



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE  
MEXICO**

**FACULTAD DE QUIMICA**

**“ESTUDIO QUIMICO Y ACTIVIDAD ANTIMICOBACTERIANA *in vitro*  
DE LA ESPECIE MEDICINAL *Thymus vulgaris*”**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
QUIMICA-FARMACEUTICA-BIOLOGA**

**PRESENTA:**

**ROSA ANTONIETA MARTINEZ ESCAMILLA**



**MEXICO, DF.**

**2006**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

---

## JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: Prof. YOLANDA CABALLERO ARROYO

VOCAL: Prof. RACHEL MATA ESSAYAG

SECRETARIO: Prof. MARIA ADELINA JIMENEZ ARELLANES

PRIMER SUPLENTE: Prof. PERLA CAROLINA CASTAÑEDA LOPEZ

SEGUNDO SUPLENTE: Prof. LUCIANO HERNANDEZ GOMEZ

### SÍTIO DE REALIZACION DE LA TESIS:

EL PRESENTE TRABAJO DE TESIS SE DESARROLLO EN LA UNIDAD DE INVESTIGACION MEDICA EN FARMACOLOGIA DE PRODUCTOS NATURALES DEL HOSPITAL DE PEDIATRIA DE CMN SIGLO XXI.

ASESOR:

DRA. MARIA ADELINA JIMENEZ ARELLANES

SUSTENTANTE:

ROSA ANTONIETA MARTINEZ ESCAMILLA

*Dame señor, agudeza para entender,  
Capacidad para retener  
Método y facultad para aprender  
Sutileza para interpretar  
Gracia y abundancia para hablar.  
Dame acierto para empezar  
Dirección al progresar  
Y perfección al acabar*

*Santo Tomas de Aquino*

*El fruto del silencio es la oración,  
el fruto de la oración es la fe,  
el fruto de la fe es el amor,  
y el fruto del amor, es servir a los demás.*

*Madre Teresa de Calcuta*

## AGRADECIMIENTOS

A la jefa de la UIM-FPN Dra. Mariana Meckes Fisher por permitirme realizar la tesis en la unidad.

A la Dra. Gloria Molina Salinas del CIBIN-IMSS Monterrey por el apoyo brindado en la realización de los ensayos antimicobacterianos contra las cepas de referencias y aislados clínicos.

A la M. en C. Rosa Virginia García Rodríguez de la UIM-FPN por la asesoría en la realización del ensayo para determinar la toxicidad aguda *in vivo*.

A los sinodales:

- ✓ Dra. Yolanda Caballero Arrollo
- ✓ Dra. Rachel Mata Essayag
- ✓ Dra. Perla Carolina Castañeda López

Por todas las sugerencias y comentarios que permitieron enriquecer este trabajo y por la atención brindada.

A todos mis compañeros de la UIM-FPN, Berenice, Omar, Oscar, Roció, Elizabeth, Claudia, Rosy, Martha por haber compartido conmigo sus conocimientos y experiencia durante el desarrollo de mi trabajo de tesis, por hacer más amena y agradable mi estancia en la unidad, les agradezco su apoyo y valiosa ayuda, pero sobre todo su compañerismo y amistad.

A la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México por permitir mi formación tanto profesional como personal, que sin la ayuda de todos mis profesores no hubiera sido posible, en especial a la M. en C. Rosa Luz Cornejo Rojas por sus consejos y apoyo incondicional a lo largo de mi preparación profesional. Con admiración y respeto le ofrezco mi más sincero agradecimiento.

Principalmente a la Dra. Ma. Adelina Jiménez Arellanes por ser el principal motor en el desarrollo de esta tesis, brindándome su incondicional e invaluable ayuda en la realización de la misma. Con respeto y admiración le doy mi más grande y profundo agradecimiento.

# DEDICATORIAS

A mis padres:

Por que gracias a sus consejos y a su apoyo he llegado a realizar uno de mis más grandes sueños; el ser una profesionista; gracias por compartir conmigo mis triunfos y mis fracasos, por desvelarse conmigo a lo largo de todos mis estudios, pero sobre todo por apoyarme en todos los proyectos que he realizado.

Me doy cuenta del diario sacrificio, callado y agotador que realizan con decisión para darme una formación personal; se que 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. Gracias por quererme y llenarme de cariño, por sus cuidados y atenciones, por el apoyo moral y en mis estudios, por acercarme al camino de Dios, por su comprensión y por su apoyo. Quiero que sepan que los admiro, respeto y quiero mucho.

A mis hermanos:

Que siempre están cuando los necesito, gracias por su apoyo y por sus cuidados.

A ti Erika que sin tus consejos y ayuda todo este proyecto no hubiera sido posible, gracias por tu apoyo incondicional, por tus regaños y consejos, por ser un ejemplo para mí, por demostrarme que cuando uno se propone algo lo logra a pesar de los diversos obstáculos que puedan cruzarse en el camino, le doy gracias a Dios por darme una hermana tan especial como tu.

A mis amigos:

Rosario, sabes que eres mi mejor amiga, tú haz compartido conmigo mis fracasos y mis triunfos, en ti encontré una verdadera amiga, leal, sincera, me haz ayudado, aconsejado y regañado cuando es necesario, gracias por tu amistad y por estar cuando más te necesito.

Magda y Gloria, ustedes han estado conmigo en mis peores momentos, han sido un apoyo en lo profesional y en lo personal, gracias por demostrarme que no hace falta conocernos de años para poder demostrarme que su amistad es sincera, agradezco a Dios el haberlas conocido, gracias por toda su ayuda pero sobre todo por su amistad sincera.

Nancy, Raúl y Omar con ustedes he compartido grandes cosas a lo largo de toda la carrera, hemos compartido momentos de alegría y de tristeza, y aunque últimamente me he distanciado de ustedes, saben que los considero mis amigos, por que gracias a ustedes he aprendido muchas cosas, sobre todo a valorar una verdadera amistad.

Claus, Coque, Apolinar, Nancy y Oscar gracias por su amistad sincera y sin condiciones, ustedes me han ayudado a ser una mejor persona, con sus regaños y por aquellas platicas que tuvimos que en muchas ocasiones me hicieron ver mis errores sin herirme, gracias por su amistad.

A ti Rogelio, desde que Dios te puso en mi camino, haz demostrado ser un hombre responsable, inteligente y con mucha fuerza para poder enfrentar mil cosas, con una enorme valentía de enfrentar la vida a pesar de algunos tropiezos, con un amor limpio y verdadero, capaz de entender y apoyarme en la realización de este proyecto, me siento orgullosa de ti y de que compartas conmigo todo esto, te agradezco el estar a mi lado. Independientemente de lo que pase en unos años, sabes que siempre vas a ser parte de mi vida.

A la Dra Adelina Jiménez:

Que contribuye de manera importante en el avance de la investigación en salud; es una persona admirable que ha luchado mucho para estar en el lugar que ocupa en este momento; su trabajo habla de su entrega, compromiso y preparación. Yo he tenido la oportunidad de realizar este proyecto tan importante bajo su asesoría, proyecto que me ha permitido adquirir conocimientos, criterio y corregir algunos errores, es por ello que se ha convertido en una persona importante e inolvidable para mí. Le agradezco sinceramente su apoyo, orientación, ayuda y consejos que me dio a lo largo de este proyecto.

## ♣ LISTA DE ABREVIATURAS

TvI	Extracto Hexánico de <i>Thymus vulgaris</i>	µg/mL	Microgramos sobre mililitros
TvII	Extracto Metanólico de <i>Thymus vulgaris</i>	min	Minutos
α	Alfa	mort	mortalidad
aq	Acuoso	msnm	Metros sobre nivel del mar
β	Beta	MFR	Multifarmacoresistencia
BAAR	Bacilo ácido-alcohol resistente	<i>M.tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
°C	Grados centígrados	ND	No determinado
ccf	Cromatografía en capa fina	NOM	Norma Oficial Mexicana
CC-FN	Cromatografía en columna en fase normal	OMS	Organización Mundial de la Salud
CHCl <sub>3</sub>	Cloroformo	OPS	Organización Panamericana de la Salud
CL <sub>50</sub>	Concentración letal media	PAS	Ácido para-aminosalicílico
CMI	Concentración mínima Inhibitoria	p.f.	Punto de fusión
CMNSXXI	Centro Médico Nacional siglo XXI	P.M.	Peso molecular
COEFAR	Comité Estatal de farmacoresistencia	PPD	Derivado de la Proteína purificada
cTB	Casos de tuberculosis	ppm	Partes por millón
σ	Delta	R	Rifampicina
DGE	Dirección General de Epidemiología	RA	Resistencia Adquirida
DL <sub>50</sub>	Dosis letal media	Rf	Factor de Referencia
DMSO	Dimetilsulfoxido	RP	Resistencia primaria
DOTS	Directly Observed Treatment Short-course	RS	Resistencia secundaria
E	Etambutol	S	Estreptomina
(Et) <sub>2</sub> O	Éter etílico	SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
FR	Farmacoresistencia	SL	Sulfolípidos
γ	Gamma	SSA	Secretaría de Salud
GANAFAR	Grupo Nacional de Asesoría en Farmacoresistencia	TAES	Tratamiento Acortado Estrictamente Supervisado
Hab	Habitantes	TB	Tuberculosis
Hex	Hexáno	TBP	Tuberculosis pulmonar
H	Isoniacida	TGF-β	Factor transformador de crecimiento-beta
IC	Índice de crecimiento	Tol	Tolueno
IL	Interleucina	TR	Tiempo de Retención
INDRE	Instituto Nacional de Diagnóstico		
INER	Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias	TNF-α	Factor de necrosis tumoral-alfa
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social	UFC	Unidad Formadora de colonia
IFN-γ	Interferón-gamma	UICTER	Unión Internacional contra la Tuberculosis y Enfermedades Respiratorias
K	Kilogramos	VIH	Virus de Inmunodeficiencia Adquirida
LAM	Lipoarabinomananos	Z	Pirazinamida
MeOH	Metanol		
µL	microlitros		

---

## ♣ INDICE

	Páginas
♣ JUSTIFICACION	1
♣ INTRODUCCION	2
♣ ANTECEDENTES	4
I.    TUBERCULOSIS	4
II.   AGENTE ETIOLOGICO	4
III.  INMUNIDAD Y TRANSMISION	6
IV.   MANIFESTACIONES CLINICAS	9
V.    DIAGNOSTICO	10
VI.   TRATAMIENTO	10
VII.  FARMACORESISTENCIA	13
VIII. ESTRATEGIA TAES-PLUS EN MEXICO	16
IX.   EPIDEMIOLOGIA	18
X.    IMPORTANCIA DE LAS PLANTAS	20
XI.   PLANTAS MEDICINALES COMO FUENTE DE AGENTES ANTI-TUBERCULOSOS	22
XII.  ANTECEDENTES <i>Thymus vulgaris</i>	23
XII.1  Características botánicas y distribución	23
XII.2  Etnobotánica	24
XII.3  Química	25
XII.4  Farmacología	26
♣ HIPOTESIS	29
♣ OBJETIVO GENERAL	30
♣ OBJETIVOS PARTICULARES	30
♣ METODOLOGIA	31
I.    SELECCIÓN Y COLECTA DEL MATERIAL	31
II.   PREPARACIÓN DE EXTRACTOS	31
III.  ENSAYOS BIOLÓGICOS	32
III.A.  DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICOBACTERIANA	32
III.A.1. <i>Microorganismo de prueba</i>	32
III.A.2. <i>Preparación de muestras a evaluar</i>	33
III.A.3. <i>Desarrollo del micométodo colorimétrico de alamar azul                         (MABA).</i>	33
III.B  Determinación de la concentración letal media (CL <sub>50</sub> ) en larvas de <i>Artemia salina</i>	34

---

III.C.	<b>Determinación de la dosis letal media (DL<sub>50</sub>) en Ratones Balb C</b>	35
IV.	<b>FRACCIONAMIENTO QUIMICO DE <i>Thymus vulgaris</i></b>	35
IV.1.	EXTRACTO HEXÁNICO	35
IV.1.1.	FRACCIONAMIENTO SECUNDARIO DE LA FRACCIÓN TV10	36
IV.1.2.	FRACCIONAMIENTO SECUNDARIO DE FRACCIÓN TV8	38
IV.2	EXTRACTO METANÓLICO	39
♣	<b>RESULTADOS Y DISCUSION</b>	42
1.	Actividad biológica de los extractos e identificación de los compuestos aislados	42
1.1	<b>Identificación de compuestos en la Fracción Tv10</b>	43
1.2	<b>Identificación de compuestos en la Fracción Tv8</b>	44
2.	Determinación de la CL <sub>50</sub> en <i>Artemia salina</i>	50
3.	Determinación de la DL <sub>50</sub> en ratones Balb/C	52
♣	<b>CONCLUSIONES</b>	53
♣	<b>BIBLIOGRAFIA</b>	54
♣	<b>ANEXO 1. ESPECTROS Y CROMATOGRAMAS</b>	63

---

## LISTA DE TABLAS, GRAFICAS, FIGURAS Y DIAGRAMAS

- Tabla 1. Clasificación de las micobacterias por la producción de pigmentos
- Tabla 2. Dosis administrada y efectos secundarios de los fármacos de primera línea.
- Tabla 3. Retratamiento estandarizado para casos de TB-MFR
- Tabla 4. Retratamiento estandarizado alternativo para TB-MFR
- Tabla 5. Estados con mayor índice de TBp
- Tabla 6. Patrón de farmacoresistencia
- Tabla 7. Fraccionamiento primario del extracto hexánico de *T. vulgaris*.
- Tabla 8. Fraccionamiento secundario de la fracción activa Tv10
- Tabla 9. Fraccionamiento secundario de la fracción primaria Tv8.
- Tabla 10. Fraccionamiento primario del extracto metanólico de *T. vulgaris*.
- Tabla 11. Resultados de la evaluación antimicobacteriana de extractos y fracciones primarias del extracto hexánico de *T. vulgaris* y compuestos identificados en dichas fracciones.
- Tabla 12. Evaluación antimicobacteriana de las fracciones secundarias de fracción TvI/10 de *T. vulgaris*
- Tabla 13. Estructura de los compuestos aislados en el extracto hexánico de *Thymus vulgaris*
- Tabla 14. Estructuras de los ácidos ursólico/oleanólico
- Tabla 15. Actividad antimicobacteriana de compuestos puros.
- Tabla 16. Datos de CL<sub>50</sub> para los extractos y mezcla de compuesto de *Thymus vulgaris*.
- Gráfica 1. Determinación de la CL<sub>50</sub> para el extracto hexánico de *T. vulgaris*.
- Gráfica 2. Determinación de la CL<sub>50</sub> para el extracto metanólico de *T. vulgaris*.
- Gráfica 3. Determinación de la CL<sub>50</sub> para la mezcla timol/carvacrol de *T. vulgaris*.
- Figura 1. *Thymus vulgaris*
- Figura 2. Timol/carvacrol
- Figura 3. ccf de los compuestos mayoritarios de las fracciones 10H-10P, con la mezcla de vainillina etanólica/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> etanólico
- Diagrama 1. Fraccionamiento primario del extracto hexánico de *Thymus vulgaris*
- Diagrama 2. Fraccionamiento primario del extracto metanólico de *Thymus vulgaris*.

## ♣ JUSTIFICACION

La tuberculosis hoy en día se presenta como una enfermedad en estado emergente a nivel mundial. A pesar de las diversas estrategias implementadas para el control y erradicación de la enfermedad, los resultados han sido escasos.

Día a día se incrementa el número de personas infectadas por esta enfermedad, debido a diversos factores tales como la falta de cumplimiento al tratamiento, diagnósticos inadecuados, acceso limitado a los servicios de salud (trámites excesivos y burocráticos en la solicitud y surtimiento de los fármacos) y enfermedades como: diabetes mellitus, VIH, enfermedad de Hodking's, cáncer, alcoholismo, personas bajo tratamiento prolongado con corticosteroides u otros fármacos inmunosupresores, drogadicción. Lo anterior contribuyen también a la aparición de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* (agente etiológico) resistentes a los fármacos actuales.

Los fármacos empleados en la actualidad para el tratamiento de cepas farmacoresistentes, son de alto costo, tóxicos, de baja efectividad y con severos efectos secundarios, en los casos de multifarmacoresistencia (MFR) por lo que se requiere urgentemente nuevos agentes antituberculosos. La búsqueda de este tipo de compuestos y/o moléculas activas puede obtenerse en diferentes fuentes tanto naturales como sintéticas.

Desde la antigüedad se han empleado las plantas medicinales para el tratamiento de diversas enfermedades, incluyendo la tuberculosis, malaria y parasitosis, que hoy en día son enfermedades emergentes. Por otro lado, es importante mencionar que de diversas fuentes naturales se han obtenido moléculas prototipo que han permitido el desarrollo de diversos principios activos; sin embargo, a pesar de que las especies medicinales han sido poco exploradas desde el punto de vista químico y farmacológico, actualmente se consideran una importante fuente potencial para encontrar nuevos compuestos y/o moléculas activas contra el bacilo de la tuberculosis y otras enfermedades.

En México existe una gran diversidad de especies que se conocen por su valor curativo, es por eso que el presente trabajo describe la investigación química y biológica de la especie medicinal *Thymus vulgaris*, con la finalidad de realizar la búsqueda de nuevos y/o conocidos agentes anti-Tuberculosis (anti-TB).

## ♣ INTRODUCCION

A nivel mundial un tercio de la población se encuentra infectada por *M. tuberculosis* y cada año se estima una incidencia de más de 10 millones de casos nuevos y 3.5 millones de defunciones por tuberculosis (TB), siendo la segunda causa de muerte por un solo agente infeccioso. En México, la tasa de incidencia es de 32 casos por cada 100,000 hab., y los estados con mayor incidencia son: Veracruz, Baja California, Oaxaca, Chiapas, Guerrero, Nuevo León, Tamaulipas (DGE, 2001-2004; De-Riemer *et al.*, 2005). Datos recientes emitidos por la Dirección General de Epidemiología (DGE) reportan que en los años 2003 y 2004 existieron 15,132 y 14,652 casos respectivamente. Para la semana 45 del 2005, se registraron 13,313 casos de TB (cTB) (DGE, 2003-2005).

En 1996, la OMS implementó el programa TAES (Tratamiento Acortado Estrictamente Supervisado) para controlar y erradicar la TB; sin embargo, en países como Brasil, Colombia, Paraguay, Guvana, Republica Dominicana, la cobertura de este programa es menor al 50%, en México la cobertura es tan solo del 70% lo que trae como consecuencia la aparición de cepas fármacoresistentes (FR) que no responden a los tratamientos establecidos (OPS, 2004). Además, la investigación sobre nuevos agentes anti-TB ha sido escasa por más de tres décadas desde el descubrimiento de la rifampicina (R) en 1967 y ha sido retomada en la última década. Dado el problema que representa la TB en los sistemas de salud a nivel mundial, se han iniciado proyectos enfocados a la búsqueda de moléculas activas y/o prototipo para el desarrollo de nuevos agentes a partir de diversas fuentes naturales y/o sintéticas (Cantrell *et al.*, 2001; Copp, 2003; Kanokmedhakul *et al.*, 2002; König *et al.*, 2000; Lall y Meyer 1999; Seephonkai *et al.*, 2002).

Contribuyendo a la búsqueda de nuevos agentes anti-TB, en la UIM en Farmacología de Productos Naturales del Hospital de Pediatría del CMN SXXI del IMSS se desarrolla una línea de investigación permanente enfocada a explorar las plantas medicinales de México como una posible fuente de moléculas con actividad antimicobacteriana (Jiménez-Arellanes *et al.*, 2003, 2005; León, 2005; Luna, 2005).

Continuando con el desarrollo de esta línea de investigación, se presenta el siguiente trabajo, en donde se explora el efecto antimicobacteriano de los extractos hexánico y metanólico de las partes aéreas de la especie medicinal *Thymus vulgaris* y el aislamiento de los compuestos responsables de la actividad biológica.

En la medicina tradicional es utilizada principalmente para curar diversas enfermedades de las vías respiratorias (tos, pulmonía, resfriados, laringitis y bronquitis) y gastrointestinales (diarrea, cólicos, disentería, dispepsia) (Duke, 2002; Font-Quer, 1961; Aguilar, 1994; Argueta *et al.*, 1994). Además, se utiliza como agente sedante, antiséptico, antihelmíntico, antipirético, fungicida, antioxidante, insecticida y de forma tópica para el tratamiento de dermatitis y pequeñas heridas, para el control de la menstruación (Ismaili *et al.*, 2004; Kitajima *et al.*, 2004a y 2004b; Wang *et al.*, 1999). En una investigación previa realizada en la UIM Farmacología de Productos Naturales, se encontró que los extractos hexánico y metanólico de las partes aéreas de la especie inhiben el crecimiento de *M. tuberculosis* H37Rv a la concentración de 50 µg/mL (datos en proceso de publicación). En la misma unidad trabajando con 11 fracciones del extracto metanólico así como el carvacrol obtenido de esta misma especie se encontró que tres de esta fracciones inhiben el crecimiento de *E.coli* -1, *Shigella sonnei*-1, *S. sonnei*-2, *S. flexneri*-2, *Salmonela sp*-2 y *S.flexneri*. Además reportan que el extracto metanólico presenta un buena actividad antipropulsiva con valores de 70.2-76.9 % de inhibición (Lugo, 2005).

## ♣ ANTECEDENTES

### I. TUBERCULOSIS

La tuberculosis es un padecimiento infecto-contagioso extendido en todos los continentes y es la causa de aproximadamente dos millones de muertes anuales entre jóvenes y adultos (Basic Facts on TB; Stop TB, fight poverty 2002). En el mundo cerca de 25,000 mil personas desarrollan TB diariamente, lo que conlleva a casi nueve millones de casos nuevos por año y dos millones de muertes por esta causa (SSA, 2004; WHO, 2004; Koga *et al.*, 2004). Afecta principalmente a individuos en edad económicamente productiva (26-40 años), lo que significa una carga para la sociedad; pero también se presenta en jóvenes y niños, siendo estos últimos los más vulnerables (Tuberculosis and children, 2002; Cantrell *et al.*, 2001; Copp, 2003; Frieden *et al.*, 2003). La TB constituye uno de los padecimientos de mayor importancia a nivel mundial y por ello la OMS ha establecido programas específicos para el control y erradicación de la enfermedad.

### II. AGENTE ETIOLOGICO

Los agentes etiológicos de la tuberculosis humana son: *M. tuberculosis* (principalmente), *M. bovis*, *M. africanum*, *M. kansasii*, *M. avium-intracellulare*, *M. fortuitum-chelonae*, los cuales pertenecen al orden Actinomycetales y a la familia Micobacteriaceae; el conjunto de todas estas micobacterias se les conoce como bacilos ácido-alcohol-resistentes (BAAR) por su resistencia a decoloración con ácido y alcohol (Brock *et al.*, 2000).

Las micobacterias presentan una composición inusual en su pared celular, la cual contienen una gran cantidad de lípidos (cerca del 40% de su peso seco) entre las cuales destacan el dimiocerosato de ptiocero (PDIM), los lipoarabinomananos (LAM—es un fosfatidilinositol anclado a un lipoglicano), los sulfolípidos (SL), los ácidos micólicos compuestos por glicolípidos o micosidos y la lipoproteína de 19 kDa (Karakousis *et al.*, 2004). Estas sustancias le confieren a las micobacterias ciertas propiedades de tinción, resistencia al medio ambiente y a los fármacos y son factores de virulencia de gran importancia.

Se han descrito tres tipos de LAM's: ManLAM (con excesiva capa de manosa) aislado de las cepas Erdman, H37Rv, H37Ra y BCG; PILAM aislados de micobacterias de rápido crecimiento (*M. smegmatis* y *M. fortuitum*) y el araLAM aislados de *M. chelonae* (Karakousis *et al.*, 2004). De los sulfolípidos destaca el SL-1 (2'-sulfato-2, 3, 6,6'-tetraacil- $\alpha,\alpha'$ -D-trehalosa). Los ácidos

micólicos son de elevado peso molecular que contienen glicolípidos y en particular trehalosa-6,6'-dimicolato (TDM) y es conocido como factor cuerda, es una de las sustancias más estudiadas por considerarse un factor de virulencia en las micobacterias, sin embargo esta sustancia se ha descrito en otros microorganismos como *Nocardia*, *Corynebacterium* y *Rhodococcus* (Karakousis *et al.*, 2004).

La proteína de 19 kDa es muy común en las bacterias gram positivas, gram negativas y micobacterias. Esta proteína está implicada en la respuesta inmunológica, atribuyéndose el efecto en la región lipopeptídica triacilada NH<sub>2</sub>-terminal (Brightbill *et al.*, 1999).

La identificación en *M. tuberculosis* es fundamental para el diagnóstico y tratamiento de la enfermedad. Debido al gran número de especies de micobacterias que existen, se ha establecido la clasificación que se describe en la Tabla 1.

Tabla.1. Clasificación de micobacterias por la producción de pigmentos (Jawetz *et al.*, 1996; Wolinsky, 1984).

CLASIFICACIÓN	MICROORGANISMO
Complejo TB	<i>M. tuberculosis</i> , <i>M. africanum</i> , <i>M. bovis</i>
Fotocromógenas	<i>M. asiaticum</i> , <i>M. Kansasii</i> , <i>M. marinum</i> <i>M. simiae</i>
Estocromógenos	<i>M. flavescens</i> , <i>M. gordonae</i> , <i>M. scrofulaceum</i> <i>M. szugai</i>
No cromógenos	Complejo <i>M. avium</i> , <i>M. celatum</i> , <i>M. haemophilum</i> , <i>M. gastri</i> , <i>M. genavense</i> , <i>M. malmoense</i> <i>M. nonchromogenicum</i> , <i>M. shimoidei</i> , <i>M. terrae</i> <i>M. trivale</i> , <i>M. ulcerans</i> , <i>M. xenopi</i>
De crecimiento rápido	<i>M. abscessus</i> , Grupo <i>M. fortuitum</i> , Grupo <i>M. chelonae</i> <i>M. phlei</i> , <i>M. smegmatis</i> , <i>M. vaccae</i>

**Fotocromógenas:** producción de pigmentos; **Estocromógenos:** desarrollo de pigmentos cuando crecen en la oscuridad; **No cromógenos:** no son pigmentados

De la gran diversidad de micobacterias que se conocen sobresale por su patogenicidad *M. tuberculosis*, cuyas principales características morfológicas se mencionan a continuación: es una bacteria ácido-alcohol resistente, se presenta como un bacilo delgado de 2 a 5 micras de longitud y 0.2 a 0.3 micras de diámetro, es aerobio estricto, no móvil, de lento y difícil crecimiento. En los medios de cultivo se presentan formas cocoides o filamentosas, presentándose como agregados entrelazados o trenzados conocidos como “cordones serpenteantes” debido al micósido 6,6’-

dimicolitrehalosa que le confiere la virulencia a *M. tuberculosis* (Koneman *et al.*, 1999; Jawetz *et al.*, 1996; Wolinsky, 1984).

Los medios de cultivo más recomendados para el crecimiento de micobacterias son el Lowestein Jensen (que contiene verde de malaquita), el ATS (American Thoracic Society), el Petragnani, el Petroff, el Cohen, Middlebrook 7H10 y 7H11; los dos últimos son muy empleados actualmente para determinar sensibilidad/resistencia a fármacos anti-TB dado el rápido crecimiento en ellos. En caso de sospecha clínica y radiológica de TB pulmonar con resultado negativo de baciloscopia y en los casos de TB extrapulmonar (renal o genitourinaria, meníngea, ósea), se recomienda realizar cultivo para confirmar la presencia de *M. tuberculosis* y para los casos de TB farmacorresistente (Brock *et al.*, 2000).

### III. INMUNIDAD Y TRANSMISION

En la protección y/o desarrollo de la TB interviene la inmunidad celular donde juegan un papel importante los linfocitos de tipo 1 (Th-1) y macrófagos; el desarrollo de esta inmunidad en un individuo infectado tarda de 2 a 8 semanas. La TB se adquiere principalmente por vía aérea y las micobacterias se depositan en los alvéolos llegando específicamente a los macrófagos, donde se inician diversos procesos inmunológicos para su eliminación o bien para el desarrollo de la infección. Durante el proceso infeccioso se describen cuatro mecanismos: a) la respuesta efectiva para eliminar el bacilo y por ende el paciente no desarrollará la enfermedad; b) la micobacteria no se elimina totalmente y empieza una manifestación clínica de la TB primaria; c) el sistema inmunológico impide el crecimiento del bacilo sin causar una eliminación total, pudiéndose verificar con la prueba intradérmica de PPD (Derivado de la Proteína Purificada) y d) los bacilos que han estado latentes vuelven a multiplicarse causando una reinfección (Jiménez-Martínez *et al.*, 2001).

Los macrófagos juegan un papel importante en la eliminación y/o replicación de las micobacterias, estas células son reclutadas por citocinas proinflamatorias como factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), interleucina-1 (IL-1), IL-6 y por quimiocinas que son producidas por células epiteliales, células endoteliales y macrófagos alveolares.

Las citocinas regulan positivamente la expresión de moléculas de adhesión (CD54, CD106 y CD62-E) en el endotelio y en los leucocitos; por esta causa, los leucocitos migran al sitio de lesión. La producción excesiva de citocinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$  e IL-1 provocan fiebre, pérdida de peso y necrosis tisular, en procesos crónicos puede generar caquexia que el paciente

---

con TB severa manifiesta clínicamente (Jiménez-Martínez *et al.*, 2001). A nivel tisular TNF- $\alpha$  sinergiza junto con Interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) para aumentar la producción de óxido nítrico (Sada-Díaz, 2003).

Los macrófagos producen también otras citocinas, como la IL-10 conocida como antiinflamatoria y el factor transformador del crecimiento beta (TGF- $\beta$ ), estas dos citocinas suprimen la función de los macrófagos. Al suprimir indirectamente la producción de citocinas por monocitos y linfocitos, y directamente al inhibir la liberación de radicales libres de oxígeno alterando la IL-12, la cual a su vez disminuye la producción de IFN- $\gamma$  (García-Sancho, 2001; Jiménez-Martínez *et al.*, 2001; Sada-Díaz, 2003). IFN- $\gamma$ , es una citocina crucial para el control de la infección de *M. tuberculosis* estimulando al macrófago para que libere TNF- $\alpha$  y así favorecer la formación de granulomas.

Los monocitos de sangre periférica y los macrófagos del granuloma pulmonar de pacientes con TB activan la liberación de TGF- $\beta$ , que a su vez suprime la proliferación de células T por lo que aumenta el crecimiento intracelular de *M. tuberculosis*, con la eliminación en la producción de TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 y la liberación de los radicales libres de oxígeno.

Durante la fase temprana de la infección hay presencia de infiltrado inflamatorio constituido por linfocitos CD-4 Th-1 productores de citocinas (IFN- $\gamma$ , IL-2) y macrófagos activados productores de TNF- $\alpha$  e IL-1 en el intersticio alveolo-capilar dando lugar a los granulomas. TNF- $\alpha$  y IL-1 activan macrófagos y estimulan la producción de IL-2, estas citocinas (IL-2 y TNF- $\alpha$ ) inducen la proliferación celular linfocitaria aumentando así el número de células inmunocompetentes que mantenían bajo control a las micobacterias, además el macrófago activado produce óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS); este genera la producción de óxido nítrico (NO) que reacciona con radicales libres y producen peroxinitrilos (compuestos inestables) que se asocian a diferentes constituyentes bioquímicos celulares, siendo uno de los blancos principales, las proteínas (en particular la tirosina). Las proteínas nitrosiladas sufren cambios conformacionales con pérdida irreversible de sus funciones provocando la muerte celular.

Algunas quimiocinas como IL-8 atraen a los neutrófilos, los cuales pueden fagocitar a la micobacteria sin la capacidad suficiente para eliminarla. La función de los neutrófilos es contener a las micobacterias evitando su diseminación mientras son sustituidos gradualmente por macrófagos activados. Otras quimiocinas como MCP-1, MIP-1 $\delta$ , RANTES, IP-10, MIG, I-TAC dirigen la migración de monocitos y linfocitos para la formación de granulomas, los cual tienen la finalidad

---

de restringir el crecimiento bacilar, confinando a las micobacterias en un sitio evitando así la distribución en todo el organismo (Frieden *et al.*, 2003; Jiménez-Martínez *et al.*, 2001).

En la fase avanzada de la TB existe un aumento de micobacterias vivas en el pulmón así como áreas progresivas de consolidación neumónica con focos de necrosis y extensa fibrosis intersticial conduciendo a la muerte. En esta fase aumenta la presencia y actividad de linfocitos Th-2 que inducen la producción de citocinas (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 y el TGF- $\beta$ ). IL-4 induce la diferenciación de linfocito B productores de anticuerpos, las citocinas IL-4, IL-10 e IL-1 son antagonistas de Th-1. La presencia de linfocitos Th-2 en esta fase de la TB contrarresta la actividad protectora de Th-1 y desvía la inmunidad celular hacia la inmunidad humoral favoreciendo la progresión de la enfermedad.

Los macrófagos sufren cambios morfo-funcionales importantes y en su citoplasma están presentes micobacterias y numerosas vacuolas que contienen lípidos como lipoarabinomananos, un lípido de la pared bacteriana muy eficiente para desactivar a los macrófagos. Los lipoarabinomananos inducen al macrófago para producir TGF- $\beta$ . Estos macrófagos con vacuolas, disminuyen la producción de IFN- $\gamma$ , IL-1 e iNOS e incrementa la producción de citocinas antiinflamatorias y supresoras de la inmunidad celular como TGF- $\beta$  e IL-10. La elevada producción de TGF- $\beta$  contribuye a desactivar la función de los macrófagos y estimula la actividad de células Th-2, también induce la proliferación fibroblástica y la síntesis de colágeno contribuyendo así a generar la fibrosis (Jiménez-Martínez *et al.*, 2001).

De acuerdo a lo anterior se observan una serie de características fisiológicas, las cuales se describen a continuación:

- ♣ Se presenta el desarrollo de una lesión exudativa aguda, de localización subpleural en la parte inferior de los lóbulos superiores o en la parte superior de los lóbulos inferiores del pulmón, se propaga a vasos sanguíneos y ganglios linfáticos regionales (Complejo de Ghon).
- ♣ Caseificación masiva de un ganglio linfático, el cual finalmente se calcifica.
- ♣ La prueba de la tuberculina se vuelve positiva.

La primoinfección (primer contacto que tiene un huésped con el bacilo tuberculoso) generalmente es asintomático, ocurre en la niñez y depende en gran medida del estado

---

inmunológico del paciente; en esta fase los bacilos tuberculosos se diseminan desde el sitio inicial a los ganglios linfáticos regionales a través de la vía linfática, dichos bacilos suelen propagarse hasta llegar a corriente sanguínea y distribuirse a los órganos (distribución miliar). Aproximadamente, el 95% de las personas infectadas inicialmente entran a la fase de latencia, a partir de la cual existe el peligro permanente de reactivación dependiendo del estado del sistema inmunológico del paciente, el 5% puede evolucionar de manera directa hasta culminar en las alteraciones antes mencionadas (Jawetz *et al.*, 1996; Koneman *et al.*, 1999; Granich *et al.*, 2000; Frieden *et al.*, 2003).

#### IV. MANIFESTACIONES CLINICAS

La manifestación clínica más común de la TB es la pulmonar; sin embargo, también existe la extrapulmonar afectando diversos órganos y/o sistemas, por ejemplo el genitourinario, el sistema nervioso central, las articulaciones, los ganglios, la pleura, el peritoneo y los huesos (Frieden *et al.*, 2003); las manifestaciones clínicas más severas se presentan en TB pulmonar (TBp) y TB meníngea sin descartar a los demás tipos de TB, entre los que se encuentran: TB ganglionar, TB ósea, peritonitis tuberculosa, TB genitourinaria, TB linfática y TB gastrointestinal (Frieden *et al.*, 2003).

Los síntomas de la TBp son tos con esputo y sangre por más de 2 semanas, dolor en pecho, pérdida rápida de peso, debilidad o fatiga generalizada, escalofrío, fiebre y sudoración nocturna. La TB meníngea presenta manifestaciones clínicas severas afectando principalmente el SNC, por la formación de tuberculomas en el cerebro e inflamación de las meninges. Las manifestaciones neurológicas graves son parálisis del sistema craneal, motor, sensorial y efectos cerebrales dependiendo del lugar en donde se localiza el tuberculo: este tipo de TB se presenta principalmente en niños menores de 5 años y en individuos infectados con VIH (Frieden *et al.*, 2003).

La TB genitourinaria, es muy rara además de que se confunde con otras infecciones del tracto genitourinario. En hombres las manifestaciones incluyen prostatitis, epididimitis, orquitis, dolor en la masa escrotal, y en mujeres se presenta infertilidad (Frieden *et al.*, 2003). La TB pleural es el resultado de una infección latente o por reactivación de la infección, se manifiesta cuando se presenta una disminución de la respuesta inmune, las consecuencias se dan cuando no se cumple

ANTECEDENTES

---

con el tratamiento ya que se pueden dar recaídas las cuales suelen afectar a otros órganos (Frieden *et al.*, 2003).

## V. DIAGNOSTICO

Se realiza principalmente por estudios de rayos X y bacteriológicos, por medio de la tinción de Ziehl-Neelsen comunmente conocida como BAAR, pudiéndose identificar el agente en esputo, orina, líquido cefalorraquídeo y jugo gástrico o en tejido de órganos infectados (pulmón, hueso, nódulos linfáticos). Para confirmar la presencia de micobacterias se debe realizar cultivo en medios específicos; sin embargo, una de las desventajas en el diagnóstico es el lento crecimiento de las micobacterias, tardándose hasta 21 días (Tortora *et al.*, 1993; Jawetz *et al.*, 1996).

## VI. TRATAMIENTO

Existen 2 tipos de fármacos para el tratamiento de la TB, los de 1ra línea que son los más utilizados y los fármacos de 2da línea que se utilizan en los casos de MFR.

Se utilizan principalmente fármacos de primera línea siendo Isoniazida (H), Rifampicina (R), Etambutol (E), Estreptomina (S) y/o Pirazinamida (Z). Además se cuenta con fármacos de segunda línea pero son más tóxicos, de costo elevado y deben emplearse en circunstancias extremas como por ejemplo resistencia a los fármacos de primera línea o bien en el fracaso del tratamiento.

### MEDICAMENTOS ANTITUBERCULOSOS DE PRIMERA LINEA

**Isoniacida (H).** Se introdujo en 1952; es altamente eficaz contra las cepas humana y bovina de *M. tuberculosis*, presenta acción bactericida sobre las micobacterias que estan en fase de división, inhibe la síntesis de ácido micólico y la alteración de la pared celular. Penetra fácilmente en la pared celular bacteriana y es igualmente eficaz contra las localizaciones intracelulares y extracelulares (Rodríguez, 1999).

**Rifampicina (R).** Este fármaco se une a la subunidad  $\beta$ - de la DNA-polimerasa RNA-dependiente, impidiendo que esta enzima se una al DNA, bloqueando la transcripción del RNA. Puede actuar como bacteriostática o bactericida según las concentraciones que alcance en su lugar de acción y de la susceptibilidad del microorganismo. Es eficaz frente a microorganismos en fase de división rápida en las lesiones cavitarias y también frente a los que se dividen lentamente, como

ANTECEDENTES

los que se encuentran en las lesiones caseosas y en los macrófagos. Fue introducida en el tratamiento antituberculoso en 1971 (Mandell, 1999).

**Pirazinamida (Z).** Fue introducida por primera vez en 1951 pero se dejó de usar por presentar efectos indeseables debido a las dosis altas que se administraban. Es un medicamento muy importante en el tratamiento antituberculoso por ser esterilizante, debido a su acción bactericida sobre el bacilo tuberculoso intracelular que es el responsable de la aparición de recaídas (Mandell, 1999).

**Estreptomina (S).** Se introdujo en 1945, tiene actividad bactericida y actúa interfiriendo con la síntesis de proteína del *M. tuberculosis* y de otros tipos de micobacterias (Mandell, 1999; Chambers y Sande, 1999).

**Etambutol (E).** Es bacteriostático, aunque también muestra efectos bactericidas si las concentraciones son lo suficientemente elevadas. Inhibe la síntesis del RNA lo que impide su multiplicación. Es efectivo frente a microorganismos en fase de división activa. No se han observado resistencias cruzadas entre el etambutol y otros fármacos antituberculosos. Como regla general, los siguientes microorganismos son susceptibles al etambutol: *M. tuberculosis*; *M. bovis*; *M. marinum*; *M. kansasii*, *M. avium*, *M. fortuitum*, y *M. intracellulare*. (Mandell, 1999; Rodriguez, 1999).

En la siguiente Tabla se describe la dosificación a administrar así como los efectos secundarios que causa cada uno de los fármacos de primera línea.

Tabla 2. Dosis administrada y efectos secundarios de los fármacos de primera línea.

Fármacos	Dosis diaria:			Reacciones adversas
	Niños (mg/Kg peso)	Adultos (mg/Kg peso)	Dosis máxima /día	
Isoniacida (H)	15-20	5-10	300 mg	Neuropatía periférica Hepatitis
Rifampicina (R)	15	10	600 mg	Hepatitis, Hipersensibilidad Interacciones medicamentosas
Pirazinamida (Z)	25-30	20-30	1,5-2 g	Gota Hepatitis
Estreptomina (S)	20-30	15	1 g	Vértigo, Dermatitis Hipoacusia
Etambutol (E)	20-30	15-25	1200 mg	Alteración de la visión

Tomado de: Frieden *et al.*, 2003; NOM-006-SSA2,1993.

ANTECEDENTES

---

## FARMACOS DE SEGUNDA LINEA

**Cicloserina:** Es un antibiótico análogo de la D-alanina; el rango de concentración en el cual actúa es de 15-20 µg/mL. Presenta reacciones adversas tales como disfunciones en el sistema nervioso central y reacciones psicóticas. La dosificación para pacientes con TB es de 0.5-1 g/día.

**Etionamida:** Es un análogo de la isoniazida, bloquea a los ácidos micólicos, la mayor parte de los bacilos tuberculosos se inhiben a concentraciones de 2.5 µg/mL; los efectos secundarios producidos por este fármaco son la intensa irritación gástrica así como síntomas neurológicos. La dosis recomendada es de 1 g/día.

**Ácido para-aminosalicílico (PAS):** Es un compuesto bacteriostático *in vitro*, casi todas las cepas de *M. tuberculosis* son sensibles a una concentración de 1 µg/mL, es específica para *M. tuberculosis*. Su mecanismo de acción es semejante al de las sulfonamidas (impidiendo a la bacteria utilizar de manera normal el PABA en la síntesis de ácido fólico). Entre los efectos secundarios que presenta, predominan los problemas gastrointestinales, incluyendo anorexia, náusea, dolor epigástrico, molestias abdominales y diarrea; los individuos con úlcera gástrica no toleran el producto (Mandell y Petri, 1999).

**Viomicina:** Es un polipéptido producido por estreptococos. La mayor parte de las cepas tuberculosas se inhibe de 1-10 µg/mL, pero induce resistencia fácilmente. Los efectos secundarios más severos que presenta este fármaco son daño a los riñones y al octavo par craneal, lo que da origen a la pérdida del equilibrio y sordera (Rodríguez, 1999).

**Rifabutina:** Es un antibiótico derivado de la rifampicina y posee gran actividad contra *M. avium-intracellulare* y *M. fortuitum*. La dosis recomendada es de 0.15-0.5 g/día por vía oral; a la fecha no se reporta su mecanismo de acción y toxicidad.

Existen otro tipo de fármacos que se utilizan para tratar cuadros causados por cepas resistentes o por micobacterias no tuberculosas, todos estos fármacos se aplican de forma parenteral, presentan farmacocinética y toxicidad similares, la mayoría de estos medicamentos son nefrotóxicos, por lo que no deben utilizarse en forma simultánea. Los fármacos de este grupo (Kanamicina, Amikacina, Capreomicina) se caracterizan por ser aminoglucósidos y presentar como mecanismo de acción la inhibición de la síntesis de proteínas bacterianas, disminuyendo la

ANTECEDENTES

---

fidelidad de la traducción del RNAm y provocando la muerte celular (Mandell y Petri, 1999; Rodríguez, 1999).

## VII. FARMACORESISTENCIA

Uno de los graves problemas en la actualidad es la aparición de cepas MFR de *M. tuberculosis*, la FR se clasifica como primaria y secundaria.

La primaria es aquella en donde el paciente es infectado por bacilos resistentes a los fármacos primarios (H, S y R) y que nunca ha recibido tratamiento. A los pacientes en los que se identifica resistencia a alguno de estos fármacos anti-TB (resistencia en casos nuevos) se deben clasificar dentro de este grupo (Amaya-Tapia *et al.*, 2000). Este tipo de resistencia involucra la transmisión de una cepa con resistencia natural.

La resistencia secundaria o adquirida es aquella en donde el paciente tuvo un tratamiento inadecuado e incompleto (con más de un mes de duración) y en su mayoría es ocasionada por no apearse a los tratamientos. En estos casos, suele encontrarse resistencia a dos o más medicamentos y es frecuente la aparición de cepas con MFR.

Dado el problema de la TB y TB-MFR, en 1996 y 2003 la OMS implementó la estrategia a nivel mundial para controlar y erradicar la enfermedad; esta estrategia es conocida como TAES (Tratamiento Acortado Estrictamente Supervisada) y TAES-Plus o DOTS (por sus siglas en inglés: Directly Observed Treatment Short Course) y DOTS-Plus, la cual se elaboró a partir de la experiencia de la Unión Internacional Contra la Tuberculosis y Enfermedades Respiratorias (UICTER) y otros organismos gubernamentales e internacionales que han trabajado en torno a la problemática de la TB.

Los objetivos principales del TAES se describen a continuación:

- Toda persona infectada debe tener acceso a un diagnóstico y tratamiento efectivo, independientemente del lugar donde se encuentre y/o radique.
- Adoptar la estrategia TAES para contrarrestar la resistencia a los medicamentos y a la resistencia del SIDA /VIH.
- Desarrollar métodos de diagnósticos rápidos sencillos y de bajo costo o bien mejorar las pruebas disponibles para el diagnóstico de la TB a fin de utilizarse en países con mayor índice de TB reportado.
- Identificar al menos una vacuna contra la enfermedad la cual mediante estudios clínicos permita la seguridad del individuo así como su eficacia.

ANTECEDENTES

- 
- Búsqueda de nuevos agentes anti-TB a partir de fuentes naturales y/o sintéticas que coadyuven a los tratamientos ya existentes, que acorten el tiempo de tratamiento y que permitan la disminución de los 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.

Existen dos objetivos a cumplir con el tratamiento de la TB; el social, que es aliviar el sufrimiento humano, prevenir la invalidez o defunción por TB y el epidemiológico, que es cortar la transmisión de la TB entre la población.

A nivel mundial, los casos de resistencia principalmente a dos de los fármacos más importantes (R y H) para tratar la TB va en aumento (Koga *et al.*, 2004). La TB-MFR ha provocado una serie de consecuencias no solo para los pacientes sino también para los programas oficiales de control, dando lugar al fracaso del tratamiento, costo elevado del mismo y transmisión de la enfermedad; ya que un paciente con enfermedad activa puede infectar de 10 a 15 personas por año y cerca de 50% de estos casos pueden llegar a desarrollar la enfermedad (Granich *et al.*, 2000; Lall y Meyer, 1999).

Los principales factores de riesgo para el desarrollo de TB-MFR son tratamientos inadecuados, abandono del mismo, falta de apego al tratamiento recomendado por la OMS, coinfección con VIH, acceso limitado a los sistemas oficiales de salud, malnutrición, hacinamiento así como la baja cobertura del programa TAES en países en donde la incidencia es muy alta, diabetes mellitus, cáncer, artritis reumatoide y los tratamientos prolongados con inmunosupresores (Amaya-Tapia *et al.*, 2000; García-García *et al.*, 2001).

En el caso de Latinoamérica, la Organización Panamericana de la Salud (OPS) reporta que algunos países como Brasil, Colombia y Paraguay tienen una cobertura del TAES menor al 50% y México presenta una cobertura arriba del 70% (OPS, 2004). Sin embargo, uno de los principales objetivos planteados en el programa TAES era erradicar la enfermedad para el 2005, objetivo que no se cumplió. La problemática en la cobertura del TAES en algunos países, favorece la aparición y transmisión de cepas MFR.

Estudios sobre un proyecto Global de Vigilancia de Resistencia a medicamentos anti-TB para 55 países realizado por la OMS demuestra que la cepas resistentes a algún fármaco de primera línea se da principalmente en países en vías de desarrollo, esta resistencia primaria se da desde el 2% para la República Checa hasta un 41 % en la República Dominicana presentando una media

ANTECEDENTES

---

del 10.4%. En el caso de FR adquirida se observa que varía de un 5.3% en Nueva Zelanda a un 100% en Ivanovo Oblast, Rusia, con un valor promedio de 36% (Salazar-Lezama, 2003). Un estudio realizado en los años 1996 y 1999 en pacientes que fueron diagnosticados con TB en 58 regiones del mundo reportó que 54 y 48 de estos sitios, presentan FR en casos nuevos y en casos con re-tratamiento respectivamente (Espinal *et al.*, 2001). De acuerdo a lo anterior, la MFR se ha catalogado como un problema emergente que constituye una creciente amenaza para el control de la TB a nivel mundial (Koga *et al.*, 2004).

Estudios realizados en 1997 reportan que Baja California presentó 6.5% de resistencia a fármacos de primera línea (R y H, principalmente), Oaxaca el 10% y Sinaloa el 6.7% en un total de 614 casos, dando como resultado un promedio de TB-MFR de 2% en casos nuevos, por lo que es importante realizar un revisión en otros estados para tener una idea real del problema a nivel nacional (Espinal, 2001; Granich *et al.*, 2000). En este mismo año Sifuentes-Osornio (2003) reportó que en zonas rurales, suburbanas y urbanas de los estados de Puebla, Veracruz, estados del Pacífico como Baja California, Sinaloa y Oaxaca, los casos de TB con resistencia primaria y secundaria van en aumento, lo que demanda una mayor atención por parte de las autoridades sanitarias y una modificación a la norma oficial mexicana para la prevención y control de la TB. Asimismo, se observó que México se encuentra entre los primeros diez países con problemas de MFR junto con Perú, Bolivia y Sierra Leona de un estudio realizado en 35 países (Sifuentes-Osornio *et al.*, 2003).

En nuestro país existe un reporte del Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiología (INDRE) realizado en el periodo de 1989-1993, el cual indica que de un total de 1636 cepas de *M. tuberculosis*, el 8.2% muestra resistencia primaria, el 63% resistencia secundaria; de estas cepas, el 27% resultó resistente a un fármaco, el 31.2% a dos fármacos y más del 30% a tres o más fármacos anti-TB (Said *et al.*, 2000).

La limitada implementación del programa TAES, siendo en algunos países en vías de desarrollo tan solo del 30 ó 40%, trae como consecuencia la permanencia de la enfermedad y además la aparición y transmisión de casos de TB-MFR que son difíciles de tratar con los esquemas establecidos, aunado al elevado costo de los tratamientos.

En un estudio realizado en México por el INDRE durante de 1990 a 1993, indicó que de 232 casos de TB, el 62.5 % fue resistente a H, el 60.3 % a R, el 37.1 % a S y el 25.1% a E, el periodo Enero 1993 a Febrero de 1999.

ANTECEDENTES

---

## VIII. ESTRATEGIA TAES-PLUS EN MEXICO.

En México, la TB-MFR se reconoce como un problema de salud pública, motivo por el que se han incluido en el Programa estrategias específicas orientadas al diagnóstico, tratamiento, seguimiento y vigilancia epidemiológica de estos casos. Este programa consiste en la administración de fármacos anti-TB de segunda línea de acuerdo a la resistencia presentada en el país o región, sobre todo en países que presentan bajos o medianos recursos económicos (Salazar-Lezama, 2003).

En apoyo a estas medidas, se creó un apartado de TB-MFR en la Norma Oficial Mexicana para la Prevención y Control de la Tuberculosis en la Atención Primaria a la Salud (NOM-006-SSA2-1993), formándose Comités Estatales de Farmacoresistencia (COEFAR) en cada entidad federativa, se constituyó el Grupo Nacional de Asesoría en Farmacoresistencia (GANAFAR) integrado por médicos de las principales instituciones de salud del país con amplia experiencia en el diagnóstico y tratamiento de TB. Además, se estableció el programa anual de capacitación y actualización en TB-FR dirigido a personal de salud (enfermeras, médicos y químicos) ubicados en las 32 entidades federativas con el apoyo de OMS, OPS y UICTER; finalmente, se logró la aprobación de la OMS para iniciar en México un proyecto piloto denominado "TAES-Plus", al cual ingresarán pacientes con TB-MFR ubicados en 5 entidades federativas con mayor incidencia de estos casos (NOM-006-SSA2-1993).

Se considera un caso probable de TB-FR cuando:

- ♣ El paciente haya abandonado el tratamiento primario acortado con fármacos de primera línea en una o más ocasiones.
- ♣ El paciente después del cuarto mes de un tratamiento supervisado con fármacos anti-TB de primera línea presenta baciloscopía positiva.
- ♣ El paciente haya sido multitratado por fracaso o recaída a tratamientos previos.
- ♣ El paciente haya tenido contacto estrecho con un paciente con TB-MFR, y presenta signos y síntomas sugestivos de TB pulmonar o extrapulmonar.

Se confirma TB-MFR al paciente que haya demostrado por aislamiento microbiológico la presencia de bacterias resistentes a H y R simultáneamente y otros fármacos. La confirmación de una cepa de *M. tuberculosis* MFR se lleva a cabo mediante el cultivo de fluidos biológicos o secreciones de órganos de pacientes.

Antes de prescribir un tratamiento con fármacos de segunda línea se debe verificar que:

1. El caso ha sido evaluado por el COEFAR.
2. Hay disponibilidad de los fármacos anti-TB para todo el período de tratamiento por la institución responsable, y establecer una carta compromiso informando del tratamiento.
3. El enfermo debe conocer las características del tratamiento farmacológico y el riesgo de interrumpirlo.
4. El personal de salud debe estar debidamente capacitado en la estrategia TAES y debe garantizar la supervisión directa del tratamiento.
5. Los pacientes con adicción a alcohol y otras sustancias, ingresarán a tratamiento siempre y cuando se encuentren en un programa de rehabilitación.
6. El paciente contará con una residencia fija durante el tratamiento.

El retratamiento estandarizado ideal para pacientes con TB-MFR es con Ofloxacina, Protionamida, Pirazinamida y Capreomicina; se divide en dos fases: una intensiva de 90 dosis (por 3 meses) y otra de sostén de 450 dosis (por 15 meses) como se muestra en la Tabla 3 (NOM 006–SSA2-1993).

Tabla 3. Retratamiento estandarizado para casos de TB-MFR

	Fase intensiva (90 dosis)	Fase de sostén (450 dosis)
Medicamentos	Dosis/día	
Capreomicina	1 g	
Protionamida	750 mg	750 mg
Ofloxacina	800 mg	800 mg
Pirazinamida	1500 mg	1500 mg

Nota: En personas que pesen menos de 50 kg las dosis serán por kilogramo de peso.

En caso de no reunir todos los fármacos que componen el esquema anterior se debe iniciar el siguiente esquema: Ciprofloxacina, Protionamida, Pirazinamida y Kanamicina, el tratamiento debe administrarse por lo menos durante 18 meses, como se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4. Retratamiento estandarizado alternativo para TB-MFR

	Fase intensiva (90 dosis)	Fase de sostén (450 dosis)
Medicamentos	Dosis/día	
Kanamicina	1 g	
Protionamida	750 mg	750 mg
Ofloxacina	1 g	1 g
Pirazinamida	1.5 g	1.5 g

Nota: En personas que pesen menos de 50 kg las dosis serán por kilogramo de peso

El retratamiento individualizado se debe indicar en casos de TB-MFR multitratado o con fracaso a un esquema de retratamiento estandarizado, fundamentado con el resultado del estudio de fármaco susceptibilidad. La recomendación para la combinación y dosificación de estos fármacos será definido por el Centro Nacional de Referencia para TB-MFR del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER).

## IX. EPIDEMIOLOGIA

Después del VIH/SIDA, la TB es la segunda enfermedad infectocontagiosa que causa el mayor número de muertes en el mundo (Frieden *et al.*, 2003). La OMS informa que a nivel mundial un tercio de la población se encuentra infectada por *M. tuberculosis*; cada año se estima una incidencia de más de 10 millones de casos nuevos y 3.5 millones de defunciones por TB.

En México, la tasa de incidencia varía de acuerdo a los diferentes estados, entre 4.2 y 37 casos por cada 100,000 hab en 1999 (SSA, 2004). En 1997, se reportaron 23,575 casos con un promedio de 25 casos/100000 hab. Los estados con mayor número de caso son Baja California, Oaxaca y Sinaloa (Granich *et al.*, 2001). Otros reportes indican que Veracruz es una de las entidades con mayor número de casos, tan solo para el año 1993 se reportan 300 muertes por TB (Amaya-Tapia *et al.*, 2000; García-García *et al.*, 2001).

La Dirección General de Vigilancia Epidemiológica de la SSA (DGE, 2003, 2004, 2005) reportó para los años 2003 y 2004 un total de 15,132 y 14,652 respectivamente y para la semana 45 del 2005 se registraron 13,313 cTB en toda la República Mexicana. En la Tabla 5 se muestran los estados con mayor incidencia de TBp.

Tabla 5. Estados con mayor índice de TBp

Entidad	Año 2003	Año 2004	Año 2005
Baja California	1026	1187	1072
Chiapas	1245	1076	1098
Chihuahua	352	420	379
Coahuila	384	320	369
Distrito Federal	564	447	424
Guerrero	1143	773	843
Jalisco	491	466	422
México	602	536	475
Nuevo León	697	953	740
Oaxaca	656	558	553
Sonora	290	499	610
Tamaulipas	722	746	681
Veracruz	1730	1737	1583

De acuerdo a los datos reportados por la DGE la TBp es la más significativa y el 95% de los casos afecta a personas en edad económicamente activa (26-40 años), trayendo como consecuencia carga económica para las familias y la sociedad (DGE, 2001-2005).

En México, la TB es la tercera causa de muerte después de neumonía e infecciones intestinales, pero ocupa el primer lugar en mortalidad causada por un solo agente infeccioso, provocando una pérdida anual de aproximadamente 96,000 años potenciales de vida (SSA, 2004). La mortalidad ha descendido, y ya no se encuentra dentro de las 20 principales causas de muerte, pero sigue siendo un problema serio de salud (García-García *et al.*, 2001).

Un estudio realizado del periodo de Marzo 1995 a Febrero 2000 en Córdoba-Veracruz, se reporta un total de 3679 casos de pacientes con los cuales 490 (13%) corresponden a pacientes con TBp, 323 (74%) de 436 pacientes se reportaron como casos nuevos y 109 (28%) se trataba de casos con retratamiento (De Riemer *et al.*, 2005).

Para el año 2002 en México se registraron 15,432 casos de TBp, de los cuales 80% fueron confirmados por laboratorio; se estudiaron 4.2 contactos en promedio por caso en el país. Por ello, el Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica de la Secretaría de Salud (SSA), a través del Programa de TB, coordina y norma las acciones que deben realizar las distintas instituciones del sector salud (IMSS, ISSSTE, PEMEX, SEDENA, SEMAR, DIF, INI) en las 32 entidades federativas. Dichas acciones están enfocadas a asegurar la atención médica con diagnóstico y

tratamiento supervisado a los pacientes de manera gratuita, así como fortalecer la vigilancia epidemiológica y la promoción de la salud a la comunidad general, todas ellas orientadas a cumplir el objetivo del programa: reducir la transmisión de la enfermedad (NOM-006 SSA2-1993).

La TB en el mundo es la segunda causa de muerte después del SIDA, poco más de 2 millones de personas mueren cada año (Ruxin *et al.*, 2005; Bates *et al.*, 2004; WHO, 2004). Se estima que en el 2004 se presentaron de 8-9 millones de casos nuevos de TB, un aumento considerable en comparación con el año de 1997 en donde se reportó un total de 7.96 millones de cTB incluidos 3.52 millones casos de TBp (Dye *et al.*, 1999; Ruxin *et al.*, 2005; Bates *et al.*, 2004).

La carga global de la TB sigue siendo una enorme preocupación, principalmente por el escaso control de esta enfermedad en el sureste de Asia, sub-Sahara África y Europa Oriental, debido a altos índices de *M. tuberculosis*, la alta pobreza en algunos países, la edad a la que se presenta la enfermedad (15-59 años) y la coinfección con VIH en algunos países africanos (Dye *et al.*, 1999), en los cuales actualmente se reportan más de 10 millones de personas coinfectadas con TB y SIDA (Bates *et al.*, 2004; Chaisson *et al.*, 1989).

Se estima que a nivel mundial en el período del 2000-2020, cerca de mil millones de personas contraerán la enfermedad, 200 millones enfermarán a causa de TB que a su vez cobrará cerca de 35 millones de vidas (OPS, 2004; Baez-Saldaña *et al.*, 2003).

## X. IMPORTANCIA DE LAS PLANTAS MEDICINALES

El uso de las plantas medicinales se remonta a los inicios de la civilización humana, grandes culturas como China, Hindú, Griega, Nor-Africana, Azteca cuentan con evidencias sobre el uso de este recurso para aliviar diversos problemas de salud que se transmite en forma oral del conocimiento, impreso o computarizado (Phillipson *et al.*, 2001; Eloff, 1998). Por ejemplo, la cultura Griega clasificó algunas especies vegetales y aportó ideas sobre su clasificación botánica; además Teofrastus es considerado el padre de la botánica.

Las plantas medicinales representan una de las fuentes naturales más importantes de compuestos con diversas actividades farmacológicas; por otro lado, y debido al auge que ha tenido el uso de este recurso natural en la actualidad, la OMS estima que el 80% de la población en África, el 48% en Australia, el 70% en Canadá, el 42% en Estados Unidos (EU), el 38% en Bélgica y un

75 % en Francia utilizan las plantas medicinales para solucionar sus principales necesidades de salud (OMS, 2002).

Otro dato interesante es que en los países en vías de desarrollo el gran uso de la medicina tradicional se debe al fácil acceso y disposición. Por ejemplo, en Uganda la proporción de médicos tradicionales frente a la población es de 1:200 dato que contrasta con los médicos alópatas donde la relación es de 1:20,000 y cuya distribución es desigual ya que la mayor parte de los médicos alópatas se encuentran en zonas urbanas y por lo tanto es difícil que las poblaciones rurales tengan acceso a los sistemas oficiales de salud (OMS, 2002), dato no muy lejano a la realidad en México.

Por otro lado, todos los pueblos del mundo tienen y hacen uso de las plantas medicinales para tratar una gran diversidad de enfermedades (Argueta *et al.*, 1994).

Como resultado de los modernos procedimientos de aislamiento e identificación y de experimentación farmacológica, se han encontrado nuevas sustancias de origen vegetal con importante actividad biológica, empleándose ahora más como sustancias purificadas que en antiguas preparaciones galénicas. La utilización de compuestos naturales aislados incluyendo fármacos sintéticos no carece de limitaciones pero en años recientes se ha incrementado el interés por el uso de agentes fitoterapéuticos estrechamente relacionados con los recursos vegetales (Trease y Evans, 1991).

En el planeta existen un total de 250,000 especies de las cuales, cerca del 15% han sido investigadas fitoquímicamente y solo al 6% se le ha explorado su potencial biológico.

Actualmente no se dispone de los datos necesarios para precisar la difusión del uso de las plantas, de los principios activos derivados de estas, en los sistemas de salud de los distintos países del mundo. Los fármacos derivados de plantas presentan mucha importancia en países desarrollados como por ejemplo Estados Unidos, Alemania y Japón.

En México, el uso de las plantas es amplio y se tiene registrado en el herbario IMSS aproximadamente 5000 especies botánicas con propiedades medicinales, las cuales son utilizadas por la población en general para tratar diversos padecimientos. La enorme riqueza de la flora medicinal en México se debe a la situación geográfica y a la diversidad de grupos étnicos (52 grupos). Actualmente, más del 66% hace uso de este recurso natural y en los centros urbanos ha surgido un reencuentro con la naturaleza lo que ha provocado que a los conocimientos de la medicina moderna, se le agreguen los de la medicina tradicional para obtener diferentes modelos terapéuticos.

La investigación realizada para la separación, purificación y elucidación de la estructura química de un determinado metabolito secundario con una actividad biológica requiere de una colaboración multidisciplinaria en donde participan farmacólogos, químicos, bioquímicos, toxicólogos entre otros expertos en la materia (Baladrin *et al.*, 1993).

La investigación de los extractos de plantas y productos naturales para la actividad antimicrobiana ha revelado el alto potencial de las plantas como fuente de nuevos agentes (Rojas *et al.*, 1992).

Antes de la segunda guerra mundial una gran cantidad de compuestos aislados de diferentes especies vegetales se convirtieron en importantes compuestos terapéuticos; por ejemplo la quinina aislada de la corteza de *Cinchona*, morfina y codeína del opio, digitoxina de las hojas de *Digitalis*, atropina (derivada de (-)-hiosciamina) y hiocina de especies de *Solanaceae* (Phillipson, 2001). En la actualidad las plantas continúan siendo fuente importante de agentes farmacológicamente activos y como ejemplos podemos mencionar el taxol, la galantamina, la galegina y arteeter (derivado de artemisinina) obtenidos de *Taxus brevifolia*, *Galanthus woronowii* *Galega officinalis*, y *Artemisia annua*, respectivamente (Balunas y Kinghorna, 2005).

## XI. LAS PLANTAS MEDICINALES COMO FUENTE DE AGENTES ANTITUBERCULOSOS

Dado estos antecedentes es urgente desarrollar nuevas drogas para la reducción de la carga global de TB y el uso de productos naturales se ha colocado como prototipo probado para el desarrollo de nuevos fármacos. Actualmente, se ha puesto mayor atención a dichos productos por su alto contenido de compuestos muchos de los cuales aun son desconocidos y pueden servir como moléculas prototipo para el desarrollo de agentes anti-TB. Diversos investigadores se han dado a la tarea de explorar no solo las plantas sino otros organismos naturales como hongos, bacterias, organismos marinos, algas etc, con el fin de encontrar nuevos compuestos y/o moléculas útiles en el tratamiento de la TB (Pauli *et al.*, 2005; Cantrell *et al.*, 2001; Lall y Meyer, 1999). De estos trabajos podemos citar algunos compuestos que se han sido aislados de diversas plantas, presentando una importante actividad anti-TB ( $\geq 8\mu\text{g/mL}$ ). Entre ellos se encuentran diferentes metabolitos secundarios como: las quinonas, alcaloides, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenoides, etc. (Wächter *et al.*, 1999; Cantrell *et al.*, 2001; Newton, 2000; Okunade *et al.*, 2000, Copp, 2003).

En el extracto metanólico de *Leucas volkensii* (arbusto de Kenia) se aisló el (E) fitol como principal constituyente antimicobacteriano, con CMI de 2 µg/mL (Copp, 2003; Cantrell *et al.*, 2001).

Del extracto CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>: MeOH (1:1) de *Sapium haematospermum*, planta nativa del sur de América, presenta CMI de 25 µg/mL contra *M. tuberculosis*; algunos de los compuestos más activos de esta especie fue el lequeronol A y cicloartanol con CMI de 4 y 8 µg/mL, respectivamente; estos compuestos fueron evaluados por el método MABA (Woldemichael *et al.*, 2004).

Se describen también compuestos como el triterpeno ergosterol-5-8-endoperóxido aislado de *Ajuga remota* con una CMI de 1 µg/mL; los diterpenos 12-dimetilmulticaulina, 12-dimetilmultiortoquinona, multiortoquinona, 12-metil-5-dehidroacetilhorminona aislados de *Salvia multicaulis* presentando CMI de 0.46, 1.2, 2 y 0.89 µg/mL respectivamente (Cantrell *et al.*, 2001).

Así mismo, se describe que el extracto de diclorometano de *Alpinia galanga* que contiene 5% de acetato de acetilchavicol, presenta una CMI de 1 µg/mL (Pauli *et al.*, 2005).

## XII. ANTECEDENTES DE *Thymus vulgaris*

### XII.1 Características botánicas y distribución

La planta pertenece a la familia Lamiaceae y es originaria de la cuenca mediterránea occidental; es una especie cultivada en Europa central, este de Asia, India, y América del Norte (Wang *et al.*, 1999) y fue introducida a nuestro País en la época de la colonia y se distribuye en la mayor parte de la República Mexicana (Aguilar *et al.*, 1994; Argueta *et al.*, 1994). Es una de las plantas medicinales más conocidas y utilizadas; curiosamente en la antigua Grecia casi pasó inadvertida, y al contrario de lo que ocurrió con el perejil, sus primeros usos fueron culinarios, como hierba aromática. Los romanos la introdujeron en el mundo occidental para combatir la tos, pero hubo que esperar hasta el siglo XI para que se cultivara y popularizara en toda Europa.

La planta crece en climas templados desde los 1600 hasta 2600 msnm, está asociada a bosques de encino, de pino y mixto de pino-encino. Se encuentra como una mata de tallo tortuoso, leñoso color blanquecino, rojizo o púrpura, muy ramificado, de menos de 30 cm de altura, con muchísimas hojas que se encuentran más anchas que largas, afiladas, pequeñas (de menos de 1 cm. de longitud), estrechas, cubiertas de pelusilla, blanca por la parte inferior de las hojas de color verde oscuro. Sobre su diminuta superficie, se abren poros por los que se expone la esencia.

La flor, blanca o rosada, con cáliz, con dos expansiones en forma de labios de distinto tamaño (característica que da nombre a la familia: Labiadas, Figura 1). Popularmente se conoce como tremoncilla, tremoncillo y tomillo (Font-Quer, 1961).



Figura 1. *Thymus vulgaris*

## XII.2 ETNOBOTANICA

La forma más adecuada de aprovechar sus virtudes es la infusión: dos o tres ramitas por taza de agua después de las comidas ejercen una acción digestiva. Tomada en ayunas durante varios días seguidos elimina los parásitos intestinales; también se utiliza como desinfectante para heridas y en caso de conjuntivitis (Wang *et al.*, 1999; Duke, 2002). Además, se utiliza para estimular el sistema circulatorio y nervioso, reactiva la musculatura tras un esfuerzo, facilita la digestión y favorece la eliminación de orina (Kitajima *et al.*, 2004a y 2004b; Duke, 2002).

El tomillo generalmente se emplea como condimento y posee propiedades medicinales que son aprovechadas principalmente para curar la tos y afecciones respiratorias (catarro, gripe, faringitis, tos irritativa, amigdalitis, bronquitis, asma, enfisema). Otro uso importante es en tratamiento de afecciones digestivas (digestiones lentas, gastritis crónicas, meteorismo, espasmos gastrointestinales, parasitosis, colitis, inapetencia; astenia, convalecencia; cistitis, uretritis, pielonefritis, dispepsia, cólicos, disentería (Wang *et al.*, 1999; Kitajima *et al.*, 2004a y 2004b; Duke, 1985 y 2002; Essawi y Srour, 2000).

En la farmacopea alemana y británica se describe como estomáquico, carminativo, diurético, desinfectante de las vías urinarias y vermífugo (Kitajima *et al.*, 2004a y 2004b; Duke, 1985 y 2002). También tiene uso externo, para curar dermatitis, forúnculos, infecciones cutáneas, dermatomycosis, vaginitis, otitis, rinitis, sinusitis, dolores reumáticos, estomatitis, dolores dentales, alopecia, úlceras, contusiones, esguinces, hematomas, quemaduras, además es utilizado como

sedante, antiséptico, antihelmíntico, antipirético, fungicida. Se emplea también para el control de la menstruación, en la higiene oral o como insecticida, también presenta actividad antimutagénica

(Wang *et al.*, 1999; Kitajima *et al.*, 2004; Chorianopoulos *et al.*, 2004; Ismaili *et al.*, 2004; Duke, 1985 y 2002; Bhaskara-Reddy *et al.*, 1998; Aydin *et al.*, 2005; Nickavar *et al.*, 2005).

Se debe tener precaución con la esencia: puede dar lugar a reacciones alérgicas, sobre todo en niños y, a dosis elevadas, se presentan convulsiones. El timol, a dosis elevadas, puede causar toxicidad hepática, problemas cardiacos, convulsiones, náuseas, vómitos, hiperemia, inflamación severa (Duke, 1985 y 2002).

### XII.3 QUIMICA

Los principios activos y mayoritarios de *T. vulgaris* son el timol y el carvacrol (Fig. 2) presentes en el aceite esencial y en el extracto poco polar (Kitajima *et al.*, 2004a y 2004b). Algunos reportes indican que el aceite esencial de las hojas contiene del 30 al 70% de timol y del 3 al 15% de carvacrol y otros monoterpenoides como metilcarvacrol, p-cimeno, o-cimeno,  $\alpha$ -terpineno, 4-tujanol  $\alpha$ -y  $\beta$  felnadreno,  $\beta$ -cariofileno limoneno,  $\alpha$  y  $\gamma$ -terpineol,  $\alpha$  y  $\gamma$ -terpineno,  $\alpha$  y  $\beta$ -pineno, terpinen-4-ol, 3,6,6-trimetilbicyclo(3,1,1)-hepta-2-ene, 1,8-cineol,  $\delta$ -carineno, canfeno, car-3-ene, car-4-ene-carvacrol, cineol, alcohol puminílico, geraniol, linalol, mirceno, borneol, acetato de bornilo entre otros (Kitajima *et al.*, 2004a y 2004b; Duke, 1985; Giordani, 2004; Díaz-Maroto *et al.*, 2005; Bhaskara-Reddy *et al.*, 1998). En las ramas se ha reportado la presencia de los monoterpenos carvacrol y timol, y su derivado 8-dimetilado; algunos compuestos fenólicos como: ácido caféico, ácido p-cumárico, ác. clorogénico, ác. litospermico, ác. rosmarínico, ácido oleico, y los ácido palmítico, nicotínico y linoleico; los aminoácidos como cistina, valina, glicina, isoleucina. Contiene ácidos tales como ác. hexadecanóico, ác. octadecanóico, ác. eicosanóico, ác. 9,12-octadecadienóico, ác. 9-octadecanóico (Argueta *et al.*, 1994).

En las hojas se ha detectado 3,3', 4,4'-tetrahidroxi-5,5'-diisopropil-2,2'-dimetil-bifenil y 4 derivados de este compuesto.

Además, en la especie se describen los sequitерpenos  $\beta$ -cadineno,  $\beta$ -cariofileno, ludsmol, acetol (Argueta *et al.*, 1994). Otros metabolitos descritos para la especie son flavonas como: apigenina, luteolina, 6-hidroxiluteolina, 7- $\beta$ -glucósido-luteolina, narigenina, cirsilino) y su derivado metoxilado, 5,4'-dihidroxi-6,7,8-trimetoxyflavona; 6,7-dimetilcartamidina, sakuranetina o 7-metilnarigenina, eridictiol, dihidrocamperol o aromadendrina, dihidroquercetina o taxifolina, dihidroxantomicrol, 5-desmetilsinensetina, 7-metilsudaquitina, cirsimaritina, salvigenina, timusina,

xantomicol, gardenina, sideritoflavona, 5-desmetilnobiletina, apigenina, 7-metilapigenina, 7,4-dimetilapigenina y quercetina (Brunentong, 2000; Van den Broucke *et al.*, 1982). Del extracto butanólico se aislaron cuatro glicósidos de acetofenonas: 4-O-[5-O-(3,5-dimetoxi-4-hidroxibenzoil)- $\beta$ -D-apiofuranosil]-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-glucopiranosido 4-hidroxiacetofenona, 4-O-[5-O-(4-hidroxibenzoil)- $\beta$ -D-apiofuranosil]-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-glucopiranosido 4-hidroxiacetofenona, piceina, androsina (Wang *et al.*, 1999).

Recientemente, se ha descrito que el extracto metanólico de las partes aéreas de *T. saturoioides* y *Thymus broussonettii* contiene ácido oleanólico y ácido ursólico en un porcentaje de 1.5% (Ismaili *et al.*, 2002 y 2004; Duke, 1985).

## XII.4 FARMACOLOGIA

Diversos reportes describen que el aceite esencial de *T. vulgaris* tiene actividad antibacteriana contra *Bacillus subtilis*, *Escherichiae coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Micrococcus flavus*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus aerus*, *S. epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Streptococcus faecalis*, y antifúngica contra *Aspergillus flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *Candida albicans*, *C. guilliermondi*, *C. kerusei*, *C. hypolytica*, *C. tropicales* y *Rhodotorula rubra* (Hersch-Martínez *et al.*, 2005; Argueta *et al.*, 1994; Essawi y Srouf, 2000) y el extracto acuoso presenta actividad antitrombótica (Yamamoto *et al.*, 2005). Así mismo el extracto etanólico de las ramas fue activo contra *B. subtilis*, a una concentración de 500  $\mu$ g/mL inhibe el crecimiento de *S. aerus*, a 100  $\mu$ g/mL inhibe el crecimiento de *V. Parahaemolyticus*; el extracto etanólico-acuoso resultó activo contra *Candida albicans*. Además, el extracto acuoso presenta actividad contra los virus del herpes tipo 2 de la influenza A2, polivirus II y de la viruela (Argueta *et al.*, 1994; Bhaskara-Reddy *et al.*, 1998). Otro estudio realizado en la especie reporta que el extracto acetónico y acuoso de las partes aéreas inhiben el crecimiento de *M. tuberculosis* H37Rv con CMI = 500 y 5000  $\mu$ g/mL (Lall y Meyer, 1999) y en una evaluación preliminar de los extractos hexánico y metanólico se encontró que ambos extractos inhiben el crecimiento de *M. tuberculosis* H37Rv a la concentración de 50  $\mu$ g/mL. También se ha descrito que el aceite esencial presenta actividad insecticida, antioxidante, antimicrobiana, antifúngica y como conservador de alimentos (Bhaskara-Reddy *et al.*, 1998). Otros datos indican que el extracto metanólico presenta una buena actividad antipropulsiva con valores de 70.2-76.9 % de inhibición en los casos de diarrea inducida con goma acacia y carbón activado (50 mg y 20 mg/mL de agua) (Lugo, 2005).

Los principios activos y mayoritarios de *T. vulgaris* son el timol y el carvacrol (Fig. 2) presente tanto en el aceite esencial y en el extracto poco polar (Kitajima *et al.*, 2004a y 2004b). El timol tiene propiedades; antimicrobianas, antioxidantes (Salehi *et al.*, 2005; Shin y Kim, 2005; Bagamboula *et*

*al.*, 2004; Trombetta *et al.*, 2005; Agbor *et al.*, 2005; Proestos *et al.*, 2005; Bhaskara-Reddy *et al.*, 1998; Giordani *et al.*, 2004), antiinflamatorias (Marsik *et al.*, 2005), antiespasmódicas (combate los espamos) y vermífugas (elimina los gusanos del tracto digestivo). El carvacrol presenta importante efecto antimicrobiano (Yanishlieva *et al.*, 1999; Trombetta *et al.*, 2005; Bagamboula *et al.*, 2004; Lugo, 2005). Los monoterpenos carvacrol, timol, p-cimeno,  $\alpha$ -pineno son los responsables del efecto repelente contra *Culex pipiens* (Park *et al.*, 2005).

Los monoterpenos mayoritarios presentan actividad antibacteriana cuya CMI es de 0.015 a 0.03% para el carvacrol y de 0.03 a 0.06% para el timol contra *S. aureus* y *S. dermatitis*, respectivamente. El timol muestra un CMI de 5 mg/mL para *E.coli* ATCC15221 (Nostro *et al.*, 2004; Trombetta *et al.*, 2005; Bagamboula *et al.*, 2004). La mezcla de timol/carvacrol incrementa la actividad enzimática para el metabolismo de xenobióticos (Sasaki *et al.*, 2005).

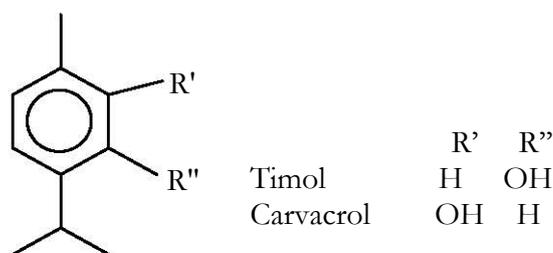


Figura 2. Timol/Carvacrol principios activos de *T. vulgaris*

En relación con las propiedades farmacológicas de los extractos y de los metabolitos secundarios de *T. vulgaris*, se ha descrito que tanto el timol como el aceite esencial forman parte de una gran cantidad de preparaciones farmacéuticas y alimentarias que incluyen jarabes para el tratamiento de desordenes respiratorios, pomadas antisépticas y como agentes saborizantes (Hudaib *et al.*, 2002; Bhaskara-Reddy *et al.*, 1998).

En el caso del timol y carvacrol se ha descrito importante actividad como antioxidante ante diferentes sistemas de lípidos (triacilgliceroles y aceite de girasol), antimicrobiano (Yanishlieva *et al.*, 1999; Gerbach *et al.*, 2001; Nostro *et al.*, 2004; Chorianopoulos *et al.*, 2004; Bagamboula *et al.*, 2004).

EL timol inhibe el crecimiento de *Candida albicans* (Giordani *et al.*, 2004), de *A. parasiticus* (CMI= 500  $\mu$ g/mL) y de *Aspergillus flavus* y *A. versicolor* (CMI = 0.4  $\mu$ g/mL) (Bhaskara-Reddy *et al.*, 1998). Tanto el timol como el carvacrol protegen del daño al DNA de linfocitos humanos, inducido por la amina heterocíclica IQ y la mitomicina C (Aydin *et al.*, 2005).

Además, se ha descrito que otros compuestos aislados del extracto hexánico de *T. vulgaris* como el eugenol, timol, carvacrol y 4-alilfenol presentan mejor actividad antioxidante respecto a los comercialmente disponibles como el  $\alpha$ -tocoferol y el hidroxitolueno butilado (Lee *et al.*, 2005). Respecto a la actividad biológica de otros metabolitos secundarios aislados de *T. vulgaris* como los polifenoles o flavonas se describe el efecto antiinflamatorio, antidiarreico, antialérgico, antiviral, citotóxico, antihelmíntico, hepatoprotector, vasodilatador y antioxidante (Wang *et al.*, 1999; Proestos *et al.*, 2005).

En el caso del ácido ursólico y ácido oleanólico aislados de *Thymus broussonettii* y *T. saturoioides* se describe el efecto antiinflamatorio y su mecanismo de acción (Ismaili *et al.*, 2002 y 2004); también se ha descrito la actividad antimicobacteriana contra *M. tuberculosis* H37Rv. El ácido ursólico muestra una CMI = 15  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ó 32  $\mu\text{M}$  y el ácido oleanólico una CMI = 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ó 64  $\mu\text{M}$  (Cantrell *et al.*, 2001; Gu *et al.*, 2004; Wachter *et al.*, 1999).

Otras actividades biológicas que se describen para estos ácidos triterpénicos son actividad antiinflamatoria *in vitro* (Liu, 1995; Deepak y Handa, 2000; Díaz *et al.*, 2000; Ismaili *et al.*, 2001 y 2004; Shin *et al.*, 2004; Ovesná *et al.*, 2004; Fu *et al.*, 2005; Kang *et al.*, 2005; Miceli *et al.*, 2005;), inhibidor selectivo de COX-2 con una  $\text{CI}_{50}$  = 130  $\mu\text{M}$  y una relación COX-2/COX-1 de 0.6  $\mu\text{M}$  (Ringbom *et al.*, 1998), antimicrobiana (Gua *et al.*, 2004; Isobe *et al.*, 1989), citotóxica (Ríos *et al.*, 2001; Taponjoui *et al.*, 2002; Baglin *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2002; Chang *et al.*, 2004), hepatoprotector, inhiben la iniciación y promoción de tumores, antihiperlipidémico, antiulcerogénico, hipoglicémico, anticariogénico (Liu, 1995; Ovesná *et al.*, 2004; Kang *et al.*, 2005).

## ♣ HIPOTESIS

Los diversos usos en la medicina tradicional y el efecto antimicobacteriano mostrado por los extractos metanólico y hexánico de *T. vulgaris*, indican que ambos extractos contienen metabolitos secundarios capaces de inhibir el crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis*, los cuales pueden ser aislados mediante fraccionamiento químico biodirigido e identificados por análisis de sus datos espectroscópicos.

## ♣ OBJETIVOS

Obtener los principios antimicrobianos de los extractos hexánico y metanólico de *Thymus vulgaris* y establecer la posible toxicidad; así como determinar la  $DL_{50}$  en ratones y la  $CL_{50}$  en larvas de *Artemia salina*.

### ♣ OBJETIVOS PARTICULARES

1. Realizar el estudio fitoquímico biodirigido del extracto activo de *Thymus vulgaris*, monitoreando la actividad mediante el método colorimétrico del Alamar azul (MABA).
2. Determinar la toxicidad aguda del extracto mediante el método de Lorke.
3. Determinar la toxicidad de los extractos contra larvas de *Artemia salina*.

## ♣ METODOLOGIA

### I. SELECCIÓN Y COLECTA DEL MATERIAL VEGETAL

La especie medicinal *Thymus vulgaris* se seleccionó con base en el criterio etnobotánico tomando en cuenta el uso en la medicina tradicional de México y los datos descritos en las fichas de herbario IMSSM (Aguilar *et al.*, 1994; Argueta *et al.*, 1994). El material vegetal se colectó en el estado de Oaxaca en Enero 2001 y un ejemplar de herbario se depositó en el herbario del IMSS (Voucher 2117). La especie es muy utilizada en la medicina tradicional para tratar problemas de vías respiratorias y gastrointestinales y en una evaluación preliminar se encontró que los extractos hexánico y metanólico de las partes aéreas inhibieron el crecimiento de *M. tuberculosis* H37Rv y *M. avium* a la concentración de 50 y 200 µg/mL, respectivamente (datos no publicados).

### II. PREPARACION DE EXTRACTOS

2 kg de material vegetal fresco (partes aéreas), se colectaron, el cual se seco a temperatura ambiente y a la sombra. El material vegetal seco se fragmentó en un molino de cuchillas (Tor-Rey) y a partir de este material se procedió a preparar por separado los extractos hexánico (400 g) y metanólico (600 g) vía maceración por periodos de 48 hr c/u con el solvente correspondiente (grado RA, Mallinckrodt). Cada extracción se realizó por triplicado, transcurrido el tiempo de maceración los extractos se concentraron a presión reducida con ayuda de un rotaevaporador (Buchi Water Bath) acoplado a una bomba de vacío (Buchi Vac V-513) y a un recirculador (ECO 20) a 40°C. El rendimiento de los mismos se determinó respecto al peso del material vegetal seco inicial. Del extracto hexánico se obtuvo un rendimiento del 3.92 % (15.7 g) y del extracto metanólico se obtuvo un rendimiento del 5.95 % (35.7 g). Una vez obtenidos los extractos se procedió a determinar la actividad antimicrobacteriana *in vitro*, la CI<sub>50</sub> en larvas de *Artemia salina* y la DL<sub>50</sub> en ratones Balb/C. Posteriormente cada extracto se fraccionó mediante métodos químicos.

### III. ENSAYOS BIOLÓGICOS

#### III.A DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICOBACTERIANA

##### III.A.1 Microorganismo de prueba:

Para la realización del ensayo se utilizaron las siguientes cepas de referencia: *M. tuberculosis* H37Rv (ATCC 27294), trece aislados clínicos de *M. tuberculosis* MFR provenientes de pacientes mexicanos con patrón de farmacoresistencia determinada (Tabla 6). El cultivo semilla de cada micobacteria se hizo crecer a 37 °C en caldo Middlebrook 7H9 (Becton Dickinson) enriquecido con 0.2% de glicerol (Sigma) y 10% OADC –ácido oleico, albúmina, dextrosa y catalasa- (Becton Dickinson). La suspensión bacteriana en fase de crecimiento logarítmico se ajustó al tubo No.1 del nefelómetro de McFarland con medio de cultivo 7H9 estéril. De esta suspensión se realizó una dilución 1:50 con el mismo medio para obtener finalmente una concentración de micobacterias de  $6 \times 10^6$  unidades formadoras de colonias (UFC/mL). De esta última solución se toman 100 µl y se adicionaron a los pozos de prueba.

Tabla 6. Patrón de farmacoresistencia.

Numero de Aislado <sup>a, b</sup>	Patrón de farmacoresistencia
MTY611	S
MTY616	H
MTY652	H
MTY687	H
MTY650	S, H
MTY172	H, PZA
MTY559	S, E
MTY675	S, H, E
MTY112	S, H, R, E
MTY282	S, H, E, PZA
MTY234	S, I, R, PZA
MTY99	S, H, R, E, PZA
MTY663	S, I, R, E, PZA

- a) Aislados de pacientes mexicanos resistentes a: estreptomina (S), isoniazida (H), rifampicina (R), etambutol (E), rifabutina (RFB), etionamida (ETH), claritromicina (CLR), ofloxacina (OFX), pirazinamida (PZA).
- b) Resistencia determinada por el micrométodo colorimétrico de alamar azul.

### III.A.2. Preparación de muestras a evaluar.

Los extractos, fracciones y compuestos puros, libres de solventes orgánicos, se solubilizaron en DMSO, se prepararon soluciones stock de 4 mg/mL. Estas soluciones se filtraron en condiciones estériles (filtro Acrodisc Syringe filters de 0.2  $\mu\text{m}$ ), a partir de ellas se realizaron las diluciones necesarias para tener concentraciones finales de 200 hasta 3.12  $\mu\text{g/mL}$  para determinar las CMI's. Cada ensayo se realizó por triplicado bajo condiciones de estricta esterilidad en campana de flujo laminar P3. Como control positivo se utilizó rifampicina (0.062  $\mu\text{g/mL}$ ). La concentración final de DMSO fue de 2.5% o menor en todos los ensayos fue no tóxica para las micobacterias.

### III.A.3 Desarrollo del micrométodo colorimétrico de alamar azul (MABA).

Esta técnica se emplea para determinar la susceptibilidad o resistencia de cepas de *Mycobacterium* a los agentes antifímicos de origen natural y/o sintético (Collins y Franzblau, 1997; Wachter *et al.*, 1998; Jiménez-Arellanes *et al.*, 2003; Mata *et al.*, 2004; Rivero-Cruz *et al.*, 2005). Es una prueba rápida, sencilla, reproducible y de bajo costo, adecuada para determinar la actividad de los extractos crudos, fracciones y compuestos puros, misma que se utilizó en la primera parte de esta línea de investigación (Jiménez-Arellanes *et al.*, 2003 y 2005). El ensayo biológico se realizó en microplacas estériles de 96 pozos con tapa y de fondo plano. A los pozos de la orilla se les adicionó 100  $\mu\text{L}$  de agua bidestilada, con la finalidad de mantener la humedad de la placa durante el proceso de incubación. Los 60 pozos restantes de la placa (10 hileras de 6 pozos cada una) sirvieron para evaluar seis concentraciones de las muestras vegetales (100-3.12  $\mu\text{g/mL}$ ) y los controles. En cada caso, se incluyeron tres controles (uno de microorganismo, uno de disolvente y el control positivo: rifampicina). En cada pozo se colocaron 100  $\mu\text{L}$  de medio Middlebrook 7H9, 100  $\mu\text{L}$  de la muestra a evaluar (extracto, fracciones y/o compuestos puros), a partir de este pozo se realizan las diluciones seriadas, por último se agregan 100  $\mu\text{L}$  de la suspensión bacteriana ( $6 \times 10^6$  UFC/mL). Una vez inoculadas las placas, se tapan, sellaron e incubaron a 37° C durante cinco días; después de este tiempo, se adicionó 20  $\mu\text{L}$  de tween-80 y 20  $\mu\text{L}$  de alamar azul (indicador redox) al control sin extracto, prolongando la incubación por 24 horas más. Si el crecimiento de la micobacteria es óptimo en este control, se observa un cambio de color, de azul (estado oxidado) a rosa (estado reducido). Al observar este cambio de coloración, se procede a la adición del alamar azul (20  $\mu\text{L}$ ) y del tween-80 (20  $\mu\text{L}$ ) al resto de los pozos, incluyendo el resto de los controles, nuevamente las placas son reincubadas a 37°C durante 24 hrs. En forma similar, se prepararon las muestras para la evaluación de los extractos, fracciones y/o compuestos contra los

aislados clínicos de *M. tuberculosis*. Transcurrido el tiempo de incubación, se determina la CMI en forma visual. Se consideran activos aquellos extractos, fracciones y compuesto puros cuya CMI sea  $<100 \mu\text{g}/\text{mL}$ .

### III.B DETERMINACION DE LA CONCENTRACION LETAL MEDIA ( $CL_{50}$ ) EN LARVAS DE *Artemia salina*

Para la realización de este ensayo, se preparó el medio salino artificial (Instant Ocean, 28g/L) con agua destilada. Los huevecillos del crustáceo *A. salina* se incubaron en el medio salino por 48 horas, al término de este tiempo las larvas fueron utilizadas para el bioensayo.

Cada una de las muestras se evaluó a las concentraciones de 1000, 750, 500, 250, 100, 50 y 10 ppm ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), para ello se preparó una solución patrón de 10 mg de muestra por mL de  $\text{CHCl}_3$ . De esta solución se tomaron alícuotas de 500, 375, 250, 125, 50, 25 y 5  $\mu\text{L}$  y se adicionaron a los viales de ensayo, cada concentración se evaluó por triplicado. Las muestras a evaluar se dejaron al vacío y a temperatura ambiente con la finalidad de eliminar el disolvente. Una vez evaporado este, se adicionó un mL de solución salina y se transfirieron 10 larvas por vial, por último se aforó cada vial a 5 mL con medio salino, para así obtener las concentraciones antes descritas.

Los viales se mantuvieron con iluminación artificial durante 24 horas, transcurrido el tiempo se procedió a contar el número de crustáceos sobrevivientes. Los límites de actividad: para el extracto o fracción se consideran activos cuando la  $CL_{50}$  es menor a  $1000 \mu\text{g}/\text{mL}$  y para compuestos puros, la  $CL_{50}$  debe ser menor a  $200 \mu\text{g}/\text{mL}$  (Anderson *et al.*, 1991).

El cálculo de la  $CL_{50}$  se realizó usando el método de Reed-Muench, que consiste en graficar el logaritmo de la concentración (en el eje de las X) contra la acumulación de larvas muertas y sobrevivientes en el mismo eje (eje de las y). Al graficar los datos, las curvas se superponen y el valor de la  $CL_{50}$  es el punto de intersección de las curvas (Wah, 1993).

### III.C DETERMINACION DE LA DOSIS LETAL MEDIA (DL<sub>50</sub>) EN RATONES Balb/C

Esta evaluación se realizó empleando el método de Lorke (1983). Para ello se emplearon ratones machos de la cepa Bab/C con peso promedio de 28 g (de 5 a 6 semanas) en ayuno de 12 horas con acceso libre de agua y con fotoperíodo de 12 h luz por 12 h de oscuridad alimentados en forma normal. Los animales fueron tratados según la NOM-062-ZOO-1999, en donde se describe los requerimientos éticos para el uso de animales de experimentación, aquellos animales que sobrevivieron al periodo de experimentación fueron sacrificados por intoxicación con CO<sub>2</sub> e incinerados en el bioterio del CMN Siglo XXI.

Se formaron grupos de tres animales y la administración de la muestra a ensayar se realizó por vía intragástrica, en una sola administración en un volumen no mayor de 300 µL. Los animales que sobrevivieron después de 24 hr se mantuvieron en observación durante 14 días y transcurrido el tiempo fueron sacrificados por dislocación cervical y se observaron los órganos principales (hígado, riñón, pulmón, intestino y bazo). Como vehículo se empleó la mezcla de Tween 20/agua (3:7). Las muestras a evaluar fueron los extractos hexánico y metanólico de *T. vulgaris* a las concentraciones de 1000, 1600, 2900 y 5000 mg/Kg de peso. Al grupo control se le administro únicamente el vehículo. Los resultados se reportan como DL<sub>50</sub>.

## IV. FRACCIONAMIENTO QUIMICO DE *Thymus vulgaris*

### IV.1 EXTRACTO HEXANICO

Una vez evaluados los extractos se procedió a realizar el fraccionamiento químico-biodirigido de aquellos que resultaron activos. Se inició con el fraccionamiento de 8 g de extracto hexánico en cromatografía en columna fase normal (CC-FN) empacada con 175 g de silica gel (Merck), empleando como fase móvil Hexano 100%, mezclas de Hex: CHCl<sub>3</sub>, CHCl<sub>3</sub>, mezclas de CHCl<sub>3</sub>:MeOH y MeOH 100%. Mediante este proceso se obtuvieron 68 fracciones de 500 mL c/u, las fracciones primarias fueron reunidas en 20 grupos de acuerdo a su perfil cromatográfico en ccf. Los sistemas de elusión empleados en el fraccionamiento, fracciones obtenidas y reunidas; así como el rendimiento y la clave final de estas se describen en la Tabla 7.

Las fracciones primarias fueron sometidas a evaluación antimicobacteriana contra la cepas *M. tuberculosis* H37Rv y contra aislados clínicos de *M. tuberculosis* MFR. Las fracciones que resultaron activas fueron objeto de un fraccionamiento secundario en CC-FN.

Tabla 7. Fraccionamiento primario del extracto hexánico de *T. vulgaris*.

Sistema de elusión (%)	Fracciones		Clave final	Peso de la fracción (mg)	*Rendimiento (%)
	Obtenidas	Reunidas			
Hex (100)	1-12	F1	Tv1/1	0,3995	4,99
		F2-4	Tv1/2	0,0168	0,21
		F5-10	Tv1/3	0,0074	0,0925
		F11-15	Tv1/4	0,0258	0,3225
Hex:CHCl <sub>3</sub> (90:10)	13-20	F16-20	Tv1/5	0,0136	0,17
Hex:CHCl <sub>3</sub> (80:20)	21-44	F21	Tv1/6	0,0723	0,9
		F22-25	Tv1/7	0,1672	2,09
		F26-29	Tv1/8	0,2087	2,6
		F30	Tv1/9	0,2379	2,97
		F31-34	Tv1/10	1,2026	15,03
		F35-39	Tv1/11	1,0502	13,12
		F40-44	Tv1/12	0,084	1,05
Hex:CHCl <sub>3</sub> (70:30)	45-50	F45-49	Tv1/13	0,026	0,32
Hex:CHCl <sub>3</sub> (50:50)	51-57	F50-51	Tv1/14	0,0438	0,54
		F52-54	Tv1/15	0,677	8,47
		F55-56	Tv1/16	1,0496	13,12
		F57-58	Tv1/17	0,8445	10,55
CHCl <sub>3</sub> 100	58-64	F59-61	Tv1/18	0,4625	5,78
		F62-64	Tv1/19	0,2043	2,55
		F65-68	Tv1/20	0,191	2,38

\* Rendimiento reportado respecto al extracto crudo

#### IV.1.1 FRACCIONAMIENTO SECUNDARIO DE LA FRACCIÓN Tv10

Considerando los resultados de la actividad antimicobacteriana de las fracciones primarias, se procedió a realizar el fraccionamiento secundario de la fracción primaria activa Tv10 en CC-FN. Para ello se sembraron 1.135 g de muestra en 40.503 g silica gel y de igual forma que en el fraccionamiento anterior se utilizó como fase móvil Hex, CHCl<sub>3</sub>, MeOH y mezcla de estos en grado creciente de polaridad. De este proceso se obtuvieron 58 fracciones de 50 mL c/u, las cuales se agruparon en 18 grupos (10A-10Q) por su similitud en ccf. Los sistemas empleados y el rendimiento de este proceso se describen en la Tabla 8.

Tabla 8. Fraccionamiento secundario de la fracción activa Tv10

Sistema de elusión (%)	Fracciones		Clave final	Peso de la fracción (g)	*Rendimiento (%)
	Obtenidas	Reunidas			
Hex (100)	1-52	F1-2	10 <sup>a</sup>	0.0502	4.52
		F3-5	10B	0.0007	0.064
		F6-8	10C	0.002	0.1830
		F9-12	10D	0.0003	0.027
		F13-19	10E	0.0004	0.0366
		F20-26	10D	0.005	0.4575
		F27-28	10G	0.1198	10.9627
		F31-34	10H	0.1355	20.8597
		F35-37	10J	0.2279	9.0684
		F38-40	10K	0.0991	7.5219
		F41-45	10L	0.0822	9.5168
		F46	10M	0.1040	3.0197
		F47	10N	0.0330	0.1372
		F48-52	10Ñ	0.0015	0.2654
Hex: CHCl <sub>3</sub> (70:30)	53-54	F53-54	10 <sup>o</sup>	0.0029	2.3334
CHCl <sub>3</sub> MeOH (50:50)	55-58	F55	10P	0.0255	3.5505
		F56-58	10Q	0.0388	0.5490

\* Rendimiento reportado respecto al extracto crudo

En las fracciones secundarias 10G-10L (de consistencia aceitosa) se detectó la presencia de compuestos mayoritarios, que al realizarle ccf en sistema de elusión Hex: CHCl<sub>3</sub> (1:1) y utilizando como agente revelador H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (aq) al 10%, se observó que correspondía a la mezcla de timol/carvacrol presentando el mismo R<sub>f</sub> que los estándares comerciales. Para corroborar la presencia de ambos compuestos se realizó una ccf en forma bidimensional empleando como sistema de elusión Tol: AcOEt (95:5) y como agente revelador H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> etanólico al 5% y Vainillina etanólica al 1% (Wagner *et al.*, 1984). Dado que se trataba de una mezcla de compuestos, se realizó un proceso de cristalización en frío con par de disolventes (mezcla de Hex: MeOH 1:1), de donde se obtuvieron cristales de color blanco con p.f. 47 °C que corresponde al timol (Reportado 49°C, Merck & CO, 1989) y un aceite de color café, solubles en CHCl<sub>3</sub> y MeOH y poco solubles en Hex. Una muestra de cristales y de aceite (residuo) se envió a análisis de RMN-<sup>1</sup>H y CG-EM, respectivamente.

## IV.1.2 FRACCIONAMIENTO SECUNDARIO DE LA FRACCION Tv8

De manera adicional se realizó el fraccionamiento secundario de Tv8 en CC-FN con la finalidad de obtener el compuesto mayoritario presente en esta fracción, para ello se sembraron 4.4 g en 26 g de silica. De este proceso se obtuvieron 13 grupos de fracciones (8a-8l), de diferente grado de polaridad. Los resultados del fraccionamiento secundario se describen en la Tabla 9.

Tabla 9. Fraccionamiento secundario de la fracción primaria Tv8.

Sistema de Elusión (%)	Fracciones		Clave final	Peso de la fracción	*Rendimiento (%)
	Obtenidas	Reunidas			
Hexano 100	1-7	F1-5	8a	0,0022	1,096
		F6-12	8b	0,0041	1,95
Hex:CHCl <sub>3</sub> (95:5)	8-30	F13-15	8c	0,0018	0,855
		F16	8d	0,0034	1,62
		F17	8c	0,007	3,33
		F18	8f	0,0191	9,08
		F19	8f	0,0126	5,99
		F20-22	8g	0,0186	8,84
		F23-25	8h	0,0336	15,98
		F26	8i	0,0183	8,7
Hex:CHCl <sub>3</sub> (75:25)	31-33	F27-31	8j	0,0414	19,69
Hex:CHCl <sub>3</sub> (50:50)	34-36	F32-35	8k	0,0346	13,45
		F36-37	8 l	0,0136	6,47

\* Rendimiento reportado respecto al extracto crudo

En las fracciones secundarias 8i y 8j se detectó la presencia de un compuesto mayoritario que fue purificado mediante ccf de tipo preparativa; para ello se utilizaron tres placas de vidrio recubiertas con gel sílice con un espesor de 0.25 mm (sílica gel F2<sub>54</sub> Merck) y como sistema de elusión una mezcla de Hex: CHCl<sub>3</sub> (8:2). El compuesto se desadsorbio con CHCl<sub>3</sub> y se envió a análisis de CG-EM. El fraccionamiento del extracto hexánico (TvI), así como los compuestos obtenidos en cada una de las fracciones se muestra en el diagrama 2. Finalmente cabe mencionar que en las fracciones primarias TvI/12-TvI/15 se detecto la presencia de una mezcla que al aparecer corresponde a la mezcla de ácido ursólico y ácido oleanólico pero en muy pequeñas cantidades.

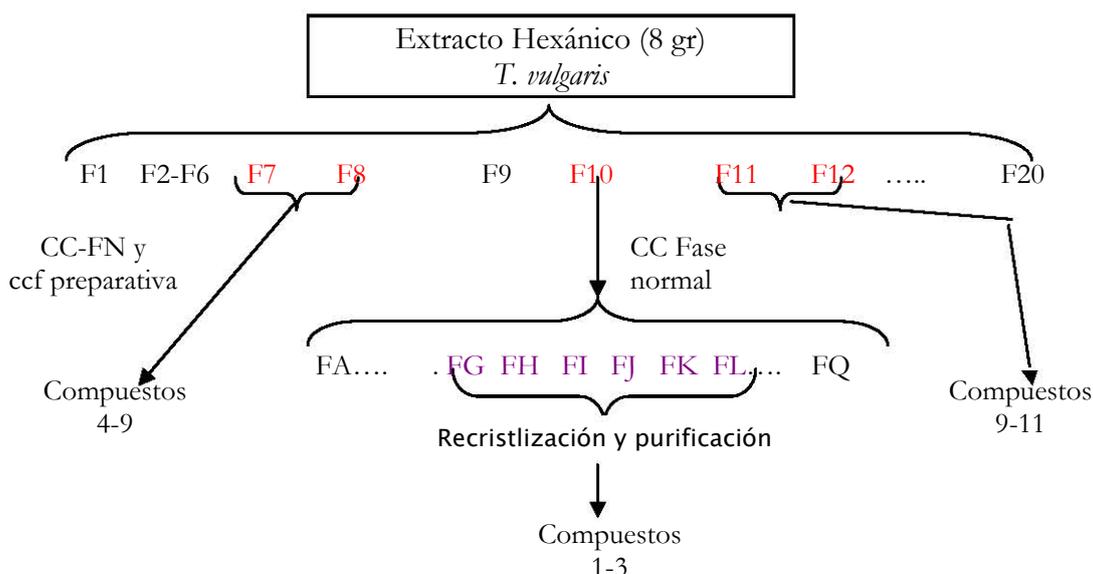


Diagrama 1. Fraccionamiento primario del extracto hexánico de *Thymus vulgaris*

## IV.2 EXTRACTO METANÓLICO

Con la finalidad de comparar la composición del extracto metanólico con el hexánico (previamente estudiado), se realizó una ccf para conocer el perfil de los compuestos presentes en este extracto; para ello se empleó como sistema de elusión  $\text{CHCl}_3$  (100 %), y como agente revelador  $\text{H}_2\text{SO}_4$  al 10%. Mediante este proceso se pudo determinar *a priori* que el extracto contenía la mezcla de timol/carvacrol y otros compuestos mayoritarios que al parecer corresponden a la mezcla de ácido ursólico/ácido oleanólico. Estos compuestos fueron detectados por comparación con estándares previamente aislados en otras especies medicinales investigadas por nuestro grupo.

Con la finalidad de aislar los compuestos presentes en este extracto se realizó el fraccionamiento primario de 20 g de extracto en CC-FN empacada con 384 g de silica gel 60, y como fase móvil se utilizó Hex,  $\text{CHCl}_3$ , MeOH y mezcla de ellos en grado de polaridad creciente. Mediante este fraccionamiento se obtuvieron 34 grupos de fracciones que se reunieron de acuerdo a su perfil cromatográfico en ccf. Los sistemas de elusión empleados, fracciones obtenidas; así como el rendimiento y la clave final de estas se describen en la siguiente Tabla 10.

Tabla 10. Fraccionamiento primario del extracto metanólico de *T. vulgaris*.

Sistema de elusión (%)	Fracciones		Clave final	Peso de la fracción	*Rendimiento (%)
	Obtenidas	Reunidas			
Hexano 100	1-4	1	TvII/1	0,0235	0,1181
		2-4	TvII/2	0,1161	0,0809
Hex:CHCl <sub>3</sub> (90:10)	5-10	5-6	TvII/3	0,0097	0,0487
		7-9	TvII/4	0,0026	0,0131
		10-11	TvII/5	0,0036	0,0181
Hex:CHCl <sub>3</sub> (80:20)	11-15	12-13	TvII/6	0,6422	3,2273
		14-15	TvII/7	0,1946	0,9783
Hex:CHCl <sub>3</sub> (70:30)	15-19	16-17	TvII/8	0,772	3,8813
		18-19	TvII/9	0,695	3,4942
Hex:CHCl <sub>3</sub> (60:40)	20-24	20	TvII/10	0,1315	0,6611
		21-22	TvII/11	0,0684	0,3439
		23-24	TvII/12	0,1142	0,5742
Hex:CHCl <sub>3</sub> (50:50)	25-36	25-38	TvII/13	0,3721	1,8708
		29-30	TvII/14	0,0364	0,183
		31-33	TvII/15	0,0208	0,1046
		34-35	TvII/16	0,0129	0,0649
CHCl <sub>3</sub> :Hex (60:40)	37-47	36-38	TvII/17	0,0193	0,097
		39-41	TvII/18	0,2063	1,0372
		42-45	TvII/19	0,0523	0,2629
CHCl <sub>3</sub> :Hex (75:25)	48-50	46-49	TvII/20	0,0337	0,1694
CHCl <sub>3</sub> :Hex (90:10)	51-54	50-51	TvII/21	0,0591	0,297
CHCl <sub>3</sub> 100%	55-62	52-55	TvII/22	0,1015	0,5103
		56-59	TvII/23	0,1582	0,7954
		60-62	TvII/24	1,0935	5,4992
CHCl <sub>3</sub> :MeOH (90:10)	63-69	63	TvII/25	3,2885	16,5334
		64-65	TvII/26	0,6832	3,4349
		66	TvII/27	0,176	0,8849
		67-69	TvII/28	0,5462	2,7461
CHCl <sub>3</sub> :MeOH (70:30)	70-71	70	TvII/29	2,1092	10,6043
		71	TvII/30	1,9691	9,8999
CHCl <sub>3</sub> :MeOH (50:50)	72-73	72	TvII/31	2,6153	13,1488
		73	TvII/32	2,1242	10,6797
MeOH (100)	74-75	74	TvII/33	1,4633	7,3569
		75	TvII/34	0,48	2,4329

Rendimiento reportado a partir del extracto crudo.

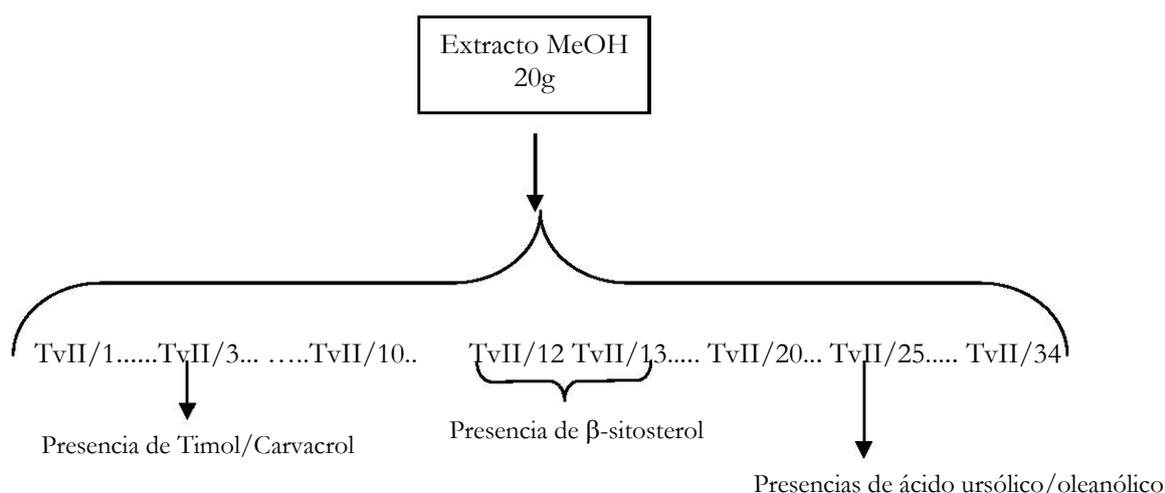


Diagrama 2. Fraccionamiento químico del extracto metanólico de *T. vulgaris*.

En la fracción primaria TVII/13 se obtuvieron cantidades adicionales de la mezcla timol/carvacrol que fueron purificados mediante proceso de recrystalización por par de disolventes. En las fracciones TVII/12 y TvII/13 se detectó la presencia de  $\beta$ -sitosterol al realizarle ccf con una muestra de referencia. En las fracciones TVII/25-26 eluidas con una mezcla de  $\text{CHCl}_3$ : MeOH (9:1) se detectó la presencia de la mezcla de ácidos triterpénicos (ác. ursólico/ác. oleanólico). Estos triterpenos se separaron mediante un proceso de partición ácido base y de cristalización. Para ello se utilizó un gramo de la fracción secundaria (TvII/25) que se lavó con mezcla  $\text{CHCl}_3$ /NaOH 10%, colocándose en agitación con la finalidad de quitar la mayor parte de las clorofilas. Una vez realizado esto, se separaron las fases; la fase acuosa se extrajo con éter etílico  $[(\text{Et})_2\text{O}]$  mediante agitación y nuevamente se separaron las fases. La fase orgánica se deja en reposo a temperatura ambiente hasta la formación de un precipitado que se filtra a través de un embudo de fibra de vidrio. El precipitado se recupera con  $\text{CHCl}_3$  y es recrystalizado en metanol frío. La fase acuosa se sigue lavando con  $(\text{Et})_2\text{O}$  hasta extraer todo el compuesto de interés. Cada una de las fases se monitorea en ccf, con estándares empleando como sistema de elución  $\text{CHCl}_3$ :  $(\text{Et})_2\text{O}$  (9:1) y utilizando como agente revelador  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (aq) al 10%.

En fracciones de mayor polaridad (TvII/29 y TvII/30) se detectó la presencia de flavonoides que al realizar ccf con estándares comerciales (camferol, catequina, epicatequina y quercetina) se observó que no corresponde a ninguno de ellas. Por lo que estas fracciones serán objeto de estudio posterior con la finalidad de aislar e identificar estos compuestos.

## ♣ RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 1. Actividad Biológica e Identificación de Compuestos Aislados

Los extractos hexánico y metanólico preparados vía maceración mostraron una CMI de 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  contra *M. tuberculosis* H37Rv (Tabla 10) al evaluarlos por el método MABA. El fraccionamiento químico en CC-FN del extracto hexánico permitió obtener 20 grupos de fracciones. Algunas de las fracciones primarias fueron evaluadas por el método MABA contra *M. tuberculosis* H37Rv, los resultados de esta evaluación se describen en la Tabla 11.

Cabe mencionar que como primer paso se realizó la evaluación de las fracciones primarias complejas y mayoritarias. Las que resultaron activas fueron de la TvI/9 a TvI/12 cuya CMI fue 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , mientras que el resto de las fracciones resultaron inactivas (CMI  $>200$   $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

Tabla 11. Resultados de la evaluación antimicobacteriana de extractos y fracciones primarias del extracto hexánico de *T. vulgaris*, y compuestos identificados en dichas fracciones.

Fracción	CMI* ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	Compuesto
Tv1	50	
Tv2	50	
TvI/1-TvI/4	$>200$	
TvI/5	$>200$	
TvI /6	---ND---	
TvI/7	$>200$	
TvI/8	50	4-9
TvI /9	100	
TvI/10	100	1-3
TvI /11	100	9-11
TvI /12	100	
TvI/13- TvI/20	$>200$	

Tomando como control positivo Rifampicina 0.062 $\mu\text{g}/\text{mL}$

\*Concentración Mínima Inhibitoria contra *M. tuberculosis* H37Rv; ND: No determinado

La fracción activa TvI/10 (1.13 g) fue objeto de una CC-FN de donde se obtuvieron 18 grupos de fracciones secundarias (10A-10-Q) (ver tabla 7, sección de metodología). Las fracciones 10 H y 10P presentaron compuestos mayoritarios por lo que se sometieron a evaluación contra *M.tuberculosis* H37Rv y contra trece aislados clínicos. La fracción 10H resultó inactiva contra la cepas de referencia (H37Rv) y contra ocho aislados clínicos, mostrando una CMI  $>100$   $\mu\text{g}/\text{mL}$  y

presentó una moderada actividad contra cinco aislados clínicos (CMI de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). La fracción secundaria 10P resultó inactiva contra la cepa de referencia y contra todos los aislados clínicos. Los resultados se describen en la Tabla 12.

En las fracciones 10G a 10J incluyendo la fracción 10H (que fue evaluada) se detectó la presencia de compuestos mayoritarios y que al realizarle ccf comparativa con estándares comerciales de timol y carvacrol se observó que presentaba el mismo  $R_f$  que el timol y carvacrol. Además estaban presentes compuestos minoritarios que fueron aislados y purificados.

Tabla 12. Evaluación antimicobacteriana de las fracciones secundarias de fracción TvI/10 de *T. vulgaris*

Cepas	CMI( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	
	Fracción 10H	Fracción 10P
H37Rv	>100	>100
MTY611	100	>100
MTY616	>100	>100
MTY652	100	>100
MTY687	100	>100
MTY172	>100	>100
MTY559	>100	>100
MTY650	100	>100
MTY675	>100	>100
MTY282	>100	>100
MTY234	>100	>100
MTY112	>100	>100
MTY99	100	>100
MTY663	>100	>100

\*Concentración Mínima Inhibitoria contra *M. tuberculosis* H37Rv y aislados clínicos MDR de *M. tuberculosis*.

### 1.1 Identificación de compuestos en la fracción Tv10

La purificación de los compuestos mayoritarios se realizó por un proceso de recristalización por par de disolventes (hexano: metanol frío). La identificación del timol y carvacrol se realizó por comparación con el  $R_f$  de estándares comerciales en ccf bidimensional (Figura 3, revelando la placa con la mezcla de vainillina/etanólica (5%) y  $\text{H}_2\text{SO}_4$ /etanólico (1%) y también por el análisis de los espectros de RMN- $^1\text{H}$  de cada compuesto. Para ello se trabajaron 448.1 mg de 10G-10J de los cuales se obtuvieron 68.6 mg de timol (1) con p.f. 47°C (Reportado

49°C, Merck & CO), soluble en  $\text{CHCl}_3$ ,  $(\text{Et})_2\text{O}$  y MeOH y 50.7 mg de carvacrol (2), este compuesto se obtuvo en forma de aceite de color café claro, soluble en cloroformo y metanol.

El espectro de RMN- $^1\text{H}$  de este compuesto presenta tres señales simples en  $\delta$  1.24,  $\delta$  1.22 y  $\delta$  2.26 que integra cada uno para 3 protones y fueron asignados a los dos metilos del gem dimetilo y al metilo de tipo aromático. En  $\delta$  3.15 se observa un hepteto que fue asignado al metino alifático base del gem dimetilo, y las señales para metinos aromático se observan en  $\delta$  6.55,  $\delta$  6.72 (dd) y  $\delta$  7.07 (Espectro 1) y cada señal integra para un protón. Con estos datos se pudo determinar que la estructura correspondía al timol (2) (Silverstein *et al.*, 1981).

En la fracción hexánica; residuo del proceso de recristalización, se observó la presencia de compuestos minoritarios en ccf uno de ellos presentaba el mismo Rf que el timol, por lo que estas muestras fueron enviadas un análisis de CG-EM (cromatograma 1), en el cromatograma se detectó la presencia del carvacrol (2) con TR de 7.53 min y la mezcla E y Z-fitol (3a, 3b) con TR de 17.07 y 17.32 min, respectivamente. Además, en el cromatograma se observa un compuesto adicional con TR de 17.18 min y PM de 294 que corresponde al ester metílico del ácido linoleico (8a). La identificación de estos compuestos se realizó por comparación de su patrón de fragmentación con lo descrito en la biblioteca Pub/Nist del espectrómetro de masas; de manera adicional la presencia de estos compuestos se detectó al realizar una ccf comparativa con el estándar de fitol aislados de *Aristolochia elegans* (León, 2005) y el estándar comercial de timol y carvacrol.

Cabe mencionar que la separación de la mezcla de timol/carcacrol fue complicada debido a la similitud estructural, en el caso de este trabajo la separación se realizó por proceso de recristalización y la identificación se determinó por análisis de sus datos de RMN- $^1\text{H}$  y CG-EM, además de su Rf en ccf al utilizar como agente revelador la mezcla vainillina/etanólica (5%) y  $\text{H}_2\text{SO}_4$ /etanólico (1%). En el caso del timol se observa un mancha de color rosa, con Rf de 0.55 y el carvacrol presenta una mancha de color morado tenue, con el mismo valor de Rf. Este dato se corroboró al utilizar estándares comerciales.

## 1.2. Identificación de los compuestos en la fracción Tv8

Al realizar el fraccionamiento secundario en CC-FN de la fracción primaria TvI/8, se obtuvieron 13 grupos de fracciones; en las fracciones secundarias 8h, 8i y 8j se observaba la presencia de un compuesto mayoritario. Estas fracciones (60 mg) fueron objeto de ccf de tipo preparativa utilizando tres placas preparativas de sílica gel lográndose obtener 18.61 mg, los cuales

fueron enviados a análisis de CG-EM (cromatograma 2). En el cromatograma se observa la presencia del compuesto mayoritario que correspondió al  $\alpha$ -amirina con PM de 440 y TR de 19.63 (4), además se observaron otros compuestos minoritarios que fueron identificados como estigmasterol (5) cuyo TR 19.13 min y PM de 412, el 9-icosino (6) cuyo TR es de 14.48 min y PM de 280, ácido hexadecanoico (7) con TR 11.58 min y PM de 256 y ácido linoléico (8b) con TR 12.52 min y PM de 280 y el  $\beta$ -sitosterol (9) con TR 20.13 min y PM de 414. En la Tabla 13 se muestran las estructuras de los compuestos detectados en la fracción TvI/10 y TvI/8.

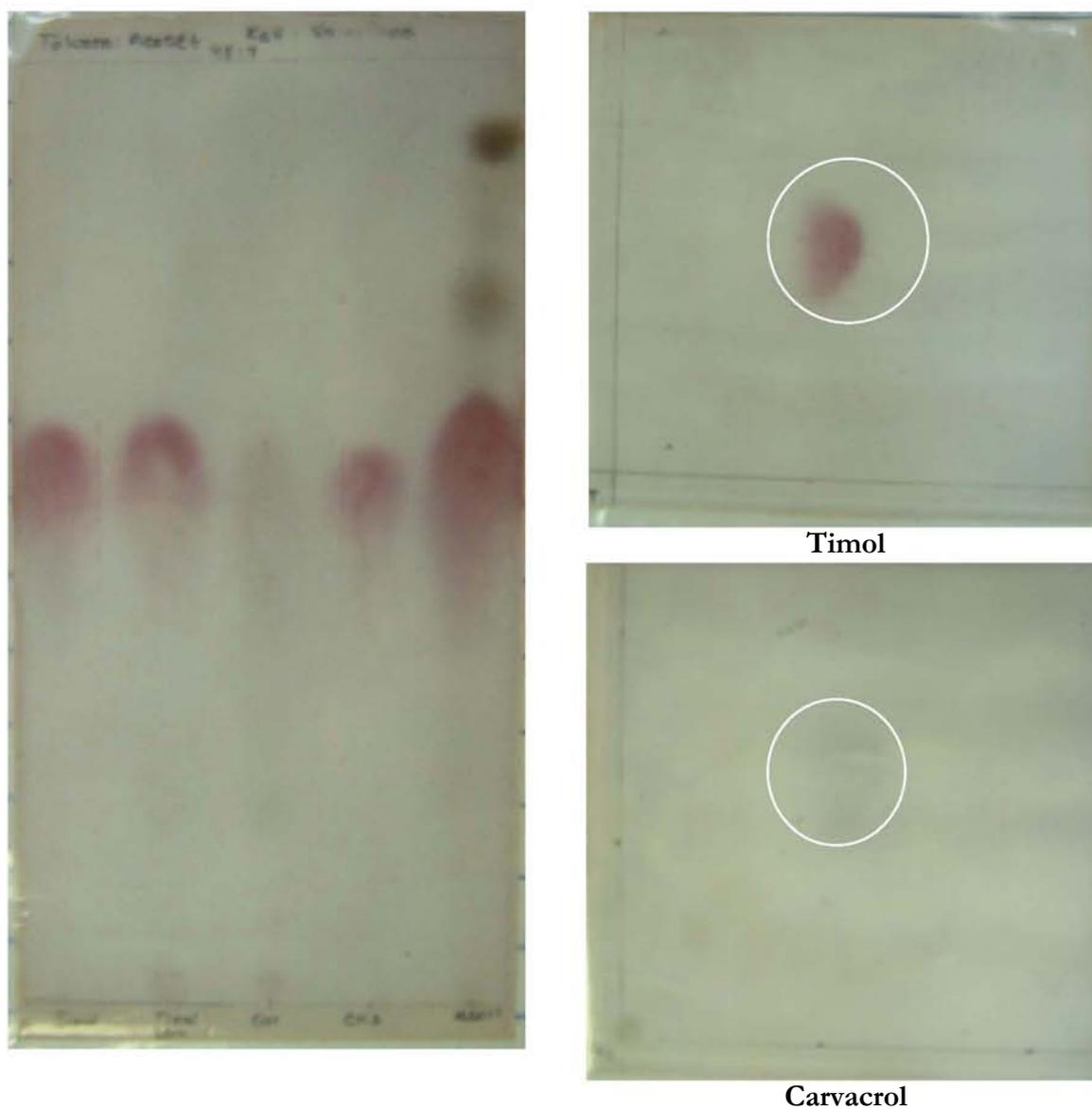
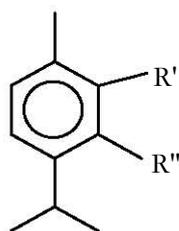
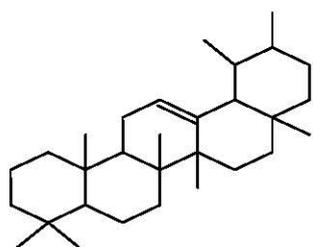
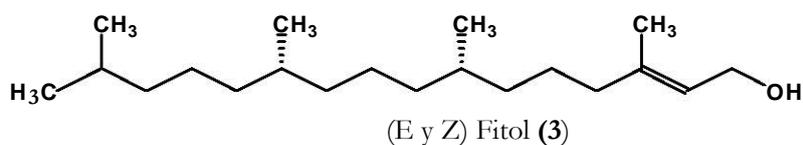


Figura 3. ccf de los compuestos mayoritarios de las fracciones 10H-10P con la mezcla: vainillina etanólica/  $H_2SO_4$  etanólico

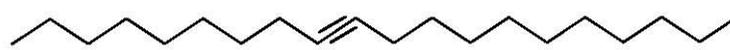
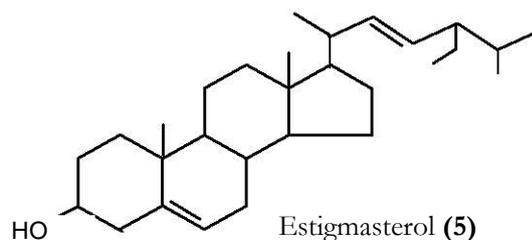
Tabla 13. Estructura de los compuestos aislados en el extracto hexánico de *Thymus vulgaris*.



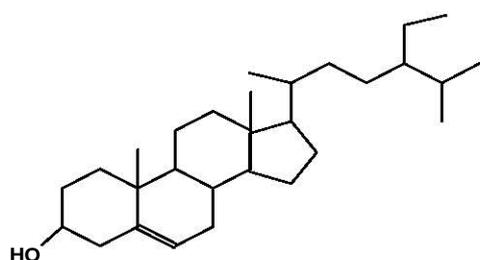
R' = H R'' = OH TIMOL (1)  
 R' = OH R'' = H CARVACROL (2)



$\alpha$ -amirina (4)



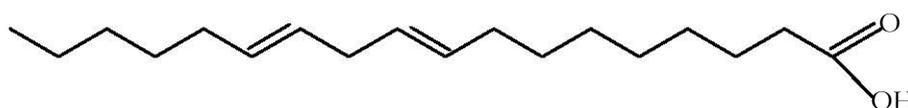
9-icosino (6)



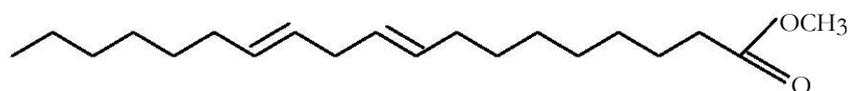
$\beta$ -sitosterol (9)



Ácido linoleico



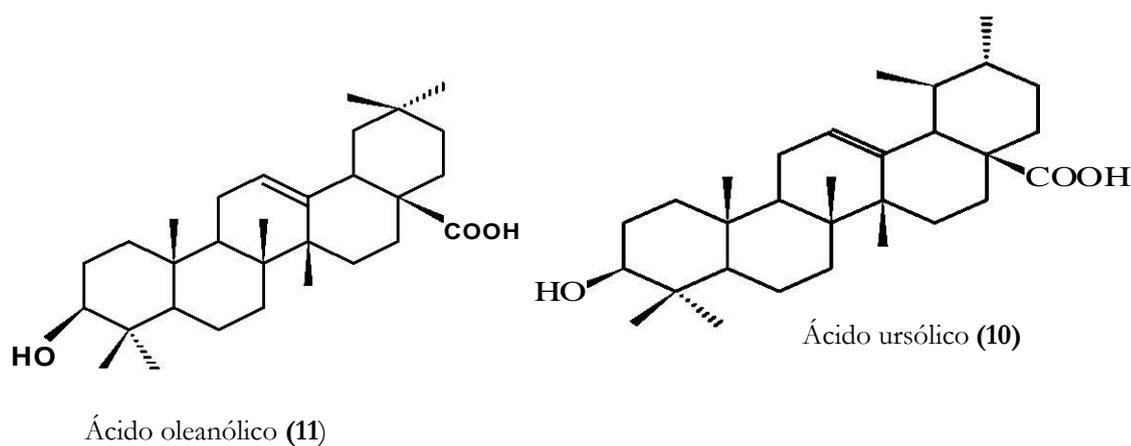
Ácido hexadecanoico (7)



Ester metílico del ácido linoleico (8b)

Al realizar ccf comparativa del extracto hexánico y metanólico se observó que presentaban compuestos similares, por lo que se procedió a realizar una CC-FN; mediante este proceso de obtuvieron 34 grupos de fracciones primarias de diferente grado de polaridad. En las fracciones primarias TVII/6 a TVII/11 está presente la mezcla de timol/carvacrol (1-2) como compuestos mayoritarios y, en TvII/12 y TvII/13 está presente el  $\beta$ -sitosterol (9). La presencia de este compuesto se detectó por comparación del Rf con una muestra auténtica empleando como sistema de elución  $\text{CHCl}_3$  100%. Por último, en las fracciones primarias TvII/25 a TvII/27 está presente la mezcla de ácido ursólico(10) y ácido oleanólico (11), estos compuestos se detectan por comparación en ccf con muestras auténticas empleando como sistema de elución  $\text{CHCl}_3$ : MeOH (9:1). La mezcla de estos compuestos se separaron y purificaron mediante un proceso de partición ácido/base y por recristalización, proceso que permitió obtener 60 mg de cristales en forma de agujas de color crema, soluble en  $\text{CHCl}_3$ , MeOH,  $(\text{Et})_2\text{O}$ ; 20 mg de esta mezcla se enviaron para su análisis de RMN- $^1\text{H}$ . En el espectro se observan señales típicas para triterpenos (Espectro 2). Las estructuras de los compuestos detectados, ácido ursólico/oleanólico se presentan en la Tabla 14.

Tabla 14. Estructuras de los ácidos ursólico/oleanólico



Respecto a los resultados de la evaluación de la actividad antimicobacteriana de los compuestos puros, estos se describen en la Tabla 15.

Tabla 15. Actividad antimicobacteriana de compuestos puros.

Cepas		CMI* ( $\mu\text{g/mL}$ )			
<i>M. tuberculosis</i>	Mezcla de timol/carvacrol (1 y 2)	Fitol (3)	Acido oleanólico (10)	Acido ursólico (11)	Mezcla Au/Ao
H37Rv	>100	25	12.5	12.5	12.5
MTY611	100	12.5	-	-	
MTY616	>100	12.5	-	-	
MTY652	100	6.25	-	-	
MTY687	100	12.5	50	50	50
MTY172	>100	25	-	-	
MTY559	>100	12.5	-	-	
MTY650	100	12.5	50	50	
MTY675	>100	12.5	50	50	
MTY282	>100	12.5	50	50	
MTY234	>100	12.5	100	50	
MTY112	>100	25	100	100	
MTY99	100	12.5	100	50	
MTY663	>100	12.5	-	-	

Respecto a las actividades biológicas para la mezcla de timol/carvacrol se ha descrito que estos compuestos son responsables de diversas actividades como: antibacteriano, antifúngico, antioxidante, antiinflamatorio, antiespasmódico y favorece el metabolismo de xenobióticos (Salehi *et al.*, 2005; Shin y Kim, 2005; Bagamboula *et al.*, 2001; Trombetta *et al.*, 2005; Agbor *et al.*, 2005; Proestos *et al.*, 2005; Sasaki *et al.*, 2005); antifúngica (Bhaskara-Reddy *et al.*, 1998; Giordani *et al.*, 2004); sin embargo, su efecto antimicobacteriano no se había descrito. Cabe señalar que la evaluación de estos compuestos mayoritarios en el presente trabajo permitió demostrar que estos no son los responsables del efecto antimicobacteriano observado en el extracto y en cambio presenta valores de  $CL_{50}$  de 295 ppm (Tabla 16).

El fitol es un diterpeno que se biosintetiza por la ruta acetato-mevalonato, y se ha reportado que inhibe el crecimiento de *M. tuberculosis* 37Rv (CMI = 2  $\mu\text{g/mL}$ ) al ser evaluado *in vitro* por el ensayo radiorespirométrico (Rajab *et al.*, 1998). Otras actividades biológicas que se le han demostrado a este compuesto es actividad contra *Staphylococcus aureus* (CMI = 0.15  $\mu\text{g/mL}$ )

(Inoue *et al.*, 2005) e impide la oviposición de *Liriomyza trifolii* (Kashiwagi *et al.*, 2005). En este trabajo se encontró que presenta una CMI de 25 µg/mL para *M. tuberculosis* H37Rv al ser evaluado por el método MABA y resultó más activo para las cepas MFR; cabe destacar que este es el primer trabajo que explora el efecto antimicobacteriano de los compuestos sobre cepas MFR.

En relación a los esteroides encontrados en el extracto hexánico, a la fecha se ha reportado que el β-sitosterol presentó un efecto adyuvante en pacientes con TB (Donald *et al.*, 1997), pero no mostró un efecto antimicobacteriano *in vitro* (Jiménez *et al.*, 2005). Respecto a la actividad biológica del estigmasterol, otro de los compuestos identificados, se reporta que la ingesta rica en fitoesteroides (β-sitosterol, estigmasterol, campesterol) y otros esteroides así como lignanos y flavonoides reduce el riesgo para el desarrollo de cáncer de próstata (McCann *et al.*, 2005); además la presencia de fitoesteroides en la dieta regula el nivel de colesterol en plasma disminuyendo notablemente el peligro para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares, también disminuye el nivel de lípidos de baja densidad (LDL) (Ho y Pal, 2005; Bouic, 2001) pero no inhibe el crecimiento de *M. tuberculosis in vitro*. Estos esteroides presentan actividad sobre el sistema inmunológico, que a la fecha no se le ha dado importancia (Bouic, 2001).

Otro compuesto presente en la especie medicinal *T. vulgaris* es el ácido linoleico, este compuesto fue previamente aislado de las especies *Pelagonium reniforme*, *P. sidoides*, *Papaver somniferum*, *Bupleurum chinense*, y otras especies vegetales, y se ha descrito que este compuesto es el responsable del efecto antimicobacteriano observado en *Pelagonium reniforme*, *P. sidoides*, (presentando una CMI de 2 µg/mL) contra *M. aurum* (Seidel y Taylor, 2004, Li *et al.*, 2005; Krist *et al.*, 2005). Otros compuestos aislados de la especie *T. vulgaris* durante el desarrollo de este trabajo fue la mezcla de dos ácidos triterpénicos: ácidos ursólico/ácido oleanólico. Ambos compuestos han sido aislados de diferentes especies medicinales como *Thymus brussanetti*, *T. satureioides*, *T. wilddenowii* (Ismaili *et al.*, 2001, 2002, 2004) y en numerosas especies medicinales (Gu *et al.*, 2004, Li *et al.*, 2003; Gua *et al.*, 2004, Cantrell *et al.*, 2001; Goren *et al.*, 2005; Abe *et al.*, 2002; Liu, 1995 y 2005). Respecto a su actividad biológica estos triterpenos presentan importante actividad antiinflamatoria *in vitro* (Liu, 1995; Kang *et al.*, 2005; Fu *et al.*, 2005; Miceli *et al.*, 2005; Shin *et al.*, 2004, Ismaili *et al.*, 2001 y 2004, Díaz *et al.*, 2000; Deepak y Handa, 2000; Ovesná *et al.*, 2004), son inhibidores selectivos de COX-2 con una  $CI_{50} = 130 \mu M$  y una relación COX-2/COX-1 de 0.6 µM (Ringbom *et al.*, 1998), actividad antimicrobiana (Gua *et al.*, 2004; Isobe *et al.*, 1989), citotóxica (Ríos *et al.*, 2001; Tapondjou *et al.*, 2002; Baglin *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2002; Chang *et al.*, 2004), actividad hepatoprotectora, inhiben la iniciación y promoción de tumores, presentan actividad

antihiperlipidémica, antiulcerogénica, hipoglucémica, anticariogénica (Liu, 1995; Kang *et al.*, 2005; Ovesná *et al.*, 2004); recientemente se ha reportado su efecto antimicrobacteriano *in vitro* cuya CMI es de 30 y 15  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para el ácido oleanólico y ácido ursólico, respectivamente (Cantrell *et al.*, 2001; Gu *et al.*, 2004; Watcher *et al.*, 1999, Jiménez *et al.*, 2005). Este trabajo es el primero que describe la presencia de estos ácidos triterpénicos en *Thymus vulgaris*.

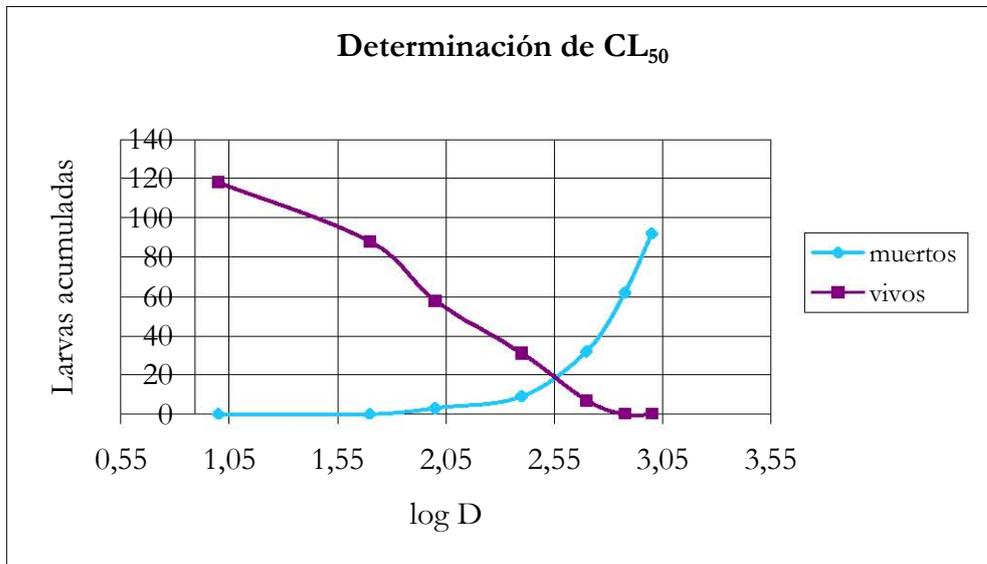
## 2. Determinación de la $\text{CL}_{50}$ en *Artemia salina*.

Empleando el modelo de Reed-Muench se calculó la  $\text{CL}_{50}$  para el extracto hexánico, metanólico, la mezcla de timol/carvacrol y para la mezcla de ácido ursólico/oleanólico. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 16 y en las Gráficas 1-3. De las muestras evaluadas, la más tóxica fue el extracto hexánico y la mezcla de timol/carvacrol; le sigue en toxicidad el extracto metanólico y, la mezcla de compuestos ácidos ursólico/oleanólico no presentó toxicidad alguna a la máxima concentración evaluada ( $>1000$  ppm). Este trabajo es el primero que describe el efecto tóxico contra *A. salina* de la mezcla de triterpenos y los resultados encontrados indicaron que no resultaron tóxicos a la máxima concentración evaluada. La  $\text{CL}_{50}$  para el timol ha sido previamente reportado (Wah, 1993). Cabe señalar que este ensayo biológico es sencillo, rápido y nos permite determinar en forma preliminar el efecto anticancerígeno, antihelmintico y antipaludico de compuestos de origen natural (Mata y Rivero, 2000).

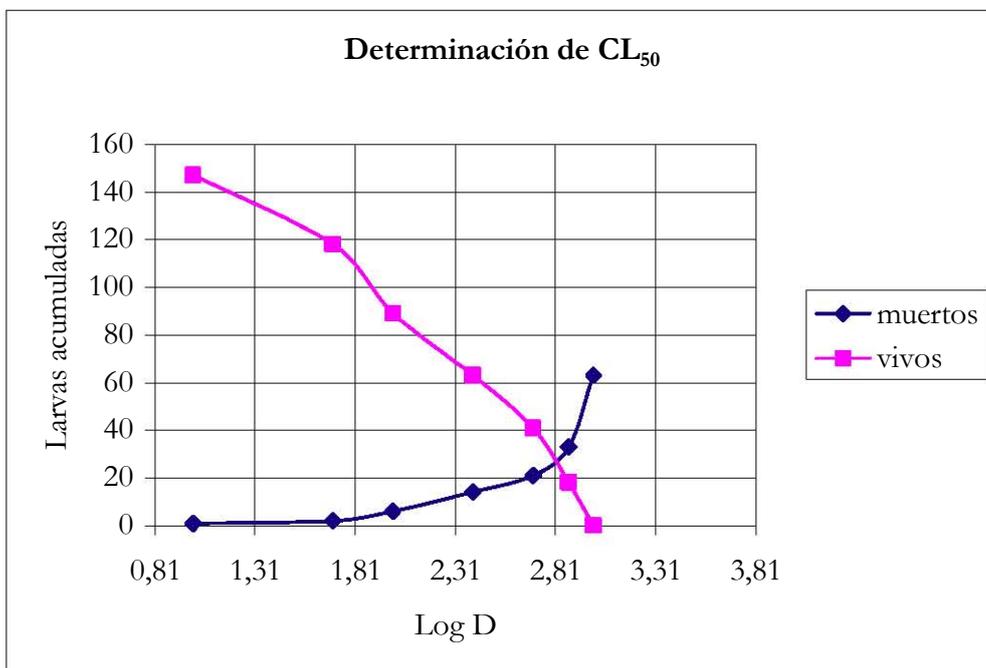
Tabla 16. Datos de  $\text{CL}_{50}$  para los extractos y mezcla de compuesto de *Thymus vulgaris*.

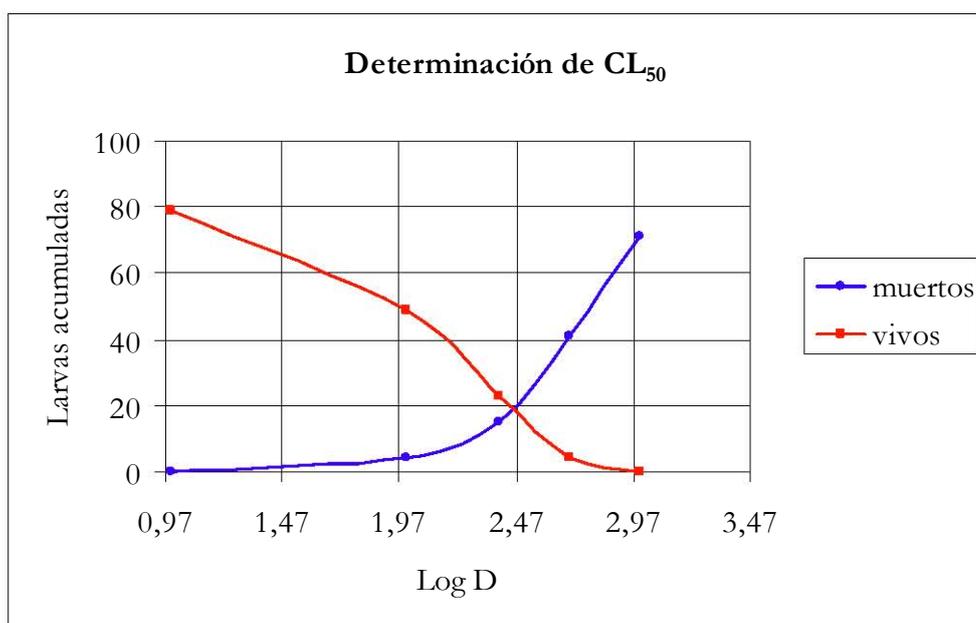
Muestras	$\text{CL}_{50}$ (ppm)
TvI	354.81
TvII	645.54
Mezcla timol/carvacrol	295.12
Mezcla ácido ursólico/oleanólico	$>1000$

Gráfica 1. Determinación de la  $CL_{50}$  para el extracto hexánico de *T. vulgaris* (TvI)



Gráfica 2. Determinación de la  $CL_{50}$  para el extracto metanólico de *T. vulgaris* (TvII).



Gráfica 3. Determinación de la  $CL_{50}$  para la mezcla timol/carvacrol.

### 3. Determinación de la $DL_{50}$ en ratones Balb/C.

La  $DL_{50}$  se determinó en ratones Balb/C empleando el método de Lorke (1983). Este método recomienda una primera evaluación de las muestras a concentraciones menores de 1000mg/Kg pero en el caso de este trabajo se decidió evaluar las muestras en el rango de 1000-5000mg/Kg y en caso de que las muestras resultaran tóxicas a 1000mg/Kg se probaría en concentraciones menores. El rango de concentración evaluada fue de 1000 a 5000 mg/Kg de peso y la administración de los extractos fue vía intragástrica, previa solubilización de cada extracto en la mezcla de Tween 20/H<sub>2</sub>O (3:7). Tanto el extracto hexánico y metanólico a la máxima concentración evaluada (5000 mg/kg), no provocaron muerte alguna, por lo que los animales de experimentación se mantuvieron en observación durante 14 días. Transcurrido este tiempo se procedió a sacrificarlos vía dislocación cervical y se observaron macroscópicamente los órganos principales (hígado, riñón, bazo, intestinos y corazón) donde se observó que ningún órgano resultó dañado, por lo que se puede concluir que ambos extractos no presentan toxicidad aguda. Falta por determinar la toxicidad subcrónica y crónica *in vivo* de los extractos, mezcla de timol/carvacrol y de ácido ursólico/ácido oleanólico.

## ♣ CONCLUSIONES

1. La especie medicinal *Thymus vulgaris* biosintetiza compuestos capaces de inhibir el crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, por lo que puede constituir una fuente potencial de sustancias antimicobacterianas.
2. Los compuestos responsables del efecto antimicobacteriano *in vitro* fueron aislados e identificados químicamente en base al análisis de sus datos espectroscópicos y espectrométricos, que no corresponden a los compuestos mayoritarios.
3. Los estudios de toxicidad contra el crustáceo *Artemia salina* permite determinar que la mezcla de timol/carvacrol presenta una  $CL_{50}$  de 250 ppm y que la mezcla de ácido ursólico/ácido oleanólico no resulto tóxico contra este crustáceo a la máxima concentración evaluada.
4. La dosis letal media para los extractos hexánico y metanólico fue mayor de 5000 mg/kg, este dato indica que ambos extractos no muestran toxicidad aguda.
5. La investigación química-biológica de las plantas usadas en la medicina tradicional en México para tratar padecimientos relacionados con la TB, constituye un buen punto de partida para la obtención de compuestos activos capaces de inhibir el crecimiento de *M. tuberculosis* o de compuestos que coadyuven y/o acorten el tratamiento de la enfermedad.
6. Dado el problema que representa la TB en los sistemas de salud, la OMS tiene como objetivo erradicar la enfermedad mediante el desarrollo de vacunas y de nuevos agentes antituberculosos. Este trabajo contribuye a explorar el potencial antimicobacteriano de la flora medicinal mexicana.
7. Consideramos que el efecto antimicobacteriano mostrado por los extractos hexánico y metanólico de *T. vulgaris* se debe a la presencia de la mezcla de metabolitos secundarios como el fitol, ácido linoléico y la mezcla de ácido ursólico/ácido oleanólico.

## ♣ BIBLIOGRAFIA

- 📖 Abe F., Yamauchi T., Nagao T., Kinjo J., Okabe H., Higo H., Akahane H. Ursolic acid as a trypanocidal constituent in rosemary. *Biol Pharm Bull.* 2002; 25: 1485-7.
- 📖 Agbor GA., Oben JE., Ngogang JY., Xinxing C., Vinson JA. Antioxidant capacity of some herbs/spices from cameroon: a comparative study of two methods. *J Agric Food Chem.* 2005; 53: 6819-24.
- 📖 Aguilar A., Camacho JR., Chino S. Herbario Medicinal del Instituto Mexicano del Seguro Social. Información etnobotánica. IMSS. México. 1994. ix-xv, 111.
- 📖 Amaya-Tapia G., Martín-del-Campo L., Aguirre-Avalos G., Portillo-Gómez L., Covarrubias-Pinedo A., Aguilar-Benavides S. Primary and Acquired Resistance of *Mycobacterium tuberculosis* in Western Mexico. *Microbial Drug Resistance.* 2000; 6: 143-145.
- 📖 Anderson JE., Goetz CM., Mc Laughlin J & Suffness, M. A blind comparison of simple bech-top bioassays and human tumor cell cytotoxicities as tumor prescreens. *Phytochemistry Anal.* 1991; 2: 107-111.
- 📖 Argueta A., Cano LM., Rodarte ME. Atlas de las plantas de la Medicina Tradicional III. Instituto Nacional Indigenista. Biblioteca de la Medicina Tradicional Mexicana. México; 1994: 1352-1353 pp.
- 📖 Astudillo A., Hong E., Bye R., Navarrete A. Antispasmodic activity of extracts and compounds of *Acalypha phleoides* Cav. *Phytother Res.* 2004; 18: 102-106.
- 📖 Aydin S., Başaran A., Başaran N. The effects of thyme volatiles on the induction of DNA damage by the heterocyclic amine IQ and mitomycin C. *Genetic Toxicol Environmental Mutagenesis.* 2005; 581: 43-53.
- 📖 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 Mexico. *Salud Publica Mex.* 2003; 45: 78-83.
- 📖 Bagamboula CF., Uyttendaele M., Debevere J. Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and *p*-cymene towards *Shigella sonnei* and *S. Flexneri*. *Food Microbiol.* 2004; 21: 33-42.
- 📖 Baglin I., Poumaroux A., Nour M., Tan K., Mitaine-Offer AC., Lacaille-Dubois MA., Chauffert B., Cave C. New ursolic and betulinic derivatives as potential cytotoxic agents. *J Enzyme Inhib Med Chem.* 2003; 18: 111-117.
- 📖 Baladrin 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; 1-12 pp.
- 📖 Balunas MJ, Kinghorn AD. Drug discovery from medicinal plants. *Life Science* 2005; 78:431-441.
- 📖 Bhaskara-Reddy MV., Angers P., Gosselin A., Arul J. Characterization and use of essential oil from *Thymus vulgaris* against *Botrytis cinerea* and *Rhizopus stolonifer* in strawberry fruits. *Phytochemistry.* 1998; 47 : 1515-1520.
- 📖 "Basic Facts on TB; Stop TB, fight poverty", the Stop TB Partnership, 24 de Marzo 2002. Fondo Mundial de lucha contra el SIDA, la tuberculosis y la malaria.
- 📖 Bates I., Fenton C., Gruber J., Lallo D., Lara MA., Squire SB., Theobald S., Thomson R., Tolhurst R. Vulnerability to malaria, tuberculosis, and HIV/SIDA infection and disease. Part 1: determinants operating at individual and household level. *Lancet Infect Dis.* 2004; 4: 267-277.
- 📖 Bouic PJ. The role of phytosterols and phytosterolins in immune modulation: a review of the past 10 years. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2001; 4: 471-475.

- ☞ Brightbill HD., Libraty DH., Krutzik SR., Yang RB., Belisle JT., Bleharski JR., Maitland M., Norgard MV., Plevy SE., Smale ST., Brennan PJ., Bloom BR., Godowski PJ., Modlin RL. Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. *Science*. 1999; 285: 732-736.
- ☞ Brock TM., Martinko JM., Parker J. Brock, *Biología de los Microorganismos*. Ed. Prentice Hall. 8ª edición. España. 2000: 418, 821, 836, 734-735 pp.
- ☞ Brunentón J. *Farmacognosia, Fitoquímica Plantas Medicinales*. Ed. Acribia. S.A. Zaragoza, 2ª edición. España. 2001: 331, 488, 540 pp.
- ☞ Cantrell CL., Franzblau SG., Fisher NH. Antimycobacterial Plant Terpenoids. *Planta Med*. 2001; 67: 685-695.
- ☞ Collins L., Franzblau S. Microplate Alamar Blue Assay versus BACTEC 460 System for High-Throughput Screening of Compounds against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium*. *Antimicrob Agents Chem*. 1997; 41: 1004-1009.
- ☞ Copp BR. Antimycobacterial Natural Products. *Nat Prod Rep*. 2003; 20:535-557.
- ☞ Chaisson E., Slutkin G. AIDS COMMENTARY. Tuberculosis and Human Immunodeficiency Virus Infection. *J Infect Dis*. 1989; 159: 96-100.
- ☞ Chambers HF., Sande MA. Aminoglucosidos. Godman & Gilman. *Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica*. Godman, A.G. McGraw-Hill Interamericana. 9ª edición. México. 1999. 1175-1176 pp.
- ☞ Chang CI., Kuo CC., Chang JY., Kuo YH. Three new oleanane-type triterpenes from *Ludwigia octovalvis* with cytotoxic activity against two human cancer cell lines. *J Nat Prod*. 2004; 67: 91-93.
- ☞ Chorianopoulos N., Kalpoutzakis E., Aligiannis N., Mitaku S., Nychas G.J., Haroutounian SA. Essential oils *Satureja*, *Origanum*, and *Thymus* Species: Chemical Composition and Antibacterial Activities Against Foodborne Pathogens. *J Agric Food Chem*. 2004; 52: 8261-8267.
- ☞ Deepak M., Handa SS. Antiinflammatory activity and chemical composition of extracts of *Verbena officinalis*. *Phytother Res*. 2000; 14: 463-465.
- ☞ De-Riemer K., García-García L., Bobadilla-del-Valle M., Palacios-Martínez A., Small P., Osornio-Sifuentes J., Ponce-de-León A. Does DOTS work in population with drug-resistant tuberculosis? *The Lancet*. 2005; 365: 1239-1245.
- ☞ Díaz AM., Abad MJ., Fernández L., Recuero C., Villaescusa L., Silvan AM., Bermejo P. *In vitro* anti-inflammatory activity of iridoids and triterpenoid compounds isolated from *Phillyrea latifolia* L. *Biol Pharm Bull*. 2000; 23: 1307-1313.
- ☞ Díaz-Maroto MC., Díaz-Maroto Hidalgo IJ., Sánchez-Palomo E., Pérez-Coello MS. Volatile components and key odorants of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) and thyme (*Thymus vulgaris* L.) oil extracts obtained by simultaneous distillation-extraction and supercritical fluid extraction. *J Agric Food Chem*. 2005; 53: 5385-5389.
- ☞ Dirección General de Epidemiología. Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica. Vigilancia Epidemiológica en México. Casos por entidad federativa de Enfermedades Infecciosas del Aparato Respiratorio. Semana 52, 2003,11.
- ☞ Dirección General de Epidemiología. Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica. Vigilancia Epidemiológica en México. Casos por entidad federativa de Enfermedades Infecciosas del Aparato Respiratorio. Semana 52, 2004,12.

- ☞ Dirección General de Epidemiología. Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica. Vigilancia Epidemiológica en México. Casos por entidad federativa de Enfermedades Infecciosas del Aparato Respiratorio. Semana 45, 2005,13.
- ☞ Dirección General de Epidemiología/Sistema Unico de Información para la Vigilancia Epidemiológica/ SSA 2001-2004.
- ☞ Donald PR., Lamprecht JH., Freestone M., Albrecht CF., Bouic PJ., Kotze D., Van-Jaarsveld PP. A randomised placebo-controlled trial of the efficacy of  $\beta$ - sitosterol and its glucoside as adjuvants in the treatment of pulmonary tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis.* 1998; 2: 522-523.
- ☞ Dorman JD., Deans SG. Antimicrobial agents from plants antibacterial activity of plant volatile oils. *J Appl Microbiol.* 2000; 88: 308-316.
- ☞ Duke JA. CRC Handbook of Medicinal Herbs. Ed. CRC Press. 1ra Edición. Florida. 1985: 483 pp.
- ☞ Duke JA. CRC Handbook of Medicinal Herbs. Ed. CRC Press. 2da Edición. USA. 2002: 730-732 pp.
- ☞ Dye C., Sheele 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. *JAMA.* 1999; 282: 677-686.
- ☞ Eloff J. Which extractant should be used for the screening and isolation of antimicrobial components from plants? *J Ethnopharmacol.* 1998; 60: 1-8.
- ☞ Espinal M., Lazlo A., Simosen L., Boulahbal F., Kim S J., Reiner A., Hoffner S., Rieder H.L., Binkin N., Dye, C., Williams R., Raviglione M. Global trends in resistance to antituberculosis drugs. *N Engl J Med.* 2001; 344: 1294-1303.
- ☞ Essawi T., Srour M. Screening of some Palestinian medical plants for antibacterial activity. *J Ethnopharmacol.* 2000; 70: 343-349.
- ☞ Evans WC, Trease GE. *Farmacognosia*. Editorial. Interamericana McGraw- Hill. 13ª edición. México. 1991: 555-565 pp.
- ☞ Font-Quer P. *Plantas Medicinales. El dioscorides Renovado*. Ed. Labor, 1ra edición. Barcelona. 1961: 698-699 pp.
- ☞ Frieden T., Sterline T., Munsiff S., Watt C., Dye C. Tuberculosis. *The Lancet.* 2003; 362: 887-899.
- ☞ Fu L., Zhang S., Li N., Wang J., Zhao M., Sakai J., Hasegawa T., Mitsui T., Kataoka T., Oka S., Kiuchi M., Hirose K., Ando M. Three new triterpenes from *Nerium oleander* and biological activity of the isolated compounds. *J Nat Prod.* 2005; 68: 198-206.
- ☞ García-García MaL., Sifuentes-Osornio J., Jiménez-Corona Ma E., Ponce-de-León A., Jiménez-Corona A., Bobadilla-del-Valle M., Palacios-Martínez M., Canales G., Sanginés A., Jaramillo Y., Martínez-Gamboa A., Balandrano S., Valdepino-Gómez J., Small P. Resistencia de *Mycobacterium tuberculosis* a los antimicrobianos en Orizaba, Veracruz. Implicaciones para el Programa de Prevención y Control de la Tuberculosis. *Rev Invest Clín.* 2001; 53: 315-323.
- ☞ García-Sancho M. Respuesta Inmune a la infección por *Mycobacterium tuberculosis*. Una Revisión de la literatura. *Rev Inst Nal Enf Resp de Mex.* 2001; 14:114-128.
- ☞ Gerbach PV., Wyllie SG., Sarafi V. A new Histochemical Method for Localization of the Site of Monoterpene Phenol Accumulation in Plant Secretory Structures. *Annals of Botany.* 2001; 88: 521-525.

- Giordani R., Regli P., Kaloustian J., Mikail C., Abou L. Portugal H. Antifungal Effect of various essential oils against *Candida albicans*. Potentiation of antifungal action of amphotericin B by essential oil from *Thymus vulgaris*. *Phytother Res.* 2004; 18: 990-995.
- Goren AC, Zhou BN, Topcu G, Kokdil G, Kingston DG. DNA damaging activities of methanol extract of *Ajuga reptans* and iridoid glucoside reptoside. *Nat Prod Res.* 2005; 19: 457-60.
- Granich R., Balandrano S., Santaella A., Binkin N., Castro K., Marquez-Fiol A., Anzaldo G., Zarate M., Jaimez M., Velazquez-Monrroy O., Salazar L., Alvarez-Lucas C., Kuri P., Flisser A., Sanctos-Preciado J., Ruiz-Matus C., Tapia-Conyer R., Tappero J. Survey of Drug Resistance of *Mycobacterium tuberculosis* in 3 Mexican States, 1997. *Arch Intern Med.* 2000; 160: 639-644.
- Gu JQ, Wang Y, Franzblau SG, Montenegro G, Yang D, Timmermann BN. Antitubercular constituents of *Valeriana laxiflora*. *Planta Med.* 2004; 70: 509-514.
- Gua JQ., Wang Y., Franzblau SG., Montenegro G., Timmermann BN. Constituents of *Quinchamalium majus* with potential antitubercular activity. *Z Naturforsch [C].* 2004; 59: 797-802.
- Heinrich M., Lee Teoh H. Galanthamine from snowdrop-the development of modern drug against Alzheimer's disease from local Caucasian knowledge. *J Ethnopharmacol.* 2004; 92: 147-162.
- Hersch-Martinez P., Leañós-Miranda BE., Solórzano-Santos F. Antibacterial effects of commercial essential oils over locally prevalent pathogenic strains in Mexico. *Fitoterapia.* 2005; 76: 453-457.
- Ho SS., Pal S. Margarine phytosterols decrease the secretion of atherogenic lipoproteins from HepG2 liver and Caco2 intestinal cell. *Atherosclerosis.* 2005; 182: 29-36.
- Hudaib M., Speroni E., Di Pietra A., Carvrini V. GC/MS evaluation of thyme (*Thymus vulgaris* L.) oil composition and variations during the vegetative cycle. *J Pharma and Biomedical Anal.* 2002; 29: 691-700.
- Inoue Y., Hada T., Shiraiishi A., Hirose K., Hamashima H., Kobayashi S. Biphasic effects of geranylgeraniol, teprenone, and phytol on the growth of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005; 49:1770-1774.
- Ismaili H., Tortora S., Sosa S., Fkih-Tetouani S., Ilidrissi A., Della Loggia R., Tubaro A., Aquino R. Topical anti-inflammatory activity of *Thymus willdenowii*. *J Pharm Pharmacol.* 2001; 53: 1645-1652.
- Ismaili H., Sosa S., Brkic D., Fkih-Tetouani S., Ilidrissi A., Touati D., Aquino R.P., Tubaro A. Topical anti-inflammatory activity of extracts and compounds from *Thymus broussonetii*. *J Pharm Pharmacol.* 2002; 54: 1137-1140.
- Ismaili H., Milella L., Fkih-Tetouani S., Ilidrissi A., Camporese A., Sosa A., Altinier G., Della-Loggia R., Aquino R. *In vivo* topical anti-inflammatory and *in vitro* antioxidant activities of two extracts of *Thymus satureioides* leaves. *J Ethnopharmacol.* 2004; 91: 31-36.
- Isobe T., Noda Y., Ohsaki A., Sakanaka S., Kim M., Taniguchi M. Studies on the constituents of *Leucoseptum stellipillum*. *Yakugaku Zasshi.* 1989; 109:175-178
- Jawetz E., Melnick JL., Adelberg EA., Broks GF., Butel JS., Ornston LN. *Microbiología Médica de Jawetz, Melnick y Aldelberg.* Ed. El Manual Moderno, S.A de C.V. 15ª edición. México.1996; 323-331,863-870 pp.
- Jimenez-Arellanes A., Meckes M., Ramírez R., Torres J., Luna-Herrera J. Activity against multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Mexican plants used to treat respiratory diseases. *Phytother Res.* 2003; 17: 903-908.
- Jiménez-Arellanes A., Meckes M., Alvarez V., Torres J., Parra R. Secondary metabolites from *Chamaedora tepejilote* (Palmae) are active against *Mycobacterium tuberculosis*. *Phytother Res.* 2005; 19: 320-322.

- Jimenez-Martinez MC., Baez R., Linares M., Lascuraín, R., Zenteno E., Avances en el estudio de los mecanismos celulares de supresión de la Respuesta Inmunitaria en la Tuberculosis. *Rev Inst Nal Enf Mex.* 2001; 14: 39-48.
- Kang WY., Du ZZ., Yang XS., Hao XJ. A new triterpene from *Luculia pinciana* Hook. *J Asian Nat Prod Res.* 2005; 7: 91-4.
- Kanokmedhakul K., Phonkerd N., Soyong K., Kongsaree P., Suksamrarn A. Antimycobacterial anthraquinone-chromanone compound and diketopiperazine alkaloid from the fungus *Chaetomium globosum* KMITL-NO802. *Planta Med.* 2002; 68: 834-836.
- Karakousis PC., Bishai WR., Dorman SE. *Mycobacterium tuberculosis* cell envelope lipids and the host immune response. *Cellular Microbiol.* 2004; 6: 105-116.
- Kashiwagi T., Mikagi E., Mekuria DB., Tebayashi S., Kim CS. Ovipositional deterrent on mature stage of sweet pepper, *Capsicum annum*, against *Liriomyza trifolii* (Burguess). *Z. Naturforsch.* 2005; 60: 739-742.
- Kitajima J., Ishikawa T., Urabe A. A new Hydroxijasmone Glucoside and Its Related Compounds from the Leaf of Thyme. *Chem Pharm Bull.* 2004 (a): 1013-1014.
- Kitajima J., Ishikawa T., Urabe A., Satoh M. Monotepenoids and their glycosides from the leaf of thyme. *Phytochem.* 2004 (b): 3279-3287.
- Koga T., Fukuoka T., Doni N., Harasaki T., Inove H., Hotoda H., Dakota M., Muramatsu Y., Yamamura N., Hoshi M., Hirota. Activity of Capuramycin analogues against *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare* *in vitro* and *in vivo*. *J. Antimicrob Chemother.* 2004; 54: 755-760.
- Koneman EW., Allen SD., Janda WM., Schreckenberger PC., Winn WC. Koneman: Diagnóstico Microbiológico: Texto y Atlas a color. Ed. Panamericano. 5ª edición. Argentina. 1999: 867-914 pp.
- Köning G., Writhg A., Franzblau S. Assessment of antimycobacterial activity of series of mainly marine derived natural products. *Planta Med.* 2000; 66: 337-342.
- Krist S., Stuebiger G., Unterwer H., Bandion F., Buchbauer G. Analysis of volatile compounds and triglycerides of seed oil extracted from different poppy varieties (*Papaver somniferum* L.). *J Agric Food Chem.* 2005; 53: 8310-8316.
- Lall N., Meyer JJ. *In vitro* inhibition of drug-resistant and drug-sensitive strains of *Mycobacterium tuberculosis* by ethnobotanically selected South African plants. *J Ethnopharmacol.* 1999; 66: 347-354.
- Lee SJ., Umamo K., Shibamoto T., Lee K-G. Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties. *Food Chem.* 2005; 91: 131-137.
- León R. Potencial antimicobacteriano de dos especies medicinales del género *Aristolochia*. Tesis Maestría en Ciencias Biológicas (Biología Experimental). Facultad de Ciencias. UNAM. 2005.
- Li J., Guo WJ., Yang QY. Effects of ursolic acid and oleanolic acid on human colon carcinoma cell line HCT15. *World J Gastroenterol.* 2002; 8: 493-495.
- Li Y., Ishibashi M., Satake M., Chen X., Oshima Y., Ohizumi Y. Eremophilenolides and other constituents from the roots of *Ligularia sagitta*. *Planta Med.* 2003; 69: 356-60.
- Li XQ., Song AH., Li W., XH., Bi KS. Analisis of the fatty acid from *Bupleurum chinense* DC in China by GC-MS and GC-FID. *Chem Pharm Bull.* 2005; 53: 1613-1617.
- Liu J. Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. *J Ethnopharmacol.* 1995;49:57-68.
- Liu J. Oleanolic acid and ursolic acid: research perspectives. *J Ethnopharmacol.* 2005; 100: 92-94.

- 📖 Lorke D. A new approach to practical acute toxicity testing. *Arch Toxicol.* 1983; 54: 257-287.
- 📖 Lugo C. Actividad antibacteriana e inhibición de la propulsión intestinal inducida del extracto metanólico de *Thymus vulgaris* Linne (Lamiaceae). Tesis de Licenciatura, Químico Farmacéutico Biólogo. Facultad de Química. UNAM. 2005.
- 📖 Luna T. Estudio químico de dos especies medicinales con actividad antimicobacteriana. Tesis de Licenciatura, Química Farmacéutica Biólogo. Universidad del Valle de México (UVM), incorporado a la UNAM. 2005.
- 📖 Mandell G., William A.P. Fármacos usados en la quimioterapia de la tuberculosis, la enfermedad causada por el complejo *Mycobacterium avium* y la lepra. Godman & Gilman. Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica. Godman, A.G. McGraw-Hill Interamericana. 9ª edición. México. 1999:1225-1238 pp.
- 📖 Marsik P., Kokoska L., Landa P., Nepovim A., Soudek P., Vanek T. *In vitro* inhibitory effects of thymol and quinones of *Nigella sativa* seeds on cyclooxygenase-1- and -2-catalyzed prostaglandin E2 biosyntheses. *Planta Med.* 2005; 71: 739-742.
- 📖 Martins M., Ordway D., Kristiansen M., Viveiris M., Leandro C., Molnar J., Amaral L. Inhibition of the *Carpobrotus edulis* methanol extract on the growth of phagocytosed multidrug-resistant *Micobacterium tuberculosis* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Fitoterapia.* 2005; 76: 96-99.
- 📖 Mata R., Morales I., Pérez O., Rivero-Cruz I., Acevedo L., Enríquez-Mendoza I., Bye R., Franzblau S., Timmermann B. Antimycobacterial compounds from *Piper sanctus*. *J Nat Prod.* 2004; 67: 1961-1968.
- 📖 Mata R., Rivero-Cruz. Curso Teórico de Farmacognosia. Facultad de Química. UNAM. 2000
- 📖 Mc Cann SE., Ambrosone CB., Moysich KB., Brasure J., Marshall JR., Freudenheim JL., Wilkinson GS., Graham S. Intakes of selected nutrients, foods, and phytochemicals and prostate cancer risk in Western New York. *Nutr Cancer.* 2005; 53: 33-41.
- 📖 Merck & CO. The Merck Index An encyclopedia of Chemicals, Drug and Biologicals. 7ª edición E.U.A. 1989: 1879, 6788, 9337, 9801 pp.
- 📖 Miceli N., Taviano MF., Giuffrida D., Trovato A., Tzakou O., Galati EM. Anti-inflammatory activity of extract and fractions from *Nepeta sibthorpii* Benth. *J Ethnopharmacol.* 2005; 97: 261-266.
- 📖 Newton SM., Lau C., Wright CW. AS. A review of Antimycobacterial Natural Products. *Phytother Res.* 2000; 14: 303-322.
- 📖 Nickavar B., Mojab F., Dolat-Abadi R. Analysis of the essential oils of two *Thymus* species from Iran. *Food Chem.* 2005; 90: 609-611.
- 📖 Modificación a la Norma Oficial Mexicana. Nom-006-SSA2 1993, para la prevención y control de la tuberculosis en la atención primaria a la salud. Secretaría de Salud. Diario Oficial de la Federación Oct.31/2000.
- 📖 Nostro A., Blanco A., Cannatelli MA., Enea V., Flamini G., Morelli I., Roccaro AS., Alonzo V. Susceptibility of methicillin-resistant staphylococci to oregano essential oil, carvacrol and thymol. *FEMS Microbiol Letter.* 2004; 23:191-195.
- 📖 Organización Mundial de la Salud Ginebra. Estrategia de la OMS sobre la medicina tradicional 2002.
- 📖 Organización Panamericana de la Salud (OPS); Hoja Informativa 2004, Américas.
- 📖 Ovesná Z., Vachálková A., Horváthová K., Tóthová. Pentacycle triterpenoic acids: new chemoprotective compounds. *Neoplasma.* 2004; 51: 327-333.
- 📖 Panizzi L., Flamini G., Cioni P., Morelli I. Composition and antimicrobial properties of essential oils of four Mediterranean Lamiaceae. *J Ethnopharmacol.* 1993; 39:167-170.

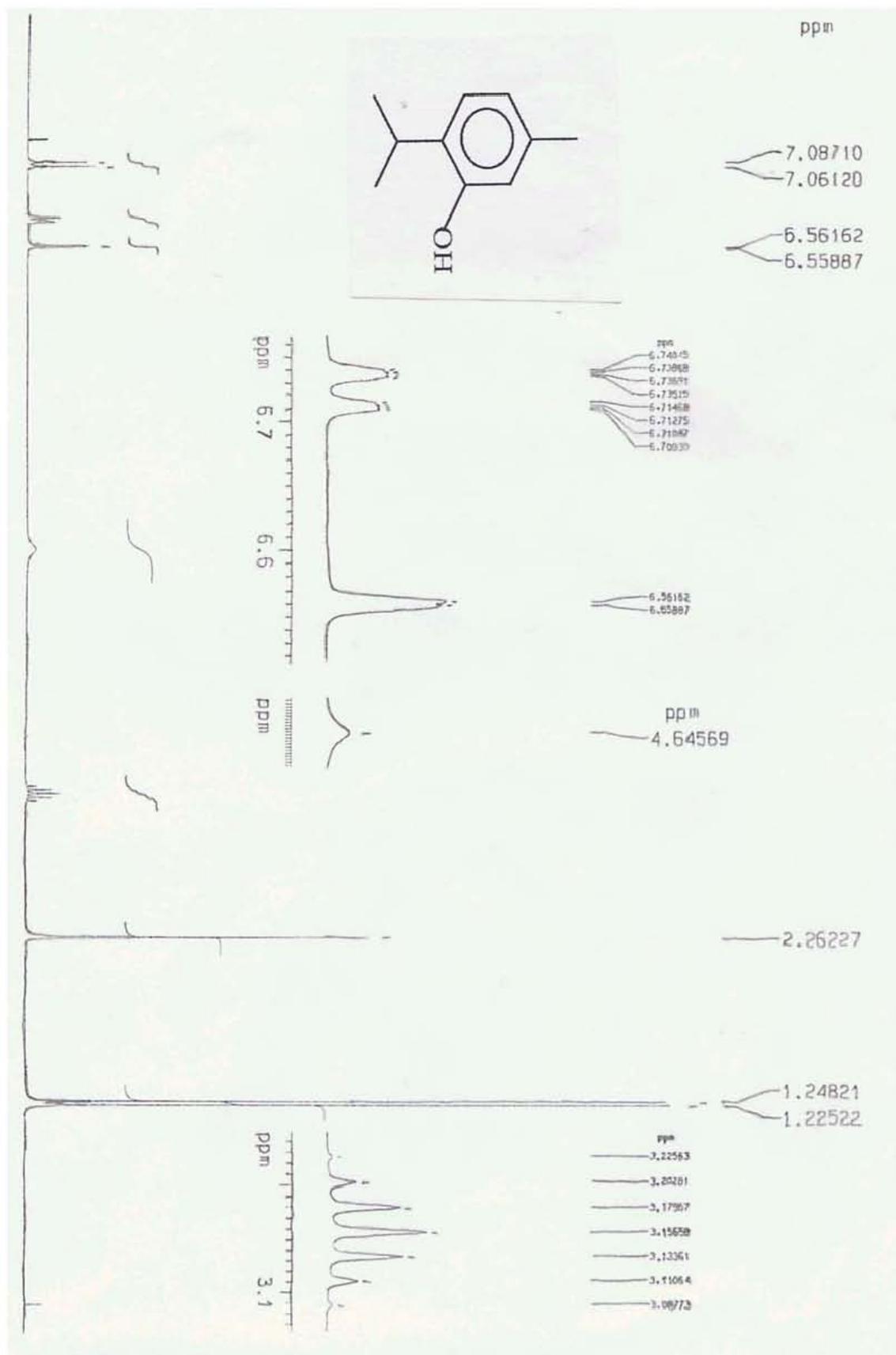
- 📖 Park BS., Choi WS., Kim JH., Lee SE. Monoterpenes from thyme (*Thymus vulgaris*) as potential mosquito repellents. *J AM Mosq Control Assoc.* 2005; 21: 80-83.
- 📖 Pauli G., Case R., Inui T., Wang Y., Ficher N., Franzblau Scott. New perspectives on natural products in TB drug research. *Life Sciences.* 2005; 78: 485-494.
- 📖 Phillipson J. Phytochemistry and medicinal plants. *Phytochemistry.* 2001; 56: 237-243.
- 📖 Phillipson J. New Drugs From Nature-It could be Yew. *Phytother Res.* 1999; 13:2-8.
- 📖 Ponce-de-León A., García-García ML., García-Sancho MC., Gómez-Pérez FJ., Valdespino-Gómez JL., Olaiz-Fernández G., Rojas R., Ferreira-Reyes L., Cano-Arellano B., Bobadilla M., Small PM., Sifuentes-Osornio J. Tuberculosis and diabetes in Southern Mexico. *Diabetes Care.* 2004; 27: 1584-1590.
- 📖 Proestos C., Choriantopoulos N., Nychas G-J., Komaitis M. RP-HPLC Analysis of the phenolic compounds of plant extracts. Investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity. *J Agric Food Chem.* 2005; 53: 1190-1195.
- 📖 Rajab MS., Cantrell CL., Franzblau SG., Fisher NH. Antimicrobial activity of (E)-phytol and derivatives: a preliminary structur-activity study. *Planta Med.* 1998; 64: 2-4.
- 📖 Raviglione M., Zinder D., Kooni A. Global Epidemiology of Tuberculosis. *JAMA.* 1995; 273: 220-226.
- 📖 Ringbom T., Segura L., Noreen Y., Perera P., Bohlin L. Ursolic acid from *Plantago major*, a selective inhibitor of cyclooxygenase-2 catalyzed prostaglandin biosynthesis. *J Nat Prod.* 1998; 61: 1212-1215.
- 📖 Rios MY., Gonzalez-Morales A., Villarreal ML. Sterols, triterpenes and biflavonoids of *Viburnum juncundum* and cytotoxic activity of ursolic acid. *Planta Med.* 2001; 67:683-4.
- 📖 Rivero-Cruz I., Acevedo L., Guerrero JA., Martínez S., Bye R., Pereda-Miranda R., Franzblau S., Timmermann BN., Mata R. Antimycobacterial agents from selected Mexican medicinal plants. *J Pharm Pharmacol.* 2005; 57: 1117-1126.
- 📖 Rodríguez-Carranza R. *Vademécum Académico de Medicamentos.* Ed. McGraw-Hill, 3ª edición. México. 1999:343, 348, 509, 773, 826 pp.
- 📖 Rojas A., Hernandez L., Pereda-Miranda R., Mata R. Screening for antimicrobial activity of crude drug extracts and pure natural products from Mexican medicinal plants. *J Ethnopharmacol.* 1992; 35: 275-283.
- 📖 Ruxin J., Paluzzi JE., Wilson PA., Tozan Y., Kruk M., Teklehaimanot A. Emerging consensus in HIV/AIDS, malaria, tuberculosis, and access to essential medicines. *Lancet.* 2005; 365: 618-620.
- 📖 Sada-Díaz E. La respuesta inmune en la tuberculosis. *Gac Med Mex.* 2003; 139: 481-483.
- 📖 Said S., Enciso J., Torres J., Castro J., Navarro L., Becerril P., Rojas M., Caballero G., Valdez 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. 1ª edición. México. 2000; 101-219 pp.
- 📖 Salazar-Lezama M. Tratamiento de la tuberculosis farmacoresistente. *Gac Med Mex.* 2003; 139: 487-490.
- 📖 Salehi P, Sonboli A, Eftekhari F, Nejad-Ebrahimi S, Yousefzadi M. Essential oil composition, antibacterial and antioxidant activity of the oil and various extracts of *Ziziphora clinopodioides* subsp. *rigida* (BOISS.) RECH. f. from Iran. *Biol Pharm Bull.* 2005; 28: 1892-1896.
- 📖 Sasaki K., Wada K., Tanaka Y., Yoshimura T., Matuoka K., Anno T. Thyme (*Thymus vulgaris* L.) leaves and its constituents increase the activities of xenobiotic-metabolizing enzymes in mouse liver. *J Med Food.* 2005 ; 8: 184-189.

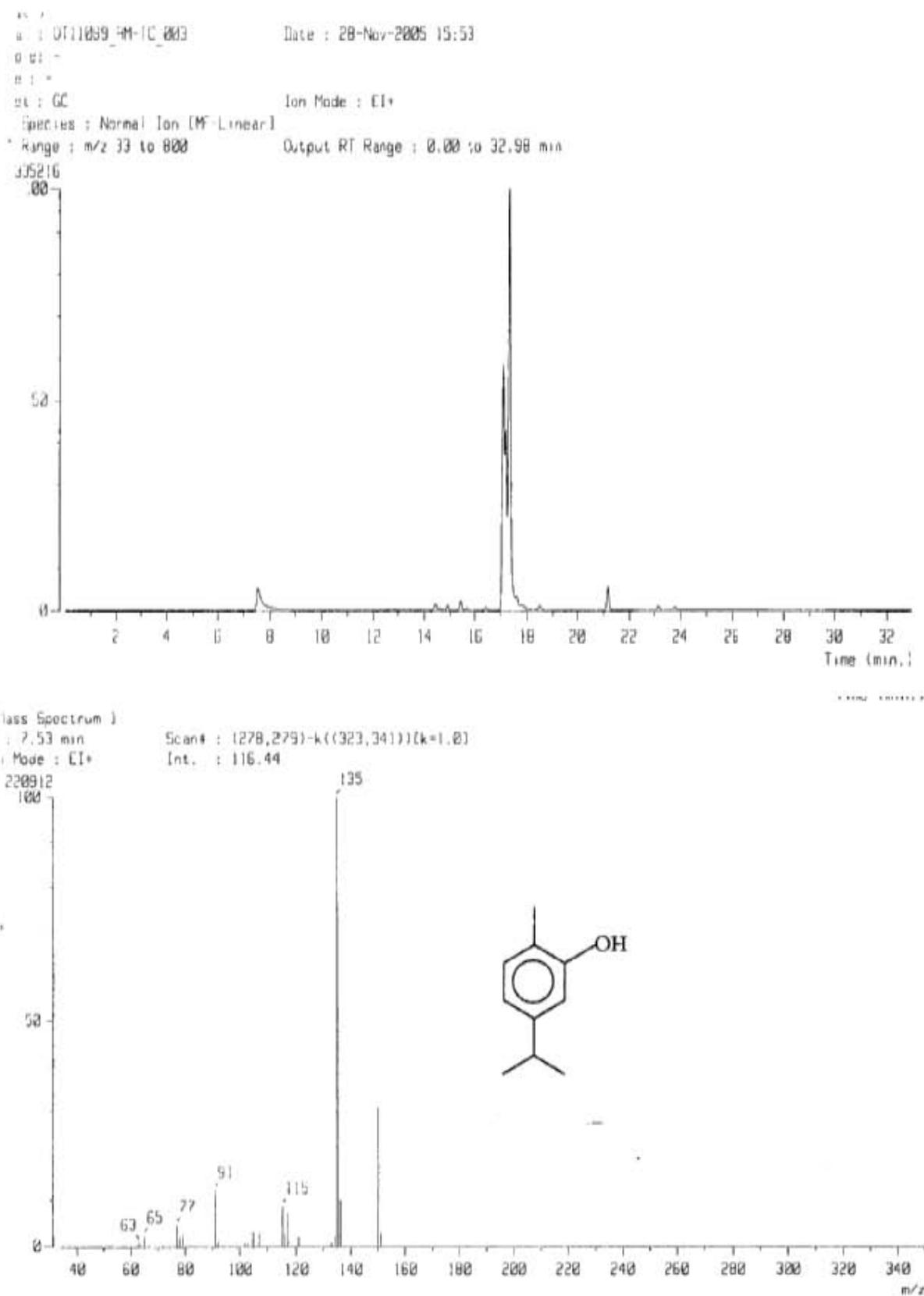
- Secretaría de Salud. Boletín Informativo. 2004
- Seephonkai P., Isaka M., Kittakoop P., Palittapongarnpim P., Kamchonwongpaisan S., Tanticharoen M., Thebtaranonth Y. Evaluation of antimycobacterial, antiplasmodial and cytotoxic activities of preussomerins isolated from the lichenicolous fungus *Microsphaeropsis* sp. BCC 3050. *Planta Med.* 2002; 68: 45-48.
- Seidel V., Taylor P.W. *In vitro* activity of extracts and constituents of *Pelagonium* against rapidly growing mycobacteria. *Int J Antimicrob Agents.* 2004; 23: 613-619.
- Shin S, Kim JH. *In vitro* inhibitory activities of essential oils from two Korean thymus species against antibiotic-resistant pathogens. *Arch Pharm Res.* 2005; 28: 897-901.
- Shin KM., Kim RK., Azefack TL., David L., Luc SB., Choudhary MI., Park HJ., Choi JW., Lee KT. *In vitro* anti-inflammatory activity of 23-hydroxyursolic acid isolated from *Cussonia banciensis* in murine macrophage RAW 264.7 cells. *Planta Med.* 2004; 70: 803-7.
- Siatis NG., Kimbaris AC., Pappas CS., Tarantilis PA., Daferera DJ., Polissiou MG. Rapid Method for Simultaneous Quantitative Determination of Four Major Essential Oil Components from Oregano (*Oreganum* sp.) and Thyme (*Thymus* sp) Using FT-Raman Spectroscopy. *J Agric Food Chem.* 2005; 53: 202-206.
- Sifuentes-Osornio J., García-García L., Small M., Bobadilla-del Valle M., Kato-Maeda M., Matus-Ruiz M., Martines-Gamboa A., Maldonado S., Méndez P., Palacios-Martínez M., Chávez-Mazari B., Ponce-de León A. Epidemiología de la resistencia antimicrobiana en *Mycobacterium tuberculosis* en México. *Gac Med Mex.* 2003; 139: 477-480.
- Silverstein R., Clayton-Bassler G., Morrill TC. Spectrometric Identification of organic compounds. Ed. John Wiley & Sons. 4ª edición. United States of American. 1981.181-205 pp.
- Tapondjou LA., Lontsi D., Sondengam BL., Choudhary MI., Park HJ., Choi J., Lee KT. Structure-activity relationship of triterpenoids isolated from *Mitragyna stipulosa* on cytotoxicity. *Arch Pharm Res.* 2002; 25: 270-274.
- Tortora GJ., Funke BR., Case CL. Introducción a la Microbiología. Ed. Acribia S.A. 3ª edición. España. 1993: 588-590 pp.
- Trombetta D., Castelli F., Sarpietro MG., Venuti V., Cristani M., Daniele C., Saija A., Mazzanti G., Bisignano G. Mechanisms of Antibacterial Action of Three Monoterpenes. *Antimicrob Agents Chem.* 2005; 49: 2474-2478.
- “Tuberculosis and children” , The Stop TB Partnership, 24 Marzo 2002. Fondo Mundial de Lucha contra el SIDA, la tuberculosis y la malaria.
- Van Den Broucke C., Dommissie RA., Esmans EL., Lemli, J. Three Methylated Flavones from *Thymus vulgaris*. *Phytochem.* 1982; 21:2581-2583.
- Villalba-Caloca J. Tuberculosis: un problema de actualidad, *Gac Med Mex.* 2003; 139:471-492.
- Wächter GA., Valcic S., Flagg ML., Franzblau SG., Montenegro G., Suarez E., Timmermann BN. Antitubercular activity of pentacyclic triterpenoids from plants of Argentina and Chile. *Phytomed.* 1999; 6: 341-345.
- Wagner M., Blatt S., Zgainski E.M. Plant Drug Analysis. A thin layer Chromatography Atlas. Translated by Scott. Ed. Springer-verlag. 1ª edición. New Cork. 1983: 40 pp.
- Wang M., Kikazaki H., Lin C., Kahyaoglu A., Huang M-T., Nakatani N, Ho C-T. Acetophenone Glycosides from Thyme (*Thymus vulgaris* L.). *J Agric Food Chem.* 1999; 47: 1911-1914.
- Wah ST. Toxicity Testing using the brine shrimp: *Artemia salina*. Bioactive Natural Products. Detection, isolation and Structural Determination. Colgate SM., Molyneux RJ. CRC Press. USA. 1993: 441-456 pp.

- 📖 Woldemichael GM., Gutierrez-Lugo MT., Franzblau SG., Wang Y., Suarez E., Timmermann BN. *Mycobacterium tuberculosis* Growth Inhibition by Constituents of *Sapium haemetospermum*. J Nat Products. 2004; 67: 598-603.
- 📖 Wolinsky E. Mycobacterium. Tratado de Microbiología con Inclusión de Inmunología y genética molecular. Davi's BD. Salvat editores S.A. España. 3ra edición; 1984: 589-604 pp.
- 📖 World Health Organization (2004) Report on the Tuberculosis. Infection and transmission. World health Organization. Geneva, Switzerland.
- 📖 Yamamoto J., Yamada K., Naemura A., Yamashita T., Arai R. Testing various herbs for antithrombotic effect. Nutrition. 2005; 21: 580-587.
- 📖 Yanishlieva N., Marinova E., Gordon M., Raneva V. Antioxidant activity and mechanism of action of thymol and carvacrol in two lipid system. Food Chem. 1999; 64: 59-66.

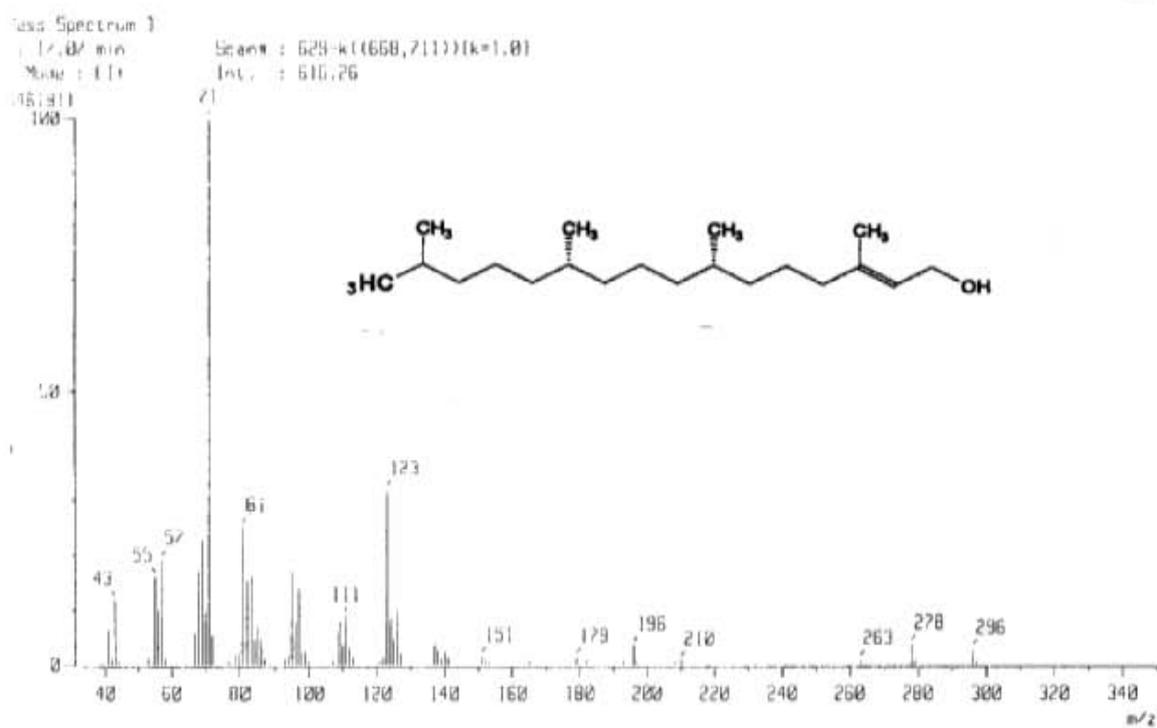
## ANEXO I.

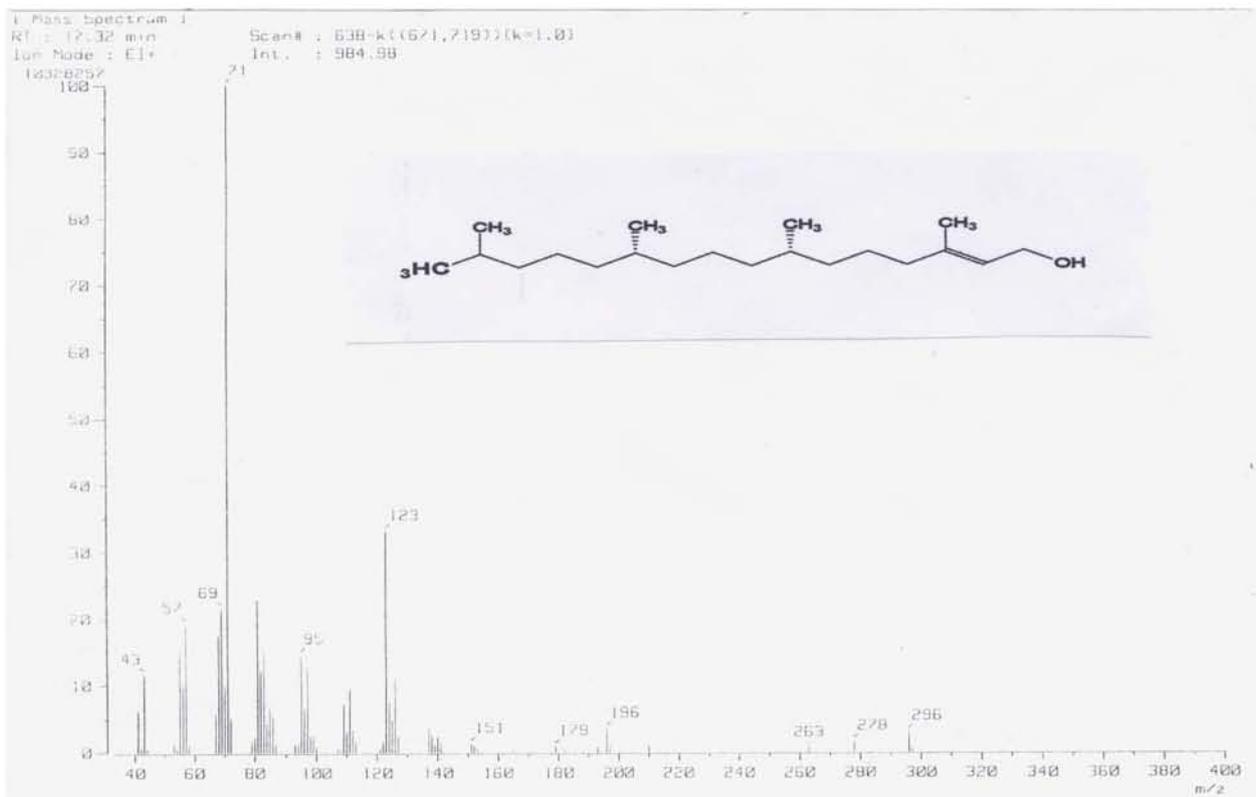
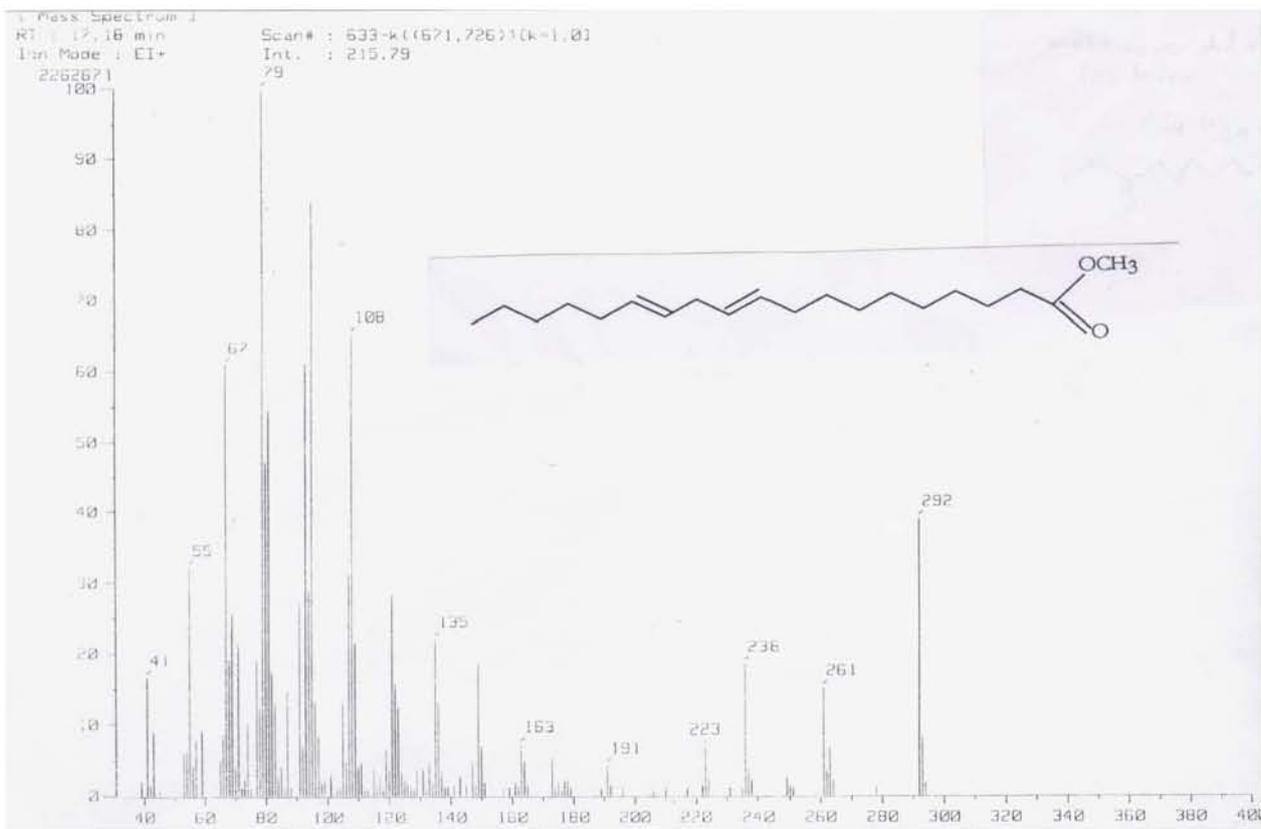
# ESPECTROS Y CROMATOGRAMAS

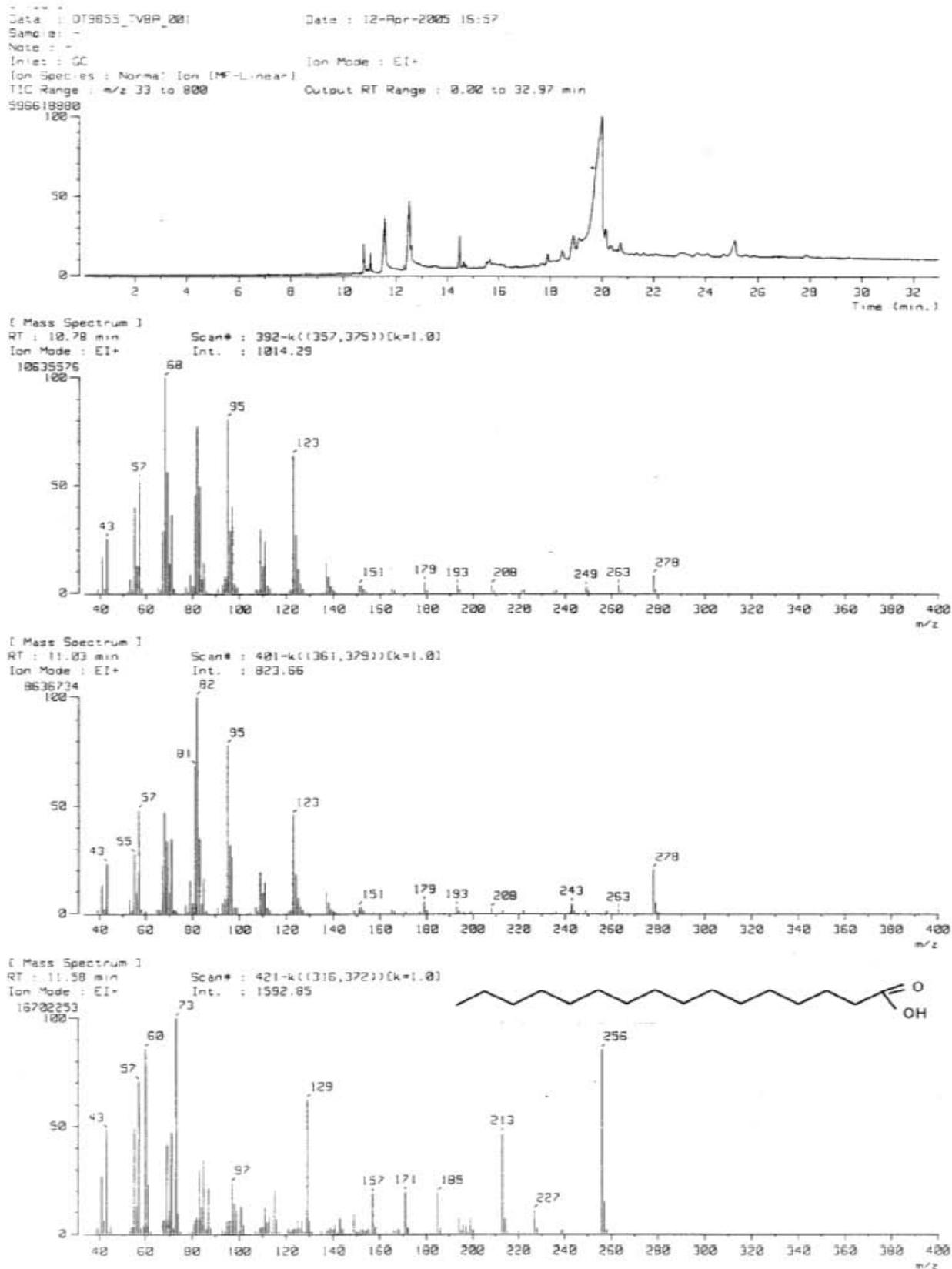
Espectro 1. Espectro de RMN- $^1\text{H}$  del timol



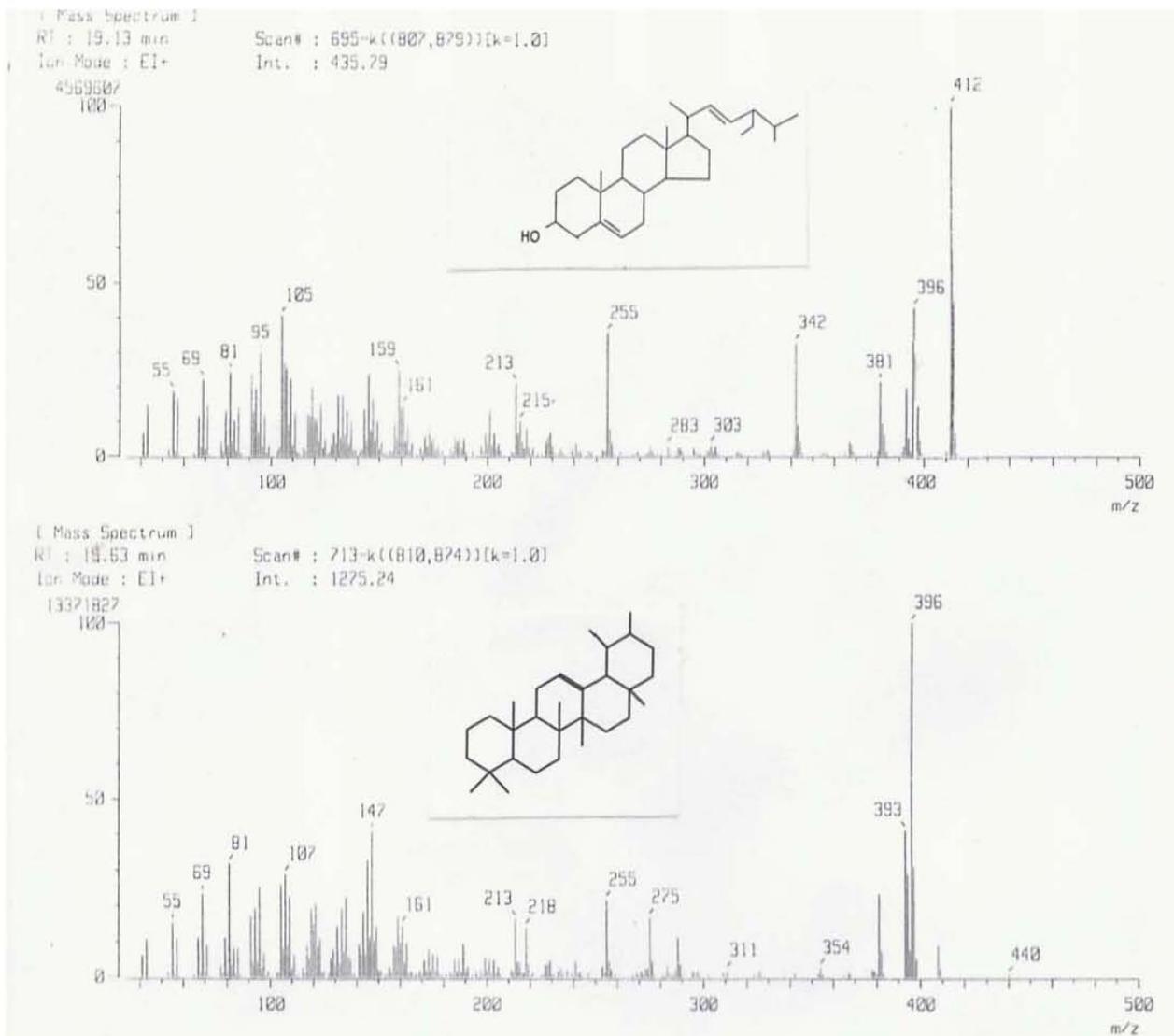
Cromatograma 1. Cromatograma de gases acoplada a espectrometría de masas de la fracción secundaria 10G-10J

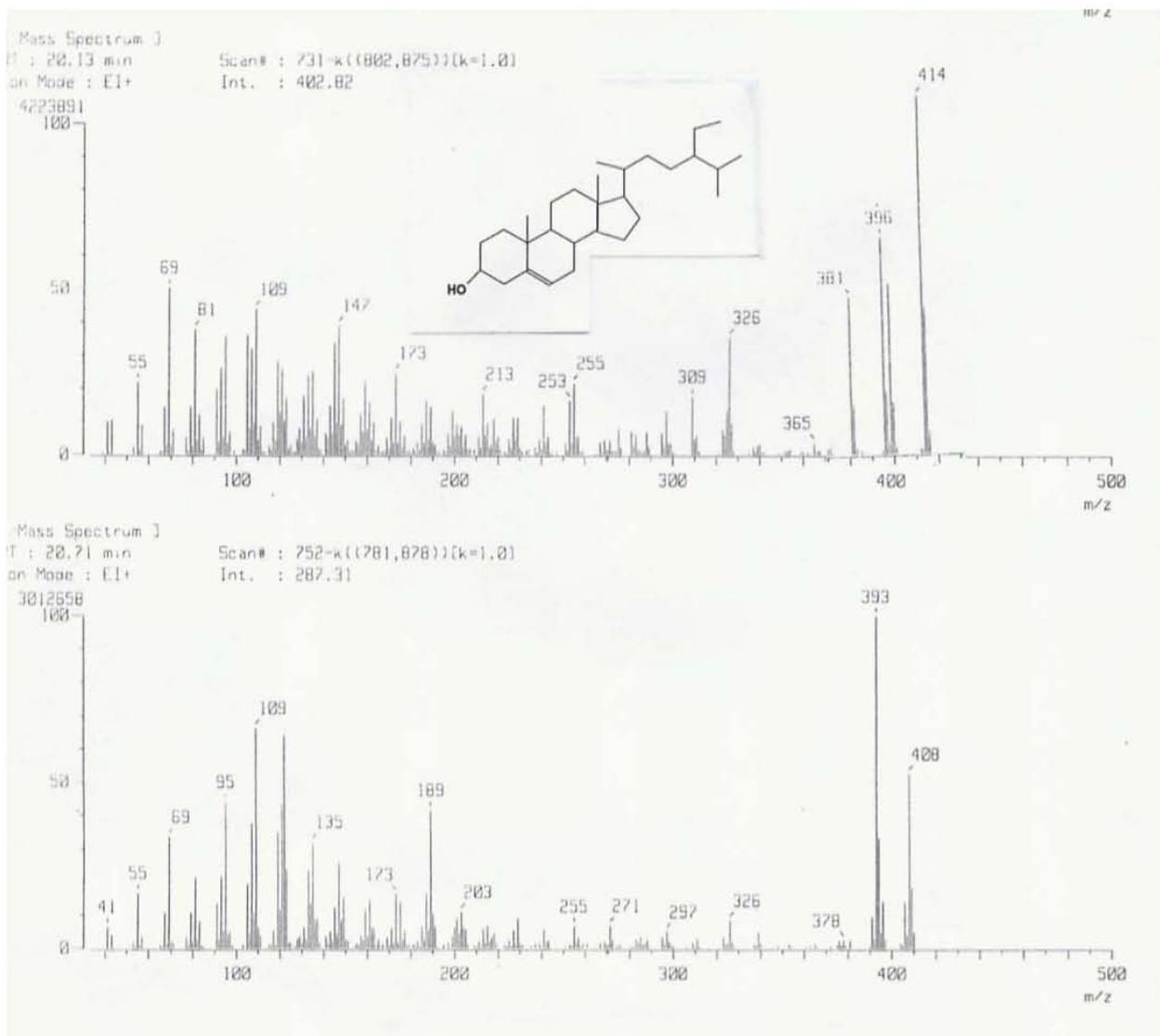


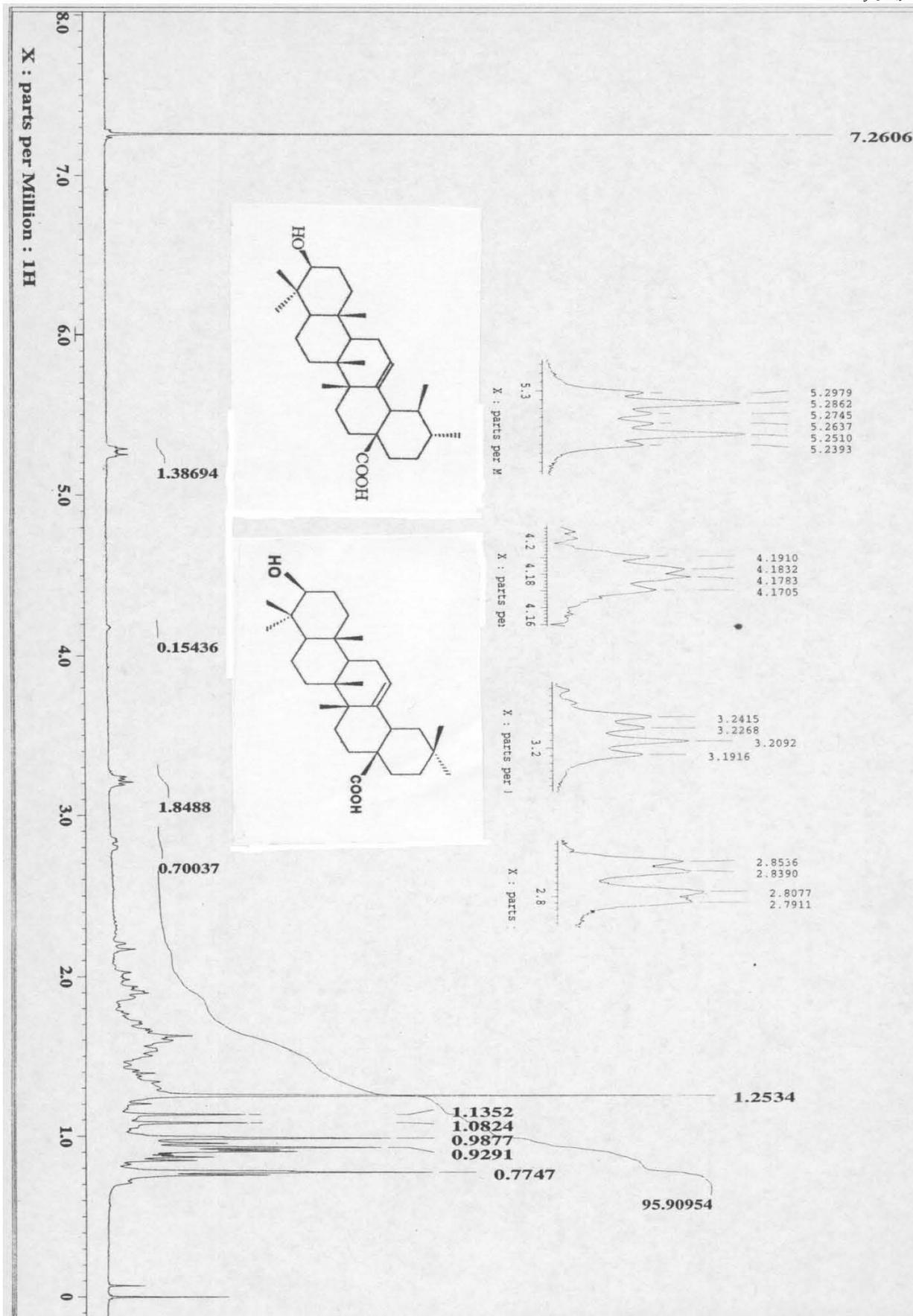




Cromatograma 2. Cromatograma de gases acoplada a espectrometría de masas de la fracción secundaria 8h-8j.







Espectro 2. Espectro de RMN-1H de la mezcla de los ácidos ursólico/oleanólico