

336427



# UNIVERSIDAD DEL VALLE DE MEXICO

CAMPUS CHAPULTEPEC

ESCUELA INCORPORADA A LA UNAM

**ESTUDIO QUÍMICO DE DOS ESPECIES  
MEDICINALES CON ACTIVIDAD  
ANTIMICOBACTERIANA**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

P R E S E N T A:

**GUADALUPE TERESA LUNA MOLINA**

DIRECTORES DE TESIS:

Q.F.B. ISIDRO HINOJOSA LÓPEZ

DRA. Ma. ADELINA JIMÉNEZ ARELLANES

MEXICO, D.F.

2005

m346960



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.

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ LA TESIS

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN FARMACOLOGÍA DE PRODUCTOS  
NATURALES EN EL HOSPITAL DE PEDIATRÍA DEL CENTRO MÉDICO  
NACIONAL SIGLO XXI

SINODALES

- |                     |                                      |
|---------------------|--------------------------------------|
| 1 PRESIDENTE:       | Q.F.B. Isidro Hinojosa López         |
| 2 VOCAL:            | Q.F.B. Martha Luna Ontiveros         |
| 3 SECRETARIA:       | Q.F.B. Esperanza Hernández Koelig    |
| 4 PRIMER SUPLETE:   | M. en C. Agustín Palma de la Cruz    |
| 5 SEGUNDO SUPLENTE: | Q.F.B. Javier Alfredo Carballo Perea |

## AGRADECIMIENTOS

A la directora externa, Dra. Adelina Jiménez Arellanes por ser el pilar principal en el desarrollo integral de ésta tesis, que me permite tener el grado de Licenciatura, y por el apoyo brindado en todo momento.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo otorgado al proyecto 30702-N.

A la Jefa de UIM en Farmacología de Productos Naturales, Dra. Mariana Meckes Fischer por el apoyo brindado en la realización de la tesis en ésta unidad y ser parte del grupo de trabajo.

Al director interno Isidro Hinojosa López por la revisión y sugerencias realizadas al trabajo escrito.

A los Sinodales por la atención brindada.

A M. en C. Rosalba León Díaz por la colaboración en la realización de los ensayos biológicos encaminados a determinar el efecto antimicobacteriano de extractos, fracciones y compuestos.

A la Química Teresa Álvarez y la M. en C. Ruth Parra Maldonado por las facilidades otorgadas para realizar los ensayos biológicos en UIM en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias del Hospital de Pediatría Centro Médico Nacional Siglo XXI.

## DEDICATORIAS

A DIOS en su Trinidad Santa:

Padre, gracias por darme la capacidad y haberme permitido la vida para lograr una de mis metas, por la oportunidad de prepararme profesionalmente al colocarme en el lugar y con las personas adecuadas para ello, por brindarme el amor y el apoyo a través de mis seres queridos.

Jesús, Salvador mío, gracias por mantenerte fielmente cerca de mí a cada paso de éste proceso, sobre todo en los momentos más difíciles, porque al caer mostraste tu rostro y tendiste tu mano para levantarme, por enseñarme el valor del esfuerzo, por compartir conmigo la inmensa alegría de ver realizado un sueño.

Espíritu Santo, gracias porque con tu aliento me proporcionaste fortaleza en los momentos de debilidad, por ayudarme a enfrentar mis miedos con valor, por darme ánimo con un toque de paciencia cuando nada salía bien.

Alabado seas DIOS todo poderoso, toma mis lágrimas, mis alegrías y todo lo que pude haber sentido para gloria tuya.

AMÉN

A mis Padres:

Por la senda de la vida he avanzado, paso a paso voy segura porque Ustedes han estado conmigo en todo momento, brindándome con su esfuerzo de cada día una buena educación, sus sabios consejos me ayudaron a construir y pulir mi personalidad.

Me doy cuenta del diario sacrificio, callado y agotador que realizan con decisión para darme una formación personal; sé qué sus esperanzas, expectativas, el fin de una obra están puestas en mi; Yo trato de no fallarles y corresponder a la confianza que me tienen.

Es bueno saber que cuento con Ustedes para todo y que siempre podré encontrar en Ustedes a unos verdaderos amigos. Quiero que sepan lo mucho que los ADMIRO, RESPETO y AMO.

GRACIAS por quererme y llenarme de cariño, por sus cuidados y atenciones, por el apoyo moral y en mis estudios, por los grandes valores que sembraron en mi, por acercarme al camino de Dios, por su comprensión al dejarme experimentar mis propios fracasos y triunfos, impulsándome a obtener los objetivos que me llevan al encuentro del futuro.

A mi hermana, mi esposo, mis amigas y mis hermanos de comunidad:

Quiero darles las GRACIAS por su presencia e intervención que tuvieron de alguna manera durante el proceso de la titulación, por ayudarme desinteresadamente, por aceptarme como soy, por preocuparse por mí, por cuidarme, por levantarme el ánimo, por escucharme, por tratar de comprenderme, por decirme mis verdades aunque duelan, por ayudarme a ser mejor, por sus oraciones, por el cariño que me tienen pase lo que pase, por tener fe en mí, por estimularme sin adularme, por gozarse con mis alegrías, por sus sabios consejos. Son lo mejor y lo más importante que tengo, los amo con todo mi corazón.

Mony, eres una bendición para mí desde que llegaste al mundo, la que con su sonrisa ha llenado y compartido su alegría, eres quien logra contagiarme la esperanza abierta a la vida. Hemos sido cómplices en múltiples ocasiones y esta vez no ha sido la excepción, tú fuiste un fuerte apoyo. Al ser testigo de mis pasos, espero darte un buen ejemplo. Mi preciosa niña, recuerda que puedes contar conmigo siempre.

Mario, desde que Dios te puso en mi camino, haz demostrado ser un hombre responsable e inteligente, con una valentía de enfrentar la vida, con un amor limpio y verdadero, capaz de atender mis necesidades que durante este proyecto colaboraste a su realización, me siento orgullosa de que compartas conmigo todo esto, me haces sentir muy feliz a tu lado.

Chío y Lupita, en Ustedes encontré unas excelentes amigas, leales, sinceras, con las que me he identificado mucho. Quiero que sepan lo mucho que me sirvieron aquellas pláticas que tuvimos porque en muchas ocasiones me hicieron ver mis errores sin herirme.

A la Dra. Adelina Jiménez Arellanes:

Dentro de la comunidad científica, contribuye de manera importante al avance de la investigación en el sector salud; me sorprende la fortaleza interior con la que ha luchado, a base de esfuerzo se ha colocado en un lugar respetable; su trabajo habla de compromiso, entrega, seriedad, buena ética, amabilidad, amplio criterio y preparación. Yo he tenido la oportunidad de formarme bajo su tutela durante éste trabajo, lo que me ha permitido adquirir conocimiento, criterio, corregir mis carencias, por ello se ha convertido en una persona muy importante e inolvidable para mí. Le agradezco el que me haya dado su apoyo, orientación, consejo, ayuda, ánimo, comprensión y regaños constructivos. Considero que al dedicar parte de su tiempo en compartir el conocimiento, forja la inteligencia y la voluntad que hace que surja la obra maestra que existe en cada uno de sus alumnos.

*Estudiante :*

*Nunca consideres el estudio como un deber, sino como una oportunidad para penetrar en el bello y maravilloso mundo del saber.*

*Albert Einstein*



*Cuando vayan mal las cosas como a veces suelen ir ; cuando ofrezca tu camino solo cuestras que subir ; cuando tengas poco haber, pero mucho que pagar ; y precisas sonreír, aún teniendo que llorar ; cuando ya el dolor te agobie y no puedas ya sufrir, descansar acaso debes, pero ¡nunca desistir!*

*Lucha pues, por más que tengas en la brega que sufrir, cuando todo esté peor, ¡más debemos insistir!*

## I N D I C E

☞ JUSTIFICACIÓN .....	6
☞ INTRODUCCIÓN .....	7
☞ ANTECEDENTES .....	8
I. TUBERCULOSIS A NIVEL MUNDIAL .....	8
II. TUBERCULOSIS EN MÉXICO.....	12
III. MANIFESTACIONES CLÍNICAS .....	16
IV. CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS DEL AGENTE CAUSAL.....	17
V. RESPUESTA INMUNE EN LA TUBERCULOSIS .....	18
VI. TRATAMIENTO.....	21
VII. TUBERCULOSIS MULTIFARMACORESISTENTE .....	23
VIII. IMPORTANCIA DE LAS PLANTAS MEDICINALES .....	26
IX. LAS PLANTAS MEDICINALES COMO FUENTE DE AGENTES ANTITUBERCULOSOS.....	27
X. GENERALIDADES DE <i>ARTEMISIA LUDOVICIANA</i> .....	29
<i>X.1 Investigación química de A. ludoviciana.....</i>	<i>31</i>
<i>X.2 Investigación biológica de A. ludoviciana.....</i>	<i>31</i>
XI. GENERALIDADES DE <i>ARISTOLOCHIA TALISCANA</i> .....	32
<i>XI.1 Investigación química de A. taliscana.....</i>	<i>33</i>
<i>XI.2 Investigación biológica de A. taliscana.....</i>	<i>34</i>
☞ HIPÓTESIS .....	35
☞ OBJETIVO GENERAL .....	36
☞ OBJETIVOS PARTICULARES .....	36
☞ METODOLOGIA .....	37
I. FRACCIONAMIENTO QUÍMICO.....	38
<i>I.A Extracto hexánico de Artemisia ludoviciana (Arlul).....</i>	<i>38</i>
<i>I.A.1 Proceso de partición para Arlul.....</i>	<i>38</i>
<i>I.A.2 Fraccionamiento secundario de Arlul/2-3.....</i>	<i>41</i>
<i>I.A.3 Fraccionamiento secundario de Arlul/4.....</i>	<i>42</i>
<i>I.B Extracto metanólico de Aristolochia taliscana (ARII).....</i>	<i>43</i>
<i>I.B.1 Proceso de partición de ARII.....</i>	<i>43</i>
<i>I.B.2 Fraccionamiento primario de ARII/1.....</i>	<i>44</i>
<i>I.C Identificación química de los compuestos activos .....</i>	<i>47</i>
II. ENSAYO BIOLÓGICO .....	47
<i>II.1 Microorganismo de prueba.....</i>	<i>47</i>
<i>II.2 Desarrollo del ensayo biológico.....</i>	<i>48</i>
☞ RESULTADOS Y DISCUSION.....	50
<i>Artemisia ludoviciana (Arlul).....</i>	<i>50</i>
<i>Aristolochia taliscana (ARII).....</i>	<i>57</i>
☞ CONCLUSIONES.....	62
☞ GLOSARIO .....	64
☞ BIBLIOGRAFIA.....	69
☞ CROMATOGRAMAS.....	75

**LISTA DE ABREVIATURAS**

ArluI	Extracto Hexánico de <i>Artemisia ludoviciana</i>
ARII	Extracto Metanólico de <i>Aristolochia taliscana</i>
$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta
$^{\circ}\text{C}$	Grados centígrados
ccf	Cromatografía en capa fina
CC-FN	Cromatografía en columna fase normal
CG-EM	Cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas
$\text{CHCl}_3$	Cloroformo
CMI	Concentración mínima inhibitoria
cTB	Casos de tuberculosis
$\sigma$	Delta
DGE	Dirección General de Epidemiología
DMSO	Dimetilsulfóxido
DOTS	Directly Observed Treatment Short-course
E	Etambutol
FR	Farmacoresistente
FM	Fórmula molecular
$\gamma$	Gama
hab	Habitantes
I	Isoniazida
IC	Índice de crecimiento
IL	Interleucina
INDRE	Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica
IFN	Interferón

ND	No determinado
NOM	Norma Oficial Mexicana
MeOH	Metanol
$\mu$ l	Microlitro
$\mu$ m	Micrómetro
$\mu$ g/mL	Microgramo sobre mililitro
min	Minutos
mort	Mórtalidad
MFR	Multifarmacoresistencia
OMS	Organización Mundial de la Salud
PAS	Ácido p-aminosalisílico
p.f.	Punto de fusión
PM	Peso molecular
R	Rifampicina
RA	Resistencia adquirida
Rf	Factor de Referencia
RP	Resistencia primaria
RS	Resistencia secundaria
S	Estreptomicina
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
TAES	Tratamiento Acortado Estrictamente Supervisado
TR	Tiempo de retención
TB	Tuberculosis
TBP	Tuberculosis pulmonar
TNF	Factor de necrosis tumoral
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana
Z	Pirazinamida

**LISTA DE TABLAS, DIAGRAMAS Y FIGURAS**

- Tabla 1. Fraccionamiento secundario de ArluI/2-3.
- Tabla 2. Reunión y clave final de fracciones obtenidas de ArluI.
- Tabla 3. Fraccionamiento secundario de ArluI/4.
- Tabla 4. Fraccionamiento secundario de ARII/1
- Tabla 5. Peso, rendimiento y resultados de la evaluación biológica del fraccionamiento químico de ArluI.
- Tabla 6. Compuestos presentes en la fracción FH
- 
- Diagrama 1. Proceso de partición de ArluI
- Diagrama 2. Proceso de partición de ARII
- 
- Figura 1 Principio general de la separación por cromatografía.
- Figura 2 Compuestos aislados en la fracción Ff de *Artemisia ludoviciana*.
- Figura 3 Compuestos aislados en la fracción Fh de *Artemisia ludoviciana*
- Figura 4 Compuestos aislados en la fracción FH de *Artemisia ludoviciana*
- Figura 5 ccf comparativa de los extractos hexánico (ARI) y metanólico (ARII) de *A. taliscana*.
- Figura 6 ccf comparativa de los compuestos puros aislados de ARI y ARII.
- Figura 7 Estructura de los neolignanos aislados del extracto metanólico de *A. taliscana*

LISTA DE CROMATOGRAMAS

- Cromatograma 1. Compuestos de la fracción secundaria Ff
- Metabolito Secundario de Ff. FARNESOL
- Metabolito Secundario de Ff. ARTEMORINA
- Metabolito Secundario de Ff. ÁCIDO HEXADECANÓICO
- Metabolito Secundario de Ff. ÁCIDO 9,12-OCTADECANÓICO
- Metabolito Secundario de Ff. ESTIGMASTEROL
- Metabolito Secundario de Ff.  $\beta$ -SITOSTEROL
- Cromatograma 2. Compuestos de la fracción secundaria 9B
- Metabolito Secundario de 9B. SANTAMARINA
- Metabolito Secundario de 9B. SANTONINA

## JUSTIFICACIÓN

En las últimas décadas, la tuberculosis resurge como un problema emergente de salud pública. A nivel mundial, la Organización Mundial de la Salud ha diseñado diversas estrategias para controlar la epidemia; sin embargo, el número de pacientes afectados por la enfermedad se ha incrementado considerablemente, debido a diversos factores como tratamientos y diagnósticos inadecuados, la presencia de enfermedades como: SIDA, diabetes, cáncer, lupus, leucemia, enfermedad de Hodgkin's y tratamientos con inmunosupresores, entre otros provocando la resistencia que ha desarrollado *M. tuberculosis* a la acción de los fármacos existentes. Los agentes terapéuticos utilizados son escasos, de alto costo y poco eficaces y con severos efectos secundarios por lo que es necesario encontrar nuevos compuestos o estructuras moleculares prototipo, activos contra el bacilo. Las plantas medicinales constituyen una fuente natural, aún poco explorada en este tema, que puede proveer de nuevas estructuras y/o extractos activos que coadyuven al tratamiento de la enfermedad. La diversidad de las especies medicinales en el país y el conocimiento que tiene la población sobre las propiedades curativas de las plantas, llevan a proponer la investigación química de dos especies medicinales (*Artemisia ludoviciana* y *Aristolochia taliscana*) con efecto antimicobacteriano *in vitro* (evaluado anteriormente) con la finalidad de obtener e identificar los compuestos responsables del efecto antimicobacteriano observado en los extractos.

## INTRODUCCIÓN

La tuberculosis es un grave problema de salud pública. Los países en vías de desarrollo son los más afectados y México no escapa a esta situación. Reportes epidemiológicos describen datos alarmantes sobre la incidencia, prevalencia y mortalidad por esta enfermedad, aunado a que existen factores de riesgo que complican en mucho su control.

Actualmente, muchos casos de tuberculosis son causados por cepas farmacoresistentes que no responden al tratamiento establecido, por lo que varios grupos de trabajo incluyendo el nuestro se encuentran enfocados a la búsqueda de sustancias con efecto antimicobacteriano en diversas fuentes naturales como las plantas medicinales.

Este trabajo constituye parte de una línea de investigación donde se explora el potencial antimicobacteriano de las plantas medicinales mexicanas (Jiménez et al., 2003, 2005; Álvarez, 2002; León, 2003). Se realizó el estudio químico-biológico de los extractos hexánico de *Artemisia ludoviciana* y el metanólico de *Aristolochia taliscana*, con la finalidad de aislar los compuestos responsables del efecto antimicobacteriano observado previamente, éstas plantas se utilizan en la medicina tradicional de nuestro país para tratar padecimientos relacionados con la tuberculosis.

## ANTECEDENTES

### I. TUBERCULOSIS A NIVEL MUNDIAL

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infectocontagiosa de curso subagudo o crónico, que resulta de una interacción entre el hombre y el agente causal, *Mycobacterium tuberculosis*, cuyo crecimiento lento y con gran capacidad de adaptación favorecen la persistencia de la infección y la enfermedad en la especie humana (Báez-Saldaña et al., 2003).

La TB en la actualidad es considerada como un problema de salud pública, ya que evidencias epidemiológicas sugieren que 8 millones de nuevos casos surgen anualmente, ocasionando la muerte de más de 3.5 millones de personas en todo el mundo cada año (Copp, 2003; Newton et al., 2000). Esta enfermedad fue declarada emergencia mundial por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 1993 (García-García, 2003).

La OMS, estima que alrededor de un tercio de la población está infectada con *M. tuberculosis* y de no existir cambios en su prevalencia, cerca de 30 millones morirán en los próximos diez años, si las tendencias actuales continúan se podría llegar a 10.2 millones de nuevos casos en este año (2005) (Sada-Díaz, 2003; Villalba-Caloca, 2003). Para el periodo 2000-2020, se estima que habrá 1000 millones de infectados, 200 millones enfermarán y 35 millones morirán si no se mejora el control de la enfermedad (Báez-Saldaña et al., 2003). De

los tres y medio millones de defunciones anuales por TB, un 98% se registran en países en desarrollo, según la OMS.

En el mundo, la TB es la segunda causa de muerte producida por un solo agente patógeno (Frieden et al., 2003) y la OMS reporta que el 9% de los decesos en la población femenina entre 15 y 44 años es debido a TB y que en 1991, provocó la muerte de 4.3 millones de niños (Dye et al., 1999).

Los países con mayor incidencia de TB son 22, entre los que podemos citar a China, India, Rusia, México y otros (Espinal et al., 2001). La OMS, señaló que en términos globales, América Latina tenía una incidencia de casos activos de 80/100 mil habitantes (hab) y que la tendencia a la reducción era menor de 5% anual en algunos países y nula en otros, así por ejemplo, Perú esta dentro de los países que contribuyen con el 70% de casos.

Los datos epidemiológicos, dados por el número de casos de TB por 100 mil hab, varían substancialmente de un país a otro, estimándose que en los 80's la incidencia fue menor de 10 en Canadá, Cuba y EUA; alrededor de 20 en Bahamas y Venezuela; 30 en Argentina y Uruguay; entre 40-50 casos en Brasil, Chile y México; más de 70 en el Salvador, Guatemala, Honduras y Nicaragua, y más de 100 en Bolivia y Haití (Sada-Díaz, 2003). En 1990, se reportaron 7.5 millones de casos de TB (cTB) y 2.5 millones de muertes a nivel mundial, el 49% fue del Sureste de Asia, con 3,106,000 cTB y una mortalidad

(mort) de 1,087,000; el noreste del pacífico con 1,839,000 cTB y una mort de 644,000; África con 992,000 cTB y una mort de 393,000; América con 569,000 cTB y una mort de 114,000; el este de Europa con 194,000 cTB y una mort de 29,000; finalmente otras ciudades industrializadas con 196,000 cTB y una mort de 14,000 (Raviglione, 1995).

La epidemiología molecular a nivel internacional ha descrito progresión acelerada de la TB en personas infectadas con VIH/SIDA, indigentes, pacientes inmunosuprimidos y/o tratados con inmunosupresores por tiempos prolongados, reinfección exógena con cepas resistentes provocando casos graves de TB, transmisión activa en países desarrollados y en desarrollo, incremento de tasas de resistencia adquirida, incumplimiento y poco apego a los programas de control, contaminación en el laboratorio y transmisión a partir de enfermos con infección latente (García-García, 2003); factores que tradicionalmente se han asociado con la adquisición de infección, desarrollo del padecimiento y mortalidad, ya que para su presentación influyen aspectos sociales, económicos, culturales, biológicos, médicos, etc. (García-García et al., 1995).

Para el control de la TB, existe la Alianza Mundial Alto a la Tuberculosis con una iniciativa emprendida en 1998 por la Dirección General de la OMS, extendiéndose rápidamente hasta sumar hoy más de 282 países, que trabajan conjuntamente para erradicar el problema mediante la implementación del programa Tratamiento Acortado Estrictamente Supervisado (TAES

o DOTS "Directly Observed Treatment Short-course" por sus siglas en inglés).

Los objetivos principales de TAES es que toda persona en todo lugar tenga acceso a un diagnóstico y tratamiento efectivo, además de los que describen a continuación:

- Adoptar la estrategia TAES para contrarrestar la resistencia a los medicamentos y a la resistencia del VIH/SIDA.
- Desarrollar métodos de diagnósticos rápidos, sencillos y de bajo costo y/o mejorar las pruebas disponibles para el diagnóstico de la TB a fin de utilizarlas en países con carga elevada de la enfermedad.
- Identificar al menos una posible vacuna contra la enfermedad mediante ensayos clínicos que permitan determinar su eficacia y que permitan la protección de los individuos.
- Búsqueda de nuevas sustancias antituberculosas en fuente natural y sintética que coadyuven a los tratamientos ya existentes y/o que acorten el tiempo de tratamiento, con menos efectos secundarios.
- Reforzar la Alianza Mundial Alto a la TB con objeto de aplicar eficazmente en todo el mundo las

estrategias de lucha contra la enfermedad que hayan resultado eficaces.

- Detectar un 70% de TB activa y tratar con éxito el 85% de los casos detectados. Concentrando la atención en los 22 países donde la carga de la enfermedad es elevada y donde se registra un 80% de casos en todo el mundo (Stop TB Partnership. The global plan to stop tuberculosis. Geneva: WHO, 2001 WHO/CDS/TB/2001.16)

## II. TUBERCULOSIS EN MÉXICO

En México, la incidencia de TB durante la segunda mitad de la década de los cincuenta era de 33.5 casos nuevos por cada 100 mil hab, y a mediados de los años setenta disminuyó a 17.4 casos/100 mil hab (Enciso et al., 2000).

En 1975, la tasa de mortalidad alcanzó valores de 18.2 casos/100 mil hab con 10,964 casos de tuberculosis pulmonar (TBP) al año, una de las diez más altas del mundo (Said et al., 2000).

Durante 1995, se reportaron 12,056 cTB y en 1997, se reportaron un total de 17,184 de casos (Amaya-Tapia, et al., 2000). En el periodo 1995 a 1999, el Sistema Nacional de

Vigilancia Epidemiológica registro entre 13 mil y 14 mil casos anuales (Enciso et al., 2000).

Por su parte la DGE, reporto para el período 2001-2004 16,323 y 13,526 casos, respectivamente con una reducción tan solo del 18%. Sin embargo, estos no son datos reales ya que algunos autores describen que existe seis veces más de casos que los reportados y recientemente la OMS estimo que el numero real de casos para México en el 2002 eran 33 mil (DGE, 2001 y 2004). Por otro lado, la revista de Salud Pública de México (2001) reporto que la TB es una de las 20 causas de muerte con 3,229 decesos acumulados en ese año.

Un estudio realizado recientemente por DeRiemer y colaboradores (2005), describe que en Córdoba-Veracruz se detectaron 3,679 casos de pacientes con tos (por más de 15 días) en el periodo marzo de 1995 a febrero del 2000, de los cuales 490 pacientes fueron diagnosticados con TPP; 323 (74%) de 436 pacientes fueron casos nuevos y 109 (25%) fueron casos con retratamiento.

Estos mismos autores describen que la incidencia de TBP para 1995 fue de 42.1 casos/100 mil hab, mientras que para el 2000 fue de 19.2 casos/100 mil hab, indicando que existe una reducción de casos de TBP (DeRiemer et al., 2005).

Estos datos reflejan el grave problema que representa la TB, ya que el objetivo principal de la OMS para el 2005 era erradicar la enfermedad o detectar el 70% de los casos y

curar el 85% de estos últimos; sin embargo, para nuestro país en el período del 2001-2004 sólo hubo una reducción del 18% de casos.

Según la DGE, los estados con mayor incidencia de TB son Veracruz, Chiapas, Baja California, Distrito Federal, Guerrero, Nuevo León y Tamaulipas (DGE, 2003 y 2004). Por ejemplo, en 1993 se reportó en Veracruz, 300 muertes por TBP (Amaya-Tapia, et al., 2000).

Durante 1995 en Chiapas, se presentaron 1,527 casos (tasa de 42.33/100 mil hab), el 95% fueron TBP, el 1% TB meníngea y el 4% otras formas; aportando con un 7% de la incidencia y 9.5% de mortalidad por TB registrada en México para ese año. En mortalidad por la enfermedad, Chiapas ocupaba el primer lugar a escala nacional, con un 8.9% del total de defunciones; tan sólo en 1995 hubo una tasa de 9.4/100 mil hab, registrándose 345 fallecimientos (Álvarez-Gordillo et al., 1999).

Por último, de Abril a Octubre de 1997 se reportaron para Baja California 351 casos de TBP, 110 casos para Oaxaca y 355 casos para Sinaloa (Granich et al., 2000).

Tanto en México como en el mundo, los factores como la pobreza, desnutrición, hacinamiento, ventilación e iluminación deficientes de la vivienda, alcoholismo, tabaquismo y otras drogas, embarazo, tratamiento prolongado con corticoesteroides e inmunosupresores, falta de acceso a

los servicios de salud y la presencia de otros padecimientos asociados (como diabetes mellitus, artritis reumatoide, enfermedad de Hodgkin's, lupus, VIH/SIDA) contribuyen al aumento de los casos y favorecen la persistencia de la enfermedad (García-García et al., 1995; DeRiemer et al., 2005, Ponce-de-León et al., 2004).

El 80% de los casos se deben a formas pulmonares afectando generalmente a la población económicamente productiva (25-60 años), siendo la edad promedio de 46 años y se presenta mayormente en hombres, esto implica una gran carga social. También, afecta a menores de cinco y a mayores de 15 años; los menores de cinco años contribuyen con un 5.4% de los casos con la forma meníngea, mientras que los mayores de 15 años representan el 87% con la forma pulmonar (Salazar-Lezama,2003).

Un caso activo de TBP puede infectar de 12 a 20 personas de los cuales, dos a cuatro desarrollarán la enfermedad (Báez-Saldaña et al., 2003).

En la era previa a la quimioterapia morían entre el 50 a 60% de los casos; sin embargo, desde su introducción, esto ha disminuido. En países industrializados la mortalidad disminuye cada año entre 4-5% aun sin tratamiento, este es el ritmo de eliminación espontánea que puede incrementar hasta en un 7-9% con quimioterapia efectiva y hasta 14% con muy buenos programas de control.

En México, tan solo se observó una tasa de disminución del 18% entre 2001 y 2004, cuando estimaciones de la OMS era que para el 2005 hubiera una reducción del 85% del total de casos de TB a nivel mundial (Báez-Saldaña et al., 2003; DGE, 2001 y 2004).

### III. MANIFESTACIONES CLÍNICAS

La manifestación clínica mas común es la TBP, también puede presentarse la extrapulmonar que afecta diversos órganos y/o sistemas, los más frecuentes son el sistema genitourinario, sistema nervioso central (SNC), las articulaciones y los huesos, los ganglios linfáticos, la pleura y el peritoneo (Frieden et al., 2003; Wolinsky, 1996).

Las consecuencias de inhalar o ingerir bacilos de TB dependen tanto de la virulencia del organismo como de la resistencia del hospedador, así como también el tamaño y la localización del inóculo. La OMS recomienda clasificar la enfermedad en forma: severa y no severa, dentro de las formas severas incluyen TB meníngea, pulmonar y del SNC; las no severas son la genitourinaria, linfática gastrointestinal, ganglionar, pleural, y ósea (Frieden et al., 2003; Wolinsky, 1996).

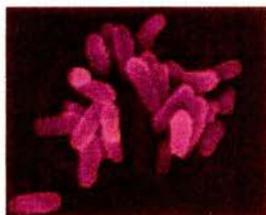
Al liberarse el material de las lesiones primarias se forma una cavidad pulmonar provocando la extensión de la enfermedad a través de los bronquios. La ruptura de lesión en una vena pulmonar produce TB diseminada o miliar, definida

como la afección simultánea de varios órganos y es el resultado de una enfermedad progresiva o reactivación de una enfermedad latente (Frieden et al., 2003; Wolinsky, 1996).

La manifestación clínica más seria es la del SNC formándose tuberculomas en el cerebro e inflamación de meninges. Las manifestaciones neurológicas son parálisis del nervio craneal, sensorial, motor, defectos cerebrales de acuerdo a la localización del tuberculoma. La meningitis es fatal en todos los casos sin tratamiento, la identificación y el tratamiento rápido son esenciales para la prevención de serias secuelas neuronales (Frieden et al., 2003).

La TB genitourinaria es poco común y difícil de distinguir de otras infecciones del tracto genitourinario. En hombres la enfermedad presenta manifestaciones tales como prostatitis, epididimitis, orquitis y dolor en la masa escrotal. En las mujeres en cambio, la enfermedad es una causa de infertilidad (Frieden et al., 2003).

#### IV. CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS DEL AGENTE CAUSAL



*Mycobacterium tuberculosis* es un bacilo ligeramente curvado Gram-positivo, alrededor de 2 a 4  $\mu\text{m}$  de largo y 0.2 a 0.5  $\mu\text{m}$  de ancho.

Bacteria ácido-resistente, no móvil, conformada en vástago, aerobio obligatorio, patógena intracelular del orden de los Actinomicetos, perteneciente a la familia de Mycobacteriaceae.

*M. tuberculosis* es uno de los principales agentes causales de la TB en el humano, aunque *M. africanum*, *M. bovis*, *M. avium* y *M. intracellulare* también son agentes etiológicos de la TB y son parásitos obligados.

Varias especies, incluyendo *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. avium* y *M. leprae* son patógenos intracelulares de vertebrados mayores, y puede causar la muerte en animales y humanos por ser patógenos oportunistas; *M. avium* y *M. kansasii* afectan principalmente a personas inmunocomprometidas.

Otras especies como *M. intracellulare*, *M. xenopae* y *M. fortuitum*, también producen síntomas clínicos similares a los de la TBP en seres humanos (Copp, 2003; Said et al., 2003, Collins et al, 1995).

## **V. RESPUESTA INMUNE EN LA TUBERCULOSIS**

En individuos infectados, el desarrollo de la inmunidad celular tarda de 2-8 semanas. Al inhalar partículas con *M. tuberculosis*, estas son depositadas en los alvéolos pulmonares, llegando específicamente a los macrófagos, donde

se inicia una serie de eventos inmunológicos en cascada, desarrollando la infección o progresión de la enfermedad activa.

Las micobacterias se reproducen lentamente dentro de los macrófagos y salen a torrente sanguíneo acumulándose en los nodos linfáticos. Los linfocitos T y macrófagos activados forman granulomas que permiten la replicación y distribución de micobacterias en el organismo (Frieden et al., 2003).

El desarrollo de la enfermedad está en relación con una proliferación desordenada de las micobacterias asociada a un daño tisular (necrosis por caseificación), pudiéndose reconocer en la radiografía de tórax. Este daño es el responsable de la manifestación clínica de la enfermedad.

La respuesta a la infección por micobacterias es el ejemplo clásico de una respuesta inmune mediada por células a un parásito intracelular facultativo, las micobacterias dentro de las células fagocíticas son capaces de evadir la respuesta humoral y mantener viabilidad por tiempo prolongado.

Los macrófagos y linfocitos T juegan un papel importante en el desarrollo de la enfermedad, mediante la liberación de citocinas. Las células T toman parte en la activación y regulación de los macrófagos y subsecuentemente en el control de las micobacterias dentro de éste. Los macrófagos infectados liberan diversas interleucinas (IL) o agentes

proinflamatorios como la IL-12 y IL-18 que estimulan a los linfocitos T especialmente a CD4 provocando la liberación de interferón-gama (IFN- $\gamma$ ). Estas citocinas estimulan la fagocitosis de *M. tuberculosis* en el macrófago. La presencia de IFN- $\gamma$  es crucial para el control de la infección ya que estimula al macrófago para liberar el factor de necrosis tumoral alfa-TNF- $\alpha$  (Sada-Díaz, 2003; García-Sancho, 2001).

La respuesta TH-1 constituye una respuesta inmunoprotectora contra *M. tuberculosis*, se encuentra modulada por IL-1 e IL-12 mediada por células T CD4 secretando IL-2 e IFN- $\gamma$ . En esta inmunidad también están implicados las células T CD4 alfa/beta ( $\alpha/\beta$ ), células T CD8  $\alpha/\beta$  y las células T gama/delta ( $\gamma/\delta$ ).

Datos recientes correlacionan la producción de IFN- $\gamma$  por células T  $\gamma/\delta$  y otras citocinas como el TNF- $\alpha$ , la IL-1 e IL-6 (producidas por macrófagos infectados y por linfocitos expuestos a productos micobacterianos); estas citocinas además de ejercer efectos inmunoreguladores median mucha de la manifestación clínica de la TB. Por ejemplo, la presencia de TNF- $\alpha$  provoca fiebre, pérdida de peso y necrosis tisular que son características típicas de la TB; IL-1 contribuye a la presencia de fiebre; IL-6 hiperglobulinemia que muy característico en pacientes con TB. Por otra parte, estas citocinas son esenciales para la formación de granulomas que permiten contener la infección (Sada-Díaz, 2003; García-Sancho, 2001).

## VI. TRATAMIENTO

El Tratamiento Acordado Estrictamente Supervisado (TAES) o DOTS implementado en 1996 y recomendado por la OMS es una estrategia para un tratamiento estandarizado y supervisado (Salazar-Lezama, 2003), el cual incluye cinco fármacos de primera línea: Rifampicina (R), Isoniazida (I), Estreptomicina (S), Etambutol (E) y Pirazinamida (Z) (Espinal, 2000); los fármacos de segunda línea son: ácido p-aminosalisílico (PAS), protionamida, cicloserina, tioacetozona, kanamicina y amikacina.

El tratamiento consiste en un régimen regularmente de 6 meses, administrándose I, R, E, S y Z durante dos meses, seguido de la administración por cuatro meses con I y R (Frieden et al., 2003). El tratamiento es prolongado por lo que se convierte en una de las desventajas, provocando poco apego al mismo.

El TAES es una de las intervenciones de mayor costo-efectividad, que ha permitido una tasa de curación de 78.5%, comparado con 44.8% en pacientes tratados en áreas sin TAES (Báez-Saldaña et al., 2003).

Las modalidades de tratamiento en casos de resistencia al TAES son muy limitadas y no necesariamente acordes al perfil de sensibilidad de cada caso. Una alternativa más racional sería obtener primero el perfil de sensibilidad de resistencia a medicamentos de primera y de segunda elección,

para luego prescribir un tratamiento acorde a este perfil (Said et al., 2003).

Recientemente, de acuerdo a la revisión de los datos epidemiológicos para algunos estados de la República Mexicana se encontró un elevado fracaso en el tratamiento de TB, por lo que este trabajo permitió hacer modificaciones importantes a la Norma Oficial Mexicana (NOM) hasta el 2000 sobre los esquemas de tratamiento e hicieron énfasis en tres rubros:

a) implementación de la estrategia TAES para todos los casos de TBP;

b) la administración de cuatro fármacos en el tratamiento primario con el objetivo de disminuir el riesgo de falla terapéutica y;

c) la estructuración de los comités estatales para el tratamiento de los casos con sospecha o comprobación de resistencia antimicobacteriana con el propósito de administrar un tratamiento acorde a la susceptibilidad (Sifuentes-Osornio et al., 2003).

Se ha subrayado la importancia de reforzar la estrategia TAES, que es la herramienta más útil en el control de la TB (García-García, 2003, Ponce-de-León et al., 2004).

Hoy en día, es claro que la terapéutica de este padecimiento debería darse en el primer nivel de atención, y

solo los casos complicados o con enfermedades subyacentes de difícil control serían manejados por el especialista.

Desafortunadamente, lo más común es que ni el médico general ni los especialistas tienen el conocimiento ni la destreza para diagnóstico y tratamiento de acuerdo con los criterios aceptados internacionalmente, por lo que estos son factores que contribuyen al aumento de la enfermedad (Villalba-Caloca, 2003).

Por lo anterior es indispensable y urgente aplicar de manera ordenada y constante el programa TAES en todo el país con el propósito de evitar la transmisión de cepas multifarmacoresistentes, curando a la mayoría de los enfermos con TBP e impedir la generación de organismos resistentes al aplicar el tratamiento de manera correcta y supervisada a nivel nacional (Villalba-Caloca, 2003).

## **VII. TUBERCULOSIS MULTIFARMACORESISTENTE**

Los casos de TB multifarmacoresistentes (TB-MFR) va en aumento sobre todo en algunas regiones del mundo y nuestro país no escapa de éste problema, por la utilización inapropiada de los esquemas de tratamiento. Respecto a datos epidemiológicos sobre el aumento de cepas MFR, estos indican fallas preocupantes en el seguimiento del programa TAES dado

el aumento acelerado de estos casos en México (Sifuentes-Osornio et al., 2003).

La tasa de curación de una TB farmacoresistente (FR) es mayor a 95% y disminuye a un 50% o menos en los casos de TB-MFR (Báez-Saldaña et al., 2003). Por ello, la TB-MFR, se ha catalogado como un fenómeno emergente que constituye una creciente amenaza para el control de la enfermedad (Salazar-Lezama, 2003).

Entre 1950-1970, la TB-MFR se consideraba como una simultánea resistencia a I, S y PAS. Para el periodo 1980-1990, TB-MFR queda definida como la resistencia simultánea a I y R debido a que estos dos fármacos son la piedra angular en lo propuesto por el programa TAES (Bastian y Portaels, 2000).

En un estudio realizado entre 1996 y 1999, para los pacientes diagnosticados con TB, la frecuencia de la resistencia a un fármaco antituberculoso era del 1.7% en Uruguay, 36.9% en Estonia para 1998, y del 9.9% en Dinamarca hacia 1995. (Espinal et al., 2001).

Los estudios de resistencia primaria (RP) a fármacos antituberculosos en América, coinciden con lo que se ha comprobado a escala mundial (Salazar-Lezama, 2003). México en 1997, ocupaba el noveno lugar por FR (incluyendo RP y MFR primaria) en un estudio realizado en 35 países (Sifuentes-Osornio et al., 2003; Granich et al., 2000).

La TB-MFR en México ha mostrado incremento en las tasas tanto de RP como resistencia secundaria -RS- (Sifuentes-Osornio et al., 2003) y existe un reporte del Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (INDRE), del periodo 1989 a 1993, indicando que de un total de 1,637 cepas de *M. tuberculosis*, el 8.2% mostró RP y el 63% RS. De estas últimas, el 31.2% presento resistencia a dos fármacos y mas del 30% fue resistente a tres o mas drogas antituberculosas (Said et al., 2000).

En 1997, se efectuó un estudio de FR en los estados de Baja California, Sinaloa y Oaxaca, dónde la resistencia a uno o mas fármacos de primera línea en casos nuevos fue de 12.9% y en los casos de retratamiento fue de 50.5%, y para la MFR se observó un 24% en los casos nuevos y un 22.4% en los retratamientos (Granich et al., 2000).

Otro estudio de FR realizado en Huachinango, Puebla y Orizaba, Veracruz en el periodo 1995-1998 se encontró que Huachinango presenta 12% de RP y 29% de RS de un total de 165 casos. Para Orizaba se encontró el 21% de RP y el 55% de RS para un total de 232 casos (Sifuentes-Osornio et al., 2003).

Un estudio que se esta realizando en Monterrey, Nuevo León indica que han encontrado un 22% de RP y un 34% de RS (Comunicación personal, Dr. Salvador Said, 2005).

### VIII. IMPORTANCIA DE LAS PLANTAS MEDICINALES

La OMS estima que el 80% de las personas que viven en países tercermundistas, usan a las plantas en la medicina tradicional (Eloff, 1998). Los productos naturales de origen vegetal han sido motivo de estudio con el objeto de conocer la naturaleza química y los efectos biológicos de los metabolitos aislados (Phillipson, 1999). Las plantas superiores constituyen una reserva de compuestos químicos de utilidad potencial como fármacos, que ha sido extensamente documentada (Newman et al., 2000).

Actualmente en uno o más países, utilizan fármacos importantes que contienen distintas sustancias químicas (existen por lo menos 119) de origen vegetal; por ejemplo: la pseudoefedrina aislado de *Ephedra sinica* Stapf, que es un simpaticomimético utilizado en la medicina tradicional contra la bronquitis crónica; la santonina aislada de *Artemisia maritima*, es un antihelmíntico que actúa clínicamente como Ascaricida (Farnsworth et al., 1989) Los productos naturales constituyen una fuente importante de núcleos químicos estructurales que han servidos como prototipo para la síntesis y desarrollo de compuestos análogos (Copp, 2003).

Actualmente, esta fuente tiene gran importancia económica; ya que la medicina tradicional juega un papel en la práctica medicinal mexicana para aliviar diversas enfermedades como la parasitosis, malaria, tuberculosis, cáncer, etc. (Hernández et al., 2003).

La investigación realizada para separar, purificar y elucidar la estructura de un metabolito secundario con determinada actividad biológica requiere de una colaboración multidisciplinaria donde participan farmacólogos, químicos, farmacognostas, bioquímicos, toxicólogos, entre otros expertos (Balandrin et al., 1993).

#### **IX. LAS PLANTAS MEDICINALES COMO FUENTE DE AGENTES ANTITUBERCULOSOS**

En la actualidad la TB es un grave problema de salud, por lo que diversos grupos de investigación a nivel internacional, se están enfocando a la búsqueda de compuestos antituberculosos. Como resultados de estas investigaciones, en la literatura se describen numerosos metabolitos secundarios activos contra cepas de micobacterias. A continuación se describirán solo aquellos compuestos con mayor actividad, que muestran una concentración mínima inhibitoria (CMI)  $\leq 16 \mu\text{g/mL}$ .

En el extracto metanólico de *Leucas volkensii* (un arbusto de kenia) se aisló el diterpeno (E)-fitol como principal constituyente antimicobacteriano, con un CMI de  $2 \mu\text{g/mL}$  (Cantrell et al., 2001; Copp, 2003).

Otros compuestos de tipo sesquiterpeno son dihidrocostulactona aislado de *Saussurea lappa* cuya CMI= $2 \mu\text{g/mL}$ ; aromaticina y encelina aislados de *Helenium cromaticin*

y *Montanoa speciosa*, respectivamente, presentaron CMI=16  $\mu\text{g/mL}$  (Cantrell et al., 2001). Entre los diterpenos se encuentran 12-dimetilmulticaulina, 12-dimetilmultiortoquinona y 12-metil-5-dihidrohorminona, con CMI's de 0.46  $\mu\text{g/mL}$  para el primero y 1.2  $\mu\text{g/mL}$  para los dos últimas, aislados de *Salvia multicaulis* (Cantrell et al., 2001).

Así mismo, se describen varios triterpenos, siendo los más activos el ergosterol-5,8-éndoperoxido con CMI=1  $\mu\text{g/mL}$  y 6 $\beta$ -hidroxiculactona con CMI=4  $\mu\text{g/mL}$ , aislados de *Ajuga remota* y *Melia volkensii*, respectivamente (Cantrell et al., 2001).

A partir de *Ruprechia triflora*, se aislaron como compuestos responsables de la actividad antimicobacteriana a los esteroides identificados como 5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -epidioxi ergost-6,22-dien-3 $\beta$ -ol, 5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -epidioxiestigmasta-6,22-dien-3 $\beta$ -ol y estigmas-4-en-6 $\beta$ -ol-3-ol cuyo efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *M. tuberculosis* fue de 2, 2, 4  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente (Woldemichael et al., 2003). Además, este mismo autor reporta triterpenos activos de *Calceolaria pinnifolia* que fueron identificados como 19-maloniloxidehidroabietinol y 19-metilmaloniloxi-ent-isopimara-8(9), 15-diona cuyas CMI fue de 4  $\mu\text{g/mL}$ . De *Lessonia nigrescens* se aislaron tres compuestos: el saringosterol y sus dos epímeros el 24R y el 24S, que inhiben el crecimiento de *M. tuberculosis*. El compuesto más activo fue el epímero 24R con una CMI=0.125  $\mu\text{g/mL}$ , seguido del saringosterol con una CMI=0.25  $\mu\text{g/mL}$  y por último el epímero

24S con una CMI=1 µg/mL (Wächter et al., 2001).

Otros tritepenoides que se aislaron del extracto diclorometano de *Lippia turbinata*, presentaron actividad antituberculosa con una CMI de 1 a 8 µg/mL, dichos compuestos son: ácido 3β-,25-epoxi-3α,21α-dihidroxi-22β-(3-metilbut-2-en-1-oiloxi)olean-12-ene-28-oico; ácido 3β-,25-epoxi-3α,21α-dihidroxi-22β-angeloiloxiolean-12-ene-28-oico; ácido 3β-,25-epoxi-3α,21α-dihidroxi-22β-tigloiloxiolean-12-ene-28-oico; ácido 3β-,25-epoxi-3α-dihidroxi-22β-(2-metilbutano-1-oiloxi)olean-12-ene-28-oico; ácido lantanílico; ácido camarico; ácido lantanólico y ácido remánico (Wächter et al., 2001).

#### **X. GENERALIDADES DE *Artemisia ludoviciana***



Foto:CIDE-Jardín Botánico UNAM

La especie pertenece al género *Artemisia* de la Familia COMPOSITAE; es conocida comúnmente como: estafiate, ajeno del país, artemisa.

Es una herbácea o arbustiva de 50 cm hasta 1 m de altura, hojas alternas sésiles, aromáticas, alternas, enteras y tomentosas.

Las flores periféricas uniseriadas, amarillas. Invólucro ovoide, acampanado, con las brácteas pauciseradas, membranosas en el margen, las exteriores más cortas (Lara y Márquez, 1996; Sánchez, 1980).

Esta planta se encuentra en todo el territorio mexicano, distribuyéndose en el Estado de México, Aguascalientes, Chiapas, Zacatecas, Baja California, Sinaloa, Coahuila, Distrito Federal, Puebla, Morelos, Michoacán, Tamaulipas, Veracruz, San Luis Potosí, Chihuahua, Jalisco, Durango (Lara y Márquez, 1996).

La especie es de hábito terrestre creciendo en asociación con encinos, coníferas y otras latifoliadas. Planta originaria de Norteamérica y Mesoamérica. Habita en climas cálidos, semicálido y semiseco. Crece a orillas de caminos, en terrenos de cultivo abandonados y es común en vegetación perturbada y es cultivada en huertos familiares, además de ser pretejida y fomentada en los alrededores de los campos de cultivo. Florece de agosto a septiembre; es una planta que no tiene problemas de supervivencia por su gran abundancia (Rzedowski, 1985; Emes, 1994).

Las partes usadas son las hojas y el tallo en té para curar el empacho, diarrea, dolores fuertes de estómago, cólicos, resfriados, fiebre, como antihelmíntico, estomáquico y en casos de reumatismo (Emes, 1994; Ochurte, 1994; Parra, 1994; Lara y Márquez, 1996).

## X.1 Investigación química de *A. ludoviciana*

La especie ha sido objeto de diversas investigaciones químicas donde se describe que principalmente biosintetiza lactonas sesquiterpénicas como: armefolina, 8- $\alpha$ -acetoxiarmexifolina, artemexifolina, estafiatina, friedolen-3-ona, artemisia isocetona, tulipinolida, arglanina, artemorina, douglanina, armexifolina y armexina. Así mismo, contiene terpenos como: crisartemina A, ludalbina, santamarina,  $\alpha$ -epoxiludalbina, borneol, alcanfor, linoneno,  $\alpha$  y  $\beta$ -felandreno. Estas investigaciones se han realizado en hojas y partes aéreas de la planta (Lara y Márquez, 1996). A partir de un espécimen de Arizona se obtuvieron cinco lactonas sesquiterpénicas, de entre las cuales destaca la douglanina (Lee & Geissman, 1970).

En otras investigaciones realizadas en la especie, se reporta la presencia de sesquiterpenos; dos guayanólidos: la estafiatina y la crisartemina A. También se han aislado dos santanólidos ya conocidos; la douglanina y la arglanina (Romo y Tello, 1972). En *Artemisia mexicana* var. *angustifolia*, se encontró 8 $\alpha$ -acetoxiarmexifolin (Mata et al., 1984).

## X.2 Investigación biológica de *A. ludoviciana*

El extracto etanólico de las partes aéreas presenta efecto antimalárico *in vivo* (Malagon et al., 1997). En el extracto metanólico de las partes aéreas del material vegetal colectado en British Colombia, presenta actividad antifúngica

contra diversas especies de hongos (McCutcheon et al., 1994). Otras investigaciones biológicas realizadas en la especie es el efecto antimicobacteriano; McCutcheon y colaboradores (1994), reporta que el extracto metanólico inhibe el crecimiento de *M. tuberculosis* cepa Erdman a 20 mg/mL y el extracto diclorometano de material vegetal colectado en Óregon no presento actividad contra *M. tuberculosis* H37Rv al ser evaluado por el método radiorespirométrico BACTEC 460 (Cantrell et al., 1998).

Recientemente se reportó que los extractos hexánico y metanólico del material vegetal, colectado en Oaxaca, inhiben el crecimiento de *M. tuberculosis* H37Rv a 200 µg/mL al ser evaluado por el método MABA; además a esta misma concentración inhiben las cepas monoresistentes (I, R y E) de *M. tuberculosis* H37Rv (Jiménez et al., 2003). Otro efecto que se describe es la inhibición del factor NF-kappa β (Bork et al., 1997).

#### **XI. GENERALIDADES DE *Aristolochia taliscana***

La especie pertenece al género *Aristolochia* (Familia ARISTOLOCHIACEA), generalmente son hierbas trepadoras con hojas alternas, simples, perennes, aromáticas, de tallos simple o ramificado y el fruto es una cápsula o folículo de embrión pequeño (Wu et al., 1999).

*Aristolochia* es el género con mayor número de especies en la familia (aproximadamente 500). La mayoría se distribuyen en las regiones tropicales y subtropicales y muy pocas en regiones templadas. En el continente Americano el género se encuentra distribuido desde la vertiente sur-oriental de los Estados Unidos a través de México, Antillas y América Central hasta Sudamérica (Argentina). Para México se reportan 64 especies (Wu et al., 1999).

### **XI.1 Investigación química de *A. taliscana***

Este género reportan la presencia de lignanos, diterpenos, flavonas, dímeros de chalcon-flavonas, sesquiterpenos, obtenidos de los extractos de hojas, tallos y raíz (Wu et al., 1999; 2000, 2002). También se sabe que en la medicina tradicional de China se emplea como expectorante, antitusiva, analgésico, antihistamínico, antiasmático, contra mordeduras de serpiente y para la inflamación de pulmón (Wu et al., 1999).

Recientemente se aislaron los compuestos: eupomatenoide-7 y -1, licarina A y B, austrobailignano, fragransina E1, (-)-metilpluviatolido, cloruro de berberina, y harmina. (Abe et al., 2002, Enríquez et al., 1984). La licarina A, Licarina B y eupomatenoide-7 son los compuestos responsables del efecto antimicobacteriano mostrado por el extracto hexánico de *A. taliscana* cuyas CMI fueron de 100, 25 y 6.25 µg/mL (León, 2005).

## XI.2 Investigación biológica de *A. taliscana*

Se ha encontrado que el extracto metanólico de la raíz de *Aristolochia brevipes* Beth posee actividad antibacteriana contra *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus* (Encarnación y Keer, 1991). Otro reporte indica que el extracto metanólico de *A. paucinervis* Pomel, posee actividad antibacteriana sobre organismos gram positivos (Gadhi et al., 1999). La literatura reporta que el extracto metanólico de esta especie posee actividad tripanocida. *A. taliscana*, es llamada "guaco", y se utiliza como remedio contra la diarrea, mordeduras de serpientes, y afecciones dermatológicas.

 HIPÓTESIS

Con base a investigaciones previas de las dos especies (*A. ludoviciana* y *A. taliscana*) en estudio y considerando el efecto antimicobacteriano mostrados por los extractos, hexánico y metanólico, respectivamente; indican que contienen metabolitos secundarios de diferente naturaleza química (terpenos, esteroides y neolignanoides) capaces de inhibir el crecimiento de micobacterias, los cuales serán aislados e identificados mediante un fraccionamiento químico biodirigido.

### ∞ OBJETIVO GENERAL

Realizar el fraccionamiento químico biodirigido de dos especies medicinales (*Artemisia ludoviciana* y *Aristolochia taliscana*) para aislar e identificar los metabolitos secundarios responsables de la actividad antimicobacteriana.

### ∞ OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.1 Realizar el fraccionamiento químico del extracto hexánico de *Artemisia ludoviciana*.
- 1.2 Determinar la actividad antimicobacteriana de las fracciones primarias por el método radiorespirométrico BACTEC 460 de *A. ludoviciana*.
- 2.1 Realizar el fraccionamiento químico del extracto metanólico de *A. taliscana*.
- 2.2 Determinar la actividad antimicobacteriana de las fracciones primarias por el método radiorespirométrico BACTEC 460 de *A. taliscana*.
3. Aislamiento y purificación de los compuestos presentes en las fracciones activas mediante el uso de diversos métodos cromatográficos.
4. Identificación de los compuestos activos mediante el análisis de sus datos espectroscópicos y espectrométricos y/o por comparación de estándares.

**METODOLOGÍA**

Dada la actividad antimicrobacteriana *in vitro* demostrada por el extracto hexánico de *Artemisia ludoviciana* y el extracto metanólico de *Aristolochia taliscana*, estos fueron sometidos a diversos procesos cromatográficos que incluyo cromatografía en columna de fase normal (CC-FN) y de capa fina (ccf). La cromatografía tiene como fundamento general la separación ó aislamiento de productos individuales a partir de una mezcla compleja en base a la afinidad de cada compuesto a la fase móvil o a la fase estacionaria (Figura 1). Esta distribución desigual de compuestos se da por la diferente afinidad de los mismos en ambas fases. En el caso específico de este trabajo de investigación se utilizo como fase estacionaria silica gel 60 (Merck) y como fase móvil hexano, mezcla de hexano:cloroformo (100→0) cloroformo, mezcla de cloroformo:metanol (100→0) y metanol, grado analítico (J.T. Bajer o Mallinkrot).

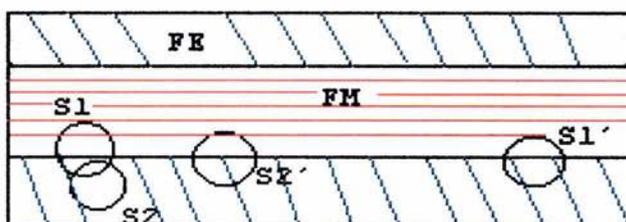


Figura 1. Principio general de la separación por cromatografía (FE, fase estacionaria; FM, fase móvil; S1, compuesto 1 poco polar; S2, compuesto 2 muy polar; S1' y S2', es la zona de posición de los mismos compuestos después de cierto periodo de flujo cromatográfico).

## **I. FRACCIONAMIENTO QUÍMICO**

### **I.A Extracto hexánico de *Artemisia ludoviciana* (ArluI)**

El fraccionamiento se realizó por cromatografía en columna fase normal (CC-FN) con 10 g del extracto, empacando la columna con 151.8 g de sílica gel (Merck). Como fase móvil se utilizaron Hexano, cloroformo (CHCl<sub>3</sub>) y mezcla de ellos con polaridad creciente. Este proceso permitió obtener un total de 6 fracciones (F1', F2', F3', F4', F5' y F6') de 400 mL c/u.

#### **I.A.1 Proceso de partición para ArluI**

En la realización CC-FN del extracto, la columna se fracturo por lo que se decidió desmontarla y recuperar el extracto sembrado. Al extracto adsorbido en la sílica gel, se le realizaron lavados con Hexano, CHCl<sub>3</sub>, metanol (MeOH) y mezcla de ellos, dando paso a lo que se le conoce como proceso de partición, el cual se muestra en el Diagrama 1.

Mediante este proceso se obtuvieron cuatro fracciones con diferente grado de polaridad cuyas claves finales fueron: ArluI/1, ArluI/2, ArluI/3 y ArluI/4.

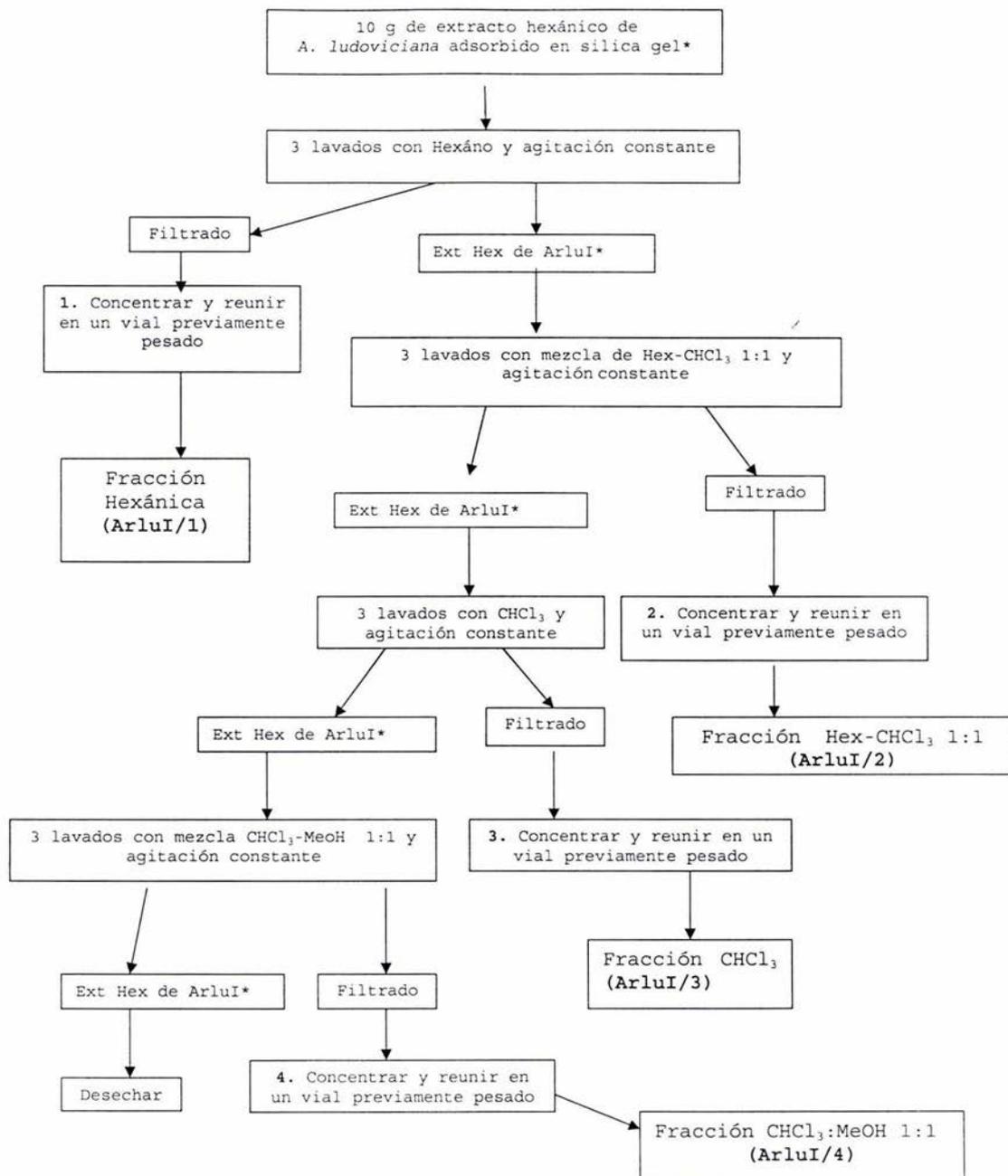
La sílica restante de la columna, se dividió en cuatro partes (A, B, C y D), a las cuales también se les realizó lavados; primero con Hexano obteniéndose las muestras con

clave A, B, C y D, posteriormente se realizaron lavados con  $\text{CHCl}_3$ , estos lavados fueron clasificados como A, B', C' y D'.

Las 12 muestras obtenidas del proceso anterior más las seis fracciones iniciales de la columna, fueron sometidas a cromatografía en capa fina (ccf), en donde se observó similitud entre ellas por lo que se reunieron las muestras ArluI/2, ArluI/3 y A' cuya clave final fue ArluI/2-3. Otras muestras reunidas son B', C', D' y C cuya clave final fue FB'. Las fracciones A, B y D fueron desechadas por tener mínima cantidad y por no presentar compuestos bien definidos. Las fracciones F1' y F2' se reunieron quedando con la clave final F1', así también se reunieron las fracciones F3'-F6' quedando con la clave final F3'.

Las fracciones ArluI/1, ArluI/2-3, ArluI/4, F3' y FB' fueron sometidas a ensayo biológico.

Diagrama 1. Proceso de partición de ArluI



### I.A.2 Fraccionamiento secundario de ArluI/2-3.

De acuerdo a los resultados obtenidos del ensayo antimicobacteriano, esta fracción resulto activa por lo que fue sometido a CC-FN empacada con 60 g de sílica gel, para ello se utilizaron 3 g de la fracción ArluI/2-3.

Como fase móvil se utilizaron mezclas de disolventes (Hexáno,  $\text{CHCl}_3$  y MeOH) con polaridades crecientes. Este proceso permitió obtener un total de 8 grupos de fracciones de 125 mL c/u que fueron reunidos de acuerdo a su perfil cromatográfico en ccf.

Las reuniones realizadas, pesos de cada una y clave final; así como los sistemas de elusión empleados se describen en la Tabla 1.

Tabla 1. Fraccionamiento secundario de ArluI/2-3.

Eluyente	Sistema elusión (%)	Fracciones		Peso (g)	Rendimiento (%)	Clave final
		Eluidas	Reunidas (⊕)			
Hexáno	100	1-12	1-16	0.3350	23.9285	fa
Hex:CHCl <sub>3</sub>	95:5	13-20	17-29	0.0894	6.3857	fb
	9:1	21-26	30-35	0.0144	1.0285	fc
	8:2	27-41	36	0.0058	0.4142	fd
	7:3	42-54	37-38	0.2300	16.4285	fe
	1:1	55-57	39-43*	0.279	19.9285	ff
CHCl <sub>3</sub>	100	58-60	44-59	0.2004	14.3142	fg
CHCl <sub>3</sub> :MeOH	7:3	61	60-61*	0.232	16.5714	fh

\*fracciones sometidas a ensayo biológico.

(⊕) Reunidas de acuerdo al perfil en ccf

En la Tabla 2 se describe en resumen la reunión de las fracciones de ArluI/2-3 y ArluI/4, así como la clave final de las mismas.

Tabla 2. Reunión y clave final de fracciones obtenidas de *Artemisia ludoviciana*.

Clave	Reunión	Peso (g)
ArluI/9A*	ArluI/2-3/F39-43 con ArluI/4/F28-31	0.3165
ArluI/9B*	ArluI/2-3/F60-61 Con ArluI/4/F44-58	0.529

\* muestras enviadas a análisis de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG-EM).

### I.A.3 Fraccionamiento secundario de ArluI/4.

Esta fracción se sometió a CC-FN empacada con 40 g de sílica y se sembraron 1.2258 g de muestra.

Como fase móvil se utilizaron mezclas de disolventes (Hexáno,  $\text{CHCl}_3$  y MeOH) con polaridades crecientes.

Este proceso permitió obtener un total de 9 grupos de fracciones de 87 mL c/u, la reunión se realizó de acuerdo a su perfil cromatográfico en ccf.

Los datos se describen en Tabla 3.

Tabla 3. Fraccionamiento secundario de ArluI/4.

Eluyente	Sistema elusión (%)	Fracciones		Peso (g)	Rendimiento (%)	Clave final
		Eluidas	Reunidas ( $\Phi$ )			
Hexáno: CHCl <sub>3</sub>	75:25	1-30	1-3	0.0052	0.426	FA
	1:1	31-41	4-6	0.0021	0.172	FB
	25:75	42-46	7-10	0.0027	0.221	FC
CHCl <sub>3</sub>	100	47-59	11-17	0.0034	0.278	FD
CHCl <sub>3</sub> :MeOH	9:1	60-67	18-27	0.0123	1.008	FE
	1:1	68	28-31	0.0349	2.860	FF*
			32-43	0.0605	4.959	FG
			44-58	0.5029	41.221	FH*
			59-68	0.8877	72.7662	FI

\*estas fracciones se reunieron y la clave final se describen en la Tabla 2. ( $\Phi$ ) Reunidas de acuerdo al perfil en ccf

## I.B Extracto metanólico de *Aristolochia taliscana* (ARII)

### I.B.1 Proceso de partición de ARII

Para este proceso se tomaron 14.4 g del extracto metanólico y fue disuelto en 20 mL MeOH al 90%, esta mezcla se lava tres veces con 40 mL de Hexáno:CHCl<sub>3</sub> 75:25 c/u en un embudo de separación.

Se obtiene la fase orgánica a la cual se le extrae el agua con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtra, se concentra y se

transvasa a un vial previamente pesado y etiquetado como **ARII/1**.

Se realiza el mismo procedimiento, pero con lavados de  $\text{CHCl}_3$  al 100%, el vial se etiqueta con clave **ARII/2**.

Nuevamente se hacen tres lavados con  $\text{CHCl}_3$  al 100% porque el color permanecía intenso; se etiquetó como **ARII/2'**. (Ver diagrama 2).

Después de este proceso se realizó ccf para determinar similitud y complejidad de las fracciones, además se realizó comparación con compuestos obtenidos previamente del extracto hexánico de *A. taliscana* (León, 2005).

### **I.B.2 Fraccionamiento primario de ARII/1**

La muestra **ARII/1** (obtenida con Hexano: $\text{CHCl}_3$  75:25) por su complejidad observada en ccf se sometió a un fraccionamiento en CC-FN para purificar los compuestos presentes. Para este fraccionamiento, se utilizó 1.5 g de la fracción en 37.5 g de sílica como fase móvil se utilizaron mezclas de disolventes (Hexano,  $\text{CHCl}_3$  y MeOH) con polaridades crecientes.

Este proceso permitió obtener un total de 109 fracciones, las cuales se reunieron según el perfil cromatográfico en ccf en 19 grupos de fracciones.

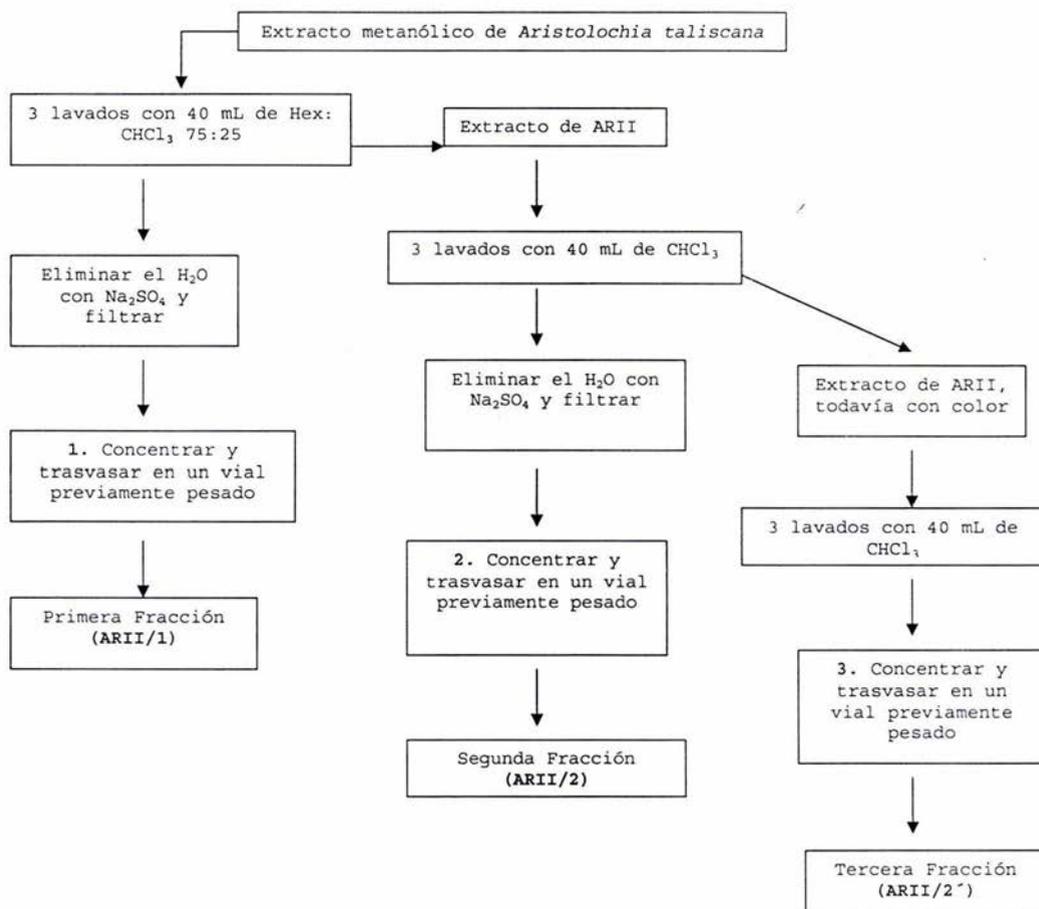
Los datos se describen en Tabla 4.

Tabla 4. Fraccionamiento secundario de ARII/1

Eluyente	Sistema elusión (%)	Fracciones		Peso (mg)	Rendimiento (%)	Clave final
		Eluidas	Reunidas (ϕ)			
Hexáno: CHCl <sub>3</sub>	9:1	1-8	1	8.7	0.58	1
	8:2	9-18	2-8	0.4	0.026	2
	7:3	19-32	9-11	23.7	1.58	3
	6:4	33-46	12-16	22.5	1.5	4
	1:1	47-62	17-21	10.0	0.66	5
	25:75	63-77	22	10.7	0.7133	6
CHCl <sub>3</sub>	100	78-96	23-26	189.1	12.6066	7
CHCl <sub>3</sub> :MeOH	9:1	97-101	27-28	28.5	1.9	8
	75:25	102-106	29-34	259.4	17.2933	9
	1:1	107-108	35-36	48.5	3.233	10
MeOH	100	109	37-41	63.4	4.226	11
			42-60	141.2	9.413	12
			61-79	44.7	2.98	13
			80-87	1622.6	10.84	14
			88-89	20.6	1.373	15
			90-96	32.7	2.18	16
			97-100	319.3	21.286	17
			101-103	86.9	5.793	18
			104-109	121	8.066	19

(ϕ) Reunidas de acuerdo al perfil en ccf

Diagrama 2. Proceso de partición de ARII



## **I.C Identificación química 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 CC-FN, ccf, cristalización que es la separación de un sólido de una solución, mediante concentración de ésta hasta llegar al punto de saturación y adoptando entonces el sólido separado su correspondiente forma cristalina.

La identificación de los compuestos se realizó por comparación del Rf en ccf con estándares de referencia comerciales y/o naturales previamente identificados. Además por análisis de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG-EM) y por comparación de los datos espectroscópicos con lo reportado en la biblioteca de espectros de masas Publish/NIST.

## **II. ENSAYO BIOLÓGICO**

### **II.1 Microorganismo de prueba**

Para evaluar la actividad antimicobacteriana se empleó la cepa de *M. tuberculosis* H37Rv (ATCC 27244) que se hacen crecer en medio Middlebrook 7H9 hasta fase de crecimiento logarítmico; el índice de crecimiento se determina en el equipo radiorespirométrico BACTEC 460.

## II.2 Desarrollo del ensayo biológico

Método radiorespirométrico BACTEC 460. Se realizó siguiendo la metodología descrita por Cantrell et al., 1996, 1998, 1999a; Collins y Franzblau, 1997. Este método es ampliamente utilizado para determinar la actividad antimicobacteriana de sustancias de origen natural o sintético y para determinar farmacosenibilidad, útil en cepas sospechosas de resistencia.

Se utiliza medio 7H12 o 12B Middlebrook (Becton Dickinson, Cockesville, MD, USA) enriquecido con ácido palmítico marcado isotópicamente, mismo que es metabolizado por la micobacteria liberando  $^{14}\text{CO}_2$ , el cual se cuantifica de manera automática en el equipo BACTEC 460, las lecturas obtenidas nos indican el índice de crecimiento (IC) de la micobacteria. El porcentaje de inhibición se expresa mediante la siguiente fórmula:

$$1 - (\text{IC problema} / \text{IC control}) \times 100$$

En este ensayo se empleo como control positivo un fármaco de primera línea (R) con CMI *in vitro* de 0.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Cantrell et al., 2001).

Cada ensayo se realizó por duplicado, y el resultado es el promedio de las lecturas. Se consideraron activos aquellos extractos y fracciones que presentaron más de 90% de inhibición sobre el crecimiento del microorganismo de prueba. El ensayo biológico se realizó en una campana de flujo

laminar tipo III, con luz UV y bajo estrictas condiciones de esterilidad.

Las fracciones a evaluar se solubilizaron en DMSO a la concentración de 4 mg/mL (solución stock) para obtener una concentración final de 100 µg/mL en el vial de prueba y se preparan al momento de utilizarse, esterilizándose por filtración empleando una membrana estéril de 0.22 µm de diámetro (millex-FG, Milliporé, Bedford, MA), depositándola en un tubo Eppendorf estéril.

De la solución stock se realizan diluciones seriadas para obtener las concentraciones deseadas (100-6.25 µg/mL); de cada solución se toman 100 µL y se colocan en un vial con medio 7H12 o 12B Middlebrook, posteriormente se inocula este medio con 100 µL cultivo semilla de micobacterias, se agita para uniformar la solución y los viales se incuban a 37°C durante 7 días o hasta que el vial del cultivo control alcance un IC de 999; tomando lectura cada 24 h después del tercer día de incubación.

En cada ensayo se colocan tres controles: uno de vehículo dimetilsulfóxido (DMSO), uno de medio de crecimiento y control positivo (usando como referencia un fármaco de primera línea -R-).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### *Artemisia ludoviciana* (ArluI)

La investigación químico-biológica del extracto hexánico de la especie se realizó tomando como punto de partida el efecto antimicobacteriano *in vitro* reportado previamente por nuestro grupo de trabajo (Jiménez et al., 2003).

Se obtuvieron seis grupos de fracciones, de las cuales cinco de ellas se sometieron a evaluación biológica excepto F1´ dado que esta muestra presentaba ceras. Los resultados de la evaluación antimicobacteriana de estas muestras se describen en la Tabla 5. Las únicas fracciones que mostraron inhibición son las muestras ArluI/2-3 y ArluI/4, siendo más activo este último.

Tabla 5. Peso, rendimiento y resultados de la evaluación biológica del fraccionamiento químico de ArluI.

Muestra	Peso (g)	Rendimiento (%)	% de inhibición*
F1´	1.1997	11.997	ND
F3´	0.0183	0.183	0
ArluI/1	2.8631	28.631	0
ArluI/2-3	1.4561	14.561	75
ArluI/4	1.2519	12.519	100
FB´	2.9038	29.038	0

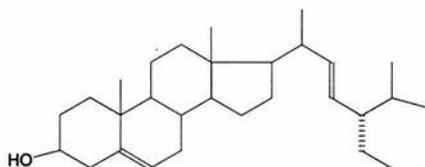
\*contra *M. tuberculosis* H37Rv a 100 µg/mL por método radiorespirométrico BACTEC 460

Dada la actividad biológica de las fracciones ArluI/2-3 y ArluI/4, estas fueron sometidas a fraccionamiento químico en CC-FN, mediante este proceso se obtuvieron 8 y 9 grupos de fracciones, respectivamente.

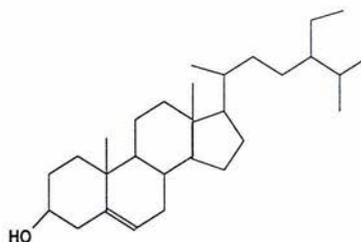
Únicamente, en las fracciones secundarias Ff y Fg -de polaridad intermedias eluidas con mezcla de Hexano:CHCl<sub>3</sub> (8:2 y 7:3) a partir de ArluI/2-3, se observó la presencia de compuestos mayoritarios, uno de ellos correspondió al **β-sitosterol** (Figura 2). La presencia de este compuesto se detectó al realizar ccf comparativa con muestra previamente obtenida de *Achillea millefolium* (Fernández, 2001).

Respecto al ensayo antimicobacteriano, la fracción secundaria Fg inhibe un 95.3% el crecimiento de *M. tuberculosis* al ser evaluado a 100 µg/mL. Además la fracción Ff fue objeto de un análisis CG-EM (Cromatograma 1) en donde se corrobora la presencia de **β-sitosterol** y **estigmasterol** cuyos TR (tiempo de retención) en el cromatograma fueron de 24.61 y 23.36 min, respectivamente, el PM para cada compuesto fue de 412 (β-sitosterol) y 414 (estigmasterol), siendo mayoritario el primero, cabe mencionar que ambos compuestos (**β-sitosterol** y **estigmasterol**) al ser evaluados por separado presentan un bajo porcentaje de inhibición (<40%) (Fernández 2001), por lo que en este trabajo ya no se evaluaron por separado.

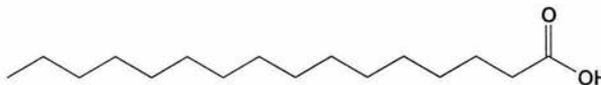
El otro compuesto mayoritario observado presenta un tiempo de TR 11.89 min, con un PM de 256, este compuesto corresponde al **ácido hexadecanoico** (Figura 2) con FM de  $C_{16}H_{32}O_2$ , que resta por evaluar. Otros picos que se observan en el cromatograma 1 con TR 8.31, 10.47 y 10.83 min corresponden a compuestos minoritarios con PM de 168, 222 y 236, una cera ( $C_{12}H_{26}$ ), el **farnesol** ( $C_{15}H_{26}O$ ) y la **artemorina** ( $C_{15}H_{20}O_2$ ), (Figura 2), respectivamente. El **farnesol** fue previamente aislado de *Chamaedara tepejilote* y en esa oportunidad fue objeto de evaluación contra *M. tuberculosis* H37Rv presentando un porcentaje de inhibición del 99% a 100  $\mu\text{g/mL}$  (Jiménez et al., 2005, Álvarez, 2002).



ESTIGMASTEROL  
 $C_{29}H_{48}O$   
 PM=412 g/mol



$\beta$ -SITOSTEROL  
 $C_{29}H_{50}O$   
 PM=414 g/mol



ÁCIDO HEXADECANÓICO  
 $C_{16}H_{32}O_2$   
 PM=256 g/mol

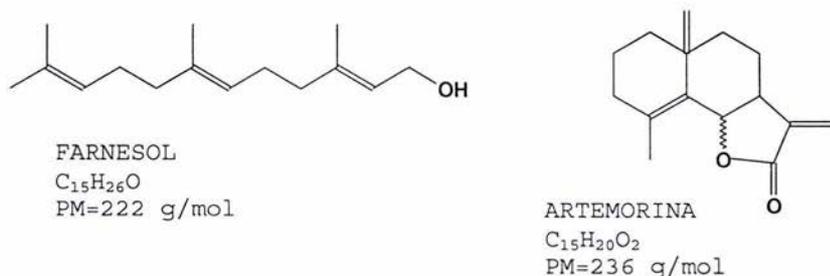
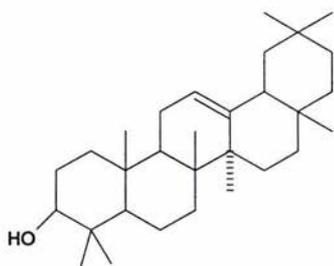


Figura 2. Compuestos aislado en la fracción Ff de *Artemisia ludoviciana*.

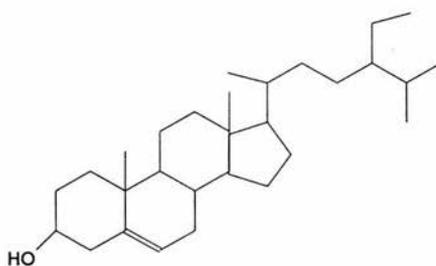
Otra fracción que inhibió en un 90.63% el crecimiento de *M. tuberculosis* H37Rv a 100  $\mu\text{g/mL}$  fue Fh; sin embargo, de esta fracción falta por determinar la composición química aunque por ccf se ha detectado la presencia de  $\beta$ -sitosterol y  $\beta$ -amirina en pequeñas cantidades (Figura 3).

El  $\beta$ -sitosterol es un constituyente que se aísla frecuentemente de las plantas, mismo que se encontró en las fracciones secundarias de ArluI, por ello es importante mencionar otras actividades biológicas exploradas en este compuesto. Por ejemplo, Singh and Singh (2003) reporta actividad antifúngica y antimicrobiana; Aboutabl y colaboradores (2003) reportan actividad analgésica, antiinflamatoria, antiulcerogénico, actúa como inhibidor del DNA polimerasa; el mismo autor, además reporta actividad hipoglucémica. Mitaine-Offer y colaboradores (2002) reportan que inhibe la elastasa de leucocitos humanos.

$\beta$ -amirina, presenta actividad antiartrítica (Kweifio-Okai and Macrides, 1992), antiinflamatorio (Akihisa et al., 1996), antimicrobiana (Romesh et al., 2001; Singh and Dubey, 2001), antifúngica (Manguero et al., 2003). Y la mezcla de  $\alpha$  y  $\beta$ -amirina presenta actividad gastroprotectora (Navarrete et al., 2002). Por otra parte, el **estigmasterol** fue aislado del extracto de acetato de etilo de raíces de *Piper auritum*, este extracto presenta moderada actividad contra la chinche de los pastos (*Collaria aff. oleosa*) oleosa, reportado por Saéz (1998). Senatore y colaboradores (1989) reportaron que tanto  $\beta$ -sitosterol como estigmasterol fueron aisladas de *Uncaria tomentosa* y presentaron moderada actividad antiinflamatoria *in vivo*.

 $\beta$ -AMIRINA $C_{30}H_{50}O$ 

PM=426 g/mol

 $\beta$ -SITOSTEROL $C_{29}H_{50}O$ 

PM=414 g/mol

Figura 3. Compuestos aislado de la Fh de *Artemisia ludoviciana*

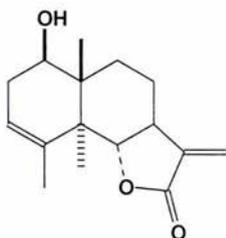
Otra de las fracciones que inhibieron el crecimiento de *M. tuberculosis* fue la fracción ArluI/4, por lo que se sometió a un fraccionamiento químico en CC-FN de donde se obtuvieron 9 grupos de fracciones.

En las fracciones secundarias FE y FF esta presente como compuesto mayoritario el  **$\beta$ -sitosterol**, su presencia se detecto por comparación de la Rf con un estándar. Además, la fracción FH fue sometida a análisis de CG-EM (Cromatograma 2) para conocer su composición química; mediante esto se determino que en dicha fracción están presentes tres compuestos cuyos PM, FM y TR se describen en la Tabla 6. Al realizar ccf y revelando con vainillina/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> se observo que la fracción (FH) esta compuesta por lactonas sesquiterpénicas siendo una de ellas mayoritaria y corresponde a la **santonina** y otro a la **santamarina** (Figura 4). Estas lactonas fueron previamente aisladas de esta especie medicinal, de *Ambrosia confertiflora* y *Artemisia ramosa* (Lara y Márquez, 1996; Lee y Geissman, 1970; Cantrell et al., 2001). Estas dos lactonas (santamarina y santonina) fueron evaluadas previamente contra *M. tuberculosis* H37Rv, presentando CMI's de 64 y >128  $\mu$ g/mL, respectivamente.

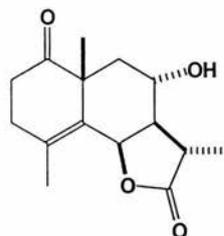
Tabla 6. Compuestos presentes en la fracción FH

TR (min)	PM	FM	estructura
7.05	256		Por identificar
9.71	248	C <sub>15</sub> H <sub>20</sub> O <sub>3</sub>	santamarina
10.06	248	C <sub>15</sub> H <sub>20</sub> O <sub>3</sub>	Santonina

Respecto a la evaluación biológica de la fracción FH, se observó que esta fracción inhibe en un 85% el crecimiento de *M. tuberculosis* H37Rv a 100  $\mu\text{g/mL}$ . Nuevamente, como lo observado en las fracciones anteriores, la actividad antimicobacteriana de las fracciones se debe a la mezcla de los compuestos; ya que la evaluación por separado de cada uno de los metabolitos secundarios no muestra efecto sobre el crecimiento de las micobacterias a la concentración de 100  $\mu\text{g/mL}$  (Fernández, 2001; Jiménez et al., 2005).



SANTAMARINA  
 $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_3$   
PM=248 g/mol



SANTONINA  
 $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_4$   
PM=264 g/mol

Figura 4. Compuestos aislado de la FH de *Artemisia ludoviciana*

***Aristolochia taliscana* (ARII)**

Dada la actividad biológica del extracto metanólico *Aristolochia taliscana* (ARII) y la comparación en ccf de éste con el extracto hexánico de la especie (previamente investigada por León, 2005; Figura 5), se decidió realizar el fraccionamiento químico con la finalidad de obtener los compuestos responsables del efecto biológico. Como primer paso se realizó el proceso de partición, mediante el cual se obtuvieron tres fracciones (ARII/1, ARII/2 y ARII/2') y el análisis en ccf de estas muestras permitió detectar que en la fracción ARII/1 estaban presentes tres compuestos mayoritarios (Figura 5).

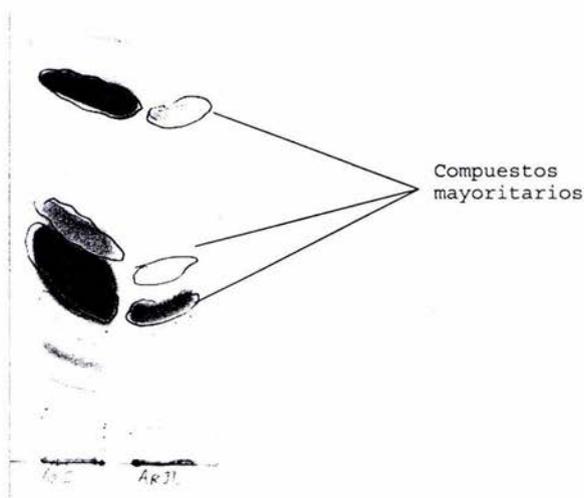


Figura 5. ccf comparativa de los extractos hexánico (ARI)a la izquierda y metanólico (ARII) a la derecha de *A. taliscana*.

Por lo anterior, esta fracción (ARII/1) fue objeto de un fraccionamiento químico, proceso que permitió obtener 19 grupos de fracciones (F1-F19) de diferente polaridad.

En las fracciones ARII/5 y ARII/6 eluidas con Hexano:CHCl<sub>3</sub> 7:3 se obtuvieron 20 mg de **licarina B**, este compuesto se identificó con un compuesto por comparación de su R<sub>f</sub> en ccf y p.f. (91-92°C) previamente aislado del extracto hexánico de esta especie (Figura 6 y 7) Este compuesto inhibió completamente el crecimiento de *M. tuberculosis* H37Rv a la concentración de 100 µg/mL al ser evaluados por el método radiorespirométrico BACTEC 460 (León, 2005).

En las fracciones ARII/7 y ARII/8 se obtuvieron 13 mg del **eupomatenoides-7**, cabe mencionar que es mayoritario en la fracción 8 pero se detectaron trazas de un compuesto más polar (Figura 6 y 7). El **eupomatenoides-7** al igual que el anterior se identificó por comparación de su R<sub>f</sub> en ccf y p.f. (100-104°C) con lo previamente reportado (León, 2005) y cuya CMI fue de 6.25 µg/mL para *M. tuberculosis* H37Rv.

De las fracciones ARII/9 y ARII/10 se obtuvieron 308 mg de la **licarina A** cuyo p.f. es 105-100°C (Figura 5 y 6), este compuesto al ser evaluado presentó una CMI de 25 µg/mL contra *M. tuberculosis* H37Rv. Éste último compuesto es el mayoritario presente en la fracción y en el extracto. En la fracción ARII/11 se detectó la presencia de **β-sitosterol**, el

diterpeno **fitol** y restos de los compuesto **eupomatenoide-7** y **licarina A**, que falta por purificar.

La actividad antimicrobacteriana de los neolignanos Licarina A, eupomatenoide-7 y licarina B (Figura 7) fue previamente reportada por León (2005) que conjuntamente con este trabajo constituye los primeros que reportan el efecto biológico de este tipo de metabolitos. Cabe señalar que éstos compuesto fueron previamente aislado de la especie *A. taliscana* (Abe et al., 2002; Enríquez et al., 1984)).

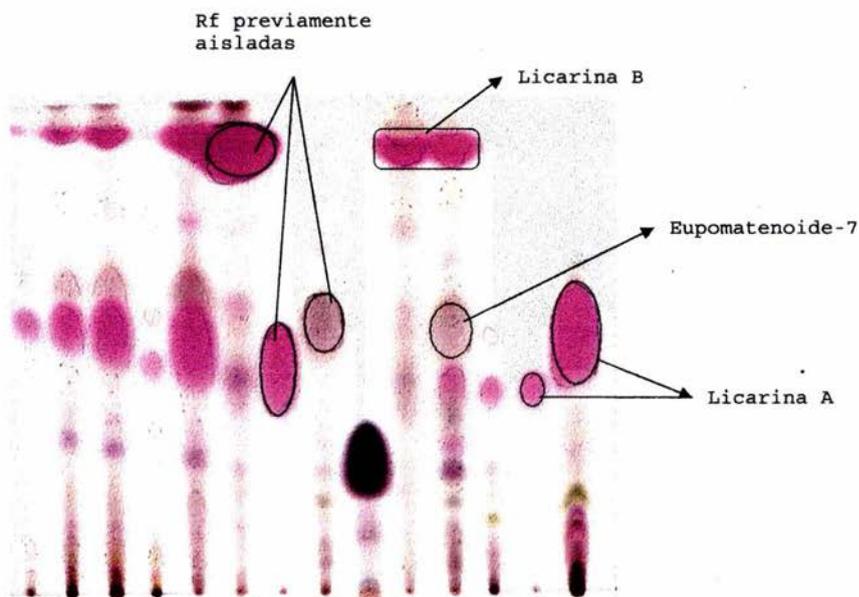


Figura 6. ccf comparativa de los compuestos puros aislados de ARI y ARII.

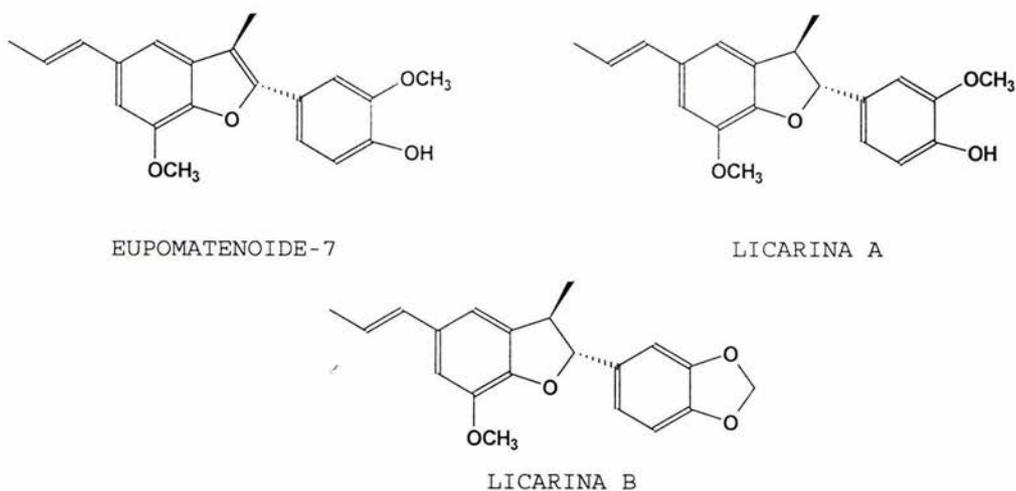


Figura 7. Estructura de los neolignanos aislados del extracto metanólico de *A. taliscana*

Los resultados del presente trabajo constituye un avance importante en el desarrollo de una línea de investigación donde se explora el potencial antimicrobiano *in vitro* de plantas medicinales mexicanas, enfocando los esfuerzos para encontrar compuestos, extractos o fracciones con importante actividad o bien que coadyuven al tratamiento de la tuberculosis.

En la literatura científica se describen numerosos metabolitos secundarios como diterpenos, sesquiterpenos, triterpenos, con importante actividad antimicrobiana (Cantrell et al., 2001; Copp, 2003; Woldemichael et al., 2003). Sin embargo, a la fecha no se han descrito neolignanos con actividad antimicrobiana y por ende tampoco se ha

explorado este efecto en *A. taliscana*, por lo que esta especie medicinal constituye una fuente potencial de metabolitos secundarios capaces de inhibir el crecimiento de *M. tuberculosis*.

## CONCLUSIONES

La investigación químico-biológica realizada en las especie medicinal *Artemisia ludoviciana* permitió obtener 8 metabolitos secundarios de diferentes naturaleza química que fueron identificados mediante el análisis de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas y corresponden a dos esteroles ( $\beta$ -sitosterol y estigmasterol), un triterpenos ( $\beta$ -amirima), un sesquiterpeno (farnesol), tres lactonas sesquiterpénicas (artemorina, santamarina y santonina) y un ácido graso (ácido hexadecanoico), de los cuales, algunos ya habían sido reportados. La mezcla de estos metabolitos son los responsables del efecto antimicobacteriano ya que la evaluación de cada uno por separado no muestra este efecto.

De la especie medicinal *Aristolochia taliscana* se aislaron tres neolignanós (licarina A, licarina B y eupomatenóide-7), y se detectó un diterpeno (fitol) y un esteroles ( $\beta$ -sitosterol). La evaluación antimicobacteriana de los compuestos por separado indica que el más activo es el eupomatenóide-7; sin embargo, el resto de compuestos inhiben también el crecimiento de *M. tuberculosis*, aunque al igual que en el caso de la especie anterior, la actividad antimicobacteriana se debe en gran medida a la mezcla de metabolitos secundarios presentes en la planta.

Este trabajo contribuye a explorar el potencial antimicobacteriano de *A. ludoviciana* y *A. taliscana*, especies medicinales de México empleadas para tratar padecimientos relacionados con la tuberculosis. Por lo que con esta investigación se valida parcialmente el uso popular de las especies vegetales investigadas.

La investigación química y biológica de plantas usadas en la medicina tradicional de México para tratar la tuberculosis y/o síntomas relacionados con la enfermedad; constituyen una fuente potencial poco explorada, de compuestos activos capaces de inhibir el crecimiento de *M. tuberculosis*. Además pueden constituir coadyuvantes en el tratamiento de la enfermedad.

**GLOSARIO**

Actividad biológica: Capacidad de una sustancia química de inducir algunas respuestas biológicas a nivel celular o subcelular.

Adsorción: Fenómeno por el cual una sustancia primitivamente disuelta en un sólido o líquido se fija.

Artritis rematoide: Inflamación de una o varias articulaciones cuya sistemática no está bien establecida a no ser que se trate de secuelas de un reumatismo agudo, tuberculosis u otras enfermedades.

Antituberculosos: Fármacos usados en el tratamiento de la tuberculosis. Se dividen en fármacos de primera línea y fármacos de segunda línea.

Antitusígenos: Fármacos utilizados en el tratamiento de la tos. Actúan inhibiendo su producción a nivel central sin producir pérdida de la conciencia ni la alteración de las funciones mentales.

Bioensayo: Es una determinación de la potencia de un agente físico, químico o biológico por medio de un indicador biológico; procedimiento que se usa para determinar la relación cuantitativa entre las dosis de una droga y la

intensidad de la respuesta biológica que produce en un modelo biológico experimental.

Coadyuvante: Que contribuye a la acción de otros agentes. Medicamento o agente que tiene acción análoga y auxiliar a la del medicamento principal.

Citocinas: Base oxiaminopiramidina, producto de desintegración del ácido nucleico.

Corticoesteroides: Son fármacos que se producen en la corteza de las glándulas suprarrenales y que tienen características de las hormonas.

Cromatografía: Es una técnica analítica y preparatoria útil para la separación de los compuestos químicos de una mezcla por migración diferencial de solubilidad de los mismos, entre una fase móvil y un medio de sostén, que puede ser papel, sílice, como en la cromatografía de capa fina, o una columna rellena con sílice, albúmina, resina absorbente o de intercambio iónico. Sobre el medio de sostén corre el solvente lavador y separa las diferentes moléculas de la mezcla a distinta velocidad; el grado de separación depende de cuatro factores tales como la velocidad del solvente y la solubilidad de las sustancias en él, responsable de la movilidad de la mezcla, otros factores son el fraccionamiento y la absorción, responsable del retardo de movimiento de la mezcla. Al solvente o líquido atrapado por el medio de sostén se le

llama fase estacionaria, al solvente revelador se le llama fase móvil.

Disnea: Dificultad para respirar.

Disolventes orgánicos: Son los líquidos cuyas propiedades permiten disolver o dispersar sustancia de naturaleza orgánica, por lo regular insolubles en agua. Sus propiedades físicas más importantes son la polaridad, el calor latente de evaporación, la presión de vapor, la velocidad de evaporación, el punto de inflamación, la explosividad, el peso específico y el intervalo de destilación.

Enfermedad de Hodgkin's: Ataca preferentemente los tejidos linfo-adenoides. Hay aumento progresivo indoloro de los ganglios linfáticos. Ésta va acompañada de fiebre periódica, anemia progresiva, pérdida de peso.

Epididimitis: Inflamación de un pequeño cuerpo grisáceo situado en la parte superior del testículo.

Estomáquico: Medicamento que favorece la función digestiva gástrica y es propio para combatir la digestión difícil y laboriosa de carácter crónico.

Extracción: Operación de separar una sustancia de la mezcla de la que forma parte.

Extracto: Preparado concentrado de drogas vegetales o animales de las que se extraen los principios activos con diferentes solventes, los cuales posteriormente se evaporan en forma parcial, como los extractos líquidos, o totalmente, como los extractos pulverizados.

Incidencia: Número o proporción de casos de una enfermedad.

Isótopos radiactivos: Aquellos con propiedades radiactivas por bombardeo del elemento en un ciclotrón.

Lupus: Afección tuberosa de la piel y las mucosas, de formas distintas, caracterizada por la producción de tubérculos que se ulceran y se extienden.

Metabolito secundario: Sustancias presentes en las plantas que no son esenciales para la vida, aunque pueden ser fundamentalmente para que se pueda operar una determinada función biológica.

Necrosis: Daño de un tejido en general, dependiente de la falta de irrigación sanguínea por obstrucción patológica o destrucción traumática de los vasos.

Orquitis: Inflamación aguda o crónica del testículo.

Ovoide: En forma de huevo.

Perennes: Que dura mucho tiempo.

Pleura: Cada una de las dos membranas o sacos serosos, derecha e izquierda, completamente independientes entre sí, que tapizan los pulmones y la superficie interna de la pared torácica.

Quimioterapia: Tratamiento por sustancias químicas, especialmente el fundado en la afinidad que poseen ciertos compuestos químicos por microorganismos determinados sin dañar los tejidos orgánicos.

Reinfección exógena: Segunda infección el mismo u otro agente patógeno, que se origina en el exterior del cuerpo.

Simpaticomimético: Grupo de fármacos que ejercen en el organismo efectos análogos a los de la estimulación de fibras adrenérgicas del sistema nervioso simpático.

Tomentoso: Cubierto de pelillos cortos y flexibles que dan un aspecto aterciopelado.

**BIBLIOGRAFIA**

- Abe F, Nagafuji S, Yamauchi T, Okabe H, Maki J, Higo H, Akahane H., Aguilar A, Jiménez-Estrada M, Reyes-Chilpa R. Trypanocidal Constituents in Plants Evaluation of some Mexican Plants for their Trypanocidal Activity and Active Constituents in Guaco Roots of Aristolochia califscana. Biological Pharmaceutical Bulletin 2002;25:1188-1191
- Aboutabl E, Nassar M, Elsakhaw F. Phytochemical and Pharmacological Studies on Sideritis taurica Stephan ex Wild. Journal of Ethnopharmacology 2002;82:177-184
- Akihisa T, Yasukawa K, Oinuma H. Triterpene Alcohols from the Flowers of Compositae and Their Anti-inflammatory Effects. Phytochemistry 1996;43(6):1255-1260
- Álvarez G, Sandoval H, Bojalil L. Tuberculosis resistente al tratamiento por fármacos antifímicos. Estudio en Chiapas, México. Atención Primaria 1999;24(4):209-241
- Álvarez V. Estudio químico de Chamaedora tepejilote con actividad antituberculosa. Tesis de Licenciatura en Biología. Facultad de Estudios Superiores (FES) Iztacala, UNAM 2002
- Amaya-Tapia G, Martín-del-Campo L, Aguirre-Ávalos, Portillo-Gómez L, Covarrubias-Pinedo A, Aguilar-Benavides S. Primary and Acquired resistance of Mycobacterium tuberculosis in Western Mexico. Microbial Drug Resistance 2000;6(2):143-145
- Báez-Saldaña A, Pérez-Padilla J, Salazar-Lezama M. 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 2003;45(2):78-83
- Balandrin M, Kinghorn D, Farnsworth N. Plant-Derived Natural Products in Drug Discovery and Development. En: Human Medicinal Agents from Plants. American Chemical Society. Estados Unidos 1993;1-12pp
- Bastian I, Portaels F. Multidrug-resistant tuberculosis: past, present and future. En: Multidrug-resistant Tuberculosis. Kluwer Academic Publishers. Netherlands 2000;1-15pp
- Bork P, Lienhard M, Kuhnt M, Escher C, Heinrich M. Sesquiterpene lactone containing Mexican Indian medicinal plants and pure sesquiterpene lactones as potent inhibitors of transcription factor NF-kappaβ. Federation of European Biochemical Societies Letters 1997;402:85-90

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA

- Cantrell C, Lu T, Fronczek F, Fischer N, Adams L, Franzblau S. Antimycobacterial Cycloartanes from *Borrchia frutescens*. Journal of Natural Products 1996;59:1131-1136
- Cantrell C, Fischer N, Urbatsch L, McGuire M, Franzblau S. Antimycobacterial crude plant extracts from South, Central, and North America. Phytomedicine 1998;5(2):137-145
- Cantrell C, Rajab M, Franzblau S, Fischer N. Antimycobacterial triterpenes from *Melia volkensii*. Journal of Natural Products 1999a;62:546-548
- Cantrell C, Rajab M, Franzblau S, Fronczek F, Fischer N. Antimycobacterial Ergosterol-5,8-endoperoxide from *Ajuga remota*. Planta Médica 1999b;65:732-734
- Cantrell C; Franzblau S, Fisher N. Antimycobacterial Plant Terpenoids. Planta Médica 2001;67:685-694
- Collins L, Franzblau S. Microplate Alamar Blue Assay versus BACTEC 460 System for High-Throughput Screening of Compounds against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 1997;41:1004-1009
- Collins C, Lyne P, Grange J. Microbiological Methods. Séptima Edición. Butterworth Heinemann. Gran Bretaña 1995;410-431pp
- Copp B. Antimycobacterial Natural Products. Natural Product Report 2003;20:535-557
- DeRiemer K, García-García L, Bobadilla-del-Valle M. Does DOTS work in population with drug-resistant tuberculosis?. Lancet 2005;365:1239-1245
- Dye C, Scheele S, Dolin P, Pathania V, Raviglione M. Consensus statement. Global burden of tuberculosis: Estimated incidence, prevalence and mortality by country. WHO Global Surveillance and Monitoring Project. Journal American Medical Association 1999;282(7):677-686
- Eloff J.N. Which extractant should be used for the screening and isolation of antimicrobial components from plants?. Journal of Ethnopharmacology 1998;60:1-8
- Emes M. Flora Cohimi. En: Flora Medicinal Indígena de México, treinta y cinco Monografías del Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana. Tomo I. Instituto Nacional Indigenista. Biblioteca de la Medicina Tradicional Mexicana. México 1994;33pp
- Encarnación R, Keer G. Antimicrobial screening of Medicinal Plants from Baja California Sur, México. Journal of Ethnopharmacology 1991;31:181-192

- Enciso J, Correa J, Valdez H, Flores L, Enciso L, Pernas N, Parra R, Torres J, Muñoz O, Van Sooliegen D. Desarrollo, estandarización y validación de un método molecular para la detección de bacilos de *M. tuberculosis* resistentes a Rifampicina. En: Proyectos Estratégicos de Investigación en Salud. Coordinación de Investigación Médica, IMSS. Primera Edición. México 2000;91-108pp
- Enríquez R, Chavez M, Reynolds W. Phytochemical investigation of plants of the genus *Aristolochia*. Isolation and NMR spectral characterization of eupomatenoic derivatives. *Journal of Natural Products* 1984;47:896-899
- Espinal M. Epidemiology of multidrug-resistant tuberculosis in low- and middle-income countries. En: *Multidrug-resistant tuberculosis*. Kluwer Academic Publishers. Netherlands 2000;29-44pp
- Espinal M, Laszlo A, Simonsen L, Boulahbal F, Kim SJ, Reniero A, Hoffner S, Rieder HL, Binkin N, Dye C, Williams R, Raviglione M. Global trends in resistance to antituberculosis drugs. *The New England Journal of Medicine* 2001;344:1294-1303
- Farnsworth R, Akerele O, Bingel A, Soejarto D, Guo Z. Medicinal plants in therapy. *The World Health Organization* 1985;63(6):965-981
- Fernández J. Efecto antimicrobiano e inmunomodulador de los metabolitos secundarios de *Achillea millefolium*. Tesis de Maestría en Biología Celular. Facultad de Ciencias, UNAM 2001.
- Frieden T, Sterline T, Munsiff S, Watt C, Dye C. Tuberculosis. *Lancet* 2003;302:887-899
- Gadhi C, Weber M, Mory F, Benharref A, Lion C, Jana M, Lozniewski A. Antibacterial activity of *Aristolochia paucinervis* Pomel. *Journal of Ethnopharmacology* 1999;67:87-92
- García-García L. Tuberculosis en México. *Salud Pública de México* 1995;37:539-548
- García-García L. Tuberculosis: epidemiología molecular en México. *Gaceta Médica de México* 2003;139(5):472-475
- García-Sancho M. Respuesta inmune a la infección por *Mycobacterium tuberculosis*. Una revisión de la literatura. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias de México* 2001;14(2):114-128
- Granich R, Balandrano S, Santaella A, Binkin N, Castro K, Marquez-Fiol A, Anzaldo G, Zarate M, Jaimes M, Velásquez-Monroy O, Salazar L, Alvarez-Lucas C, Kuri P, Flisser A, Santos-Preciado J, Ruiz-Matus C, Tapia-Conyer R, Tappero J. Survey of drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* in 3 Mexican States, 1997. *Archives of Internal Medicine* 2000;160:639-644

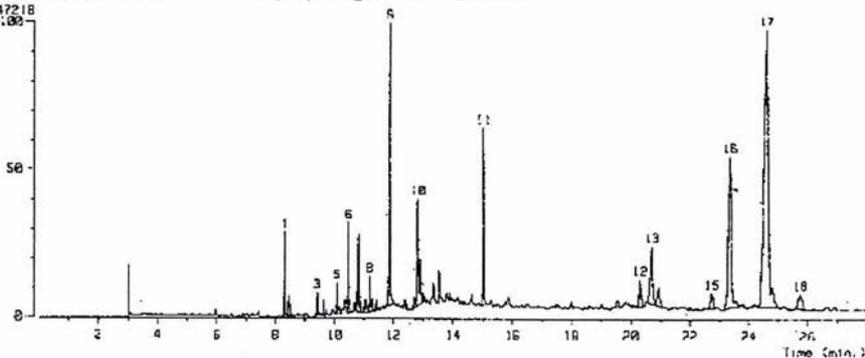
- Hernández T, Canales M, Avila J, Duran A, Caballero J, Romo A, Lira R. Ethnobotany and antibacterial activity of some plants used in traditional medicine of Zapotitlán de las Salinas, Puebla (Mexico). *Journal of Ethnopharmacology* 2003;88:181-188
- Jiménez-Arellenes A, Meckes M, Ramirez R, Torres J. Activity against Multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Mexican Plants used to Treat Respiratory Diseases. *Phytotherapy Research* 2003;17:903-908
- Jiménez-Arellenes A, Meckes M, Álvarez V, Torres J, Parra R. Secondary Metabolites from *Chamaedora tepejilote* (Palmae) are Active against *Mycobacterium tuberculosis*. *Phytotherapy Research* 2005;19:000-000
- Kweifio-Okai G, Macrides T. Antilipoxigenase Activity of Amyrin Triterpenes. *Research Communication in Chemical Pathology and Pharmacology* 1992;78(3):367-372
- Lara O., Marquéz A. *Plantas medicinales de México*. UNAM 1996;55-56pp
- Lee K. H. and Geissman T. A. Sesquiterpene lactones of *Artemisia* constituents of *A. ludoviciana* ssp. Mexicana. *Phytochemistry* 1970;9:403-408
- León R. Potencial antimicobacteriano de dos especies medicinales del género *Aristolochia*. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas (Biología Experimental). Facultad de Ciencias, UNAM 2005
- McCutcheon A, Ellis S, Hancock R, Tower G. Antifungal screening of medicinal plants of British Columbian native peoples. *Journal of Ethnopharmacology* 1994;44:157-169
- Malagon F., Vazquez J., Delgado G, Ruiz A. Antimalaric effect of an alcoholic extract of *Artemisia ludoviciana* mexicana in a rodent malaria model. *Parassitologia* 1997;39(1):3-7
- Manguro L, Ugi I, Lemmen P. Further Bisabolones and Demmaranc Triterpenes of *Commiphora kua* Resin. *Chemical Pharmaceutical Bulletines* 2003;51(5):479-482
- Mata R, Delgado G, Romo A. Sesquiterpene lactones of *Artemisia mexicana* var. *angustifolia*. *Phytochemistry* 1984;23:1665-1668
- Mitaine-Offer A, Hornebeck W, Sauvain M. Triterpenes and Phytosterols as Human Leucocyte Elastase Inhibitors. *Planta Médica* 2002;68:930-932
- Navarrete A, Trejo-Miranda J, Reyes-Trejo L. Principles of Root Bark of *Hippocratea excelsa* (Hippocrataceae) With Gastroprotective Activity. *Journal of Ethnopharmacology* 2002;79(3):383-388
- Newman D, Cragg G, Snader K. The influence of natural products upon drug discovery. *Natural Products Report* 2000;17:215-234

- Newton S, Lau C, Wright C. A review of Antimycobacterial Natural Products. *Phytotherapy Research* 2000;14:303-322
- Ochurte C. Flora Kiliwa. En: Flora Medicinal Indígena de México, treinta y cinco Monografías del Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana. Tomo I. Instituto Nacional Indigenista. Biblioteca de la Medicina Tradicional Mexicana. México 1994;47pp
- Parra E. Flora Medicinal de la Región de el Fuerte y Choix, Sinaloa. En: Flora Medicinal Indígena de México, treinta y cinco Monografías del Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana. Tomo I. Instituto Nacional Indigenista. Biblioteca de la Medicina Tradicional Mexicana. México 1994;370pp
- Phillipson J. New Drugs from nature - It could be yew. *Phytotherapy Research* 1999;13:2-8
- Ponce-de-León A, García-García L, García-Sancho M, Gómez-Pérez F, Valdespino-Gómez J, Olaiz-Fernández G, Rojas R, Ferreyra-Reyes L, Cano-Arellano B, Bobadilla M, Samll P, Sifuentes-Osornio J. Tuberculosis and Diabetes in Southern Mexico. *Diabetes Care* 2004;27:1584-1590
- Ramesh N, Viswanathan M, Saraswathy A. Phytochemical and Antimicrobial Studies on Drynaria quercifolia. *Fitoterapia*, 2001;72(8):934-936
- Raviglione M, Snider D, Kooni A. Global Epidemiology of Tuberculosis. *Journal American Medical Association* 1995;273:220-226
- Romo J., Tello H. Estudio de la Artemisia mexicana armexina, un nuevo santanólido cuya lactona posee fusión Cis. *Revista Latinoamericana de Química* 1972;3:122-126
- Rzedowski. An Ecological and Phytogeographical analysis of the grasslands of Mexico. *Taxon* 1985;24:67-80
- Sada-Díaz E. La respuesta inmune en la tuberculosis. *Gaceta Médica de México* 2003;139(5):481-486
- Saéz J, Granados H, Escobar G, Cardona W, Atehortua L, Callejas R, Cortes D, González C. Piperlonguminina y estigmasterol, compuestos de raíces y tallos de Piper auritum, actividad insecticida de extractos. *Revista Colombiana de Química* 1998;27(1):103-108
- Said S, Enciso J, Torres J, Castro J, Navarro L, Becerril P, Rojas M, Caballero G, Valdéz H, Flores L, Pernas N, Valdovinos S, Martínez H, Luna J. Epidemiología molecular de la tuberculosis pulmonar en el norte de México. En: *Proyectos Estratégicos de Investigación en Salud*. Coordinación de Investigación Médica, IMSS. Primera Edición. México 2000;101-219pp

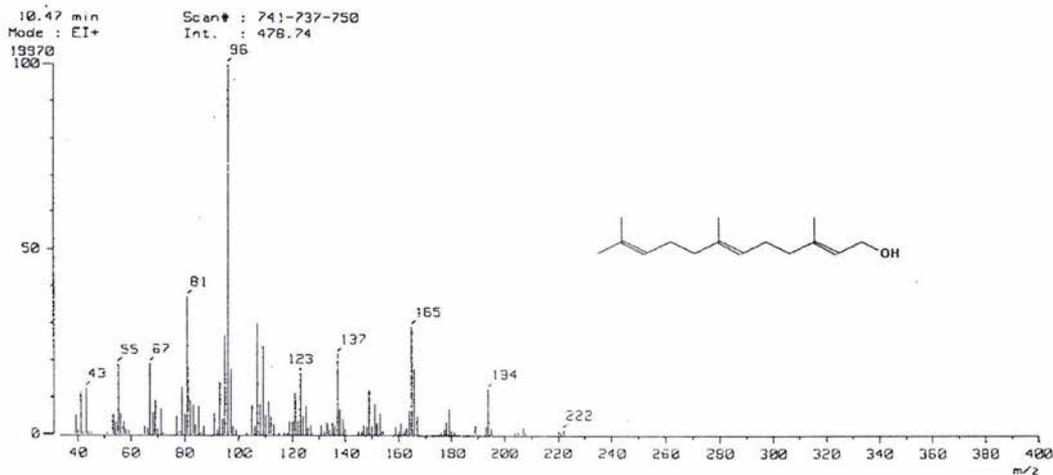
- Salazar-Lezama M. Tratamiento de la tuberculosis farmacoresistente. *Gaceta Médica de México* 2003;139(5):487-490
- Sánchez O. La flora del valle de México. Editorial Herrero. México 1980;432pp
- Sifuentes-Osornio J, García-García L, Small M, Bobadilla-del-Valle M, Kato-Maeda M, Matus-Ruiz M, Martínez-Gamboa A, Maldonado S, Méndez P, Palcios-Martínez M, Chávez-Mazari B, Ponce-de-León A. Epidemiología de la resistencia antimicrobiana en *Mycobacterium tuberculosis* en México. *Gaceta Médica de México* 2003;139(5):477-480
- Singh B and Dubey M. Estimation of Triterpenoids from *Heliotropium marifolium* Koen. Ex Rets. In vivo and In vitro. I. Antimicrobial Screening. *Phytotherapy Research* 2001;15(3):231-234
- Singh B and Sing S. Antimicrobial Activity of Terpenoids From *Trichodesma amplexicaule* Roth. *Phytotherapy Research* 2003;17:814-816
- Stop TB Partnership. The global plan to stop tuberculosis. Geneva: WHO, 2001 (WHO/CDS/TB/2001.16)
- Villalba-Caloca J. Tuberculosis: un problema de actualidad. *Gaceta Médica de México* 2003;139(5):471-472
- Wächter G, Franzblau S, Montenegro G, Hoffmann J, Maiese W, Timmermann B. Inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* Growth by Saringosterol from *Lessonia nigrescens*. *Journal of Natural Products* 2001;64:1463-1464
- Wächter G, Valcic S, Franzblau S, Suarez E, Timmermann B. Antitubercular Activity of Triterpenoids from *Lippia turbinata*. *Journal of Natural Products* 2001;64:37-41
- Wolinsky E. Micobacterias. En: Tratado de Microbiología. Cuarta edición. Editorial Masson. Barcelona-España 1996;620-632pp
- Woldemichael G, Franzblau S, Zhang F, Wang Y, Timmermann B. Inhibitory effect of Sterols from *Ruprechtia triflora* and Diterpenes from *Calceolaria pinnifolia* on the growth of *Mycobacterium tuberculosis*. *Planta Médica* 2003;69:628-631
- Wu T, Chan Y, Leu Y, Chan Z. Sesquiterpene Esters of Aristolochic Acid from the root and stem of *Aristolochia heterophylla*. *Journal of Natural Products* 1999;62:415-418
- Wu T, Tsai Y, Wu P, Lin J. Constituents from the leaves of *Aristolochia elegans*. *Journal of Natural Products* 2000;63:692-693
- Wu T, Tsai Y, Damu A, Kuo P, Wu P. Constituents from the root and stem of *Aristolochia elegans*. *Journal of Natural Products* 2002;65:1522-1525

**CROMATOGRAMAS**

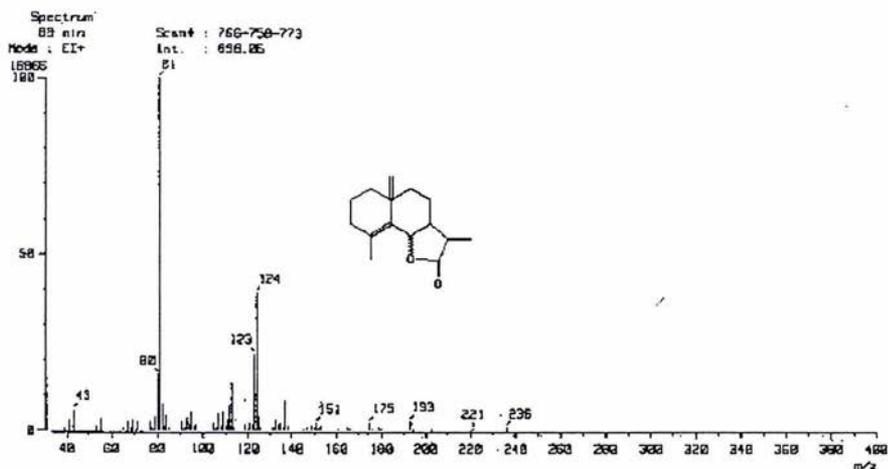
Data : 07797\_39=3\_001 Date : 03-Mar-2004 16:11  
 Sample: Inlet : GC Ion Mode : EI+  
 TIC Range : m/z 33 to 800 Output RT Range : 0.00 to 27.99 min  
 12084718



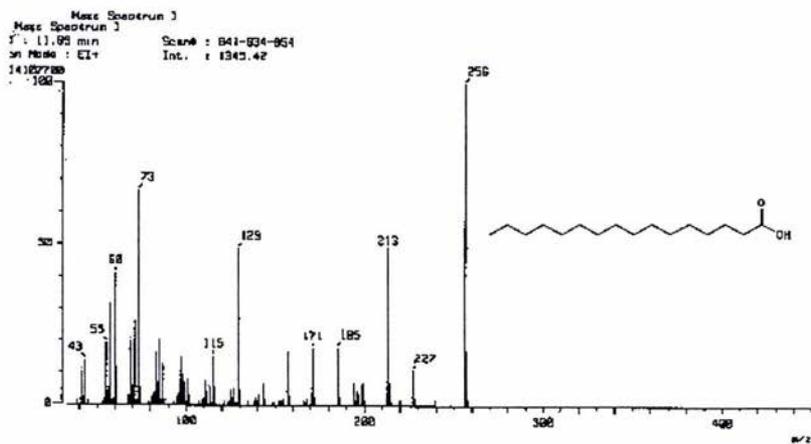
Cromatograma 1. Compuestos de la fracción secundaria Ff



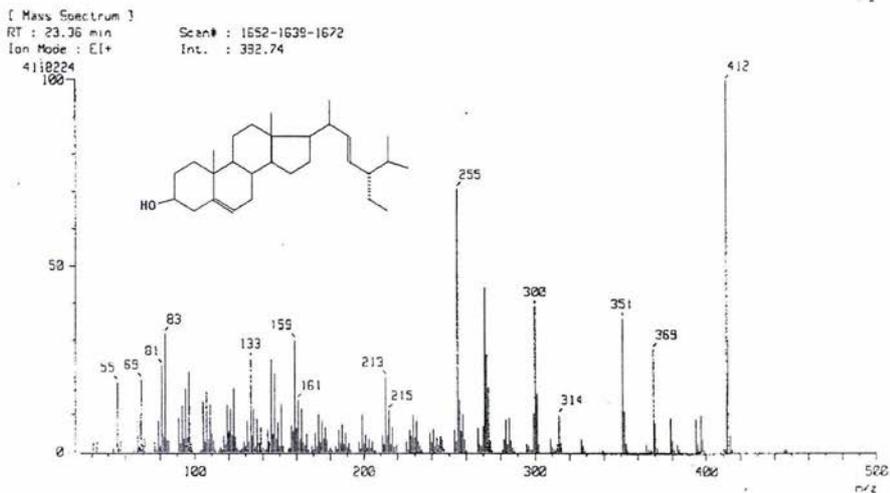
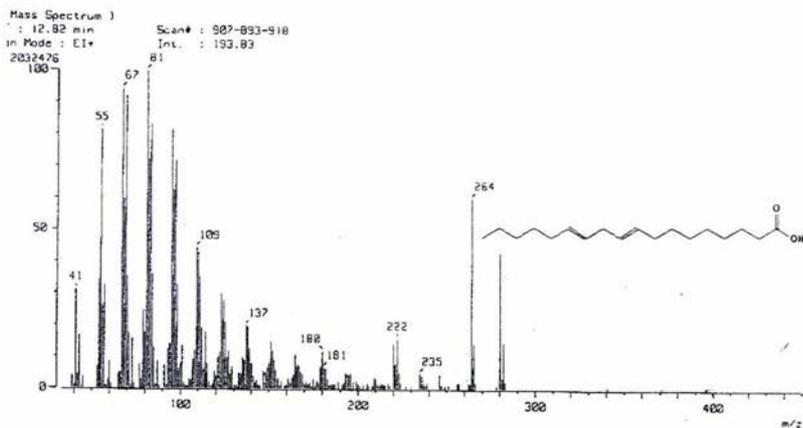
Metabolito Secundario de Ff. FARNESOL

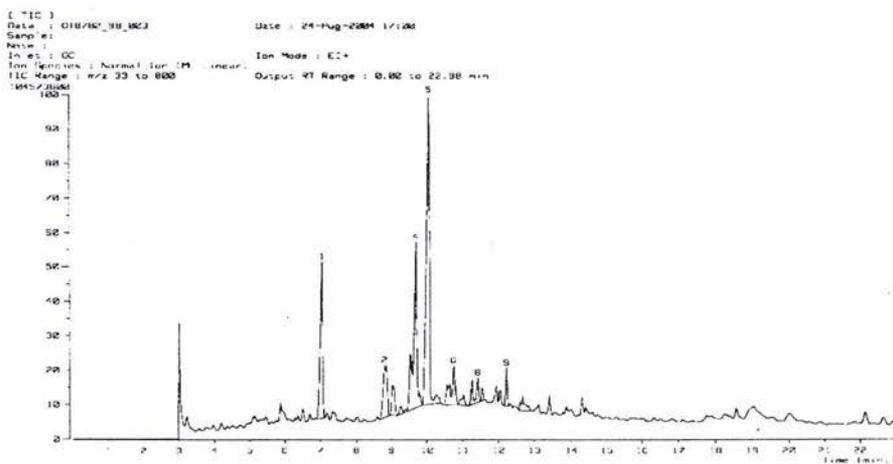
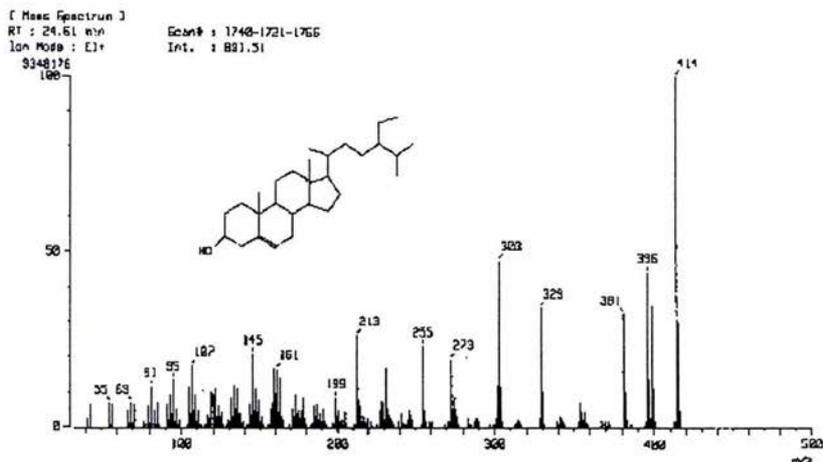


Metabolito Secundario de Ff. ARTEMORINA



Metabolito Secundario de Ff. ÁCIDO HEXADECANÓICO





[ Mass Spectrum ]

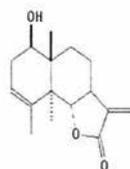
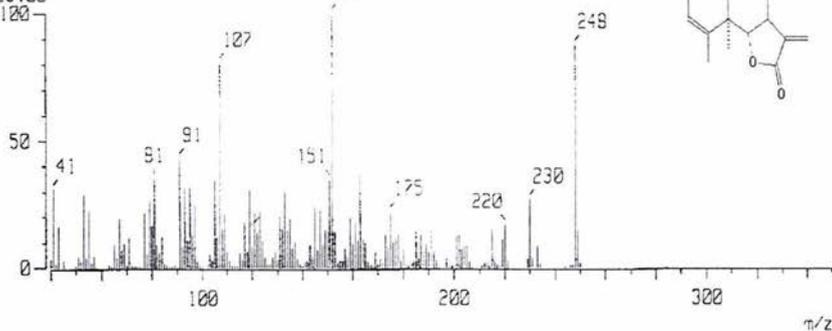
RT : 9.71 min

Scan# : 359-368-368

Ion Mode : EI+

Int. : 859.83

2725120



Metabolito Secundario de 9B. SANTAMARINA

[ Mass Spectrum ]

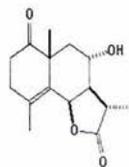
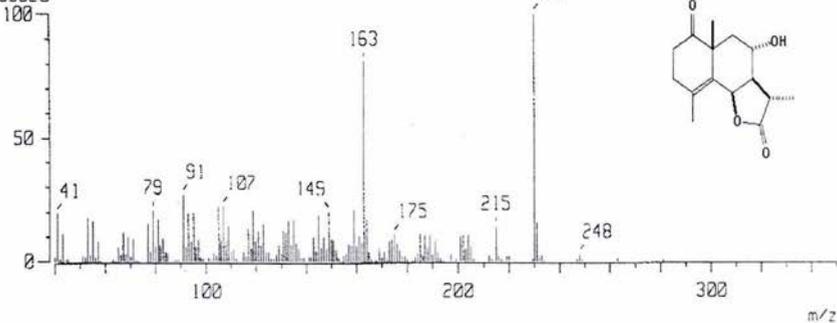
RT : 10.06 min

Scan# : 372-385-384

Ion Mode : EI+

Int. : 721.51

7565620



Metabolito Secundario de 9B. SANTONINA