



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO

**POSGRADO EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE MEDICINA

**RASTREO DE LA ACTIVIDAD ANTIMICOBACTERIANA DE LOS
EXTRACTOS DE PLANTAS MEDICINALES DE MÉXICO**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

**P R E S E N T A
RAQUEL RAMÍREZ MUÑOZ**

DIRECTORA DE TESIS: Dra. ADELINA JIMÉNEZ ARRELLANES



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.

AGRADECIMIENTOS:

- Al Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), por la beca otorgada en el periodo 01/08/1999 al 30/04/2002 (No. de registro: 11746599)
- El trabajo de tesis se realizo con el apoyo del CONACYT mediante el proyecto de Investigación No. 30702-N.
- A la Dra. Mariana Meckes Fisher, Jefa de la Unidad de Investigación Médica de Productos Naturales del Hospital de Pediatría, IMSS, por las facilidades y apoyo otorgado para elaborar mi trabajo de tesis dentro de ésta unidad.
- A la Dra. Adelina Jiménez, Investigador de la UIM en Farmacología de Productos Naturales, por su asesoría en la realización del presente trabajo.
- A la Dra. Julieta Luna Herrera por la colaboración y el gran apoyo proporcionado para la realización del trabajo en la parte biológica.
- A los miembros del Comité Académico (Dr. Xavier Lozoya Legorreta y al Dr. Alfonso Romo de Vivar Romo) por sus atenciones, sugerencias para enriquecer el trabajo experimental, mejorar el trabajo escrito y consejos proporcionados durante la realización del proyecto de investigación.

INDICE

	Págs
LISTA DE ABREVIATURAS	I
LISTA DE ESQUEMAS	II
LISTA DE FIGURAS	III
LISTA DE TABLAS	V
1. GENERALIDADES DE LA TUBERCULOSIS.....	1
1.1. Importancia epidemiológica de la tuberculosis pulmonar en el mundo.....	2
1.2. Importancia epidemiológica de TB multidrogorresistente.....	7
1.3. Características del Mycobacterium.....	12
1.4. Cuadros Clínicos de la TB.....	15
1.5. Tratamiento para la TB.....	17
2. GENERALIDADES DE LA ETNOBOTÁNICA.....	22
2.1. La medicina tradicional en el mundo.....	24
2.2. La MT en México.....	27
2.3. Plantas medicinales con actividad antimicobacteriana.....	37
3. FUNDAMENTO TEORICO.....	42
3.1. Métodos utilizados para la determinación de la susceptibilidad de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	43
3.2. Características del Alamar Azul.....	46
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	48
5. OBJETIVO GENERAL	50
5.1. Objetivos específicos	51
6. HIPÓTESIS	52
7. METODOLOGÍA	53
7.1. Selección y colecta de las especies vegetales.....	54
7.1.1. Operaciones preliminares.....	54
7.2. Preparación de los extractos orgánicos y acuosos.....	57

	Págs
7.3. Evaluación Biológica	59
7.3.1. Microorganismos de prueba.....	59
7.3.2. Preparación de las muestras a evaluar.....	61
7.3.3. Desarrollo del Micrométodo del Alamar Azul (MABA).....	61
7.4. Fraccionamiento químico biodirigido del extracto hexánico de <i>L. hispida</i>	67
8. RESULTADOS	68
8.1. Primera colecta (Mes de Agosto-Septiembre).....	71
8.2. Segunda colecta (Mes de Diciembre-Enero).....	73
8.3. Tercera colecta (Mes de Agosto-Septiembre).....	74
8.4. Determinación de la actividad antimicobacteriana de los extractos orgánicos de la especie <i>L. hispida</i>	78
8.5. Fraccionamiento químico-biodirigido del extracto hexánico de <i>L. hispida</i>	81
9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	84
10. CONCLUSIONES	92
11. BIBLIOGRAFÍA	94
12. APÉNDICE	116

Lista de abreviaturas

CCF o ccf:	Cromatografía en capa fina
µg/mL:	microgramos por mililitro
g/L:	gramos por litro
mg:	miligramos
kg:	kilogramos
h:	hora
CMI:	Concentración Mínima Inhibitoria
Hex:	hexano
MeOH:	metanol
CHCl₃:	cloroformo
DMSO:	dimetilsulfóxido
CH₂Cl₂:	Diclorometano
INH:	Isoniazida
RFM:	Rifampicina
EMB:	Etambutol
S:	Estreptomicina
PZA:	Pirazinamida
PAS:	Acido P-Aminosalicílico
TB:	Tuberculosis
SIDA:	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
VIH:	Virus de Inmunodeficiencia Humana
IPN:	Instituto Politécnico Nacional
UFC/mL:	Unidades formadoras de colonias por mililitro
SNC:	Sistema Nervioso Central
ATCC:	American Type Culture Collection
IC:	Índice de Confiabilidad
MDR:	Multidrogorresistente
TB-MDR:	Tuberculosis multidrogorresistente
OMS:	Organización Mundial de Salud
TBP+:	Tuberculosis pulmonar con baciloscopía positiva
DGE:	Dirección General de Epidemiología
DOTS:	Directly Observed Treatment Short-course
TAES:	Tratamiento Acortado Estrictamente Supervisado
COEFAR:	Comités Estatales de Farmacorresistencia
GANAFAR:	Grupo Nacional de Asesoría en Farmacorresistencia
MT:	Medicina Tradicional
MAC:	Medicina Alternativa Complementaria
IMEPLAN:	Instituto Mexicano para el Estudio de Plantas Medicinales
IMSS:	Instituto Mexicano del Seguro Social
UIMTH:	Unidad de Investigación Médica de la Medicina Tradicional y Herbolaria
FDA:	Food and Drug Administration
REMA:	Resazurin microtiter assay
MABA:	Microdilution alamar blue assay

Lista de figuras

	Págs.
Figura 1. Distribución de tuberculosis en el Mundo del 2003.....	3
Figura 2. Tasa de Incidencia notificada de tuberculosis en la región de las Américas (1994-2003).....	4
Figura 3. Casos reportados de TB en México del 2002 hasta la semana 23 del 2006.	5
Figura 4. Estados de la República Mexicana con mayor incidencia de TB.....	6
Figura 5. <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	12
Figura 6. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> con tinción Ziehl Neelsen.....	13
Figura 7. Contagio de la Enfermedad por vía aérea.....	16
Figura 8. Sitios en donde se presenta comúnmente la TB.....	16
Figura 9. Estructura químicas de los medicamentos antituberculosos de 1ª línea.....	21
Figura 10. Estructura química de la Febrifugina.....	25
Figura 11. Estructura química de la mescalina.....	30
Figura 12. Estructura química de la chanoclavina, ácido lisérgico y amida del ácido isolisérgico.....	31
Figura 13. Estructura química de la turbicorina y turbicoritina.....	32
Figura 14. Estructura química de la Estricnina.....	32
Figura 15. a) Estructura química de la resazurina, b) Estructura química de la resorufina.....	46
Figura 16. Absorbancia del Alamar Azul.....	47
Figura 17. Adición del agua y del medio de cultivo en la placa de 96 pozos de fondo plano.....	62

Figura 18.	Distribución de soluciones de trabajo (extractos) y controles en la microplaca.....	63
Figura 19.	Inoculación de la suspensión bacteriana en los pozos de la microplaca....	64
	<i>Continuación de la Lista de Figuras</i>	Págs.
Figura 20.	Adición del indicador Alamar Azul y el Tween 80 en el control (b).....	65
Figura 21.	Reacción redox del Alamar Azul, en caso de que el crecimiento de la micobacteria sea óptimo.....	65
Figura 22.	Evaluación del extracto hexánico de <i>L. hispida</i> (Lant I) contra <i>M. tuberculosis</i> H37Rv.....	79
Figura 23.	Evaluación del extracto hexánico (Lant I) contra 4 cepas monorresistentes de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv y contra la cepa de referencia <i>M. tuberculosis</i> H37Rv.....	79
Figura 24.	Evaluación del extracto hexánico (Lant I) contra la cepa <i>M. tuberculosis</i> H37Rv resistente a INH. Evaluación del extracto metanólico (Lant II) y fracción FVI del extracto hexánico (Lant I) de <i>L. hispida</i> contra la cepa de referencia <i>M. tuberculosis</i> H37Rv.....	79
Figura 25.	Evaluación de las fracciones primarias (FI-FVIII) obtenidas del extracto hexánico de <i>L. hispida</i> contra la cepa de referencia <i>M. tuberculosis</i> H37Rv.....	81

Lista de tablas

	Págs.
Tabla 1. Especies de micobacterias que pueden producir enfermedades en el hombre	17
Tabla 2. Fármacos de 1ª línea para tratar la TB, dosis y efectos secundarios.....	18
Tabla 3. Fármacos de 2ª línea para tratar la TB, dosis y efectos secundarios.....	19
Tabla 4. Retratamiento estandarizado para casos de TB-MDR.....	20
Tabla 5. Retratamiento estandarizado alternativo para TB-MDR.....	20
Tabla 6. Estado Actual y perspectivas de las plantas medicinales en México.....	28
Tabla 7. Principios activos aislados de plantas usadas en la medicina tradicional Azteca.....	30
Tabla 8. Recomendaciones para la colecta de las especies vegetales.....	36
Tabla 9. Actividad antimicobacteriana de los extractos y/o compuestos de algunas plantas medicinales.....	39
Tabla 10. Especies vegetales seleccionadas de acuerdo al criterio etnobotánico.....	120
Tabla 11. Estudios químicos y biológicos de algunas de las especies vegetales.....	55
Tabla 12. Cepas monorresistentes de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv de la colección (ATCC).	59
Tabla 13. Aislados clínicos de <i>M. tuberculosis</i> obtenidas de pacientes con patrón de fármaco-sensibilidad determinadas.....	60
Tabla 14. Micobacterias no tuberculosas.....	60
Tabla 15. Fraccionamiento primario del extracto hexánico de <i>L. hispida</i>	67

Continuación de la lista de tablas

	Págs.
Tabla 16. Rendimiento de los extractos hexánico, metanólico y acuoso de las especies vegetales evaluadas	70
Tabla 17. Resultados de la evaluación biológica de 14 especies vegetales contra <i>M. tuberculosis</i> H37Rv (1ª colecta).....	72
Tabla 18. Resultados de la 2ª evaluación biológica de las 10 especies vegetales contra <i>M. tuberculosis</i> H37Rv (1ª colecta).....	73
Tabla 19. Resultados de la 2ª evaluación biológica de cuatro especies vegetales contra <i>M. tuberculosis</i> H37Rv (2ª colecta).....	73
Tabla 20. Resultados de la evaluación biológica de diez especies vegetales contra <i>M. tuberculosis</i> H37Rv (3ª colecta).....	74
Tabla 21. Resultados de la evaluación antimicobacteriana de tres especies activas contra variantes monorresistentes de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv (3ª colecta).....	75
Tabla 22. Resultados de la evaluación biológica de los tres extractos de las 23 especies vegetales contra <i>M. tuberculosis</i> H37Rv.....	76
Tabla 23. Resumen de los resultados finales del estudio de la evaluación biológica de los tres extractos de las 23 especies vegetales contra <i>M. tuberculosis</i> H37Rv.....	77
Tabla 24. Actividad antimicobacteriana de los extractos orgánicos de <i>L. hispida</i> contra <i>M. tuberculosis</i> H37Rv y contra cuatro variantes monorresistentes de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv.....	78
Tabla 25. Resultados de la evaluación del extracto hexánico de <i>L. hispida</i> contra 8 aislados clínicos de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv MDR.....	80
Tabla 26. Evaluación antimicobacteriana de las fracciones primarias de <i>L. hispida</i> contra <i>M. tuberculosis</i> H37Rv y <i>M. avium</i>	82
Tabla 27. Evaluación antimicobacteriana de la fracción activa FVI contra <i>M. tuberculosis</i> H37Rv; cuatro variantes monorresistentes de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv y contra ocho aislados clínicos de <i>M. tuberculosis</i> MDR.....	83

RESUMEN

Rastreo de la actividad antimicobacteriana de los extractos de plantas medicinales de México

Las plantas medicinales han sido muy empleadas por la población desde tiempo atrás y la medicina tradicional de los diversos pueblos es utilizada para satisfacer sus principales necesidades de salud. En el mundo, la medicina tradicional es el resultado del uso de plantas medicinales, circunstancias históricas y creencias culturales junto con la accesibilidad, disponibilidad y bajo costo de la misma. Para algunos países en vías de desarrollo, la importación o adquisición de medicamentos es de costo elevado, por lo que hacen uso del conocimiento desarrollado sobre la utilización de las plantas con fines terapéuticos. Por otra parte, la OMS reconoce esta práctica médica e invita a los gobiernos para que la incluyan en los sistemas oficiales de salud; aunado a que, en la actualidad este organismo está desarrollando monografías sobre el uso, seguridad y eficacia de diversas especies medicinales en donde se incluye la investigación química, biológica y toxicológica. Esto es muy importante para los investigadores sobre todo a los que se dedican a explorar este recurso natural con miras a obtener compuestos biológicamente activos.

Hoy en día, la necesidad de buscar sustancias activas para tratar enfermedades que se creían erradicadas como la tuberculosis y otros padecimientos, que aquejan a la humanidad, ha despertado el interés de numerosos grupos de investigación; enfocándose a explorar el potencial químico-biológico de las plantas medicinales con miras a encontrar nuevas y novedosas metabolitos secundarios. Este tipo de investigación se realiza mediante el empleo de técnicas modernas y ensayos biológicos apropiados que nos permitan determinar el potencial de las plantas medicinales. Intentando contribuir a la búsqueda de sustancias activas contra la tuberculosis en este trabajo se propuso evaluar la actividad antimicobacteriana de especies medicinales de la flora medicinal de México.

México por su distribución geográfica y diversidad de grupos étnicos, cuenta con una rica flora medicinal y algunas de ellas son empleadas para tratar padecimientos relacionados con la TB y a la fecha no se ha explorado su potencial antimicobacteriano. Para el desarrollo de este proyecto se seleccionaron 54 plantas medicinales con base a la información etnobotánica, de las cuales 23 fueron colectadas. De cada especie se prepararon los extractos hexánico, metanólico y acuoso, mismos quedaron evaluados por el método colorimétrico del Alamar Azul empleando como microorganismos de prueba el *M. tuberculosis* H37Rv y *M. avium*. Los extractos que resultaron activos en esta primera etapa, fueron evaluados contra cuatro cepas monorresistentes de *M. tuberculosis* H37Rv y 8 aislados clínicos de *M. tuberculosis* MDR.

La evaluación biológica demostró que de las 23 plantas medicinales sólo 4 (*Artemisia ludoviciana*, *Chamaedora tepejilote*, *Juniperus communis* y *Lantana hispida*) inhibieron el crecimiento de *M. tuberculosis* H37Rv; siendo la más activa *L. hispida* contra *M. tuberculosis* H37Rv, contra las cuatro cepas monorresistentes de *M. tuberculosis* H37Rv y contra los ocho aislados clínicos de *M. tuberculosis* MDR.

El estudio químico biodirigido del extracto hexánico de *L. hispida* permitió determinar que la fracción FVI fue la más activa (CMI=12.5 µg/mL), en esta fracción están presentes tres triterpenos y el β-sitosterol. Cabe mencionar que esta especie no mostró actividad contra las cepas de micobacterias no tuberculosas.

Abstract
Tracking of the activity antimycobacterial of the extracts of medicinal plants of México.

The medicinal plants have been very used by the population from time behind and the traditional medicine of the diverse villages is used to satisfy his principal needs of health. In the world, the traditional medicine is the result of the use of medicinal plants, historical circumstances and cultural beliefs together with the accessibility, availability and lower cost of the same one. In some countries in routes of development, the import or acquisition of medicines it is of high cost, for what they use the knowledge developed on the utilization of the plants with therapeutic ends. On the other hand, the OMS recognizes this practice medicates and invites the governments in order that they include it in the official systems of health; united to that, at present this organism this one developing monographs on the use, safety and efficiency of diverse medicinal species where there is included the chemical, biological and toxicological investigation. This is very important for the investigators especially those who devote themselves to explore this natural resource with a view to obtaining biological active compounds.

Today in day, the need to look for active substances to treat diseases that we believed eradicated as the tuberculosis and other sufferings, which afflict the humanity, has woken up the interest of numerous groups of researchers; focusing to exploring the chemical - biological potential of the medicinal plants with the goal to finding secondary metabolic new and novel. This type of investigation it's does by means of the employment of modern technologies and biological appropriate tests that they allow us to determine the potential of the medicinal plants. Trying to contribute to the search of active substances against the tuberculosis in this work one proposed to evaluate the activity antimycobacterial of medicinal species of the medicinal flora of Mexico.

Mexico for theirs geographical distribution and diversity of ethnic groups, possesses a rich medicinal flora and some of them are used to treat sufferings related to the TB and to this day his potential has not been explored antimycobacterial. For the development of this project 54 medicinal plants were selected by base to the information ethnobotany, of which 23 were collected. Of every species the extracts were prepared hexane, methanol and watery, same they remained evaluated by the method colorimetric of the Alamar Blue trimming using as microorganisms of test *M. tuberculosis* H37Rv and *M. avium*. The extracts that turned out to be active in this first stage, were evaluated against four stump monoresistant of *M. tuberculosis* H37Rv and 8 isolated clinical of *M. tuberculosis* MDR.

The biological evaluation demonstrated that of 23 medicinal plants only 4 (*Artemisia ludoviciana*, *Chamaedora tepejilote*, *Juniperus communis* and *Lantana hispida*) disabled the growth of *M. tuberculosis* H37Rv; being the most active *L. hispida* against *M. tuberculosis* H37Rv, against four strains monoresistant of *M. tuberculosis* H37Rv and against the isolated clinical eight of *M. tuberculosis* MDR.

The chemical study biossay-guided of the extract hexane of *L. hispida* allowed to determine that the fraction FVI was the most active (CMI=12.5 µg/mL), in this fraction three are present triterpenes and β-sitosterol. It is necessary to mention that this species did not show activity against the strains of mycobacterias not tuberculoses.

1. Generalidades de la tuberculosis

1.1 Importancia epidemiológica de la tuberculosis pulmonar en el mundo

La tuberculosis (TB) es la segunda causa de muerte provocada por un agente infeccioso después del SIDA, y se estima que un tercio de la población mundial está infectada con *M. tuberculosis* y en riesgo de desarrollar la enfermedad (Álvarez-Gordillo y Dorantes-Jiménez, 1998; OMS, 2006).

En la década de los 90'; la TB fue reconocida como una enfermedad reemergente (Dye y col., 1999) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) declaró en abril de 1993 que la TB había adquirido carácter de urgencia mundial, debido principalmente a falta de atención a la enfermedad por parte de muchos gobiernos, con programas de control mal administrados; además, del crecimiento demográfico y el SIDA/VIH como uno de los factores de riesgo más importante (UNSSC, 2000; Billo y col., 2005).

En el año 2002, se reportaron 8,8 millones de nuevos casos y fueron cerca de 3 millones de muertes (Case y col., 2006; Molina-Salinas y col., 2006). Los países con mayor incidencia de TB (con una tasa 100 casos) se localizan en África Subsahariana, la India, algunos países que pertenecieron a la Unión Soviética y en Sudamérica (Brasil, Colombia, Bolivia y Perú) (Figura 1). México y España reportaron en el 2002, tasas de entre 25 y 49 casos por c/100 mil habitantes aunque las tasas por habitante fueron más altas en África (presentan de una cuarta parte de todos los casos, que es el 356 casos por c/100,000 habitantes), la mitad de los casos, nuevos se sitúan principalmente en 6 países asiáticos: Bangladesh, China, Filipinas, India, Indonesia y Pakistán; la mayor parte de ellos del Este de Asia y del África Subsahariana. (OMS, 2005; Dye, 2006; Case y col., 2006; Molina-Salinas y col., 2006).

En la mayor parte del mundo, la batalla contra TB se está librando con éxito, pero en África esa enfermedad ha alcanzado proporciones alarmantes, y la morbilidad y mortalidad por esta causa aunado al problema de VIH va en aumento, según afirma la OMS (OMS, 2005). A escala mundial, la incidencia de TB crece con un ritmo del 1% anual debido a su incremento en África; y en otras regiones del mundo. Las enérgicas labores de lucha contra esta enfermedad están ayudando a que los casos descieran o se estabilicen, aunque la incidencia, la prevalencia y la mortalidad se mantuvieron estables o disminuyeron en siete de las nueve regiones del planeta analizadas a excepción de los países africanos. Las tasas de detección de

nuevos casos aumentaron del 11% en 1995 al 45% en 2003, y llegaron al 60% en 1999 (Dye y col., 1999). Así mismo en el 2004, también se reportaron 1.4 millones de casos TB positivo en hombres, y solo 775,000 en mujeres (Dye, 2006).



Figura 1. Distribución de Tuberculosis en el Mundo del 2003 (Tomado de Dye, 2006).

En América Latina, en 1999 se registraron aproximadamente 253 mil nuevos casos de TB, de los cuales el 6% fueron reportados en México (OMS, 2001).

La TB es prevenible y curable, sin embargo, continúa siendo un problema importante de salud pública en el mundo; para América en el 2003 se notificaron en la región 227,551 casos de los cuales 130,877 correspondieron a formas pulmonares con baciloscopia positiva; en este mismo año, se estimó que murieron 53,800 personas por esta causa (OPS, 2005). La coinfección TB/VIH y los casos de TB multidrogorresistente (MDR) representan un reto para el control de la enfermedad. El poco acceso a los sistemas de salud en los países en vías de desarrollo y el impacto de las reformas del sector salud, las condiciones socioeconómicas bajas, y la migración son factores que favorecen la prevalencia de TB. La tendencia a la incidencia, de 1994 al 2003, ligeramente descendió con 1.6% anual para TB en todas las formas y el 2.6% para TB pulmonar con baciscopia positiva (TBP+) (Figura 2). Tendencia atribuida fundamentalmente a la disminución de casos en: Brasil, Chile, Costa Rica, Cuba,

Estados Unidos y Perú (OPS, 2005). En Colombia los casos de defunción de TB corresponden al 25% de la mortalidad evitable en países en desarrollo. Presentándose el 95% de los casos y el 98% de las muertes por TB ocurren en estos lugares, y el 75% de los casos se presenta en la población económicamente productiva (15-50 años) (UNSSC, 2000).

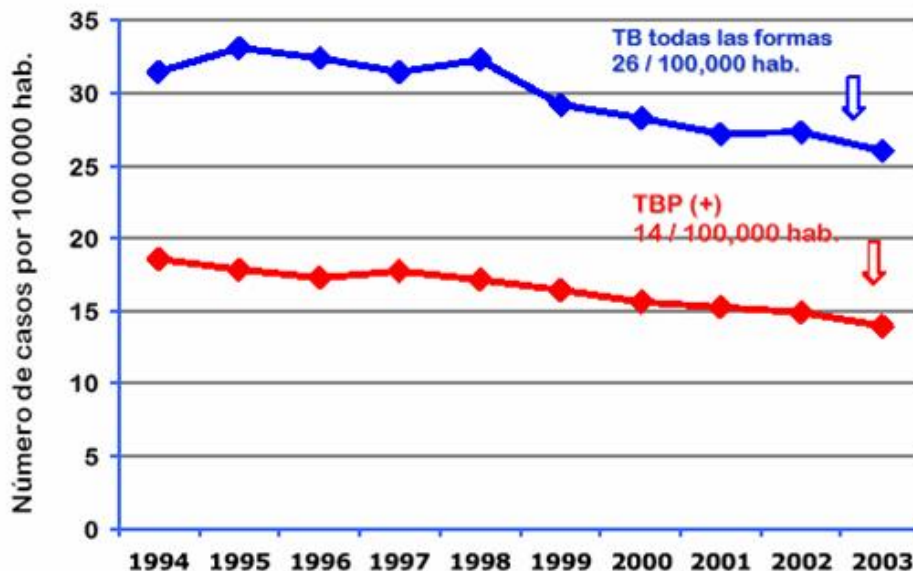


Figura 2. Tasa de incidencia notificada de tuberculosis en la región de las Américas (1994-2003)
(Tomado de la OPS, 2005)

En Colombia se calculan aproximadamente 10,000 casos nuevos de TB por año y la resistencia inicial global fue de 13% (Robledo y Mejía, 2001).

En México, la TB fue una de las 20 causas principales de mortalidad, reportada en los meses de Marzo-Abril del 2000, presentándose 773 defunciones y una tasa de incidencia de 49.4 de casos por c/ 100,000 habitantes, esto indicó el 1.4% en pacientes hospitalizados. Mientras que para pacientes derechohabientes representó el 0.5% con 188 defunciones y una tasa de 22.8 de casos por c/100,000 hab., así mismo, se observó que el sector público más propenso a manifestar la enfermedad, es entre los 15 y 65 años de edad (económicamente productiva), (SPM, 2002a). Estas cifras son alarmantes, pero lo son más aún para el periodo de Mayo-Junio del 2002 donde se observó que la tendencia de la TB sigue tomando fuerza en la población, en este periodo la mortalidad reportada en hombres fue de 2,233 defunciones con

una tasa de 4.5 c/100,000 hab, representando el 0.9%. Por otro lado, la mortalidad reportada para el año 2001 en hombres fue de 2,284 defunciones con una tasa de 4.6 c/100, 000 hab, indicando el 0.9% (SPM, 2002b).

Chiapas ocupó desde 1995 el primer lugar en mortalidad por TB en el país; durante ese año se presentaron 325 muertes por TB pulmonar (tasa de 9.4 por 100,000 habitantes), lo que constituye 9.4% del total de muertes por esta causa en México, y en ese mismo año se presentaron 1,527 casos nuevos (tasa de 42.33 por c/100,000 habitantes) (Álvarez-Gordillo y Dorantes-Jiménez, 1998).

La incidencia reportada por la Dirección General de Epidemiología (DGE) para el periodo 2002 a 2004 fue aproximadamente de 16,000 casos por año, en toda la Republica Mexicana. Las entidades federativas con mayor incidencia fueron los estados de Veracruz, Baja California Norte, Chiapas y Guerrero, siendo Veracruz el estado con mayor número de casos (1,234) representando el 11.8%. En la (Figura 3) se reportan los casos de incidencia de TB reportados por año del periodo del 2002-2006 (DGE, 2002-2006). Sin embargo, la OMS estimó que en nuestro país existen aproximadamente 30,000 casos por año.

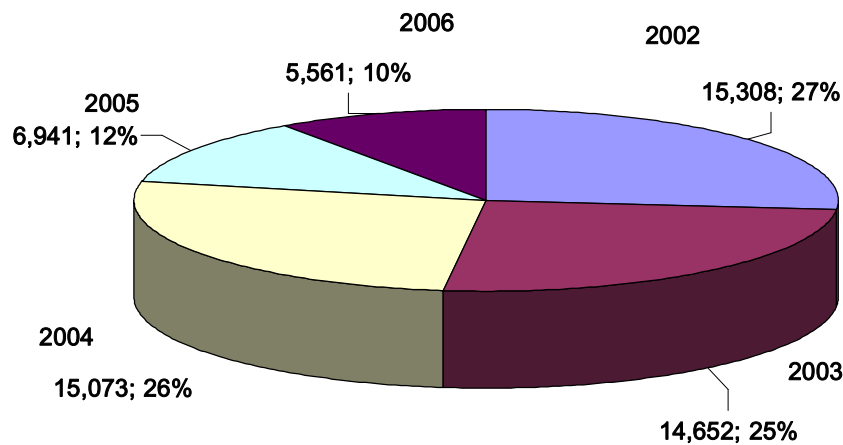


Figura 3. Casos Reportados de TB en México del 2002 hasta la semana 23 del 2006.

Actualmente, la incidencia de TB registrada por la DGE en la semana 23 del 2006, es de 4,766 c/100,000 hab., siendo las mismas entidades federativas de la Republica Mexicana, las de mayor número de casos de TB que en los años anteriores (Veracruz 644, Chiapas 557, Baja California Norte 487, Tamaulipas empieza a incrementar el número a 441, Nuevo León 309 y Guerrero 277) (Figura 4).

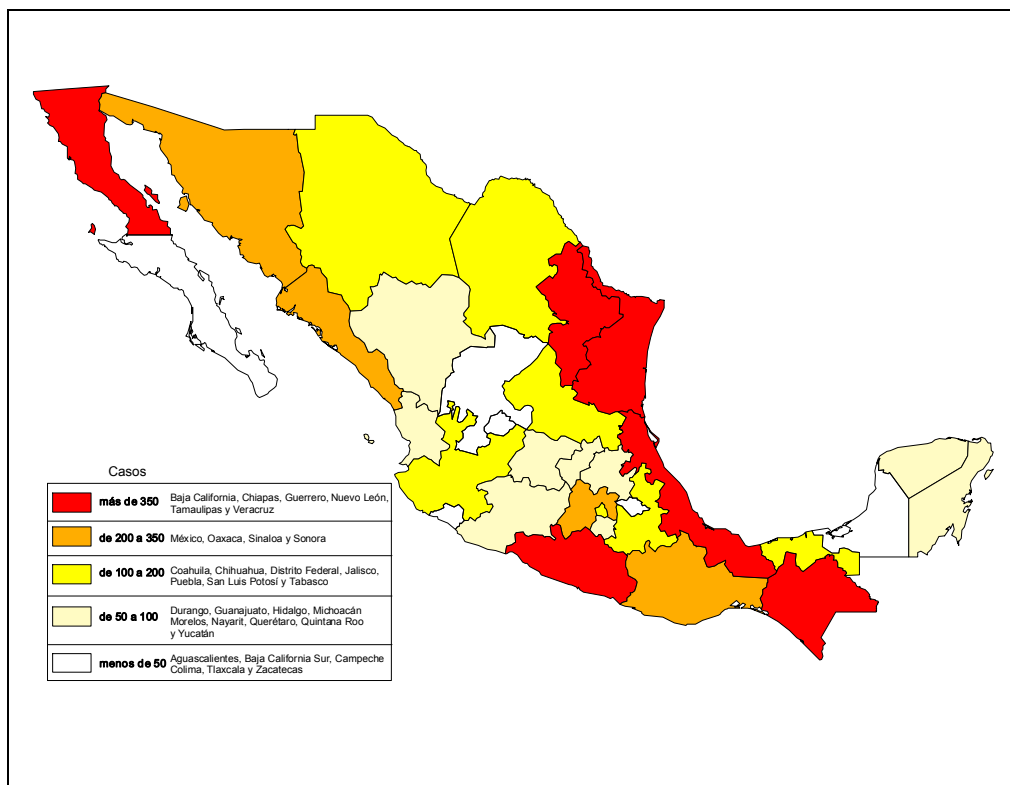


Figura 4. Estados de la República Mexicana con mayor incidencia de TB.

1.2 Importancia Epidemiológica de TB Multidrogorresistente

Existen factores que han favorecido la prevalencia de TB en el mundo, como el aumento de la pobreza en países en desarrollo, crecientes niveles de desnutrición, la falta de apego al tratamiento, el descuido de la vigilancia epidemiológica, la escasez de recursos humanos y económicos para su control, el surgimiento del SIDA y de cepas multidrogorresistentes [MDR], definida como resistencia al menos a dos de los fármacos de 1ª elección [Rifampicina (RFM) e Isoniazida (INH)] (Said-Fernández y col., 2005a). La MDR puede ser primaria o adquirida; siendo la primaria cuando los casos de TB no han recibido tratamiento alguno y la enfermedad es causada por una cepa de *M. tuberculosis* MDR. La adquirida es cuando los casos de TB han sido tratados o multitratados y se presentan recaídas por abandono del tratamiento.

El número de casos de TB en el mundo aumenta 3% cada año, debido principalmente a la expansión de cepas MDR. En un estudio realizado por la OMS, se encontró que entre los países participantes el rango de resistencia primaria fue de 2% (República Checa) al 41% (República Dominicana), con una mediana de 10.4%. Se identificaron cepas de *M. tuberculosis* MDR primaria en todos los países estudiados, excepto en Kenia. La mediana de prevalencia fue 1.4%, y el rango de 0 (Kenia) al 14.4% (Letonia). La drogorresistencia adquirida fue mucho mayor que la resistencia primaria. El rango de prevalencia de resistencia adquirida a cualquier medicamento antituberculoso fue de 5.3% (Nueva Zelanda) a 100% (Ivanovo Oblast, Rusia), con una mediana de 36%. La prevalencia de cepas de TB-MDR fue 13%, con un rango de 0% (Kenia) a 54% (Letonia). Se ha sugerido que la prevalencia de TB-MDR está subestimada y que la resistencia a medicamentos antituberculosos está extendida en todo el mundo; sin embargo los estudios epidemiológicos enfocados a este problema son escasos. Un importante hallazgo fue que los países con mayor grado de TB-MDR fueron aquellos con programas deficientes de control. Por otro lado, el uso de regímenes terapéuticos estandarizados de curso corto reduce el problema de la drogorresistencia (Said-Fernández y col., 2005a).

Dado el problema de la TB en el mundo en 1996, la OMS implemento el programa DOTS (Directly Observed Treatment Short-course) ó TAES (Tratamiento Acortado Estrictamente Supervisado). Mediante este programa más de 17 millones de pacientes han sido

tratados, con lo que se ha conseguido aumentar la tasa de curaciones. La proporción de curaciones con esta estrategia en 2003 fue del 82%. Por consiguiente para poder reducir a la mitad la prevalencia en el año 2015 respecto a 1990, es necesario alcanzar una tasa de detección del 70% y elevar la tasa de éxito del tratamiento hasta el 85%, así como reducir la incidencia al menos en un 2% anual. Para reducir la mortalidad a la mitad, la disminución de la incidencia debería de ser de 5 o 6% cada año (Dye y col., 1999).

Actualmente, 182 países han adaptado la estrategia DOTS/TAES, aunque una cuarta parte de la población mundial aun no tiene acceso a estos servicios (OMS, 2005).

Sin embargo, en Uganda donde se ha logrado reducir con éxito el VIH se curan hoy menos pacientes de TB que hace cuatro años, esto se debe a que más de la mitad de las personas con la enfermedad siguen sin recibir servicios de DOTS, por sobrecarga de los servicios generales de salud. En cambio, en China y la India que con un tercio de los casos de TB a nivel mundial, cuentan con una cobertura del DOTS casi del 100% y en efecto el número de casos tratados en todo el mundo mediante la DOTS creció un 8% en 2003 respecto del año anterior (OMS, 2005), así mismo más de 20 millones de pacientes con TB han sido tratados en el marco de la estrategia DOTS/TAES (OMS, 2005). Al mantener éste compromiso y el actual nivel de recursos en las cuatro regiones (América, el Mediterráneo Oriental, Asia Sudoriental y el Pacífico Occidental) podría lograrse el Objetivo de Desarrollo del Milenio que es reducir la incidencia de TB para 2015 (Dye, 2006). La excepción sería África, debido a la epidemia simultánea de TB/VIH, y Europa donde se registra un elevado nivel de TB-MDR y el DOTS avanza lentamente (OMS, 2005).

La resistencia a medicamentos y en especial la MDR primaria en la República Dominicana es de 6.6%, en Argentina de 4.7%, Perú del 2.5%, en USA del 1.6%, Bolivia del 1.2%, Nicaragua del 1.1%, Brasil del 0.9%, Chile del 0.5% y Cuba del 0.7%. En Colombia fue del 1,81% (IC95% 0,9 a 3,5) para 1991-1992, y de 1,5% (IC95% 0,9 a 2,4) para 1999-2000, estos estudios fueron realizados por el Instituto Nacional de Salud. Con estas cifras se concluye que la media de MDR es similar al global y aún no representa un grave problema de salud pública; sin embargo, la falta de control y la detección tardía, puede incrementar el porcentaje y convertirse en un grave problema (Porrás y col., 2005). Es de destacar que en países con años de experiencia en la aplicación de la estrategia DOTS/TAES, la MDR no representa un problema de salud (Said-Fernández y col., 2005a).

A lo largo de la última década, se ha implementado progresivamente en América el programa DOTS, alcanzando para el 2003 una cobertura global del 78%. Esta estrategia ha permitido mejorar la detección y curación de los casos. La Región se encuentra en buen camino de alcanzar los indicadores y metas de los Objetivos de Desarrollo del Milenio, sin embargo, los resultados actuales han sido fundamentalmente alcanzados en países con altos o medianos ingresos, y con programas nacionales para el control de la TB (OPS, 2005).

En México, de los casos de TB pulmonar registrados entre 1989-1996, más del 95% recibió tratamiento y solamente 73.2% lo terminó presentándose un 25 % de abandono, alcanzándose una eficacia, (proporción de curaciones en relación con los pacientes que terminaron el tratamiento) del 95%, y la eficiencia (proporción de pacientes curados con relación a los que iniciaron el tratamiento) fue del 73%. Esto nos indica que el abandono del tratamiento es uno de los principales factores de riesgo para desarrollar MDR (Álvarez-Gordillo y Dorantes-Jiménez, 1998).

Gran parte de esta mejora se debe a la eficiencia del tratamiento y en parte es responsabilidad de los servicios de salud, por lo que es primordial establecer al 100% la estrategia TAES, el cual consiste en que los servicios de salud sean más accesibles al paciente, sin importar origen, condición socioeconómica, credo o religión y garantizar el tratamiento mediante tarjetas de control y la administración personalizada de medicamentos.

Debido a que existe diferente dinámica de desarrollo en los países y a la aparición de nuevos retos, la cooperación técnica debe contemplar la diversidad de escenarios epidemiológicos, operativos y de desarrollo de los programas nacionales de TB, priorizando a los más vulnerables, de acuerdo a condiciones de pobreza, incidencia de TB, respuesta sanitaria, impacto del VIH/SIDA y de TB-MDR. Las acciones de cooperación y optimización sobre el control destinado a mejorar la calidad de atención, promover la participación y movilización social, y facilitar el cumplimiento de los Objetivos de Desarrollo del Milenio (*Plan Estratégico del Programa Regional de Tuberculosis 2005-2015*). Para expandir y consolidar la estrategia DOTS enfocándose a los casos de TB-MDR, casos de TB asociada con VIH/SIDA y para revertir la incidencia, prevalencia y la mortalidad por TB (OPS, 2005).

Las siguientes notificaciones fueron reportadas por la OMS en el boletín publicado en OMS, 2005.

* La estrategia DOTS/TAES lanzada en 1995, consta de cinco elementos:

1. Compromiso político de los gobiernos para el control de TB.
2. Diagnóstico bacteriológico y una red de laboratorio eficaz.
3. Quimioterapia breve estandarizada y apoyo al paciente a lo largo de todo el tratamiento.
4. Suministro ininterrumpido de fármacos de calidad asegurada y
5. Registro y notificación oficial para medir los resultados a nivel de pacientes y de programa.

* La OMS ha desarrollado una nueva estrategia mundial *Alto a la TB* que aspira llegar a todos los pacientes e intensificar la lucha, para ello se han planteado seis elementos básicos:

1. Continuar con la expansión de la estrategia DOTS/TAES de calidad,
2. Enfrentar la asociación TB/VIH y la TB-monorresistente
3. Contribuir al fortalecimiento de los sistemas de salud
4. Incorporar a todos los proveedores de atención sanitaria
5. Capacitar a los pacientes y a las comunidades y
6. Facilitar y promover la investigación.

* El Departamento *Alto a la TB* de la OMS, junto con las oficinas regionales y nacionales de la OMS, elaborada políticas, estrategias y normas; apoya las iniciativas de los Estados Miembros de la OMS; evalúa los avances hacia las metas de control de la TB, así como el funcionamiento, el financiamiento y el impacto de los programas nacionales; y facilita las alianzas y las comunicaciones.

* El Servicio *Mundial de Adquisición de Medicamentos*, esta extendiendo el acceso a los fármacos con miras a la aplicación de la estrategia DOTS/TAES. En apenas cuatro años ha suministrado cuatro millones de tratamientos para pacientes con TB.

* A través del Comité Luz Verde, los proyectos DOTS/TAES-Plus pueden solicitar el acceso a medicamentos de calidad para el manejo de los casos TB-monorresistente a bajo precio (alcanzando una reducción del precio total hasta del 90%)

* El *Plan Mundial Alto a la TB 2006-2015* detalla las necesidades económicas y de recursos para alcanzar las metas en el 2015; cuyo objetivo primordial es eliminar la TB para ese año.

Estrategia TAES-Plus en México.

Debido a que la TB-MDR se ha convertido en un problema de salud pública en México, se ha incluido el Programa Estrategias específicas orientadas al diagnóstico, tratamiento, seguimiento y vigilancia epidemiológica de estos casos. El programa consiste en administrar fármacos anti-TB de segunda línea con base a la resistencia presentada en el lugar de la infección (región o país) como es el caso de los países subdesarrollados.

Para ello, se creó un apartado de TB-MDR en la Norma Oficial Mexicana para la Prevención y Control de la Tuberculosis en la Atención Primaria a la Salud (NOM-006-SSA2-1993), se formaron los Comités Estatales de Farmacorresistencia (COEFAR) y en cada entidad federativa, se construyó el Grupo Nacional de Asesoría en Farmacorresistencia (GANAFAR) integrado por médicos de las principales instituciones de salud del país, tomando en cuenta su amplia experiencia en el diagnóstico y tratamiento de TB. Se estableció el programa anual de capacitación y actualización en TB-MDR dirigido al personal de salud (enfermeras, médicos y químicos) ubicados en las 32 entidades federativas con el apoyo de la OMS, OPS y UICTER. México logró la aprobación de la OMS para iniciar un proyecto piloto “TAES-Plus”, donde se incluirán pacientes con TB-MDR de 5 regiones del país con mayor incidencia de casos (NOM-006-SSA2-1993).

1.3. Características del *Mycobacterium***

1.3.1 *Micobacterias de interés clínico*

El género *Mycobacterium* incluye más de 100 especies que pueden clasificarse en seis grupos desde el punto de vista bacteriológico, pero con fines didácticos se dividen en tres:

Complejo tuberculosis. Incluye las especies *M. tuberculosis*, *M. bovis* (incluida la cepa BCG) y *M. africanum*, todas ellas provocan TB en el humano. Se incluye también *M. microti*, productor de tuberculosis en rata.

Complejo lepra. Se incluyen las especies *M. leprae*, que provoca la lepra en el humano, y *M. lepraemurium*, que produce lepra en roedores.

Otras Micobacterias. Sólo algunas especies suelen ser patógenas para el humano, otras pueden ser patógenas oportunistas y finalmente otras suelen ser saprofitas. Producen las denominadas micobacteriosis.

Las micobacterias pueden variar mucho en su morfología, desde formas cocoides pequeñas a largos filamentos. *M. tuberculosis* suele tener una morfología característica, bacilo delgado de forma recta o ligeramente curvada en frotis teñidos, y su tamaño suele ser de 1-4 micras de largo por 0.3-0.5 micras de ancho. Ocasionalmente, forma ramificaciones verdaderas que se observan en cultivos enriquecidos y en frotis de ganglios linfáticos caseosos, (Figura 5).

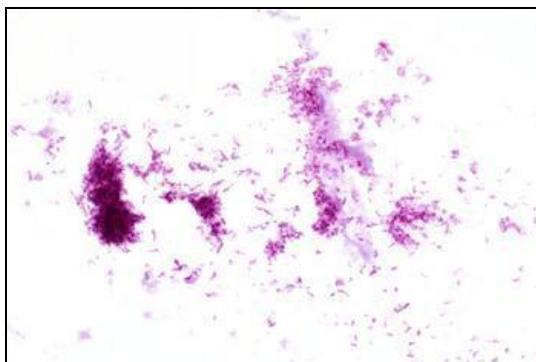


Figura 5. *Mycobacterium tuberculosis*

Son bacilos ácido-alcohol resistente, por lo que la tinción de Ziehl Neelsen es útil para la coloración de estos microorganismos obtenidos de muestras clínicas o de cultivo. Con esta tinción, los bacilos aparecen de color rojo brillante sobre un fondo azul (Figura 6). Son difíciles de teñir con la tinción de Gram, y se observan como bacilos gram positivos con

tinción irregular; no son formadores de esporas, sin flagelos, ni cápsula y son aerobios estrictos.

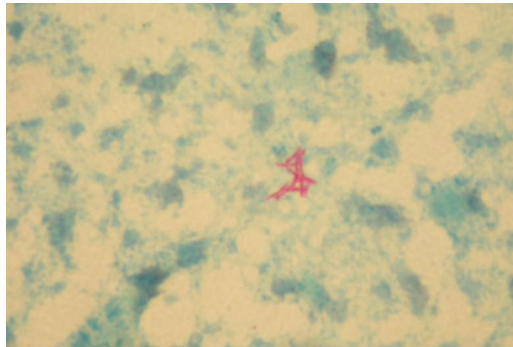


Figura 6. *Mycobacterium tuberculosis* con Tinción Ziehl Neelsen

La estructura celular de *M. tuberculosis* consta de un pared gruesa, separada de la membrana celular por el espacio periplásmico, con cuatro capas. La más interna es el glicopéptido o peptidoglicano con moléculas de N-acetilglucosamina y ácido-N-glicolilmurámico (en lugar del habitual N-acetilmurámico) con cadenas cortas de alanina, a diferencia de *M. leprae* que posee glicina. Esta capa es el esqueleto de la bacteria que le confiere forma y rigidez. Externamente, hay otras 3 capas compuestas una por polímeros de arabinosa y galactosa, otra formada por ácidos micólicos (que son derivados de ácidos grasos, de gran importancia taxonómica en micobacterias y otros géneros relacionados como *Nocardia*) y otra superficial formada por lípidos como los sulfolípidos (factor cuerda), llamado así por su aparente asociación con la forma acordonada con que se agrupan las micobacterias virulentas, y los micósidos que son al igual que el anterior glicolípidos.

La mayoría de la micobacterias, y entre ellas *M. tuberculosis*, se desarrollan en forma adecuada en medios simples que contenga fuente de carbono, nitrógeno y metales esenciales (hierro y magnesio). Para su aislamiento primario a partir de muestras clínicas, se requiere un medio más complejo que contengan una base de papa-huevo o una base de agar-suero. Los bacilos tuberculosos tienen un crecimiento muy lento incluso en condiciones óptimas y requieren de 10 a 20 días de incubación a 37°C. Aunque la proliferación puede tener lugar a un pH que oscila entre 6 a 7.6, el óptimo es de 7.

El tiempo de duplicación de *M. tuberculosis* en condiciones óptimas de cultivo es de 15 a 18 horas, tardando varias semanas (1 a 3) en aparecer colonias visibles en medios de cultivo.

Las micobacterias son muy resistentes a la desecación. El medio ambiente en el que se encuentran constituye un factor muy importante para su viabilidad. Por ejemplo, cuando se exponen a la luz solar directa, los bacilos tuberculosos de los cultivos son destruidos en 2 horas, pero si estos están presentes en el esputo, pueden permanecer viables durante periodos más largos.

Las micobacterias son resistentes a la desinfección con productos químicos que otros microorganismos no formadores de esporas, probablemente como consecuencia de su contenido en lípidos. Son sensibles al calor húmedo y son destruidas por las temperaturas de pasteurización.

**Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiológica Clínica. Coordinado por Casal, Manuel. España (1999).

1.4. Cuadros clínicos de la TB

Las micobacterias son microorganismos que se comportan como patógenos obligados (*M. tuberculosis* y *M. leprae*), patógenos oportunistas y saprofitos. Muchas de ellas pueden aislarse de muestras ambientales, como tierra o agua. Los cuadros clínicos de las micobacterias son muy variados.

La TB constituye una de las enfermedades infecciosas de mayor prevalencia y es la primera causa de muerte por enfermedad prevenible a nivel mundial (OMS, 2005); además, es un problema importante de salud pública, con una alta incidencia en muchos países en los últimos años (Case y col., 2006). La epidemia del VIH, problemas socioeconómicos, y la migración son causas importantes que contribuyen a revertir la curva decreciente de nuevos casos de TB que se venía observando en los países occidentales (Dye, 2006).

El riesgo de padecer TB es variable, dependiendo del sistema inmunológico y la edad. Esto se ha visto en niños menores de 5 años y en personas inmunosuprimidas (por VIH, cáncer, artritis reumatoide, diabetes y otras) existe un elevado riesgo para desarrollar la enfermedad. En adultos normales existe mayor posibilidad de que la infección entre en un estado de latencia, con riesgo de reactivación en los años siguientes. Aproximadamente, un 10% de las personas infectadas desarrollan TB activa a lo largo de su vida, con el mayor riesgo en los dos años siguientes a la infección. Las personas con infección latente pueden ser identificadas mediante la prueba de la tuberculina, y en casos positivos se les debe dar quimioprofilaxis para evitar el desarrollo de la enfermedad.

La infección se adquiere principalmente por vía aérea, siendo similar el riesgo para todos los sujetos, variando exclusivamente con la capacidad infectiva de la persona enferma y la proximidad del contacto. La TB es contagiosa y se propaga en el aire; cada persona con TB pulmonar activa infecta entre 10 a 15 personas por año, y lo hace al toser, estornudar o escupir (Figura 7) (OMS, 2005).

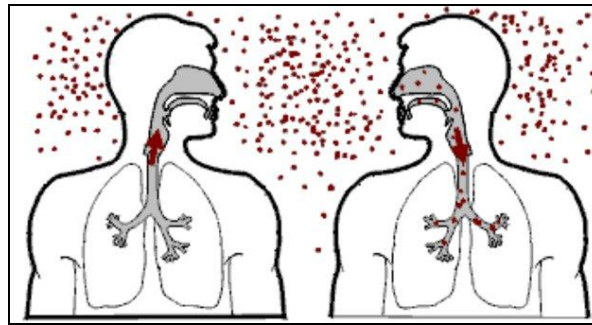


Figura 7. Contagio de la Enfermedad por vía aérea

La localización más frecuente de TB es la pulmonar, que se presenta como una enfermedad de curso subagudo caracterizada por fiebre de bajo grado principalmente por la noche, tos persistente, sudoración nocturna, expectoración y debilidad generalizada. En el estudio radiológico de tórax se presenta como un infiltrado en lóbulos superiores, con frecuencia cavitado, y no siendo raro el derrame pleural como única manifestación radiológica. En personas inmunosuprimidas, la TB puede presentarse en forma extrapulmonar o diseminada. Estas son las formas clínicas más frecuentes en las personas con SIDA o inmunocomprometidas. Entre los órganos que con mayor frecuencia se afectan se incluyen los ganglios linfáticos, el hígado, el riñón, la columna vertebral y huesos y SNC (Figura 8). El bacilo de *M. tuberculosis* puede aislarse a partir de esputo, biopsias, orina, líquido cefalorraquídeo.

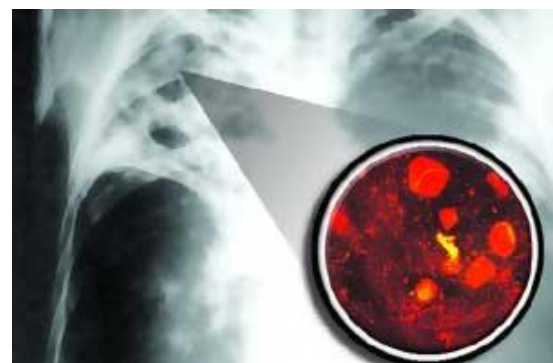
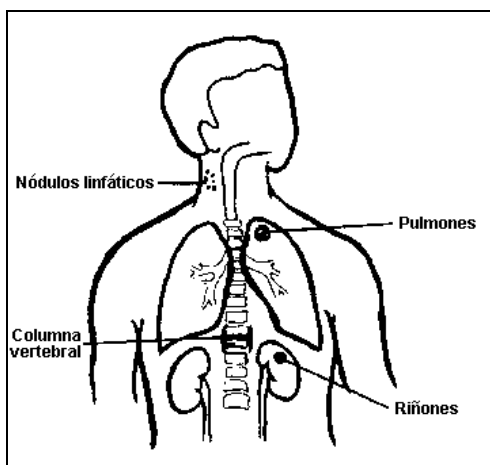


Figura 8. Sitios en donde se presenta comúnmente la TB (Washington Hispanic, Por Cohen Rachel)

En la Tabla 1, se describe las micobacterias que con mayor frecuencia son patógenas para el hombre y las enfermedades que provocan; por ejemplo *M. avium-intracellulare*, *M. genavense*, *M.* puede llegar a producir una enfermedad pulmonar; En tanto *M. celatum*, *M. kansasii* y *M. szulgai* producen la enfermedad pulmonar similar a la tuberculosis.

Tabla 1. Especies de micobacterias que pueden producir enfermedades en el hombre (Casal y col., 1999)

Espece de Micobacteria	Enfermedad más frecuente
<i>M. avium-intracellulare</i> y <i>M. genavense</i>	Enfermedad pulmonar, linfadenitis cervical en niños, enfermedad diseminada (SIDA)
<i>M. celatum</i> y <i>M. kansasii</i>	Enfermedad pulmonar similar a tuberculosis, enfermedad diseminada (SIDA)
<i>M. haemophilum</i>	Nódulos cutáneos, inf. diseminada (SIDA)
<i>M. malmoense</i>	Enfermedad pulmonar crónica
<i>M. marinum</i>	Infección cutánea
<i>M. fortuitum</i> , <i>M. chelonae</i> y <i>M. abscessus</i>	Infecciones de partes blandas, osteomielitis, enfermedad diseminada, infección de herida quirúrgica
<i>M. scrofulaceum</i>	Linfadenitis cervical en niños
<i>M. simiae</i>	Enfermedad pulmonar crónica
<i>M. szulgai</i>	Enfermedad pulmonar similar a tuberculosis
<i>M. ulcerans</i>	Úlceras cutáneas (úlceras de Buruli en Africa, úlcera de Baimsdale en Australia)
<i>M. xenopi</i>	Enfermedad pulmonar crónica

1.5 Tratamiento para la TB

El tratamiento se basa en aplicar las recomendaciones de la OMS mediante el programa TAES cuyos objetivos plasmados en la modificación a la Norma Oficial Mexicana NOM-006-SSA2-1993 son:

- Curar al paciente y evitar que muera de TB activa
- Evitar las recaídas y bloquear la transmisión
- Que la falta sobre el control de TB no se debe a la eficiencia sino al problema relacionado a la organización e implementación del programa TAES.
- Asegurarse que el paciente cumpla con el tratamiento, mediante supervisión estricta sobre la ingesta de las dosis prescritas.

Es importante acercar los servicios de diagnóstico y tratamiento a los pacientes, e integrar a los servicios generales y de primer nivel.

Los fármacos más utilizados para el tratamiento son: los de primera línea y los de segunda línea que son los que se utilizan en los casos de MDR.

Los fármacos de primera línea son Isoniazida (INH), Rifampicina (RFM), Etambutol (EMB), Estreptomicina (S) y Pirazinamida (PZA); las estructuras químicas se muestran en la (Figura 9). Los fármacos de segunda línea son más tóxicos, de elevado costo y solo deben emplearse en circunstancias extremas como por ejemplo cuando existe resistencia a los fármacos de primera línea o bien en caso de fracaso del tratamiento; además inducen fácilmente resistencia.

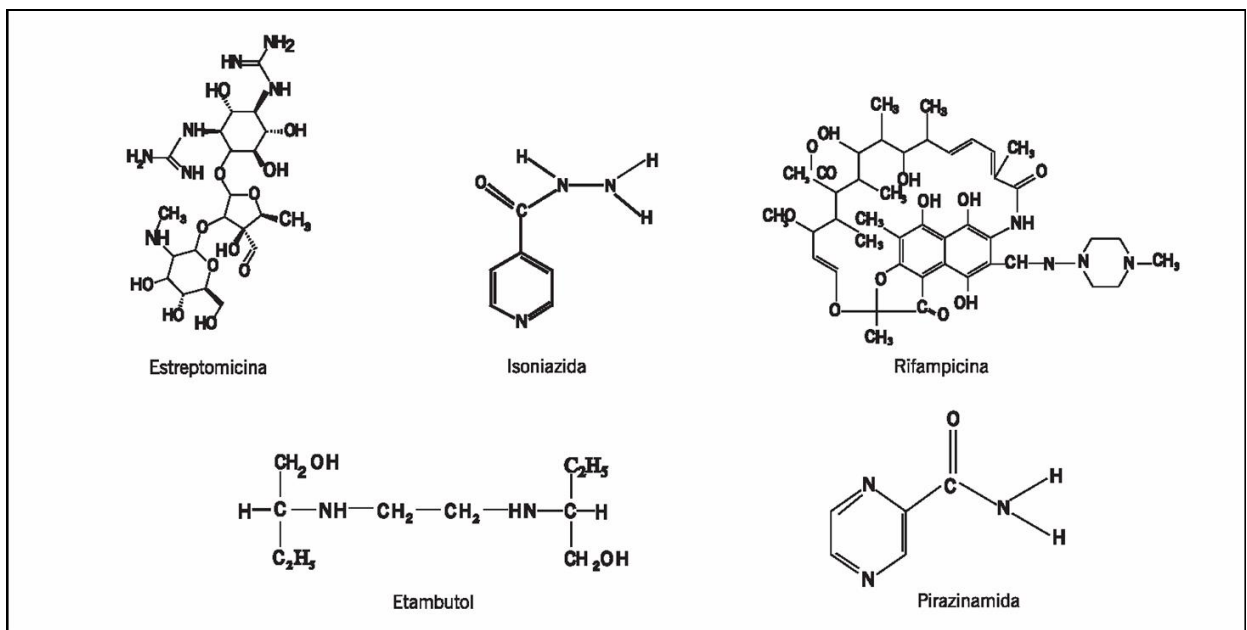


Figura 9. Estructura químicas de los medicamentos antituberculosos de 1ª línea.

En las siguientes Tablas 2, 3 y 4 se describen los efectos secundarios de los fármacos de primera y segunda línea utilizados para tratar la TB.

Tabla 2. Fármacos de 1ª línea para tratar la TB, dosis y efectos secundarios.

Fármaco	Dosis	Efectos adversos
Isoniazida	5-10 mg/kg (max. 450 mg)	Hepatitis, polineuritis y otros trastornos neurológicos, erupciones cutáneas, artralgias.
Rifampicina	10 mg/kg (max. 900 mg) <40 kg max. 450 mg	Náuseas, vómitos y diarrea, colestasis, trombocitopenia, cuadro pseudogripal, migraña.
Pirazinamida	30 mg/kg (max. 2500 mg)	Hepatitis, artralgias, hiperuricemia.
Etambutol	25 mg/kg (los 2 primeros meses) 15 mg/kg (a partir del tercer mes)	Neuritis retrobulbar.
Estreptomicina	15 mg/kg (max. 1000 mg) <50 kg ó >50 años (max. 750 mg)	Toxicidad vestibular y auditiva. Nefrotoxicidad, parestesias bucales.

Tabla 3. Fármacos de 2ª línea para tratar la TB, dosis y efectos secundarios.

Fármaco	Dosis	Efectos adversos
Protionamida	15 mg/kg/día (max. 1000 mg)	Gastritis, sabor metálico, salivación excesiva. Anorexia. Náuseas y vómitos. Hepatitis. Impotencia. Polineuritis. Artralgias.
Cicloserina	15 mg/kg/día (max. 1000 mg)	Convulsiones, migraña, depresión, psicosis.
Capreomicina	15 mg/kg/día (max. 1000 mg)	Similar a estreptomicina.
Clofazimina	200-300 mg/día	Hiperpigmentación. Ileo paralítico, Infartos esplénicos, Hemorragia digestiva.
Ofloxacina	400 mg/12h	Náuseas, vómitos. Insomnio.
Acido P-Aminosalícilico	150 mg/kg (max. 12 g)	Dispepsia, hepatitis.
Tioacetona	150 mg/día	Hepatitis, dispepsia. Supresión de médula ósea.

Los casos probables de TB-MDR se presentan cuando:

- El paciente abandono el tratamiento primario con fármacos de primera línea en una o varias ocasiones.
- La baciloscopia es positiva en el cuarto mes de un tratamiento supervisado con fármacos de anti-TB de primera línea.
- Exista fracaso o recaída de los tratamientos previos.
- Por contacto estrecho con otro paciente con TB-MDR y muestre los mismos signos y síntomas de TB pulmonar o extrapulmonar.

Se dice que el paciente tiene TB-MDR, después de haber realizado el ensayo microbiológico y se haya verificado por prueba de farmacosenibilidad que la bacteria es resistente a INH, RFM y a otros fármacos.

Para poder prescribir el tratamiento con fármacos de segunda línea se verifica primero:

- ✓ Que el caso ha sido evaluado por el COEFAR.
- ✓ Exista disponibilidad de fármacos anti-TB para todo el tratamiento por la institución de salud, y realizar una carta de compromiso del tratamiento.
- ✓ El paciente debe conocer el tratamiento farmacológico y las consecuencias si lo interrumpe.
- ✓ Los servidores de salud deben conocer y estar capacitados en la estrategia TAES, así como deben garantizar la supervisión directa del tratamiento.
- ✓ El paciente con adicción (alcoholismo y otras sustancias) antes de ingresar al tratamiento, debe estar rehabilitándose en un programa.
- ✓ La residencia del paciente debe ser fija durante el tratamiento.

El tratamiento para TB-MDR

Los fármacos utilizados para este tratamiento estandarizado son Ofloxacina, Protionamida, Pirazinamida y Capreomicina se realizan en dos etapas: una intensiva de 90 dosis (3 meses) y la de sostén 450 dosis (15 meses) (Tabla 4) (NOM-006-SSA2-1993). Cuando exista falta de alguno de estos medicamentos se puede utilizar ciprofloxacina y kanamicina pero la duración del tratamiento se extiende hasta 18 meses mínimo (Tabla 5).

Tabla 4. Retratamiento estandarizado para casos de TB-MDR

	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: Los pacientes que pesan <50 Kg, la dosis será por Kg de peso.

Tabla 5. Retratamiento estandarizado alternativo para TB-MDR

	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	1500g	1500 mg

Nota: Los pacientes que pesan <50 Kg, la dosis será por Kg de peso.

2. Generalidades de la Etnobotánica

“La medicina tradicional” (MT) es un término amplio referido en un sistema salud, y es muy utilizado en los países en vías de desarrollo (Akerele, 1990); mientras que la medicina alternativa o complementaria (MAC) es utilizada y va en aumento rápidamente en los países desarrollados. En algunos países los encargados del área de salud son los políticos y profesionales de la salud cuestión sobre la eficacia, seguridad, calidad y disponibilidad de la MT. Sin embargo, la MT ha sido utilizada desde cientos de años y diversas culturas como la China, Hindú, Árabe, Nofricana, Romana, Azteca y otras, así como las diversas formas de medicina indígena proveen evidencias escritas del uso de las plantas para el tratamiento de diversas enfermedades (Phillipson, 2001). La MT se basa principalmente en la utilización de plantas medicinales en forma natural, tinturas, tés, cataplasma, polvos, hierbas y en formulaciones farmacéuticas rudimentarias y en ocasiones pueden incluir partes de animales y/o minerales (Design, 2002; Akerele, 1990; Phillipson, 2001). Al iniciar este siglo, gran parte de la terapia médica para países desarrollados dependía de las plantas medicinales pero con el crecimiento de las industrias farmacéuticas internacionales, esto se fue perdiendo. Por ejemplo, en el periodo de 1959 a 1984 aproximadamente, el 25% de las prescripciones médicas de Estados Unidos y Canadá contenían extractos de plantas medicinales o bien algún principio activo obtenido de este recurso natural. En la actualidad aproximadamente el 25% de los principios activos de los fármacos usados en la clínica se obtuvieron de plantas o bien constituyen derivados semisintéticos de estos (Balandrin y col., 1993). Hoy en día, se ha recobrado la importancia de las plantas medicinales así por ejemplo 1976 la asamblea de la OMS dirigió su atención hacia este sistema de salud con las resoluciones WHA30.49, WHA29.71, WHA31.33 (Akerele, 1990; Eloff, 1998) y en 1985 organizó un seminario internacional sobre el papel de MT en los sistemas primarios de salud.

La OMS define la medicina tradicional como prácticas, enfoques, conocimientos y creencias sanitarias diversas que incorporan medicinas basadas en plantas, animales y/o minerales, terapias espirituales, técnicas manuales y ejercicios aplicados de forma individual o en combinación para mantener el bienestar, además de tratar, diagnosticar y prevenir las enfermedades (Design, 2002)

2.1. La Medicina Tradicional en el Mundo

La OMS reportó que más del 65% de la población mundial utiliza las plantas medicinales en los sistemas primarios de salud. Por ejemplo en África y China más del 80% y 40% de la población respectivamente utiliza la MT para ayudar a satisfacer sus necesidades sanitarias de salud y curar sus enfermedades (Jagtap y col., 2006; Design, 2002) En Asia, África, Latinoamérica y algunos otros países en vías de desarrollo, alrededor del 80% las poblaciones siguen utilizando la MT como resultado de circunstancias históricas y creencias culturales junto con la accesibilidad y el costo. Por ejemplo en Uganda la proporción de personas que practican la MT frente a la población total es de 1:200 y de 1:499, dato que contrasta con las personas que practican la medicina alópata cuya relación es de 1:20,000 o menos y la mayoría se encuentra en zonas urbanas. Por lo que a veces, la MT es la única alternativa de atención médica aunado a que el costo de importación de medicamentos es muy elevado. Datos recientes indican que en Kenia, Ghana y Mali, el gasto sanitario per capita es de 6 dls/año y que los medicamentos antimaláricos comerciales son de costo elevado pero en cambio es más barato curar la malaria con hierbas y el pago por este servicio se hace en especie y/o de acuerdo con la riqueza del cliente (Design, 2002). Otros países con elevado índice de malaria, VIH/SIDA, tuberculosis y otras enfermedades de transmisión tiene menos de 15 dls per capita al año para gastar en sanidad y 0.75 dls per capita para gasto de medicamentos. Por lo que la OMS explora el potencial para la utilización de recursos accesibles y asequibles de MT con la finalidad de combatir estas enfermedades; mediante la investigación y uso de plantas más eficaces, protección de especies silvestres y cultivo sostenible de plantas medicinales de interés. Además, se fomentará la protección de los conocimientos indígenas sobre MT (Design, 2002).

El conocimiento milenario sobre el uso de las plantas en la MT en diferentes culturas es básico en la actualidad para los investigadores que se dedican a explorar este recurso natural con miras a obtener compuestos biológicamente activos. Por ejemplo, los chinos dejaron constancias escritas sobre el uso antimalárico de la droga chaáng shan (*Dichroa febrifuga* Lour) de donde aislaron el alcaloide Febrifugina (Figura 10), con importante actividad antimalárica (Romo de Vivar, 1987)

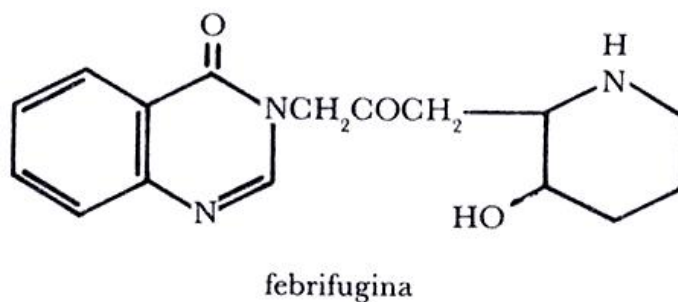


Figura 10. Estructura química de la Febrifugina

La obtención de los principios activos a partir de las plantas medicinales tuvo un gran desarrollo en el siglo XVIII y XIX con el aislamiento de alcaloides como la morfina, codeína, atropina, quinina, escopolamina, cocaína, pilocarpina; glicósidos cardiotónicos como la (digitoxina), ácido silícico. Muchas de estas sustancias se siguen utilizando como materia prima para el desarrollo de nuevos compuestos activos (Balandrin y col., 1993; Phillipson, 2001). Sin embargo, la obtención de principios activos de plantas tuvo su decadencia después de la segunda guerra mundial con el descubrimiento de los antibióticos y de diversas sustancias sintéticas que se producían a gran escala con mejor efecto terapéutico o aparentemente de mayor eficacia y de menor costo. La decadencia fue de 1930 a 1970, pero el resurgimiento de enfermedades que se creían erradicadas (como la malaria, diversas parasitosis, tuberculosis, etc.) y la aparición de otras como el SIDA, cáncer, diabetes, enfermedades cardiovasculares, ha despertado el interés y la necesidad urgente de intensificar la búsqueda de nuevas sustancias en fuentes naturales (plantas y microorganismos) y sintéticas. Las plantas más investigadas son las que se emplean en la MT por su valor terapéutico. Por otro lado, a principio de 1970, China ingreso al sistema de la Organización de las Naciones Unidas por sus avances en la solución de sus problemas de salud en tiempo corto mediante el empleo de su medicina tradicional (Lozoya y col., 1988). Y en 1976, la OMS implemento el programa sobre promoción y desarrollo de las medicinas tradicionales principalmente en aquellos países en vías de desarrollo.

Recientemente el interés por las plantas medicinales ha recobrado importancia con el descubrimiento del taxol, podofilotoxina y artemisina; sustancias con importante actividad biológica y en uso clínico y, además constituyen prototipos estructurales para el desarrollo de nuevos fármacos. Otros ejemplos recientes son la galegina (antidiabético), la galantamina (para tratar el Alzheimer), tiotropium (derivado de la atropina, empleado para tratar la enfermedad obstructiva pulmonar crónica), vinflunina y exatocan (derivado de vinblastina y camptocina respectivamente y que son anticancerígenos de gran importancia). Además, las moléculas de origen natural juegan un papel importante como nuevas entidades químicas que sirven para el desarrollo de preparados farmacéuticos, síntesis, semisíntesis de derivados con mejor efecto terapéutico; por ejemplo, en el período de 1981 al 2002, aproximadamente el 28% de nuevas entidades provinieron de productos naturales (plantas medicinales y microorganismos) (Newman y col., 2003).

Para la obtención de nuevos compuestos farmacológicamente activos se requiere de trabajo en equipo donde participen químicos, farmacólogos, toxicólogos, antropólogos y farmacógnostas; además de una inversión económica y de tiempo. Junto con esto es necesario el empleo de métodos modernos para el aislamiento, identificación y evaluación biológica. Respecto a este último punto, es importante resaltar que los ensayos biológicos deben ser reproducibles, de bajo costo, sencillos y rápidos. Además uno de los aspectos principales a tomar en cuenta, es el uso tradicional de la especie, ya que constituye un punto de partida muy importante para la obtención de este tipo de compuesto (Farnsworth y col., 1989; Case y col., 2006). Cabe destacar que, de muchas especies vegetales se desconoce la composición química y su potencial farmacológico y de algunas se ha “redescubierto” su potencial químico/farmacológico por los científicos (Balandrin y col., 1993; McCutcheon y col., 1992).

Según las estimaciones más recientes, alrededor del 15% de la riqueza florística mundial (37,000 especies), poseen virtudes curativas, por lo que cabe esperar que nuevas y novedosas estructuras químicas de metabolitos secundarios coadyuven al desarrollo de nuevos fármacos y así ayudar a resolver las principales enfermedades que aquejan a la humanidad hoy en día (Huerta, 2002).

Los procesos metabólicos son similares en casi todos los organismos vivos y los productos biosintetizados se les denomina metabolitos primarios (aminoácidos, carbohidratos, proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, entre otros), éstos cumplen una función vital en los seres

vivos y se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza. En cambio los metabolitos secundarios se sintetizan a partir de los metabolitos primarios y los procesos que conllevan a su formación, pueden diferir en los diferentes organismos. Los metabolitos secundarios presentan una distribución taxonómica restringida (de acuerdo a su género o especie). Entre ellos se encuentran cumarinas, alcaloides, flavonoides, limonoides, lignanos y terpenos entre otros. Existen evidencias que los metabolitos secundarios cumplen una función específica en la especie vegetal que los produce. Algunos de ellos son responsables del aroma y el color de numerosas plantas (Domínguez, 1973).

Los metabolitos secundarios muchos de ellos con importante actividad biológica son clasificados según su origen biosintético, siendo las mas importantes a) la ruta del ácido *chiquímico* dando origen a aminoácidos esenciales, taninos, lignanos, cumarinas, compuestos fenólicos, alcaloides derivados de los aminoácidos, quinonas, fenilpropanoides entre otros; la ruta del *acetato-malonato* (principalmente se lleva a cabo en bacterias, hongos y líquenes) originando prolicétidos aromáticos, antibióticos, macrólidos (tetraciclinas, antraciclinas, griseofulvina, eritromicina, antraquinonas, etc.), ácidos grasos (postaglandina) y metabolitos relacionados; c) la ruta del *aceto-mevalonato* y ruta DOXP (1-desoxixilulosa-5-fosfato) mediante el cual se biosintetizan los terpenoides (en general) y esteroides; d) *Metabolitos derivados de aminoácidos no aromáticos* y otros precursores nitrogenados que dan origen principalmente a los alcaloides y e) Metabolitos de biosíntesis mixta, por esta ruta se biosintetizan flavonoides, furanocumarinas, piranocumarinas, plastoquinonas, ubiquinonas y cannabionoles) (Domínguez, 1973; Evans, 1991; Mata, 1999).

2.2. La MT en México

La extraordinaria riqueza florística (30,000 especies de las cuales aproximadamente 9,500 son endémicas), ubica a México en el cuarto lugar mundialmente (Huerta, 2002) aspecto que ha permitido que la herbolaria floreciera desde la época prehispánica; además una buena parte de esos conocimientos del uso de las plantas han perdurado en invaluables documentos, entre ellos el Códice de la Cruz-Badiano (*Libellus de Medicina libus Indorum Herbis*, de 1552), que fue dictado en náhuatl por el médico indigenista Martín de la Cruz, traducido al latín por Juan Badiano e ilustrado con dibujos de las plantas realizadas por indígenas. Los conocimientos

empíricos han sido transmitidos durante siglos de generación en generación por los diferentes grupos étnicos. Cabe mencionar que en toda la República Mexicana existen 56 grupos étnicos, cada uno con su propia medicina tradicional, creencias, tradiciones, forma de trabajo y que hasta hoy en día continúan siendo los depositarios de este legado.

Actualmente, se han registrado en México alrededor de 4,000 especies con propiedades medicinales (15% de la flora total). Este número coincide con lo informado en varias regiones del mundo por especialistas en la materia, quienes consideran que una de cada siete especies posee alguna propiedad curativa (Tabla 6). Sin embargo, se calcula que en México, y en todo el mundo, la validación química farmacológica y biomédica sólo se ha llevado a cabo en 5% de estas especies (Huerta, 2002).

Tabla 6. Estado actual y perspectivas de las plantas medicinales en México (Tomado de Huerta, 2002)

Especies medicinales identificadas y registradas	4,000
Especies medicinales validadas farmacológica y clínicamente	250
Especies medicinales empleadas por la población mexicana	3,500 a 4,000
Especies medicinales utilizadas regularmente (sin procesar)	1,500
Especies medicinales usadas intensivamente (sin procesar, mezcladas o procesadas)	250
Especies medicinales silvestres que se colectan	3,600
Especies medicinales que se cultivan en el huerto familiar o en cultivos comerciales	370
Especies medicinales amenazadas	35

Dada la gran riqueza florística del país y la importancia de su MT, en 1975 en México mediante el Instituto Mexicano para el Estudio de las Plantas Medicinales (IMEPLAN), se implemento a nivel nacional un programa enfocado a estudiar la MT, enfocándose a recopilar la información sobre las potencialidades de los recursos humanos (médicos tradicionales, curanderos, hueseros, sanadores, parteras, etc.) y materiales (plantas). En 1980, el IMEPLAN se incorporo al Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) convirtiéndose en Unidad de Investigación Médica de MT y Herbolaria (UIMTH). Además, en la década de los 70's fue creado IMSS-COPLAMAR que estableció dentro de sus objetivos proporcionar atención médica a la población rural marginada de escasos recursos económicos; reconocer y recopilar la información sobre médicos tradicionales, información sobre plantas medicinales y registrar el número de médicos tradicionales que existían; además de establecer alrededor de 3,000

clínicas rurales y 60 hospitales rurales. Los estados de Chiapas y Oaxaca fue donde se registraron mayor numero de médicos tradicionales (887 y 1,476 respectivamente) y contaban con mayor numero de clínicas rurales (460 y 328) en contraste con Baja California Sur, Norte y Aguascalientes que registraron 13, 59 y 63 médicos tradicionales y contaban con 2, 10 y 37 clínicas rurales, respectivamente. Estados como Chiapas y Oaxaca presentaron una rica medicina tradicional, y un gran porcentaje de la población hacia uso de este recurso e importante información antropológica sobre la práctica dedicada a lo tradicional. En estas clínicas se incluyeron jardines botánicos con la finalidad que los pacientes hicieran uso de este recurso para aliviar sus enfermedades (Lozoya, 1988 y 1994). Fue en este periodo cuando se hizo necesario desarrollar un proyecto de interrelación entre IMSS-COPLAMAR y UIMTH que tenían como objetivo lograr el aprovechamiento de los recursos médicos-sanitarios de las comunidades. También en este periodo se creo un banco de datos sobre información etnobotánica del siglo XVI al XIX. Un segundo banco de datos creado fue referente a las plantas medicinales de uso actual y también fue creado el Herbario IMSSM (Lozoya, 1994).

La riqueza florística de México, ha sido de gran importancia para instituciones como el Instituto de Química, UNAM que desde su creación se ha enfocado al estudio de plantas medicinales iniciando con el estudio del tamarindo (*Tamarindus indica*), guamúchil (*Pithecolobium dulce*) y el colorín (*Eriquina americana*) (Romo de Vivar, 2006).

La validación del conocimiento empírico sobre la herbolaria indígena, desarrollada por los aztecas en la época prehispánica, fue realizada por investigadores de la Universidad de Utah en 1975, basándose en la información registrada en documentos del siglo XVI como el ya mencionado Códice De la Cruz-Badiano y *La Historia General de las Cosas de Nueva España* de Bernardino de Sahagún. En sus investigaciones trabajaron con 25 especies de las citadas en los documentos anteriores, y pudieron comprobar que los principios activos extraídos de ellas poseen las propiedades terapéuticas referidas en los documentos, (Farnsworth, y col., 1989) Algunos de los compuestos aislado de las plantas se describen en la (Tabla 7).

Tabla 7. Principios activos aislados de plantas usadas en la medicina tradicional Azteca (Tomado de Huerta, 2002; Farnsworth y col., 1989).

NOMBRE COMUN <i>Nombre náhuatl</i>	Nombre científico	Usos prehispánicos	Principales componentes químicos
CACAO <i>Cacahuáhuatl</i>	<i>Theobroma cacao</i> L.	Estimulante, analgésico, febrífugo	Teobromina (analgésico)
CAPULÍN <i>Tlalcapulin</i>	<i>Rhamnus serrata</i> Willd.	Antidisentérico	Rhamnetina (antidisentérico)
<i>Cempasúchil</i>	<i>Tagetes erecta</i> L.	Febrífugo	Patuletina (febrífugo)
EPAZOTE <i>Epazotl</i>	<i>Teloxys ambrosoides</i>	Antihelmíntico	Ascaridol (antihelmíntico)
ESTAFIATE <i>Itztauhyatl</i>	<i>Artemisia mexicana</i> Willd.	Colagogo antihelmíntico	Santonina (antihelmíntico)
GUAYABA <i>Xalxocotl</i>	<i>Psidium guajava</i> L.	Antidiarréico	Guijaverina (antidiarréico)
LIQUIDAMBAR <i>Xochiocotzotl</i>	<i>Liquidambar styraciflua</i> L.	Cura de la sarna (antiescabioso)	Storenina (elimina parásitos de la piel)
PAPAYO <i>Chichihualxóchitl</i>	<i>Carica papaya</i> L.	Antiinflamatorio	Papaína (antiinflamatorio)
ZAPOTE BLANCO <i>Cochitzapotl</i>	<i>Casimiroa edulis</i> La Llave & Lex.	Antihipertensivo	N-Benzoiltiramina (antihipertensivo)
ZOAPATLE <i>Cihuatli</i>	<i>Montanoa tomentosa</i> Cerw.	Emenagogo energético, abortivo	Zoapatlina (abortivo)

El peyote es otro ejemplo, empleado por los pueblos del Noroeste de México y se le considera una planta divina. Al ingerirlo elimina la fatiga, calma el apetito y la sed y el individuo empieza a tener fantasías. Los grupos indígenas lo emplean en sus ritos religiosos. El principio activo del peyote (*Anhalonium Williamsi*) es la mescalina (Figura 11).

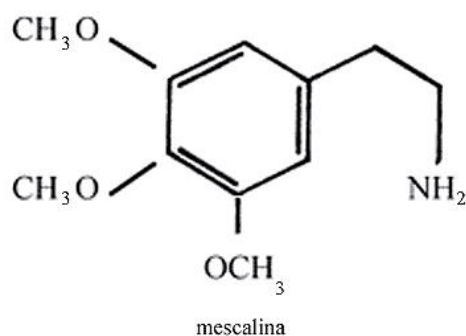


Figura 11. Estructura química de la mescalina

Ololiuqui (*Turbina corymbosa*), es una especie de la familia Convolvulácea con importante uso mágico-religioso en México. Fue muy usada en la época prehispánica por sacerdotes indígenas para adquirir la facultad de comunicarse con sus dioses. Su propiedad medicinal es contra la gota, mencionada por Francisco Hernández (Lozoya y Lozoya, 1982). Albert Hoffmann aisló en 1960 derivados del ácido lisérgico (alcaloides) y de *Ipomea tricolor* aisló la chanoclavina (Figura 12) y los glucósidos turbicorina y turbicoritina (Figura 13).

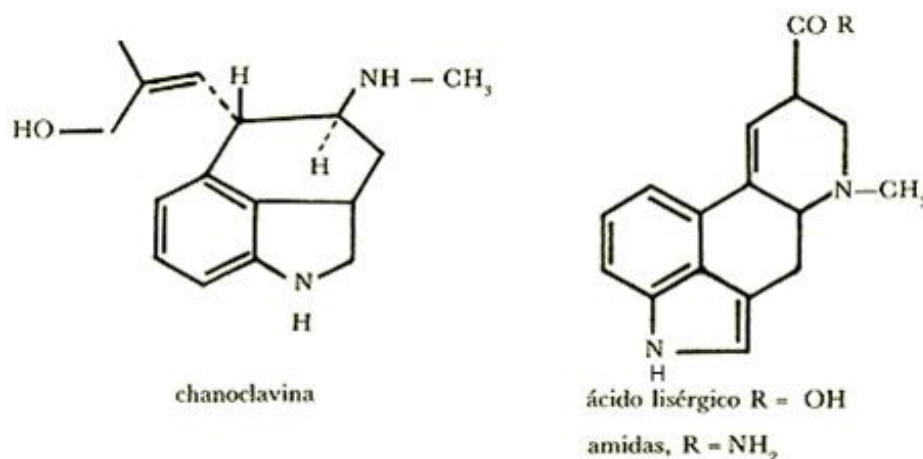


Figura 12. Estructura química de la chanoclavina, ácido lisérgico y la amida del ácido isolisérgico.

Hoffmann evaluó la actividad de las amidas del ácido lisérgico y del ácido isolisérgico, no encontró en estas sustancias propiedades alucinógenas, y sólo encontró que producían cansancio, apatía y somnolencia. Por otro lado, los glucósidos encontrados en *I. tricolor* mostraron actividad relajante (Romo de Vivar, 1987).

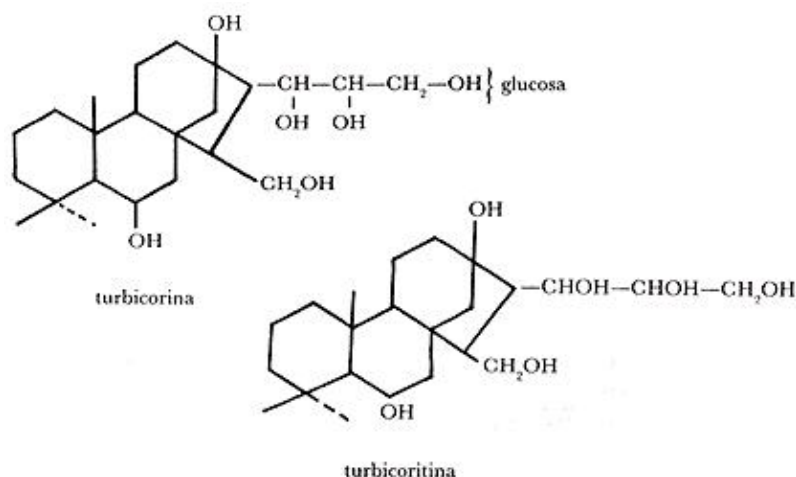


Figura 13. Estructura química de la turbicornina y turbicoritina.

Otro ejemplo obtenido de preparaciones de plantas es el curare (significa “matar aves”) que fue utilizado en Mesoamérica como veneno puesto en las flechas. Es un extracto acuoso de varias plantas, entre las que se encuentran especies de *Chondodendron cissampelos* y *Strychnos*, siendo esta última muy venenosa debido a que contiene entre otros alcaloides, la estricnina (Figura 14), sustancia tóxica que se usa para exterminar roedores y para matar animales de pieles finas. Los efectos del curare empiezan con la pérdida del habla, seguida por parálisis de los miembros y los músculos faciales; y finalmente la muerte (Caballero y Walls, 1970).

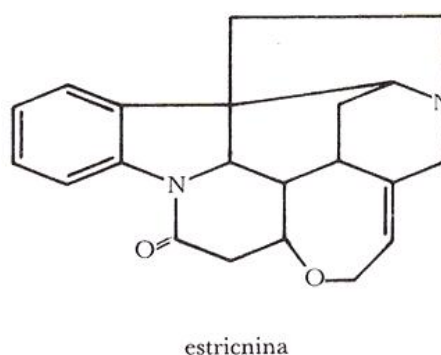


Figura 14. Estructura química de la Estrictina.

El zoapatle (cihuapalli), es otra planta muy utilizada por las mujeres indígenas para inducir al parto o para corregir irregularidades en el ciclo menstrual. En la actualidad, su

empleo sigue siendo bastante extendido con el objeto de facilitar el parto, aumentar la secreción de la leche y de la orina, y para estimular la menstruación (Lozoya y Lozoya, 1982).

Los estudios químicos del zoapatle se comenzaron a realizar desde fines del siglo pasado, aunque el aislamiento de sus principios activos se realizó hasta 1970 cuando se obtuvieron de la raíz, varios derivados del ácido kaurénico (Caballero y Walls, 1970). En 1971 se aislaron lactonas sesquiterpénicas (Geissman y Griffin, 1971) y a partir de 1972 se inician estudios que culminan con el aislamiento de los diterpenos activos llamados zoapatanol y montanol (Levine y col., 1979). Las patentes para la obtención de estos productos fueron adquiridos por la compañía farmacéutica estadounidense Ortho Corporation. La síntesis de zoapatanol fue llevada a cabo en 1980.

De otras especies de *Montanoa* conocidas también como zoapatle, y usadas con el mismo fin, se han aislado oxepanos (Caballero y Walls, 1970). Hoy en día en los mercados de plantas medicinales se venden como zoapatle varias especies de *Montanoa*: *M. tomentosa*, *M. frutescens* y *M. floribunda*.

Otro apartado importante por desarrollar son las monografías sobre plantas medicinales, en este sentido la OMS ha iniciado con el desarrollo de este documento donde se proporciona, información científica sobre seguridad, eficacia y control de la calidad de plantas medicinales ampliamente utilizadas, parte del vegetal usado, forma de uso, farmacología, posología, contraindicaciones y precauciones frente a reacciones adversas, características botánicas, sinonimias, composición química y concentración de ciertos marcadores químicos.

Las monografías constituyen una referencia clave para las autoridades sanitarias nacionales, los científicos y las empresas farmacéuticas, y público en general. Así mismo la Sede Central y las Oficinas Regionales de la OMS tienen como objetivo organizar una serie de páginas web sobre MT/MCA a fin de proporcionar información sobre políticas nacionales, legislaciones para la práctica y uso de la MT/MCA, y datos de investigación sobre seguridad, eficacia y uso de terapias de MT/MCA. (Design, 2002).

Actualmente se cuenta con monografías y banco de datos de las especies vegetales, ya anteriormente los estudios realizados al azar eran altamente costosos y poco efectivos. Sin embargo, algunos resultados fueron exitosos como el descubrimiento del taxol, extraído del árbol *Taxus breviflora* y desde 1994 se usa para el tratamiento del cáncer de mama (Ortigoza, 2006). Para los científicos es importante el conocimiento obtenido después de realizar estudios

químicos, farmacológicos y clínicos de las plantas medicinales, ya que conlleva a la formulación y comercialización de un principio activos o bien de un fitofármaco; y por otro lado, es importante difundir en la población en general el mejor uso de las plantas que utilizan para curar sus enfermedades, así como la dosis y toxicidad del mismo. El auge de estudios químicos-farmacológicos de plantas medicinales, ayudará a validar en forma científica su uso y con ello a curar y evitar enfermedades (Design, 2002). Investigaciones recientes enfocadas a determinar el efecto tóxico de plantas medicinales son los trabajos realizados por el grupo de Steenkamp realizados en dos hospitales de Sur África, en donde se dieron cuenta que la mayoría de muertes por envenenamiento provenían de personas adultas y niños que para curar ciertos padecimientos utilizaban plantas medicinales como el *Senecio latifolius*, *Datura stramonium*, *D. feroz* y que contenían cantidades elevadas de alcaloides (pirrolizidina, retrorsina, atropina y escopoletina) hepatotóxicos (Steenkamp y col., 2000, 2001, 2005). Estos alcaloides son hepatotóxicos y que en pequeña dosis provoca severos efectos tóxicos. El estudio ayudó para que a las comunidades se les diera información de las consecuencias fatales que el consumo excesivo de estas plantas medicinales pueden ocasionar.

Las estrategias y plan de acción de la OMS para el 2002–2005 es reducir el exceso de mortalidad, morbilidad y discapacidad, especialmente en poblaciones subdesarrolladas. Puesto que la MT es una forma de atención sanitaria muy accesible y asequible en muchos países con ingresos bajos, por esto la OMS promueve su inclusión — dada la seguridad y eficacia. Para ello se han establecido los siguientes objetivo: a) integrar la MT a los sistemas nacionales de salud mediante el desarrollo y la implementación de políticas y programas; b) fomentar la seguridad, eficacia y calidad de la MT; c) aumentar la disponibilidad y asequibilidad y d) fomentar el uso terapéutico (Design, 2002).

Para poder obtener los beneficios que posee una especie vegetal con propiedades medicinales es necesario tomar en cuenta ciertos factores como la recolección y conservación de las plantas, ya que las células vegetales, desde el momento de su recolección, sufren un cierto número de transformaciones biológicas. Así al separar la parte aérea de la raíz, provoca una interrupción del flujo alimenticio y de transpiración. Las enzimas que contiene, y que antes favorecían la formación de materias activas, empiezan a descomponerla. En el organismo vegetal, estas reacciones de síntesis bioquímica, comienzan a transformarse por reacciones de degradación. Estas transformaciones son manifestadas por el producto en forma

de olor, modificación del color, etc. Una incorrecta recolección y desecación, aumenta la cantidad de productos de degradación, perdiendo la planta parte de su calidad y cantidad de principios activos (Williamson y col., 1998). Por lo tanto, también es importante y necesario aprender a tomar las medidas adecuadas para su colecta, como son: el tiempo y periodo de crecimiento de la planta, ya que esto impide obtener una buena cantidad y calidad de los principios activos que posee la especie vegetal (Tabla 8) (BPAR, 2003; Williamson y col., 1998). Por otro lado, las condiciones climatológicas, como la duración del día, la humedad y la temperatura en el campo, influyen en las cualidades físicas, químicas y biológicas de las plantas medicinales. El suelo debe contener concentraciones adecuadas de nutrientes, materia orgánica y otros elementos, para garantizar un crecimiento y una calidad óptimos de la planta medicinal. Las condiciones del suelo óptimas —como el tipo de suelo, el drenaje, la retención de agua, la fertilidad y el pH— dependerán de la especie de planta medicinal seleccionada y en su caso, de la parte de la planta destinada, para obtener un rendimiento alto es necesario aplicar fertilizantes a las plantas. En la práctica, se usan abonos orgánicos y químicos, pero no deben usarse como abono; excrementos humanos y estiércol animal, dado que pueden contener microorganismos o parásitos infecciosos. Estos deben aplicarse con moderación a las necesidades de la planta, así mismo deben reducirse al mínimo la lixiviación (BPAR, 2003).

La recolección de especies tanto silvestres como de cultivo requiere de una especial atención y dedicación en determinadas épocas del año según las especies a recolectar. Una parte de una planta determinada recolectada antes de la floración o después de ella no tendrá los mismos principios activos, al igual que si se recolecta en día soleado o nublado variará su composición en aceites esenciales. Por consiguiente no es conveniente guardar las plantas más de un año si se requieren para uso fitoterapéutico (Domínguez, 1973; BPAR, 2003).

Tabla 8. Recomendaciones para la colecta de las especies vegetales

PARTE DE LA PLANTA	RECOLECCIÓN	HORA DE RECOLECCIÓN	SECADO	CONSERVACIÓN
RAIZ	En primavera y/ u otoño	Después de una semana lluviosa. En un día soleado por la mañana entre las 10-11 a. m	Colocar en tela o papel, con el fin de transpirar. Cepillarlas p/ eliminar la tierra, cortarlas en trozos de 1 cm. Exponer al sol sobre una tela.	En botes de vidrio opacos con tapón de caucho o de aluminio.
TALLO y/ u HOJAS	Antes de florecer	Después de una semana lluviosa. En un día soleado por la mañana entre las 10-11 a. m	Sin desprender hojas y tallos, se amarran en ramilletes y se cuelgan en un cuarto airado	En botes de vidrio opacos con tapón de caucho o de aluminio
FLORES	Al florecer y antes de que aparezcan los frutos	Después de una semana lluviosa. En un día soleado por la mañana entre las 10-11 a. m	Colocarlas sobre papel de estraza en un cuarto airado	En botes de vidrio opacos con tapón de caucho o de aluminio
SEMILLAS Y FRUTOS	No deben estar verdes ni maduros	Después de una semana lluviosa. En un día soleado por la mañana entre las 10-11 a. m	Exponer al sol en un lugar airado	Caja de cartón o en un recipiente inoxidable.

2.3. Plantas medicinales con actividad antimicobacteriana

Dada la problemática que representa la TB en los sistemas de salud del mundo, es necesario buscar nuevos compuestos, que sean más efectivos que los fármacos antimicobacterianos, actualmente en uso. Para ello, diversos investigadores han realizado evaluación de diversas plantas medicinales cuyos extractos íntegros han mostrado importante actividad antimicobacteriana contra diferentes especies de *Mycobacterium* no tuberculosas como *M. phlei*, *M. smegmatis*, *M. avium* (McCutcheon y col., 1992; Salie y col., 1996; Fischer y col., 1996), así como contra *M. tuberculosis* (Kobaisy y col., 1997; Fischer y col., 1996; Lall y Meyer, 1999)

Para ello, los investigadores han utilizado diferentes metodologías como: Difusión de agar (McCutcheon y col., 1997) y el radiorespirométrico BACTEC 460 (Cantrell y col., 1998 y 1999a; Caldwell y col., 2000; Wächter y col., 2001a y 2001b). Independientemente del método utilizado, estos han corroborado la actividad biológica de las plantas medicinales y han logrado aislar diversos metabolitos secundarios con importante actividad antimicobacteriana *in vitro*.

Un trabajo realizado en 308 extractos etanólicos de 250 plantas medicinales usadas contra infecciones bacterianas en la Unión Soviética empleando bacterias gram-positivas; gram-negativas y *M. smegmatis* como microorganismos de prueba, encontraron que el 67.2% de las plantas evaluadas presentaron actividad antibacteriana y el 28% fueron muy activas. Las familias botánicas con especies activas fueron: *Aceraceae*, *Asteraceae*, *Betulaceae*, *Pinaceae*, *Rutaceae* y *Polypodiaceae*, entre otras (Moskalenko, 1986). Similarmente a este estudio también se probaron plantas usadas para el tratamiento de enfermedades infecciosas en la Medicina Tradicional China, en donde evaluaron 19 especies de plantas contra diez bacterias patógenas incluyendo *M. smegmatis*. La planta Huangqin (*Scutellaria sp*) mostró una actividad ≤ 100 $\mu\text{g/mL}$ contra *M. smegmatis*. Esto demostró que el 5.2% del total de las plantas probadas poseen actividad antimicrobiana (Franzblau y Cross, 1986). Por otro lado, en 1992 se reportó la evaluación de plantas medicinales nativas de British Columbia con actividad antibiótica contra *M. phlei*, *M. avium* y *M. tuberculosis*. Estas plantas son usadas para la tos, TB, diarrea y disentería, entre otros usos. En los primeros estudios realizados se evaluaron 96 especies vegetales de las cuales 85 de 89 extractos evaluados fueron activos contra *M. phlei* (McCutcheon y col., 1992). A partir de estos resultados se continuaron las investigaciones de

tipo biodirigido de las especies que mostraron mayor actividad como son: [*Moneses uniflora* (Ericaceae) y *Oplopanax horrindus* (Araliaceae)]. De la primera especie se aislaron sus compuestos [8-cloro-2,7-dimetil-1,4-naftoquinona (8-clorochimaoilina); chimafilina; 3-hidroxichimafilina; 2,7-dimetil-1,3-dihidroxi-naftil 4-O- α -L-ramnopiranosida; 2,7-dimetoxi-1,4,8-trihidroxi-naftaleno], pero al ser evaluados contra *M. avium* y *M. tuberculosis*, tanto el extracto como los compuestos puros no resultaron activos contra ninguna de las micobacterias probadas (Saxena y col., 1996). De *Oplopanax horrindus* se obtuvieron cinco compuestos de tipo poliino siendo el falcarinol y acetato de oplopandiol los más activos mostrando CMI de 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ contra *M. avium* y *M. tuberculosis* (Kobaisy y col., 1997).

Fischer (1996), Cantrell y col., (1996) y otros grupos han explorado la actividad antimicobacteriana de numerosas plantas medicinales, tanto de los extractos como de algunos de sus compuestos químicos aislados mediante fraccionamiento químico biodirigido, utilizando como ensayo biológico el método radiorespirométrico BACTEC 460 contra *M. tuberculosis* H37Rv. Los resultados indicaron que seis especies (*Borrchia frutencens*, *Chrysoma pauciflosculosa*, *Erigeron philadelphicus*, *Magnolia grandiflora*, *Melia volkensii* y *Montanoa speciosa*) fueron las más activas. De *B. frutencens* se aislaron tres triterpenos (24R)-24,25-epoxicicloartan-3-ona, (3 β ,24R)-24,25-epoxicicloartan-3-ol y (23R)-3-oxolanosta-8,24-dien-23-ol); los dos primeros presentaron una CMI de 6 y 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectivamente. El tercero resultó poco activo con una CMI de 128 $\mu\text{g}/\text{mL}$ contra *M. tuberculosis*. Otros ejemplos se describen en la (Tabla 9).

Tabla 9. Actividad Antimicrobacteriana de los extractos y/o compuestos de algunas plantas medicinales

ESPECIE VEGETAL	EXTRACTO Y COMPUESTOS	<i>M.tuberculosis</i> MIC (µg/mL)	REFERENCIA
<i>Borrichia frutencens</i>	Ext. MeOH	<100	(Fischer y col., 1996; Cantrell y col., 1996)
	* (24R)-24,25-epoxicicloartan-3-ona	6	
	* (3β,24R)-24,25-epoxicicloartan-3-ol	8	
	* (23R)-3-oxolanosta-8,24-dien-23-ol	128	
<i>Chrysoma pauciflosculosa</i>	* Lactona matricaria	12.5	(Fischer y col., 1996)
	* Ester de dehidromatricaria	25	
	* Ester 10-angeloiloxi-cis-matricaria	25	
<i>Erigeron philadelphicus</i>	* Lactona matricaria	12.5	(Fischer y col., 1996)
<i>Magnolia grandiflora</i>	Ext. MeOH	<100	(Fischer y col., 1996)
	* Partenólida	16	
	* Costunólida	32	
	* 1-10-epoxicostunólida	64	
<i>Melia volkensii</i>	Ext. MeOH	100	(Cantrell y col., 1999a)
	* 12β-hidroxikulactona	16	
	* 6β-hidroxikulactona	4	
	* Kulonato	16	
<i>Inula helenium</i>	Ext. CH ₂ Cl ₂	<100	(Cantrell y col., 1999b)
	* Alantolactona	32	
	* Isoalantolactona	32	
	* 4α,(15)-epoxiisovalantolactona	32	
<i>Montanoa speciosa</i>	* 5α-epoxialantolactona	8	(Quijano y col., 1991)
	* Encelina	16	
	* 1.2-dehidro-3-epi-isotelekina	32	
<i>Rudbeckia subtomentosa</i>	* Alloalantolactona	32	(Cantrell y col., 1999b)
<i>Saussurea lappa</i>	* costunolide	32	(Cantrell y col., 2001)
	* dehidrocostuslactona	2	
<i>Helenium aromaticen</i>	* aromaticina	16	(Cantrell y col., 2001)
<i>Euthamia leotocephala</i>	* curcufenol	16	(Cantrell y col., 2001)
<i>Magnolia acuminata</i>	* nerodiol	32	(Cantrell y col., 2001)
<i>Azorella madreporica</i>	* 9,12-ciclomulina-13-ol	20	(Cantrell y col., 2001)
<i>Junellia tridens</i>	* ácido 3-epioleanolico	16	(Cantrell y col., 2001)
	* ácido oleanonico	16	
<i>Lucas vollensii</i>	* (E)-fitol	2	(Cantrell y col., 2001)

De *Chrysoma pauciflosculosa* se obtuvieron poliacetilenos; el éster de dehidromatricarina y éster 10-angeloiloxi-cis-matricarina mostraron la misma CMI de 25 µg/mL contra *M. tuberculosis*. En tanto la especie *Erigeron philadelphicus* que también contiene constituyentes poliacetilenos, como la lactona matricaria, al ser evaluado este compuesto contra *M. tuberculosis* mostró una CMI de 12.5 µg/mL (Fischer y col., 1996). Los compuestos de *Magnolia grandiflora*, fueron los más activos, siendo lactonas sesquiterpénicas (partenólida, costunólida y 1,10-epoxicostunólida) cuyas CMI fueron de 16, 32 y 64 µg/mL, respectivamente (Fischer y col., 1996).

Cantrell y col., (1999a) realizó el estudio de la actividad antimicobacteriana de la especie *Melia volkensii*. Del extracto metanólico (CMI 100 µg/mL) aislaron cuatro triterpenos de tipo eufano los dos primeros fueron estructuras nuevas; 12β-hidroxikulactona, 6β-hidroxikulactona, kulonato y kulactona siendo la CMI para los tres primeros de 16, 4 y 16 µg/mL respectivamente. El estudio de otras especies de la familia Asteraceae: *Inula helenium*, *Rudbeckia subtomentosa*, *R. mollis* y *Montanoa speciosa* indicaron que estas especies presentaban actividad antimicobacteriana *in vitro* (Cantrell y col., 1999b). Del extracto CH₂Cl₂ de *Inula helenium* se aislaron eudesmanolidos: alantolactona, isoalantolactona y 11αH,13-dihidroisoalantolactona cuyas CMI fueron de 8 y 32 µg/mL. A partir de alantolactona e isoalantolactona se realizó una reacción de epoxidación para obtener la 5α-epoxialantolactona y 4α,(15)-epoxiisoalantolactona con CMI de 8 y 32 µg/mL respectivamente. Del extracto CH₂Cl₂ de *Rudbeckia subtomentosa* se aisló alloalantolactona que al ser probado contra el *M.tuberculosis* dio una CMI de 32 µg/mL. La encelina y 1,2-dehidro-3-epi-isotelequinina aislados de *Montanoa speciosa* mostraron CMI de 16 y 32 µg/mL, respectivamente (Quijano y col., 1991).

Del extracto metabólico de *Ajuga remota* se aisló el ergosterol-5,8-endoperoxido, los diterpenos clerodina, ajugarina-I, ajungarina-II, que al ser evaluados contra *M. tuberculosis* siendo el más activo el ergosterol-5,8-endoperoxido (CMI = 1 µg/mL) y su derivado acetilado acetato de ergosterol-5,8-endoperoxido (8 µg/mL); mientras que el ergosterol, ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3β-ol mostraron CMI >128 µg/mL. La clerodina, ajugarina-I y ajungarina-II resultaron inactivos (Cantrell y col., 1999c).

Estudios realizados con la flora medicinal de Sudáfrica seleccionaron 20 especies utilizadas para tratar la TB (Lall y Meyer, 1999), probaron dos extractos (acetónico y acuoso)

de cada especie contra *M. tuberculosis* H37Rv empleando el método radiorespirométrico BACTEC 460. Las especies activas fueron *Ekebergia capensis*, *Euclea natalensis*, *Nidorella anomala* y *Polygala myrtifolia* cuyas CMI fue de 0.1 mg/mL.

Por otro lado, en Turquía realizaron estudios biológicos en la determinación de la evaluación antimicobacteriana de plantas acuáticas (macroalgas) de las especies: *Cladophora fracta*, *Cladopora glomerata*, *Spyrogyra gratiana*, *Maugeotia sp.*, *Elodea canadienses* y *Ranunculus rionii*. De estas especies se evaluaron sus extractos etanólicos contra *M. tuberculosis* H37Ra, las dos algas que presentaron actividad fueron *Maugeotia sp* y *Cladophora fracta* mostrando una CMI de 200 y 50 µg/mL, respectivamente (Orhan, 2002).

En América Latina existen otros tipos de programas enfocados a explorar el potencial farmacológico de especies vegetales como el Grupo de Biodiversidad Cooperativa Internacional (ICBG), para buscar agentes bioactivos de plantas terrestres. En Chile, a diferencia de los estudios biodirigidos realizados con plantas medicinales para la obtención de extractos o compuestos activos, llevaron a cabo un estudio donde aislaron compuestos bioactivos a partir de algas marinas procedentes de la costa chilena. Del alga morena *Lessonia nigrescens* que sirve de alimento en la comunidad, se aisló un alcohol diterpeno (Saringosterol) cuyo valor de CMI fue de 0.25, 1 y 0.125 µg/mL para el derivado 24R y 24S, respectivamente (Wächter y col., 2001b). Estudios recientes han demostrado que la estereoquímica de los compuestos influye enormemente sobre la actividad antimicobacteriana, tal es el caso del saringosterol cuyas CMI's varían dependiendo de su estereoquímica.

En Nuevo León, México realizaron la evaluación antimicobacteriana contra *M. tuberculosis* H37Rv y una cepa resistente (CIBIN:UMF:15:99) así mismo las plantas fueron seleccionadas para tratar diversas enfermedades (afecciones pulmonares y expectorantes, bronquitis, neumonía, asma, tos y gripe). Se evaluaron los extractos orgánicos (hexánico, acetónico y metanólico) y acuoso de las especies *Marrubio vulgare*, *Mentha spicata*, *Artemisia ludoviciana*, *Chenopodium ambrosoides* y *Flourensia cernua*; los extractos de las especies que resultaron más activas contra *M. tuberculosis* fue el hexánico de *Artemisia ludoviciana* presentando una CMI de 200 µg/mL para las dos cepas probadas. El extracto acetónico de *Flourensia cernua* mostró una CMI de 200 y 100 µg/mL para *M. tuberculosis* H37Rv y para la cepa resistente (CIBIN:UMF:15:99), respectivamente; mientras que el extracto hexánico fue de 50 y 25 µg/mL (Molina-Salinas y col., 2006).

3. Fundamento Teórico

3.1. Métodos utilizados para la determinación de la susceptibilidad de *Mycobacterium tuberculosis*.

Los ensayos biológicos más comúnmente utilizados para evaluar la posible actividad antimicobacteriana de compuestos de origen natural y sintéticos son: el método de difusión en caja, el método de proporción múltiple, el radiorrespirométrico y más recientemente se han desarrollado dos ensayos de tipo colorimétrico en donde se utilizan sustancias cromogénicas para detectar el crecimiento de las micobacterias en presencia de la sustancia de prueba.

La metodología que se usa como referencia para la detección de susceptibilidad a los medicamentos es el método de las proporciones múltiples (Van Puyvelde y col., 1994); es costosa, laboriosa y requiere un tiempo prolongado para emitir el resultado hasta tres semanas. Por ello, es indispensable implementar nuevas técnicas que reduzcan el tiempo y el costo para la detección de la susceptibilidad a los medicamentos. Ejemplo de ello es el sistema radiorrespirométrico BACTEC 460 considerado por la FDA como estándar de oro para determinar drogosensibilidad y ofrece resultados en poco tiempo (10 días), pero sus mayores inconvenientes son el uso de material radioactivo y su elevado costo (Caldwell y col., 2000; Cantrell y col., 1999a, 1999b, 1999c; Wächter y col., 2001a y 2001b). Actualmente, este ensayo se ha discontinuado y se ha desarrollado un sustituto que es el tubo indicador de crecimiento (*Mycobacteria Growth Indicator Tube*, MGIT) que utiliza un indicador fluorescente sensible a los cambios de presión, pero este ensayo aún no está totalmente evaluado y registra altos porcentajes de contaminación dada la riqueza del medio y el uso de tubos con taparroscas. Este último parámetro ha sido mejorado en el nuevo sistema BACTEC MGIT 960 y que sustituye al BACTEC 460 (Palaci y col., 1996; Tortorli y col., 2002; Scarparo y col., 2004).

En muchas ocasiones el uso de estos métodos provoca el deterioro de las sustancias a evaluar, ya que son ensayos tardados y además requieren de grandes cantidades (en gramos) de extracto.

Así mismo, las técnicas basadas en la difusión del antibiótico en placas de agar como el E-test ayudan en la determinación rápida de farmacorresistencia (Wanger y Mills, 1996; Hausdorfer y col., 1998).

Los indicadores de viabilidad celular, como el alamar azul (Collins y Franzblau, 1997; Franzblau y col., 1998) o resazurina, permiten detectar crecimiento, viabilidad y susceptibilidad de *M. tuberculosis* a los medicamentos (Yajko y col., 1995). Para detectar esta susceptibilidad se emplean microplacas de cultivo de 96 pozos con medio líquido, y de acuerdo con el indicador utilizado se conocen como REMA (*resazurin microtiter assay*) (Palomino y col., 2002; Martín y col., 2003) y MABA (*microdilution alamar blue assay*) (Collins y Franzblau, 1997; Franzblau y col., 1998; Pietro y col., 2000). Otro colorante usado es la sal de tetrazolium MTT (bromuro de 3(4,5-dimetiltizol-2-l)-2,5-difeniltetrazolio) útil en ensayos de proliferación y citotoxicidad de células eucariotas (Mosmann, 1983; Berridge y col., 1996; Mshana y col., 1998). Su incorporación en cultivos líquidos de *M. tuberculosis*, realizados en microplacas, permite determinar rápidamente la susceptibilidad a los diferentes agentes antibacterianos (Abate y col., 1998; De Logu y col., 2001).

Actualmente, se ha incrementado el uso del micrométodo colorimétrico Alamar Azul (MABA) ya que ha demostrado buena correlación al realizar estudios comparativos con el método radiorespirométrico sistema BACTEC 460 (Collins y Franzblau, 1997). El ensayo es una buena alternativa para evaluar la actividad de los compuestos puros o extractos crudos provenientes de plantas (Cantrell y col., 2001; Pietro y col., 2000). Con el ensayo se han realizado pruebas de determinación fármaco-sensibilidad tanto a cepas de referencia como aislados clínicos (Luna-Herrera y col., 2003; Mijares, 2003). Las ventajas que posee este método son: alta sensibilidad, reproducibilidad, rapidez con resultados de 7–10 días y de bajo costo (Caviedes y col., 2002; Yajko y col., 1995). Para este ensayo, las cantidades necesarias de extracto y/o compuesto son mínimas (Orhan y col., 2002). Así mismo, se requiere de cantidades pequeñas de medio de cultivo, antibióticos, colorante y es rápido de realizar, el tiempo empleado para montar esta prueba con respecto a la técnica de las proporciones múltiples es corto (Acosta y col., 2004).

Por consiguiente, el método MABA es muy utilizado en la actualidad para la búsqueda de sustancias con actividad antimicobacteriana provenientes de fuentes naturales y sintéticas (Jiménez-Arrellanes y col., 2003; Álvarez, 2002; Molina-Salinas y col., 2006; Case y col., 2006; Martín y col., 2003; Palomino y col., 2002; Banfi y col., 2003; Fukushima y col., 2002; Acosta y col., 2004; Pietro y col., 2000).

La prueba del Alamar Azul utiliza un colorante vital como indicador de crecimiento y viabilidad que es la resazurina, que en presencia de las micobacterias sufre una reducción, que se detecta por cambio de coloración. En estado oxidado el colorante es de color azul y en estado reducido es de color rosa. Inicialmente este colorante fue utilizado por Yajko para determinar la susceptibilidad de *M. tuberculosis* a los medicamentos, obteniendo buenos resultados y una buena concordancia con el método de las proporciones múltiples (Yajko y col., 1995). Estudios posteriores también mostraron similitud a estos resultados (Franzblau y col., 1998; Palomino y Portaels, 1999). Otros estudios utilizando Alamar Azul como indicador han servido para la determinación de la susceptibilidad de bacterias gram positivas y gram negativas, hongos y levaduras con buenos resultados (Pfaller y Barry, 1994).

La técnica del Alamar Azul es una prueba de bajo costo, rápida, reproducible y promisoría para la detección rápida de farmacorresistencia o susceptibilidad a los fármacos actuales en muestras biológicas obtenidas de pacientes con alto riesgo de presentar TB-MDR y así aportar al laboratorio clínico una herramienta rápida para la detección de casos de TB y para aplicar un tratamiento adecuado y oportuno, además para servir de apoyo a los programas de control de la enfermedad (Robledo y Mejía, 2001).

3.2 Características del Alamar Azul

El ensayo del Alamar Azul está diseñado para medir cuantitativamente la proliferación de varias líneas celulares vivas humanas y animales, además de bacterias y hongos. Así mismo, se usa para determinar viabilidad celular. El indicador del Alamar Azul es la resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazin-3-ona-10-óxido sal de sodio) (a), que es el N-óxido de la resorufina (b) (Figura 15) y puede detectarse en forma visual, en espectrofotómetro ó en fluorómetro (Patente de los EUA No. 5,501959; R&D Systems, Inc. 1-800-343-7475). El NADPH o el NADH es el reductor que convierte la resazurina a resorufina respectivamente (Sigma-Adrich, 2004).

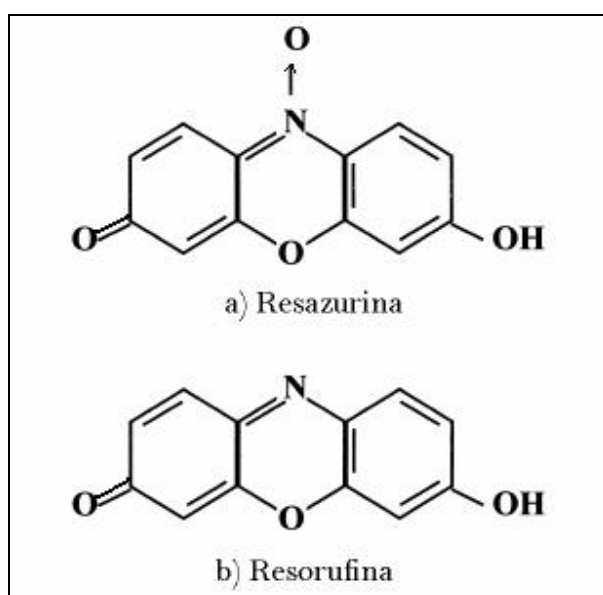


Figura 15. (a) Estructura química de la resazurina, (b) Estructura química del resorufina (O'Brien y col., 2000)

El Alamar Azul se puede cuantificar en un rango de absorbancia de 570-600 nm (Figura 16), es soluble en DMSO o agua, su almacenamiento puede ser de 12 semanas en un lugar oscuro a temperatura ambiente, si se desea prolongar la vida del anaquel se recomienda colocarlo entre 2-8°C incrementándolo hasta 20 semanas, así mismo puede conservarse congelado a -70°C indefinidamente, solo se recomienda que cuando sea reutilizado se caliente a 37°C y se agite para que se mezclen bien todos sus componentes. Otra ventaja del Alamar

Azul es su mínima toxicidad para las células (*in vivo e in vitro*) y su estabilidad en las condiciones del ensayo (temperatura ambiente), así mismo es económico, rápido y no utiliza radioactividad (Reis y col., 2004).

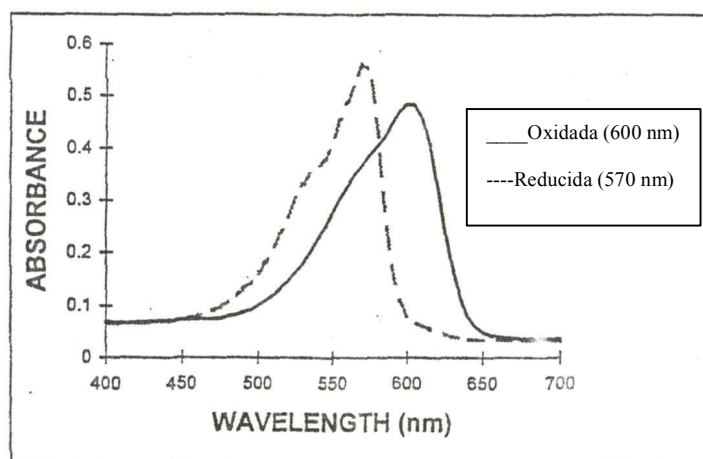


Figura 16. Absorbancia del Alamar Azul (Patente de los EUA No. 5,501959)

4. Planteamiento del problema

En México hay una gran variedad de plantas medicinales usadas para tratar enfermedades de las vías respiratorias incluyendo la tuberculosis y cuyas propiedades terapéuticas no se han sustentado científicamente. En este trabajo se propone la evaluación de la actividad antimicobacteriana de 23 especies vegetales seleccionadas de la medicina tradicional mexicana y colectadas en el interior de la República Mexicana. Esta propuesta es muy relevante si se considera que la tuberculosis es un problema de salud pública emergente, debido a la aparición de cepas de *M. tuberculosis* MDR.

Algunas de las causas del resurgimiento de la tuberculosis son: la migración, la aparición de cepas resistentes a los fármacos, ya que algunas cepas presentan resistencia hasta a cuatro diferentes fármacos; el abandono del paciente al tratamiento, entre otras causas. Esto, obliga a una urgente necesidad de buscar nuevos compuestos para el tratamiento de la TB. Las plantas son utilizadas en la medicina tradicional y pueden servir como una fuente potencial para encontrar extractos y/o compuestos con actividad antimicobacteriana, así también pueden servir como una alternativa para el tratamiento de la enfermedad.

5. Objetivos

e

6. Hipótesis

5. Objetivo General:

Determinar la actividad antimicobacteriana *in vitro* de los extractos: hexánico, metanólico y acuoso de 23 plantas medicinales usadas en la medicina tradicional mexicana.

5.1 Objetivos Específicos:

5.1.1. Recopilar y analizar la información etnobotánica contenida en las colecciones de plantas medicinales (Aguilar y col., 1994; Argueta y col., 1994; Glasby, 1991; Berlin col., 1996a y 1996b). Preseleccionar las especies susceptibles a la evaluación de la actividad antimicobacteriana, a partir del análisis de la información etnobotánica consistente en las colecciones.

5.1.2. Colectar y realizar las operaciones preliminares previas a la preparación de extractos de 23 especies preseleccionadas.

5.1.3. Preparar los extractos hexánico, metanólico y acuoso de las 23 especies seleccionadas.

5.1.4. Determinar la actividad antimicobacteriana *in vitro* de los extractos de las 23 especies vegetales seleccionadas, utilizando el micrométodo colorimétrico del Alamar Azul y como microorganismos de prueba:

a) *M. tuberculosis* H37Rv y *M. avium*.

5.1.5. Determinar la actividad antimicobacteriana *in vitro* de los extractos, que resulten más activos, en el inciso punto (5.1.4), utilizando el micrométodo colorimétrico del Alamar Azul y como microorganismos de prueba:

a) Cepas de *M. tuberculosis* H37Rv resistentes a los fármacos: INH, S, RFM y EMB.

b) Ocho aislados clínicos de *M. tuberculosis*.

c) Once cepas no tuberculosas: *M. avium*, *M. simiae*, *M. scrofulaceu*, *M. smegmatis*, *M. microti*, *M. xenopi*, *M. fortuitum*, *M. kansasii*, *M. flavescens*, *M. duvalli* y *M. chelonae*

- 5.1.6. Realizar el fraccionamiento químico biodirigido, del extracto hexánico de la especie más activa.
- a) Fraccionar el extracto hexánico activo vía cromatografía en columna.
 - b) Evaluar las fracciones obtenidas en el inciso anterior, empleando el ensayo que se describe en el punto (4).
 - c) Separar y purificar los compuestos presentes en las fracciones activas empleando diversos métodos cromatográficos.
 - d) Evaluar los compuestos de las fracciones activas, empleando el ensayo que se describe en el punto (4).

6. Hipótesis

El análisis de la información etnobotánica y la determinación de la actividad antimicobacteriana *in vitro* de los extractos hexánico, metanólico y acuoso de las especies vegetales seleccionadas puede conducir a una identificación apropiada de plantas medicinales que poseen compuestos activos contra diferentes especies de *Mycobacterium*.

A partir de la información etnobotánica previamente estudiada en la selección de plantas medicinales que mostraron actividad antimicobacteriana nos conduce a una mejor selección en los extractos activos contra *M. tuberculosis* y por consiguiente, una buena separación de los compuestos activos responsables de la actividad biológica.

7. Metodología

7.1. Selección y colecta de las Especies vegetales

La selección de las plantas medicinales se realizó mediante el análisis de la información etnobotánica descrita en algunas fuentes bibliográficas (Aguilar y col., 1994; Argueta y col., 1994) existentes en el Herbario IMSSM del Instituto Mexicano del Seguro Social. Los criterios que nos permitieron seleccionar a las especies vegetales fueron en base al empleo que tienen éstas en la medicina tradicional como son: para aliviar la tos y dolor de pecho, dolor de garganta, tos ferina y en general para problemas respiratorios, a partir de esta información se elaboro la Tabla 10 (ver Apéndice 12.4),, donde se describe su distribución geográfica, nombre común y sus usos de cada especie.

De las 54 especies vegetales seleccionadas en la Tabla 10 (ver apéndice 12.4), para la realización de este proyecto únicamente se colectaron 23 plantas en los estados de Chiapas, Distrito Federal Morelos, Oaxaca, Puebla y Veracruz. Los procedimientos que se siguieron para la colecta de cada ejemplar fueron los descritos por Williamson y col., 1998. En la (Tabla 11) se describen algunas especies vegetales que han demostrado tener actividad biológica y propiedades químicas.

7.1.1. Operaciones preliminares

De cada especie vegetal se colectaron aproximadamente 2 Kg de material vegetal fresco, un ejemplar se depositó en el herbario IMSSM y la identificación botánica estuvo a cargo del grupo de la M. en C. Abigail Aguilar. De cada especie vegetal se colecto la parte que se utiliza en la medicina tradicional (hojas, flores, fruto, tallos y/o partes aéreas). Las especies vegetales se secaron a temperatura ambiente y bajo la sombra, este proceso se realizó con la finalidad de eliminar el agua y desactivar sistemas enzimáticos presentes en la planta. Posteriormente, el material vegetal seco de cada especie vegetal fue desintegrado en forma manual y después se fragmenta en un molino de cuchillas Willey, proceso que permitió obtener aproximadamente 600 g de material vegetal seco y molido por especie.

Tabla 11. Antecedentes Químicos y Biológicos de algunas de las Especies Vegetales.

ESPECIE	ACTIVIDAD FARMACOLOGICA	COMPOSICIÓN QUÍMICA	REFERENCIAS
<i>Achillea millefolium</i>	Antiinflamatorias, cicatrizantes. Antihemorrágicas Antiespasmódicas. Antihemorroidal Antirreumáticas, Antipiréticas Antiulcérica, anti-hepatoma, antidiabetis antitumoral antirepelente contra mosquito y Parasimpaticolítica, Efecto antimicobacteriano e inmodulador.	Sesquiterpeno (camazuleno). Aceite esencial cineol, acetato de bornilo, pineno, borneol y alcanfor. La aquilicina, lactonas sesquiterpénicas tipo guaianólico y leukodina. Flavonas, apigenol, luteolol y sus glucósidos. Las betainas (betaina, stachidrina, betonicina, colina). Taninos, ácido cafeico, potasio, clorofila, trazas de acetilénicos y de un heterósido cianogenético.	Tozyo y col., 1994; Petlevski y col., 2001; Fernández, 2001; Liang-Tzung y col., 2002; Tuñón y col., 1994; Cavalcanti y col., 2006; Yacesh y col., 2006.
<i>Artemisia ludoviciana</i>	Espasmódica, inhibición de la transcripción del factor NF-kappa B, Antiparasitaria, antifúngica. Antituberculosa, antimalárica.	Aceite esencial, resina neutra y sales minerales (potasio), sesquiterpenos, lactonas sesquiterpénicas	Aguilar-Contreras y col., 1998; Lee y Geissman, 1970; Molina-Salinas y col., 2006; Lara y Marquez, 1996; Bork y col., 1997; Pike y col., 1997; McCutcheon y col., 1992, 1994, Malagon y col., 1997; Fischer y col., 1998; Cantrell y col., 1998; Linares y Medrano, 2004; Said-Fernández y col., 2005; Luna, 2005.
<i>Bouvardia ternifolia</i>	Hipoglucemiante, antirrábico, efecto antagonico	Triterpenos, hexapeptidos, péptidos	Jolad y col., 1977; Jiménez-Ferrer y col., 2005a y 2005b.
<i>Cassia fistula</i>	Antiinflamatoria, Nematicida, hepaticida, Inhibición de la biosíntesis del leucotrieno, Analgésico, Antitusivo, Antibacteriano, regenerador de tejido, antiamibiano.	Flavonoides, diterpenos, taninos, proantocianidinas	Bhakta y col., 1999a,b; 1998a,b; Khurma y col., 1999; Mazumder y col., 1998; Samy y col., 1998; Misra y col., 1997; Anturlikar y col., 1993; Kashiwada y col., 1990.
<i>Chamaedora tepejilote</i>	Antituberculosa, Antiinflamatoria,	Acido ursólico, escualeno.	Alvarez, 2002; Salazar, 2003; Jiménez-Arrellanes y col., 2005
<i>Gnaphalium semiamplexicaule</i>	Antibacterial. Relajante de músculo liso, estimulante uterino	Flavonoides, triterpenos, hidrocarburos, sesquiterpeno	(Lara y Marquez, 1996)

Continuación de la Tabla 11.

ESPECIE	ACTIVIDAD FARMACOLOGICA	COMPOSICIÓN QUÍMICA	REFERENCIAS
<i>Juniperus communis</i>	Antimicobacteriana, antidiabético, antiartrítica	Monoterpenos, diterpenos, sesquiterpeno, lignanos, taninos, flavonoides, ácidos orgánicos y compuestos glucosilados	Ochocka y col., 1997; Fragoso, 2003; Salazar, 2003; Van Der Werwe y col., 2000; Pepelijnjak y col., 2005; Van Der Weijden y col., 1998; McCutcheon y col., 1992; Cavaleiro y col., 2006; Peláez y col., 2000; Topcu, 1999; Martín y col., 2006; Chatzopoulou y col., 2002; Font, 1980; Duke, 1988; Loew y col., 1991; Glasby, 1991.
<i>Lippia dulcis</i>	Antituberculosis, Antiinflamatorio	Quercetina,, hernandulcino, alcaloides, saponinas, terpenoides, triterpenoides, sesquiterpenos, monoterpenos	Compadre y col., 1985 y 1986; Kaneda y col., 1992; Souto-Bachiller y col., 1996, 1997; Perez y col., 2005.
<i>Malva parviflora</i>	Antimicrobiana; Antiinflamatoria	Esteroles y proteínas	Tadeg y col., 2005; Shale y col., 2005; Sharma y col., 1999; Wang y col., 2000 y 2001
<i>Quercus sp</i>	Inhibidor enzimático Anticancerígeno	Polifenoles, taninos	(Abou-Karam y col., 1999)
<i>Sapindus saponaria</i>	Antihemorrágico, actividad moluscicidal	Saponinas, Flavonoides (luteolina, 4'-metoxiflavona, rutina), Esteroides (β -sitosterol), triterpenoide, (α -amirina, β -amirina)	(Castro y col., 1999; Ribeiro y col., 1995; White, 1999)
<i>Swietenia humillis</i>		limonoides	Okorie y Taylor, 1971; Segura-Correa y col., 1993; Jiménez-Arellanes y col., 1998;

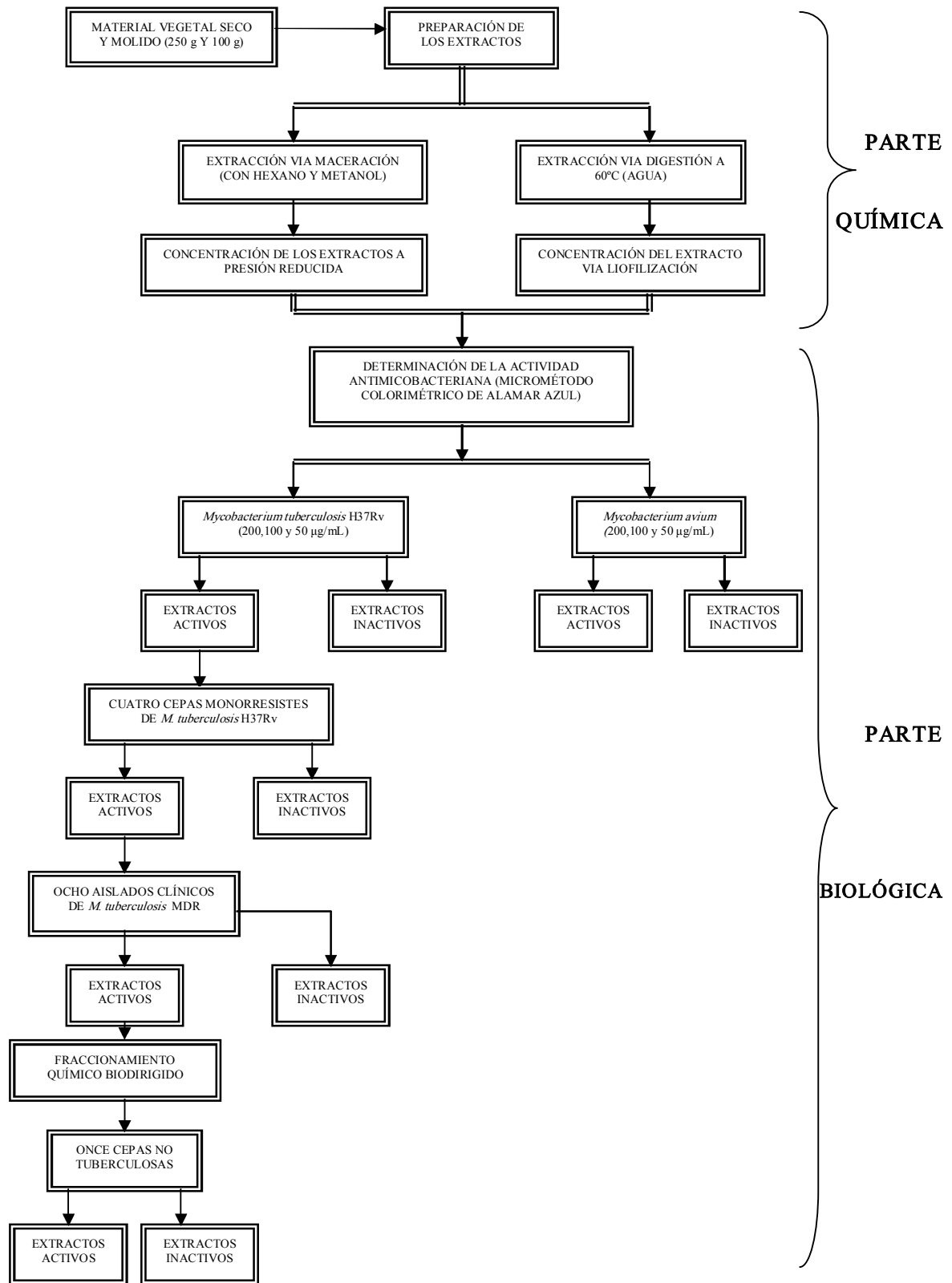
7.2 Preparación de los extractos orgánicos y acuosos

El material químico utilizado para la elaboración de los extractos orgánicos y acuosos de las especies vegetales seleccionadas se describe en el apéndice 12.1.

Los extractos se prepararon siguiendo el Esquema 1, los extractos orgánicos se prepararon vía maceración con de 250 g de material vegetal seco y molido, dejándolo en contacto directo con 600 mL del disolvente (hexano o metanol) durante 72 h a temperatura ambiente. Los extractos acuosos fueron preparados vía digestión a partir de 100 g del material vegetal seco y molido, dejándolo en contacto directo con 150 mL, de agua destilada a 60°C, durante 3 h.

Los extractos orgánicos fueron macerados tres veces de manera consecutiva, con la finalidad de obtener mayor rendimiento del extracto crudo.

Los extractos orgánicos se filtraron y se concentraron a presión reducida y los extractos acuosos fueron concentrados vía liofilización.



Esquema 1. Preparación y evaluación biológica de los extractos hexánico, metanólico y acuoso de las especies vegetales seleccionadas.

7.3 Evaluación Biológica

La evaluación biológica se llevó a cabo en el Laboratorio de Inmunoquímica, del Departamento de Inmunología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del IPN, bajo la supervisión de la Dra. Julieta Luna Herrera.

7.3.1. Microorganismos de prueba

El material y la preparación de las sustancias que se utilizaron se describen en el apéndice 12.2 y 12.3.

Las cepas de *Mycobacterium* fueron incubadas de 2 a 5 semanas dependiendo del crecimiento bacteriano de cada especie en medio Middlebrook 7H9 conteniendo 10% de enriquecimiento OADC.

El inóculo de la cepa se preparó ajustando la suspensión bacteriana al tubo No. 1 del nefelómetro de McFarland que corresponde a 3×10^7 Unidades Formadoras de Colonias (UFC/mL).

Las cepas que se usaron como microorganismos de prueba en la primera etapa del proyecto fueron *M. tuberculosis* H37Rv (ATCC 27294) y *M. avium* (ATCC 35717). Las cepas monorresistentes de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv que se usaron en las siguientes fases del estudio biológico se mencionan en la (Tabla 12). Los aislados clínicos con patrón de fármaco-resistencia determinado se describen en la (Tabla 13) y en la (Tabla 14) se mencionan las cepas de *Mycobacterium* no tuberculosas.

Tabla 12. Cepas monorresistentes de *M. tuberculosis* H37Rv de la colección ATCC

CEPA de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv	CLAVE ATCC
resistente a Estreptomicina	35820
resistente a Isoniazida	35822
resistente a Rifampicina	35838
resistente a Etambutol	35837

Tabla 13. Aislados clínicos de *M. tuberculosis* MDR obtenidas de pacientes con patrón de fármaco-sensibilidad determinadas (Mijares, 2003)

AISLADOS CLÍNICOS <i>M. tuberculosis</i>	CLAVE	PATRÓN DE RESISTENCIA
Sinaloa	Sin-3	Estreptomina, Isoniazida, Rifampicina, Etambutol, Rifabutina, Claritromicina, Etionamida
Sinaloa	Sin-4	Estreptomina, Isoniazida, Rifampicina, Etambutol, Ofloxacina, Claritromicina, Etionamida
Sinaloa	Sin-5	Estreptomina, Isoniazida, Rifampicina, Etambutol, Ofloxacina, Rifabutina, Etionamida
Sinaloa	Sin-6	Isoniazida, Rifampicina, Etambutol, Rifabutina, Etionamida
Hospital General	HG-7	Etambutol, Claritromicina, Etionamida
Hospital General	HG-8	Etambutol, Claritromicina, Etionamida
Chiapas	Chi-121	Isoniazida, Etambutol, Rifabutina
Monterrey	Mty-134	Isoniazida, Rifampicina, Etambutol, Etionamida

Tabla 14. Micobacterias no tuberculosas

CEPAS	CLAVE ATCC
<i>Mycobacterium avium</i>	35717
<i>Mycobacterium chelonae</i>	*
<i>Mycobacterium duvalli</i>	
<i>Mycobacterium flavescens</i>	14474
<i>Mycobacterium fortuitum</i>	*
<i>Mycobacterium kansasii</i>	35775
<i>Mycobacterium microti</i>	35781
<i>Mycobacterium scrofulaceum</i>	35795
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	35798
<i>Mycobacterium simiae</i>	
<i>Mycobacterium xenopi</i>	35841

* Obtenidas de pacientes mexicanos.

7.3.2. Preparación de las muestras a evaluar

Los extractos orgánicos se solubilizaron en dimetilsulfóxido (DMSO), y los acuosos se solubilizaron en agua destilada; se filtraron a través de un filtro millipore de 0.45 mm estériles (Acrodisc Synnqe Filters, Pall Corporation). Todos los extractos se prepararon a una concentración de 20 mg/mL (solución stock), y se mantuvieron en congelación a -70°C hasta su utilización.

A partir de la solución stock, se prepararon diluciones de trabajo adicionando 40 μL de la solución stock y 960 μL de medio 7H9 enriquecido con 10% de OADC. Para obtener una concentración final de 800 $\mu\text{g/mL}$.

Las concentraciones probadas de cada extracto fueron de 200, 100 y 50 $\mu\text{g/mL}$ y para la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), se realizaron diluciones seriadas hasta 6.25 $\mu\text{g/mL}$.

7.3.3. Desarrollo del Micrométodo Alamar Azul (MABA)

El ensayo biológico fue realizado en condiciones estrictas de esterilidad en una campana de flujo laminar tipo P3 y en placas para cultivo de 96 pozos de fondo plano c/tapa estériles (Figura 17).

El ensayo se desarrolló bajo los siguientes pasos:

1. Se adicionaron 200 μL de agua destilada estéril a los pozos de la periferia (A1-A12; H1-H12) de la placa, para mantener la humedad de la placa durante el tiempo de incubación del ensayo, como se observa en la (Figura 17) (color azul).
2. Posteriormente, se adicionaron 100 μL de medio Middlebrook 7H9 enriquecido con 10% de OADC a los 60 pozos de las columnas y filas restantes (B2-B11; C2-C11; D2-D11; E2-E11; F2-F11 y G2-G11), como se observa en la (Figura 17) (color amarillo).

Agua y Medio de Cultivo

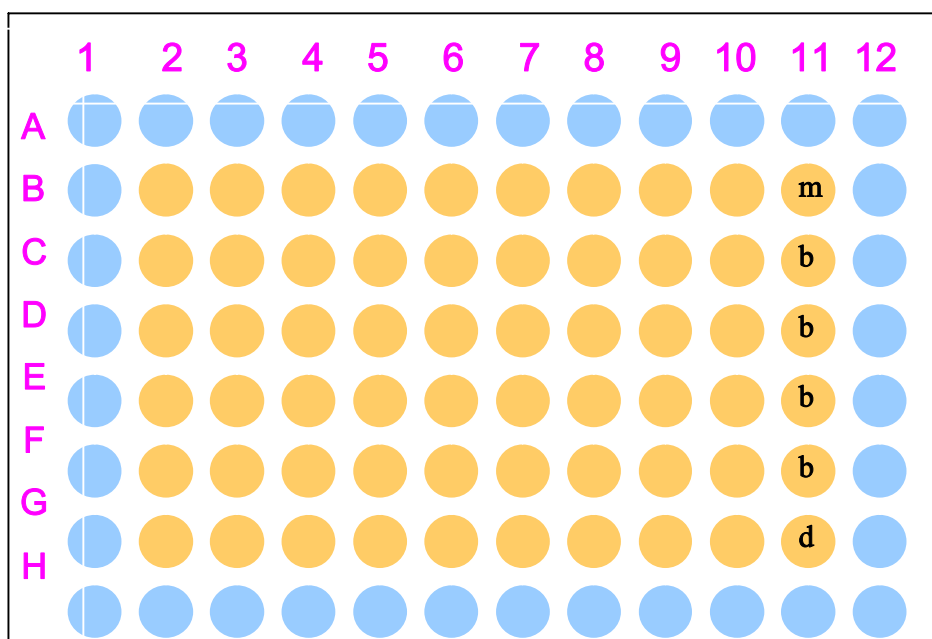


Figura 17. Adición del agua y del medio de cultivo en la placa de 96 pozos de fondo plano.

- De la solución de trabajo se tomaron 100 μL y se adicionaron a los pozos de las filas B2-B10 y E2-E10, (Figura 18), que corresponden a la 1^a dilución 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (filas B y E) y de este pozo se hacen diluciones seriadas a la fila (C y D; F y G) para obtener concentraciones de 100 y 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Los pozos de la columna 11B a 11G, se dejaron para los tres controles: uno que contiene únicamente el medio de cultivo (**m**); cuatro sin extracto, que contiene el medio de cultivo y la suspensión bacteriana (**b**) y uno que contiene el medio de cultivo con la suspensión bacteriana diluida (1:100) (**d**), este último nos sirvió como referencia para identificar aquellos extractos capaces de inhibir el 99% de la población bacteriana.

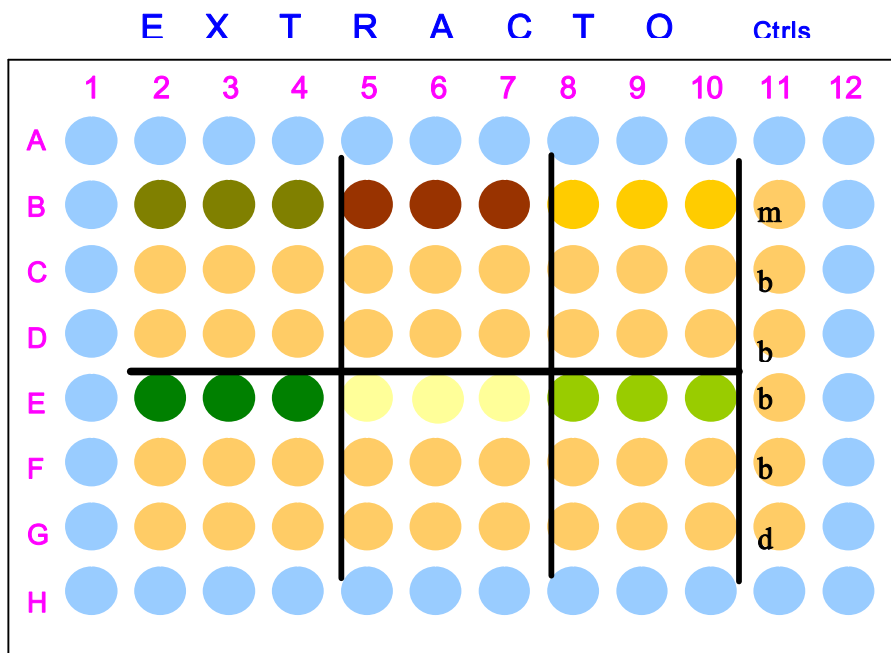


Figura 18. Distribución de soluciones de trabajo (extractos) y controles en la microplaca.

- El inóculo de la cepa de micobacteria se ajustó al tubo No. 1 del nefelómetro de McFarland que corresponde a su concentración del microorganismo de 3×10^7 UFC/mL. De esta suspensión se realizó una dilución con el medio 7H9 de 1:20 para *M. tuberculosis* ó 1:50 para las cepas no tuberculosas.
- Por último, se adicionaron 100 μ L del inóculo diluido a todos los pozos con muestra problema y controles (**b**); a los pozos de los controles (**d**) se adicionaron 2 μ L de esta suspensión bacteriana y 98 μ L del medio 7H9, en la (Figura 19).

INOCULACIÓN

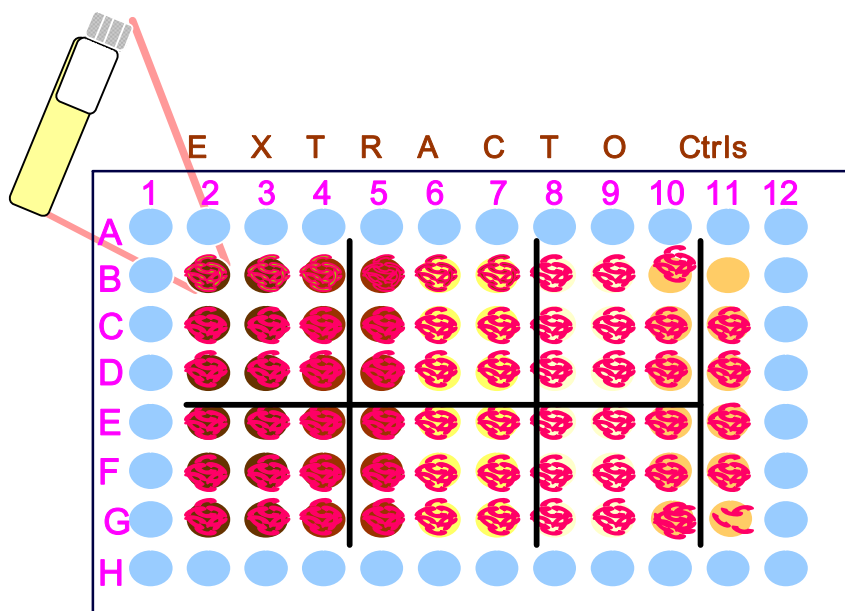


Figura 19. Inoculación de la suspensión bacteriana en los pozos de la microplaca.

6. Al terminar la preparación de la placa, se colocó en una bolsa de plástico transparente y se cerró con una liga.
7. Finalmente, se dejó incubar por 24 h a 37°C.
8. Una vez, transcurrido el tiempo de incubación (dependiendo de cada cepa de micobacteria), se procedió a adicionar 12 μ L de Tween 80 y 20 μ L del alamar azul a uno de los pozos de los controles (**b**), como se muestra en la (Figura 20) dejando incubar la placa por 24 h más a 37°C.
9. En la (Figura 21), se observa el cambio de coloración del indicador (azul a rosa), en el control **b**, lo que indica que hubo un crecimiento óptimo, por lo que se procede con el experimento.

Controles

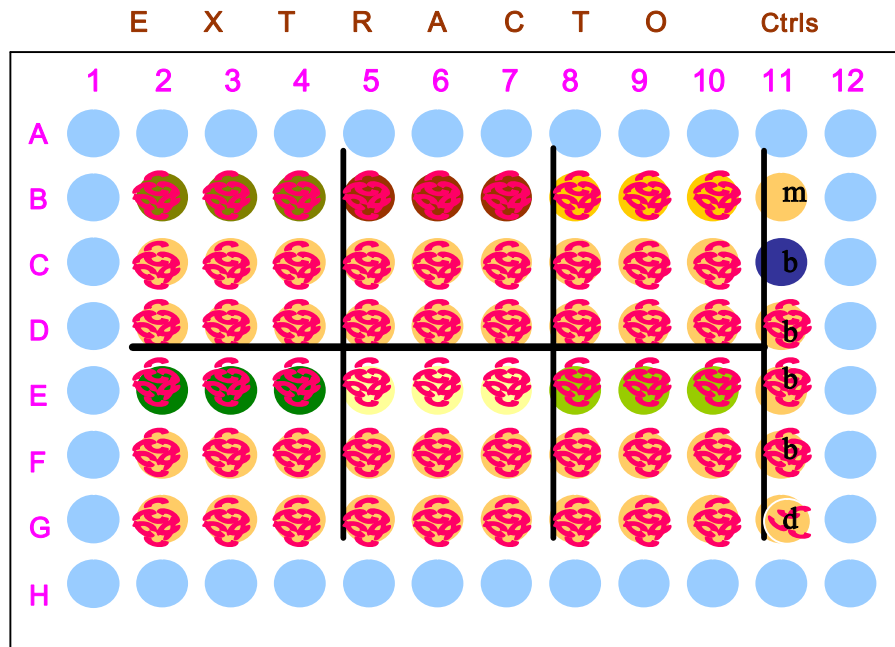


Figura 20. Adición del indicador Alamar Azul y el Tween 80 en el control (b).

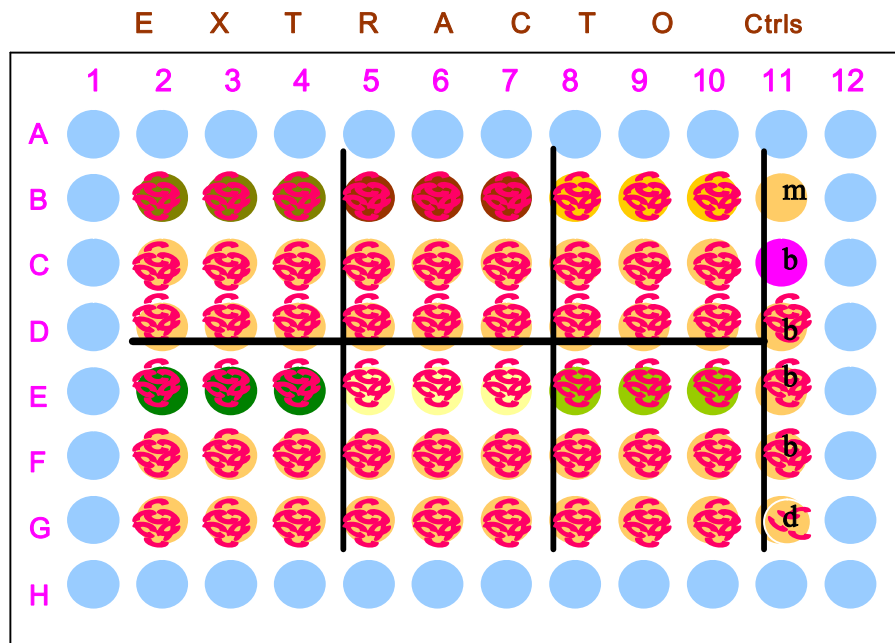


Figura 21. Reacción redox del Alamar Azul, en caso de que el crecimiento de la micobacteria sea óptimo.

10. Al observar el cambio de coloración en este control se adiciona Alamar Azul y Tween 80 al resto de los pozos de la placa, y nuevamente se deja incubar la placa por 24 h a 37°C. Transcurrido este último tiempo de incubación se toma la lectura de la placa, y la referencia es el color del control (**d**). Aquellos pozos que permanen de color azul, indican que los extractos inhibieron el crecimiento micobacteriano, por lo tanto son activos; en cambio aquellos pozos que cambiaron de coloración (de azul a rosa), demostraron que los extractos no son capaces de inhibir el crecimiento de las micobacterias.
11. Para determinar la actividad de un extracto, se consideró el siguiente criterio, basado en la CMI descrita en la literatura (Cantrell y col., 1996).

Activo <50 µg/mL

Moderadamente activo 200 a >50 µg/mL

Inactivo >200 µg/mL.

Como se mencionó anteriormente los extractos fueron evaluados primero con *M. tuberculosis* H37Rv y *M. avium*.

Aquellos extractos que resultaron activos que inhibieron el crecimiento de *M. tuberculosis* H37Rv y/o *M. avium*. Fueron sometidos a una segunda fase de la evaluación utilizando cuatro cepas monorresistentes de *M. tuberculosis* H37Rv (Tabla 12).

Únicamente el extracto hexánico de *Lantana hispida* inhibió el crecimiento de las cuatro variantes de H37Rv. Por lo que este extracto (hexánico) se sometió a la tercera fase del ensayo donde se emplearon aislados clínicos de *M. tuberculosis*, cuyo patrón de fármaco sensibilidad fue previamente determinado (Mijares, 2003).

Por último, este extracto fue evaluado contra ocho micobacterias no tuberculosas (Tabla 14).

6.4. Fraccionamiento químico Biodirigido del extracto hexánico de *L. hispida*.

Dos gramos del extracto hexánico activo, se fraccionó químicamente vía cromatografía en columna abierta gravitacional de fase normal, utilizando como fase estacionaria 40 g de sílica gel y como fase móvil hexano, hexano-cloroformo, cloroformo, cloroformo-metanol y metanol (en diferentes proporciones). De este fraccionamiento se colectaron 165 fracciones de 125 mL c/u, las cuales se concentraron a presión reducida. Cada fracción fue analizada cromatográficamente en capa fina, con la finalidad de reunir las de acuerdo a su similitud cromatográfica, al ser revelada con ácido sulfúrico acuoso al 10%. Este proceso permitió obtener un total de ocho grupos de fracciones primarias. En la (Tabla 16), se describe el fraccionamiento primario del extracto hexánico y los sistemas de elución empleados.

Tabla 16. Fraccionamiento primario del extracto hexánico de *L. hispida*

FASE MOVIL	PROPORCIÓN	FRACCIONES OBTENIDAS	FRACCIONES COMBINADAS O PRIMARIAS
HEXANO	100	1-40	1-25 (FI)
HEX: CHCl ₃	9:1	41-58	26-28 (FII)
HEX: CHCl ₃	8:2	59-74	29-60 (FIII)
HEX: CHCl ₃	7:3	75-83	61-76 (FIV)
HEX: CHCl ₃	1:1	84-95	77-90 (FV)
HEX: CHCl ₃	2.5:7.5	96-111	91-94 (FVI)
CHCl ₃	100	112-128	95-99 (FVII)
CHCl ₃ :MeOH	7.5:2.5	129-139	100-163 (FVIII)
CHCl ₃ :MeOH	1:1	140-153	
MeOH	100	154-163	

Los ocho grupos de fracciones primarias (FI a FVIII) con diferente grado de polaridad fueron evaluadas biológicamente contra *M. tuberculosis* H37Rv y *M. avium*, a tres diferentes concentraciones (200, 100 y 50 µg/mL).

La fracción FVI fue la más activa contra la cepa de *M. tuberculosis* H37Rv, por lo que se procedió a evaluarla contra cuatro cepas monorresistentes de *M. tuberculosis* H37Rv y contra 8 aislados clínicos MDR.

8. Resultados

La información etnobotánica descrita en fuentes bibliográficas sobre medicina tradicional de México permitió seleccionar 54 especies vegetales que se emplean para tratar diversos problemas de vías respiratorias como tos y dolor de pecho, dolor de garganta, tos con esputo y/o tuberculosis, entre otros usos (Tabla 10, Ver Apéndice 12.4) (Argueta y col., 1994; Aguilar y col., 1994; Berlin, 1996a y 1996b) De estas plantas se colectaron 23 especies en diferentes estados de la República Mexicana (Tabla 10, Ver Apéndice 12.4). Una vez colectadas las especies se procedió a realizar las operaciones preliminares (limpieza, secado y molienda) para posteriormente proceder con la preparación de los extractos orgánicos y acuosos.

De cada especie vegetal se prepararon tres extractos; el hexánico y metanólico por vía maceración y el acuoso por vía digestión y posteriormente liofilización (Esquema 1).

La cantidad de material vegetal y el rendimiento obtenido de cada extracto de las 23 especies vegetales colectadas se muestra en la (Tabla 16) y este dato se reporta como porcentaje de rendimiento respecto al peso del material vegetal seco que fue calculado por la siguiente fórmula.

$$\% \text{ de extracto} = \frac{\text{peso del extracto seco}}{\text{peso de material vegetal seco y triturado}} \times 100\%$$

Cabe mencionar que las 23 especies evaluadas se colectaron en diferentes periodos. A continuación se describe las colectas realizadas y los resultados biológicos obtenidos.

Tabla 16. Rendimiento de los extractos hexánico, metanólico y acuoso de las especies vegetales evaluadas.

ESPECIE VEGETAL (Nombre científico)	PESO INICIAL DEL MATERIAL VEGETAL SECO Y MOLIDO (g).			PESO DEL EXTRACTO SECO (g).			% DE RENDIMIENTO		
	HEX	MeOH	Ac	HEX	MeOH	Ac	HEX	MeOH	Ac
<i>Achillea millefolium</i>	348.2	348.2	73.4	29.50	73.42	9.71	8.47	21.08	13.20
<i>Ageratum corymbosum</i>	120.0	120.0	68.0	3.31	32.30	6.00	2.75	26.91	8.82
<i>Anoda cristata</i>	483.4	483.4	60.4	8.62	15.70	1.41	1.78	3.24	2.33
<i>Artemisia ludoviciana</i>	350.0	350.0	59.5	7.80	59.90	5.50	2.22	17.11	9.24
<i>Bambusa guada</i>	415.0	415.0	51.0	5.82	27.22	6.61	1.40	6.55	12.90
<i>Bouvardia ternifolia</i>	700.0	700.0	70.0	9.60	81.99	2.80	1.37	11.71	4.00
<i>Calliandra houstoniana</i>	275.0	275.0	74.6	4.60	53.20	3.22	1.67	19.34	4.31
<i>Cassia fistula</i>	700.0	700.0	40.0	1.35	151.00	4.98	0.19	0.21	12.40
<i>Chamaedora elegans</i>	450.0	450.0	65.0	9.73	70.0	4.20	2.16	15.55	6.46
<i>Chamaedora tepejilote</i>	175.0	175.0	50.0	4.61	16.50	4.92	2.63	9.42	9.84
<i>Cirsium conspicum</i>	250.0	250.0	100.0	9.70	7.30	6.28	3.88	2.92	1.00
<i>Cordia boissieri</i>	121.7	450.0	100.0	2.30	-----	-----	1.88	-----	-----
<i>Crataegus mexicana</i>	250.0	250.0	68.7	2.28	63.60	2.64	0.91	25.44	3.84
<i>Juniperus communis</i>	380.0	380.0	50.0	11.90	82.40	2.49	3.13	21.68	4.98
<i>Gnaphalium semiaplexicaule</i>	100.0	90.2	130.0	2.50	24.30	6.32	2.50	26.94	4.86
<i>Lantana hispida</i>	165.0	165.0	40.0	3.58	16.80	3.55	2.16	10.18	8.87
<i>Lippia dulcis</i>	253.0	253.0	38.0	1.83	16.40	3.80	0.72	6.48	10.00
<i>Malva parviflora</i>	220.0	220.0	80.0	3.03	20.70	1.81	1.37	9.40	2.26
<i>Manilkara zapota</i>	500.0	500.0	120.0	26.30	219.00	8.93	5.26	43.80	7.44
<i>Pleopeltis sp</i>	163.0	303.0	62.0	2.03	59.25	2.46	1.24	19.55	3.96
<i>Quercus sp</i>	160.0	160.0	57.0	1.82	37.23	1.76	1.13	23.26	3.08
<i>Sapindus saponaria</i>	200.0	200.0	80.0	1.65	24.90	5.88	0.82	12.45	7.35
<i>Swietenia humillis</i>									
HOJAS	663.4	534.0	100.0	33.07	41.70	0.33	4.98	7.80	0.33
SEMILLAS	90.0	90.0	16.8	12.77	13.13	3.37	14.18	14.58	20.05

(-----) No se preparó el extracto.

8.1. Primera colecta (mes de Agosto-Septiembre)

Las especies colectadas en esta primera etapa fueron 14 que son: *Achillea millefolium*, *Ageratum corymbosum*, *Anoda cristata*, *Artemisia ludoviciana*, *Calliandra houstoniana*, *Chamaedora tepejilote*, *Cirsium conspicum*, *Cordia boissieri*, *Gnaphalium semiaplexicaule*, *Juniperus communis*, *Lantana hispida*, *Lippia dulcis*, *Malva parviflora* y *Sapindus saponaria* y los resultados de la evaluación de los extractos orgánicos y acuosos contra *M. tuberculosis* H37Rv y *M. avium* se describen en la (Tabla 17).

Los extractos hexánicos de *A. millefolium*, *L. hispida* y *M. parviflora* inhibieron el crecimiento de *M. tuberculosis* H37Rv a una concentración de 200 µg/mL; los extractos de *C. boissieri* y *J. communis* fueron activos a 100 µg/mL y los extractos de *A. ludoviciana*, *C. houstoniana* y *Ch. tepejilote* fueron las más activas presentando inhibición del crecimiento de *M. tuberculosis* H37Rv a <50 µg/mL.

Los extractos metanólicos de las especies *A. corymbosum* y *J. communis* presentaron actividad a una concentración >100 y 100 µg/mL contra *M. tuberculosis* H37Rv respectivamente; los extractos de las especies *A. ludoviciana* y *M. parviflora* dieron actividad a una concentración de 100 µg/mL y finalmente los extractos metanólicos de *Ch. tepejilote* y *L. hispida* fueron los más activos con CMI= 50 µg/mL.

Únicamente el extracto hexánico de *J. communis* y el metanólico de *M. parviflora* dieron actividad a 200 y 100 µg/mL, respectivamente contra *M. avium*.

Los extractos acuosos de las 14 especies evaluadas no mostraron actividad alguna a la mayor concentración probada (200 µg/mL) contra *M. tuberculosis* H37Rv y contra *M. avium*.

Con base a estos resultados, se procedió a determinar la CMI de los extractos hexánicos más activos (*A. ludoviciana*, *C. houstoniana* y *Ch. tepejilote*) contra *M. tuberculosis* H37Rv. La CMI de los extractos hexánicos de *A. ludoviciana* y *C. houstoniana* fue de 12.5 y 25 µg/mL, respectivamente y el extracto hexánico de *Ch. tepejilote* presentó una CMI de 6.25 µg/mL.

Tabla 17. Resultados de la evaluación biológica de 14 especies vegetales contra *M. tuberculosis* H37Rv (1ª Colecta)

ESPECIE VEGETAL	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv CMI (µg/mL)		
	Hexánico	Metanólico	Acuoso
<i>Achillea millefolium</i>	200	>200	>200
<i>Ageratum corymbosum</i>	>200	>100	>200
<i>Anoda cristata</i>	>200	>200	>200
<i>Artemisia ludoviciana</i>	<50 (125)	100	>200
<i>Calliandra houstoniana</i>	<50 (12.5)	>200	>200
<i>Chamaedora tepejilote</i>	<50 (6.25)	50	>200
<i>Cirsium conspicum</i>	>200	>200	>200
<i>Cordia boissieri</i>	100	>200	>200
<i>Gnaphalium semiamplexicaule</i>	>200	>200	>200
<i>Juniperus communis</i>	100	100	>200
<i>Lantana hispida</i>	200	50	>200
<i>Lippia dulcis</i>	>200	>200	>200
<i>Malva parviflora</i>	200	100	>200
<i>Sapindus saponaria</i>	>200	>200	>200

Después de un mes se realizó nuevamente el ensayo de aquellos extractos activos, empleando extractos que se tenían almacenados diluido en DMSO, mismos que fueron preparados y usados para el 1^{er} ensayo. En la (Tabla 18) se describen los resultados de este segundo ensayo y en su mayoría no fueron reproducibles, observando crecimiento de la micobacteria a la máxima concentración evaluada (200 µg/mL). Sólo los extractos orgánicos (hexánico y metanólico) de la especie *L. hispida* mantuvieron su actividad biológica (200 y 50 µg/mL).

Tabla 18. Resultados de la 2ª evaluación biológica de las 10 especies vegetales contra *M. tuberculosis* H37Rv. (1ª Colecta).

ESPECIE VEGETAL	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv CMI (µg/mL)	
	Hexánico	Metanólico
<i>Achillea millefolium</i>	>200	>200
<i>Ageratum corymbosum</i>	>200	>200
<i>Artemisia ludoviciana</i>	>200	>200
<i>Calliandra houstoniana</i>	>200	>200
<i>Chamaedora tepejilote</i>	>200	>200
<i>Cordia boissieri</i>	>200	>200
<i>Gnaphalium semiamplexicaule</i>	>200	>200
<i>Juniperus communis</i>	>200	>200
<i>Lantana hispida</i>	200	50
<i>Malva parviflora</i>	>200	>200

Al observar pérdida de la actividad antimicobacteriana se decidió realizar una nueva colecta de material vegetal de las especies activas (*A. ludoviciana*, *Ch. tepejilote*, *J. communis* y *M. parviflora*) en los mismos lugares donde se realizó la primera.

8.2. Segunda colecta (mes de Diciembre-Enero)

De las especies colectadas se prepararon los extractos orgánicos y fueron evaluados bajo las mismas condiciones. En la Tabla 19 se describen estos resultados, donde se muestra que ningún extracto inhibió el crecimiento de *M. tuberculosis* H37Rv.

Tabla 19. Resultados de la evaluación biológica de cuatro especies vegetales contra *M. tuberculosis* H37Rv (2ª Colecta)

ESPECIE VEGETAL	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv CMI (µg/mL)	
	Hexánico	Metanólico
<i>Artemisia ludoviciana</i>	>200	>200
<i>Chamaedora tepejilote</i>	>200	>200
<i>Juniperus communis</i>	>200	>200
<i>Malva parviflora</i>	>200	>200

8.3. Tercera colecta (mes de Agosto-Septiembre)

En esta etapa del estudio, se colectaron y prepararon los extractos orgánicos y acuosos de otras 9 especies medicinales: *Bambusa guada*, *Bouvardia ternifolia*, *Cassia fistula*, *Chamaedora elegans*, *Crataegus pubescens*, *Manilkara zapota*, *Pleopeltis sp*, *Quercus sp*, *Swietenia humillis* (semillas y hojas), mismas que fueron evaluadas contra *M. tuberculosis* H37Rv y *M. avium*. De manera adicional se evaluaron los extractos de la especie *L. hispida*. En la (Tabla 20) se muestran los resultados de esta evaluación.

Únicamente los extractos orgánicos de la especie *L. hispida* fueron reproducibles. Por otro lado, ninguno de los extractos de las otras 9 especies que se describen en la (Tabla 20) inhibieron el crecimiento de la micobacteria a la máxima concentración probada (200 µg/mL).

Tabla 20. Resultados de la evaluación biológica de diez especies vegetales contra *M. tuberculosis* H37Rv (3ª Colecta)

ESPECIE VEGETAL	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv CMI (µg/mL)		
	Hexánico	Metanólico	Acuoso
<i>Bambusa guada</i>	>200	>200	>200
<i>Bouvardia ternifolia</i>	>200	>200	>200
<i>Cassia fistula</i>	>200	>200	>200
<i>Chamaedora elegans</i>	>200	>200	>200
<i>Crataegus pubescens</i>	>200	>200	>200
<i>Lantana hispida</i>	200	50	>200
<i>Manilkara zapota</i> ,	>200	>200	>200
<i>Pleopeltis sp</i>	>200	>200	>200
<i>Quercus sp</i>	>200	>200	>200
<i>Swietenia humillis</i> Semillas	>200	>200	>200
Hojas	>200	>200	>200

En este período, nuevamente se colectaron las especies vegetales de (*A. ludoviciana*, *Ch. tepejilote*, *M. parviflora* y *J. communis*), que al ser evaluados mostraron actividad contra *M. tuberculosis* H37Rv y *M. avium*, resultados que fueron reproducibles a los obtenidos en la 1ª colecta.

Los extractos orgánicos (hexánico y metanólico) de estas cuatro especies vegetales activas fueron evaluados contra cuatro variantes monorresistentes de *M. tuberculosis* H37Rv,

a los fármacos de 1ª línea (S, INH, RFM y EMB). Los extractos fueron evaluados a las concentraciones de 200, 100, 50, 25, 12.5 y 6.25 $\mu\text{g/mL}$. Estos últimos resultados se muestran en la (Tabla 21), donde se confirma la actividad antimicobacteriana de tres especies vegetales (*A. ludoviciana*, *Ch. tepejilote* y *J. communis*).

Tabla 21. Resultados de la evaluación antimicobacteriana de las tres especies activas contra variantes monorresistentes de *M. tuberculosis* H37Rv (3ª Colecta).

ESPECIE VEGETAL	Cepas monorresistentes de <i>M. tuberculosis</i> CMI ($\mu\text{g/mL}$)				
	S	INH	RFM	EMB	H37Rv
<i>A. ludoviciana</i>					
Extracto Hexánico	*ND	200	200	200	200
Extracto Metanólico	>200	>200	200	200	200
<i>Ch. tepejilote</i>					
Extracto Hexánico	*ND	100	200	>200	200
Extracto Metanólico	>200	>200	>200	>200	>200
<i>J. communis</i>					
Extracto Hexánico	*ND	100	200	100	100
Extracto Metanólico	*ND	100	200	100	100
<i>M. parviflora</i>					
Extracto Hexánico	>200	>200	>200	>200	>200
Extracto Metanólico	>200	>200	>200	>200	>200

*ND: No determinado.

Los extractos (hexánico y metanólico) de *J. communis* mostraron actividad contra las cepas de *M. tuberculosis* monorresistentes, siendo de 100 $\mu\text{g/mL}$ para las cepas monorresistentes a INH y EMB; y de 200 $\mu\text{g/mL}$, para la cepa resistente a RFM.

El extracto hexánico de *A. ludoviciana* fue activo a la concentración de 200 $\mu\text{g/mL}$ contra tres cepas monorresistentes y el extracto metanólico inhibió a las micobacterias monorresistentes RFM y EMB a 200 $\mu\text{g/mL}$, y las cepas monorresistentes a INH y S no fueron afectadas por este extracto, ya que se observó crecimiento a la máxima concentración probada (200 $\mu\text{g/mL}$).

El extracto hexánico de *Ch. tepejilote* inhibió el crecimiento de dos cepas monorresistentes (INH y RFM), cuya CMI fue de 100 y 200 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. El extracto metanólico no afectó el crecimiento de las cuatro cepas monorresistentes (S, INH, RFM y EMB) cuya CMI fue >200 $\mu\text{g/mL}$.

En tanto los dos extractos orgánicos de la especie *M. parviflora* no inhibieron el crecimiento bacteriano de ninguna de las cuatro cepas monorresistentes a *M. tuberculosis*.

En la (Tabla 22) se muestra los resultados de la evaluación biológica de las 23 especies vegetales evaluadas.

Tabla 22. Resultados de la evaluación biológica de los tres extractos de las 23 especies vegetales contra *M. tuberculosis* H37Rv

ESPECIE VEGETAL	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv CMI (µg/mL)		
	Hexánico	Metanólico	Acuoso
<i>Achillea millefolium</i>	200	>200	>200
<i>Ageratum corymbosum</i>	>200	>100	>200
<i>Anoda cristata</i>	>200	>200	>200
<i>Artemisia ludoviciana</i>	<50 (12.5)	100	>200
<i>Bambusa guada</i>	>200	>200	>200
<i>Bouvardia ternifolia</i>	>200	>200	>200
<i>Calliandra houstoniana</i>	<50 (12.5)	>200	>200
<i>Cassia fistula</i>	>200	>200	>200
<i>Chamaedora sp</i>	>200	>200	>200
<i>Chamaedora tepejilote</i>	<50 (6.5)	50	>200
<i>Cirsium conspicum</i>	>200	>200	>200
<i>Cordia boissieri</i>	>200	>200	>200
<i>Crataegus pubescens</i>	>200	>200	>200
<i>Gnaphalium semiamplexicaule</i>	>200	>200	>200
<i>Juniperus communis</i>	100	100	>200
<i>Lantana hispida</i>	200	50	>200
<i>Lippia dulcis</i>	>200	>200	>200
<i>Malva parviflora</i>	200	100	>200
<i>Manilkara zapota</i>	>200	>200	>200
<i>Pleopeltis sp</i>	>200	>200	>200
<i>Quercus sp</i>	>200	>200	>200
<i>Sapindus saponaria</i>	>200	>200	>200
<i>Switenia humillis</i>	>200	>200	>200

En la (Tabla 23), se resumen los resultados de las 23 especies evaluadas biológicamente contra la cepa de referencia *M. tuberculosis* H37Rv. Donde se muestra que los extractos hexánicos de las especies *A. ludoviciana*, *Ch. tepejilote* y *L. hispida*, dieron actividad contra *M. tuberculosis* H37Rv a 200 µg/mL. El extracto hexánico de *J. communis* mostró

actividad a 100 µg/mL. Los extractos metanólicos de *A. ludoviciana*, *J. communis* y *L. hispida* fueron activos a 200, 100 y 50 µg/mL, respectivamente.

Por otro lado, la actividad contra *M. avium* fue menos frecuente en las 23 especies evaluadas, solo el extracto metanólico de la especie *M. parviflora* dio actividad a 100 µg/mL y el extracto hexánico de la especie *J. communis* mostró inhibición bacteriana a 200 µg/mL.

En tanto, los extractos acuosos de las 23 especies evaluadas no mostraron actividad a las concentraciones probadas contra ninguna cepa.

Tabla 23. Resumen de los resultados Finales del Estudio de la evaluación biológica de los tres extractos de las 23 especies vegetales contra *M. tuberculosis* H37Rv

ESPECIE VEGETAL	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv CMI (µg/mL)		
	Hexánico	Metanólico	Acuoso
<i>Achillea millefolium</i>	>200	>200	>200
<i>Ageratum corymbosum</i>	>200	>200	>200
<i>Anoda cristata</i>	>200	>200	>200
<i>Artemisia ludoviciana</i>	>200	200	>200
<i>Bambusa guada</i>	>200	>200	>200
<i>Bouvardia ternifolia</i>	>200	>200	>200
<i>Calliandra houstoniana</i>	>200	>200	>200
<i>Cassia fistula</i>	>200	>200	>200
<i>Chamaedora sp</i>	>200	>200	>200
<i>Chamaedora tepejilote</i>	200	>200	>200
<i>Cirsium conspicum</i>	>200	>200	>200
<i>Cordia boissieri</i>	>200	>200	>200
<i>Crataegus pubescens</i>	>200	>200	>200
<i>Gnaphalium semiamplexicaule</i>	>200	>200	>200
<i>Juniperus communis</i>	100	100	>200
<i>Lantana hispida</i>	200	50	>200
<i>Lippia dulcis</i>	>200	>200	>200
<i>Malva parviflora</i>	>200	>200	>200
<i>Manilkara zapota</i>	>200	>200	>200
<i>Pleopeltis sp</i>	>200	>200	>200
<i>Quercus sp</i>	>200	>200	>200
<i>Sapindus saponaria</i>	>200	>200	>200
<i>Switenia humillis</i>	>200	>200	>200

8.4. Determinación de la actividad antimicobacteriana en los extractos orgánicos de la especie *L. hispida*.

Dada la actividad de los extractos hexánico y metanólico de la especie *L. hispida* (CMI = 200 y 50 µg/mL, respectivamente) contra la cepa de referencia (*M. tuberculosis* H37Rv) (Figura 22 y 24), se procedió a la evaluación biológica de los extractos orgánicos contra las variantes monorresistentes de *M. tuberculosis* H37Rv; a tres diferentes concentraciones (400, 200 y 100 µg/mL) (Figura 23), y posteriormente para determinar las CMI se realizaron diluciones de 200 a 6.25 µg/mL; la CMI del extracto hexánico para la variante resistente a INH fue de 25 µg/mL, (Figura 24) y para la cepa monorresistente a (S) fue de 100 µg/mL y las cepas monorresistentes a RFM y EMB presentaron una CMI de 200 µg/mL. Mientras que el extracto metanólico fue inactivo contra las cuatro variantes monorresistentes de *M. tuberculosis* H37Rv, ya que su CMI fue >200 µg/mL, (Tabla 24).

Tabla 24. Actividad antimicobacteriana de los extractos orgánicos de *L. hispida* contra *M. tuberculosis* H37Rv y contra cuatro variantes monorresistentes de *M. tuberculosis* H37Rv

Especie vegetal <i>Lantana hispida</i>	Cepas monorresistentes de <i>M. tuberculosis</i> CMI (µg/mL)				
	S	INH	RFM	EMB	H37Rv
Extracto hexánico	100	25	200	200	200
Extracto metanólico	>200	>200	>200	>200	50

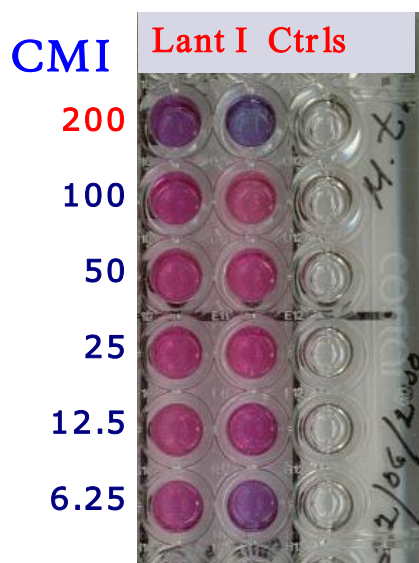


Figura 22. Evaluación del extracto hexánico (Lant I) contra *M. tuberculosis* H37Rv.

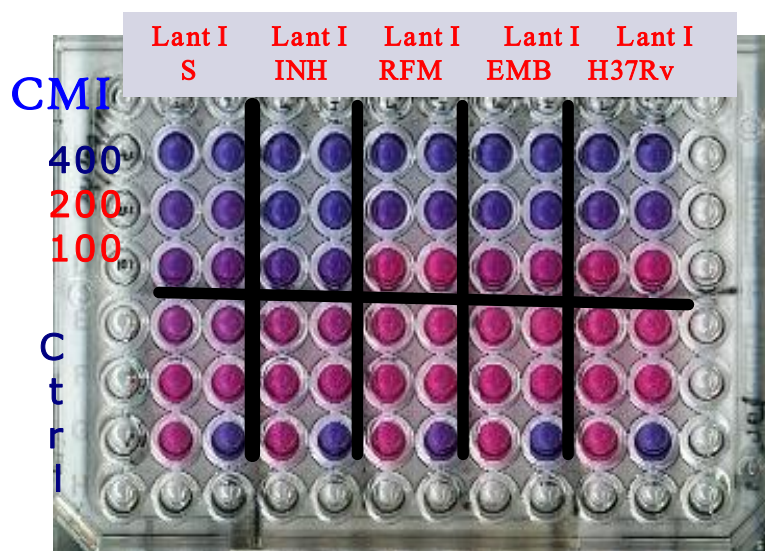


Figura 23. Evaluación del extracto hexánico (Lant I) contra 4 cepas monorresistentes y contra la cepa de referencia *M. tuberculosis* H37Rv.

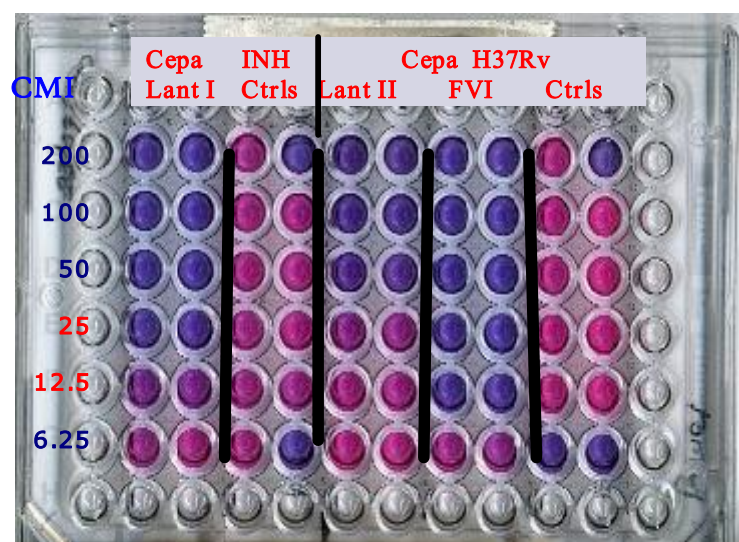


Figura 24. Evaluación del extracto hexánico (Lant I) contra la cepa *M. tuberculosis* H37Rv resistente a INH. Evaluación del extracto metanólico (Lant II) y fracción FVI del extracto hexánico (Lant I) de *L. hispida* contra la cepa de referencia *M. tuberculosis* H37Rv.

Dada la actividad antimicobacteriana mostrada por el extracto hexánico de *L. hispida* contra *M. tuberculosis* H37Rv y contra las cepas monorresistentes, se procedió a evaluar el extracto hexánico contra ocho aislados clínicos de *M. tuberculosis* seleccionados por su diferente patrón de resistencia a los fármacos primarios y secundarios. El extracto se evaluó a seis diferentes concentraciones (200 a 6.25 µg/mL). Los resultados de esta evaluación se describen en la (Tabla 25), donde se observa que el extracto hexánico inhibe el crecimiento de los aislados clínicos, siendo la CMI para siete aislados clínicos de 100 µg/mL y el aislado Sin-3 fue moderadamente sensible, ya que presento obtuvo una CMI de 200 µg/mL.

El extracto hexánico también fue evaluado en las mismas condiciones contra once micobacterias no tuberculosas, en esta evaluación se encontró que el extracto no afecto el crecimiento de ninguna cepa, ya que se observo una CMI >200 µg/mL.

Tabla 25. Resultados de la evaluación del extracto hexánico de *L. hispida* contra 8 aislados clínicos de *M. tuberculosis* MDR

Aislados clínicos de <i>M. tuberculosis</i>	Extracto hexánico CMI (µg/mL)
Sin-3	200
Sin-4	100
Sin-5	100
Sin-6	100
HG-7	100
HG-8	100
Chi-21	100
Mty-134	100

8.5. Fraccionamiento químico biodirigido del extracto hexánico de *L. hispida*.

El extracto hexánico fue objeto de un fraccionamiento químico; proceso que permitió obtener ocho grupos de fracciones con diferentes grados de polaridad (Tabla 15). Los ocho grupos de fracciones primarias FI-FVIII fueron evaluadas biológicamente contra *M. tuberculosis* H37Rv, (Figura 24) y *M. avium*, a tres diferentes concentraciones 200, 100 y 50 $\mu\text{g/mL}$. En la (Tabla 28) se describen los resultados de esta evaluación, donde se observa que tres fracciones primarias, la FV, FVI y FVII mostraron inhibición del crecimiento de *M. tuberculosis* H37Rv, siendo la FVI la más activa a $<50 \mu\text{g/mL}$, esta fracción fue nuevamente evaluada para determinar su CMI, siendo de $12.5 \mu\text{g/mL}$, (Figura 24), y las fracciones FV y FVII presentaron una CMI de $100 \mu\text{g/mL}$. Las ocho fracciones al ser evaluadas contra *M. avium*, todas resultaron inactivas a la máxima concentración probada ($200 \mu\text{g/mL}$).

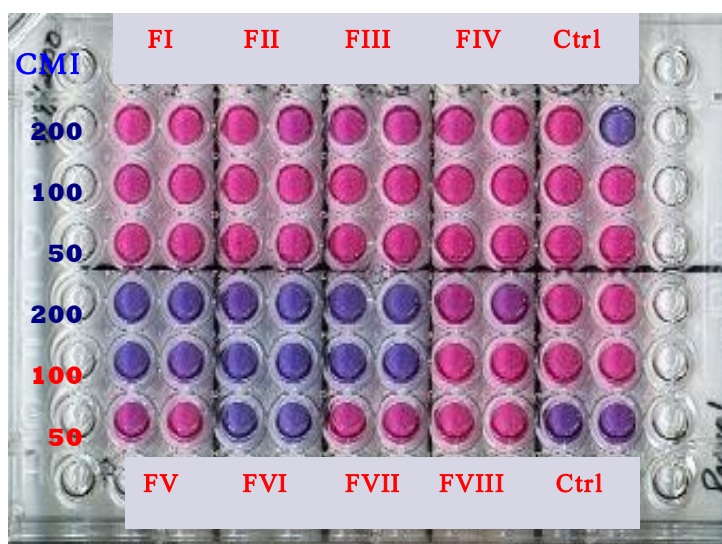


Figura 25. Evaluación de las fracciones primarias (FI-FVIII) obtenidas del extracto hexánico de *L. hispida* contra la cepa de referencia *M. tuberculosis* H37Rv.

Tabla 26. Evaluación antimicobacteriana de las fracciones primarias de *L. hispida* contra *M. tuberculosis* H37Rv y *M. avium*

FRACCIONES PRIMARIAS	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv CMI (µg/mL)	<i>M. avium</i> CMI (µg/mL)
FI	>200	>200
FII	>200	>200
FIII	>200	>200
FIV	>200	>200
FV	100	>200
FVI	12.5	>200
FVII	100	>200
FVIII	>200	>200

Posteriormente, la fracción más activa FVI fue evaluada contra cuatro variantes monorresistentes de *M. tuberculosis* H37Rv; y contra ocho aislados clínicos de *M. tuberculosis* MDR (Tabla 13 de metodología). En la (Tabla 27), se resume los resultados de esta evaluación. Esta fracción inhibió el crecimiento de las cuatro cepas monorresistentes, presentando una CMI de 50 µg/mL en todos los casos. Los resultados encontrados contra los aislados clínicos son: tres cepas (HG-7, Chi-21, Mty-134) donde inhibieron a una CMI de 25 µg/mL y el resto de estos aislados inhibieron a la concentración de 50 µg/mL.

Tabla 27. Evaluación antimicobacteriana de la fracción activa FVI contra *M. tuberculosis* H37Rv; cuatro variantes monorresistentes de *M. tuberculosis* y contra 8 aislados clínicos de *M. tuberculosis* MDR.

Cepas de <i>M. tuberculosis</i>	FVI CMI (µg/mL)
Referencia H37Rv	12.5
H37Rv resistente a (S)	50
H37Rv resistente a (INH)	50
H37Rv resistente a (RFM)	50
H37Rv resistente a (EMB)	50
Sin-3	50
Sin-4	50
Sin-5	50
Sin-6	50
HG-7	25
HG-8	50
Chi-21	25
Mty-134	25

*9. Discusión
de
Resultados*

La OMS estima que son más las muertes por tuberculosis que por otras enfermedades infecciosas causadas por un solo agente (Dye y col., 1999). Además un tercio de la población mundial esta infectada con *M. tuberculosis* y en riesgo de desarrollar la enfermedad. Para controlar la TB en 1996 se estableció el programa TAES cuyo objetivo era erradicar la enfermedad en el 2005, objetivo que no se logro ya que los casos incrementaron debido a la aparición de cepas farmacorresistentes y a la presencia de enfermedades que comprometen el sistema inmunológico (SIDA, cáncer, diabetes, artritis reumatoide, enfermedad de Hodkins). Otros factores que favorecieron el incremento de la TB son factores socioeconómicos, nutricionales, de diagnóstico y tratamiento. El programa TAES cuenta con fármacos de primera y segunda línea, sin embargo la implementación del mismo es escaso para algunos países sobre todo en aquellos en vías de desarrollo, por ejemplo en México tiene una cobertura del 70%, mientras que en Brasil y Colombia la cobertura es menor al 50%.

Los fármacos antituberculosos que se utilizan actualmente fueron desarrollados desde hace más de 30 años y por este tiempo no se ha desarrollado este tipo de sustancias. Debido al problema que representa la TB en los sistemas de salud; hoy en día se requiere del desarrollo de nuevas terapias para eliminar esta enfermedad mediante la búsqueda de nuevas sustancias o moléculas prototipo para el desarrollo de fármacos antimicobacterianos en fuentes naturales y/o sintéticas. Cabe mencionar que las plantas son ricas en metabolitos secundarios con importante actividad farmacológica (por ejemplo morfina, artemisinina) por lo que pueden constituir una alternativa para obtener nuevos compuestos antimicobacterianos, además esta fuente no ha sido suficientemente explorada. En la última década diversos grupos de investigación se han dedicado a buscar compuestos antimicobacterianos en numerosas especies vegetales mediante el empleo de diversos métodos como son: el de mínima proporción (Van Puyvelde y col., 1994), método de disco (McCutcheon y col., 1997), el sistema radiopirométrico BACTEC 460 (Caldwell y col., 2000; Cantrell y col., 1998 y 1999; Jiménez-Arellanes y col., 2005) y el micrométodo colorimétrico del Alamar Azul (Collins y Franzblau, 1997; Acosta y col., 2006; Collins y col., 1997; Pietro y col., 2000; Jiménez-Arellanes col., 2003 y 2006). Este último ensayo ofrece las ventajas con respecto a los otros por su alta sensibilidad, reproducibilidad, bajo costo y rapidez de resultados, obteniéndose resultados a los 5 días y la cantidad de muestra a emplear es mínima.

En la actualidad es muy empleado para determinar drogosensibilidad en los casos de farmacorresistencia (Mijares, 2003; Luna-Herrera y col., 2003) y recientemente se ha empleado para la búsqueda de compuestos de origen natural (Pietro y col., 2000; Linares y Medrano, 2004; Jiménez-Arellanes y col., 2003 y 2005).

Para el desarrollo de este trabajo se empleo como ensayo biológico el micrométodo colorimétrico Alamar Azul (MABA) y como primer paso fue estandarizar el método.

Por otro lado, la información etnobotánica recopilada en fuentes de información etnobotánica (Aguilar y col., 1994; Argueta y col., 1993; Díaz, 1976)) fue procesada y analizada de donde se seleccionaron 54 especies vegetales con base en su uso medicinal en la República Mexicana; los criterios de selección fueron los usos que se le dan a las plantas para aliviar la tuberculosis y padecimientos relacionados con la enfermedad (tos crónica, tos y dolor de pecho, tos con esputo, fiebre y pérdida de peso). De las especies seleccionadas solo 23 fueron colectadas en diferentes estados de la República Mexicana (Chiapas, Morelos, Distrito Federal, Oaxaca, Puebla y Veracruz) (Tabla 11). Así mismo, se prepararon los extractos orgánicos (hexánico y metanólico) y acuosos de cada especie y posteriormente fueron evaluados mediante el ensayo MABA (Esquema 1).

La colecta y evaluaciones biológicas de las 23 especies fueron realizadas en tres bloques. En el primer bloque se colectaron y evaluaron 14 especies (*Achillea millefolium*, *Ageratum corymbosum*, *Anoda cristata*, *Artemisia ludoviciana*, *Calliandra houstoniana*, *Chamaedora tepejilote*, *Cirsium conspicum*, *Cordia boissieri*, *Gnaphalium semiaplexicaule*, *Juniperus communis*, *Lantana hispida*, *Lippia dulcis*, *Malva parviflora* y *Sapindus saponaria*), de las cuales 10 extractos hexánico y metanólico resultaron activos contra *M. tuberculosis* H37Rv; estos mismos extractos (activos) fueron evaluados un mes después de tenerlos almacenados y disueltos en DMSO encontrándose que los resultados no fueron reproducibles, solo se reprodujeron para los extractos (hexánico y metanólico) de *L. hispida*, por lo que se llegó a la conclusión que las muestras a evaluar deben prepararse por lo menos un día antes de su evaluación y no deben almacenarse con DMSO por tiempo prolongado. La colecta de estas especies se realizo en el periodo de Septiembre a Octubre, época en que las plantas presentan un metabolismo activo, con elaboración de nutrientes y metabolitos secundarios para la producción de semillas, además en esa temporada las lluvias fueron moderadas lo que favoreció que el material vegetal no desarrollara hongos (BPAR, 2003). En el segundo bloque

sé colectaron y evaluaron 9 especies (*Bambusa guada*, *Bouvardia ternifolia*, *Casia fistula*, *Chamaedora elegans*, *Crataegus pubescens*, *Manilkara zapota*, *Pleopeltis sp*, *Quercus sp*, *Switenia humillis*) de estas especies ninguna resulto activa contra *M. tuberculosis* H37Rv y *M. avium*. La colecta de estas especies se realizó en el mes de Diciembre-Enero, época en que el metabolismo es lento y escaso por la temporada de frío (BPAR, 2003). Los extractos hexánicos de *Juniperus communis* y *Malva parviflora* resultaron activos contra *M. avium*.

La colecta de las plantas en diferente época del año influyó enormemente sobre la actividad biológica, este fenómeno es bien conocido ya que el contenido de metabolitos secundarios en las plantas es influenciado por la época de colecta, edad de la planta, hora de colecta, localización geográfica y factores ambientales (lluvia, humedad, luz solar). Por lo tanto, es importante tomar en cuenta estos factores para realizar la colecta de especies vegetales para el estudio químico-biodirigido. Además, la desecación y conservación, aumenta la cantidad de productos de degradación y altera enormemente parte del contenido de los metabolitos secundarios de una planta (BPAR, 2003). Las especies (*Artemisia ludoviciana*, *Chamaedora tepejilote*, *Malva parviflora* y *Juniperus communis*) que resultaron activas en el primer bloque fueron nuevamente colectadas en el siguiente año en el mismo periodo y fueron evaluadas contra cuatro variantes de *M. tuberculosis* H37Rv monorresistentes (S, INH; RFM Y EMB). Las cuatro especies resultaron activas contra estas cepas monorresistentes, (Tabla 21).

Por consiguiente, en la (Tabla 23) se resume los resultados finales de la evaluación biológica de las 23 especies vegetales probadas contra la cepa de referencia *M. tuberculosis* H37Rv, mismos que indican que *A. ludoviciana*, *Ch. tepejilote*, *J. communis* y *L. hispida* que representan el 17.39% de las 23 especies vegetales probadas.

El extracto hexánico de la especie *A. ludoviciana* (con Bauche No. 13075 del Herbario del IMSS) resultó activo a 200 µg/mL contra la cepa de referencia *M. tuberculosis* H37Rv y contra tres variantes resistentes a INH, RFM y EMB. En tanto el extracto metanólico fue activo a la concentración de 200 µg/mL contra la cepa de referencia *M. tuberculosis* H37Rv y contra dos variantes resistentes a los fármacos RFM y EMB. *A. ludoviciana* es utilizada en la medicina tradicional para aliviar la tos, neumonía, dolor de estómago, etc. (Aguilar-Contreras y col., 1998), así mismo investigaciones químicas han reportado su composición química conteniendo lactonas sesquiterpénicas (Lee y Geissman, 1970; Lara y Márquez, 1996; Romo y

Tello, 1972), sesquiterpenos y aceites esenciales (monoterpenos). Por otro lado, estudios biológicos han publicado que algunas lactonas sesquiterpénicas de la familia Asteraceae presentan actividad antiparasitaria (Pike y col., 1997), e inhibidor del factor NF-Kappa β (Bork y col., 1997), actividad antifúngica (McCutcheon y col., 1994) y actividad antimicobacteriana (Fischer, 1996 y Fisher col., 1998). Además, el extracto etanólico de *A. ludoviciana* tiene efecto antimalárico (Malagón y col., 1997). El extracto de acetona-metanol-hexano y acuoso presenta efecto antiprotozoario *in vitro* (Said-Fernández y col., 2005). Este mismo extracto presentó efecto contra *M. tuberculosis* H37Rv al ser evaluado por el método radiorespirométrico BACTEC 460 a 100 $\mu\text{g/mL}$ (Cantrell y col., 1998) y de 200 $\mu\text{g/mL}$ al ser evaluado por MABA (Molina-Salinas y col., 2006). De acuerdo a los estudios reportados y en conjunto con los resultados obtenidos en el desarrollo de este trabajo, los dos extractos orgánicos (metanólico y hexánico) de *Artemisia ludoviciana* poseen compuestos con potencialidad antimicobacteriana. Recientemente, se ha realizado el estudio químico biodirigido del extracto hexánico y se han logrado aislar las sustancias responsables del efecto antimicobacteriano (Linares y Medrano y col., 2004; Luna, 2005).

Por otro lado, el extracto hexánico de la especie *Chamaedora tepejilote* (con Bauche No. 13080 del Herbario del IMSS) fue activo a una concentración de 200 $\mu\text{g/mL}$ contra la cepa de referencia y contra dos variantes monorresistentes a los fármacos INH y RFM. El extracto metanólico no inhibió el crecimiento de la cepa de referencia ni de las cuatro variantes de *M. tuberculosis* H37Rv.

Actualmente se ha realizado el estudio químico biodirigido del extracto hexánico de *Ch. tepejilote*, siendo el ácido ursólico y el escualeno los compuestos activos cuyas CMI's fueron de 12.5 y 50 $\mu\text{g/mL}$ al ser evaluados por el método radiorespirométrico BACTEC 460 (Álvarez, 2002; Jiménez-Arellanes y col., 2005); además, se ha reportado sus efectos antiinflamatorio del extracto acuoso de la especie (Salazar, 2003). A la fecha no se describe trabajo adicional sobre su composición química y efecto biológico. Solo se reporta el uso medicinal (para tratar la pulmonía) de la especie y su importancia económica (Aguilar y col., 1994; Aguilar-Contreras y col., 1998; Díaz, 1976; López, 1988).

Otra especie que resultó activa fue *Juniperus communis*; los extractos hexánico y metanólico resultaron activos a la concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$ contra la cepa de referencia (*M. tuberculosis* H37Rv) y contra dos variantes resistentes a INH y EMB, en tanto, los dos

extractos orgánicos inhibieron a 200 µg/mL a la variante resistente al fármaco RFM. Respecto a investigaciones preliminares de la especie, estudios biológicos han reportado efecto antidiabético del extracto acuoso en ratón (Petlevski y col., 2001), el aceite esencial presenta actividad antibacteriana y antifúngica (Pepeljnjak y col., 2005; Van Der Weijden y col., 1998; McCutcheon y col., 1992; Cavaleiro y col., 2006; Peláez y col., 2000). Se ha descrito que *J. communis* presenta actividad moderada contra *M. tuberculosis* H37Rv, así como aislaron los compuestos responsables del efecto antimicobacteriano siendo los diterpenos (ácido isopimárico, ácido isocomúnico, ácido (-)-ent-trans-comúnico, y ácido juniperexcélcico) y el sesquiterpeno (4 α -hidroxicedrol) y cuyas CMI de estos compuestos esta en el rango de 16 µg/mL (Topcu, 1999). Otro efecto que se ha reportado para el extracto metanólico es el efecto antiedematoso (Salazar, 2003).

En cuanto a la composición química de esta especie se reporta la composición del aceite esencial (utilizados en la industria farmacéutica en preparaciones de productos cosméticos como en fragancias) (Chatzopoulou y col., 2002). Y en el extracto orgánico de diferentes partes de la planta se reporta la presencia de diterpenos, sesquiterpenos, lignanos, taninos, flavonoides, ácidos orgánicos y compuestos glucosilados (Font, 1980; William y Thompson, 1981; Duke, 1988; Loew y col., 1991; Glasby, 1991). En la medicina tradicional de México, *J. communis* es utilizada para la tos, problemas de vías respiratorias, bronquitis, pulmonía, tos ferina, presión arterial, tuberculosis, malestares estomacales, estimulante del apetito, problemas dermatológicos y enfermedades urogenitales (Aguilar-Contreras y col., 1998; Font, 1980; Duke, 1988; Tumer, 1988; Loew y col., 1991). La actividad antimicobacteriana que se encontró en este trabajo confirma parcialmente los usos que se le atribuyen a la especie en la medicina tradicional de nuestro país. A la fecha, se ha realizado un estudio químico biodirigido parcial del extracto hexánico, aislándose dos compuestos identificados como *ent*-labda-8(17),12E,14-trien-3 α -ol, 3 α -acetoxi-*ent*-labda-8(17), 12E,14-trieno siendo responsables del efecto antimicobacteriano observado en el extracto (Fragoso, 2003).

Los extractos hexánico y metanólico de la especie *Malva parviflora* (con Bauche No. 14155 del Herbario del IMSS) mostraron actividad contra *M. tuberculosis* H37Rv, respectivamente, pero ningún extracto resulto activo contra las variantes monorresistentes de *M. tuberculosis* H37Rv. La planta se usa en la medicina tradicional para aliviar la tos, el

empacho y como antiinflamatorio (Aguilar y col., 1994). Los compuestos químicos obtenidos de esta especie son esteroides principalmente (Sharma y col., 1999). El extracto hidroalcohólico de la especie tiene actividad antimicrobiana y antiinflamatoria (Tadeg y col., 2005; Shale y col., 2005). Además se han aislados diferentes proteínas con actividad antimicrobiana (Wang y col., 2000, 2001).

Por último, *Lantana hispida* (con Bauche No. 15178 del Herbario del IMSS) fue la especie que conservó la actividad antimicobacteriana, durante las tres evaluaciones realizadas en diferente época contra la cepa de referencia *M. tuberculosis* H37Rv (CMI= 200 µg/mL). Por consiguiente, fue la especie que se sometió a un fraccionamiento químico biodirigido. El extracto hexánico de *L. hispida* fue el más activo contra las cuatro variantes monorresistentes de *M. tuberculosis* H37Rv, siendo la variante INH la más sensible al extracto hexánico mostrando una CMI=25 µg/mL en comparación con las otras tres variantes S, RFM y EMB (CMI= 100 µg/mL). En una siguiente fase de la evaluación biológica, el extracto hexánico se evaluó contra 8 aislados clínicos de *M. tuberculosis* MDR y contra 11 cepas de micobacterias no tuberculosas. Los aislados clínicos fueron sensibles al extracto hexánico a una concentración de 100 µg/mL y 200 µg/mL para Sin-3 (Tabla 26), las micobacterias no tuberculosas fueron resistentes al extracto hexánico ya que se obtuvo un CMI mayor al probado. El extracto metanólico solo inhibió al crecimiento de la micobacteria de referencia *M. tuberculosis* H37Rv a una CMI= 50 µg/mL.

Dado el efecto antimicobacteriano mostrado por el extracto hexánico, este fue fraccionado químicamente mediante cromatografía en columna, proceso que permitió obtener 8 grupos de fracciones primarias (FI-FVIII) con grado creciente de polaridad, mismas que fueron evaluadas. Los resultados indicaron que la actividad se concentraba en la fracción FVI, siendo la más activa contra la cepa de referencia *M. tuberculosis* H37Rv (MIC= 12.5 µg/mL), en tanto las fracciones FV y FVII fueron activas a 100 µg/mL, contra la misma micobacteria, el resto de las fracciones presentaron CMI>200 µg/mL. Ninguna de las fracciones primarias inhibió el crecimiento de *M. avium*. Los resultados de la evaluación de la fracción FVI, contra los aislados clínicos de *M. tuberculosis* y las cepas monorresistentes que se describen en la (Tabla 28) y se observó que los aislados clínicos MDR (HG-7, Chi-121 y Mty-134), fueron las más sensibles mostrando una CMI= 25 µg/mL, mientras que contra las cuatro variantes

monorresistentes y contra cinco aislados clínicos (HG-8, Sin-3, Sin-4, Sin-5 y Sin-6) fueron menos sensibles a la fracción mostrando CMI= 50 µg/mL.

El análisis en ccf de la fracción activa FVI, reveló que estaban presentes cuatro compuestos mayoritarios mismos que fueron separados y purificados por ccf de tipo preparativa, obteniéndose tres triterpenos (A-C) y el β-sitosterol. A la fecha se han identificado químicamente los compuestos y evaluados (Jiménez y col., 2006).

En la medicina tradicional la especie es usada para aliviar la tos, neumonía y tuberculosis, problemas gastrointestinales, bronquitis, asma, desordenes gastrointestinales entre otros usos (Aguilar y col., 1994; Martínez–Alfaro y col., 1984; Zamora-Martínez y Pola, 1992). Estudios farmacológicos previos han demostrado que esta especie tiene actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* (Meckes y col., 1995). Así mismo, algunas especies de la familia Verbenaceae como son: *L. achgranthifolia*, *L. camara*, *L. hibrida* y *L. trilaefolia*, son usadas también para problemas respiratorios y otros usos (Duke, 1985; Ross, 1999; Begún y col., 1995). Desde el punto de vista químico la especie *L. hispida* no ha sido objeto de estudio, solo en la especie *L. camara* se ha reportado la presencia de monoterpenos, terpenos, sesquiterpenos y triterpenos con núcleo oleanano (Barua y col., 1976; Sharma y col., 1990 y 2000; Siddiqui y col., 1995).

L. hispida fue la especie con mejor efecto antimicobacteriano por lo que fue objeto de estudio químico biodirigido, lográndose aislar los compuestos antimicobacterianos. Cabe mencionar, que este trabajo es el primero que describe el efecto biológico y químico. El efecto encontrado sobre los aislados clínicos MDR de *M. tuberculosis*; que provocan los casos de tuberculosis de difícil tratamiento y que no responden a los esquemas convencionales establecidos mediante el programa TAES, indican que *L. hispida* constituye una fuente potencial de agentes antimicobacterianos que se necesita seguir investigando.

10. Conclusiones

Los reportes obtenidos en la información etnobotánica de plantas medicinales junto con los trabajos publicados por investigadores donde se llevan a cabo estudios químicos y biológicos nos dieron la pauta para seleccionar especies vegetales con propiedades biológicas específicas y además con la seguridad de obtener resultados confiables.

En este estudio en particular, fueron seleccionadas plantas medicinales usadas en la medicina tradicional para problemas de vías respiratorias y para la tuberculosis, estos antecedentes nos permitieron obtener buenos resultados en la determinación antimicobacteriana, ya que de 23 especies probadas 4 de ellas (17.39%) mostraron actividad antimicobacteriana siendo *Artemisia ludoviciana*, *Chamaedora tepejilote*, *Juniperus communis* y *Lantana hispida* las especies activas.

La evaluación biológica de los tres extractos de *Lantana hispida* indicó que el extracto metanólico posee mayor actividad con respecto a los extractos hexánico y acuoso. Aún así, el fraccionamiento químico-biodirigido del extracto hexánico permitió establecer la actividad de las fracciones primarias siendo la fracción FVI la más activa (CMI= 12.5 µg/mL), con una polaridad intermedia. Así mismo, se obtuvieron dos compuestos (A y B), los cuales no mejoraron la actividad dada por la F-VI.

En este trabajo los extractos orgánicos de *Lantana hispida* resultaron ser más consistentes en la evaluación de la actividad contra *M. tuberculosis* H37Rv, cepas monorresistentes a (S, INH, RFM, EMB) y contra 8 aislados clínicos (cepas de *M. tuberculosis* MDR). *L. hispida* no resultó activa contra las cepas no tuberculosas. Lo que indica que el efecto antimicobacteriano es selectivo. Así mismo esta especie se considera una fuente potencial de agentes antimicobacterianos.

Por consiguiente, la planta *Lantana hispida* biosintetiza compuestos con actividad antituberculosis y esto la hace formar parte como un antecedente a seguir con el estudio químico biodirigido para la obtención de la actividad antimicrobacteriana, así mismo la metodología de MABA, resultó ser un ensayo biológico barato, rápido, reproducible y efectivo en la evaluación de los extractos íntegros, fracciones y compuestos de las especies vegetales.

11. Bibliografia

1. **ABATE G**, MSHANA RN, MIÖRNER H. EVALUATION OF A COLORIMETRIC ASSAY BASED ON 3-(4,5-DIMETHYLTHIAZOL-2-YL)-2,5-DIPHENYL TETRAZOLIUM BROMIDE (MTT) FOR RAPID DETECTION OF RIFAMPICIN RESISTENCE IN *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Tuberc Dis* 2:1011-1016 (1998).
2. **ABOU-KARAM M**, SHIER WT. INHIBITION OF ONCOGENE PRODUCT ENZYME ACTIVITY AS AN APPROACH TO CANCER CHEMOPREVENTION TYROSINE-SPECIFIC PROTEIN KINASE INHIBITION BY PURPUROGALLIN FROM *Quercus sp.* NUTGALL. *Phytother Res* 13:337-340 (1999).
3. **ACOSTA MS**, LEON CI, LEAL AL. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA EN CEPAS DE *Mycobacterium tuberculosis* MEDIANTE LA TÉCNICA COLORIMÉTRICA DEL ALAMAR AZUL. *Asociación Colombiana de Infectología* 8:194-202 (2004).
4. **AGUILAR A**, CAMACHO JR, CHINO S, JACQUEZ P y LÓPEZ ME. HERBARIO MEDICINAL DEL INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL. Información Etnobotánica. MÉXICO, IMSS (1994).
5. **AGUILAR-CONTRERAS A**, CAMACHO-PULIDO JR, CHINO-VARGAS S, JACQUEZ-RIOS P y LÓPEZ-VILAFRANCO ME. PLANTAS MEDICINALES DEL HERBARIO IMSS: Su distribución por enfermedades. Grupo ROCHE Syntex de México, SA. DE CV. MÉXICO (1998).
6. **AKERELE O**. MEDICAL PLANTS IN TRADITIONAL MEDICINE. Capítulo. 1. In WAGNER H and FARNSWORTH NR. Economic and Medical Plant Research. Vol. 4. Plants and Tradicional Medicine. Academia Press; p. 5-16 (1990)
7. **ALVAREZ PEREZ VICTOR HUGO**. ESTUDIO QUÍMICO DE *Chamaedora tepejilote* CON ACTIVIDAD ANTITUBERCULOSA. Tesis de Lic. En Biología FES Iztacala, UNAM, (2002).
8. **ALVAREZ-GORDILLO GC**, y DORANTES-JIMENEZ JE. TRATAMIENTO ACORTADO Estrictamente SUPERVISADO PARA TUBERCULOSIS PULMONAR. *Salud Publica de Mexico* 40:272-275 (1998).

9. **ANTURLIKAR** SD, GOPUMADHAVAN S, MITRA SK, CHAUHAN BL, KULKARNI RD. ANTIAMOEBIIC ACTIVITY OF *Cassia fistula*: *IN VITRO* AND *IN VIVO* STUDY. *Indian Drugs* 30:582-585 (1993).
10. **ARGUETA** VA, CANO ALM, RODARTE ME. ATLAS DE LAS PLANTAS DE LA MEDICINA TRADICIONAL MEXICANA. INSTITUTO NACIONAL INDIGENISTA BIBLIOTECA DE LA MEDICINA TRADICIONAL, MÉXICO, (1994).
11. **BALANDRIN** FM, KINGHORN DA, FARNSWORTH RN. PLANT-DERIVED NATURAL PRODUCTS, IN DRUG DISCOVERY AND DEVELOPMENT. Capitulo. 1. *Amer Chem Soc* p. 1-11 (1993).
12. **BANFI** E, SCIALINO G, MONTI-BRAGADIN C. DEVELOPMENT OF A MICRODILUTION METHOD TO EVALUATE *Mycobacterium tuberculosis* DRUG SUSCEPTIBILITY. *J Antimicrob Chemother* 52:796-800 (2003).
13. **BARUA** AK, CHAKRABARTI MK, CHOWDDURY A, BASAK, BASU K. THE STRUCTURE AND STEREOCHEMISTRY OF LANTANILIC ACID, THE β - β DIMETHYLACRYLOYL ESTER OF LANTANINILIC ACID, ISOLATED FROM *Lantana camara*. *Phytochem* 15: 987-989 (1976).
14. **BEGUN** S, MOHAMMAD S, SIDDIQUI BS, SIDDIQUI S. TRITERPENOIDS FROM THE AERIAL PARTS OF *Lantana camara*. *J Nat Prod* 58:1570-1574 (1995).
15. **BERLIN** B, BERLIN EA, MECKES FM, LOZOYA LX, VILLARREAL ML AND TORTORIELLO J. THE SCIENTIFIC BASIS OF GASTROINTESTINAL HERBAL MEDICINE AMONG THE HIGHKAND MAYA OF CHIAPAS, MÉXICO. INC NAKED SCIENCE ANTHROPOLOGICAL INQUIRY INTO BOUDARIES, POWER AND KNOWLODGE. ED. LAURA NADER. ROUTLEDGE. p. 43-68, (1996a).
16. **BERLIN** EA and BERLIN B. MEDICAL ETHNOBIOLOGY OF THE HIGHLAND MAYA OF CHIAPAS, MÉXICO. THE GASTROINTESTINAL DISEASES, PRINCETON, ACADEMIC PRESS, USA (1996b).
17. **BERRIDGE** MB, TAN AS, McCOY KD, WANG R. THE BIOCHEMICAL AND CELLULAR BASIS OF CELL PROLIFERATION ASSAY THAT THE TETRAZOLIUM SALTS. *Biochemica* 4:14-19 (1996).

18. **BHAKTA T**, MUKHERJEE PK, SAHA K, PAL M, SAHA BP. STUDIES ON ANTITUSSIVE ACTIVITY OF *Cassia fistula* (LEGUMINOSAE) LEAF EXTRACT. *Pharm Biol* 36:140-143 (1998a).
19. **BHAKTA T**, MUKHERJEE PK, MUKHERJEE K, PAL M, SAHA BP. STUDIES ON *IN VIVO* WOUND HEALING ACTIVITY OF *Cassia fistula* LINN. LEAVES (LEGUMINOSAE) IN RATS. *Nat Prod Sci* 4:84-87 (1998b).
20. **BHAKTA T**, MUKHERJEE PK, SAHA K, PAL M, SAHA BP, MANDAL SC. EVALUATION OF ANTI-INFLAMMATORY EFFECTS OF *Cassia fistula* (LEGUMINOSAE) LEAF EXTRACT ON RATS. *J Herbs, Spc & Med Plant* 6:67-72 (1999a).
21. **BHAKTA T**, MUKHERJEE PK, MUKHERJEE K, BANERJEE S, MANDAL SC, MAITY TK, PAL M, SAHA BP. EVALUATION OF HEPATOPROTECTIVE ACTIVITY OF *Cassia fistula* LEAF EXTRACT. *J Ethnopharmacol* 66:277-282 (1999b).
22. **BILLO M**, CABALION P, WAIKEDRE J, FOURNEAU C, BOUTTIER S, HOCQUEMILLER R, FOURNET A. SCREENING OF SOME NEW CALEDONIAN AND VANUATU MEDICINAL PLANTS FOR ANTIMYCOBACTERIAL ACTIVITY. *J Ethnopharmacol.* 96:195-200 (2005).
23. **BORK PM**, SCHMITZ ML, KUHN M, ESCHER C, HEINRICH M. SESQUITERPENE LACTONE CONTAINING MEXICAN INDIAN MEDICINAL PLANTS AND PURE SESQUITERPENE LACTONES AS POTENT INHIBITORS OF TRANSCRIPTION FACTOR NF-KAPPA B. *Febs Letters* 402:85-90 (1997).
24. **BPAR**. DIRECTRICES DE LA OMS SOBRE BUENAS PRÁCTICAS AGRÍCOLAS Y DE RECOLECCIÓN, DE PLANTAS MEDICINALES. *Catalogo por la OMS*, Ginebra (2003).
25. **CABALLERO Y** y WALLS F. "PRODUCTOS NATURALES DEL ZOAPATLE (*Montanoa tomentosa* Cerv.)", *Bol. Inst. Quím. UNAM.* 22, 79 (1970).
26. **CALDWELL CG**, FRANZBLAU SG, SUAREZ E, TIMMERMANN BN. OLEANANE TRITERPENES FROM *Junellia tridens*. *J Nat Prod* 63:16611-1641 (2000).

27. **CANTRELL CL, LU T, FRONCZEK FR, FISCHER NH.** ANTIMYCOBACTERIAL CICLOARTANES FROM *Borrchia frutescens*. *J Nat Prod* 59:1131-1136 (1996).
28. **CANTRELL CL, NUÑEZ IS, CASTAÑEDA-ACOSTA J, FOROOZESH M, FRONCZEK FR, FISHER NH, FRANZBLAU SG.** ANTIMYCOBACTERIAL ACTIVITIES OF DEHYDROCOSTUS LACTONE AND ITS OXIDATION PRODUCTS. *J Nat Prod* 61:1181-1186 (1998).
29. **CANTRELL CL, RAJAB, MS, FRANZBLAU SG, FISCHER NH.** ANTIMYCOBACTERIAL TRITERPENES FROM *Melia volkensii*. *J Nat Prod* 62: 546-548 (1999a).
30. **CANTRELL CL, ABATE L, FRONCZEK FR, FRANZBLAU SG, QUIJANO L, FISCHER NH.** ANTIMYCOBACTERIAL EUDESMANOLIDES FROM *Inula helenium* AND *Rudbeckia subtomentosa*. *Planta Med* 65:351-355 (1999b).
31. **CANTRELL CL, RAJAB, MS, FRANZBLAU SG, FRONCZEK FR, FISCHER NH.** ANTIMYCOBACTERIAL ERGOSTEROL-5,8-ENDOPEROXIDE FROM *Ajuga remota*. *Planta Med* 65:732-734 (1999c).
32. **CANTRELL CL, FRANZBLAU SG, FISCHER NH.** ANTIMYCOBACTERIAL PLANT TERPENOIDS. *Planta Med* 67:685-694 (2001).
33. **CASAL M, GUERRERO A, MARTÍN N, MORENO S, NOGALES MC.** DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO DE LAS INFECCIONES POR MICOBACTERIAS. Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (1999).
34. **CASE RJ, FRANZBLAU SG, WANG Y, CHO SH, SOEJARTO DD, PAULI GF.** ETHNOPHARMACOLOGICAL EVALUATION OF THE INFORMANT CONSENSUS MODEL ON ANTI-TUBERCULOSIS CLAIMS AMONG THE MANUS. *J Ethnopharmacol.* 106:82-89 (2006).
35. **CASTRO O, GUTIERREZ JM, BARRIOS M, CASTRO I, ROMERO M, UMANA E.** NEUTRALIZACIÓN DEL EFECTO HEMORRÁGICO INDUCIDO POR VENENO DE *Bothrops asper* (SERPIENTES: VIPERIDAE) POR EXTRACTOS DE PLANTAS TROPICALES. *Rev Biol Tropical* 47:605-615 (1999).
36. **CAVALCANTI AM, BAGGIO CH, FREITAS CS, REIECK L, SOUSA RS, DA SILVA-SANTOS JF, MESIA-VELA S, MARQUES MC.** SAFETY AND

- ANTIULCER EFFICACY STUDIES OF *Achillea millefolium* L. ALTER CHRONIC TREATMENT IN WISTAR RATS. *J Ethnopharmacol* 22 (2006).
37. **CAVALEIRO** C, PINTO E, GONCALVES MJ, SALGUEIRO L. ANTIFUNGAL ACTIVITY OF JUNIPERUS ESSENTIAL OILS AGAINST *Demartophyte*, *Aspergenillus* AND *Candida* STRAINS. *J Appl Microbiol* 100:1333-1338 (2006).
38. **CAVIEDES** L, DELGADO J, GILMAN RH. TETRAZOLIUM MICROPLATE ASSAY AS A RAPID AND INEXPENSIVE COLORIMETRIC METHOD FOR DETERMINATION OF ANTIBIOTIC SUSCEPTIBILITY OF *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiology* 40:1873-1874 (2002).
39. **CHATZOPOULOU** P, DE HAAN A, KATSIOTIS ST. INVESTIGATION ON THE SUPERCRITICAL CO₂ EXTRACTION OF THE VOLATILE CONSTITUENTS FROM *Juniperus communis* OBTAINED UNDER DIFFERENT TREATMENTS OF THE “BERRIES” (CONES). *Planta Med* 68:827-831 (2002).
40. **COLLINS** L y **FRANZBLAU** SG. MICROPLATE ALAMAR BLUE ASSAY VERSUS BACTEC 460 SYSTEM FOR HIGH-THROUGHPUT SCREENING OF COMPOUNDS AGAINST *Mycobacterium tuberculosis* AND *Mycobacterium avium*. *Antimicrob Agents Chemother* 41:1004-1009 (1997).
41. **COMPADRE** CM, PEZZUTO JM, KINGHORN AD, KAMATH SK. HERNANDULCIN: AN INTENSELY SWEET COMPOUND DISCOVERED BY REVIEW OF ANCIENT LITERATURE. *Science* 227:417-419 (1985).
42. **COMPADRE** CM, ROBBBINS EF, KINGHORN AD. THE INTENSELY SWEET HERB, *Lippia dulcis* TREV: HISTORICAL USES, FIELD INQUIRIES, AND CONSTITUENTS. *J Ethnopharmacol* 15: 89-106 (1986).
43. **DE LOGU** A, UDA P, PERELLANO ML, PUSCEDDU MC, SADDI B, SCHIVO ML. COMPARISON OF TWO RAPID COLORIMETRIC METHODS FOR DETECTION RESISTENCE OF *Mycobacterium tuberculosis* TO RIFAMPICIN, ISONIAZID, AND STREPTOMYCIN IN LIQUID MEDIUM. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 20:33-39(2001).
44. **DESIGN** RK. ESTRATEGIAS DE LA OMS SOBRE MEDICINA TRADICIONAL 2002-2005. WHO (2002).

45. **DGE.** SISTEMA UNICO DE INFORMACIÓN PARA LA VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA. Información preliminar. Casos por Entidad Federativa de Enfermedades del Aparato Respiratorio del 2002-2006.
46. **DIAZ JL,** USOS DE LAS PLANTAS MEDICINALES DE MEXICO. INSTITUTO MEXICANO PARA EL ESTUDIO DE PLANTAS MEDICINALES; p. 254 (1976).
47. **DOMÍNGUEZ AX,** MÉTODOS DE INVESTIGACIÓN FITOQUÍMICA, EDITORIAL LIMUSA, MÉXICO, p. 64-68 (1973).
48. **DUKE JA,** HANDBOOK OF MEDICAL HERB. 6ª ed, Ed. CRC Press Inc, BOCA RATON, FLORIDA. p. 266-267 (1985).
49. **DUKE JA,** HANDBOOK OF MEDICAL HERB. 6ª ed, Ed. CRC Press Inc, BOCA RATON, FLORIDA. p. 156-157 (1988).
50. **DYE C, SCHEELE S, DOLIN P, PATHANIA V, RAVIGLIONE RC.** GLOBAL BURDEN OF TUBERCULOSIS ESTIMATED INCIDENCE, PREVALENCE, AND MORTALITY BY COUNTRY. *JAMA* 282:677-686 (1999).
51. **DYE C,** GLOBAL EPIDEMIOLOGY OF TUBERCULOSIS. *Lancet* 367:938-940 (2006).
52. **ELOFF JN.** WHICH EXTRACTANT SHOULD BE USED FOR THE SCREENING AND ISOLATION OF ANTIMICROBIAL COMPONENTS FROM PLANTS. *J Ethnopharmacol* 60:1-8 (1998).
53. **EVANS WCH.** FARMACOGNOSIA. Trease-Evans. Nueva Editorial Interamericana. 13ª ed. México, p. 75-90; 1991.
54. **FARNSWORTH NR, AKERELE O, BINGEL AS, SOJERTO DD, GUO Z.** LAS PLANTAS MEDICINALES EN LA TERAPEUTICA. *Bol Saint Panam* 107:314-329 (1989).
55. **FERNANDEZ VARGAS JACQUELINA.** EFECTO ANTIMICOBACTERIANO E INMODULADOR DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS DE *Achillea millefolium* L. (COMPOSITAE). *Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas* (BIOLOGÍA CELULAR), FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM (2001).
56. **FISCHER NH.** STRUCTURE AND ACTIVITY OF ANTI-TUBERCULOSIS NATURAL PRODUCTS. *Rev Latinoamer Quim* 24:65-68 (1996).

57. **FISCHER** NH, LU T, CANTRELL CL, CASTAÑEDA-ACOSTA J, QUIJANO L, FRANZBLAU SG. ANTIMYCOBACTERIAL EVALUATION OF GERMACRANOLIDES. *Phytochem* 49:559-564 (1998).
58. **FONT** P. PLANTAS MEDICINALES. 6ª ed. Ed. LABOR, MÉXICO, p. 82-84 (1980).
59. **FRAGOSO** ALVAREZ ISAAC ALEJANDRO. ESTUDIO QUÍMICO Y ACTIVIDAD ANTIMICOBACTERIANA DE *Juniperus communis*. Tesis de Licenciatura en *BIOLOGÍA* FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES (FES) IZTACALA. UNAM (2003).
60. **FRANZBLAU** SG, y **CROSS** C. COMPARATIVE *IN VITRO* ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF CHINESE MEDICINAL HERBS. *J Ethnopharmacol* 15:179-288 (1986).
61. **FRANZBLAU** SG, **WITZING** RS, **McLAUGHLIN** JC, **TORRES** P, **MADICO** G, **HERNANDEZ** A, **DEGNAN** MT, **COOK** MB, **QUENZER** VK, **FERGUSON** RM, **GILMAN** RH. RAPID, LOW-TECHNOLOGY MIC DETERMINATION WITH CLINICAL *Mycobacterium tuberculosis* ISOLATES BY USING THE MICROPLATE ALAMAR BLUE ASSAY. *J Clin Microb* 36:362-366 (1998).
62. **FUKUSHIMA** RS, **WEIMER** PJ, **KUNZ** DA. PHOTOCATALYTIC INTERACTION OF RESAZURIN N-OXIDE WITH CYSTEIN OPTIMIZES PREPARATION OF ANAEROBIC CULTURE MEDIA. *Anaerobe* 8:29-34 (2002).
63. **GARCIA** BH. FLORA MEDICINAL DE COLOMBIA. Tomo II. INSTITUTO DE Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Colombia- Bogotá. Colombia, p. 399 (1975).
64. **GEISSMAN** TA y **GRIFFIN** TS. "SEQUITERPENE LACTONES. TOMENTOSIN FROM *Montanoa tomentosa* Cer. *Rev. Latinoam. Quím.* 2:81(1971).
65. **GLASBY** JS. DICTIONARY OF PLANTS CONTAINING SECONDARY METABOLITES. Ed. TAYLOR y FRANCIS Inc, London, INGLATERRA, p. 178 (1991).
66. **HAUSDORFER** J, **SOMPEK** E, **ALLERBERG** F, **DIERICH** M, **RÜSCH-GERDES** S. E-TEST FOR SUSCEPTIBILITY TESTING OF *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Tuberc Lung Dis* 2:751-755 (1998).

67. **HUERTA C.** LA HERBOLARIA MITO O REALIDAD. *Conabio* (12), MÉXICO (2002).
68. **JAENSON TG, PALSSON K, BORG-KARLSON AK.** EVALUATION OF EXTRACTS AND OILS OF MOSQUITO (DIPTERA: CULICIDAE) REPELLENT PLANTS FROM SWEDEN AND GUINEA-BISSAU. *J Med Ethomol* 43:113-119 (2006).
69. **JAGTAP SD, DEOKULE SS, BHOSLE SV.** SOME UNIQUE ETHNOMEDICINAL USES OF PLANTS USED BY THE KORKU TRIBE OF AMRAVATI DISTRICT OF MAHARASHTRA, INDIA. *J Ethnopharmacol* 18 (Aceptado para publicación) (2006).
70. **JIMENEZ-ARRELLANES A, VILLAREAL C, TOSCANO RA, COOK M, ARNASON JT, BYE R, MATA R.** LIMONOIDS FROM *Swietenia humillis* and *Guarea grandifolia* (MELIACEAE). *Phytochem*49:1981-1988 (1998).
71. **JIMENEZ-ARRELLANES 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* 17:903-908 (2003).
72. **JIMENEZ-ARRELLANES A, MECKES M, ALVAREZ V, TORRES J, PARRA R.** SECONDARY METABOLITES FROM *Chamaedora tepejilote* (PALMAE) ARE ACTIVE AGAINST *Mycobacterium tuberculosis*. *Phytother Res* 19:320-322 (2005).
73. **JIMENEZ-ARRELLANES A, MECKES M, LUNA-HERRERA J, TORRES J.** ANTIMYCOBACTERIAL COMPOUNDS FROM *Lantana hispida* (VERBENACEAE). *J Ethnopharmacol* Aceptado para publicación (2006).
74. **JIMENEZ-FERRER JE, REYNOSA-ZAPATA I, PEREZ-RORRES Y, TORTORIELLO J.** THE SECRETAGOGUE EFFECT OF THE POISON FROM CENTRUTOIDES LIMPIDUS LIMPIDIDUS ON THE PANCREAS OF MICE AND THE ANTAGONISTIC ACTION OF THE *Bouvardia ternifolia* EXTRACT. *Phytomedicine* 12(1-2):65-71 (2005a).
75. **JIMENEZ-FERRER JE, PEREZ-TERAN YY, ROMAN-RAMOS R, TORTORIELLO J.** ANTITOXIN ACTIVITY OF PLANTS IN MEXICAN

- TRADITIONAL MEDICINE AGAINST SCORPION POISONING. *Phytomedicine* 12:116-122 (2005b).
76. JOLAD SD, HOFFMANN JJ, TORRANCE SJ, WIEDHOPF RM, COLE JR, ARORA SK, BATES RB, GARDIULO RL, KRIEK GR. BOUVARDIN AND DEOXYBOUVARDIN, ANTITUMOR CYCLIC HEXAPEPTIDES FROM *Bouvardia ternifolia* (RUBIACEAE). *J Am Chem Soc* 99:8040-8044 (1977).
77. KANEDA N, LEE IS, GUPTA MP, SOEJARTO DD, KINGHORN AD. (+)-4 β -HYDROXYHERNANDULCIN, A NEW SWEET SESQUITERPENE FROM THE LEAVES AND FLOWERS OF *Lippia dulcis*. *J Nat Prod* 55:1136-1141 (1992).
78. KASHIWADA Y, LIZUKA H, YOSHIOKA K, CHEN R-F, NONAKA G, NISHIOKA I. TANNINS AND RELATED COMPOUNDS XCIII. OCCURRENCE OF ENANTIOMERIC PROANTHOCYANIDINS IN THE LEGUMINOSAE PLANTS, *Cassia fistula* L. AND *Cassia javanica* L. *Chem Pharm Bull* 38:888-893 (1990).
79. KHURMA UR, CHAUDHARY P. COMPARATIVE EFFECTS OF EXTRACTS OF DIFFERENTS PARTS OF CALOTROPIS PROCERA, *Cassia fistula*, RICINUS COMMUNIS AND SESBANIA SESBAN ON MELOIDOGYNE JAVANICA JUVENILES. *J Evironmental Biology* 20:287-288 (1999).
80. KOBAISY M, ABRAMOWSKI Z, LERMER L, SAXENA G, HANCOCK REW and TOWERS GHN. ANTIMICOBACTERIAL POLYYNES OF DEVIL'S CLUB (*Oplopanax horridus*), A NORTH AMERICAN NATIVE MEDICINAL PLANT. *J Nat Prod* 60:1210-1213 (1997).
81. LALL N, y MEYER JJM. *IN VITRO* INHIBITION OF DRUG-RESISTANT AND DRUG-SENSITIVE STRAIN OF *Mycobacterium tuberculosis* BY ETHNOBOTANICALLY SELECTED SOUTH AFRICAN PLANTS. *J Ethnopharmacol* 66:347-54 (1999).
82. LARA OF y MARQUEZ AC. PLANTAS MEDICINALES DE MÉXICO. UNAM, MÉXCO, p. 63 (1996).
83. LEE KH y GEISSMAN TA. SESQUITERPENE LACTONES OF ARTEMISIA CONSTITUENTS OF *A. ludoviciana ssp. mexicana*. *Phytochem* 9:403-408 (1970).

84. LEVINE SA, ADAMS RE, CHEN R, COTTER M, HIRSH AF, KANE VV, KANODIA RM, SHOW CH, WACHTER MR, CHIN E, HUETTMANN R, OSTROWSKI P, MATEOS JL, NORIEGA L, GUZMÁN A, MIJAREZ A, y TOVAR. PATANOL AND MONTANOL, NOVEL OXEPANE DITERPENOIDS FROM THE MEXICAN PLANT ZOAPATLE (*M. tomentosa*)", *J. Am. Chem. Soc.* 101: 3404 (1979).
85. LIANG-TZUNG L, LI-TEH L, LIEN-CHAI CH, CHUN-CHING L. *IN VITRO* ANTI-HEPATOMA ACTIVITY OF FIFTEEN NATURAL MEDICINES FROM CANADA. *Phytother Res* 16:440-444 (2002).
86. LINARES JA y MEDRANO RA. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD *IN VITRO* E INTRACELULAR DE *Artemisia ludoviciana* SOBRE *Mycobacterium tuberculosis* RESISTENTE A FÁRMACOS. *Tesis de Licenciatura* ENCB, IPN (2004).
87. LOEW D, HEIMSOTH V, KUNTZ E, SCHILCHER H, FITOFARMACOS, FARMACOLOGÍA Y CLÍNICA DE LOS "DIURÉTICOS VEGETALES". En: DIURÉTICO: QUÍMICA, FARMACOLOGÍA Y TERAPÉUTICA, INCLUIDA FITOTERAPIA. BARCELONA; Ed. Salvat, p. 233-259 (1991).
88. LÓPEZ, V. MARIA EDITH. CONTRIBUCIÓN ETNOBOTÁNICA EN PLANTAS MEDICINALES UTILIZADAS POR DOS GRUPOS ÉTNICOS DE MECAPALAPA, MUNICIPIO DE PANTEPEC, PUEBLA. *Tesis de Licenciatura en BIOLOGÍA*, ENEP, Campus IZTACALA, UNAM, p. 12-22 (1988).
89. LOZOYA S y LOZOYA M. "FLORA MEDICINAL DE MÉXICO," *PLANTAS INDÍGENAS*, 1ª. parte, IMSS, México, p. 193 (1982).
90. LOZOYA LX, VELAZQUEZ DG, FLORES AA. LA MEDICINA TRADICIONAL EN MÉXICO. EXPERIENCIA DEL PROGRAMA. IMSS-COPLAMAR, 1982-1987. IMSS, 1ª ed., México (1988).
91. LOZOYA X. AN OVERVIEW OF THE SYTEM OF TRADITIONAL MEDICINE CURRENTLY PRACTISED IN MEXICO Cap. 6. *Eco Med Planta Res*, 4:71-93(1990). In FRARNSWORTH, NR. PLANTS AND TRADITIONAL MEDICINE. Editorial Academic. Press. (1994).

92. LUNA-HERRERA J, MARTINEZ-CABRERA G, PARRA-MALDONADO R, ENCISO-MORENO JA, TORRES-LOPEZ J, QUESADA-PASCUAL F, DELGADILLO-POLANCO R, FRANZBLAU SG. USE OF RECEIVER OPERATING CHARACTERISTIC CURVES TO ASSESS THE PERFORMANCE OF A MICRODILUTION ASSAY FOR DETERMINATION OF DRUG SUSCEPTIBILITY OF CLINICAL ISOLATES OF *Mycobacterium tuberculosis*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 22:21-27 (2003).
93. LUNA MOLINA TERESA. ESTUDIO QUÍMICO DE DOS ESPECIES MEDICINALES CON ACTIVIDAD ANTIMICOBACTERIANA. Tesis de Licenciatura en QFB. UVM (Incorporada a la UNAM) (2005).
94. MALAGON F, VAZQUEZ J, DELGADO G, RUIZ A. ANTIMALARIC EFFECT OF AN ALCOHOLIC EXTRACT OF *Artemisia ludoviciana* MEXICANA IN A RODENT MALARIA MODEL. *Parassitologia* 39:3-7 (1997).
95. MARTIN AM, CAMACHO M, PORTAELS F, PALOMINO JC. RESAZURIN MICROTITER ASSAY PLATE TESTIG OF *Mycobacterium tuberculosis* SUSCEPTIBILITES TO SECOND-LINE DRUGS: RAPID, SIMPLE, AND INEXPENSIVE METHOD. *Antimicrob Agents Chemother* 47:3616-3619 (2003).
96. MARTIN AM, QUEIROZ EF, MARTSON A, HOSTETTMANN K. LABDANE DITERPENES FROM *Juniperus communis* L. BERRIES. *Phytochem Anal* 17:32-35 (2006).
97. MARTÍNEZ-ALFARO MA. MEDICINAL PLANTS IN A TOTONAC COMMUNITY OF THE SIERRA NORTE OF PUEBLA, TUZAMAPAN DE GALELEANA, PUEBLA, MÉXICO. *J Ethnopharmacol* 11:203-221 (1984).
98. MATA RE. CURSO DE FARMACOGNOSIA (TEORIA). Información General. Facultad de Química. UNAM. p. 45 (1999).
99. MSHANA RN, TADESSE G, ABATE G, MIÖRNER H. USE OF 3-(4,5-DIMETHYLTHIAZOL-2-YL)-2,5-DIPHENYL TETRAZOLIUM BROMIDE FOR RAPID DETECTION OF RIFAMPIN-RESISTANT *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 36:1214-1219 (1998).
100. MAZUMDER UK, GUPTA M, RATH N. CNS ACTIVITIES OF *Cassia fistula* IN MICE. *Phytother Res* 12:520-522 (1998).

101. **McCUTCHEON** AR, ELLIS SM, HANCOCK REW, TOWERS GHN. ANTIBIOTIC SCREENING OF MEDICINAL PLANTS OF THE BRITISH COLUMBIAN NATIVE PEOPLES. *J Ethnopharmacol* 37:213-223 (1992).
102. **McCUTCHEON** AR, ELLIS SM, HANCOCK REW, TOWERS GHN. ANTIFUNGICAL SCREENING OF MEDICINAL PLANTS OF BRITISH COLUMBIAN NATIVE PEOPLES. *J Ethnopharmacol* 44:157-169 (1994).
103. **McCUTCHEON** AR, STOKES RW, THORSON LM, ELLIS SM, HANCOCK REW, TOWERS GHN. ANTI-MYCOBACTERIAL SCREENING OF BRITISH COLUMBIAN MEDICINAL PLANTS. *Inter J Pharmacognosy* 35:77-83 (1997).
104. **MECKES** M, VILLAREAL ML, TORTORIELLO J, BERLIN B, BERLIN EA. A MICROBIOLOGICAL EVALUATION OF MEDICINAL PLANTS USED BY THE MAYA PEOPLE OF SOUTHERN MEXICO. *Phytother Res* 9:244-250 (1995).
105. **MIJARES** E. DESARROLLO DE MICROENSAYO COLORIMÉTRICO PARA LA DETERMINACIÓN DE LA DROGOSENSIBILIDAD DE AISLADOS CLÍNICOS DE *M. tuberculosis* A FÁRMACOS DE 1ª LÍNEA Y 2ª LÍNEA. Tesis de Licenciatura. ENCB, IPN, México (2003).
106. **MISRA** TN, SINGH RS, PANDEY HS, SINGH BK. A NEW DITERPENE FROM *Cassia fistula* PODS. *Fitoterapia* 68:375-376 (1997).
107. **MOLINA-SALINAS** GM, RAMOS-GUERRA MC, VARGAS-VILLAREAL J, MATA-CARDENAS BD, BECERRIL-MONTES P, SAID-FERNANDEZ S. BACTERICIDAL ACTIVITY OF ORGANIC EXTRACTS FROM *Flourensia cernua* DC AGAINST STRAINS OF *Mycobacterium tuberculosis*. *Arch Med Res* 37:45-49 (2006).
108. **MOSMANN** T. RAPID COLORIMETRIC ASSAY FOR CELLULAR GROWTH AND SURVIVAL: APPLICATION TO PROLIFERATION AND CYTOTOXICITY ASSAY. *J Immunol Method* 65:55-63 (1983).
109. **MOSKALENKO** SA. PRELIMINARY SCREENING OF FAR-EASTERN ETHNOMEDICINAL PLANTS FOR ANTIBACTERIAL ACTIVITY. *J Ethnopharmacol* 15:231-259 (1986).

110. **NEWMAN DJ, CRAGG GM, SNADER KM.** REVIEWS. NATURAL PRODUCTS AS SOURCES OF NEW DRUGS OVER THE PERIOD 1981-2002. *J Nat Prod* **66**:1022-1037 (2003).
111. **NOM-006-SSA2-1993.** (Norma Oficial Mexicana Para la Prevención y Control de la Tuberculosis en la Atención Primaria a la Salud).
112. **O'BRIEN J, WILSON I, OTON T, POGNAN F.** INVESTIGATION OF THE ALAMAR BLUE (RESAZURIN) FLUORESCENT DYE FOR THE ASSESSMENT OF MAMMALIAN CELL CYTOTOXICITY. *Eur J Biochem* **267**:5421-5426 (2000).
113. **OCHOCKA JR, ASZTEMBORSKA M, ZOOK DR, SYBILSKA D, PEREZ G, OSSICINI L.** ENANTIOMERS OF MONOTERPENIC HYDROCARBONS IN ESSENTIAL OILS FROM *Juniperus communis*. *Phytochem* **44**:869-873 (1997).
114. **OKORIE DA y TAYLOR DAH.** LIMONOIDS FROM *Swietenia humillis*. *Phytochem* **10**:469-470 (1971).
115. **OMS.** (ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE SALUD) ANTI-TUBERCULOSIS DRUG RESISTENCE IN THE WORLD. The WHO/IUATLD global project on anti-tuberculosis surveillance. Report No. 2. Geneva, Switzerland (2001).
116. **OMS.** (ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE SALUD) LA CARTA MUNDIAL DE TUBERCULOSIS. STOP TB Partnership. WHO (2005).
117. **OMS** (ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE SALUD). Versión impresora Nota descriptiva OMS Revisada (104): (2006).
118. **OPS** (Organización Panamericana de la Salud) OMS, 136ª SESION DEL COMITÉ EJECUTIVO. ESTRATEGIA REGIONAL PARA EL CONTROL DE LA TUBERCULOSIS PARA 2005-2015. Buenos Aires, ARGENTINA. CE136/17, 2005.
119. **ORHAN I, SENER B, ATICI T, PALITTAPONGARNPIM P.** *IN VITRO* ANTIMYCOBACTERIAL POTENTIAL OF SOME FRESH-WATER MACROALGAE AND AQUEOUS PLANTS. *Pharma Bull* **40**:568-569 (2002).
120. **ORTIGOZA GJ.** MEDICINA TRADICIONAL. ETNOFARMACOLOGÍA. Cienciorama: Una Imagen del Universo la Vida en la Tierra (2006).
121. **PALACI M, MIZUKA USY, NAKAMURA SD, DA SILVA TMA, CURCIO M, MATHEUS SEA.** EVALUATION OF MYCOBACTERIA GROWTH INDICATOR TUBE FOR RECOVERY AND DRUG SUSCEPTIBILITY TESTIG

- OF *Mycobacterium tuberculosis* ISOLATED FROM RESPIRATORY SPECIMENS. *J Clin Microbiol* 34:762-764 (1996).
122. PALOMINO JC y PORTAELS, F. SIMPLE PROCEDURE FOR DRUG SUSCEPTIBILITY TESTING OF *Mycobacterium tuberculosis* USING A COMMERCIAL COLORIMETRIC ASSAY. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 18:380-383 (1999).
123. PALOMINO JC, MARTIN A, CAMACHO M, GUERRA H, SWINGS J, PORTAELS F. RESAZURIN MICROTITER ASSAY PLATE: SIMPLE AND INEXPENSIVE METHOD FOR DETECTION OF DRUG RESISTENCE IN *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agent Chemother* 46:2720-2722 (2002).
124. PATENT No. 5,501,959. USA. ALAMAR BLUE™ ASSAY. TREK™ DIAGNOSTIC SYSTEMS, INC.
125. PELÁEZ F, CABELLO A, PLATAS G, DIEZ MT, GONZALEZ DEL VAL A, MARTAN I, VICENTE F, BILLS GE, GRACOBBE RA, SCHWAETZ RE, ONISH JC, MEINZ MS, ABRUZZO GK, FLATTERY AM, KONG L, KURTZ MB. THE DISCOVERY OF ENFUMAFUNGIN, A NOVEL ANTIFUNGAL COMPOUND PRODUCED BY AN ENDOPHYTIC HORMONEMA SPECIES BIOLOGICAL ACTIVITY AND TAXONOMY OF THE PRODUCING ORGANISMS. *Syst Appl Microbiol* 23:333-343. (2000).
126. PEPELJNJAK S, KOSALEC I, KALODERA Z, BLAZEVIC N. ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF JUNIPER BERRY OIL (*Juniperus communis* L., CUPRESSACEAE). *Acta Pharm* 55:417-422 (2005).
127. PEREZ S, MECKES M, PEREZ C, SUSUNAGA A, ZAVALA MA. ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY OF *Lippia dulcis*. *J Ethnopharmacol* 102:1-4 (2005).
128. PETLEVSKI R, HADŽIJA M, SLIJEČEVIĆ, JURETIĆ D. EFFECT OF “ANTIDIABETIS” HERBAL PREPARATION ON SERUM GLUCOSE AND FRUCTOSAMINE IN NOD MICE. *J Ethnopharmacol* 75:181-184 (2001).
129. PFALLER MA y BARRY AL. EVALUATION OF A NOVEL COLORIMETRIC BROTH MICRODILUTION METHOD FOR ANTIFUNGAL SUSCEPTIBILITY TESTING OF YEAST ISOLATES. *J Clin Microbiol* 32:1992-1996 (1994).

-
130. **PHILLIPSON** JD. PHYTOCHEMISTRY AND MEDICAL PLANTS. *Phytochem* 56:237-243 (2001).
131. **PIETRO** RCLR, KASHIMA S, SATO DN, JANUARIO AH, FRANCA SC. *IN VITRO* ANTIMYCOBACTERIAL ACTIVITIES OF *Physalis angulata* L. *Phytomedicine* 7:335-338 (2000).
132. **PIKE** KS, STARY P, ALLISON D, GRAF G, BOYDSTON L, MILLER T. PARASITOIDS (HYMENOPTERA: BRACONIDAE: APHIDIINAE) OF APHIDS ON BIG SAGEBRUSH (*Artemisia tridentata* NUTTALL) AND PRAIRIE SAGE (*Artemisia ludoviciana* NUTTALL) IN WASHIGTON STATE. *Proceedings of the Entomological Society of Washington* 99:143-155 (1997).
133. **PORRAS** TB, LEON CI, GUERRERO MI, MARTÍN A, PORTAELS F, PALOMINO JC. EVALUACIÓN DE MÉTODOS FENOTÍPICOS Y GENOTÍPICOS PARA LA DETECCIÓN DE FARMACORRESISTENCIA DE *Mycobacterium tuberculosis*. *Biomédica* 25:22-33 (2005).
134. **QUIJANO** L, GOMEZ-GARIVAY F, TREJO-B RI, RIOS T. HYDROXI-BIS-DIHYDROENCCELIN, A DIMERIC EUDESMANOLIDE AND OTHER EUDESMANOLIDES FROM *Montanoa speciosa*. *Phytochem* 30:3293-3295 (1991).
135. **R&D** Systems, Inc. 1-800-343-7475. RESAZURIN. Catalog Number. AR002. 21/02/02.
136. **REIS** RS, NEVES I Jr, LOURENCO SLS, FONSECA LS, LOURENCO MCS. COMPARATION OF FLOW CYTOMETRIC AND ALAMAR BLUE TESTS WITH THE PROPORTION METHOD FOR TESTING SUSCEPTIBILITY OF *Mycobacterium tuberculosis* TO RIFAMPIN AND ISONIAZID. *J Clin Microb.* 42:2247-2248 (2004).
137. **RIBEIRO** A, ZANI CL, ALVES TMD, MENDES NM, HAMBURGER M, HOSTETTMANN K. MOLLUSCICIDAL SAPONINS FROM THE PERICARP OF *Sapindus saponaria*. *Inter J Pharmacog* 33:177-180 (1995).
138. **ROBLEDO** RJ y MEJIA MGI. ACTUALIDAD EN EL DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSIS POR EL LABORATORIO. *Asociación Colombiana de Infectología* 5:251-259 (2001).

-
139. **ROMO J** y **TELLO H**. ESTUDIO DE LA *Artemisia mexicana* ARMEXICANA, UN NUEVO SANTANÓLIDO CUYA LACTONA POSEE FUSIÓN CIS. *Rev Latinoamer Quím* 3:122-126 (1972).
140. **ROMO DE VIVAR RA**. QUIMICA, UNIVERSO, TIERRA Y VIDA. Editorial Fondo de Cultura Económica. La ciencia/51 para todos. México, p. 87 (1987).
141. **ROMO DE VIVAR RA**. QUIMICA DE LA FLORA MEXICANA. INVESTIGACIONES EN EL INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM. S y G EDITORES S.A de C.V., México, prologo p. IX-XIII (2006).
142. **ROSS IA**, MEDICAL PLANTS OF THE WORLD, CHEMICAL CONSTITUENTS TRADICIONAL AND MODERN MEDICINAL USES. Ed. Human Press, NEW JERSEY, p. 179-182 (1999)
143. **SAID-FERNANDEZ S**, **BECERRIL-MONTES P**, **MOLINA-SALINAS GM**, **BARRIOS-GARCIA H**, **VARGAS-VILLAREAL J**. TUBERCULOSIS CAUSADA POR CEPAS DE *Mycobacterium tuberculosis* DROGORRESISTENTES. *Enf Emerg* 7:13-19 (2005a).
144. **SAID-FERNANDEZ S**, **RAMOS-GUERRA MC**, **MATA CARDENAS BD**, **VARGAS-VILLAREAL J**, **VOLLAREAL-TREVINO L**. *IN VITRO* ANTIPROTOZOAL OF THE LEAVES OF *Artemisia ludoviciana*. *Fitoterapia* 76: 466-468 (2005b).
145. **SALAZAR SIERRA FERNANDO**. VALORACIÓN DE LOS EFECTOS DE *Chamaedora tepejilote*, *Sphaeralcea angustifolia*, *Larrea tridentata* y *Juniperus communis* EN EL MODELO DE ARTRITIS REUMATOIDE ACII. *Tesis de Licenciatura en BIOLOGÍA*, ENEP Campus IZTACALA, UNAM (2003).
146. **SALIE F**, **EAGLES PFK**, **LENG HMJ**. PRELIMINARY ANTIMICROBIAL SCREENING OF FOUR SOUTH AFRICAN ASTERACEAE SPECIES. *J Ethnopharmacol* 52:27-33 (1996).
147. **SAMY RP**, **IGNACIMUTHU S**, **SEN A**. SCREENING OF 34 INDIAN MEDICINAL PLANTS FOR ANTIBACTERIAL PROPERTIES. *J Ethnopharmacol* 62:173-181 (1998).

148. **SAXENA G**, FARMER SW, HANCOCK REW, TOWERS GHN. CHLOROCHIMAPHILIN: A NEW ANTIBIOTIC FROM *Moneses uniflora*. *J Nat Prod* 59:62-65(1996).
149. **SCARPARO C**, RICORDI P, RUGGIERO G, PICCOLI P. EVALUATION OF THE FULLY AUTOMATED BACTEC MGIT 960 SYSTEM FOR TESTING SUSCEPTIBILITY OF *Mycobacterium tuberculosis* TO PYRAZINAMIDE, STREPTOMYCIN, ISONIAZID, RIFAMPIN AND ETHAMBUTOL AND COMPARISON WITH THE RADIOMETRIC BACTEC 460TB METHOD. *J Clin Microbiol* 42:1109-1114 (2004).
150. **SEGURA-CORREA R**, MATA R, ANAYA AL, HERNANDEZ-BAUTISTA B, VILLENA R, SORIANO-GARCÍA M, BYE R, LINARES E. NEW TETRANORTRITERPENOIDS FROM *Swietenia humillis*. *J Nat Prod* 56:1567-1574 (1993).
151. **SHALE TL**, STIRK WA, VAN STADEN J. VARIATION IN ANTIBACTERIAL AND ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY OF DIFFERENT GROWTH FORMS OF *Malva parviflora* AND EVIDENCE FOR SYNERGISM OF THE ANTI-INFLAMMATORY COMPOUNDS. *J Ethnopharmacol* 96:325-330 (2005).
152. **SHARMA OP**, DAWRA RK, RAMESHY DA. TRITERPENOID ACID LANTADENE D FROM *Lantana camara* var ACULEATA. *Phytochem* 29:3961-3962 (1990).
153. **SHARMA SK**, ALI M. A NEW STIGMASTANE DERIVATIVE FROM ROOTS OF *Malva parviflora*. *Indian J Chem Sec-B-Org Chem Including Med Chem* 38:746-748 (1999).
154. **SHARMA OP**, SING A, SHARMA S. LEVELES OF LANTADENES, BIOACTIVE PENTACYCLIC TRITERPENOIDS, IN YOUNG AND MATURE LEAVES OF *Lantana camara* var. ACULEATA. *Fitoterapia*. 71:487-491 (2000).
155. **SIDDIQUI BS**, RAZA SM, BEGUM S, SIDDIQUI S, FIRDOUS S. PENTACYCLIC TRITERPENOIDS FROM *Lantana camara*. *Phytochem* 38:681-685 (1995).

-
156. **SOUTO-BACHILLER** FA, DEJESUS-ECHEVERRIA MD, CARDENAS-GONZALEZ OE. HERNANDULCIN IS THE MAJOR CONSTITUENT OF *Lippia dulcis* Trev (VERBENACEAE). *Nat Prod Letters* 8:151-158 (1996).
157. **SOUTO-BACHILLER** FA, DEJESUS-ECHEVERRIA M, CARDENAS-GONZALEZ OE, ACUNA-RODRIGUEZ MF, MELENDEZ PA, ROMERO-RAMSEY L. TERPENOID COMPOSITION OF *Lippia dulcis*. *Phytochem* 44:1077-1086 (1997).
158. **SPM** (Salud Pública de México). PRINCIPALES CAUSAS DE MORTALIDAD HOSPITALARIA. Egresos hospitalarios del Sistema Nacional de Salud, 2000; 44 p. 184 (2002a)
159. **SPM** (Salud Pública de México). PRINCIPALES CAUSAS DE MORTALIDAD HOSPITALARIA. Egresos hospitalarios del Sistema Nacional de Salud, 2000; 44 p. 274 (2002b)
160. **STEENKAMP** V, STEWART MJ, ZUCKERMAN M. CLINICAL AND ANALYTICAL ASPECTS OF PIRROLIZIDINE POISONING CAUSED BY SOUTH AFRICAN TRADITIONAL MEDICINES. *Therapeutic Drug Monitoring* 22:302-206 (2000).
161. **STEENKAMP** V, STEWART MJ, VAN DER MERWE S, ZUCKERMAN M, CROWTHER NJ. THE EFFECT OF SENECIO LATIFOLIUS A PLANT USED AS A SOUTH AFRICAN TRADITIONAL MEDICINE, ON A HUMAN HEPATOMA CELL LINE. *J Ethnopharmacol* 78:51-58 (2001).
162. **STEENKAMP** V, y STEWART MJ. NEPHROTOXICITY ASSOCIATED WITH EXPOSURE TO PLANT TOXINS, WITH PARTICULAR REFERENCE TO AFRICA. *Ther Drug Monit* 27:270-277 (2005).
163. **TADEG** H, MOHAMMED E, ASRES K, GEBRE-MARIAM T. ANTIMICROBIAL ACTIVITIES OF SOME SELECTED TRADITIONAL ETHIOPIAN MEDICINAL PLANTS USED IN THE TREATMENT OF SKIN DISORDES. *J Ethnopharmacol* 100:168-175 (2005).
164. **TOPCU** G, ERENLER R, CAKMAK O, BOZOK CJ, CELIK C, CHAI HB, PEZZUTO JM. DITERPENOS FROM THE BERRIES OF *Juniperus excelsa*. *Phytochem* 50:1195-1199 (1999).

165. **TORTOLI E**, **BENEDETTI M**, **FONTANELLI A**, **SIMONETTI M**. EVALUATION OF AUTOMATED BACTEC MGIT 960 SYSTEM FOR TESTING SUSCEPTIBILITY OF *Mycobacterium tuberculosis* TO FOUR MAJOR ANTITUBERCULOUS DRUGS: COMPARISON WITH THE RADIOMETRIC BACTEC 460TB METHOD AND THE AGAR PLATE METHOD OF PROPORTION. *J Clin Microbiol* 40:607-610 (2002).
166. **TOZYO T**, **YOSHIMURA Y**, **SAKURAI K**, **UCHIDA N**, **TAKEDA Y**, **NAKAI H**, **ISHII H**. NOVEL ANTITUMOR SESQUITERPENOIDS IN *Achillea millefolium*. *Chem Pharm Bull* 42:1096-1100 (1994).
167. **TUÑÓN H**, **THORSELL W**, **BOHLIN L**. MOSQUITO REPELLING ACTIVITY OF COMPOUNDS OCCURRING IN *Achillea millefolium* L. (ASTERACEAE). *Economic Botany* 48:111-120 (1994).
168. **TURNER NJ**. ETHNOBOTANY OF CONIFEROUS TREES IN THOMPSON AND LILLOOET INTERIOR SALISH OF BRITISH COLUMBIA. *Economic Botany*, 42:177-194 (1988).
169. **UNSSC** (Últimas Normas Servicio de Salud Colombiana). Guía de Atención de la Tuberculosis Pulmonar y Extrapulmonar. *NTTBC* (RESOLUCIÓN No. 00412) (2000).
170. **VAN DER MERWE M**, **WINFIELD MO**, **ARNOLD GM**, **PARKER JS**. SPATIAL AND TEMPORAL ASPECTS OF THE GENETIC STRUCTURE OF *Juniperus communis* POPULATIONS. *Molecular Ecology* 9:379-386 (2000).
171. **VAN DER WEIJDEN GA**, **TIMMER CJ**, **TIMMERMAN MF**, **REIJERSE E**, **MANTEL MS**, **VAN DER VELDEN V**. THE EFFECT OF HERBAL EXTRACTS IN AN EXPERIMENTAL MOUTHRINSE ON ESTABLISH PLAQUE AND GINGIVITIS. *J Clin Periodontol* 25:399-403 (1998).
172. **VAN PUYVELDE L**, **NTAWUKILIYAYO JD**, **PORTAELS F**, **HAKIZAMUNGU E**. *IN-VITRO* INHIBITION OF MYCOBACTERIA BY RWANDESE MEDICINAL-PLANTS. *Phytother Res* 8:65-69 (1994).
173. **WÄCHTER GA**, **VALCIC S**, **FRANZBLAU SG**, **SUAREZ E**, **TIMMERMANN BN**. ANTITUBERCULAR ACTIVITY OF TRITERPENOIDS FROM *Lippia turbinata*. *J Nat Prod* 64:37-41 (2001a).

174. **WÄCHTER GA, FRANZBLAU SG, MONTENEGRO G, HOFFMANN JJ, MAIESE WM and TIMMERMANN BN.** INHIBITION OF *Mycobacterium tuberculosis* GROWTH BY SARINGOSTEROL FROM *Lessonia nigrescens*. *J Nat Prod* 64:1463-1464 (2001b).
175. **WANG X, BUNKERS GJ.** POTENT HETEROLOGOUS ANTIFUNGAL PROTEINS FROM CHEESEWEED (*Malva parviflora*). *Biochem Biophys Res Commun* 279:669-673 (2000).
176. **WANG X, BUNKERS GJ, WALTERS MR, THOMA RS.** PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF TREE ANTIFUNGAL PROTEINS FROM CHEESEWEED (*Malva parviflora*). *Biochem Biophys Res Commun* 282:1224-1228 (2001).
177. **WANGER A, y MILLS K.** TESTIG OF *Mycobacterium tuberculosis* SUSCEPTIBILITY TO ETHAMBUTOL, ISONIAZID, RIFAMPIN, AND STREPTOMYCIN BY USING ETEST. *J Clin Microbiol* 34:1672-1676 (1996).
178. **WHITE GL.** *Sapindus saponaria* L-(SAPINDACEAE), A NEW HOST OF ECDYTOLOPHA AURANTIANUM (LIMA) (LEPIDOPTERA: TORTRICIDAE: OLETHREUTINAE). *Inter J Pest Management* 45:287-291 (1999).
179. **WILLIAM, AR, y THOMPSON, DM,** GUIA PRACTICA ILUSTRADA DE LAS PLANTAS MEDICINALES, Ed. BLUME, ESPAÑA, p. 76-171 (1981).
180. **WILLIAMSON EM, OKPAKO TG, EVANS JP.** SELECTION, PREPARATION AND PHARMACOLOGICAL EVALUATION OF PLANT MATERIAL, *Pharmacological Methods in Phytotherapy Reserch* EDITORIAL JOHN WILEY Y SONS, INGLATERRA (1998).
181. **YACESH S, JAMAL Q, KHAN AU, GILANI AH.** STUDIES ON HEPATOPROTECTIVE, ANTISPASMODIC AND CALCIUM ANTAGONIST ACTIVITIES OF THE AQUEOUS-METHANOL EXTRACT OF *Achillea millefolium*. *Phytother Res* 20:546-551 (2006).
182. **YAJKO DM, MADEJ JJ, LANCASTER MV, SANDERS CA, CAWTHON VL, GEE B, BABST A, HADLEY K.** COLORIMETRIC METHOD FOR DETERMINING MICs OF ANTIMICROBIAL AGENTS FOR *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 33:2324-2327 (1995).

183. ZAMORA-MARTÍNEZ MC, POLA CP. MEDICINAL PLANTS USED IN SOME RURAL POPULATION OF OAXACA, PUEBLA AND VERACRUZ, MÉXICO. *J Ethnopharmacol* 35:229-257 (1992).

CITAS Web

184. [In Vitro Toxicology Assay Kit, Resazurin based from Sigma-Aldrich ...](http://www.biocompare.com/.../17250/matrix/In-Vitro-Toxicology-Assay-Kit-Resazurin-based-from-Sigma-Aldrich.html)
[www.biocompare.com/.../17250/matrix/ In-Vitro-Toxicology-Assay-Kit-Resazurin-based-from-Sigma-Aldrich.html](http://www.biocompare.com/.../17250/matrix/In-Vitro-Toxicology-Assay-Kit-Resazurin-based-from-Sigma-Aldrich.html) - 39k -
185. [Resazurin - definition from Biology-Online.org](http://www.biology-online.org/dictionary/Resazurin) - www.biology-online.org/dictionary/Resazurin - 9k -
186. **Tuberculosis.** ... Infección y transmisión. La **tuberculosis** es una enfermedad contagiosa. ... www.who.int/entity/mediacentre/factsheets/fs104/es/

12. Apéndice

12. Parte química

12. 1. Material

- Columnas para cromatografía en columna
- Matraces bola 50, 100, 500 mL
- Matraces kitazato 250, 400 mL
- Pipetas Pasteur
- Vasos de precipitado 50, 100, 150, 200, 250, 400 mL
- Cámaras de elución
- Probetas
- Pizetas de plástico
- Embudos de talle corto y largo
- Soporte universal
- Anillo de fierro
- Pinzas de tres dedos con nuez
- Parrilla de agitación y calentamiento (Corning stierrer/hot plate)
- Pipetas graduadas
- Cromatofolios de sílica gel con soporte de aluminio DC-Alufolien Kiesselgel 60F₂₅₄25 Folien 20x20 cm para CCF.
- Sílica gel para columna Merck (70-230 astm)
- Papel filtro

12. 1.2. Reactivos

- Reveladores químicos: sulfato cérico amoniacal; vainillina etanólica (1%)/ácido sulfúrico etanólica al 10%.

12. 1.3. Equipo

- Balanza analítica (Plus OHAUS)
- Balanza granataria digital (OHAUS)
- Bombas para vacío
- Campana de extracción NOM 461 y B-480
- Lámparas de UV modelo GL-58 con longitudes de onda de 254 y 365 nm.
- Rotaevaporador (BÜCHI RE 111 y R-114)

12. 1.4. Disolventes

- Hexano, metanol, cloroformo, acetato de etilo, acetona (Mallinckrodt RA). Agua destilada.

12. 2. Evaluación biológica

12. 2.1. Material

- Pipetas graduadas de 5 y 10 mL
- Pipetero de aluminio
- Puntas de 200 y 1000 μ L
- Micropipeta de 20, 200, 1000 μ L y multicanal de 200 μ L
- Cajas Petri de plástico
- Placas de 96 pozos estériles fondo plano
- Microtubos estériles de 1.0 mL y 2.5 mL
- Guantes estériles
- Cubre bocas
- Gradillas para tubos de ensaye y microtubos
- Tubos de vidrio 13x100 cm con tapón de baquelita
- Viales de 20 mL
- Frascos de vidrio
- Vasos de precipitados de 500, 250, 100 mL
- Mechero
- Bolsas de plástico
- Ligas
- Cinta adhesiva

12. 2.2. Equipo

- Campana de flujo laminar
- Estufa a 37°C y estufa con atmósfera de CO₂ a 37°C
- Refrigerador a -8°C y a -70°C
- Microscopio invertido, compuesto y electrónico
- Autoclave (Presto)
- Vórtex

12. 2.3. Reactivos y sustancias

- Medio Middlebrook 7H9 (Caldo)
- Enriquecimiento OADC (DIFCO)
- Hank's Balanced Salts (HBSS) pH 7.4 \pm 0.3
- Cepas Monorresistentes a los fármacos: Estreptomycin, Isoniazida, Rifampicina y Etambutol.
- Colorante de Alamar Azul (Patente 5,501,559. USA)
- Tween 80 (Polyoxyethylene sorbitan mono-oleate)

12.3 Preparación de reactivos

12. 3.1. Medio Middlebrook 7H9 (caldo)

Se disuelven 4.7 g de medio Middlebrook 7H9 en 900 mL de agua destilada o desionizada, [conteniendo 2 mL de Glicerol o (0.5 g) de Tween 80, sí se desea]. Se esteriliza a 121-124°C por 15 minutos, y se almacena a temperatura de 37°C.

Al momento de utilizar el medio, se realizan alícuotas de 90 mL y se adiciona 10 mL de enriquecimiento (Middlebrook OADC). Se almacena en refrigeración.

12. 3.2. *Tween 80*

Adicionar 20 mL de Tween 80 en un frasco limpio y 80 ml de agua desionizada. Se esteriliza por 15 minutos a 15 lb. Posteriormente se agita la mezcla mientras este caliente. Finalmente se almacena en la estufa a 37°C.

12. 4 (Tabla 10) Especies Vegetales Seleccionadas de acuerdo al Criterio Etnobotánico.

ESPECIE FAMILIA	NOMBRE COMÚN	USOS	DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA
<i>Achillea millefolium</i> * (L) COMPOSITAE	Mil en rama, plumajillo, tierra blanquecina, cola de zorra, alcanfor, plumerillo, plumilla.	Fiebre, diarreas, hemorroides, tos ferina, dolor de estomago, de oído, disentería, tuberculosis.	Estado. de México, Puebla, Veracruz, Hidalgo, Morelos, Michoacán, Chiapas y Coahuila.
<i>Adiantum andicola</i> (Liebm) POLYPODIACEA	Cilandrillo y velo.	Anticonceptivo y enfermedades del riñón. Para acelerar el parto y regular la regla después del mismo.	Asociada a cultivos anuales y de temporal, bosque de juníperos y mixto de pino encino.
<i>Adiantum princeps</i> (T. More) POLYPODIACEA	Cilandrillo, velo, culantrillo, palmita, pexma, pie de sánate.	Infecciones vaginales, regular y controlar los ciclos menstruales, abortivo, hemorragias vaginales, espanto.	República Mexicana.
<i>Ageratum corymbosum</i> * (Zuccagni) COMPOSITAE	Hierba dulce, Tzopolixihuitl, Jandetoni, pañate.	Granos, venteado	Veracruz y Puebla.
<i>Ambrosia artemisifolia</i> (L) COMPOSITAE	Ajenjo del país, Artemisa amargosa, Artemisia, santa María, estafiate, pasto de cola.	Estimulante de la digestión, febrífugo, antihelmíntico, dolores menstruales, hinchazón, abortivo, empacho.	Estado. de México, Morelos, San Luis Potosí y Veracruz.
<i>Anoda cristata</i> * (L) MALVACEAE	Violeta, genciana, malva, flor de campanita, hierba mora, malvavisco, requesón, malvon ó violeta de campo.	Bilis, astigastrálgico, empacho, granos en la boca, problemas respiratorios (tos ferina, tos), caída del cabello (hacerlo crecer y no salga canoso), contra la fiebre, hemorroides, calentura, heridas y dolor de riñones.	Chiapas, Estado de México, Hidalgo Michoacán, Oaxaca y Puebla.
<i>Antirrhinum majus</i> (L) SCROPHULARIACEAE	Perritor	Tos	Tlaxcala
<i>Arracacia atropurpurea</i> (Lehm) UMBELLIFERAE	Carrizo chico, hierba del borrego, chela nehinfi.	Antihelmíntico, pulmonía y susto.	Desde México hasta el Perú y Bolivia

*Especies vegetales colectadas y evaluadas

Continuación de la Tabla 10.

ESPECIE FAMILIA	NOMBRE COMÚN	USOS	DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA
<i>Artemisia ludoviciana*</i> (Nutt) ASTERACEAE	Estafiate, santa maría.	Antihelmíntico, hinchazón, anginas, bilis, cólicos, gastritis, limpias, mareos, nervios, parásitos intestinales, susto, tos, abortivo.	Estado de México, Morelos, San Luis Potosí y Veracruz.
<i>Aster sp</i> (Var) COMPOSITAE	manzanilla	Febrífugo	Sonora
<i>Aster gymnocephalus</i> (DC) COMPOSITAE	Arnica sosa, arnica morada y arnica rosa.	Cicatrizante, de heridas internas como externas, contra hemorroides, tratamiento del cáncer y dolor de estómago.	Durango y Aguascalientes.
<i>Bambusa guadua*</i> (Humb & Bonp) GRAMINEAE	Matleo, cuatecomate, Tarro	Tuberculosis	Veracruz
<i>Bouvardia ternifolia*</i> (Cav) RUBIACEAE	Trompetilla, campanilla, vara de flor, cerillito, chilillo, cigarrillo, corneta, flor de valleta, hierba del burro, hierba del Indio, lengua de víbora, sombra de la virgen, trompetillo, dunita, candelilla.	Sarampión, rabia, mordedura de víbora, tos ferina, herida erisipela, tos, comezón, acelera el parto, disentería, dolor de estómago, granos o absceso vaginal, fatiga, debilidad del corazón y nervios.	Sonora, Guerrero, Puebla, Estado de México, Hidalgo, Guanajuato, Tlaxcala, Distrito Federal.
<i>Calliandra houstoniana*</i> (Var) LEGUMINOSA	Cabello de ángel, hierba del burro, tabardillo, timbre, timbrillo rojo.	Tos, mal de orín, riñones y vejiga, conjuntivitis, infecciones de los dientes, paludismo, padecimientos del corazón.	Sonora, Jalisco, Michoacán, Guanajuato, Hidalgo, Puebla, Veracruz, Chiapas, y Quintana Roo.
<i>Cassia fistula*</i> (L) LEGUMINOSAE	Morenita	Resfriados, tos.	Tlaxcala.
<i>Chamaedora lunata</i> PALMAE	Tepejilote, lijtampan (Puebla) y tepexilot.	Enfermedades respiratorias (tos, anginas, bronquitis), tónico en baños de temascal, eliminar los mezquinos de la piel.	Veracruz y Puebla.

*Especies vegetales colectadas y evaluadas

Continuación de la Tabla 10.

ESPECIE FAMILIA	NOMBRE COMÚN	USOS	DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA
<i>Chamaedora*</i> <i>elegans</i> (Mart) PALMAE	Tepejilote	Dolor de estómago.	Puebla y Veracruz.
<i>Chamaedora sp</i> (aff) PALMAE	Tepejilote	Tos y resfriados.	Puebla, Veracruz y Oaxaca.
<i>Chamaedora</i> <i>tepejilote*</i> PALMAE	Tepejilote	Pulmonía.	Puebla.
<i>Cirsium conspicum*</i> COMPOSITAE	Cardo santo	Dolor de corazón, cabeza, muelas, encías y oído, contraveneno, laxante, pérdida de memoria, susto, malestar pulmonar y tos ferina.	Estado de México y Puebla
<i>Cirsium ehrenbergii</i> (Sch. Bip) COMPOSITAE	Cardo	Pulmonía, irritación en los ojos, detención del flujo vaginal, regulación de la presión arterial, desinflamatorio, antirreumático.	Tlaxcala, Toluca, Hidalgo.
<i>Cirsium anartiolepis</i> (Petraik) COMPOSITAE	Cardo santo	Curar granos y heridas, retraso menstrual, antiasmático, pulmonía, várices.	Michoacán
<i>Cirsium sp</i> COMPOSITAE	Cardo santo	Dolor de pulmón	Puebla
<i>Cordia boissieri*</i> (A. DC. Kunth) BORAGINACEAE	anacahuite	Tos, asma, dolor de pecho	Veracruz
<i>Crataegus</i> <i>pubescens*</i> (HBk) Steud ROSACEAE	Tejocote, manzanita.	Tos, antiasmático.	Guerrero, Oaxaca, Coahuila, Hidalgo, Estado de México.
<i>Crusea calocephala</i> (DC) RUBIACEAE	Paluu thipon	Calentura y escalofríos, tos (con hojas de pino y de cinco negritos), diarrea, espanto.	San Luis Potosí, Chiapas y Veracruz.
<i>Gnaphalium</i> <i>semiamplexicaue*</i> (DC) ASTERACEAE	Gordolobo	Bronquitis, antiasmático, infecciones de garganta, anginas, problemas pectorales y tos.	Chiapas, Hidalgo, Puebla y Tlaxcala.

*Especies vegetales colectadas y evaluadas

Continuación de la Tabla 10.

ESPECIE FAMILIA	NOMBRE COMÚN	USOS	DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA
<i>Heliotropium arborecens</i> BORAGINACEAE	Heliotropo.	tos	Estado de México.
<i>Heliotropium angiospermum</i> (Murray) BORAGINACEAE	Alancrancillo, cola de gato, hierba del sapo, rabo de mico.	Tos, diarrea, antiinflamatorio, infecciones de encías, hemorroides.	Sur de Estados Unidos, Chile y Bolivia.
<i>Hamelia patens</i> (Jacq) PUBIACEAE	Botellita, hierba coral, tochomite.	Cicatrizante, problemas digestivos, disentería, dolor de muela,	Chiapas, Puebla, Quintana Roo, Tabasco, Veracruz y Yucatán.
<i>Hibiscus uncinellus</i> MALVACEAE	Tulipán, ch'x jolak (tzotzil).	Tos, tuberculosis, tos ferina, raspaduras, heridas y granos.	México
<i>Hibicus rosa – sinensis</i> (L) MALVACEAE	Obelisco, rehilete, tulipán fino, tulipán rojo, tulipán rehilete.	Tos, asma, tos ferina, gripa, diarrea, infecciones gastrointestinales y en ojos, dolores menstruales, diabetes.	Climas cálidos y semicálidos.
<i>Hypericum uliginosum</i> (Kunth) HYPERICACEAE (GUTTRIFERAE)	tianchalagua, tenchalita	Bajar de peso, cáncer uterino.	Estado de México.
<i>Lantana achyranthifolia</i> (Desf) VERBENACEAE	Hierba mariposa, orozuz,	Tos y reflujo, lastimaduras y torceduras.	Habita en climas cálidos y semicálidos.
<i>Lantana hispida*</i> (Kunth) VERBENACEAE	Cinco negritos, orozuz, salvarreal.	Tos, amibas, diarrea, tos ferina, riñón, tuberculosis, gripa, aire, dolor de muelas.	Toda la República Mexicana.
<i>Lippia dulcis*</i> (Trev) VERBENACEAE	Hierba dulce	Tos, dolor de estomago, vómito, detenciones menstruales.	Hidalgo, Oaxaca, Puebla y Veracruz.
<i>Machaerium kegelii</i> (Meissn) LEGUMINOCEAE	Uña de gato	Enfermedades de las vías urinarias.	Oaxaca.

*Especies vegetales colectadas y evaluadas

Continuación de la Tabla 10.

ESPECIE FAMILIA	NOMBRE COMÚN	USOS	DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA
<i>Malva parviflora</i> * (L) Malvaceae	Malva, quesito.	Tos, empacho, antiinflamatorio, para bajar la fiebre.	Oaxaca, Puebla, Chiapas y Tlaxcala.
<i>Malva silvestres</i> (L) Malvaceae	Malva.	Bronquitis, gripe, faringitis, catarros.	Toda la República Mexicana.
<i>Manilkara zapota</i> * (L) SAPOTACEAE	Chicozapote, zapote chico.	Disentería, diarrea, presión alta, insomnio, enfermedades de la sangre, dolores generales.	Se distribuye en climas cálidos y semicálidos.
<i>Pinus ayacahuite</i> (Var) PINACEAE	Pino chinonque	Cicatrizante, tratamiento de llagas y reumas, enfermedades del pecho y fiebre, heridas pectorales.	Sonora, Chihuahua, Veracruz y Guatemala.
<i>Pinus montezumae</i> (Lamb) PINACEAE	Ocote	Ronquera	Puebla, Tlaxcala
<i>Pinus pseudostrubus</i> PINACEAE	Ocote	Ronquera, tos	Puebla, Tlaxcala
<i>Pinus sp</i> PINACEAE	Nebro.	Tos, ronquera.	Puebla y Oaxaca.
<i>Pleopeltis interfecta</i> (Weath) POLYPOCEAE	Lengua de ciervo, hierbabuena, caligüela	Disentería, tos, riñones, dolor de parto, y estomacales.	Estado de México. Chiapas y Guerrero.
<i>Polygala paniculada</i> (Mplkwort) POLYGECEAE	Escobilla, esbillos, morenita, tlachinole, tlanchinole	Problemas digestivos, úlceras, analgésico (para dolor de estomago, cabeza y muelas), tos ferina.	Veracruz y Tlaxcala
<i>Quercus peduncularis</i> (Née) FAGACEAE	Encino prieto	Dolor de estomago, de menstruación, infecciones de la piel y boca.	Oaxaca.
<i>Quercus oblongata</i> (D) FAGACEAE	Encino prieto.	Dolor de estomago, infecciones de la boca y piel, dolores menstruales.	Oaxaca.
<i>Rubus adenotrichus</i> (Cham) ROSACEAE	Zarzamora, mora, situni.	Disentería, anginas inflamadas, diabetes, sarampión, dolor menstrual, antiinflamatorio.	Jalisco, Guerrero y Oaxaca.

*Especies vegetales colectadas y evaluadas

Continuación de la Tabla 10.

ESPECIE FAMILIA	NOMBRE COMÚN	USOS	DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA
<i>Sapindus saponaria*</i> (L) SAPINDACEAE	Amole o pipe, jaboncillo, amolio	Antiséptico, enfermedades reumáticas, baños de temascal y evita la caída del cabello.	Chiapas, Quintana Roo, Oaxaca y Sonora.
<i>Struthanthus densiflorus</i> (Benth) LORANTHACEAE	Injerto, chimpilla seca, palo san bartolo sempacala.	Hemorragias, menorragia, diabetes, susto, tiricia tuberculosis mal olor de pies.	Puebla, Chiapas, Veracruz y Tlaxcala.
<i>Swietenia humillis*</i> (Zuccarini) MELIACEAE	Caoba, caobilla.	Antiparásito, para el cáncer, tos, amibiasis, dolor de pecho.	Guerrero y Oaxaca.
<i>Ternstroemia pringlei</i> (Rose) Standl THEACEAE	Tila, trompillo	Dolores reumáticos, de corazón. Insomnio y tos	Jalisco, Veracruz, Puebla, Tamaulipas y Estado de México.
<i>Tradescantia spathucea</i> Sw(=Rhoeo) COMMELINACEAE	Hierba del cáncer, maguey, zapotilera, magueyito, maguey morado.	Disentería, desinfectante, desinflamatorio, contra tétanos, gripe, cefalea, tos, asma, tuberculosis, pulmonía y cáncer.	Republica Mexicana

*Especies vegetales colectadas y evaluadas

Los bauches de algunas de las especies colectadas en el Herbario del IMSS; son *Achillea millefolium* No. 13044; *Anoda cristata* No. 13076; *Artemisia ludoviciana* No. 13075; *Bouvardia ternifolia* No. 15176; *Calliandra houstoniana* No. 13073; *Chamaedora tepejilote* No. 13080; *Gnaphalium semiamplexicaule* No. 14153; *Lantana hispida* No. 15178; *Lippia dulcis* No. 13074; *Malva parviflora* No. 14155; *Manilkara zapota* No. 15175; *Sapindus saponaria* No. 13071; *Swietenia humillis* No. 15174.