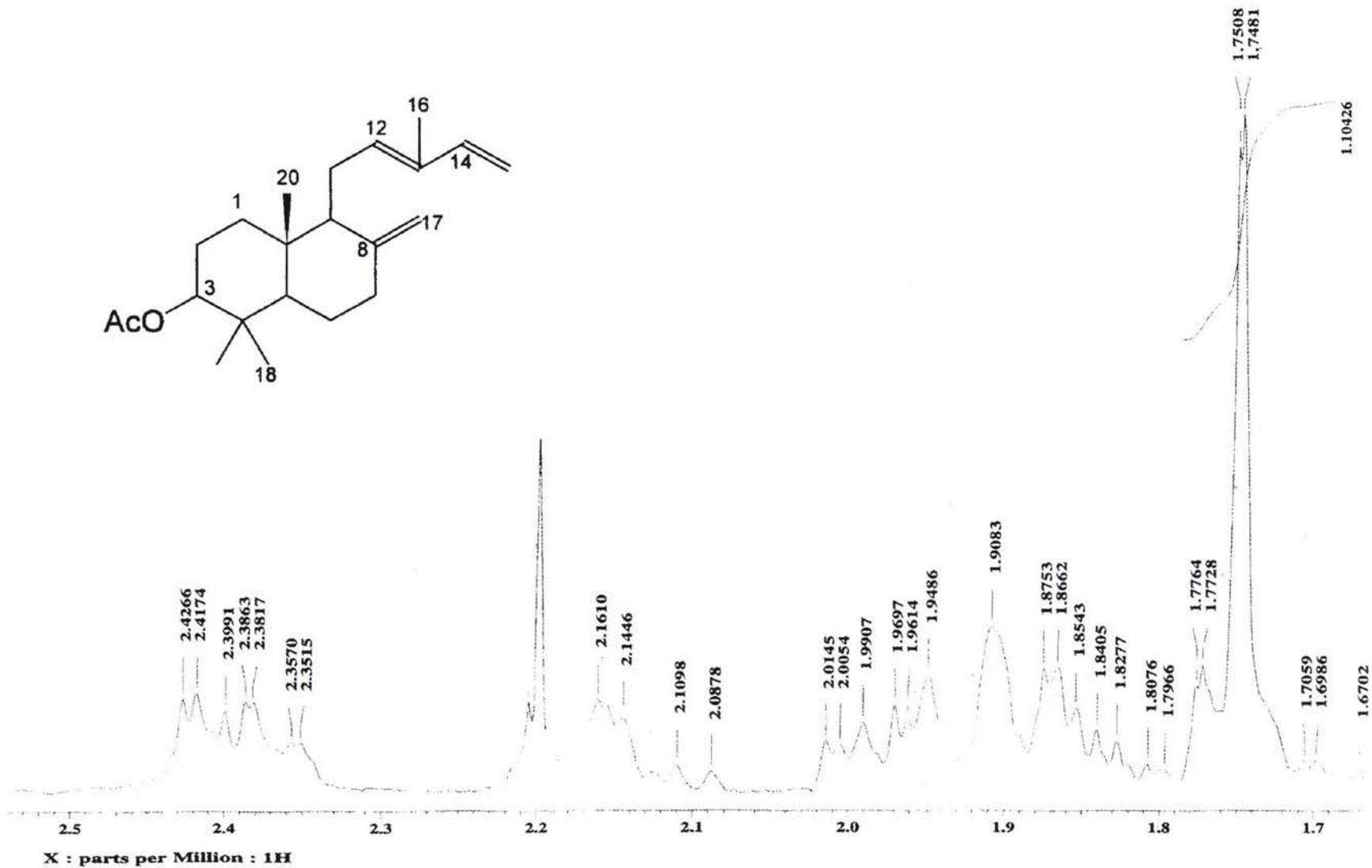
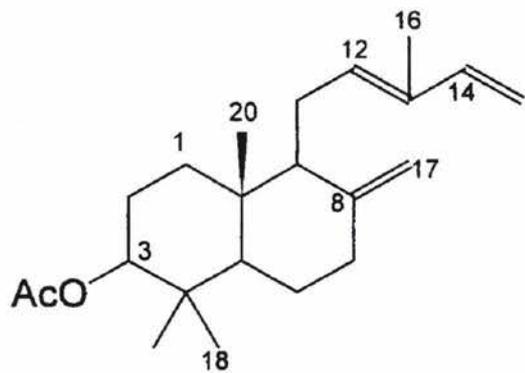
Espectro 4.-Espectro de RMN- ^1H del compuesto 1: ent-labda-8(17),12E,14-trien-3 α -ol.



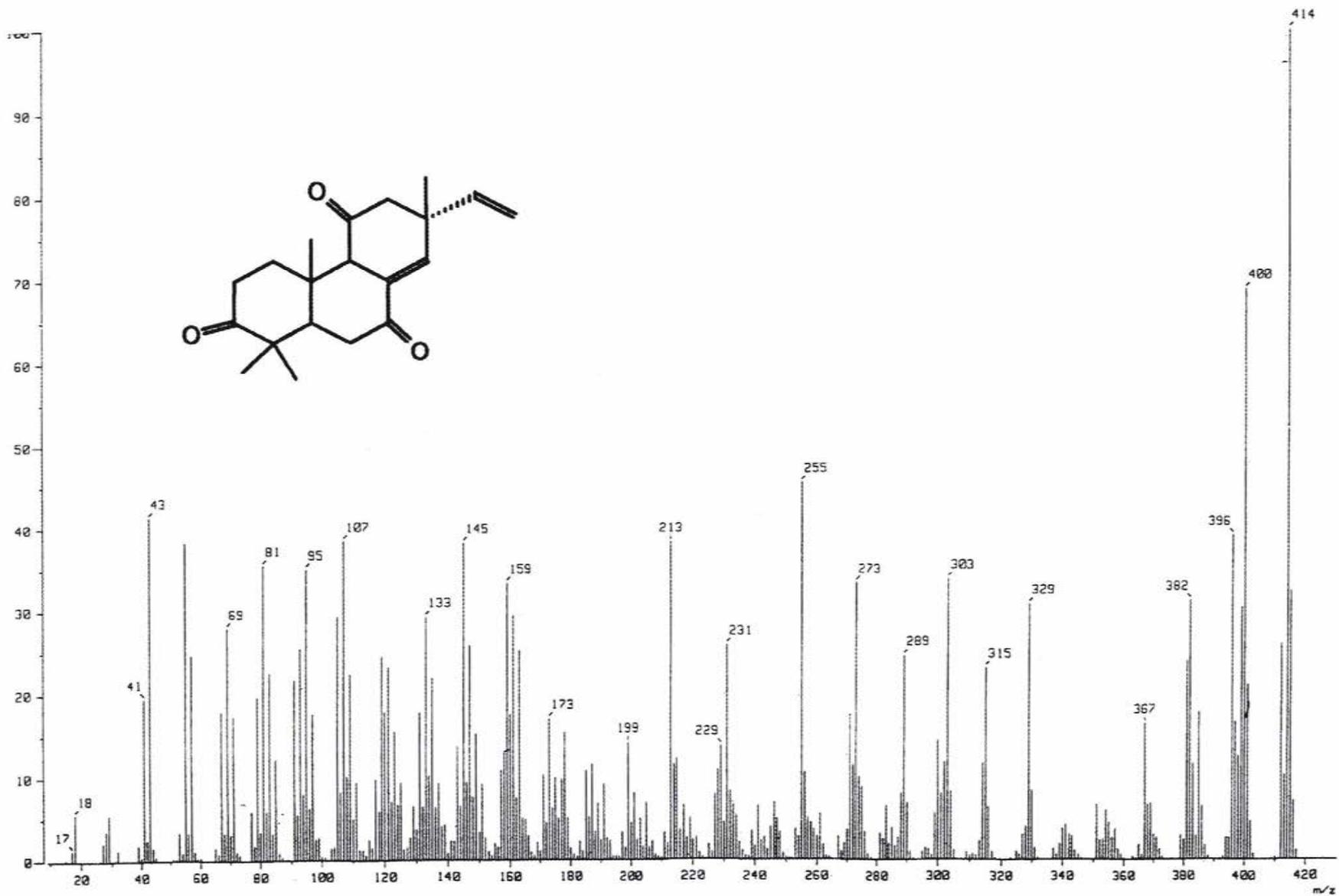
Espectro 5.-Espectro de RMN-H¹ del compuesto 2: 3 α -acetoxi-ent-labda-8(17),12E,14-trieno.



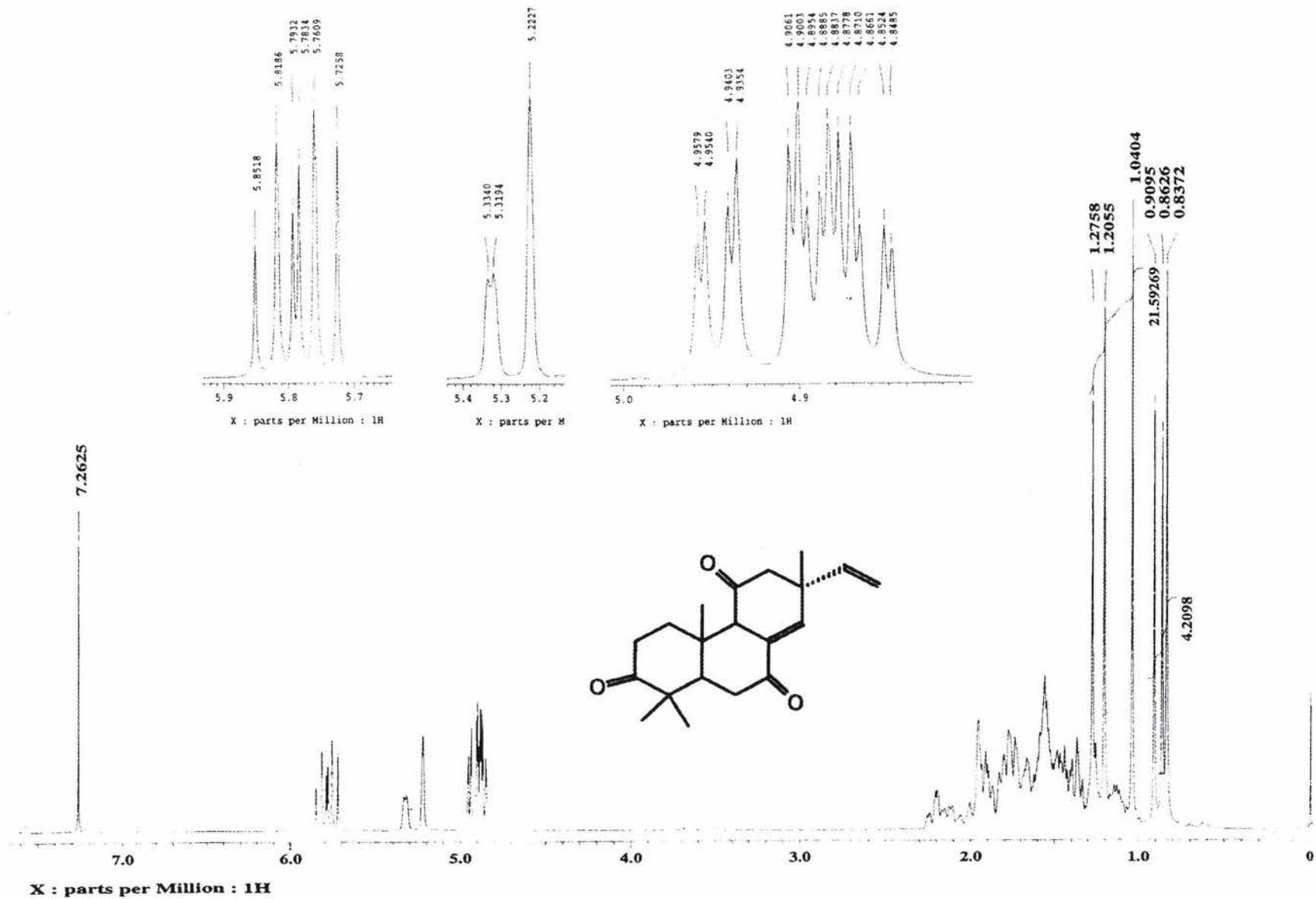
Espectro 6.-Espectro de RMN-H¹ del compuesto 2: 3 α -acetoxi-ent-labda-8(17),12E,14-trieno.



Espectro 7.-Espectro de RMN-H¹ del compuesto 2: 3 α -acetoxi-ent-labda-8(17),12E,14-trieno.

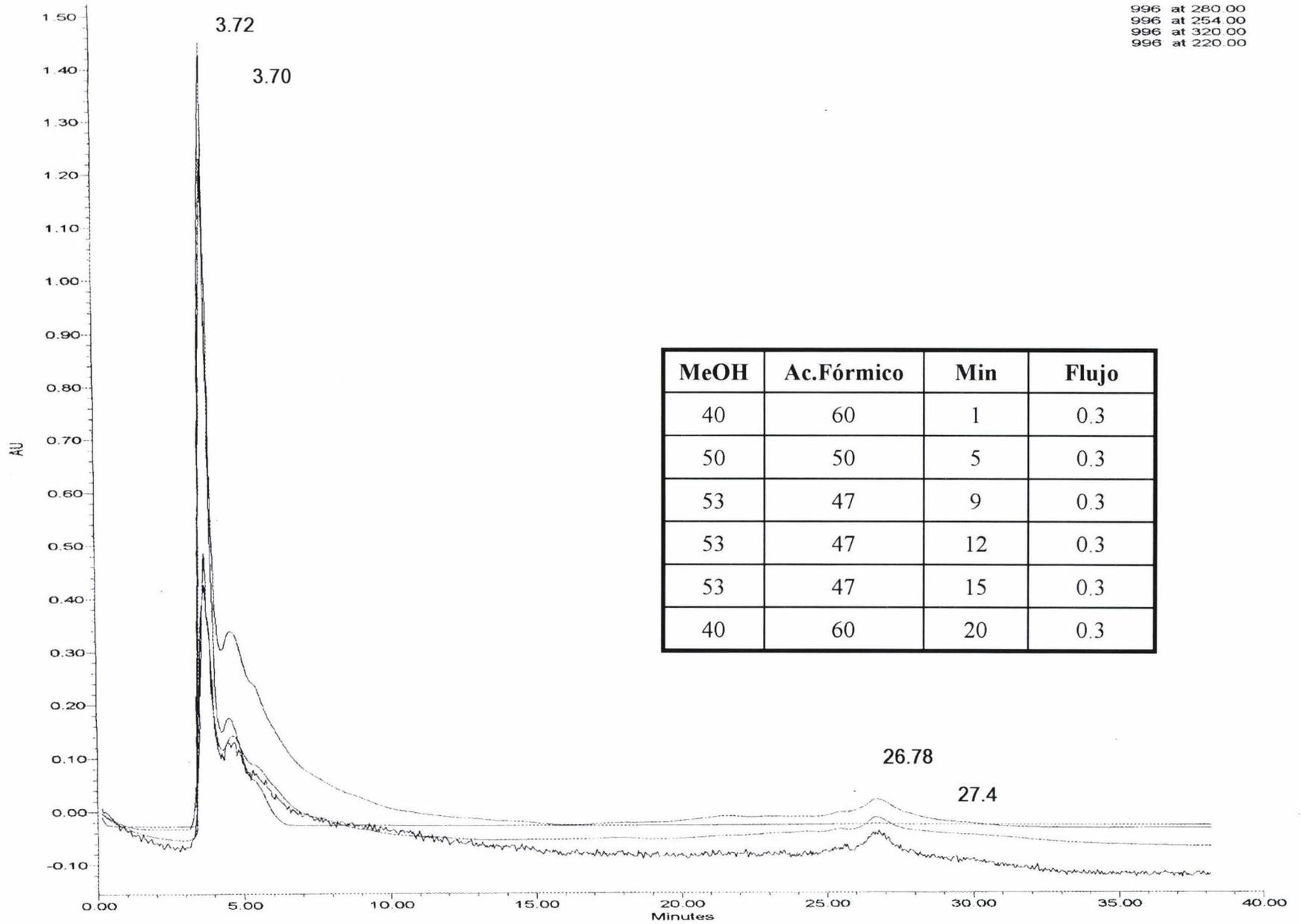


Espectro 8.-Espectro de masas del compuesto F3-5HIII.



Espectro 9.-Espectro de RMN-H¹ del compuesto F3-5HIII.

996 at 280.00
996 at 254.00
996 at 320.00
996 at 220.00



Espectro 10.- Identificación de flavonas en las fracciones F16-18 por HPLC.