



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“OBTENCIÓN Y EVALUACIÓN TOXICOLÓGICA DE
COMPUESTOS ANTIMICOBACTERIANOS EN
ESPECIES DEL GENERO ARISTOLOCHIA”.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A:

ARLENE CALDERÓN CORONA





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: María Isabel Aguilar Laurents.

VOCAL: Profesor: Carlos Pérez Muñoz.

SECRETARIO: Profesor: María Adelina Jiménez Arellanes

1 er SUPLENTE: Profesor: María Elena Bravo Gómez.

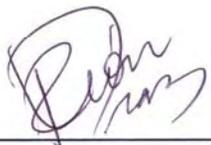
2º SUPLENTE: Profesor: Isabel Rivero Cruz.

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA: Unidad de Investigación Médica en Farmacología de Productos Naturales. Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI.

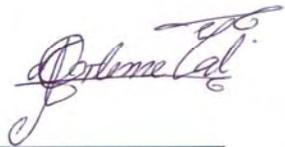
ASESOR DEL TEMA: Dra. M^a Adelina Jiménez Arellanes



SUPERVISOR TÉCNICO: M. en C. Rosalba León Díaz.



SUSTENTANTE: Calderón Corona Arlene.



❖ AGRADECIMIENTOS

- A la Jefa de la UIM-FPN, Dra. Mariana Meches Fischer, por el apoyo brindado para llevar a cabo la realización experimental del presente trabajo en la unidad de investigación.

- A la Dra. Gloria Molina Salinas y al Dr. Salvador Said, del Centro de Inv. Biomédica del Noreste, IMSS-Mty, por las facilidades otorgadas en la realización de los ensayos conducentes para la actividad antimicobacteriana *in vitro* de los compuestos obtenidos.

- Al Consejo Nacional de Ciencia y tecnología (CONACyT), por la beca otorgada (No. 48339) para realizar el trabajo de licenciatura mediante el proyecto U48339-M.

- Al Fondo de Fomento a la Investigación del IMSS (FOFOI-IMSS) y al CONACyT por el financiamiento otorgado a los proyectos No. 2006/1A)/I/053 y U48339-M.

- A los miembros del jurado:

Dra. Ma. Isabel Aguilar Laurents.
M. en C. Carlos Pérez Muñoz.
M. en C. Isabel Rivero Cruz.
QFB. Ma. Elena Bravo Gómez.

por las sugerencias, observaciones, comentarios y tiempo dedicado a la revisión de este trabajo, los cuales permitieron enriquecerlo.

AGRADECIMIENTOS:

- Principalmente, a la Dra. Maria Adlina Jiménez Arellanes por todo el apoyo brindado, por la paciencia, los consejos, la preocupación, la dedicación, las revisiones, el asesoramiento y todo el tiempo invertido a en este trabajo de tesis.

- A la M. en C. Rosalba León Díaz por la ayuda y colaboración en los estudios y ensayos realizados como parte de este trabajo.

- A mis compañeros del laboratorio: Rosalba, Jorge, Edgar, Mónica, Jovani, Ileana, Nayeli, Martita, Omar, Claudia, Raúl y Sandra, por brindarme su amistad, por hacer que los días de trabajo en el laboratorio fueran agradables y por la experiencia compartida.

- A mis compañeros y amigos Adriana, Fernando y Ramón, por todos los momentos inolvidables e irremplazables que compartimos juntos, por la alegría y amistad que hicieron más fácil y agradable cada momento dentro y fuera de la escuela, por el apoyo brindado en momentos difíciles, por formar y compartir una parte muy importante de mi vida y permitirme formar parte de la suya. A Caro, Montse, Aurora, Male y Adriana V., porque me llena de gusto haberlas conocido un día, saber que me brindaron su amistad y que aquellos instantes que pasamos juntas son imborrables. A Marely G., Juan Carlos V., Doris L., Oliver W., Laura G., Carolina C., Araceli M., Sofía L., Fabi L., Daniel A., Oscar I., Perla y Cesar M., gracias por haberme permitido compartir momentos agradables con ustedes y por su amistad a lo largo de la carrera y después de esta.

- A la Facultad de Química, a mis profesores y a la Universidad Nacional Autónoma de México, por haber permitido mi formación profesional en mis estudios de licenciatura.

DEDICATORIAS:

- A Dios, por darme la oportunidad de culminar mis estudios de licenciatura, pero sobre todo por permitirme compartir estos momentos con mis hermanos y mis padres.
- A mis padres: a quienes realmente me es difícil expresarles con palabras mi enorme agradecimiento, respeto y admiración. A quienes les debo la vida y todo el tiempo que me han dedicado, siempre con un amor y un cariño que esta demás decir que es insustituible, por su apoyo incondicional, por todos sus consejos, sus preocupaciones, por darme educación, por impulsarme siempre a ser mejor y estar conmigo en cada instante y decisión importante de cada etapa de mi vida y por compartir conmigo mis triunfos pero también mis fracasos, porque simplemente les debo mi existencia y la persona que soy, muchas gracias.
- A mis hermanos: Amairani, Luis Manuel y Crysele, por cada momento e instante compartido conmigo desde el día en que aparecieron en mi mundo por primera vez, por todo su apoyo y confianza, por su cariño irremplazable, por su presencia en mi vida, por la felicidad y alegría inyectada en cada instante a través de mis días.
- A mis abuelitas: Manuela Barrera y Celia Arenas, que representan en mi vida experiencia, lucha y sabiduría, por toda la ternura y dulzura, por sus abrazos, besos, consejos, cariño y experiencias compartidas conmigo, y por ser muestra de que nada es imposible.
- A todos mis amigos y compañeros de la licenciatura que con su amistad hicieron de esta una experiencia inolvidable.
- A la Dra. Maria Adlina Jiménez Arellanes quien es un ejemplo a seguir y por haberme permitido formar parte de su equipo de trabajo y brindandarme el apoyo y la dedicación que hicieron posible la realización de este trabajo.

❖ ABREVIATURAS

°C	Grados centígrados.
λ	Longitud de onda.
%	Por ciento.
AcOEt	Acetato de etilo.
ANOVA	Análisis de varianza.
antiTB	Antituberculoso.
ATCC	American Type Culture Collection.
BH	Biometría hemática.
ccf	Cromatografía en capa fina.
CC-FN	Cromatografía en columna de fase normal.
CDC	Centro de Control y Prevención de Enfermedades.
CG	Cromatografía de gases.
CG-EM	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.
CHCM	Concentración de hemoglobina corpuscular media.
CICUAL	Comité Internacional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio.
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria.
CMN	Centro Médico Nacional.
c/u	Cada uno.
DMSO	Dimetilsulfóxido.
EM-IE	Espectrometría de masas por impacto electrónico.
EMB	Etambutol.
Eri	Eritrocitos
E.S.M.	Error estándar de la media.
EtOH	Etanol.
E.U.	Estados Unidos.
g	Gramos.
HB	Hemoglobina.
Hex	Hexano.
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Cromatografía líquida de alta resolución)
hr	Hora.
Hto	Hematocrito.
INH	Isoniazida.
kg	Kilogramo.
Leu	Leucocitos.
Linf	Linfocitos.
MABA	Microdilution Alamar Blue Assay (Micrométodo colorimétrico de azul de alamar).
MeOH	Metanol.
MFR	Multifarmacorresistente.
mg	Miligramos.
mg/kg	Miligramos por kilogramo
min	Minutos.
mL	Mililitros.
mL/kg	Mililitros por kilogramo.
mm	Milímetros.
μ g	Microgramos.
μ L	Microlitros.
μ g/mL	Microgramos por mililitro.
NCI	Instituto Nacional de Cáncer.
ODS	Octadecil silano.
OMS	Organización Mundial de la Salud
P	Probabilidad.
pf	Punto de fusión.
Plaq	Plaquetas.
PZA	Pirazinamida.
Rf	Factor de retención.
RIF	Rifampicina.

RMN-¹H	Resonancia magnetica nuclear protónica.
RMN-¹³C	Resonancia magnetica nuclear de carbono 13.
Seg	Segmentados.
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida.
SLDs	Fármacos de segunda línea.
STR	Streptomycin.
TAES	Tratamiento Acortado Estrictamente Supervisado.
TB	Tuberculosis.
TB-MFR	Tuberculosis Multifarmacoresistente.
TB-XFR	Tuberculosis extremadamente farmacoresistente.
TR	Tiempo de retención.
UFC/mL	Unidades formadoras de colonia por mililitro.
VCM	Volumen corpuscular medio.
Veh	Vehículo.
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana.
XFR	Extremadamente fármacosresistente.

❖ ÍNDICE GENERAL

❖	Justificación	I
❖	Introducción	III
❖	Antecedentes	1
	I.- Tuberculosis como problema de salud	1
	I.1.- Importancia epidemiológica de la tuberculosis.....	2
	I.2 - Tuberculosis multifarmacoresistentes (TB-MFR).....	6
	I.3 - Tuberculosis extremadamente farmacoresistente (TB-XFR).....	8
	I.4 - Estrategias para el control de la enfermedad.....	10
	I.5 - Diagnóstico y tratamiento de la tuberculosis.....	12
	II.- Importancia de las plantas medicinales	16
	III.- Plantas medicinales como fuentes de principios con actividad antimicobacteriana	19
	IV.- Antecedentes de las especies a investigar	25
	IV.1.- Antecedentes botánicos del género <i>Aristolochia</i>	25
	IV.2.- Usos dentro de la medicina tradicional y antecedentes químicos y biológicos de especies del género <i>Aristolochia</i>	26
❖	Hipotesis	31
❖	Objetivos	32
❖	Metodología	34
	I.- Preparación de los extractos	34
	II.- Fraccionamiento primario del extracto MeOH de <i>A. taliscana</i>	34
	III.- Fraccionamiento secundario de dos fracciones de <i>A. grandiflora</i>	35
	IV.- Fraccionamiento químico secundario de fracciones provenientes del fraccionamiento primario de <i>A. grandiflora</i> y <i>A. taliscana</i>	36
	V.- Procesos de purificación del eupomatenoide 7	38
	V.1.- Purificación del eupomatenoide 7 presente en la fracción secundaria AF25 mediante HPLC.....	38
	V.2.- Purificación por columna cromatográfica del eupomatenoide 7.....	39
	V.2.1.- Recristalización de la fracción FIX para obtención de eupomatenoide 7.....	40
	VI.- Procesos de purificación del licarina A	41
	VII.- Actividad antimicobacteriana de licarina A y eupomatenoide 7	42
	VII.1.- Preparación de las muestras a evaluar.....	43
	VII.2.- Desarrollo del Micrométodo Colorimétrico del Alamar Azul (MABA).....	44
	VIII.- Toxicidad subaguda	45
	VIII.1.- Licarina A vía subcutánea.....	45
	VIII.1.1.- Toxicidad subaguda del aceite de olivo (vehículo).....	45
	VIII.1.2.- Toxicidad subaguda de la licarina A en aceite de olivo.....	46
	VIII.2.- Licarina A por vía oral.....	46
	VIII.2.1.- Toxicidad subaguda del vehículo.....	47

VIII.2.2.- Toxicidad subaguda de licarina A en tween 20 como vehículo.....	47
VIII.3.- Estudio histopatológico.....	48
❖ Resultados y discusión	49
I.-Fraccionamiento primario del extracto MeOH de <i>A. taliscana</i>	49
II.-Fraccionamiento químico secundario de <i>A. grandiflora</i>	50
III.- Fraccionamiento químico secundario de fracciones provenientes del fraccionamiento primario de <i>A. grandiflora</i> y <i>A. taliscana</i> y purificación del eupomatenoides 7 por HPLC	52
IV.-Purificación del eupomatenoides 7 por cromatografía en columna	54
V.- Resultados de la purificación de licarina A	55
VI.-Actividad antimicobacteriana de los compuestos aislados	58
VII.- Toxicidad subaguda de licarina A	60
VII.1.-Toxicidad subaguda de los vehículos (tween 20 y aceite de olivo).....	60
VII.1.1 - Toxicidad subaguda del tween 20.....	60
VII.1.2 - Toxicidad subaguda del aceite de olivo.....	64
VII.2.-Toxicidad subaguda de licarina A.....	67
VII.2.1.-Toxicidad subaguda de licarina A en tween 20.....	67
VII.2.2.-Toxicidad subaguda de licarina A en aceite de olivo.....	73
❖ Conclusiones	77
❖ Referencias	79
❖ Anexo	

Índice de gráficas:

- Gráfica 1:** Peso de los ratones durante el estudio de toxicidad subaguda del vehículo tween 20/agua 17:83.
- Gráfica 2:** Peso de los órganos obtenidos de los diferentes grupos estudiados en la toxicidad subaguda de tween 20/agua 17:83.
- Gráfica 3:** Valores hematológicos entre los grupos, blanco, testigo y vehículo del estudio de toxicidad subaguda de tween 20/agua 17:83.
- Gráfica 4:** Peso de los ratones en el estudio de toxicidad subaguda del aceite de olivo.
- Gráfica 5:** Peso de los órganos de ratones obtenidos en el estudio de toxicidad subaguda de aceite de olivo.
- Gráfica 6:** Valores hematológicos del estudio de toxicidad subaguda de aceite de olivo.
- Gráfica 7:** Peso de los ratones durante el estudio de toxicidad subaguda de licarina A en tween 20/agua 17:83.
- Gráfica 8:** Pesos de los órganos de los diferentes grupos estudiados en la toxicidad subaguda de licarina A en tween 20/agua.
- Gráfica 9:** Comparación de valores hematológicos del estudio de toxicidad subaguda de licarina A en tween 20/agua.
- Gráfica 10:** Peso de los ratones durante el estudio de toxicidad subaguda de licarina A en aceite de olivo.
- Gráfica 11:** Peso de los órganos en el estudio de toxicidad subaguda de licarina A en aceite de olivo.
- Gráfica 12:** Representación de los valores hematológicos del estudio de toxicidad subaguda de licarina A en aceite de olivo.

Índice de tablas:

- Tabla 1:** Regímenes de tratamiento para pacientes con TB-MFR con varios patrones de farmacorresistencia.
- Tabla 2:** Dosis y CMI de fármacos antituberculosos de primera y segunda línea y sus efectos secundarios.
- Tabla 3:** Fraccionamiento primario del extracto metanólico de *A. taliscana*.
- Tabla 4:** Fraccionamiento secundario de *A. grandiflora*.
- Tabla 5:** Fraccionamiento secundario de *A. grandiflora* y *A. taliscana*.
- Tabla 6:** Condiciones analíticas y semipreparativas del proceso de purificación de los compuestos presentes en la fracción AF25 por HPLC.
- Tabla 7:** Purificación de eupomatenoide 7 mediante CC-FN.
- Tabla 8:** Patrones de farmacorresistencia de las micobacterias utilizadas en el ensayo de actividad antimicobacteriana de licarina A y eupomatenoide 7.
- Tabla 9:** Resultados del fraccionamiento químico de *A. taliscana*.
- Tabla 10:** Resultados del fraccionamiento secundario de *A. grandiflora*.
- Tabla 11:** Resultados del fraccionamiento químico secundario de *A. grandiflora* y *A. taliscana*.
- Tabla 12:** Resultados del fraccionamiento químico de las fracciones AF24-AF26.
- Tabla 13:** Actividad antimicobacteriana *in vitro* de licarina A y eupomatenoide 7 contra cepas de micobacterias no tuberculosas.
- Tabla 14:** Actividad antimicobacteriana *in vitro* de licarina A y eupomatenoide 7 contra cepas resistentes y aislados clínicos de *M. tuberculosis*.
- Tabla 15:** Registro de los pesos de animales con tratamiento subagudo del vehículo (tween 20/agua 17:83).
- Tabla 16:** Pesos de los órganos de los animales tratados con vehículo.
- Tabla 17:** Valores de biometría hemática de los animales tratados con vehículo.
- Tabla 18:** Peso de los ratones durante el estudio de toxicidad subaguda de aceite de olivo.
- Tabla 19:** Pesos de órganos obtenidos de los ratones en el estudio de toxicidad subaguda del aceite de olivo.
- Tabla 20:** Valores hematológicos del estudio de toxicidad subaguda de aceite de olivo.
- Tabla 21:** Pesos de los ratones durante el estudio de toxicidad subaguda de licarina A en tween 20/agua 17:83.
- Tabla 22:** Pesos de los órganos de los ratones en la toxicidad subaguda de licarina A en tween 20.
- Tabla 23:** Valores hematológicos de muestras tomadas en ratón en el estudio de toxicidad subaguda de licarina A en tween 20/agua 17.83.
- Tabla 24:** Pesos de ratones durante el estudio de toxicidad subaguda de licarina A en aceite de olivo.
- Tabla 25:** Pesos de los órganos en el estudio de toxicidad subaguda de licarina A en aceite de olivo.
- Tabla 26:** Datos hematológicos del estudio de toxicidad subaguda de licarina A en aceite de olivo.

Índice de figuras:

- Figura 1:** Incidencia de tuberculosis alrededor del mundo.
- Figura 2:** Regiones en las que se han reportado casos de TB-XFR.
- Figura 3:** Proceso de recristalización del compuesto eupomatenoide 7 presente en la fracción FIX.
- Figura 4:** Ccf comparativa de fracciones primarias (2 y 3) de la especie *A. grandiflora*, donde se observa la presencia de eupomatenoide 7, licarina A y B.
- Figura 5:** Cromatograma del eupomatenoide 7 a 220 nm en HPLC.
- Figura 6:** Cromatograma de la licarina A a 220 nm en HPLC.
- Figura 7:** Estructuras químicas de los compuestos.

❖ JUSTIFICACIÓN

A pesar de las diversas estrategias y programas implementados para el control y erradicación de la tuberculosis (TB), los resultados favorables han sido escasos. Por lo que esta enfermedad hoy en día se considera como emergente a nivel mundial.

Actualmente, el aumento de los casos de TB en el mundo se debe a diversos factores, tales como: a) aparición de cepas multifarmacorresistentes (MFR) y con farmacorresistencia extendida (XFR) de *M. tuberculosis* y de otras especies de *Mycobacterium*, b) enfermedades que comprometen el sistema inmunológico (SIDA, cáncer, diabetes, artritis reumatoide, entre otras), c) diagnóstico y tratamientos inadecuados, d) migración, e) desnutrición, entre otros; mismos que conllevan a que esta enfermedad constituya un serio problema de salud mundial. Las infecciones con cepas MFR traen como consecuencia que los medicamentos de primera y segunda elección resulten poco eficaces para el tratamiento y control de la enfermedad, además de que los tratamientos resultan prolongados, de elevado costo, tóxicos, de baja efectividad y con severos efectos secundarios, por lo que se requiere urgentemente de nuevos agentes antituberculosos.

La búsqueda de este tipo de compuestos y/o moléculas activas puede realizarse en diferentes fuentes tanto naturales como sintéticas. Dentro de las naturales, se sabe que las plantas juegan un papel importante en la obtención de compuestos o moléculas prototipos que en muchos casos sirven como materia prima o intermediarios en la síntesis de nuevos agentes terapéuticos,

sin embargo las especies medicinales han sido poco exploradas desde el punto de vista químico y farmacológico.

En la actualidad, las plantas medicinales son consideradas una fuente potencial para encontrar nuevos compuestos y/o moléculas activas contra el bacilo de la tuberculosis y otras enfermedades, por lo que actualmente y debido al problema que representa la tuberculosis en los sistemas oficiales de salud, diversas líneas de investigación se han enfocado al desarrollo de proyectos encaminados a la evaluación de extractos de plantas medicinales para obtener e identificar los metabolitos secundarios responsables del efecto antimicobacteriano.

En México existe una gran diversidad de especies que se conocen por su valor terapéutico, es por eso que tomando en cuenta el efecto antimicobacteriano mostrado por tres neolignanós (licarina A, licarina B y eupomatenoide 7) aislados previamente del extracto hexánico de *A. taliscana* (**León, 2005**), el presente trabajo describe la obtención de compuestos activos (eupomatenoide 7 y licarina A) en las especies medicinales *Aristolochia taliscana* y *A. grandiflora* y la actividad antimicobacteriana *in vitro*, así como la evaluación toxicológica subaguda en ratones Balb/C de la licarina A administrada por vía intragástrica y subcutánea como continuación de una línea de investigación enfocada a la obtención de compuestos antituberculosos.

❖ INTRODUCCIÓN

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infectocontagiosa causada por *Mycobacterium tuberculosis*. Reportes de la Organización Mundial de la Salud (OMS) indican que en el 2004, se detectaron 8,9 millones de nuevos casos, un tercio de la población mundial se encuentra infectada con el bacilo y ha provocado la muerte de aproximadamente 2 millones de personas al año. Para el 2020, cerca de un billón más de personas estarán infectadas, 200 millones desarrollarán la enfermedad, y 35 millones morirán a causa de la TB, si no se implementan de forma adecuada los programas de control. Dado el problema de salud que representa y con la finalidad de controlar la TB, la OMS implemento los programas de Tratamiento Acortado Estrictamente Supervisado (TAES) y TAES-*plus*; sin embargo, el objetivo no se ha logrado y actualmente existen casos de tuberculosis multifarmacoresistente (TB-MFR) y de tuberculosis extremadamente farmacoresistente (TB-XFR), que no responden a los tratamientos establecidos y para los casos TB-XFR no existe ya alternativa de tratamiento. El VIH/SIDA y enfermedades que comprometen el sistema inmunológico contribuyen significativamente a la reemergencia y persistencia de la TB, lo que impide el control y/o erradicación de la misma. El desarrollo de nuevos agentes antituberculosos (antiTB) fue escaso por más de tres décadas, por lo que hoy en día a nivel internacional se realizan investigaciones enfocados a encontrar nuevos fármacos que coadyuven, acorten y/o mejoren el tratamiento. Las investigaciones realizadas en plantas medicinales de México han permitido encontrar que algunas de ellas pueden ser fuente potencial de agentes antiTB. Dentro de ellas esta

Aristolochia taliscana, cuyo extracto hexánico y metanólico inhibió el crecimiento de *M. tuberculosis* H37Rv (CMI=50 µg/mL), y mediante estudio químico biodirigido se aisló la licarina A, licarina B y eupomatenoide 7 los cuales presentaron una CMI de 25, 25 y 6.25 µg/ml, respectivamente al evaluarse por el método radiorespirométrico Bactec 460 contra la misma micobacteria.

En este trabajo, se describe la obtención de cantidades adicionales de licarina A y eupomatenoide 7 a partir *A. taliscana* y *A. grandiflora* y su evaluación antimicobacteriana *in vitro* por el Micrométodo colorimétrico de azul de alamar (MABA) contra cepas monoresistentes y aislados clínicos MFR de *M. tuberculosis* y contra dos cepas de micobacterias no tuberculosas; así como la toxicidad subaguda de la licarina A usando como vehículo tween 20/agua y aceite de olivo.

Los resultados de la evaluación antimicobacteriana indicaron que la licarina A fue la más activa contra las cepas no tuberculosas y las monoresistentes de *M. tuberculosis* y presentó moderada actividad contra aislados clínicos de *M. tuberculosis* MFR. La toxicidad subaguda en ratones Balb/C de la licarina A administrada por vía intragástrica y subcutánea, no induce alteraciones en valores de biometría hemática.

❖ ANTECEDENTES

I.- Tuberculosis como problema de salud:

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infectocontagiosa que se propaga por vía aérea y es transmitida por personas que padecen TB pulmonar activa al toser, estornudar, hablar o escupir. Este padecimiento es causado principalmente por *Mycobacterium tuberculosis*, pero además puede ser provocado por otras micobacterias como *M. avium*, *M. carionni*, *M. africanum*, *M. chelanoae*, entre otras.

La forma más común de la enfermedad es la pulmonar, presentándose entre el 70 y el 90% de los casos; y puede clasificarse en (***Baltussen et al., 2005; Raviglione y Smith, 2007***):

a) TB pulmonar con baciloscopía-positiva: Son los casos diagnosticados por medio de estudios bacteriológicos en muestras de esputo (abarca cerca del 60% de todos los casos de TB pulmonar).

b) TB pulmonar con baciloscopia-negativa: Son aquellos casos diagnosticados por los signos clínicos básicos y por rayos X, y que no responden al tratamiento con los antibióticos usados comúnmente.

c) TB susceptible: En este grupo se engloban los casos de TB, principalmente la pulmonar, que responde de manera positiva a los tratamientos con los fármacos antituberculosos de primera línea.

d) TB multifarmacoresistente (TB-MFR): Esta clasificación corresponde a los casos causados por cepas de *M tuberculosis* que presentan resistencia al menos a rifampicina e isoniazida (RIF, INH.), que corresponden a dos de los

fármacos antituberculosos de primera línea más efectivos y básicos en el tratamiento de la TB.

e) TB extremadamente farmacoresistente (TB-XFR): Hoy en día, se han detectado casos de TB que no responden a los tratamientos con fármacos de primera línea como INH y estreptomina (STR), además de presentar resistencia a las fluoroquinolonas y a fármacos inyectables de segunda línea como amikacina, kanamicina y/o capreomicina. Estos casos representan un serio problema de salud debido a que en la actualidad no existe alternativa de tratamiento.

Además de la TB pulmonar, se presentan casos de TB extra pulmonar, siendo los principales: meníngea, ósea, linfática, gastrointestinal, del sistema nervioso central, genitourinaria, ganglionar y ocular (**Baltussen et al., 2005; Raviglione y Smith, 2007**).

1.1.- Importancia epidemiológica de la tuberculosis:

Este padecimiento provoca la muerte de aproximadamente 2 millones de personas cada año (**WHO, 2007a**) y en la actualidad esta considerada como la causa del mayor número de muertes ocasionadas por un sólo agente infeccioso a nivel mundial. Estimaciones recientes indican que una tercera parte de la población mundial se encuentra infectada con *M. tuberculosis* y en riesgo de desarrollar la enfermedad (*Figura 1*). La Organización Mundial de la Salud (OMS) reportó que en el 2004 se detectaron 8,9 millones de nuevos casos de TB, de los cuales 7.4 millones se presentaron en Asia y África Subsahariana y cerca de 3.9 millones de casos resultaron con baciloscopia positiva en muestras de esputo (**Dye, 2006**).

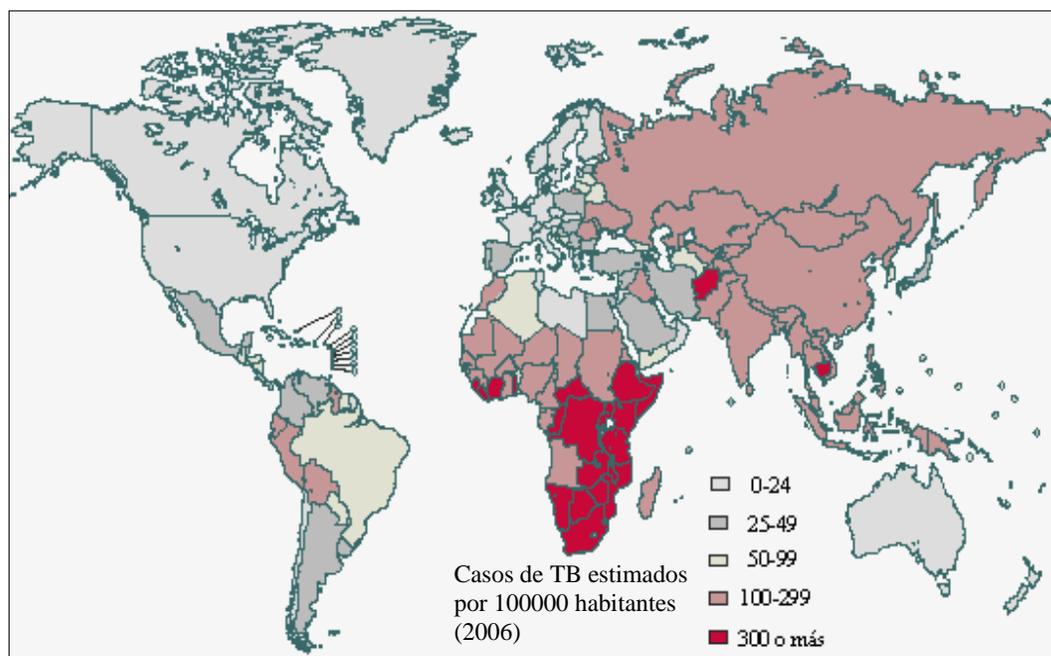
Desde que la OMS lanzó la estrategia “Alto a la Tuberculosis” en el año 2005, se han identificado tres factores que dificultan el control de este padecimiento:

a) La propagación de todas las formas de farmacorresistencia incluyendo la TB-XFR.

b) El reto que implica el diagnóstico y los resultados de un tratamiento exitoso a casos de TB que presentan coinfección con VIH.

c) Los programas implementados para el control de la TB no cuentan con una cobertura del 100%, sobre todo en aquellos países en vías de desarrollo. En el caso de México, la cobertura del programa es cerca del 70% y según datos estadísticos de la secretaria de salud, existe una prevalencia de 25 a 49 casos nuevos/100000 habitantes (*WHO, 2007a; Dye, 2006*).

Figura 1: Incidencia de tuberculosis alrededor del mundo (Tomada de Dye, 2006)



En la región Africana se ha reportado una incidencia de 356 casos por cada 100 000 habitantes cada año, pero en las regiones más pobladas de Asia (Bangladesh, China, India, Indonesia y Pakistán) se registran un mayor número, por lo que juntas representan el 48% de todos los casos anuales registrados a nivel mundial (**Dye, 2006**). El incremento global es atribuido a la sorprendente proliferación de casos en países del Este de Europa (principalmente en la antigua Unión Soviética) desde 1990, y la región Subsahariana de África desde mediados de 1980. El resurgimiento de la TB en el Este de Europa, se debe al escaso control de la TB por deficiencia en los servicios de salud desde 1991. Estudios periódicos han demostrado que más del 10% de los casos nuevos de TB en Estonia, Latvia y algunas partes de Rusia son TB-MFR.

En el Sureste Asiático, en regiones del Pacífico Occidental, en América Latina y en el este de las regiones del Mediterráneo, el incremento de los casos de TB se ha mantenido constante al menos por dos décadas.

Esta enfermedad afecta principalmente a pacientes con VIH y los rangos de incidencia son mayores en adultos en edad económicamente productiva (promedio 36 años) (**Dye, 2006; Gautam et al., 2007**).

Arriba del 80% de los pacientes con TB son VIH positivos en países donde la prevalencia de este último es alta (**Ruxin, et. al., 2005**); por ejemplo, en algunas regiones africanas las personas coinfectadas por el VIH y el bacilo de TB tienen muchas más probabilidades de desarrollar y morir por esta enfermedad, debido a que esta comprometido el sistema inmunológico (**WHO, 2007a**). Gran parte del incremento global de la TB que se ha observado desde 1980 es atribuido a la propagación del VIH en África. Alrededor de 11 millones

de personas con VIH/SIDA se encuentran coinfectadas con el bacilo de la TB **(WHO, 2007a)**.

Globalmente, se estima que aproximadamente el 13% de los adultos recientemente diagnosticados con TB, fueron infectados con VIH en el 2004; sin embargo, existe una gran variación entre regiones, del 34% en la región Africana a un 1.4% en la región oeste del Pacífico **(Dye, 2006)**.

Los programas basados en el TAES (Tratamiento Acortado Estrictamente Supervisado) diagnosticaron a más de 26 millones de pacientes entre 1995-2005, por lo que la Asamblea Mundial de la Salud de la OMS, estableció para el 2005 la meta de detectar al menos un 70% de todos los casos bacilíferos nuevos de TB que se produjeran cada año, y curar al menos el 85% de los casos detectados. Los programas nacionales para el control de la TB de 199 países notificaron que en el año 2005 se diagnosticaron 2.3 millones de nuevos casos bacilíferos en el marco de la estrategia TAES de la OMS, lo que representó el 60% del total de casos bacilíferos nuevos (4.9 millones) estimados en ese año. En la Región del Pacífico Occidental se alcanzaron las dos metas de la OMS (detección y curación), con tasas de detección y éxito terapéutico del 76% y 91%, respectivamente; Asia Sudoriental alcanzó la meta de tratamientos satisfactorios con una tasa del 87% y en el resto de los países, la OMS estimó que 67 de ellos alcanzaron las tasas de detección perseguidas y 57 países alcanzaron la meta de resultados satisfactorios; 26 de ellos, incluidos países que presentan una alta carga, como China, Filipinas y Vietnam, lograron las dos metas **(WHO, 2007b)**.

Sin embargo la presencia de casos de TB-MFR y TB-XFR, están contribuyendo significativamente a la reemergencia y persistencia de esta

enfermedad, lo que impide el control y/o erradicación de la misma. La OMS estima que para el 2020, cerca de un billón más de personas estarán infectadas con TB, 200 millones de estos desarrollarán la enfermedad, y 35 millones morirán a causa de este padecimiento si no se implementan de forma adecuada los programas de control (**Case et al., 2006**). Por otro lado, es importante señalar que actualmente aproximadamente 2 millones de personas tiene TB latente, entre el 5 y 7% de estos desarrollaran la enfermedad y arriba del 50% presentarán coinfección TB/VIH (**Saunders y Britton, 2007**).

Existen elementos importantes que agravan el problema del control y manejo de la TB siendo: a) la mayor prevalencia de TB se localizan en países en vías de desarrollo, b) El incremento de los casos de TB-MFR y la aparición reciente de los casos TB-XFR y c) El escaso desarrollo de nuevos fármacos (**Case et al., 2006**).

Aunque la presencia del VIH tiene un claro y profundo impacto dentro de la epidemiología de la TB, existen otros factores potencialmente importantes que favorecen su incidencia, como la desnutrición, el cáncer, la artritis reumatoide, la contaminación, la diabetes mellitus tipo II y las enfermedades respiratorias causadas por el tabaco que complican el problema que presenta por si sola la enfermedad, y a los cuáles será importante prestar más atención en los próximos años (**Dye, 2006**).

1.2.- Tuberculosis multifarmacoresistente (TB-MFR):

La TB-MFR puede ser primaria o adquirida; siendo la primaria cuando los casos nuevos de TB no han recibido tratamiento alguno y la enfermedad es causada por *M. tuberculosis* MFR, es muy frecuente que los casos sean

resistentes a un solo fármaco. La fármacoresistencia secundaria o adquirida es cuando los casos de TB han sido tratados o multitratados y se presentan recaídas por abandono del tratamiento, o aparece durante este como consecuencia de la irregularidad o mala adherencia a él y por la administración inadecuada de los medicamentos; además, es un indicador epidemiológico de la deficiencia en el Programa de Control de la Tuberculosis en cuanto al tratamiento **(Castillo, 2001; Said-Fernández et al., 2005)**.

La TB-MFR es aquella causada por cepas de *M. tuberculosis* resistentes a INH y RIF (fármacos básicos en el tratamiento) **(Abate y Miörner, 1998)** y esta incrementado en algunas partes del mundo, lo que representa un importante problema de salud en los países en vías de desarrollo; ya que los tratamientos son más prolongados, provocan severos y diversos efectos secundarios y son de mayor costo.

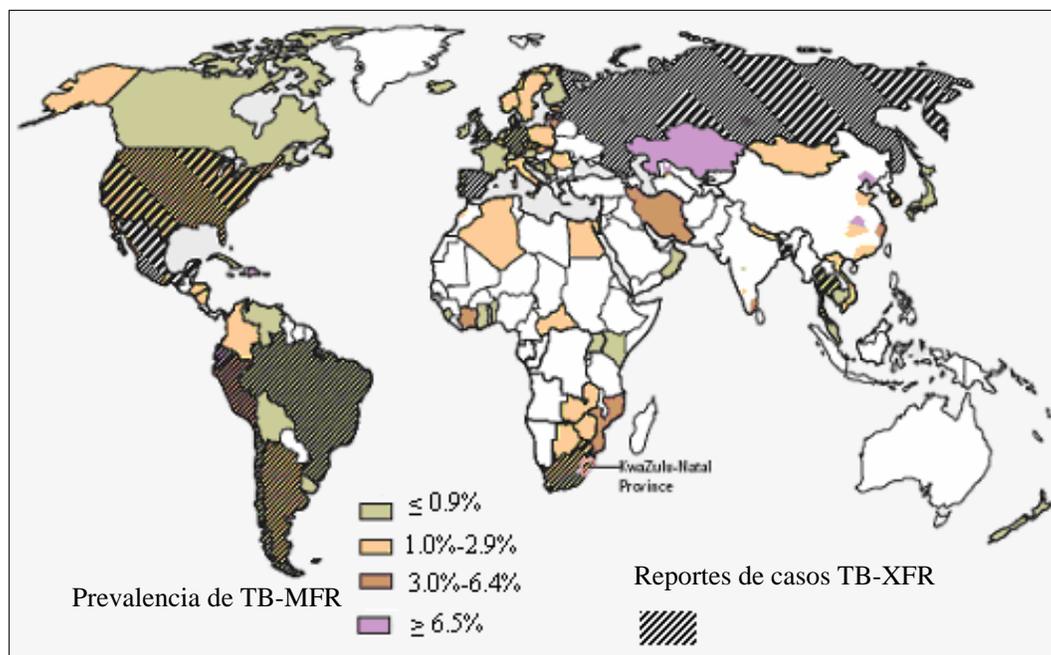
Las causas más frecuentes que inducen la resistencia son: diagnóstico tardío e inadecuado, tratamiento incompleto, irregular, interrumpido, cambiante y/o escaso apego en el esquema del tratamiento y, la resistencia primaria **(Raviglione, 2007)**.

La resistencia de *M. tuberculosis* se desarrolla por mutaciones espontáneas que ocurren con una frecuencia de uno en 10^6 a 10^8 replications dependiendo del fármaco. Por lo que, la exposición de la micobacteria a un solo fármaco proporciona un pequeño número de microorganismos con una ventaja selectiva, en la siguiente exposición a un segundo fármaco, proporciona nuevamente una ventaja selectiva en aquellos microorganismos que ya eran resistentes al primer fármaco, por lo que de este modo adquieren la multifarmacoresistencia **(Coker, 2004)**.

1.3. - Tuberculosis extremadamente farmacoresistente (TB-XFR):

Actualmente, algunos estudios han revelado la presencia de TB-XFR; además, de la TB-MFR. Estos casos son causados por *M. tuberculosis* resistentes a algunas fluoroquinolonas y al menos a uno de tres de los fármacos de segunda elección: capreomicina, kanamicina y amikacina; además, presenta resistencia a fármacos de primera elección como INH y RIF (Raviglione y Smith, 2007). En Marzo de 2006, un reporte del Centro de Prevención y Control de Enfermedades y la OMS, documentaron la presencia de casos de TB-XFR en al menos 17 países (Ver figura 2).

Figura 2: Regiones en las que se han reportado casos de TB-XFR. (Tomada de Raviglione y Smith, 2007).



Prevalencia de casos de TB-MFR entre nuevos casos de tuberculosis, 1994-2002, y países que reportaron casos de TB-XFR en enero del 2007.

En aislados clínicos estudiados que presentaban TB-MFR, únicamente el 10% corresponde a TB-XFR. Sin embargo, en países como Estados Unidos, Corea y Latvia, se encontró que el 4%, 15% y 19%, respectivamente de las

muestras estudiadas de TB-MFR correspondían a cepas de TB-XFR. **(Raviglione, 2006; Blower y Supervie, 2007; Raviglione y Smith, 2007)**

Se han confirmado 269 casos recientemente de TB-XFR en la región sur de África. **(WHO, 2007b)**. A principios del 2005, un hospital médico rural en KwaZulu-Natal (Sudáfrica), registró un alarmante incremento de muertes en pacientes coinfectados VIH/TB, y estudios realizados revelaron la presencia de cepas de TB-XFR y TB-MFR. De 53 pacientes que presentaban TB-XFR, 51% declararon que nunca habían sido tratados (lo cual implica que habían adquirido la enfermedad por infección primaria con *M. tuberculosis* XFR). El 98% de estos pacientes murieron poco tiempo después (16 días) de haberse tomado la muestra de esputo. Al realizar las pruebas de susceptibilidad, se encontró que presentaban resistencia a todos los fármacos antituberculosos de primera línea (INH, RIF, pirazinamida (PZA), etambutol (EMB) y STR) y a dos de los fármacos de segunda línea (a los aminoglicósidos amikacina y kanamicina), y a todas las fluoroquinolonas probadas **(Raviglione, 2006)**.

En marzo de 2006 un reporte de Los Centros de Prevención y Control de Enfermedades (CDC) y la OMS, reportaron el análisis de 17 690 aislados clínicos de 49 países, los cuales fueron sometidos a pruebas de susceptibilidad a tres fármacos de segunda línea (SLDs), los resultados revelaron que el 20% de las muestras fueron TB-MFR y que el 10% de los aislados fueron TB-XFR. Las muestras TB-XFR estuvieron presentes en al menos 17 países de todos los continentes **(Raviglione, 2006)**.

Las causas de TB-XFR son similares a las de la TB-MFR; el inapropiado uso de fármacos de segunda línea en pacientes en quienes el tratamiento con fármacos de primera línea no dio resultados (tratamientos inapropiados y

escaso apego), la propagación directa debido al contacto con casos TB-XFR y diagnósticos inadecuados (**Raviglione, 2007; Blower y Supervie, 2007**).

1.4. - Estrategias para el control de la enfermedad:

Debido al problema de salud que representa la TB en los sistemas de salud, en el 2005, la OMS implemento el Programa Mundial Alto a la Tuberculosis, basado en las estrategias de detectar al menos un 70% de todos los casos bacilíferos nuevos de TB que se produjeran cada año mediante estudios de rayos X y de laboratorio (**WHO, 2007b**); además de tratar con éxito al menos el 85% de los casos detectados mediante el programa “Tratamiento Acortado Estrictamente Supervisado” (TAES o DOTS). Este programa ha sido implementado al menos en 182 países, y consta de cinco componentes esenciales (**Elzinga et al., 2004; Baltussen et al., 2005**):

1.- Que el gobierno sostenga el compromiso para controlar la enfermedad.

2.-Diagnóstico basado en baciloscopía de muestras de esputo con la debida calidad y aseguramiento; sobre todo en los pacientes sintomáticos que se presenten ante los servicios de salud.

3.-Estandarizar la quimioterapia de vía corta para todos los casos y administrar estos para cada caso dependiendo de las condiciones e incluyendo la observación directa del tratamiento.

4.- Suministro ininterrumpido de fármacos de calidad-asegurada.

5.-Un registro estándar e informes del sistema, los cuales permitan la creación de un programa de monitoreo para la evaluación sistemática de los resultados del tratamiento de todos los pacientes registrados.

Este programa ha tenido éxito en el control de la TB en varios países alcanzándose una cobertura de más del 90%; sin embargo, en países de la ex-Unión Soviética y de África Subsahariana la cobertura es menor al 10%, aunado al problema de VIH/SIDA. Por otro lado, podemos mencionar que en las regiones de China donde se encuentra implementado el programa, la incidencia de la TB se ha reducido en un 40% en relación a las regiones donde no se encuentra implementado el programa TAES (**Nelson, 2004**). Debido a que los los objetivos planteados en el programa TAES no se cumplieron en el tiempo estimado (2005), en el 2006 se realizó un replanteamiento del programa enfocándose principalmente a los casos de TB-MFR mediante el programa TAES-*plus*. Este programa esta basado en los mismos principios del TAES, pero además incluye pruebas de susceptibilidad en muestras de esputo para el diagnóstico, además de hacer uso de los fármacos de segunda línea (SLDs) como primera elección con la finalidad de conseguir la cura de los pacientes en proporciones cercanas a los casos de TB sensible (**Baltussen et al., 2005**).

Las estrategias para el uso de fármacos de segunda línea cae dentro de dos categorías: aquellas que hacen uso de regimenes estandarizados formulados para áreas geográficas particulares basados en los perfiles de fármacoresistencia detectados en muestras tomadas, y aquellos que utilizan regimenes de tratamiento individuales basada en pruebas de susceptibilidad. Sin embargo, los tratamientos con fármacos SLDs resultan mas caros, con mayores efectos secundarios, inducen fácilmente resistencia y son más prolongados que aquellos tratamientos que hacen uso de fármacos de primera línea (**Resch et al. , 2006**).

La estrategia “Alto a la Tuberculosis” fue diseñada como una guía para

el control de la TB entre el año 2006 al 2015 y fue construido en base a los programas TAES y TAES-*plus*, constando de 5 principales componentes: seguir con la expansión del programa TAES; controlar la coinfección TB/HIV y la TB-MFR; ayudar y orientar a los sistemas de salud; proporcionar asistencia médica; impulsar a las comunidades y gobiernos a promover la investigación sobre métodos rápidos de diagnóstico, desarrollo de vacunas y desarrollo de nuevos fármacos antituberculosos (**Baltussen et al., 2005**).

1.5. - Diagnóstico y tratamiento de la tuberculosis:

Aproximadamente 1.7 millones de personas alrededor del mundo no tienen un adecuado acceso a los medicamentos, y el 80% de ellas vive en países en vías de desarrollo, en los cuales el poco suministro de los medicamentos es el mayor obstáculo para tratar los problemas de salud y son un fuerte indicador de la deficiencia de los sistemas de salud pública (**Ruxin et al., 2005**).

Los nuevos casos de TB son detectados cuando los pacientes presentan síntomas pulmonares y son diagnosticados mediante pruebas baciloscópicas en muestras de esputo; sin embargo, el 23% de los casos corresponden a diagnósticos incidentales (**Resch et al., 2006; Iseman y Huitt, 2000**).

Los regímenes de tratamiento establecidos mediante el programa TAES, constan de la combinación de cuatro o cinco medicamentos administrados entre seis y nueve meses, entre los que se tienen a la RIF, INH, STR, EMB o PZA (fármacos de primera línea), la mezcla de estos medicamentos se emplea en la fase intensiva (dos meses de tratamiento) y en la fase de sostén se

recomienda un tratamiento a base de INH y RIF durante 4 meses o INH y EMB por 6 meses. El uso de EMB o STR, esta en función de la resistencia a INH, cuando es superior al 4%, cuando el paciente ha sido previamente tratado con antimicobacterianos, cuando el paciente es de un país con una elevada incidencia de TB resistente o cuando existe el antecedente de contacto con un paciente con TB-MFR (**Coll, 2003**). Sin embargo, debido a la larga duración del tratamiento (6 meses) y la inadecuada administración de los medicamentos los pacientes frecuentemente dejan de tomar los medicamentos tan pronto como los síntomas se ven disminuidos y como consecuencia se presenta la aparición de casos TB-MFR y TB-XFR, los cuales son mas complicados de tratar que aquellas infecciones provocadas por cepas susceptibles de *M. tuberculosis* (**Raviglione, 2006; Coker, 2004**).

Para casos que ya han sido tratados (fallas en el tratamiento, tratamiento interrumpido o recaídas), se recomienda retomar el régimen de tratamiento que consiste en las mismas cinco fármacos administrados todos juntos durante 2 meses, seguido de un mes exceptuando la STR, y por 5 meses más INH, RIF y EMB. Este régimen de tratamiento es muy efectivo, incluso para pacientes que presentan coinfección con VIH (**Maartens y Wilkinson, 2007; Iseman y Huitt, 2000**).

El tratamiento para TB-MFR requiere del de fármacos que no han sido prescritos previamente durante un periodo entre 6 meses y dos, y no todos los pacientes responden favorablemente a la terapia (**Molina et al., 2006; Iseman y Huitt, 2000**). Para tratar estos casos se requiere medicamentos de segunda línea (amikacina, kanamicina, ofloxacina, ciprofloxacina, etionamida), los cuales tiene moderada actividad contra *M. tuberculosis*, provocan severos efectos

adversos e inducen fácilmente resistencia, como las fluoroquinolonas (Tablas 1 y 2) y muchos son de administración diaria e inyectables. El uso de estos fármacos debe ser en forma cuidadosa para evitar la aparición de casos TB-XFR. El régimen de tratamiento para TB-MFR incluye el uso de al menos 4 fármacos y hasta 8 fármacos. Generalmente, el tratamiento se inicia con pequeñas dosis de medicamento, y después de 3 a 10 días se incrementa. Algunas de las estrategias de tratamiento en los casos de pacientes con TB-MFR se muestran en la tabla 1.

Tabla 1: Regímenes de tratamiento para pacientes con TB-MFR con varios patrones de farmacoresistencia (Tomada de Iseman y Huitt, 2000).

Resistencia a	Régimen sugerido	Duración de la terapia
Isoniazida, estreptomina	rifampicina pirazinamida etambutol amikacina	6-9 meses
Isoniazida y etambutol +/- estreptomina	rifampicina pirazinamida amikacina quinolona	6-12 meses
Isoniazida y rifampicina +/- estreptomina	pirazinamida etambutol amikacina quinolona	18-24 meses
Isoniazida, rifampicina y etambutol +/- estreptomina	pirazinamida amikacina quinolona dos fármacos más (plus)	24 meses después de la conversión
Isoniazida, rifampicina y pirazinamida +/- estreptomina	etambutol amikacina quinolona dos fármacos más (plus)	24 meses después de la conversión
Isoniazida, rifampicina, pirazinamida y etambutol +/- estreptomina.	amikacina quinolona tres fármacos más (plus)	24 meses después de la conversión

Otros fármacos no incluidos en la tabla pueden ser utilizados en ciertas situaciones, como clofazimina, amoxicilina-clavulanato, claritromicina y azitromicina (*Iseman y Huitt, 2000*).

Tabla 2: Dosis y CMI de fármacos antituberculosos de primera y segunda línea y sus efectos secundarios (Tomada de Iseman y Huitt, 2000).

Fármaco	Dosis usual diaria en adultos (mg/kg)	CMI µg/mL	Efectos secundarios
primera línea			
Isoniazida	5-10 (mg/kg)	0.01-0.025	Hepatitis, polineuritis y otros trastornos neurológicos, erupciones cutáneas, artralgias.
Rifampicina	10 (mg/kg)		Náuseas, vómitos y diarrea, colestasis, trombocitopenia, cuadro pseudogripal, migraña.
Pirazinamida	30 (mg/Kg)	6.2-50	Hepatitis, sarpullido, artritis, artralgia, hiperurucemia, malestar estomacal.
Etambutol	15-25 (mg/Kg)	05-2.0	Neuritis óptica, malestar estomacal
inyectables			
Estreptomina	15 (mg/Kg)	0.25-2.0	Pérdida de la audición, ataxia, proteinuria, presencia anormal de electrolitos en suero, eosinofilia.
Amikacina	15 (mg/Kg)	0.5-1.0	
Kanamicina	15 (mg/Kg)	1.5-3.0	
Capreomicina	15 (mg/Kg)	1.25-2.5	Somnolencia o movimiento involuntario del globo ocular
segunda línea			
Ciprofloxacina	750 mg q.d.	0.25-2.0	Artralgia, tendinitis, dolor de cabeza, malestar estomacal, ansiedad, temblores
Ofloxacina	600 mg q.d.	0.25-2.0	
Levofloxacina	750 mg q.d.	<1.0	
Etionamida	250 mg q.d. o 500 mg q.d	0.3-1.2	Malestar abdominal, hipotiroidismo, diarrea, intolerancia a la glucosa, disfunción sexual, sarpullido.
Ácido para-aminosalicílico	4 mg q.d	desconocido	Malestar estomacal, náuseas, diarrea, sarpullido, hipotiroidismo, edema
Cicloserina	250 mg q.d. o 500 mg q.d	desconocido	Psicosis, ataques, convulsiones

También existen vacunas como la BCG que confiere protección contra la TB meníngea en niños y TB pulmonar en adultos, pero no reduce la transmisión

de la enfermedad. Durante 10 años, se han desarrollado nuevas vacunas con igual o mayor eficacia que la BCG, pero aun se encuentran en fases clínicas I o II (**Maartens y Wilkinson, 2007**).

II.- Importancia de las plantas medicinales:

Las plantas han sido utilizadas como remedios naturales por miles de años; inicialmente éstas eran utilizadas en forma de preparaciones como tinturas, infusiones, decocción, polvos, y/o cataplasmas. En la actualidad, éstas se siguen utilizando para solucionar diversos problemas de salud, sobre todo en países en vías de desarrollo donde el acceso a los medicamentos es limitado. La información sobre el uso de las plantas medicinales se ha transmitido y/o conservado a través de la historia en forma oral o escrita y dada su importancia en diversas culturas, en el siglo XIX se realizaron las primeras investigaciones enfocadas a la obtención de principios activos, empezando con el aislamiento de la morfina a partir del opio. Otros ejemplos importantes de citar son la obtención de cocaína, codeína, digitoxina, quinina, entre otros; muchos de los cuales son actualmente empleados con fines terapéuticos y algunos otros sirvieron como moléculas prototipo para el desarrollo de nuevos fármacos (**Balunas y Kinghorn, 2005**). Sin embargo, la obtención de principios activos a partir de plantas tuvo su decadencia después de la segunda guerra mundial, debido al descubrimiento de los antibióticos y de diversas sustancias sintéticas que se producían a gran escala con mejor efecto terapéutico y aparentemente con mayor eficacia y menor costo; pero el resurgimiento de enfermedades que se creían erradicadas (como la malaria, diversas parasitosis, tuberculosis, etc.) y la detección de otras como el SIDA, cáncer,

diabetes, entre otras, ha despertado el interés y la necesidad urgente de intensificar la búsqueda de nuevas sustancias en fuentes naturales (**Fabricant y Farnsworth, 2001; Newman y Cragg, 2007**).

Hoy en día, continúa el aislamiento y la evaluación farmacológica de compuestos aislados a partir de plantas medicinales, empleando diversas y novedosas técnicas de química analítica y de biología molecular; además, en esta búsqueda participan grupos de investigadores de diversas disciplinas (botánicos, químicos, bioquímicos, farmacólogos, y de algunas otras como antropología, arqueología, historia y lingüística) que contribuyen al descubrimiento y conocimiento de productos naturales con actividad biológica (**Balunas y Kinghorn, 2005; Fabricant y Farnsworth, 2001**).

En el periodo de 1959 a 1984 aproximadamente el 25% de las prescripciones médicas de los Estados Unidos y Canadá contenían extractos de plantas medicinales, o bien algún principio activo obtenido de este recurso natural (**Balandrin et al., 1993**) y de acuerdo con estudios del Instituto Nacional del Cáncer (NCI de E.U.), el 61% de las 877 nuevas moléculas químicas introducidas como fármacos en todo el mundo entre 1981 y 2002 fueron obtenidas a partir de productos naturales (**Gautam et al., 2007**).

El uso de las plantas medicinales como fuente alternativa para la búsqueda y obtención de agentes terapéuticos nos lleva al aislamiento de moléculas que pueden ser utilizadas directamente como fármacos o bien, derivar en la obtención de compuestos activos que conduzcan a la semisíntesis de otras entidades químicas con mayor actividad y menor toxicidad (**Fabricant y Farnsworth, 2001**).

De acuerdo con la OMS, al menos el 65% de la población mundial usa

las plantas medicinales como alternativa terapéutica para tratar sus principales problemas de salud. Por ejemplo, en África y China más del 80% y 40% de la población, respectivamente utiliza la medicina tradicional para ayudar en el tratamiento de sus enfermedades y problemas de salud, debido a que el acceso a los medicamentos es muy limitado (**Jagtap et al., 2006; Design, 2002**).

Entre el 2001 y el 2002, aproximadamente un cuarto de los medicamentos de mayor venta en todo el mundo eran productos naturales, o derivados de estos (**Balunas y Kinghorn, 2005; Fabricant y Farnsworth, 2001**), ejemplos importantes que se utilizan dentro de la terapéutica actual son:

Arteether (nombre comercial: Artemotil) es un fármaco empleado en el tratamiento de la malaria, es una lactona sesquiterpénica derivado de la artemisina aislada de *Artemisia annua* L., planta utilizada dentro de la medicina tradicional China.

Galantamina (conocida comercialmente como Reminyl), es un producto natural aislado de *Galanthus woronowii* Losinsk a principios de 1950 en Rusia. La galantamina esta aprobada en el tratamiento del Alzheimer, ya que es capaz de frenar el proceso de degeneración neurológica inhibiendo la acetilcolinesterasa, también une y modula el receptor de la acetilcolina.

Tiotropio (nombre comercial: Spiriva), fue lanzado en E.U. para el tratamiento de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica y es un anticolinérgico broncodilatador basado en el ipratropio, que es un derivado de la atropina aislada de *Atropa belladonna* y en otros miembros de la familia Solanaceae.

Metformina, agente hipoglucemiante que se obtuvo a partir de la

galegina (*Galega officinalis*), la especie vegetal es muy empleada como antidiabético.

Sin embargo, a pesar de la riqueza florística en el mundo (250,000 especies de plantas), únicamente alrededor del 15% se han estudiado desde el punto de vista fitoquímico y aproximadamente el 6 % de las especies vegetales en nuestro planeta han sido evaluadas con la finalidad de conocer sus actividades biológicas (***Molina-Salinas et al., 2006; Fabricant y Farnsworth, 2001***).

III.- Plantas medicinales como fuentes de compuestos con actividad antimicobacteriana:

Los agentes antituberculosos (PZA, EMB, INH, RIF y STR) de uso actual, se desarrollaron entre 1950 y 1970 y por más de 3 décadas el desarrollo de este tipo de sustancias fue escaso. Desde 1980 se detectó que a nivel mundial, el número de casos de TB iba en aumento y se presentaron los primeros casos de TB-MFR (***Gautam et al., 2007***), durante este periodo se impulso la búsqueda y desarrollo de nuevos fármacos antiTB y a la fecha únicamente se cuenta con dos (rifalazil y rifabutina) aprobados por la FDA (***O'Brien y Spigelman, 2005***).

En este sentido, podemos mencionar que en la actualidad numerosos grupos de investigadores se han dado a la tarea de buscar nuevos compuestos antiTB en las plantas medicinales. Hoy en día, este recurso es empleado en los países desarrollados por su efectividad terapéutica e inocuidad. Más de 350 productos de origen vegetal han sido evaluados para determinar su actividad antimicobacteriana, y se han encontrado compuestos tales como

alcaloides, chalconas, flavonoides, entre otros, que han demostrado actividad antimicobacteriana *in vitro* (**Billo et al., 2005; Cantrell et al., 2001; Newton et al., 2000; Pauli et al., 2005**).

Dentro de los trabajos que se han realizado sobre plantas medicinales con el objetivo de explorar su potencial antimicobacteriano durante el periodo del año 2002 a la fecha, se encuentra la descripción de un grupo de 22 plantas medicinales mexicanas, empleadas para el tratamiento de enfermedades respiratorias, que fueron evaluadas contra *M. tuberculosis* H37Rv y *M. avium* encontrándose que los extractos hexánico y metanólico de *Juniperus communis* presentaron una CMI= 100 µg/mL y los extractos hexánicos de *Lantana hispida*, *Chamaedora tepejilote*, *Artemisa ludoviciana* y *Malva parviflora* presentaron una CMI= 200 µg/mL. Los extractos activos fueron probados contra cuatro variables monoresistentes de *M. tuberculosis* H37Rv (resistentes a INH, RIF, STR y EMB) donde el extracto hexánico de *L. hispida* mostró la mejor actividad, siendo la cepa resistente a INH la mas sensible al extracto; sin embargo, también mostró actividad contra aislados clínicos de *M. tuberculosis* MFR (**Jiménez et al., 2003**). Del extracto activo de *L. hispida* se aislaron tres triterpenos y el β-sitosterol, siendo el más activo el ácido oleanólico con una CMI de 12.5 µg/mL, los otros dos triterpenoides (ácido 3-acetoxi-22-[2'-metil-2z-buteniloxi]-12-oleanen-28-oico y lantadeno A reducido) mostraron una CMI de 50 µg/mL contra *M. tuberculosis* H37Rv (**Jiménez et al., 2007**). Del extracto hexánico de *C. tepejilote* se aisló el ácido ursólico y escualeno como responsables de inhibir el crecimiento de *M. tuberculosis* H37Rv, encontrándose que presentaron un 99% de inhibición a 100 µg/mL (**Jiménez et al., 2005**). Cabe mencionar que el ácido ursólico aislado de

Aspidosperma quebracho-blanco presentó una CMI= 32 μ M al ser evaluado por el método radiorespirométrico y de 50 μ g/mL por MABA (**Wächter et al., 1998; Cantrell et al., 2001**). De *Thymus vulgaris* (extracto hexánico) se aisló la mezcla de ácido ursólico/ac. oleanólico cuya CMI fue de 12.5 μ g/mL para *M. tuberculosis* H37Rv y de 50 μ g/mL contra diversas cepas de *M. tuberculosis* MFR (**Martínez, 2006; Jiménez et al., 2006**).

Otro estudio realizado sobre un total de 55 extractos de 20 plantas diferentes, refiere que el extracto activo contra *M. bovis* BCG fue el metanólico del fruto de *Amborella trichopoda* (CMI=1-2.5 μ g/mL) (**Billo et al., 2005**). Y dentro de otras investigaciones se describe la evaluación del potencial antimicobacteriano de los extractos diclorometánicos de 270 plantas peruanas contra *M. tuberculosis*, donde se encontró que los que presentaron mayor actividad fueron la corteza de la especie *Senna silvestres*, el tallo de *Somera sabiceoides* (CMI <6.5 μ g/mL), la corteza de *Nectandra hihua*, frutos y tallos de *Senna oblicua*, tallo de *Heisteria acuminata* (CMI= 10 μ g/mL) y la corteza de *Zanthoxylum sprucei* (CMI= 15 μ g/mL) (**Graham et al., 2003**).

En el 2004, un estudio realizado con la finalidad de encontrar compuestos con actividad antimicobacteriana en la especie *Piper sanctus*, que es abundante en la región del sur y centro de México, y es comúnmente conocida con el nombre de “acuyo”, “hierba santa” y “hoja santa”, se reportó que en el extracto CH₂Cl₂:MeOH (1:1) preparado a partir de las hojas presentó una inhibición del 99% en el crecimiento de *M. tuberculosis* H37Rv a 100 μ g/mL y el extracto del tallo inhibió el crecimiento del microorganismo en un 95% a la misma concentración. El estudio químico biodirigido condujo a la identificación de 14 nuevos compuestos y 10 ya conocidos en los aceites

esenciales y en los extractos de las hojas; los más activos fueron: el 2-oxo-14-(3',4'-metilendioxfenil)tetradecano (CMI= 6.25 µg/mL), 2-oxo-16-(3',4'-metilendi-oxifenil)hexadecano (CMI= 6.25 µg/mL), 5,6-dehidro-7,8-dihidrometisticina (CMI= 4 µg/mL), cefaranona B (CMI= 12 µg/mL) y piperolactama A (CMI= 8 µg/mL) (**Mata et al., 2004**).

Por otro lado, en el 2005 se reportó que el extracto CH₂Cl₂:MeOH (1:1) de *Thalia multiflora* inhibió el crecimiento de *M. tuberculosis* H37Rv (CMI= 50 µg/mL) y mediante fraccionamiento químico se aislaron 18 compuestos (esteroides, flavonoides, glicósidos, ceramidas, compuestos fenólicos y alcaloides) siendo los más activos contra la micobacteria el estigmast-5-en-3β-ol-7-ona (CMI= 1.98 µg/mL), el estigmast-4-en-6β-ol-3-ona (CMI= 4.2µg/mL), estigmasta-5,22-dien-3β-ol-7-ona (CMI=1.0 µg/mL) y el estigmasta-4,22-dien-6β-ol-3-ona (CMI= 2.2µg/mL) (**Gutiérrez-Lugo et al., 2005**).

Otro trabajo fitoquímico realizado por Stavri y Gibbons (2005) en la especie *Anethum graveolens* describe el aislamiento de la oxipeucedanina, el hidrato de oxipeucedanina y el falcarindiol, los cuales fueron evaluados contra 5 especies de *Mycobacterium*, resultando el falcarindiol como el más activo con una CMI de 2 µg/mL para *M. phlei* y *M. abscessus* y de 4 µg/mL para *M. fortuitum*, *M. smegmatis* y *M. aurum* (**Stavri y Gibbons, 2005**).

Otras evaluaciones realizadas a partir del extracto CH₂Cl₂ de la corteza del tallo de *Warbugia ugandensis*, permitieron el aislamiento de 13 compuestos, siendo el ácido linoleico el más activo contra *M. aurum*, *M. fortuitum*, *M. phlei* y *M. smegmatis* con una CMI de 4, 8, 4 y 16 µg/mL, respectivamente; le sigue en actividad el sesquiterpeno muzigadial mostrando CMI de 64 µg/mL contra *M. phlei* y *M. smegmatis* y una CMI de 32 y 16 µg/mL

para *M. aurum* y *M. fortuitum*, respectivamente (**Wube et al., 2005**).

En evaluaciones realizadas sobre los extractos hexánico y acetónico de *Flourensia cernua* se encontró que inhibieron el crecimiento de *M. tuberculosis* H37Rv (cepa sensible a los cinco fármacos de primera línea) y también contra la cepa MFR (CIBIN/UMF: 15:99, resistentes a todos los fármacos de primera línea) presentando una CMI de 50 y 25 µg/mL, respectivamente (**Molina-Salinas et al., 2006**).

Y reportes de investigaciones realizadas por O'Donnell y coladores describen la actividad de la homoisoflavona [3-(4'-metoxibencil)-7,8-metilenedioxi-croman-4-ona) aislada de *Chlorophyllum inornatum*, la cuál mostró actividad contra *M. phlei* y *M. aurum* con una CMI de 16 y 32 µg/mL, respectivamente; y el 7-(1'-hidroxietil)-2-(2''-hidroxietil)-3,4-dihidrobenzopirano resulto activo contra *M. aurum* (CMI= 64 µg/mL) (**O'Donnell et al., 2006**).

Además, se ha descrito que a partir de las hojas de *Beilschmiedia tsangii* fueron aislados 13 compuestos, la beilschmina A y B resultaron los mas activos contra *M. tuberculosis* 90-V221387 con una CMI= 2.5, 7.5 µg/mL, el escualeno y el rel-(7S,8S,7'R,8'R)-3,3',4,4',5,5'-hexametoxilignano presentaron una CMI de 28 y 25 µg/mL, respectivamente (**Chen et al., 2007**).

Otro reporte muestra que los extractos hexánico y diclorometánico de la corteza de *Casearia grewiifolia* presentaron actividad contra *M. tuberculosis* H37Ra (CMI= 25 µg/mL) y mediante fraccionamiento químico se aislaron 4 nuevos clerodan-diterpenos (caseargrewiina A-D) y dos conocidos; rel-(2S,5R,6R,8S,9S,10R,18S,19R)-18,19-diacetoxi-18,1-epoxi-6-metoxi-2-(2-metilbutanoiloxi)cleroda-3,13(16),14-trieno y rel-(2S,5R,6R,8S,9S,10R,18S,19R)-18,19-diacetoxi-18,19-epoxi-6-hidroxi-2-(2-metilbutanoiloxi)cleroda-

3,13 (16),14-trieno, los cuales presentaron una CMI de 12.5 µg/mL y la caseargrewiina C presentó una CMI de 25.0 µg/mL contra la misma micobacteria (**Kanokmedhakul et al., 2005**).

Como parte de otras evaluaciones, se reportó que del estudio químico del extracto EtOH de las raíces de *Piper sarmentosum* fueron aislados 16 compuestos, los que presentaron mayor actividad contra *M. tuberculosis* H37Ra fueron el 1-alil-2-metoxi-4,5-metilendioxibenzeno y una *N*-[9-(3,4-metilendioxifenil)-2*E*,4*E*,8*E*-nonatrienoil]pirrolidina (pirrolidinamida) cuya CMI fue de 25 µg/mL, el resto de compuestos presentaron una CMI >50 µg/mL. Además, del extracto hexánico y metanólico de los frutos de esta especie, se aislaron 12 compuestos, de los cuáles pellitorina y el 1-(3,4-metilendioxifenil)-1*E*-tetradeceno resultaron los mas activos (CMI= 25 µg/mL) contra *M. tuberculosis* H37Ra. (**Tuntiwachwuttikul et al, 2006**).

Akihisa et al. (2005a) describe el efecto antimicobacteriano de 27 triterpenos aislados de la fracción lípídica no saponificable del extracto metanólico de las flores de *Chrysanthemum morifolium*, siendo los más activos contra *M. tuberculosis* H37Rv maniladiol, 3-epilupeol (CMI= 4 µg/mL), 4,5α-epoxihelianol (CMI= 6 µg/mL), faradiol y amidiol (CMI= 16 µg/mL).

De la fracción lípídica no saponificable del extracto diclorometánico de *Hypsizigus marmoreus* se obtuvieron 15 compuestos (entre esteroides y poliisoprenopolioides), entre los mas activos contra *M. tuberculosis* H37Rv están el peróxido de ergosterol, cerevisterol, 6-epicerevisterol, 6-*O*-metilcerevisterol e hipsiziprenol A₉ cuyas CMI fueron de 1, 6, 11, 36 y 15 µg/mL, respectivamente (**Akihisha et al., 2005b**).

También se han realizado estudios de compuestos sintéticos, en donde

se ha encontrado gran actividad antimicobacteriana. Un ejemplo de ellos es geranilgeraniol (CMI= 1.56 µg/mL) y acetato de geranilgeraniol (CMI=3.13 µg/mL) que mostraron gran actividad contra *M. tuberculosis* H37Rv (**Vik et al., 2007**); y la evaluación de una serie de flavonas, chalconas y derivados de estos permitió encontrar que 8 compuestos mostraron actividad (con porcentaje de inhibición >90% a 12.5 µg/mL). Los compuestos mas activos fueron 3-cloro-2'-hydroxichalcona, 3-oido-2'-hidroxichalcona, 1-(4-fluorofenil)-3-(piridin-3-ilo)-2-propen-1-ona, 1-(furan-2-il)-3-fenil-2-propen-1-ona (**Lin et al., 2002**).

IV.-Antecedentes de las especies a investigar:

IV.1. - Antecedentes botánicos del género *Aristolochia*:

El género *Aristolochia* comprende las $\frac{3}{4}$ partes del total de la familia Aristolochiaceae dentro del orden de las Aristolochiales. La familia abarca cerca de 400 especies de plantas herbáceas o leñosas.

Las especies de *Aristolochia* se distribuyen en regiones tropicales, semiáridas y templadas (**Cano y Marroquín, 1994**). En el continente Americano se encuentra distribuido desde la vertiente sur y oriental de los Estados Unidos a través de México, Antillas y América Central hasta Sudamérica (Argentina). En México se han descrito 64 especies, algunas especies de *Aristolochia* se les conoce como “flor de pato”, “guaco”, “huaco”, “gallinitas”, “hierba del indio”, “pipilo” y una gran variedad de nombres más en lenguas autóctonas, según las regiones y localidades.

Las especies pertenecientes al género *Aristolochia*, son hierbas trepadoras de tallo simple o ramificado, con hojas que son simples, perennes, aromáticas y se disponen de manera alternada a lo largo del tallo (**Ortega-Ortiz**

y **Ortega-Ortiz, 1997; Cano y Marroquín, 1994**) y carecen de apéndices estipulares (ocasionalmente presentan pseudoestípulas) con pecíolo, flores bisexuales, actinomorfas o zigomorfas, solitarias o en glomérulos axilares, de periantio (perigonio) sencillo, y de dos verticilos trímeros, tubulosos en la parte inferior (proximal); la cubierta floral es de una sola pieza, de forma tubulosa, terminada en una lengüeta, y corona el fruto incipiente, que queda por debajo de la flor pedicelada, el cáliz gamosépalo, inflado basalmente, formando un utrículo, el limbo de colores vistosos, de purpúreo a amarillo, entero a 3 lobado, algunas veces unido al tubo en la parte central o peltado, la corola generalmente ausente, raramente con 3 pétalos (**Quer, 1962; Ortega-Ortiz y Ortega-Ortiz. 1997; Cano y Marroquín, 1994**), con estambres que pueden ser 5 o más, libres o unidos al estilo; el ovario es ínfero, de 5 a 6 carpelos, y de 4 a 6 lóculos, estilos unidos que forman la columna que remata en lóbulos estigmáticos, que van de 3 a 8; tienen numerosos rudimentos seminales marginales o parietales; el fruto es capsular dehiscente (en forma de paracaídas invertido); sus semillas numerosas y con endospermo abundante. (**Cano y Marroquín, 1994**).

IV.2.- Usos dentro de la medicina tradicional y antecedentes químicos y biológicos de especies del género *Aristolochia*:

Algunas especies de este género son comúnmente utilizadas en la medicina tradicional, puesto que han mostrado diversos efectos, tales como: diuréticos, analgésicos, antiasmáticos, anti-inflamatorios, anticancerígenos, antitusivos y expectorantes. La desventaja de este género es que contiene derivados de ácido aristoloquico, el cuál induce nefrotoxicidad y mutagenicidad

(**Sato et al., 2004**), razón por la cual muchas especies ya no son usadas en la medicina tradicional (**Yu et al., 2007; Machado y Lopes, 2005; Shi et al., 2004**).

Dentro de las especies del género *Aristolochia* que se les ha dado uso dentro de la medicina tradicional, podemos mencionar a *A. asclepiadifolia*, que se ha empleado para el tratamiento de la diabetes y mordeduras de serpientes, al igual que *A. elegans* que se utiliza para tratar mordeduras de víbora, *A. pentandra* y *A. quercetorum* se utilizan para tratar problemas estomacales (diarrea) (**Aguilar et al., 1994**). Otros ejemplos de especies empleadas con fines terapéuticos y de las cuales se ha evaluado su actividad biológica son *A. paucinervis*, que es utilizada en el tratamiento de infecciones de la piel, dolor abdominal e infecciones en las vías respiratorias altas. La evaluación biológica del extracto metanólico presentó actividad antibacteriana contra gram positivos (**Gadhi et al., 1999**). Así mismo, se ha reportado que las hojas de *A. bracteolata*, poseen actividades antihelmínticas; también es útil en el tratamiento de la sífilis, gonorrea, úlceras infectadas y otras enfermedades de la piel, y el extracto EtOH posee actividad cicatrizante (**Shirwaikar et al., 2003**).

En diversas especies de este género se ha reportado la presencia de lignanos, diterpenos, sesquiterpenos y flavonoides, de diferentes partes vegetales (**Wu et al., 1999,2000, 2002**); por ejemplo, como parte del estudio químico del extracto acetónico de las hojas de *A. ridicula*, fueron identificadas tres nuevas flavonas: ridiculoflavona A y B (biflavonas) y la ridiculoflavonilchalcona A (tetrámero de charcona-flavona) además del ciclitol (**Machado y Lopes, 2005**).

Por otro lado, se encontró que en una evaluación de los extractos crudos de 39 plantas mexicanas, el extracto MeOH de las raíces de *A. taliscana* fueron activas contra *Trypanosoma cruzi*, y como resultado del fraccionamiento químico biodirigido del extracto se aislaron 4 neolignanos (eupomatenopide-7 y 1, licarina A y B) responsables de la actividad tripanocida (**Abe et al., 2002**). También se encontró que el extracto hexánico y metanólico de la especie *A. elegans* posee actividad contra el veneno del escorpión (**Jiménez-Ferrer et al., 2005**).

Existen reportes donde se describe el aislamiento de lignanos, diterpenoides, sesquiterpenoides y alcaloides de las hojas, tallo y raíces de la especie *A. elegans*. Trabajos publicados en el 2000 y 2003, reportan el aislamiento de nuevos compuestos, aristofilas A y B, aristelegona-A-D; una nueva isoquinolina -pericampilinona-A, seis nuevos difenil éteres (aristogina-A, B, C, D, E y F), tres nuevos lignanos (aristelegina-A-C), un nuevo dimero (aristolina), dos nuevas aristolactamas (aristolactama E y aristolactam-AIIIa-6-O- β -D-glucósido), tres nuevos aristoquinolinas A-C del extracto metanólico de hojas, tallos y raíces de *A. elegans* (**Wu et al., 2000; 2002; Shi et al., 2004**). En el aceite volátil de las raíces, hojas y tallos de la misma especie se encontró β -cariofileno, isocariofileno y la biciclogermacreno (**Vila et al., 1997**) y en el aceite esencial del rizoma y de las partes aéreas de *A. mollissima* se encontraron 68 y 74 constituyentes, respectivamente. El 2,2,7,7-tetrametiltri ciclo[6.2.1.0(1,6)]undec-4-en-3-one, fue el constituyente más abundante (15.9% en rizoma y 13.5% en partes aéreas). Otros compuestos detectados son (E)-acetato de santalol (10.3%) y el canfeno (6.7%) para el rizoma y el espatulenol (6.8%) para las partes aéreas. **Yu et al. (2007)** describe la

actividad antimicrobiana de ambos aceites esenciales contra 20 microorganismos, siendo el más activo el aceite del rizoma contra *Staphylococcus saprophyticus*.

Dentro de las actividades biológicas de *A. grandiflora* encontramos que ha sido utilizada como antihemorrágico en los casos por mordeduras de *Bothrops atrox*, y la investigación biológica del extracto EtOH (96%) reveló que posee moderada neutralización sobre la toxina de *B. atrox* (**Otero et al., 2000**).

Respecto a *A. taliscana*, llamada comúnmente “Guaco”, se utiliza como remedio contra la diarrea, mordeduras de serpiente, y afecciones dermatológicas. Es una planta trepadora, de tallos delgados de 2-3 m de largo, se distingue por un cáliz limbado no bilobado, obtuso, y cápsula de 3 cm. En México, se distribuye en Sinaloa, Nayarit y Jalisco (**Martínez, 1979**).

Como parte de una línea de investigación donde se explora el potencial antituberculoso de plantas medicinales de México se encontró que los extractos Hex y MeOH de las partes aéreas de esta planta inhiben el 100 y 46%, respectivamente, el crecimiento de *M. tuberculosis* H37Rv, al ser evaluadas por el método radiorespirométrico a una concentración de 100 µg/mL (**León, 2005**). El fraccionamiento químico biodirigido del extracto hexánico permitió el aislamiento de 3 neolignanos caracterizados como licarina A, licarina B y eupomatenoide 7, los cuales fueron activos contra *M. tuberculosis* H37Rv presentando una CMI de 25 (licarina A y licarina B) y 6.25 µg/mL (eupomatenoide 7), al ser evaluados por el mismo método. Dado el efecto antimicobacteriano presentado por estos compuestos, se decidió realizar el presente trabajo con la finalidad de enriquecer los compuestos activos y explorar el efecto antimicobacteriano de estos contra cepas y aislados clínicos

de *M. tuberculosis* mono y multifarmacorresistentes, así como evaluar la toxicidad subaguda del compuesto más activo, con la finalidad de determinar la potencialidad de estos compuestos como posibles agentes antituberculosos.

❖ **HIPÓTESIS**

La licarina A y el eupomatenóide 7, presentes en las especies *A. taliscana* y *A. grandiflora* serán capaces de inhibir el crecimiento de cepas de micobacterias no tuberculosas, así como de cepas mono y multifarmacoresistentes de *Mycobacterium tuberculosis*, además presentarán baja toxicidad subaguda.

❖ OBJETIVOS

Objetivos generales:

- Obtener licarina A y eupomatenoide 7 de las especies *Aristolochia taliscana* y *A. grandiflora*.
- Evaluar el efecto de los compuestos contra cepas de micobacterias no tuberculosas, cepas monoresistentes de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv y contra aislados clínicos multifarmacoresistentes de *M. tuberculosis* y determinar la toxicidad subaguda del compuesto más activo.

Objetivos particulares:

- Realizar el fraccionamiento químico primario en cromatografía en columna de fase normal del extracto metanólico de *A. taliscana* y el fraccionamiento secundario de *A. grandiflora*.
- Aislar e identificar los principales compuestos activos y mayoritarios (licarina A y eupomatnoide 7) que son responsables de la actividad antimicobacteriana presentes en las fracciones.
- Establecer las condiciones analíticas de HPLC para la identificación de licarina A y eupomatenoide 7.

- Llevar a cabo la purificación del eupomatenoide 7 mediante métodos cromatográficos (HPLC y cromatografía en columna de fase normal) y recristalización.
- Realizar la purificación de la licarina A mediante métodos de recristalización.
- Evaluar la actividad antimicobacteriana *in vitro* del eupomatenoide 7 y licarina A (compuestos mayoritarios) contra cuatro cepas monoresistentes de *M. tuberculosis* H37Rv (de la colección ATCC), cuatro aislados clínicos de *M. tuberculosis* MFR y dos cepas de micobacterias no tuberculosas (*M. fortuitum* y *M. non-chromogenicum*).
- Determinar la toxicidad subaguda del compuesto mas activo empleando aceite de olivo (vía subcutánea) y tween 20/agua 17:83 (vía intragástrica) como vehículos.

❖ METODOLOGÍA

I.-Preparación de los extractos:

Los extractos metanólico y hexánico de las especies *Aristolochia taliscana* y *A. grandiflora*, respectivamente, fueron preparados vía maceración a partir de 1.5 kg de material vegetal (rizoma) seco y molido.

II.-Fraccionamiento primario del extracto MeOH de A. taliscana:

Se realizó el fraccionamiento químico de 10 g de extracto MeOH en cromatografía en columna de fase normal (CC-FN). Para llevar a cabo el fraccionamiento, se utilizaron 200g de sílica gel 60 (0.063-0.2 mm, Merck) como fase estacionaria, y como fase móvil se emplearon disolventes con grado creciente de polaridad (mezcla de Hex:CHCl₃, CHCl₃, mezcla de CHCl₃:MeOH y MeOH), mediante este proceso se colectaron 124 fracciones (de la fracción 1 a la 48 el volumen fue de 200 ml c/u y de 49 a la 124 se colectaron fracciones de 500 ml c/u) (*Tabla 3*). Las fracciones obtenidas, fueron sometidas a un análisis en cromatografía en capa fina (ccf) con la finalidad de llevar a cabo la reunión de las fracciones similares de acuerdo a su perfil cromatográfico, al final de este procedimiento las fracciones fueron reunidas en 11 grupos.

Las fracciones reunidas y los eluyentes empleados, así como las fracciones colectadas y la clave final se muestran en la tabla 3.

Sistema de elusión	Fracciones		Clave
	Colectadas	Reunidas	
Hex:CHCl ₃ 90:10	1-15	1-35	F1
Hex:CHCl ₃ 85:15	16-35		
Hex:CHCl ₃ 80:20	36-62	36-37	F2
		38-57	F3
		58-63	F4
Hex:CHCl ₃ 75:25	63-92	64-80	F5
		81-106	F6
Hex:CHCl ₃ 70:30	93-103	107-113	F7
Hex:CHCl ₃ 60:40	104-112		
Hex:CHCl ₃ 50:50	113-116	114-119	F8
		CHCl ₃	117-119
CHCl ₃ : MeOH 50:50	120-122	120	F9
		121-123	F10
MeOH	123-124	124	F11

Tabla 3: Fraccionamiento primario del extracto metanólico de *A. taliscana*.

Durante el proceso de fraccionamiento se realizaron ccf comparativas con compuestos de referencia, previamente aislados de la especie (**León, 2005**).

III.- Fraccionamiento secundario de dos fracciones de *A. grandiflora*:

Dos muestras obtenidas de un fraccionamiento primario del extracto hexánico de *A. grandiflora* fueron unidas para ser sometidas a un fraccionamiento secundario, con la finalidad de aislar los compuestos presentes. Para esto, se montó una CC-FN, empacada con 70 g de sílica gel 60 (0.063-0.2 mm) como fase estacionaria, sobre la cual se sembraron 3.5 g de muestra adsorbidos previamente en el 10% del peso de la sílica, posteriormente la columna se eluyó con mezclas de disolventes con grado creciente de polaridad (Hex:CHCl₃, CHCl₃, CHCl₃:MeOH y MeOH),

obteniéndose 57 fracciones, 48 de 50 mL (1-48) y 9 fracciones (49-57) de 250 mL; que en base a su perfil cromatográfico en ccf fueron reunidas en 7 grupos.

Las fracciones colectadas, eluyentes, fracciones reunidas y la clave final de cada grupo se muestran en la tabla 4.

Tabla 4: Fraccionamiento secundario de *A. grandiflora*.

Sistema de elusión (%)	Fracciones		Clave
	Colectadas	Reunidas	
Hex:CHCl ₃ 70:30	1-44	1 – 5	Agl / F1
		6 – 10	Agl / F2
		11	Agl / F3
		12 – 26	Agl / F4
		27 – 34	Agl / F5
		35 – 49	Agl / F6
CHCl ₃ 100	45-51	50 – 57	Agl / F7
CHCl ₃ :MeOH 80:20	52-54		
MeOH 100	56-57		

Posteriormente, se realizó una comparación de la fracción Agl/F6 (del fraccionamiento secundario de *A. grandiflora*) con 4 fracciones provenientes del fraccionamiento primario de *A. taliscana*, mediante una ccf utilizando como sistema de elusión CHCl₃ y H₂SO₄ al 10% en solución acuosa como revelador, esto con la finalidad de observar su similitud química en cuanto a su composición.

El perfil cromatográfico en ccf de las fracciones fue muy parecido por lo que se reunieron y posteriormente fueron sometidas a un siguiente fraccionamiento químico.

IV.- Fraccionamiento químico secundario de fracciones provenientes del fraccionamiento primario de *A. grandiflora* y *A. taliscana*:

Se realizó el fraccionamiento químico de 8 g de muestra (fracciones provenientes del fraccionamiento primario de *A. grandiflora* y *A. taliscana*)

mediante CC-FN (240 g de silica gel 60, 0.063-0.2 mm, Merck), eluyendo con mezclas de disolventes con grado creciente de polaridad (Tabla 5).

Al finalizar este proceso, se obtuvieron 187 fracciones que mediante ccf comparativa se reunieron en 32 grupos finales. Las reuniones realizadas, las claves asignadas a cada grupo de fracciones, pesos y rendimientos de cada uno, se muestran en la tabla 5.

Sistema de elución (%)	Fracciones		Clave
	Colectadas	Reunidas	
Hexano 100	1-41	1 – 4	AF1
		5 – 8	AF2
		9 – 16	AF3
		17 – 26	AF4
		27 – 33	AF5
		34 – 42	AF6
Hex:CHCl ₃ 98:2	42-49	43 – 49	AF7
Hex:CHCl ₃ 95:5	50-58	50 – 54	AF8
		55 – 58	AF9
Hex:CHCl ₃ 90:10	59-64	59 – 64	AF10
Hex:CHCl ₃ 85:15	65-86	65 – 69	AF11
		70 – 76	AF12
		77 – 83	AF13
		84 – 87	AF14
Hex:CHCl ₃ 80:20	87-105	88 – 89	AF15
		90 – 91	AF16
		92 – 94	AF17
		95 – 105	AF18

Sistema de elución (%)	Fracciones		Clave
	Colectadas	Reunidas	
Hex:CHCl ₃ 75:25	106-146	106 – 107	AF19
		108 – 124	AF20
		125 – 134	AF21
		135 – 140	AF22
		141 – 145	AF23
		146 – 152	AF24
Hex:CHCl ₃ 70:30	147-161	153 – 155	AF25
		156 – 162	AF26
Hex:CHCl ₃ 50:50	162-174	163 – 170	AF27
		171 – 175	AF28
Hex:CHCl ₃ 30:70	175-178	176 – 178	AF29
		179 – 180	AF30
CHCl ₃ 100	179-183	181 – 183	AF31
		184 – 187	AF32
CHCl ₃ :MeOH 50:50			

Conjuntamente con la realización del proceso de fraccionamiento se realizó un análisis en ccf de cada una de las fracciones para determinar la composición de estas. Las fracciones, en las cuales se encontraron los compuestos de interés (licarina A y eupomatenoides 7), fueron sometidas a procesos de purificación, empleando HPLC, cristalización y CC-FN.

V.-Procesos de purificación del eupomatenoides 7:

V.1.- Purificación del eupomatenoides 7 presente en la fracción secundaria AF25 mediante HPLC:

Tabla 5: Fraccionamiento secundario de *A. grandiflora* y *A. taliscana*. Parte de la fracción secundaria AF25 (Tabla 5), en la cual se detectó uno de los compuestos activos y mayoritarios, fue objeto de análisis por HPLC. Para ello, fue necesario desarrollar las condiciones analíticas (Tabla 6), probando diferentes sistemas y flujos para determinar las condiciones que permitieran una mejor separación del compuesto principal (eupomatenoides 7) presente en esta fracción y tomando en cuenta lo reportado en la literatura, donde se describe que para la separación de lignanos empleando fase reversa se recomienda utilizar disolventes polares como MeOH, acetonitrilo o mezclas de estos (**Willför et al., 2006**), para este análisis se empleó un cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC, marca Waters) acoplada a un controlador 600 (Waters) y degasificador (Degassit 6324). Para el manejo del equipo se empleó el programa Millennium 32 (Waters).

Parte de esta fracción fue sometida purificada por el mismo método, empleando las condiciones determinadas.

Las condiciones analíticas y semipreparativas fueron las siguientes:

Tabla 6: Condiciones analíticas y semipreparativas del proceso de purificación de los compuestos presentes en la fracción AF25 por HPLC.

Columna	Condiciones analíticas	Condiciones semipreparativa
Spherisorb S10 ODS2	(4.6X250 mm, 10 µm ODS2)	(10X250 mm)
Sistema de elución	MeOH 100% (grado HPLC)	MeOH 100% (grado HPLC)
Flujo (mL/min)	0.3	1
Vol. inyección (µL)	20	100
Concentración (mg/mL)	2	3.33
Tiempo de corrida (min)	40	43
λ (nm)	220 y 350	220 y 350

45 mg de la fracción AF25 fueron sometidos a columna semipreparativa [Spherisorb S10 ODS2 (10X250 mm)], el compuesto se identificó por análisis de sus espectros de resonancia magnética nuclear protónica (RMN-¹H), y espectrometría de masas por impacto electrónico (EM-IE).

V.2.- Purificación por columna cromatográfica del eupomatenoides 7:

La purificación de eupomatenoides 7 (2), se realizó también por cromatografía en columna fase normal empleando 240 g de sílica gel como fase estacionaria, en la cual se sembraron 948.8 mg de las fracciones AF24, parte de la fracción AF25 y la fracción AF26, la columna se eluyó con mezclas de disolventes con grado creciente de polaridad (Hex, Hex:CHCl₃, CHCl₃, CHCl₃:MeOH, MeOH).

Los sistemas de elución empleados, las fracciones colectadas y reunidas de acuerdo a su perfil cromatográfico, pesos y rendimientos se encuentran registrados en la tabla 7.

Sistema de elución (%)	Fracciones		Clave	Peso (mg)	Rendimiento (%)
	Colectadas	Reunidas			
Hex	1-23	1-3	FI	2.2	0.23
		3-8	FII	3.1	0.33
		9-22	FIII	1.7	0.18
		23-38	FIV	2.8	0.3
Hex:CHCl ₃ 97:3	24-37				

Tabla 7: Purificación de eupomatenoides 7 mediante CC-FN.

Hex:CHCl ₃ 93:7	38-46				
Hex:CHCl ₃ 90:10	47-52	39-52	FV	2.8	0.3
Hex:CHCl ₃ 85:15	53-58	53-58	FIV	2.1	0.22
Hex:CHCl ₃ 80:20	59-62	59-61	FVII	13.8	1.45
		62-63	FVIII	66.9	7.05
Hex:CHCl ₃ 70:30	63-68	64-68	FIX	337.0	35.52
		69-70	FX	191.4	20.17
Hex:CHCl ₃ 60:40	69-73				
CHCl ₃	74-75	71-77	FXI	265.8	28.01
CHCl ₃ :MeOH	76-77				
MeOH	78	78	FXII	----	----

De las fracciones FVIII, FIX y FX, se obtuvieron 595.3 mg de eupomatenoide 7 (2) (mayoritario) en forma impura, sin embargo la mayor cantidad se encontró en la fracción FIX, por lo que esta muestra fue sometida a un proceso de recristalización por par de disolventes.

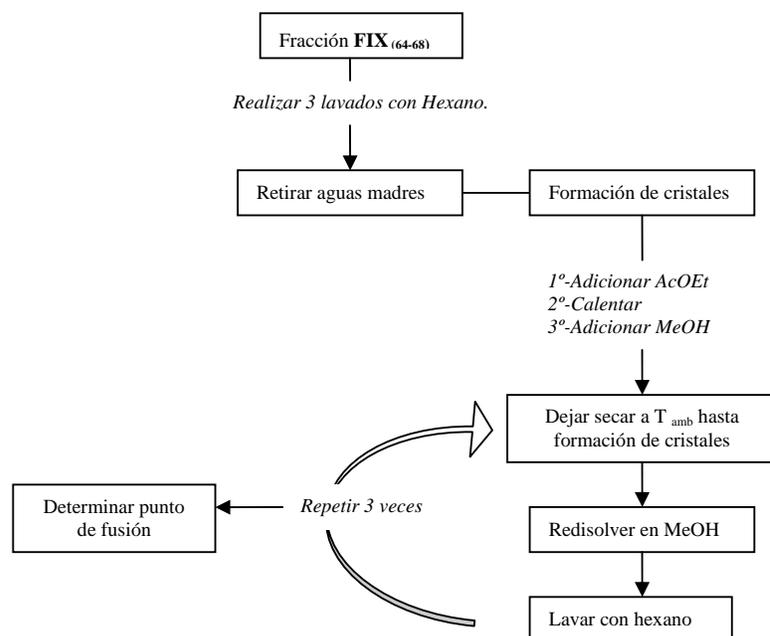
V.2.1.- Recristalización de la fracción FIX para obtención de eupomatenoide 7:

La fracción FIX fue sometida a un proceso de cristalización con la finalidad de purificar el compuesto mayoritario presente en esta fracción:

A la FIX, libre de disolvente orgánico, se le realizaron lavados consecutivos con hexano (3 x 2mL) previamente destilado, posteriormente se retiró el disolvente como aguas madres (disolución residual que contiene las impurezas o compuestos que no son de interés en este trabajo), y el residuo (cristales) se dejó secar a temperatura ambiente para eliminar el disolvente de los cristales formados, estos se disolvieron en 2.0 mL de AcOEt en baño maría y posteriormente se adicionaron 2.0 mL de metanol frío, nuevamente se dejó secar a temperatura ambiente, los cristales obtenidos fueron disueltos nuevamente en 1.5 mL de MeOH, y se adicionó hexano (1.5 mL) con la

finalidad de lavar nuevamente, la fase hexánica se retiró como aguas madres y en la fase metanólica quedo el compuesto, este último procedimiento se realizó tres veces, finalmente se dejó cristalizar a temperatura ambiente la fase metanólica (*Figura 3*) en donde se formaron cristales de color crema con un p.f. de 109-110 °C, solubles en CHCl_3 , AcOEt y MeOH; durante este procedimiento se realizaron ccf para llevar un control del proceso de purificación del compuesto. La identificación del compuesto se determinó por análisis de sus espectros de EM-IE y RMN- ^1H (*Anexo, Espectros 1 y 2*).

Figura 3: *Proceso de recristalización del eupomatenoide 7 presente en la fracción FIX.*



VI.- Procesos de purificación del licarina A:

Con la finalidad de aislar la licarina A (**5**) presente en la fracción primaria AF27 (*Tabla 5*) (1760.9 mg) se realizó un proceso de recristalización:

Como primer paso, se agrego MeOH frío (2.0 mL) hasta lograr la disolución total de la muestra, posteriormente se adiciono Hex (2.0 mL) y se dejo enfriar, para después retirar las aguas madres (fase Hexánica), la fase metanólica se llevo nuevamente a sequedad para posteriormente, realizar nuevamente el proceso de recristalización, las aguas madres se reunieron y los cristales se redisolvieron en AcOEt (1.0 mL) y MeOH (1.0 mL), de donde se obtuvieron 340.4 mg de licarina A (**5**) en forma de cristales de color crema con p.f. 97-99°C, solubles en CHCl₃ y AcOEt. La identificación del compuesto se determinó mediante el análisis de sus datos de RMN-¹H y EM-IE (*Anexo, Espectros 3 y 4*) y por su tiempo de retención (TR) en análisis de HPLC al ser comparado con un compuesto de referencia, y donde las condiciones analíticas empleadas de HPLC fueron las mismas descritas en el inciso V.1 de este apartado. Cabe aclarar que este compuesto fue obtenido mediante un proceso de cristalización y el análisis de HPLC se empleo para determinar su pureza y TR.

VII.- Actividad antimicobacteriana de licarina A y eupomatenoide 7:

La licarina A (**5**) y eupomatenoide 7 (**2**) (*Figura 7*), fueron evaluados contra dos especies de micobacterias no tuberculosas (*M. fortuitum* y *M. non-chromogenicum*), cuatro cepas monoresistentes de *M. tuberculosis* H37Rv (de la colección ATCC) y cuatro aislados clínicos *M. tuberculosis* MFR de pacientes mexicanos y con patrón de farmacoresistencia determinada, la evaluación se realizó mediante el ensayo MABA para determinar la CMI (*Tablas 8*). En esta evaluación se incluyó la cepa de referencia *M. tuberculosis* H37Rv (ATCC 27294) (*Tabla 8*).

El cultivo semilla de cada micobacteria se hizo crecer a 37 °C en caldo Middlebrook 7H9 (Becton Dickinson) enriquecido con 0.2% de glicerol (Sigma) y 10% OADC- ácido oleico, albúmina, dextrosa y catalasa (Becton Dickinson). La suspensión bacteriana en fase de crecimiento logarítmico se ajustó al tubo No. 1 del nefelómetro de McFarland con medio de cultivo 7H9 estéril. De esta suspensión se realizó una dilución 1:50 con el mismo medio para obtener finalmente una concentración de micobacterias de 6×10^6 unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL). De esta última dilución se tomaron 100 μ L y se adicionaron a los pozos de prueba.

Cepa	CMI (μ g/mL)
	Patrón de farmacorresistencia
<i>M. tuberculosis</i> H37Rv (ATCC 27294)	Sensible a INH, RIF, STR, EMB
<i>M. tuberculosis</i> Monorresistentes^a	
INH-R(ATCC 35822)	Resistente a INH
RIF-R (ATCC 33838)	Resistente a RIF
STR-R (ATCC 35820)	Resistente a STR
EMB-R (ATCC 35837)	Resistente a EMB
Aislados clínicos de <i>M. tuberculosis</i>*	
MTY663	Resistentes a STR, INH, RIF, EMB, PZA
MTY675	Resistente a STR, INH, EMB
MTY99	Resistente a STR, INH, RIF, EMB, PZA
MTY282	Resistente a STR, INH, EMB, PZA

Tabla 8: Patrón de farmacorresistencia de las micobacterias utilizadas en el ensayo de actividad antimicobacteriana de licarina A y eupomatenoide 7.

^aEstreptomina (STR), Isoniazida (INH), rifampicina (RIF), etambutol(EMB) y pirazinamida (PZA).

*El patrón de farmacoresistencia se determinó mediante el micrométodo colorimétrico de azul de alamar (MABA) (Jimenez A.M.A. et al., datos en proceso de publicación)

VII.1.- Preparación de las muestras a evaluar:

Los compuestos puros, libres de solventes orgánicos, se solubilizaron en DMSO para posteriormente preparar soluciones stock de 4 mg/mL. Estas soluciones se filtraron en condiciones estériles (filtro Acrodisc Syringe filtros de

0.2 μm) y a partir de ellas se realizaron las diluciones necesarias para tener concentraciones finales desde 100 hasta 3.12 $\mu\text{g/mL}$ para determinar las CMI's. Cada ensayo se realizó por triplicado bajo condiciones de estricta esterilidad en campana de flujo laminar P3. Como control positivo se utilizó RIF (0.062 $\mu\text{g/mL}$). La concentración final de DMSO fue de 2.5% o menor (en todos los ensayos, la concentración de DMSO no fue toxica para las micobacterias) **(Molina-Salinas et al., 2006)**.

VII.2.- Desarrollo del Micrométodo Colorimétrico de Azul de Alamar (MABA):

Esta técnica se emplea para determinar la susceptibilidad o resistencia de cepas de micobacterias a los agentes antifímicos (medicamentos empleados contra la TB) de origen natural y /o sintético **(Collins y Franzblau, 1997; Wachter et al., 1998; Jiménez et al., 2003; Mata et al., 2004)**. Es una prueba rápida, sencilla, reproducible y de bajo costo, adecuada para determinar la actividad de los extractos crudos, fracciones y compuestos puros, misma que se utilizo en la primera parte de esta línea de investigación **(Jiménez et al., 2003 y 2007)**.

El ensayo biológico se lleva a cabo en microplacas estériles de 96 pozos con tapa y de fondo plano. A los pozos de la orilla se les adiciono 100 μL de agua bidestilada, con la finalidad de mantener la humedad de la placa durante el proceso de incubación. Los 60 pozos restantes de la placa (10 hileras de 6 pozos cada una) sirvieron para evaluar seis concentraciones seriadas de los compuestos (de 100 a 3.12 $\mu\text{g/mL}$) y los controles. En cada caso se incluyeron tres controles (uno de microorganismo, uno de disolvente y un control positivo

(RIF). En cada pozo se colocaron 100 µL de medio Middlebrook 7H9, 100 µL de la muestra a evaluar (compuesto), a partir de este pozo se realizan las diluciones seriadas, por último se agregan 100 µL de la suspensión bacteriana (6×10^6 UFC/mL). Una vez inoculadas las placas, se taparon, sellaron e incubaron a 37 °C durante cinco días, después de este tiempo se adicionaron 20 µL de tween 80 y 20 µL de alamar azul (indicador redox) al control sin compuesto, prolongando la incubación durante 24 h más. Si el crecimiento de la micobacteria es óptimo en este control, se observa un cambio de color, de azul (estado oxidado) a rosa (estado reducido). Al observar este cambio de coloración, se procede a la adición del alamar azul (20 µL) y del tween 80 (20 µL) al resto de los pozos, incluyendo el resto de los controles, nuevamente las placas son reincubadas a 37 °C durante 24 horas. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se determina la CMI en base al cambio de coloración del indicador redox. Se consideran compuestos activos aquellos cuya CMI sea <50 µg/mL.

VIII.- Toxicidad subaguda.

VIII.1.- Licarina A vía subcutánea:

VIII.1.1 - Toxicidad subaguda del aceite de olivo (vehículo):

Con la finalidad de determinar un posible efecto tóxico que pudiera causar el vehículo se procedió primero a determinar la toxicidad del aceite de olivo. Para este estudio se emplearon ratones Balb/C con un peso de 20 ± 2 g. Los animales fueron seleccionados en forma aleatoria para formar 3 grupos de 5 animales c/u; el grupo I fue asignado como blanco, el grupo II como testigo (agua) y el grupo III fue tratado con aceite de olivo altamente refinado (marca SIGMA).

Los animales fueron pesados y marcados al inicio del experimento y semanalmente. Cada grupo se colocó en cajas independientes y se mantuvieron en el Bioterio del CMN Siglo XXI, a una temperatura de 27°C, un ciclo de 12 hr de luz y oscuridad con acceso libre al alimento y agua. El manejo de los animales de experimentación fue apegado a los estatutos del Comité Internacional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) y a la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999) revisada en 2001.

El volumen de aceite de olivo administrado a cada ratón en este estudio fue de 50 µL (grupo III), el grupo blanco no se les administro nada, en el caso del grupo control sólo se le administro 10 mL/kg agua inyectable (Irrigadual). La administración se realizó vía subcutánea (en el lomo del ratón) durante 28 días, los animales fueron pesados cada 7 días, durante todo el estudio. Al finalizar el experimento, los animales se pesaron y se anestesiaron vía intramuscular con clorhidrato de ketamina (50 mg/kg de peso) y clorhidrato de xilazina (5 mg/kg) administrado en una sola dosis. Una vez anestesiado el animal, se realizó un corte en la parte abdominal para permitir la visualización de la arteria aorta, a partir de la cual se extrajeron aproximadamente 2 mL de sangre para estudios de biometría hemática (BH). Las muestras de sangre para BH se colocaron en un tubo con heparina (Microvette 500 LH, Sarstedt). Una vez sacrificado el animal, se le extrajeron los siguientes órganos: hígado, riñones, intestino, estomago, bazo, piel y hueso. A excepción del intestino, hueso y piel, los demás órganos fueron pesados; posteriormente se mantuvieron en EtOH grado histológico (J.T. Baker) y en el hígado, riñón y bazo se realizaron estudios histopatológicos.

VIII.1.2.- Toxicidad subaguda de la licarina A en aceite de olivo:

En este estudio se utilizaron cuatro grupos de cinco ratones Balb/C animales c/u seleccionados en forma aleatoria: grupo I (blanco), grupo II (tratados con vehículo), grupo III (tratados con 5 veces la CMI de licarina A *in vitro* -5 mg/kg-) y grupo IV (tratados con 10 veces la CMI de licarina A *in vitro* - 10 mg/kg-). La metodología empleada fue similar a la descrita en el inciso anterior. La dosis se administro en un volumen no mayor a 10 mL/kg de peso del animal.

VIII.2.- Licarina A por vía oral.

VIII.2.1.- Toxicidad subaguda del vehículo:

Como primer paso se procedió a determinar el efecto del vehículo (tween 20) por vía oral, para ello se emplearon 3 grupos de 6 ratones cada uno: grupo I (control de agua), grupo II (vehículo tween 20:H₂O 17:83) y un grupo III (blanco). Los animales se pesaron, marcaron y se colocaron al azar por grupo en cajas independientes, al grupo I y II se les administró una dosis de 10 mL/kg de agua y vehículo, respectivamente. La administración se llevo a cabo por vía oral con una cánula del No. 20 PS. La administración se realizó por 5 días consecutivos, seguidos de 2 días sin administración hasta completar 28 días.

Los animales fueron pesados y marcados cada 7 días, durante todo el estudio. Al igual que en las evaluaciones anteriores, los animales en experimentación permanecieron en el Bioterio del CMN Siglo XXI, a una temperatura de 27°C, un ciclo de 12 hr de luz y oscuridad con alimento y agua libre.

Al finalizar el estudio los animales se pesaron y se anestesiaron vía intramuscular con clorhidrato de ketamina y clorhidrato de xilazina empleando la misma metodología descrita en el inciso **VIII.1.**

VIII.2.2.- Toxicidad subaguda de licarina A en tween 20 como vehículo:

Para determinar la toxicidad del la licarina A, se emplearon ratones machos Balb/C de 20 ± 2 g, los cuales se agruparon en 4 grupos de 6 animales c/u, grupo I (blanco), grupo II (vehículo, tween 20 : agua 17:83), grupo III (administración de licarina A, concentración de 5 veces la CMI *in vitro*) y grupo IV (administración del compuesto a una concentración de 10 veces la CMI *in vitro*). La dosis administrada por vía oral fue de 10 mL/kg de peso y la metodología empleada fue similar a la descrita en el inciso **VIII.1.**

VIII.3.- Estudio histopatológico:

Los órganos extraídos de los animales fueron pesados y lavados en solución isotónica, posteriormente fueron sumergidos en etanol anhidro (J.T.Baker) durante 48 hr para su fijación. Transcurrido el tiempo, los tejidos fueron retirados del etanol y colocados en un procesador de tejidos (Leica TP1020 automatizado) para hacerlos pasar por xileno por una hora en dos ocasiones y finalmente se incluyeron en parafina histológica. Posteriormente, los tejidos son colocados en cubos de parafina para obtener cortes de 5 μm realizados en un micrótopo (Letz Wetzlar). Cada corte fue teñido con la técnica de hematoxilina-eosina. Los cortes de cada órgano (hígado, riñón y bazo) se analizaron en el microscopio (Axolab, Carl Zeiss acoplado a una cámara Sony

CCD-IRIS) con la intención de buscar alteraciones histopatológicas respecto al grupo control.

Análisis Estadístico: El análisis de los datos de BH, se realizó mediante el programa Sigma stat 3.5 y se reportan como media \pm error estándar de la media (SEM) y la significancia estadística se determinó por ANOVA. Los datos de toxicidad aguda se analizaron por la prueba de ANOVA con una $p < 0.05$.

❖ RESULTADOS Y DISCUSIÓN

I.-Fraccionamiento primario del extracto MeOH de *A. taliscana*:

Como resultado del fraccionamiento químico del extracto MeOH de la especie *A. taliscana* se obtuvieron 11 grupos de fracciones finales; los pesos y rendimientos así como los compuestos detectados en cada fracción, se muestran en la tabla 9. Cabe mencionar que los compuestos fueron identificados por comparación de su Rf (factor de retención) en ccf, con muestras previamente aisladas (León, 2005).

Fracción	Peso (mg)	Rendimiento (%)	Compuestos detectados
F1	6.7	0.067	Eupomatenoides 1
F2	0.9	0.009	
F3	4.7	0.047	
F4	2.7	0.027	
F5	17.9	0.179	Licarina B y Eupomatenoides 7
F6	37.7	0.377	Licarina A y restos de Eupomatenoides 7
F7	0.041	0.041	Licarina A
F8	27.5	0.275	-----
F9	2705.9	27.059	Flavonas
F10	4593.7	45.937	
F11	723.9	7.239	

Tabla 9: Resultados del fraccionamiento químico de *A. taliscana*.

De la fracción F1 a la fracción F4 se obtuvo el eupomatenoides 1 (3) (Figura 7), cabe mencionar que este compuesto no fue aislado en el trabajo previo (realizado por León, 2005). El compuesto se obtuvo como un polvo blanco de pf de 84-86 °C, soluble en CHCl₃ y su identificación química se realizó mediante el análisis de sus espectros de resonancia magnética nuclear

de carbono 13 (RMN-¹³C), resonancia magnética nuclear protónica (RMN-¹H) y espectrometría de masas por impacto electrónico (EM-IE) (*Anexo, espectros 5, 6 y 7*).

En el espectro de RMN-¹H (*Anexo, espectro 6*) y RMN-¹³C (*Anexo, espectro 7*) se observan señales para un grupo metilendioxi en δ 6.00 y 101.23, respectivamente; la señal para el metilo ubicado en C-3 se observa en δ 2.39 (*Anexo, espectro 6*) y δ 18.44 (*Anexo, espectro 7*) y para el metilo ubicado en el C- β δ 1.90 (*Anexo, espectro 6*) y δ 9.51 (*Anexo, espectro 7*), el resto de las señales coincide perfectamente con lo previamente publicado (**Enriquez et al., 1984**).

En el espectro de masas (*Anexo, espectro 5*) se observa el ion molecular a 322 que corresponde a la fórmula molecular C₂₀H₁₈O₄.

En F5 se observó la mezcla de licarina B y eupomatenoide 7 (**1,2**) y en las fracciones F6 y F7 se observó la presencia de licarina A (**5**), principalmente.

En las fracciones de mayor polaridad (F9-F11) se observó la presencia de flavonas, las cuales no fueron objeto de estudio en este trabajo.

II.-Fraccionamiento químico secundario de *A. grandiflora*:

El objetivo de esta parte del trabajo fue enriquecer los compuestos de interés (eupomatenoide 7 (**2**) y licarina B (**1**)); por lo que dos fracciones primarias (2 y 3) (*Figura 4*) provenientes de *A. grandiflora* fueron analizadas en base a su perfil cromatográfico por comparación de los R_f's en ccf con compuestos de referencia. Puesto que en las fracciones se detectó la presencia de los compuestos de interés, estas fueron sometidas a fraccionamiento en CC-FN.

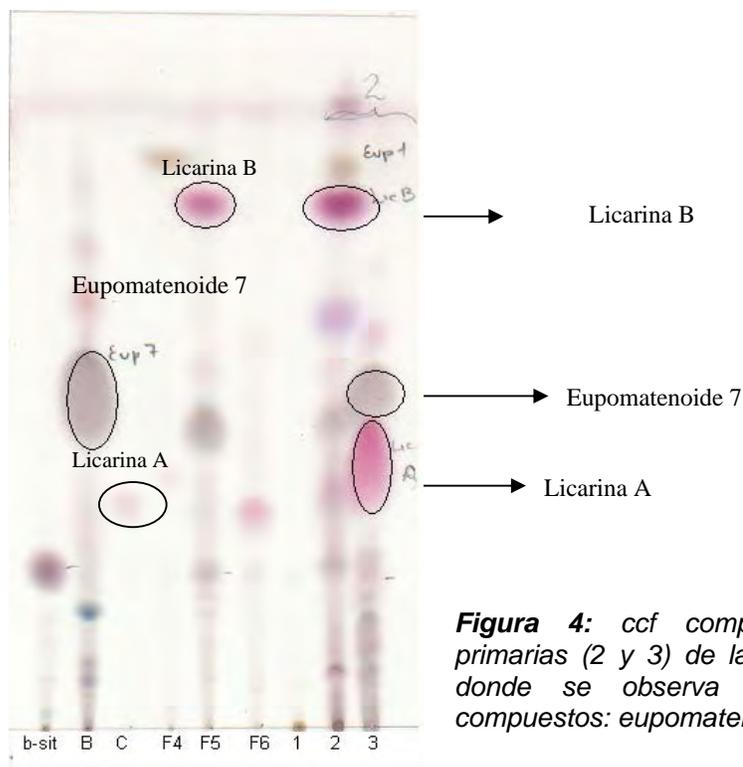


Figura 4: ccf comparativa de fracciones primarias (2 y 3) de la especie *A. grandiflora*, donde se observa la presencia de los compuestos: eupomatenoide 7, licarina A y B.

En la figura, se observa la presencia de licarina B en el punto 2 (fracción proveniente de *A. grandiflora*), y de eupomatenoide 7 y licarina A en el punto 3 (fracción proveniente de *A. grandiflora*) al comparar el R_f de cada una con los compuestos de referencia que corresponden a los puntos B (eupomatenoide 7), C (licarina A) y F5 (licarina B).

Mediante este proceso se obtuvieron 7 grupos de fracciones primarias (Tabla 10), en las fracciones Agl/F1 se detectó la presencia de *ent*-kaureno (6) y en las fracciones Agl/F2 a Ag1/F5 la mezcla de eupomatenoide 1 (3), estigmastandieno (4) y licarina B (1) (Figura 7), y en las fracciones Agl/F6 y Agl/F7 se observó la presencia de licarina B como compuesto mayoritario pero presentaba impurezas; por lo que esta fracción (Agl/F6), junto con cuatro fracciones primarias provenientes de *A. taliscana* se sometieron a un siguiente fraccionamiento secundario.

La presencia del *ent*-kaureno se detectó al realizar un análisis de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG-EM) (*Anexo, Espectro 9*) y por comparación del espectro de masas con los reportados en la biblioteca Nist Library.

La presencia del estigmastandieno en las fracciones AgI/F2 a AgI/F5 se detectó al realizar un análisis de CG-EM (*Anexo, Espectro 10*) a estas muestras, en el espectro se observa la presencia del compuesto mayoritario con un TR de 19.64 min, en el espectro de masas de se observa un PM de 396. El compuesto se obtuvo como un polvo blanco que al ser sometido a un análisis por RMN-¹H (*Anexo, Espectro 10*), se observan las señales típicas para un esteroide y sus datos espectroscópicos se compararon como lo previamente reportado en la literatura.

Fracción	Peso (mg)	Rendimiento (%)	Compuesto detectado
AgI/F1	7.4	0.2	Ent-kaureno
AgI/F2	27.7	0.8	Eupomatenoides 1 y estigmastandieno
AgI/F3	0.3	0.008	
AgI/F4	75.7	2.16	
AgI/F5	38	1.08	
AgI/F6	2627.2	75.06	Licarina B
AgI/F7	525.1	15	Licarina B

Tabla 10: Resultados del fraccionamiento secundario de *A. grandiflora*.

III.- Fraccionamiento químico secundario de fracciones provenientes del fraccionamiento primario de *A. grandiflora* y *A. taliscana* y purificación del eupomatenoides 7 por HPLC:

Como resultado del fraccionamiento secundario se obtuvieron 32 grupos de fracciones, en la tabla 11 se describen los compuestos detectados en cada grupo de fracciones.

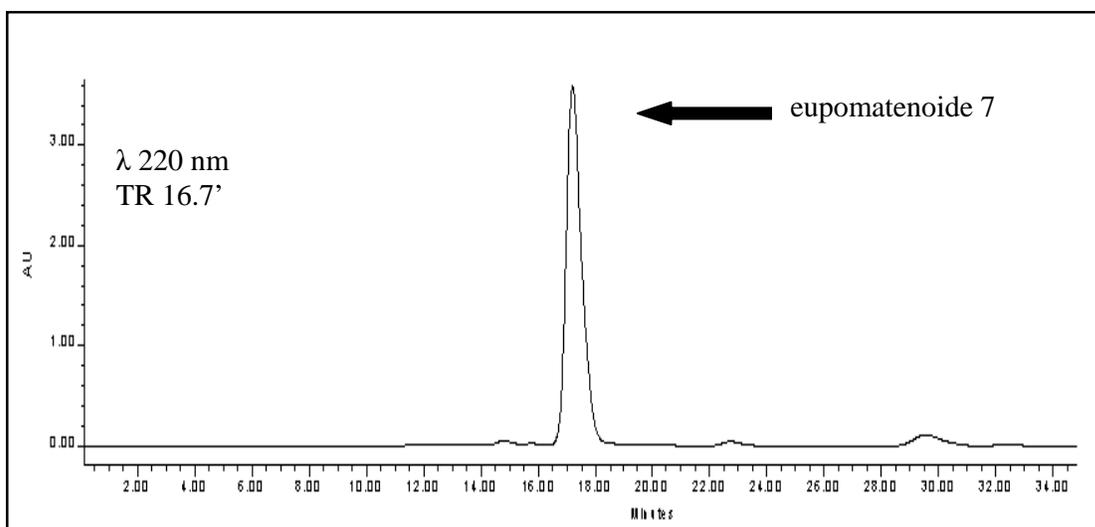
Fracción	Peso (mg)	Rendimiento (%)	Compuesto detectado
AF1	4.2	0.052	ent-kaureno
AF2	5.2	0.065	
AF3	5.1	0.064	
AF4	2.1	0.026	
AF5	1.5	0.019	eupomatenoides 1 y estigmastandieno
AF6	2.3	0.028	No se detectaron compuestos.
AF7	1.2	0.015	
AF8	2	0.025	
AF9	1.7	0.021	
AF10	6.5	0.08	
AF11	9.2	0.115	eupomatenoides 1 y estigmastandieno
AF12	15.1	0.188	eupomatenoides 1 y estigmastandieno
AF13	2.8	0.035	Restos de eupomatenoides 1 y estigmastandieno
AF14	5.4	0.062	licarina B
AF15	4.6	0.057	
AF16	5.4	0.062	
AF17	5.4	0.062	
AF18	14.7	0.183	
AF19	2.7	0.033	
AF20	58.5	0.731	
AF21	205.2	2.565	licarina B y eupomatenoides 7 (minoritario)
AF22	54.8	0.685	licarina B
AF23	102.3	1.278	
AF24	36.7	4.587	eupomatenoides 7 y restos de licarina B
AF25	539.8	6.747	
AF26	172.2	2.152	
AF27	1760.9	22.01	licarina A y eupomatenoides 7
AF28	59.1	0.738	
AF29	60.7	0.759	licarina A
AF30	179.4	2.242	
AF31	127	1.59	
AF32	4345.2	54.315	---

Tabla 11: Resultados del fraccionamiento químico secundario de *A. grandiflora* y *A. taliscana*

En la fracción AF25, se detectó la presencia del eupomatenoides 7 (2) (Figura 7), uno de los compuestos de interés, en mayor proporción. Por lo que parte de esta fracción (45 mg) fue sometida a un proceso de purificación por HPLC, empleando las condiciones descritas en la metodología. Mediante este

proceso se obtuvieron 26.7 mg (59.3% de rendimiento) de cristales de color crema con tiempo de retención de 16.7' (*Figura 5*), los cuales presentaron un p.f. de 109-110°C (reportados 105-106 Y 106-107°C, **Enríquez et al., 1984; León, 2005**) y el análisis de espectros de EM-IE y RMN-¹H (*Anexo, Espectro 1 y 2, respectivamente*), nos permitieron corroborar su estructura. En el espectro de RMN-¹H (*Anexo, Espectro 2*), se observan señales para dos metoxilos ubicados en C-3' y C-7 (δ 4.041 y 3.986), señales para protones aromáticos H-4, H-6, H-2', H-5' y H-6' (entre δ 6.825-7.260), protones de doble ligadura del grupo propenilo H-α y H-β (δ 6.51 y 6.23), señales para dos metilos, ubicados en C3 y Cγ (δ 1.92 y 1.55); en el EM-IE se observa el ion molecular en 324 (*Espectro 1*), el cual concuerda con el peso molecular del compuesto (C₂₀H₂₀O₄) y todos estos datos concuerdan con los previamente reportados por **Enríquez et al., 1984 y León, 2005**.

Figura 5: Cromatograma del eupomatenoide 7 a 220 nm en HPLC.



IV.-Purificación del eupomatenoide 7 por cromatografía en columna:

En las fracciones AF24-AF26 (Tabla 11), se observó la presencia del compuesto 2 (eupomatenoide 7, Figura 7), por lo que este grupo de fracciones (948.8 mg) fue sometido a un fraccionamiento secundario (Tabla 12) donde se obtuvieron 94.9 mg de eupomatenoide 7, presente en las fracciones FVIII-FX, después de un proceso de recristalización. Otros compuestos detectados como el estigmastandieno, eupomatenoide 1 y β -sitosterol se describen en la tabla 12.

Tabla 12: Resultados del fraccionamiento químico de las fracciones AF24-AF26.

Reuniones	Clave	Peso (mg)	Rendimiento (%)	Compuestos
1-2	FI	2.2	0.23	
3-8	FII	3.1	0.33	Grasas
9-22	FIII	1.7	0.18	Grasas
23-38	FIV	2.8	0.30	eupomatenoide 1, estigmastandieno y grasas
39-52	FV	2.8	0.3	Restos de eupomatenoide 1 y estigmastandieno
53-58	FVI	2.1	0.22	β-sitosterol
59-61	FVII	13.8	1.45	β-sitosterol
62-63	FVIII	66.9	7.05	restos de β-sitosterol y eupomatenoide 7
64-68	FIX	337.0	35.52	eupomatenoide 7
69-70	FX	191.4	20.17	eupomatenoide 7
71-77	FXI	265.8	28.01	-----

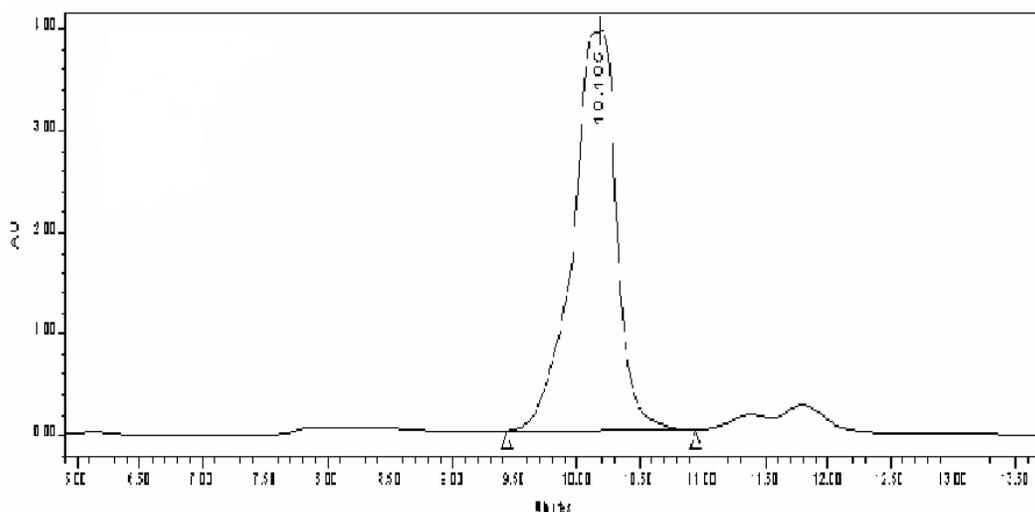
V.- Resultados de la purificación de licarina A:

A partir de la fracción primaria AF27 (1760.9 mg) (Tabla 11) se obtuvo, por partición por par de disolventes, 324.9 mg de licarina A (5) en forma cristales color crema con p.f. 97-99°C [reportado 133-134 °C (**Enríquez et al., 1984**) y 102-104°C (**Achenbach et al., 1987**)]. La determinación de la estructura se realizó por análisis de sus espectros de RMN-¹H (Anexo, Espectro 4)

y EM-IE (*Anexo, Espectro 3*). Cabe mencionar que la fracción fue sometida a análisis por HPLC y presento un pico con TR 10.1', que corresponde a la licarina A, empleando las condiciones analíticas descritas en la metodología (*Figura 6*) que fueron las mismas que se utilizaron en el análisis en HPLC para el eupomatenoide 7.

Figura 6: Cromatograma de la licarina A a 220 nm en HPLC.

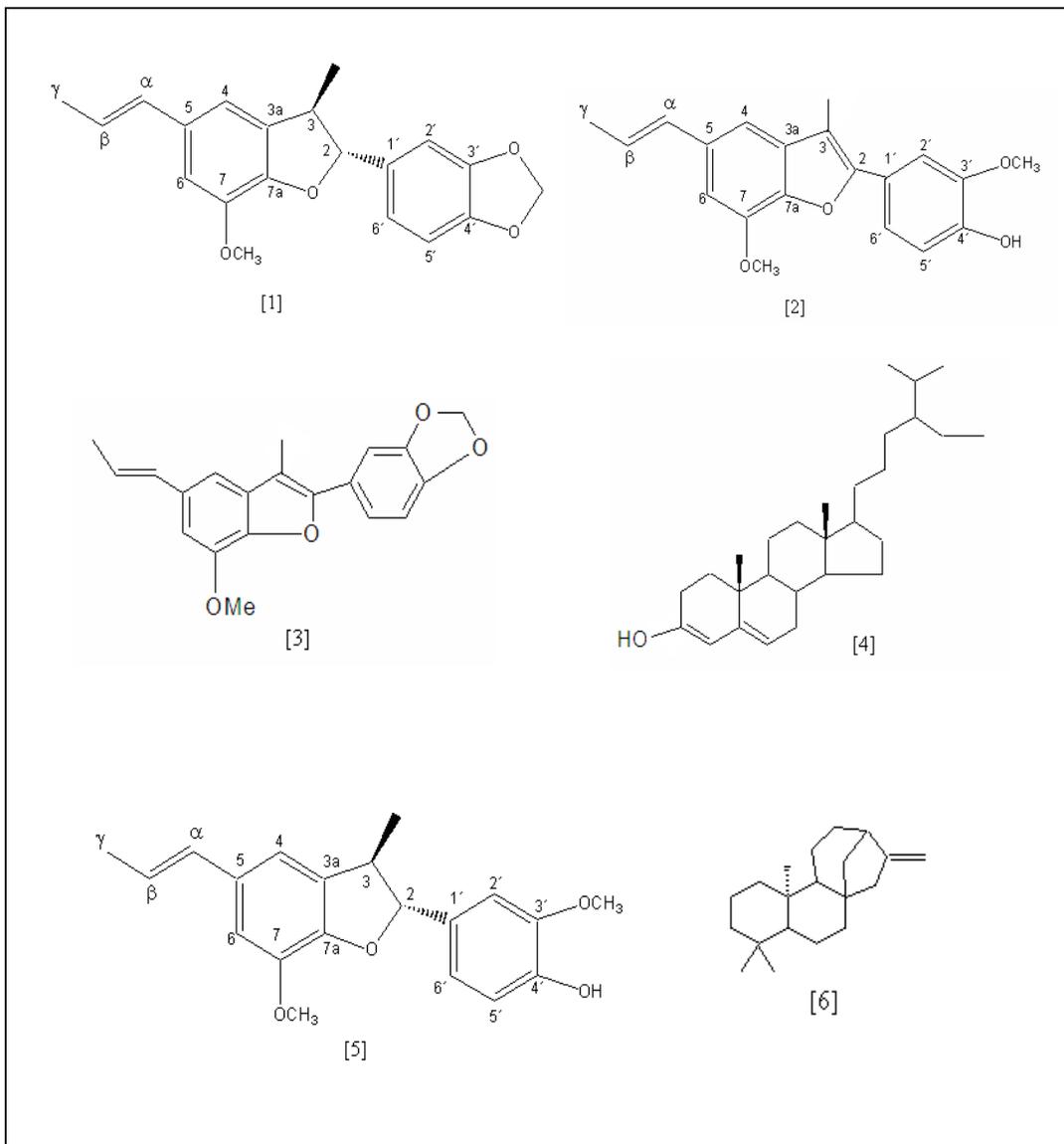
En el espectro de licarina A
 λ 220 nm
 RMN- ¹H (Anexo, Espectro 4) se observan señales para dos



metoxilos ubicados en C-3' y C-7 (δ 3.87 y 3.89), señales para protones aromáticos H-4, H-6, H-2', H-5' y H-6' (entre δ 6.7- 6.90), protones de doble ligadura del grupo propenilo H- α y H- β (δ 6.36 y 6.04), señales para dos metilos, ubicados en C3 y C γ (δ 1.31 y 1.86); en el EM-IE (*Espectro 3*) se observa el ion molecular en 326, el cual concuerda con el peso molecular del compuesto (C₂₀H₂₂O₄), todos estos datos concuerdan con los reportados por **Enríquez et al., 1984 y León, 2005.**

Cabe mencionar que estos compuestos han sido previamente reportados en *A. taliscana* (Enríquez et al., 1984, Abe et al., 2002, León, 2005).

Figura 7: Estructuras químicas de los compuestos.



VI.-Actividad antimicobacteriana de los compuestos aislados:

Los resultados obtenidos por el método MABA mostraron que la licarina A (5) (Figura 7) presentó mayor actividad antimicobacteriana que el eupomatenolide 7, contra todos los microorganismos evaluados, mostrando una CMI entre 3.12 y 6.25 µg/mL para las cepas monoresistentes de *M. tuberculosis* H37Rv y para las micobacterias no tuberculosas y una CMI de 12.5 µg/mL (Tabla 14) contra los cuatro aislados clínicos MFR. Contra la cepa de referencia (*M. tuberculosis* H37Rv), ambos compuestos mostraron actividad moderada (CMI= 25 µg/mL); por lo que es importante resaltar que evaluar los compuestos contra la cepa de referencia en algunas ocasiones no es indicativo de su potencial antimicobacteriano, ya que en este trabajo se encontró que la licarina A resultó más activa contra las micobacterias monoresistentes que contra la cepa de referencia *M. tuberculosis* H37Rv. Es importante mencionar que encontrar compuestos activos contra cepas de micobacterias no tuberculosas es de gran relevancia, debido a que en la actualidad algunos casos son provocados por micobacterias atípicas. El tratamiento de estos casos es difícil ya que no existen regímenes establecidos y no responden a los tratamientos establecidos mediante el programa TAES. Por otro lado, actualmente se requiere de compuestos que sean activos contra *M. tuberculosis* resistente a INH y/o RIF, ya que la aparición de cepas MFR va en aumento, por lo que el tratamiento de estos casos es más prolongado, de costo elevado y con severos efectos secundarios, mismo que está dando origen a la aparición de casos de TB-XFR, para lo cual hoy en día no existe alternativa de tratamiento (Raviglione, 2006; Dye, 2006).

Tabla 13: Actividad antimicobacteriana in vitro de licarina A y eupomatenoide 7 contra cepas de micobacterias no tuberculosas.

Especie	CMI ($\mu\text{g/mL}$)	
	eupomatenoide 7 (2)	licarina A (5)
<i>M. fortuitum</i>	50	6.25
<i>M. non-chromogenicum</i>	25	12.5

Tabla 14: Actividad antimicobacteriana in vitro de licarina A (5) y eupomatenoide 7 (2) contra cepas resistentes y aislados clínicos de *M. tuberculosis*.

Cepa	CMI ($\mu\text{g/mL}$)		
	Patrón de farmacorresistencia	Eupomatenoide 7 (2)	Licarina A (5)
<i>M. tuberculosis</i> H37Rv (ATCC 27294)		25	25
<i>M. tuberculosis</i> H37Rv Monorresistentes			
INH-R (ATCC 35822)	INH	25	3.12
RIF-R (ATCC 33838)	RIF	12.5	6.25
STR-R (ATCC 35820)	STR	25	<3.12
EMB-R (ATCC 35837)	EMB	25	6.25
Aislados clínicos de <i>M. tuberculosis</i>*			
MTY663	STR, INH, RIF, EMB, PZA	50	12.5
MTY675	STR, INH, EMB	50	12.5
MTY673	STR, INH, RIF, EMB, PZA	50	12.5
MTY282	NH STR, INH, EMB, PZA	50	12.5

*El patrón de farmacorresistencia se determinó mediante el método MABA. (Jiménez, A.M.A. et al., datos en proceso de publicación)

Un trabajo previo describe que la licarina A y eupomatenoide 7 inhibieron el crecimiento de *M. tuberculosis* H37Rv, siendo sus CMI= 25 y 6.25 $\mu\text{g/mL}$ al ser evaluados por el método radiorespirométrico Bactec 460 (León, 2005). Estos compuestos fueron obtenidos por fraccionamiento químico biodirigido del extracto hexánico de *A. taliscana* y a ellos se les atribuye un efecto antimicobacteriano observado en el extracto. El eupomatenoide 1 y el estigmastandieno presentaron una CMI >100 $\mu\text{g/mL}$ contra *M. tuberculosis* H37Rv al ser evaluados en el método MABA. Es de importancia mencionar,

que este reporte fue uno de los pocos que exploró el efecto antituberculoso en este tipo de compuestos, debido a que en general se cree que son compuestos citotóxicos por excelencia (*Tsai et al., 1998; Park et al., 2004; Saleem et al., 1995*).

VII.- Toxicidad subaguda de licarina A.

VII.1.- Toxicidad subaguda de los vehículos (tween 20 y aceite de olivo):

VII.1.1- Toxicidad subaguda del tween 20:

Con la finalidad de determinar si el vehículo pudiera ocasionar un posible efecto tóxico y evitar resultados erróneos, al momento de evaluar el compuesto de interés, se procedió a determinar la toxicidad subaguda del vehículo (tween 20) durante 28 días, administrado por vía IG a los animales en experimentación.

En el análisis estadístico se observó que el vehículo administrado por vía IG no alteró el peso de los animales, ya que no se observa diferencia significativa entre los diferentes grupos estudiados (blanco, testigo y tratado con tween 20/agua 17:83) (*Tabla 15 y Gráfica 1*). La variación de peso que se observa en el último punto se debe a que éste se registró después de un ayuno de 12 hr, previo al sacrificio.

Tabla 15: Registro de los pesos de animales con tratamiento subagudo del vehículo (tween 20/agua 17:83).

Peso del animal (g) n= 7							
Grupo	0 día	5° día	10° día	15° día	20° día	25° día	28° día*
Blanco	21.55 ± 0.36	22.13 ± 0.35	22.53 ± 0.34	23.38 ± 0.32	23.38 ± 0.32	24.65 ± 0.46	24.4 ± 0.47
Testigo	21.74 ± 0.18	21.81 ± 0.23	22.19 ± 0.28	22.87 ± 0.34	22.87 ± 0.34	24.1 ± 0.34	24.1 ± 0.32
Vehículo	22.07 ± 0.13	22.47 ± 0.17	22.74 ± 0.21	23.53 ± 0.23	23.53 ± 0.23	24.41 ± 0.28	23.97 ± 0.37

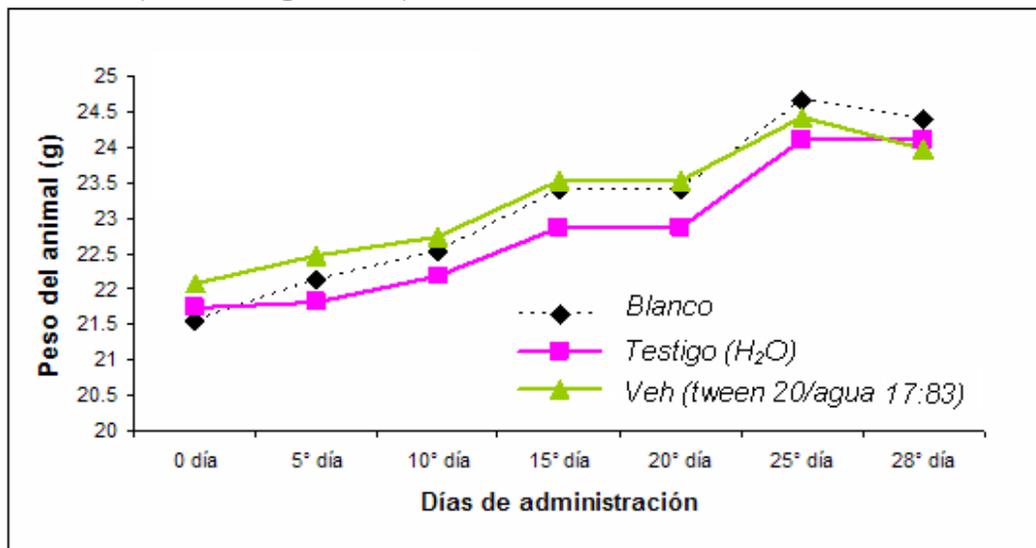
Los valores están expresados como la media ± E.S.M., n=7, P<0.05

El grupo blanco corresponde al grupo que no recibió ningún tratamiento

El grupo testigo fue administrado con agua.

El grupo vehículo corresponde a los animales administrados con tween 20: agua 17:83.

Grafica 1: *Peso de los ratones durante el estudio de toxicidad subaguda del vehículo (tween 20/agua 17:83).*



Al final del tratamiento, los animales fueron sacrificados y se obtuvieron muestras de sangre y órganos para determinaciones de BH y análisis histopatológicos.

El peso de los órganos de los animales tratados con tween 20/agua 17:83 no presento diferencia significativa ($P < 0.05$) con respecto al grupo testigo y blanco (Tabla 16 y Grafica 2).

Tabla 16: *Pesos de los órganos de los animales tratados con vehículo.*

Órgano	Peso de los órganos (g)		
	Blanco	Testigo	Vehículo
Hígado	1.32 ± 0.05	1.43 ± 0.04	1.41 ± 0.06
Pulmón	0.33 ± 0.06	0.41 ± 0.04	0.4 ± 0.04
Riñón	0.19 ± 0.01	0.20 ± 0.00	0.19 ± 0.01
Estómago	0.38 ± 0.05	0.36 ± 0.05	0.26 ± 0.02
Bazo	0.10 ± 0.00	0.13 ± 0.02	0.10 ± 0.00

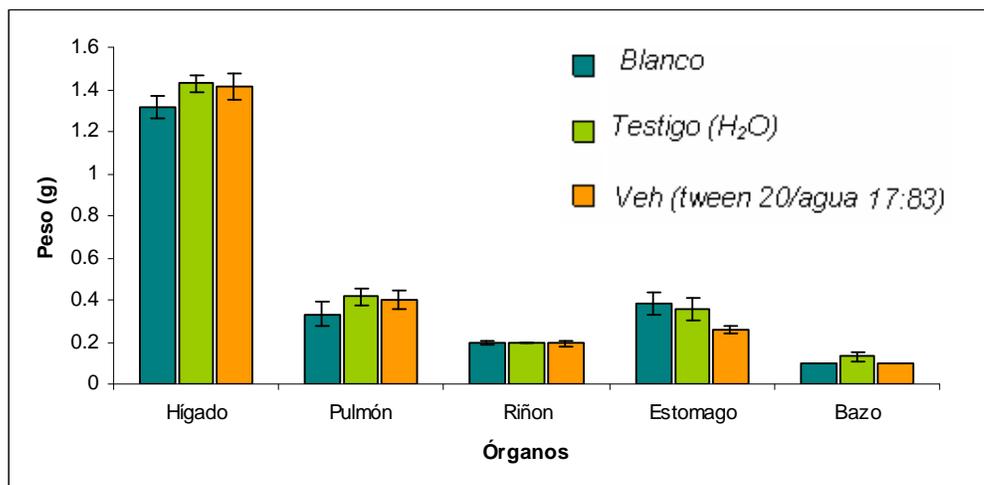
Los valores estan expresados como la media ± E.S.M., n=7, $P < 0.05$

El grupo blanco corresponde al grupo que no recibió ningún tratamiento

El grupo testigo fue administrado con agua.

El grupo vehículo corresponde a los animales administrados con tween 20: agua 17.83.

Gráfica 2: Peso de los órganos obtenidos de los diferentes grupos estudiados en la toxicidad subaguda de tween 20/agua 17:83.



El análisis gráfico y estadístico de los datos de biometría hemática (serie blanca y serie roja) no mostró diferencia entre los diferentes grupos estudiados (blanco, testigo y tratado con vehículo), lo cuál indica que el vehículo (tween 20) no altera ninguno de los valores sanguíneos determinaos (Tabla 17 y Grafica 3).

Tabla 17: Valores de biometría hemática de los animales tratados con vehículo.

Parámetro	Grupo		
	Blanco	Testigo	Vehículo
Eri (x 10 ⁵ /uL)	86.87 ± 1.02	83.97 ± 2.09	85.23 ± 4.14
HB (gr/dL)	14.20 ± 0.22	13.81 ± 0.44	14.06 ± 0.57
Hto (%)	38.77 ± 0.89	39.36 ± 1.62	39.67 ± 1.94
VCM (fL)	44.97 ± 0.44	45.59 ± 0.50	46.53 ± 0.49
CHCM (gr/dL)	36.42 ± 0.37	35.79 ± 0.19	35.50 ± 0.46
Leu (x 10 ² /uL)	38.20 ± 16.40	49.00 ± 3.69	47.00 ± 8.88
Seg (%)	18.17 ± 1.60	13.00 ± 2.01	16.29 ± 3.30
Linf (%)	81.83 ± 1.60	86.57 ± 2.14	81.43 ± 2.25
Pla _q (x10 ⁷ /uL)	76.78 ± 4.67	60.54 ± 4.27	69.19 ± 8.92

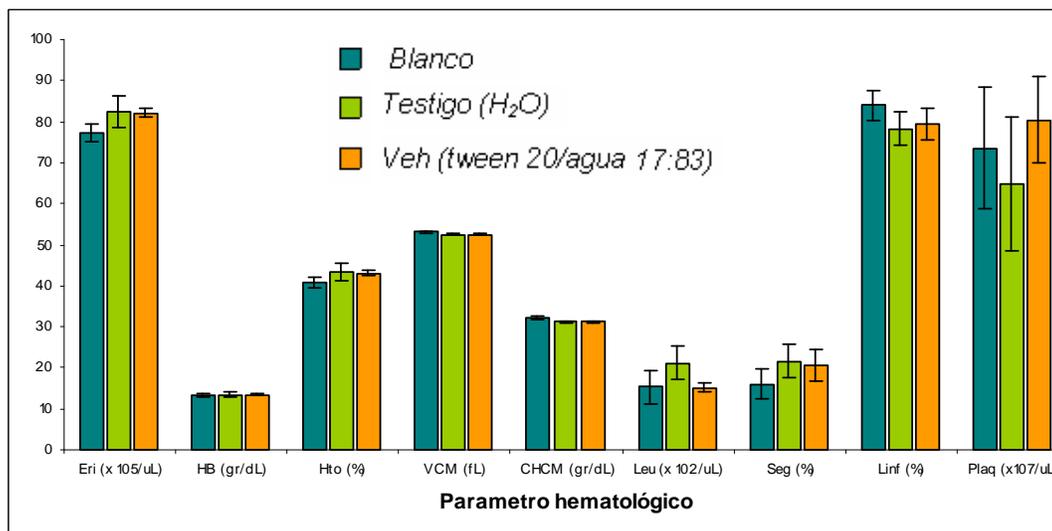
Los valores están expresados como la media ± E.S.M., n=7, P<0.05

El blanco corresponde al grupo que no recibió ningún tratamiento

El testigo fue administrado con agua.

El vehículo corresponde a los animales administrados con tween 20: agua 17.83.

Grafica 3: Valores hematológicos entre los grupos, blanco, testigo y vehículo del estudio de toxicidad subaguda de tween 20/agua 17:83.



Respecto al análisis histopatológico se observó que únicamente el hígado del grupo administrado con el vehículo presentó acumulación de grasa (esteatosis) (Figura 8), esta observación es común cuando hay ingesta elevada de grasas. El bazo y el riñón no presentaron alteraciones significativas respecto al grupo control (Figura 9 y 10).

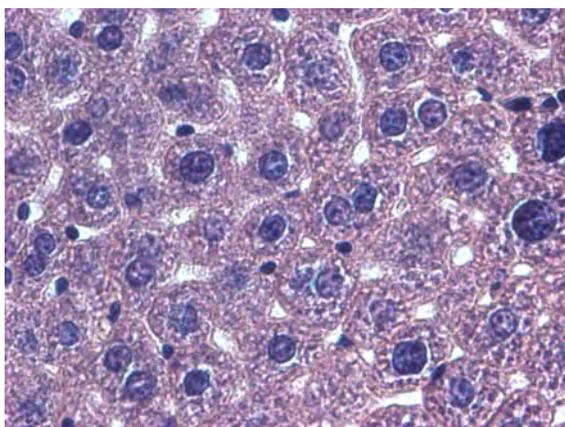


Figura 8: Corte histológico del hígado del grupo tratado con vehículo (tween 20) presentando acumulación de grasa (esteatosis) teñido con hematoxilina-eosina

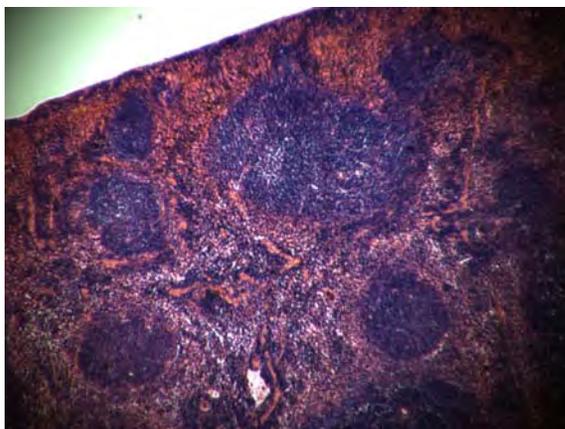


Figura 9: Corte histológico del bazo del grupo tratado con vehículo (tween 20) teñido con hematoxilina-eosina.

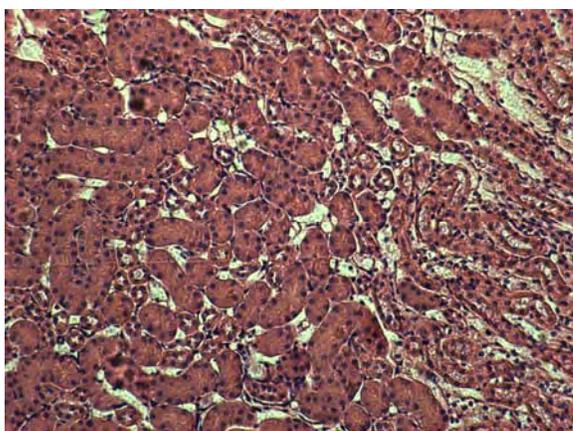


Figura 10: Corte histológico de riñón del grupo tratado con vehículo (tween 20) teñido con hematoxilina-eosina.

VII.1.2 - Toxicidad subaguda del aceite de olivo:

En el análisis estadístico y la representación gráfica (Tabla 18 y Gráfica 4) de los pesos registrados durante el estudio de toxicidad subaguda del vehículo (aceite de olivo), demostró que no se observa diferencia significativa entre los grupos tratados ($P < 0.05$).

Tabla 18: Peso de ratones durante el estudio de toxicidad subaguda del aceite de olivo.

Peso del animal (g) n=5							
Grupo	0 día	5° día	10° día	15° día	20° día	25° día	28° día *
Blanco	20.43 ± 0.15	20.39 ± 0.15	22.98 ± 0.26	23.5 ± 0.42	23.93 ± 0.4	24.28 ± 0.45	22.81 ± 0.56
Testigo	19.78 ± 0.75	20.3 ± 0.95	21.28 ± 0.81	22.02 ± 0.96	22.36 ± 0.77	22.74 ± 0.82	21.64 ± 0.82
Vehículo	20.3 ± 0.28	21.4 ± 0.51	23.22 ± 0.46	24.98 ± 0.4	24.76 ± 0.41	26.12 ± 0.4	24.84 ± 0.52

Los valores están expresados como la media ± E.S.M., n=5, $P < 0.05$

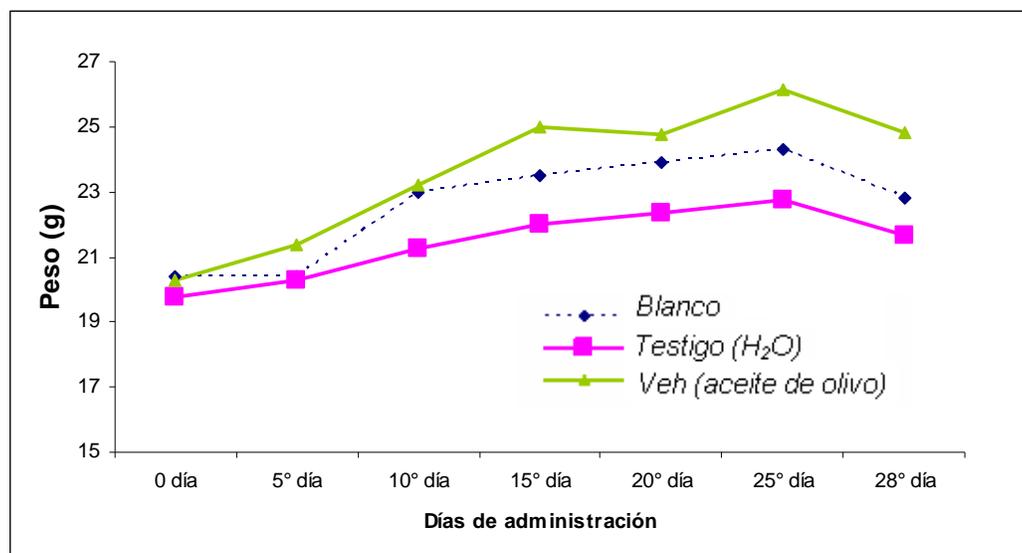
El grupo blanco corresponde al grupo que no recibió ningún tratamiento

El grupo testigo fue administrado con agua.

El grupo vehículo corresponde a los animales administrados con aceite de olivo.

* Al día 28 se observó una disminución en el peso debido a que los animales se dejaron 12 hr en ayuno previo al registro de peso y posterior sacrificio.

Gráfica 4: Peso de los ratones durante el estudio de toxicidad subaguda del aceite de olivo.



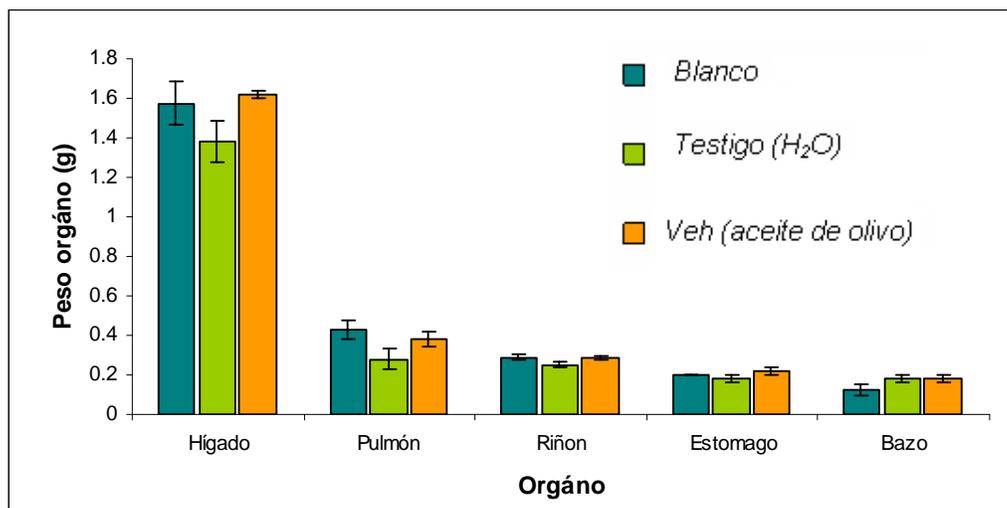
Al finalizar el experimento de toxicidad subaguda del aceite de olivo por vía subcutánea, se procedió a la obtención de órganos y muestras sanguíneas con la finalidad de determinar si el vehículo induce alguna alteración hematológica y/o alteración sobre el peso de los órganos. Al realizar el análisis estadístico y la comparación gráfica de los valores de los pesos de los órganos y los datos sanguíneos, no se encontró ninguna diferencia significativa entre los diferentes grupos estudiados (Tablas 19 y 20; Gráficas 5 y 6).

Tabla 19: Pesos de órganos obtenidos de los ratones en el estudio de toxicidad subaguda del aceite de olivo

Órgano	Peso de los órganos (g)		
	Blanco	Testigo	Vehículo
Hígado	1.58 ± 0.11	1.38 ± 0.10	1.62 ± 0.02
Pulmón	0.43 ± 0.05	0.28 ± 0.05	0.38 ± 0.04
Riñón	0.29 ± 0.01	0.25 ± 0.02	0.29 ± 0.01
Estomago	0.20 ± 0.00	0.18 ± 0.02	0.22 ± 0.02
Bazo	0.13 ± 0.03	0.18 ± 0.02	0.18 ± 0.02

Los valores están expresados como la media ± E.S.M., n=5, P<0.05.

El blanco corresponde al grupo que no recibió ningún tratamiento, el testigo fue administrado con agua y el grupo vehículo corresponde a los animales administrados con aceite de olivo.

Gráfica 5: Peso de los órganos de ratones obtenidos en el estudio de toxicidad subaguda de aceite de olivo.**Tabla 20:** Valores hematológicos del estudio de toxicidad subaguda de aceite de olivo.

Valores de biometría hemática

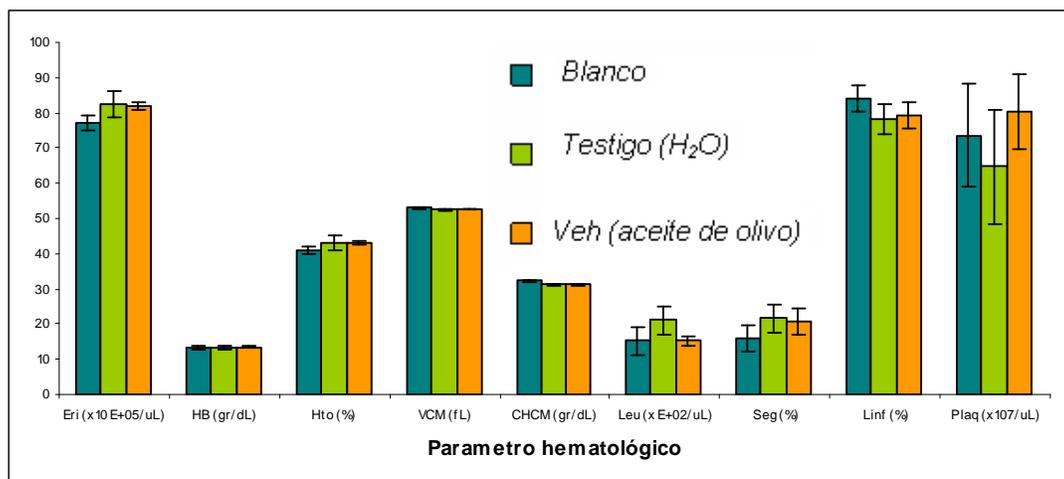
Parámetro	Blanco	Testigo	Vehículo
Eri (x 10 ⁵ /uL)	77.13 ± 2.07	82.46 ± 3.90	82.08 ± 1.14
HB (gr/dL)	13.20 ± 0.44	13.44 ± 0.53	13.42 ± 0.26
Hto (%)	40.90 ± 1.24	43.28 ± 2.13	43.10 ± 0.68
VCM (fL)	53.03 ± 0.23	52.44 ± 0.14	52.54 ± 0.13
CHCM (gr/dL)	32.23 ± 0.37	31.12 ± 0.35	31.14 ± 0.32
Leu (x 10 ² /uL)	15.25 ± 4.01	21.20 ± 3.97	15.20 ± 1.16
Seg (%)	16.00 ± 3.56	21.60 ± 4.12	20.80 ± 3.88
Linf (%)	84.00 ± 3.56	78.20 ± 4.10	79.20 ± 3.88
Plaq (x10 ⁷ /uL)	73.50 ± 14.7	64.68 ± 16.3	80.36 ± 10.40

Los valores están expresados como la media ± E.S.M., n=5, P<0.05.

El grupo blanco corresponde al grupo que no recibió ningún tratamiento

El grupo testigo fue administrado con agua.

El grupo vehículo corresponde a los animales administrados con aceite de olivo extravirgen.

Grafica 6: Valores hematológicos del estudio de toxicidad subaguda de aceite de olivo.

El análisis histopatológico de los órganos de este grupo no se realizó debido a que sufrieron lisis; por lo que este experimento está en proceso de repetición.

VII.2.-Toxicidad subaguda de licarina A.

VII.2.1.-Toxicidad subaguda de licarina A en tween 20:

Una vez determinado el efecto tóxico de los vehículos (tween 20 y aceite de olivo), se procedió a determinar el efecto tóxico de la licarina A solubilizado en tween 20/agua 17:83, en este caso al igual que en los estudios anteriores se registraron los pesos de animales cada semana y al finalizar el tratamiento se procedió a tomar muestras de sangre y peso de órganos. Respecto al peso de los animales se observa que el compuesto administrado no altera en forma significativa este parámetro (Tabla 21 y Gráfica 7).

Tabla 21: Pesos de los ratones durante el estudio de toxicidad subaguda de licarina A en tween 20/agua 17:83.

Grupo	Peso del animal (g)						
	0 día	5° día	10° día	15° día	20° día	25° día	28° día
Blanco	21.27 ± 0.6	23.27 ± 0.52	24.07 ± 0.59	24.52 ± 0.54	24.88 ± 0.47	24.7 ± 0.31	26.15 ± 0.28
Testigo	22.17 ± 0.2	23.35 ± 0.29	23.78 ± 0.43	23.58 ± 0.37	23.6 ± 0.68	23.35 ± 0.79	24.03 ± 0.79
5 mg/kg	20.46 ± 0.74	21.54 ± 1.07	21.48 ± 1.13	22.26 ± 3.83	22.54 ± 1.17	23.24 ± 0.88	24.32 ± 0.97
10 mg/kg	20.48 ± 0.19	22.68 ± 0.37	23.08 ± 0.29	23.82 ± 0.29	24.65 ± 0.22	25.65 ± 0.21	27.27 ± 0.22

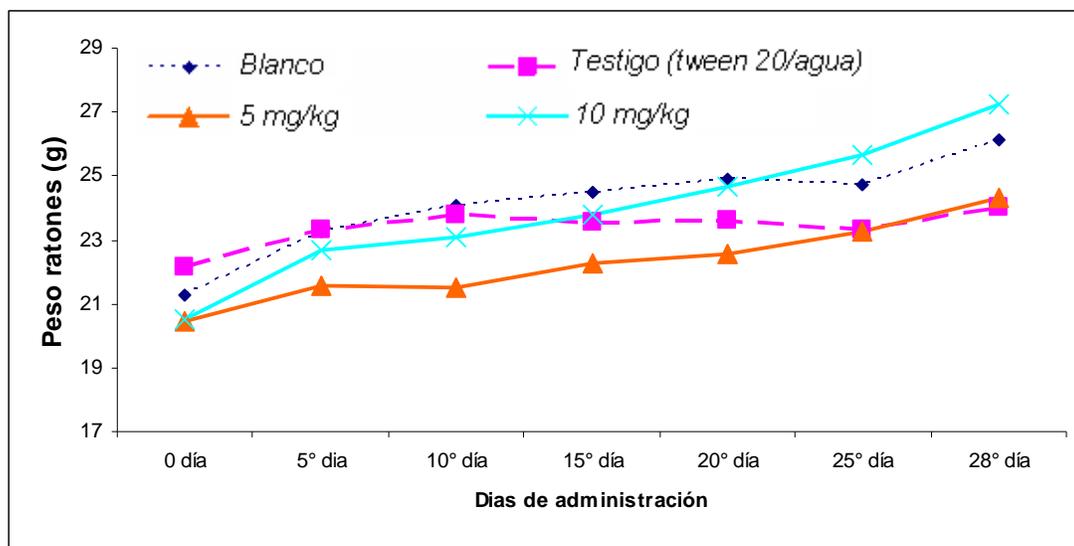
Los valores están expresados como la media ± E.S.M., n=6, P<0.05.

El grupo blanco corresponde al grupo que no recibió ningún tratamiento

El grupo testigo fue administrado con tween 20:agua 17:83 únicamente.

El grupo 5 mg/kg corresponde a la dosis de licarina A (5 veces la CMI).

El grupo 10 mg/kg corresponde a la dosis de licarina A (10 veces la CMI).

Gráfica 7: Peso de los ratones durante el estudio de toxicidad subaguda de licarina A en tween 20/agua 17:83.

Al finalizar el experimento de toxicidad, se registraron los pesos de hígado, riñón, bazo, pulmón y estómago. Los datos obtenidos se describen en la tabla 22 y la gráfica 8, el análisis estadístico demostró que no existe diferencia significativa entre grupos ($P < 0.05$).

Tabla 22: Pesos de los órganos de los ratones en la toxicidad subaguda de licarina A en tween 20/agua 17.83.

Órgano	Peso de los órganos (g)			
	Blanco	Vehículo	5 mg/kg	10 mg/kg
Hígado	1.53 ± 0.12	1.40 ± 0.09	1.44 ± 0.08	1.62 ± 0.02
Pulmón	0.47 ± 0.03	0.38 ± 0.03	0.56 ± 0.07	0.54 ± 0.04
Riñon	0.23 ± 0.01	0.21 ± 0.02	0.21 ± 0.01	0.27 ± 0.01
Estomago	0.22 ± 0.02	0.23 ± 0.02	0.24 ± 0.05	0.26 ± 0.02
Bazo	0.15 ± 0.02	0.12 ± 0.02	0.14 ± 0.02	0.20 ± 0.03

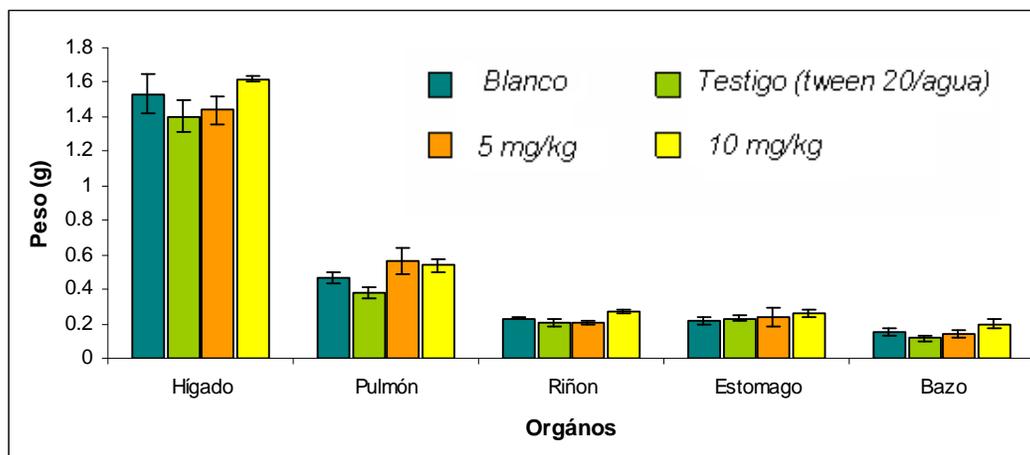
Los valores estan expresados como la media ± E.S.M., n=6, P<0.05

El grupo blanco corresponde al grupo que no recibió ningún tratamiento

El grupo testigo fue administrado con tween 20:agua 17:3 únicamente.

El grupo 5 mg/kg corresponde a la dosis de licarina A (5 veces la CMI).

El grupo 10 mg/kg corresponde a la dosis de licarina A(10 veces la CMI).

Gráfica 8: Pesos de los órganos de los diferentes grupos estudiados en la toxicidad subaguda de licarina A en tween 20/agua.

En lo que respecta al análisis de los datos hematológicos, se encontró que no existe diferencia significativa entre los grupos ($P < 0.05$), (Tabla 23). Es importante mencionar, que al utilizar tween 20 como vehículo se observa que la licarina A no se disuelve completamente a temperatura ambiente y requiere de calentamiento y sonicación, por lo que el vehículo no es recomendable, debido a los problemas de disolución, por lo que se decidió emplear aceite de olivo como alternativa.

Tabla 23: Valores hematológicos de muestras tomadas en ratón en el estudio de toxicidad subaguda de licarina A en tween 20/agua 17:83.

Parámetro	Valores de biometría hemática			
	Blanco	Testigo	5 mg/kg	10 mg/kg
Eri (x 10 ⁵ /uL)	85.22 ± 4.31	84.43 ± 3.33	85.78 ± 2.31	87.97 ± 1.18
HB (gr/dL)	16.22 ± 0.56	14.60 ± 0.53	15.20 ± 0.27	15.57 ± 0.24
Hto (%)	39.63 ± 2.88	40.48 ± 0.81	40.16 ± 1.11	40.92 ± 0.59
VCM (fL)	46.28 ± 0.89	45.95 ± 0.52	46.82 ± 0.47	46.52 ± 0.11
CHCM (gr/dL)	41.40 ± 1.40	37.72 ± 0.50	37.88 ± 0.56	38.02 ± 1.85
Leu (x 10 ² /uL)	46.18 ± 1.34	40.50 ± 1.04	56.20 ± 13.3	66.17 ± 17.1
Seg (%)	12.17 ± 1.25	18.83 ± 1.94	19.80 ± 5.31	18.67 ± 2.45
Linf (%)	87.33 ± 1.41	80.83 ± 1.82	79.60 ± 5.64	81.00 ± 2.35
Pla _q (x10 ⁷ /uL)	85.22 ± 2.88	81.05 ± 4.53	100.1 ± 2.26	91.22 ± 4.97

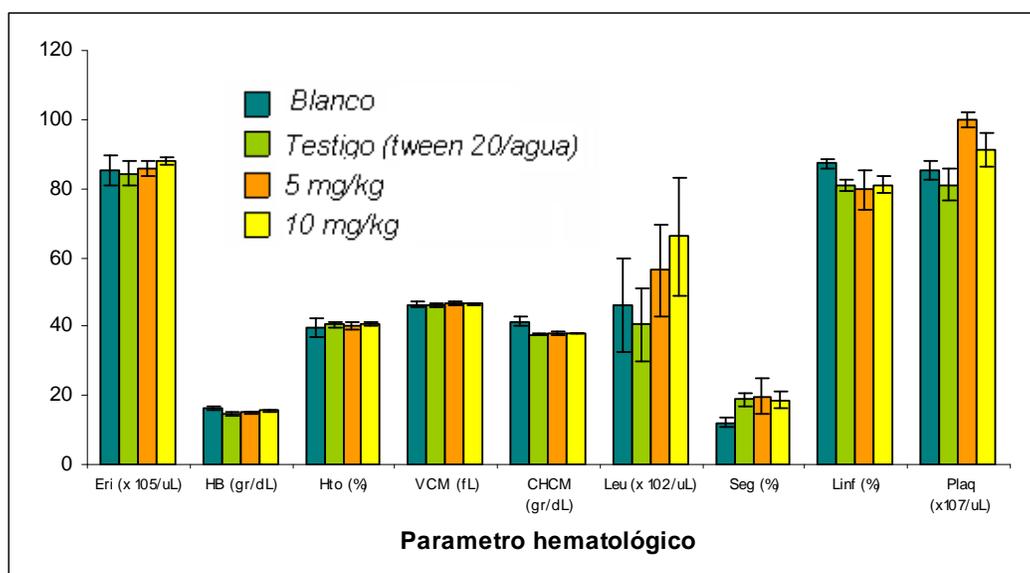
Los valores están expresados como la media ± E.S.M., n=6, P<0.05

El grupo blanco corresponde al grupo que no recibió ningún tratamiento

El grupo testigo fue administrado con tween 20:agua 17.83 únicamente.

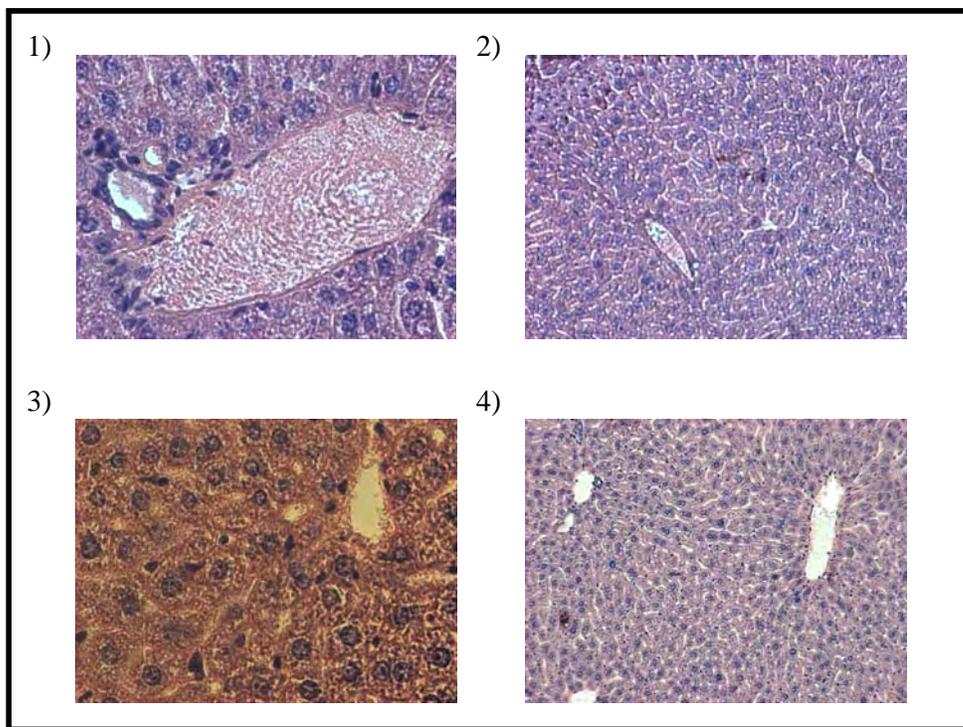
El grupo 5 mg/kg corresponde a la dosis de licarina A (5 veces la CMI).

El grupo 10 mg/kg corresponde a la dosis de licarina A(10 veces la CMI).

Gráfica 9: Comparación de valores hematológicos en la toxicidad subaguda de licarina A en tween 20/agua.

En el análisis histopatológico del hígado, bazo y riñón (Figuras, 11,12 y 13) de los animales tratados con licarina A/tween 20 se observó que el corte del hígado de los animales tratados presenta similitud respecto al tejido del grupo control de vehículo (presentan esteatosis), estos es debido al tween 20 y no a la sustancia evaluada (Figura 11).

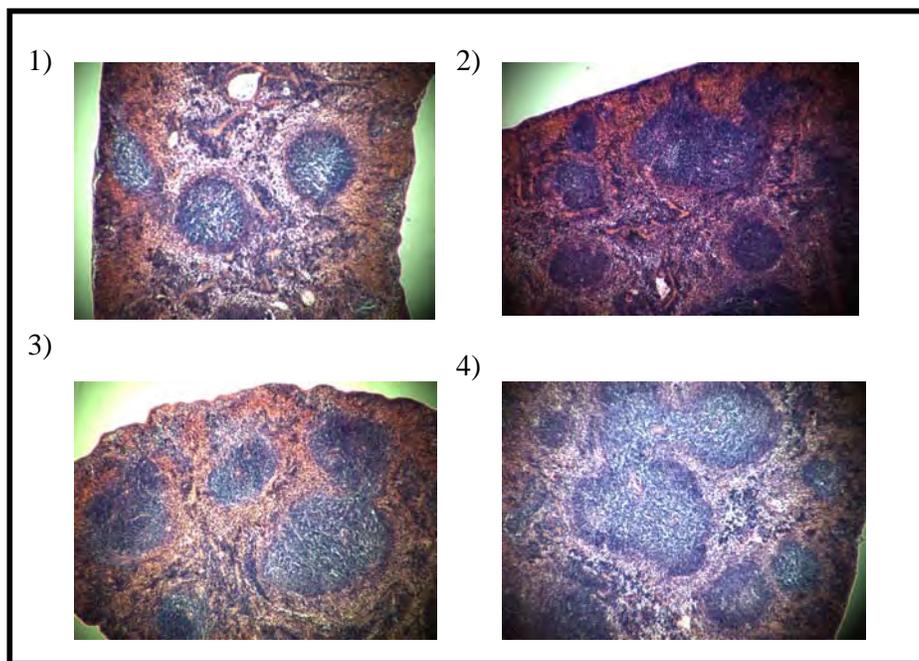
Figura 11: Corte histológico de hígado de animales en toxicidad subaguda con licarina A empleando como vehículo tween 20/agua 17:83.



1) grupo blanco (sin tratamiento), 2) grupo testigo (vehículo: tween 20/H₂O 17:83), 3) grupo tratado con licarina A (dosis de 5 mg/kg), 4) grupo tratado con licarina A (dosis de 10 mg/kg).

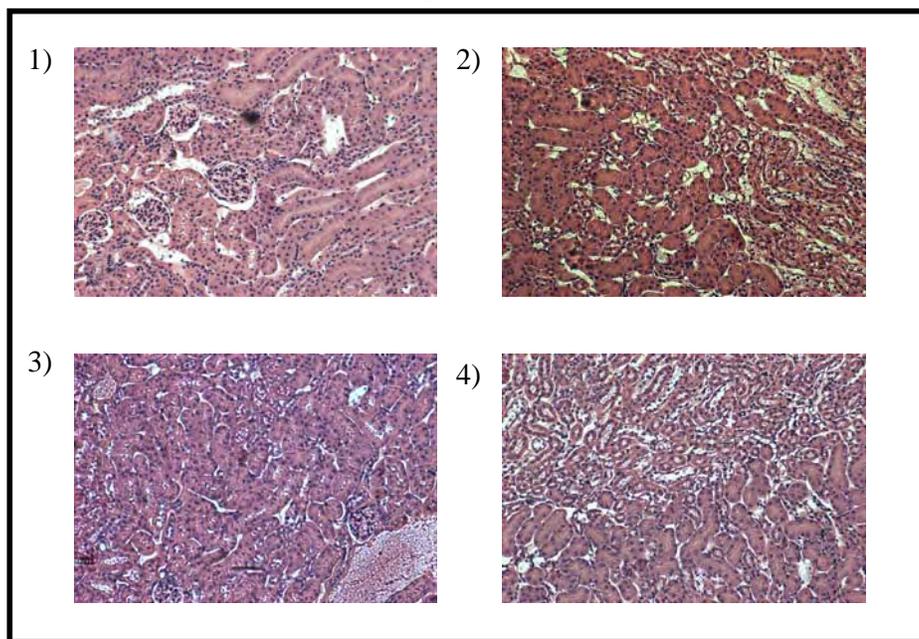
Respecto al riñón y bazo, estos no presentaron alteraciones al ser comparadas con los cortes de bazo y riñón de los grupos control de vehículo y blanco. (Figuras 12 y 13).

Figura 12: Corte histológico de bazo de animales en toxicidad subaguda con licarina A empleando como vehículo tween 20/agua 17.83.



1) grupo blanco (sin tratamiento), 2) grupo control (vehículo: tween 20: H₂O 17:83), 3) grupo tratado con licarina A (dosis de 5 mg/kg), 4) grupo tratado con licarina A (dosis de 10 mg/kg).

Figura 13: Corte histológico de riñón de animales en toxicidad subaguda con licarina A empleando como vehículo tween 20/agua 17.83.



1) grupo blanco (sin tratamiento), 2) grupo control (vehículo: tween 20: H₂O 17:83), 3) grupo tratado con licarina A (dosis de 5 mg/kg), 4) grupo tratado con licarina A (dosis de 10 mg/kg).

VII.2.2.-Toxicidad subaguda de licarina A en aceite de olivo:

Con la finalidad de determinar el posible efecto tóxico de la licarina A, se procedió a realizar el estudio de toxicidad subaguda empleando como vehículo aceite de olivo extravirgen (Sigma).

Durante el estudio de toxicidad se registro el peso de los ratones cada semana, con la finalidad de detectar si la administración del compuesto provocaba alguna variación entre los pesos de ratones de los diferentes grupos estudiados. Sin embargo, al realizar el análisis gráfico y estadístico no se encontró diferencia significativa entre los grupos evaluados (Tabla 24 y Gráfica 10)

Tabla 24: Pesos de ratones durante el estudio de toxicidad subaguda de licarina A en aceite de olivo:

Grupo	Peso del animal (g)						
	0 día	5° día	10° día	15° día	20° día	25° día	28° día
Blanco	20.56 ± 0.38	22.38 ± 0.12	21.08 ± 0.19	23.76 ± 0.15	24.38 ± 0.23	25.88 ± 0.25	26.88 ± 0.29
Testigo	20.62 ± 0.35	22.76 ± 0.57	22.24 ± 0.61	24.96 ± 0.66	26.05 ± 0.66	28.58 ± 0.55	30.15 ± 0.6
5 mg/kg	20.82 ± 0.25	21.82 ± 0.71	23.38 ± 0.7	23.74 ± 0.59	25.1 ± 0.39	27.68 ± 0.43	29.03 ± 0.55
10 mg/kg	20.82 ± 0.23	22.08 ± 0.44	23.26 ± 0.51	23.72 ± 0.41	24.85 ± 0.63	27.78 ± 0.81	29.48 ± 0.84

Los valores están expresados como la media ± E.S.M., n=5, P<0.05

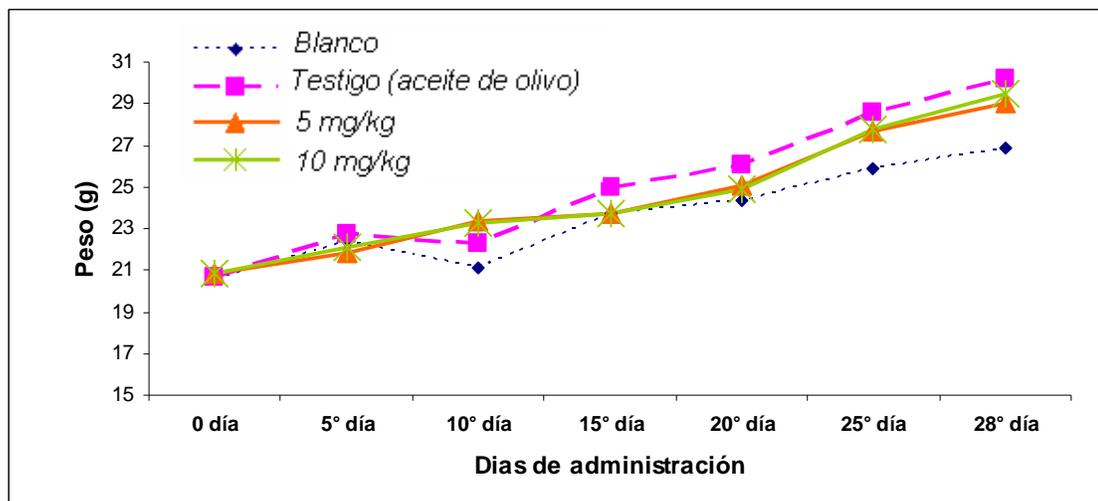
El grupo blanco corresponde al grupo que no recibió ningún tratamiento

El grupo testigo fue administrado con aceite de olivo.

El grupo 5 mg/kg corresponde a la dosis de licarina A (5 veces la CMI).

El grupo 10 mg/kg corresponde a la dosis de licarina A(10 veces la CMI)

Gráfica 10: Peso de los ratones durante el estudio de toxicidad subaguda de licarina A en aceite de olivo.



Una vez concluidos los 28 días de administración por vía subcutánea de la licarina A empleando como vehículo aceite de olivo, se registraron los pesos de los órganos de cada animal (Tabla 25 y Gráfica 11) y se tomaron muestras sanguíneas para determinar los valores hematológicos (Tabla 26 y Gráfica 12). El análisis de los datos de la BH, indicaron que no hubo diferencia significativa entre los grupos evaluados.

Tabla 25: Pesos de los órganos en el estudio de toxicidad subaguda de licarina A en aceite de olivo.

Órgano	Peso de los órganos (g)			
	Blanco	Vehículo	5 mg/kg	10 mg/kg
Hígado	2.45 ± 0.06	2.28 ± 0.06	2.05 ± 0.19	2.1 ± 0.15
Pulmón	0.60 ± 0.04	0.55 ± 0.03	0.5 ± 0.04	0.53 ± 0.08
Riñón	0.38 ± 0.01	0.3 ± 0.02	0.29 ± 0.01	0.28 ± 0.01
Estomago	0.35 ± 0.03	0.23 ± 0.03	0.23 ± 0.03	0.23 ± 0.05
Bazo	0.23 ± 0.03	0.20 ± 0.04	0.15 ± 0.03	0.2 ± 0.00

Los valores están expresados como la media ± E.S.M., n=5, P<0.05

El grupo blanco corresponde al grupo que no recibió ningún tratamiento

El grupo testigo fue administrado con aceite de olivo.

El grupo 5 mg/kg corresponde a la dosis de licarina A (5 veces la CMI).

El grupo 10 mg/kg corresponde a la dosis de licarina A(10 veces la CMI)

Gráfica 11: Pesos de los órganos en el estudio de toxicidad subaguda de licarina A en aceite de olivo.

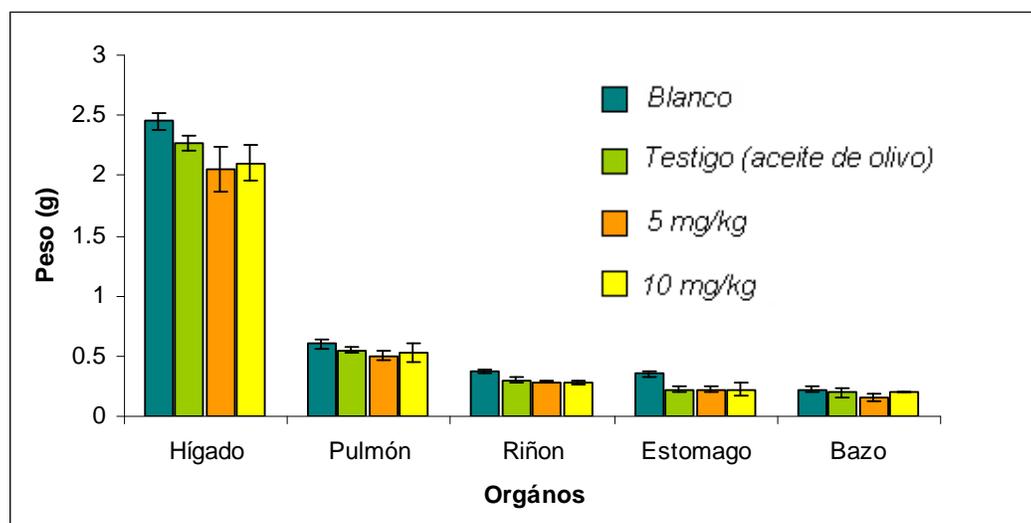


Tabla 26: Datos hematológicos del estudio de toxicidad subaguda de licarina A en aceite de olivo.

Parámetros	Valores de biometría hemática			
	Blanco	Veh	5mg/kg	10 mg/kg
Eri (x 10 ⁵ /uL)	91.13 ± 1.66	88.33 ± 4.73	78.1 ± 6.93	90.20 ± 4.60
HB (gr/dL)	14.20 ± 0.27	13.30 ± 0.52	13.43 ± 0.89	14.30 ± 0.70
Hto (%)	41.85 ± 0.76	41.18 ± 2.31	40.2 ± 3.14	43.93 ± 2.68
VCM (fL)	45.95 ± 0.32	46.63 ± 0.23	51.83 ± 2.53	48.60 ± 0.64
CHCM (gr/dL)	33.95 ± 0.51	32.38 ± 0.84	33.53 ± 0.60	32.60 ± 0.46
Leu (x 10 ² /uL)	99.00 ± 11.2	75.75 ± 3.50	70.25 ± 20.1	75.75 ± 24.5
Seg (%)	11.50 ± 2.10	14.75 ± 1.65	16.75 ± 4.11	12.00 ± 1.16
Linf (%)	88.50 ± 2.10	84.50 ± 1.32	83.25 ± 4.11	8800 ± 1.16
Plaq (x10 ⁷ /uL)	33.35 ± 0.75	28.50 ± 4.55	50.78 ± 12.5	46.33 ± 5.43

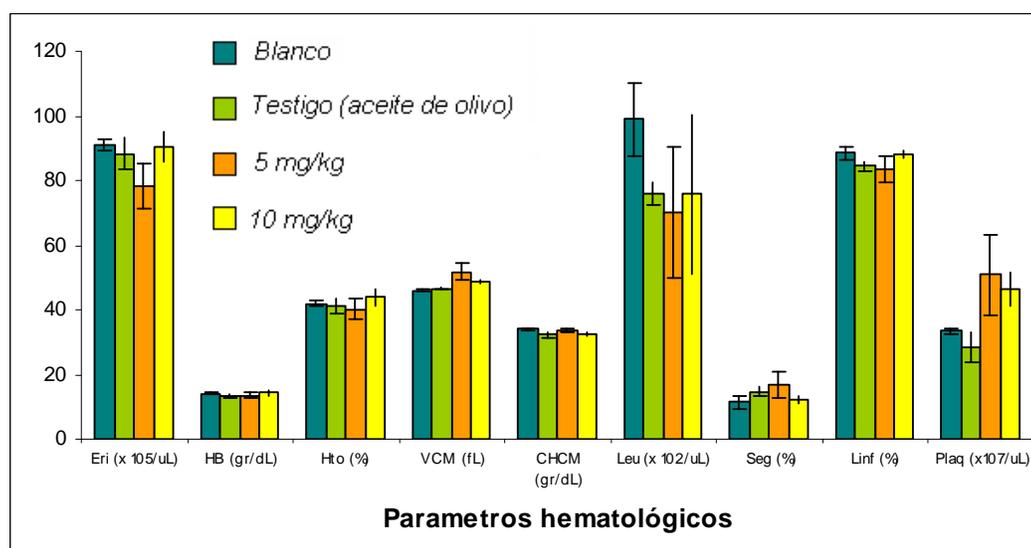
Los valores están expresados como la media ± E.S.M., n=5, P<0.05

El grupo blanco corresponde al grupo que no recibió ningún tratamiento

El grupo testigo fue administrado con aceite de olivo.

El grupo 5 mg/kg corresponde a la dosis de licarina A (5 veces la CMI).

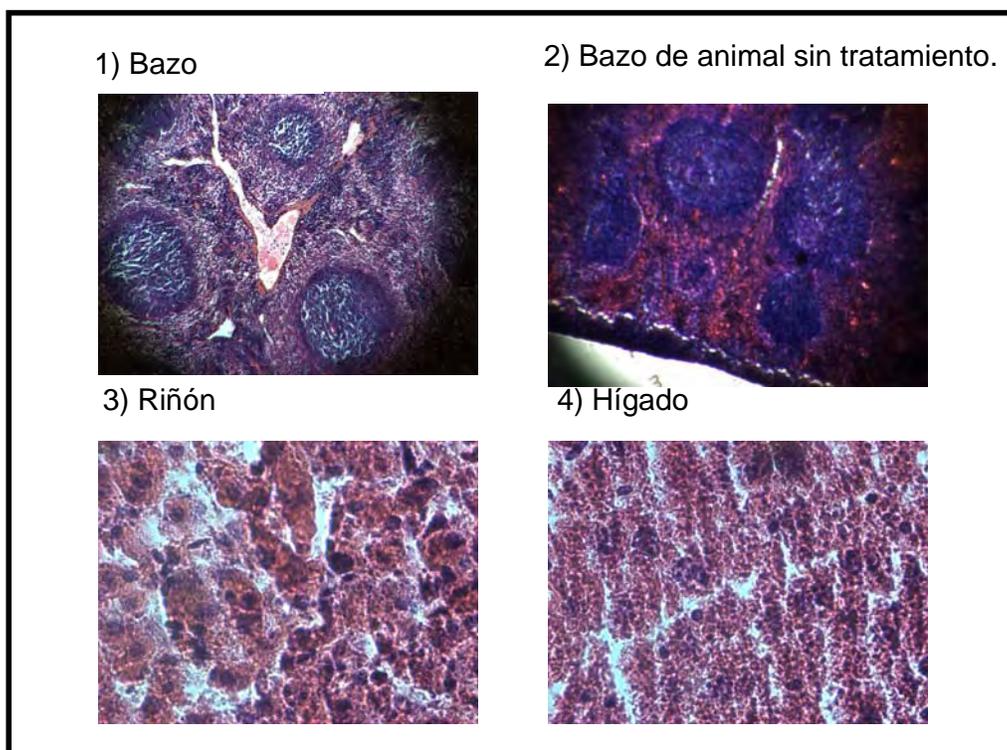
El grupo 10 mg/kg corresponde a la dosis de licarina A(10 veces la CMI

Gráfica 12: Representación de los valores hematológicos del estudio de toxicidad subaguda de licarina A en aceite de olivo.

Respecto a la histopatología de este estudio, cabe mencionar que los órganos de los animales de este experimento se lisaron por lo que no fue posible realizar el análisis histopatológico de los mismos. A manera de ejemplo se muestran los cortes de hígado, riñón y bazo de los animales tratados con

licarina A/aceite de olivo, a una dosis de 10 mg/kg (Figura 14). En donde se observa que el hígado y el riñón están lisados. Sin embargo, el bazo no mostró lisis y se observa que no presenta alteraciones significativas al compararlo con un corte de bazo de animal sin tratamiento. Cabe mencionar que actualmente esta en curso la repetición de este experimento para obtener los órganos adecuadamente y poder realizar la histopatología de los mismos.

Figura 14: Cortes histológicos de órganos de animales en toxicidad subaguda con licarina A (dosis de 10 mg/kg) empleando como vehículo aceite de olivo.



❖ CONCLUSIONES

- Las especies *A. taliscana* y *A. grandiflora* constituyen una fuente importante de compuestos con actividad antimicobacteriana.
- Mediante fraccionamiento químico en cromatografía en columna de fase normal de fracciones primarias y secundarias de *A. taliscana* y *A. grandiflora* se logró la obtención de 324.9 mg de licarina A y 121.6 mg de eupomatenoides 7.
- El análisis de los espectros de RMN-¹H y EM-IE permitió la identificación química de los compuestos.
- Se establecieron las condiciones analíticas de HPLC para la identificación y análisis de licarina A y eupomatenoides 7.
- La evaluación antimicobacteriana *in vitro* demostró que la licarina A tiene menor CMI que el eupomatenoides 7 al ser evaluado contra las cepas monoresistentes y aislados clínicos MFR de *M. tuberculosis* y también contra micobacterias no tuberculosas (*M. fortuitum* y *M. non-chromogenicum*).

- Con la evaluación de la toxicidad subaguda de la licarina A usando como vehículo tween 20/agua 17:83 y aceite de olivo extravirgen se determinó que este compuesto no induce alteración significativa en los parámetros de biometría hemática. Sin embargo el uso de tween 20 como vehículo para la licarina A no es recomendable debido a los problemas de disolución que presenta.

Perpectivas:

- Dado el efecto antimicobacteriano *in vitro* de la licarina A y el escaso efecto toxico *in vivo* observado para el compuesto se puede considerar como candidato para estudios antituberculosos *in vivo*.
- Realizar estudios de toxicidad subcrónica, mutagenicidad y genotoxicidad de la licarina A.
- Proponer la síntesis orgánica de la molécula

❖ REFERENCIAS

- Abate, G.**, Miörner, H. *Susceptibility of multidrug-resistant strains of Mycobacterium tuberculosis to amoxicillin in combination with clavulanic acid and ethambutol.* **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** **1998**; 42: 738-740.
- Abe, F.**, Nagafuji, S., Yamauchi, T., Okabe, H., Maki, J., Higo, H., Akahane, H., Aguilar, A., Jiménez-Estrada, M., Reyes-Chilpa, R. *Trypanocidal Constituents in Plants 1. Evaluation of some Mexican Plants for their Trypanocidal Activity and Active Constituents in Guaco, Roots of Aristolochia taliscana.* **Biological & Pharmaceutical Bulletin** **2002**; 25: 1188-1191.
- Aguilar, A.**, Camacho, J.R., Chino, S., Jacquez, P., López, E.M. *Herbario Medicinal del Instituto Mexicano del Seguro Social.* **IMSS** **1994**; pp: 20.
- Achenbach, H.**, Grob, J., Dominguez, X.A., Cano, G., Star, J.V., Brussolo, L. del C., Muñoz, G., Salgado, F., López, L. *Lignans, neolignans and norneolignans from Krameria cystisoides.* **Phytochemistry** **1987**; 26: 1159-1166.
- Akihisa, T.**, Franzblau, S.G., Ukiya, M., Okuda, H., Zhang, F., Yasukawa, K., Suzuki, T., Kimura, Y. *Antitubercular Activity of Triterpenoids from Asteraceae Flowers.* **Biological & Pharmaceutical Bulletin** **2005a**; 28:158-160.
- Akihisa, T.**, Franzblau, S.G., Tokuda, H., Tagata, M., Ukiya, M., Matsuzawa, T., Metori, K., Kimura, Y., Suzuki, T., Yasukawa, K. *Antitubercular Activity and Inhibitory Effect on Epstein-Barr Virus Activation of Sterols and Polyisoprenepolyols from an Edible Mushroom, Hypsizigus marmoreus..* **Biological & Pharmaceutical Bulletin** **2005b**; 28:1117-1119.
- Álvarez, P.V.H.** *Estudio químico de Chamaedora tepejilote Liebm ex Mart con actividad antituberculosa.* Tesis Licenciatura Biología. **Facultad de Estudios Superiores. UNAM** **2002**.
- Balandrin, F.M.**, Kinghorn, D.A., Farnsworth, R.N. *Plant-derived Natural Products, in drug discovery and development.* Capitulo 1. **American Chemical Society** **1993**; 1-11
- Balunas, M.J.**, Kinghorn, A.D. *Drug discovery from medicinal plants.* **Life Sciences** **2005**; 78: 431-441.

- Baltussen, R.,** Floyd, K., Dye, C. *Cost effectiveness analysis of strategies for tuberculosis control in developing countries.* **British Medical Journal** **2005**; 331:1364.
- 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.* **Journal of Ethnopharmacology** **2005**; 96: 195-200
- Blower, S.,** Supervie, V. *Predicting the future of XDR tuberculosis.* **The Lancet** **2007**; 7: 443.
- Cano, C.G.,** Marroquín, J. *Angiospermae (Magnoliophyta).* Cano, C.G., Marroquín, J. *Taxonomia de plantas superiores.* **Editorial Trillas** **1994**; 172-174.
- Cantrell, C.L.,** Franzblau, S.G., Fisher, N.H. *Antimycobacterial plant terpenoids.* **Planta Médica** **2001**; 67: 685-694.
- Case, R.J.,** Franzblau, S.G., Wang, Y., Cho, S.H., Soejarto, D.D., Pauli, G.F. *Ethnopharmacological evaluation of the informant consensus model on anti-tuberculosis claims among the Manus.* **Journal of Ethnopharmacology** **2006**; 106: 82-89.
- Castillo, C.R.,** *Farmacorresistencia secundaria en tuberculosis. Tendencia en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias.* **Revisión del Instituto Nacional de Enfermedades respiratorias de México** **2001**; 14: 151-159.
- Chen, J.J.,** Chou, E.T., Peng, C.F., Chen, I.S., Yang, S.Z., Huang, H.Y. *Novel Epoxyfuranoid Lignans and Antitubercular Constituents from the Leaves of Beilschmiedia tsangii.* **Planta Médica** **2007**; 73: 557-571.
- Coker, R.J.** *Multidrug-resistant tuberculosis: public health challenges.* **Tropical Medicine and International Health** **2004**; 9: 25-40.
- Coll, P.** *Fármacos con actividad frente a Mycobacterium tuberculosis.* **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica** **2003**; 21: 299-308.
- Collins, L.,** Franzblau, S.G. *Microplate alamar blue assay versus BACTEC 460 system for high-throughput screening of compounds against Mycobacterium tuberculosis y Mycobacterium avium.* **Antimicrobial agents and chemotherapy** **1997**; 41: 1004-1009.
- Design, R.K.** *Estrategias de la OMS sobre medicina tradicional 2002-2005.* **WHO** **2002.**

- Dye, C.** *Global epidemiology of tuberculosis.* **Lancet** **2006**; 367: 934-940.
- Elzinga, G.,** Raviglione, M.C., Maher, D. *Scale up: meeting targets in global tuberculosis control.* **Lancet** **2004**; 363: 814-819.
- Enriquez, R.G.,** Chavez, M.A., Reynolds, W.F. *Phytochemical investigation of plants of the genus Aristolochia, 1-. Isolation and NMR spectral characterization of eupomatenoic derivatives.* **Journal of natural products** **1984**; 47: 896-899.
- Fabricant, D.S.,** Farnsworth, N.R. *The value of Plants Used in Traditional Medicine for Drug Discovery.* **Environmental Health Perspectives** **2001**; 109: 69-75.
- Gautam, R.,** Saklani, A., Jachak, S.M. *Indian medicinal plants as a source of antimycobacterial agents.* **Journal of Ethnopharmacology** **2007**; 110: 200-234.
- Gadhi, C.A.,** Weber, M., Mory, F., Benharref, A., Lion, C., Jana, M., *Lozniewski, A., Antimicrobial activity of Aristolochia paucinervis Pomel.* **Journal of Ethnopharmacology** **1999**; 67: 87-92.
- Graham, J.G.,** Pendland, S.L., Prause, J.L., Danzinger, L.H., Vigo, J.S., Cabieses, F., Farnsworth, N.R. *Antimycobacterial evaluation of Peruvian plants.* **Phytomedicine** **2003**; 10: 528-538.
- Gutierrez-Lugo, .M.T.,** Wang, Y., Franzblau, S.G., Suarez, E., Timmermann, B.N. *Antitubercular Sterols from Thalia multiflora Horkel ex Koernicke.* **Phytotherapy Research** **2005**; 19: 876-880.
- Iseman, M.D.,** Huitt, G.A. *Treatment of multidrug-resistant tuberculosis.* Ed. Por Bastian, I. y Portaels, F. en: *Multidrug-Resistant tuberculosis.* **Kluwer Academia Publishers.** Netherlands, **2000**; 1180-1185.
- Jagtap, S.D.,** Deokule, S.S., Bhosle, S.V. *Some unique ethnomedicinal uses of plants by the Korku tribe of Amravati District of Maharashtra, India.* **Journal of Ethnopharmacology** **2006**; 107: 463-469.
- Jimenez, A.A.,** Meckes, M., Ramirez, R., Torres, J., Luna, H.J. *Activity Against Multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis in Mexican Plants Used to Treat Respiratory Diseases.* **Phytotherapy Research** **2003**; 17: 903-908.
- Jiménez A.A.,** Meckes, M., Alvarez, V., Torres, J., Parra, R. *Secondary Metabolites from Chamaedora tepejilote (Palmae) are Active against Mycobacterium tuberculosis.* **Phytotherapy Research** **2005**; 19: 320-322.

- Jiménez, A.A.**, Meckes M., Luna-Herrera, J., Torres, J. *Antimycobacterial triterpenoids from Lantana hispida (Verbenaceae)*. **Journal of Ethnopharmacology** **2007**; 111: 202-205.
- Jiménez-Ferrer, J.E.**, Pérez-Térán, Y.Y., Román.Ramos, R., Tortoriello, J. *Antitoxin activity of plants used in Mexican traditional medicine against scorpion poisoning*. **Phytomedicine** **2005**; 12: 1116-1122.
- Kanokmedhakul, S.**, Kanokmedhakul, K., Kanarsa, T., Buayairaksa, M. *New Bioactive Clerodane Diterpenoids from the Bark of Casearia grewiifolia*. **Journal of Natural Products** **2005**; 68:183-188.
- León, D.R.** *Potencial antimicobacteriano de las especies medicinales del género Aristolochia*. Tesis Maestría en Ciencias Biológicas (Biología experimental). **Facultad de Ciencias. UNAM 2005**.
- Lin, Y.M.**, Zhou, Y., Flavir, M.T., Zhou, L.M., Nie, W., Chen, F.C. *Chalcones and Flavonoids as Anti-Tuberculosis Agents*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry** **2002**; 10: 2975-2802.
- Maartens, G.**, Wilkinson, R.J. *Tuberculosis*. **Lancet** **2007**; 370: 2030-2040.
- Machado, M.B.**, Lopes, L.M.X. *Chalcone-flavone tetramer and biflavones from Aristolochia ridicula*. **Phytochemistry** **2005**; 66: 669-674.
- Martínez, E.R.A.** *Estudio químico y actividad antimicobacteriano in vitro de la especie medicinal Thymus vulgaris*. Tesis Licenciatura (Química Farmacéutica Biológica). **Facultad de Química. UNAM 2006**.
- Martínez, M.** *Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas*. **Fondo de Cultura económico 1979**, México.
- Mata, R.**, Morales, I., Pérez, O., Rivero, C.I., Acevedo, L., Enriquez, M.I., Bye, R., Franzblau, S., Timmermann, B. *Antimycobacterial Compounds from Piper sanctum*. **Journal of Natural Products** **2004**; 67: 1961-1968.
- Molina-Salinas, G.M.**, Ramos, G.M.C., Vargas, V.J., Mata, C.B.D., Becerril, M.P., Said, F.S. *Bactericidal Activity of Organic Extracts from Flourensia cernua DC against Strains of Mycobacterium tuberculosis*. **Archives of Medicinal Research** **2006**; 37: 45-49.
- Nelson, R.** *WHO's tuberculosis control strategy said to be insufficient*. **Lancet** **2004**; 4: 653.
- Newman, D.J.**, Cragg, G.M. *Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years*. **Journal of Natural Products** **2007**; 70: 461-477.
- Newton, S.M.**, Lau, C., Wrigth, C.W. *A review of antimycobacterial natural products*. **Phytotherapy Research** **2000**; 14: 303-322.

- O'Brien, R.J., Spigelman, M. *New drugs for tuberculosis: current status and future prospects*. **Clinics in chest medicine** **2005**; 26: 327-340.
- O'Donnell, G., Bucar, F., Gibbons, S. *Phytochemistry and antimycobacterial activity of Chlorophytum inornatum*. **Phytochemistry** **2006**; 67: 178-182.
- Ortega-Ortiz, J.F., Ortega-Ortiz, R.V. *Aristolochiaceae. Flora de Veracruz. Instituto de Ecología* **1997**. A.C. Fascículo 99.
- Otero, R., Nuñez, V., Barona, J., Fonnegra, R., Jiménez, S.L., Osorio, R.G., Saldarriaga, M., Díaz, A. *Snakebites and ethnobotany in the northwest region of Colombia. Part III: Neutralization of the haemorrhagic effect of Bothrops atrox venom*. **Journal of Ethnopharmacology** **2000**; 73: 133-141.
- Park, B., Min, B., Kwon, O., Oh, S., Ahn, K., Kim, T. *Increase of caspase-3 activity by lignans from Machilus thunbergii in HL-60 cells*. **Biological & Pharmaceutical Bulletin** **2004**; 27: 1305-1307.
- Pauli, G.F., Case, R.J., Inui T., Wang Y., Cho, S., Fischer, N.H., Franzblau, S.G. *New perspectives on natural products in TB drug research*. **Life sciences** **2005**; 78: 485-494.
- Phillipson, J.D. *Phytochemistry and medicinal plants*. **Phytochemistry** **2001**; 56: 237-243.
- Quer, F. *Aristolochiaceas*. Ed. por Quer F. en *Plantas Medicinales (El Dioscórides Renovado)*. **Editorial Labor** **1962**; 193-194.
- Rámirez, M.R. *Rastreo de la actividad antimicobacteriana de los extractos de las plantas medicinales de México*. Tesis Maestría en Ciencias Biológicas (Biología experimental). **Facultad de Ciencias, UNAM** **2006**.
- Raviglione, M.C. *XDR-TB: entering the post-antibiotic era?*. **The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease** **2006**; 10: 1185-1187.
- Raviglione, M.C. *The new Stop TB Strategy and Global Plan to Stop TB, 2006-2015*. **Bulletin of the World Health Organization** **2007**; 85: 327.
- Raviglione, M.C., Smith I.M. *XDR Tuberculosis-Implications for Global Public Health*. **Medical Society** **2007**; 356: 656-659.
- Resch, S.C., Salomon, J.A., Murray, M., Weinstein, M.C. *Cost-Effectiveness of Treating Multidrug-Resistant Tuberculosis*. **PloS Medicine** **2006**; 3: e241.
- Ruxin, J., Paluzzi, J.E., Wilson, P.A., Tozan Y., Kruk, M., Teklehaimanot, A., *Emerging consensus in HIV/AIDS, malaria, tuberculosis, and access to essential medicines*. **Lancet** **2005**; 365: 618-621.

- Said-Fernandez, S.**, Becerril-Montes, P., Molina-Salinas, G.M., Barrios-Garcia, H., Vargas.Villareal, J. *Tuberculosis causada por cepas de Mycobacterium tuberculosis drogorresistentes.* **Enfermedades Emergentes 2005**; 7: 13-19.
- Saleem M**, Kim H, Ali M, Lee Y. *An update on bioactive plant lignans.* **Natural Product Reports 1995**; 22: 696-716.
- Sato, N.**, Takahashi, D., Chen, S.M., Tsuchiya, R., Mukoyama, T., Yamagata, S.I., Ogawa, M., Yoshida, M., Kondo, S., Satoh, N., Ueda, S. *Acute nephrotoxicity of aristolochic acids in mice.* **Journal of Pharmacy and Pharmacology 2004**; 56: 221-229.
- Saunders, B.M.**, Britton, W.J. *Life and death in the granuloma: immunopathology of tuberculosis.* **Immunology and cell biology 2007**; 85: 103-111.
- Shi, L.S.**, Kuo, P.C., Tsai, Y.L., Damu A.G., Wu, T.S. *The alkaloids and other constituents from the root and stem of Aristolochia elegans.* **Bioorganic & Medicinal Chemistry 2004**; 12: 439-446.
- Shirwaikar, A.**, Soashekar, A.P., Udupa, A.L., Udupa, S.L., Somashekar, S. *Wound healing studies of Aristolochia bracteolata Lam. Whit supportive action of antioxidant enzymes.* **Phytomedicine 2003**; 10: 558-562.
- Stavri, M.**, Gibbons, S. *The Antimycobacterial Constituents of Dill (Anethum graveolens).* **Phytotherapy Research 2005**; 19: 938-941.
- Tsai, I.**, Hsieh, C., Duh, C. *Additional cytotoxic neolignans from Persea obovatifolia.* **Phytochemistry 1998**; 48: 1371-1375.
- Tuntiwachwuttikul, P.**, Phansa, P., Pootaeng-on, Y., Taylor, W.C. *Chemical Constituents of the Roots of Piper sarmentosum.* **Chemical & Pharmaceutical Bulletin 2006**; 54: 149-151.
- Vila, R.**, Mundina, M., Muschiatti, L., Priestap, H.P., Bandoni, A.L., Adzet, T., Cañigueral, S. *Volatile constituents of leaves, roots and stems from Aristolochia elegans.* **Phytochemistry 1997**; 46: 1127-1129.
- Vik, A.**, James, A., Gundersen, L.L. *Screening of Terpenes and Derivatives for Antimycobacterial Activity; Identification of Geraniogeraniol and Geranylgeranyl Acetate as Potent Inhibitors of Mycobacterium tuberculosis in vitro.* **Planta Medica 2007**; 73: 1410-1412.
- Wächter, G.A.**, Franzblau, S.G., Montenegro, G., Suárez, E., Fortunato, R.H., Saavedra, E., Timmermann, B.N. *A New Antitubercular Mulinane Diterpenoid from Azorella madreporica Clos.* **Journal of Natural Products 1998**; 61: 965-968.

- Willför, S.M.**, Smeds, A.I., Holmbom, B.R. *Chromatographic analysis of lignans*. **Journal of Chromatography** **2006**; 1112: 64-77.
- Wu, T.S.**, Tsai, Y.L., Wu, P.L., Lin, F.W., Lin, J.K. *Constituents from the Leaves of *Aristolochia elegans**. **Journal of Natural Products** **2000**; 63: 692-693.
- Wu, T.S.**, Tsai, Y.L., Damu, A.G., Kuo, P.C., Wu, P.L. *Constituents from the Root and Stem of *Aristolochia elegans**. **Journal of Natural Products** **2002**; 65: 1522-1525.
- Wu, T.S.**, Chan, Y.Y., Leu, Y.L., Chan, Z.T. *Sesquiterpene Esters of Aristolochic Acid from the root and stem of *Aristolochia heterophylla**. **Journal of Natural Products** **1999**; 62: 415-418.
- Wube, A.A.**, Bucar, F., Gibbons, S., Asres, K. *Sesquiterpenes from *Warburgia ugandensis* and their antimycobacterial activity*. **Phytochemistry** **2005**; 66: 2309-2315.
- WHO**. *Stopping tuberculosis proves hard to do*. **Lancet** **2007a**; 369: 965.
- WHO**. *Did we reach the 2005 targets for tuberculosis control?*. **Bulletin of the World Health Organization** **2007b**; 85.
- Yu, J.Q.**, Liao, Z.X., Cai, X.Q., Lei, J.C., Zou, G.L. *Composition, antimicrobial activity and cytotoxicity of essential oils from *Aristolochia mollissima**. **Environmental Toxicology and Pharmacology** **2007**; 23: 162-167.

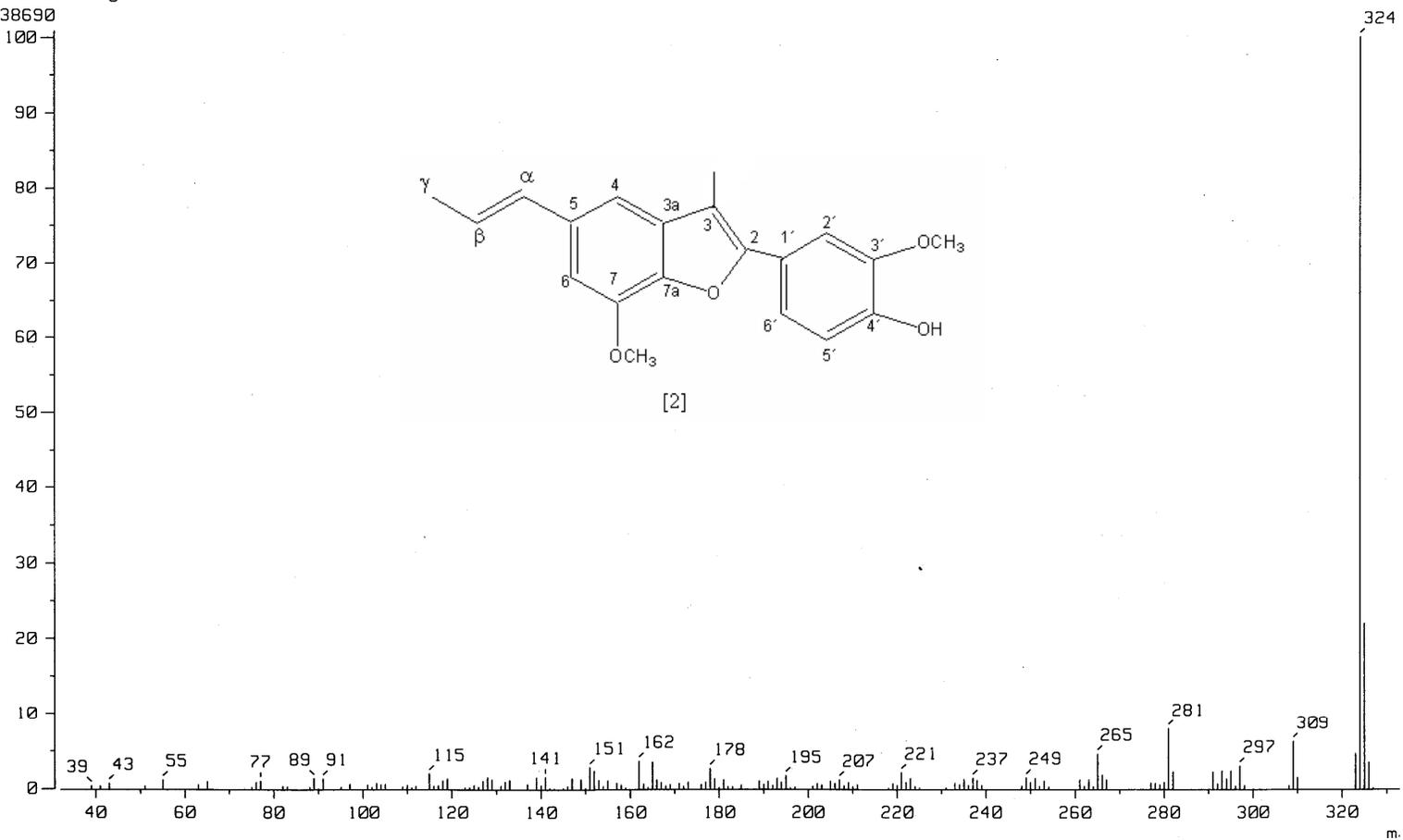
❖ ANEXO



chrom type : Normal Ion LRF-Linear
: 0.67 min Scan# : (9,23)
: m/z 324.0000 Int. : 277.85
put m/z range : 32.0475 to 337.0920
938690

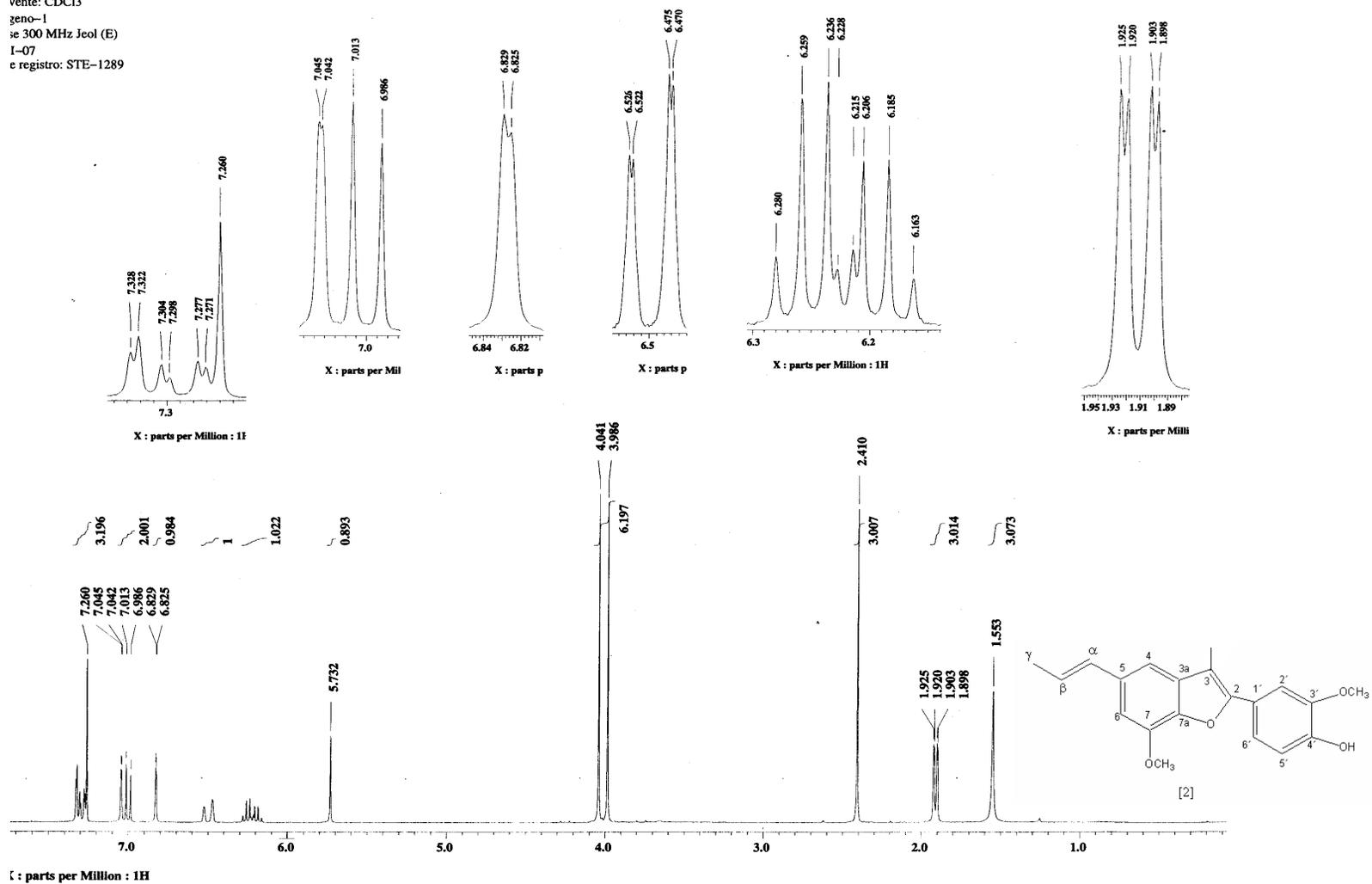
Temp : 247.4 deg.C

Cut Level : 0.00 %



Espectro 1: Espectro de Masas por Impacto Electrónico del eupomatenoide 7.

ec./ Dra A. Jimenez
 : AF25-B
 vnto: CDC13
 geno-1
 se 300 MHz Jeol (E)
 I-07
 e registro: STE-1289



Espectro 2: Resonancia Magnética Nuclear de ¹H del eupomatenoide 7.

RT : 0.36 min Scan# : (8,11)
BP : m/z 326.0000 Int. : 816.82
Output m/z range : 10.6825 to 344.2136

Temp : 244.7 deg.C

Cut Level : 0.00 %

8614459

100

90

80

70

60

50

40

30

20

10

0

20

40

60

80

100

120

140

160

180

200

220

240

260

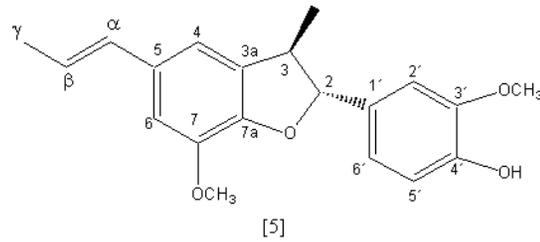
280

300

320

34

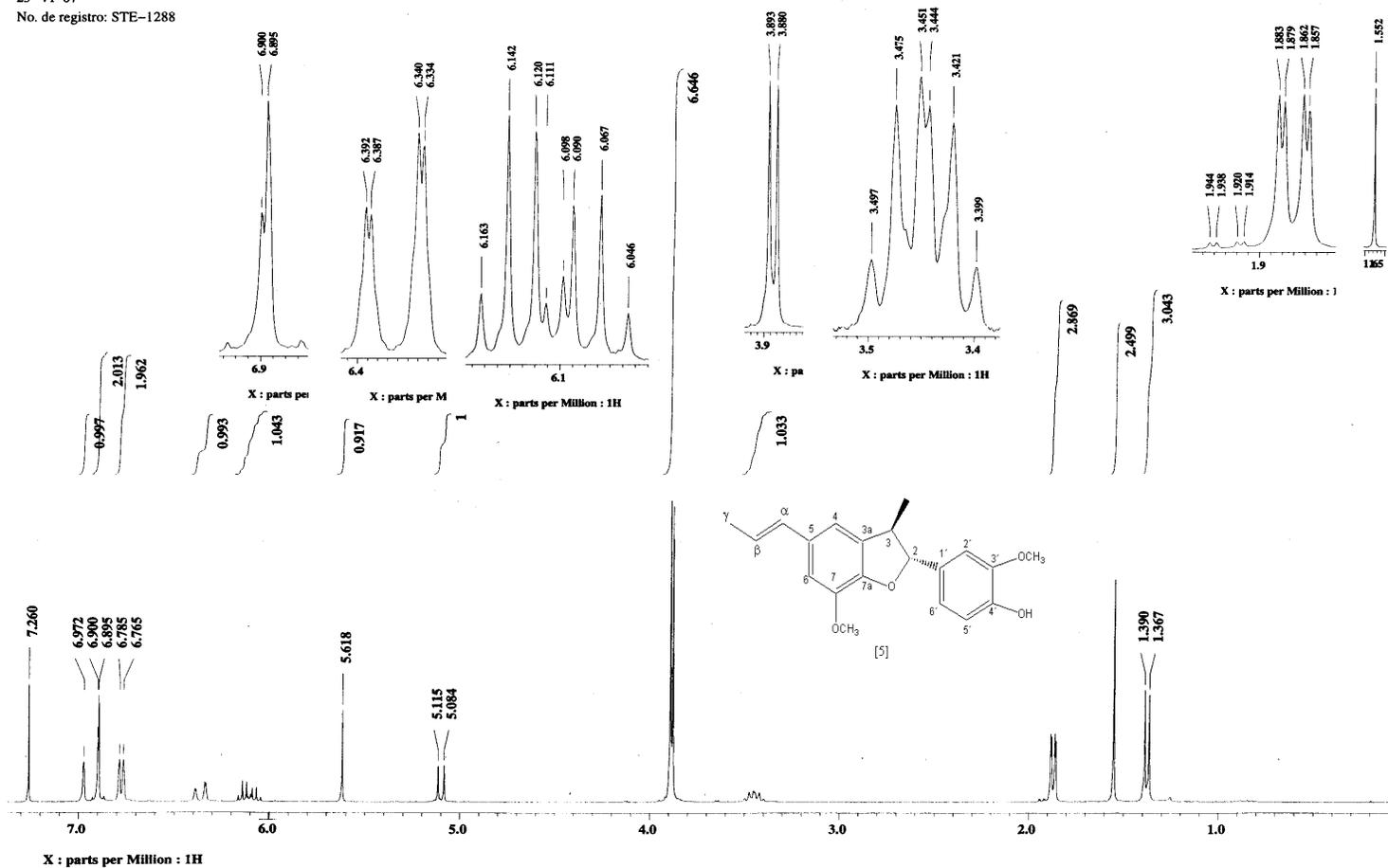
m/z



326

Espectro 3: Espectro de Masas por Impacto Electrónico de la licarina A.

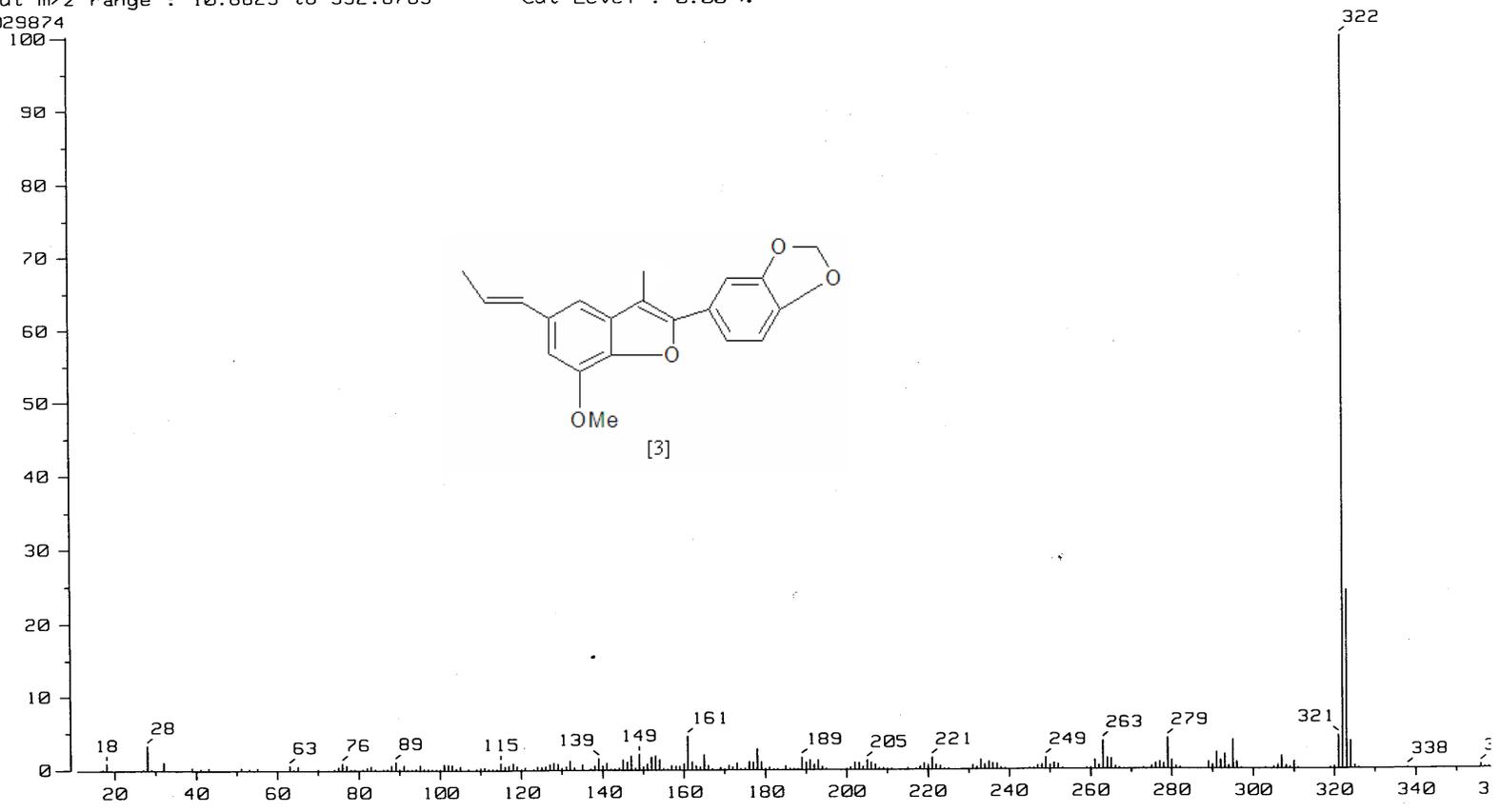
Clave: AF27-C
 Disolvente: CDCl₃
 Hidrogeno-1
 Eclipse 300 MHz Jeol(E)
 25-VI-07
 No. de registro: STE-1288



Espectro 4: Resonancia Magnética Nuclear de ¹H de la licarina A.

m/z 322.0000 Int. : 573.40
tput m/z range : 10.6825 to 392.8783
6029874

Cut Level : 0.00 %



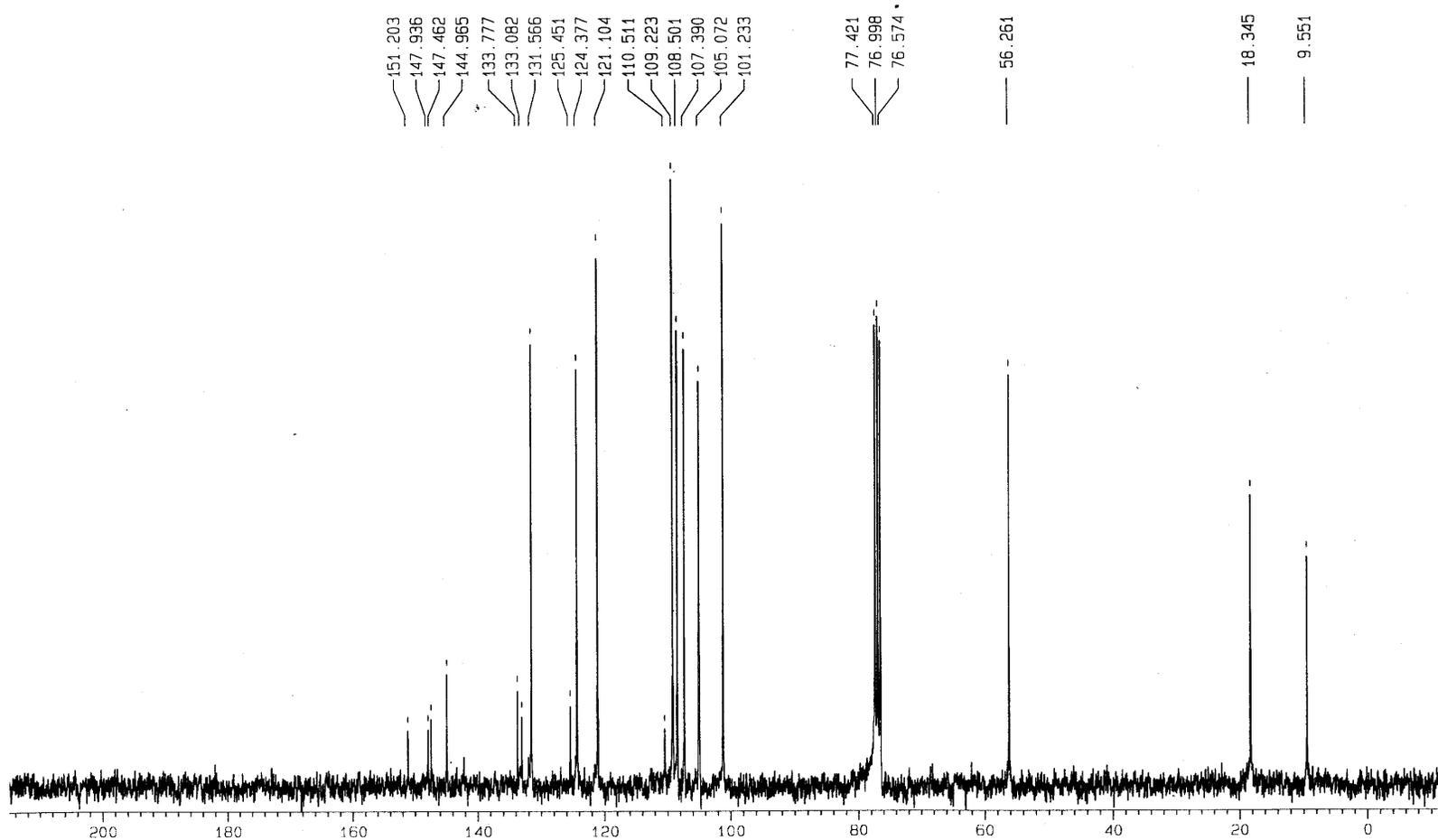
Espectro 5: Espectro de masas por impacto electrónico del eupomatenoide 1.

No. Registro: SIE-1159
27-11-07

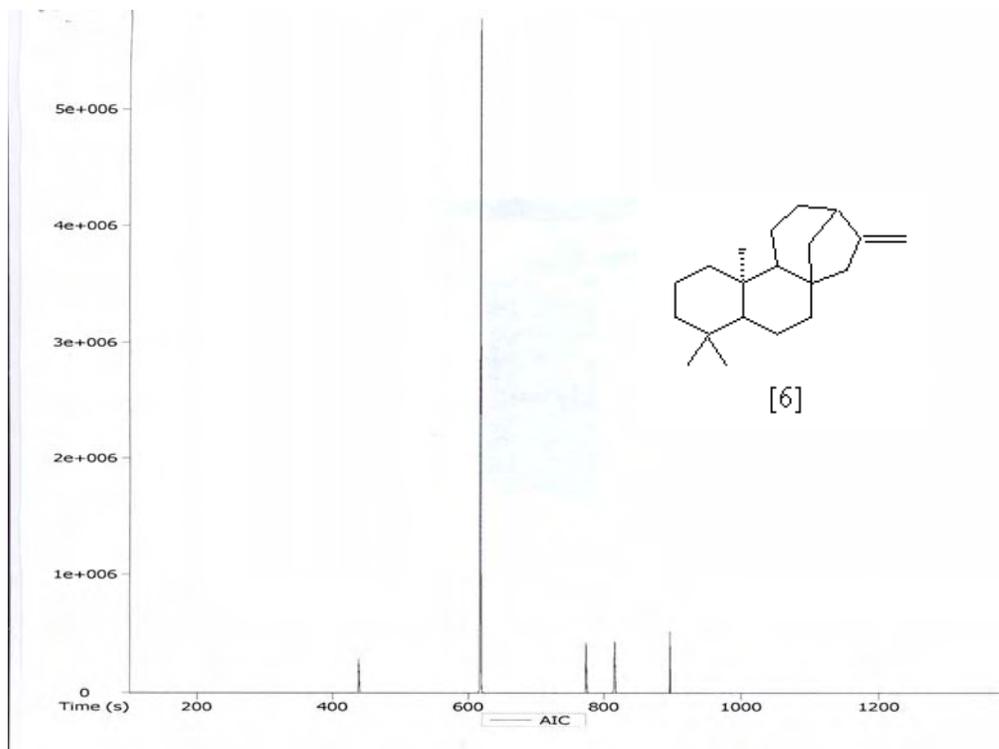
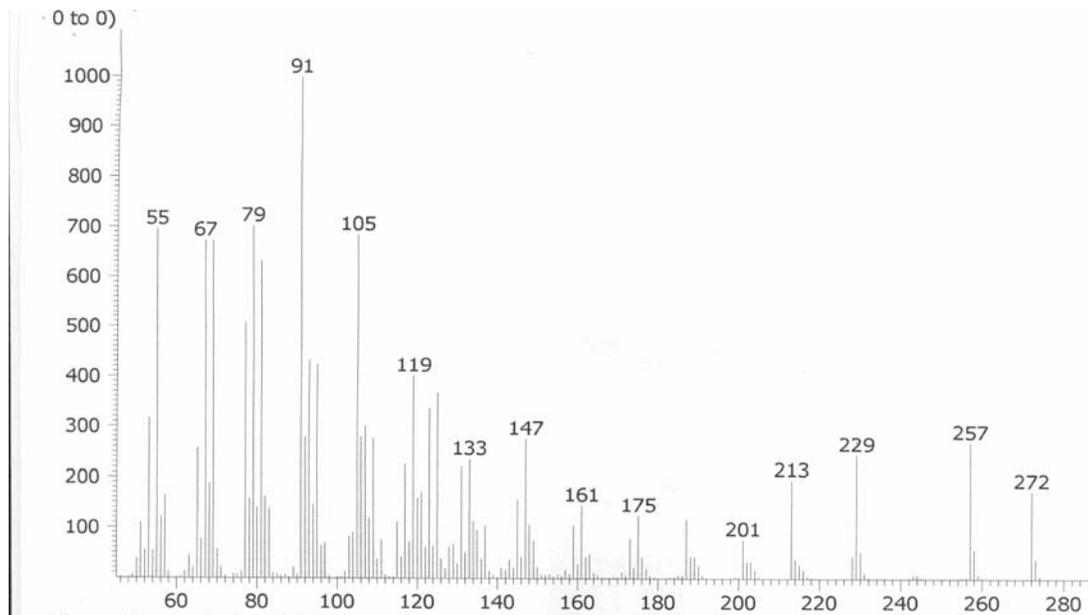


Espectro 6: Espectro de RMN-¹H del eupomatenoide 1.

No. Registro: STE-1159
3-III-07



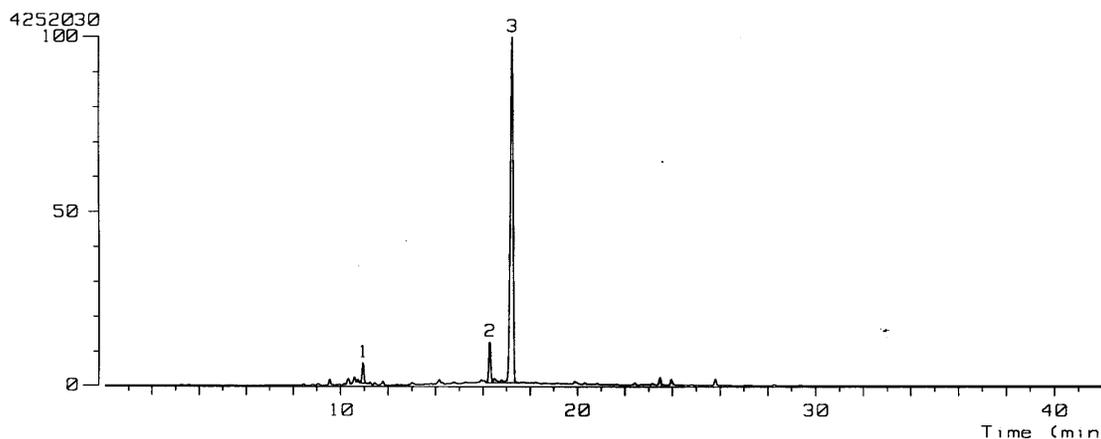
Espectro 7: Espectro de RMN-¹³C del eupomatenoide 1.



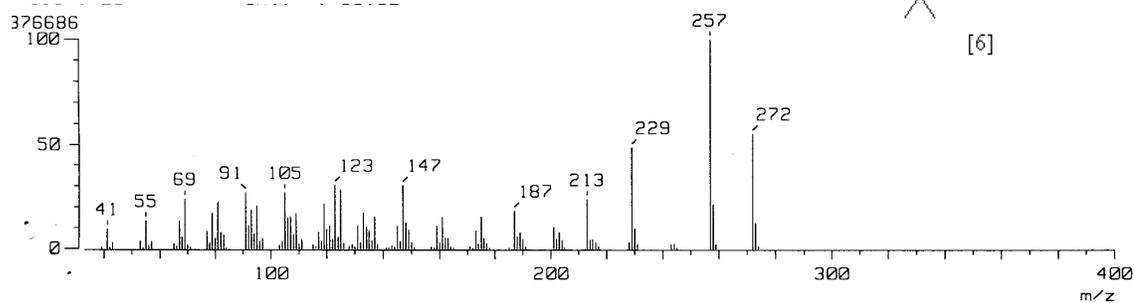
Espectro 8: Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas del compuesto *ent*-kaureno.

on Species : Normal Ion

TIC Range : m/z 33 to 800



No.	RT [min]	Area	Area%	Height	Height%	Width [sec]	INTEG
1	10.94	136.07	3.61	24.77	5.21	5.16	BB
2	16.31	286.83	7.61	48.66	10.23	5.53	BV
3	17.25	3345.46	88.78	402.14	84.56	7.81	VB



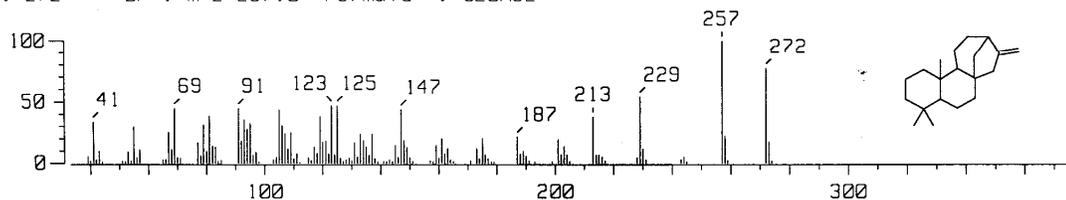
Mass Library Spectrum]

Library : Public/NIST

Entry No.: 30378 CAS No.: 562-28-7

Name: Kaur-16-ene

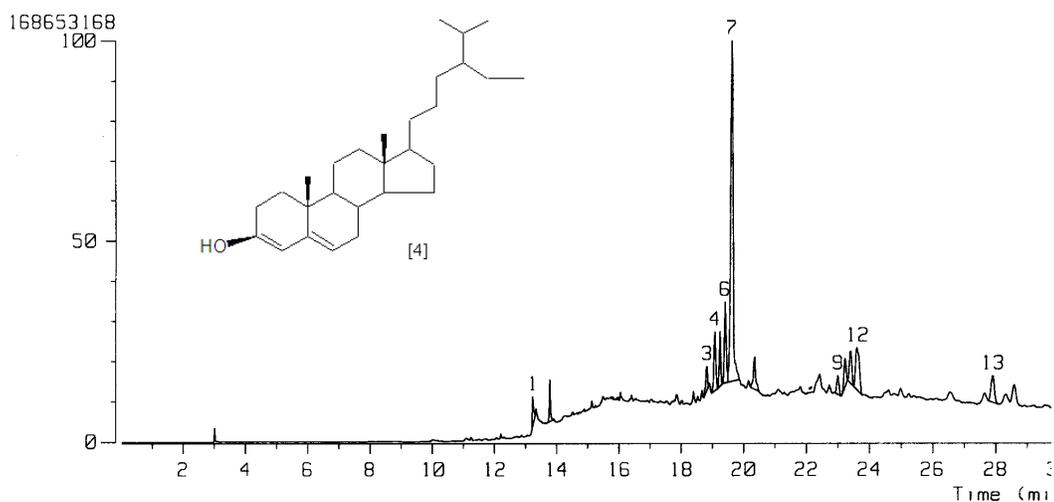
MW: 272 BP: m/z 257.0 Formula: C₂₀H₃₂



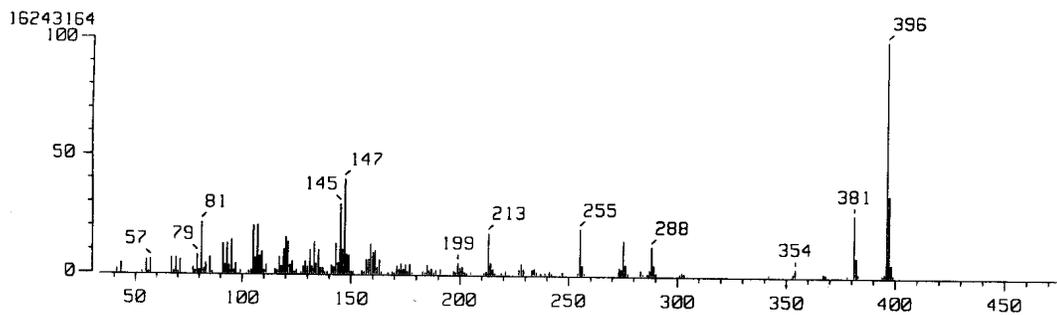
Espectro 9: Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas del *ent*-kaureno y el respectivo espectro de masas de la biblioteca Nist library.

Inlet : GC
Ion Species : Normal Ion

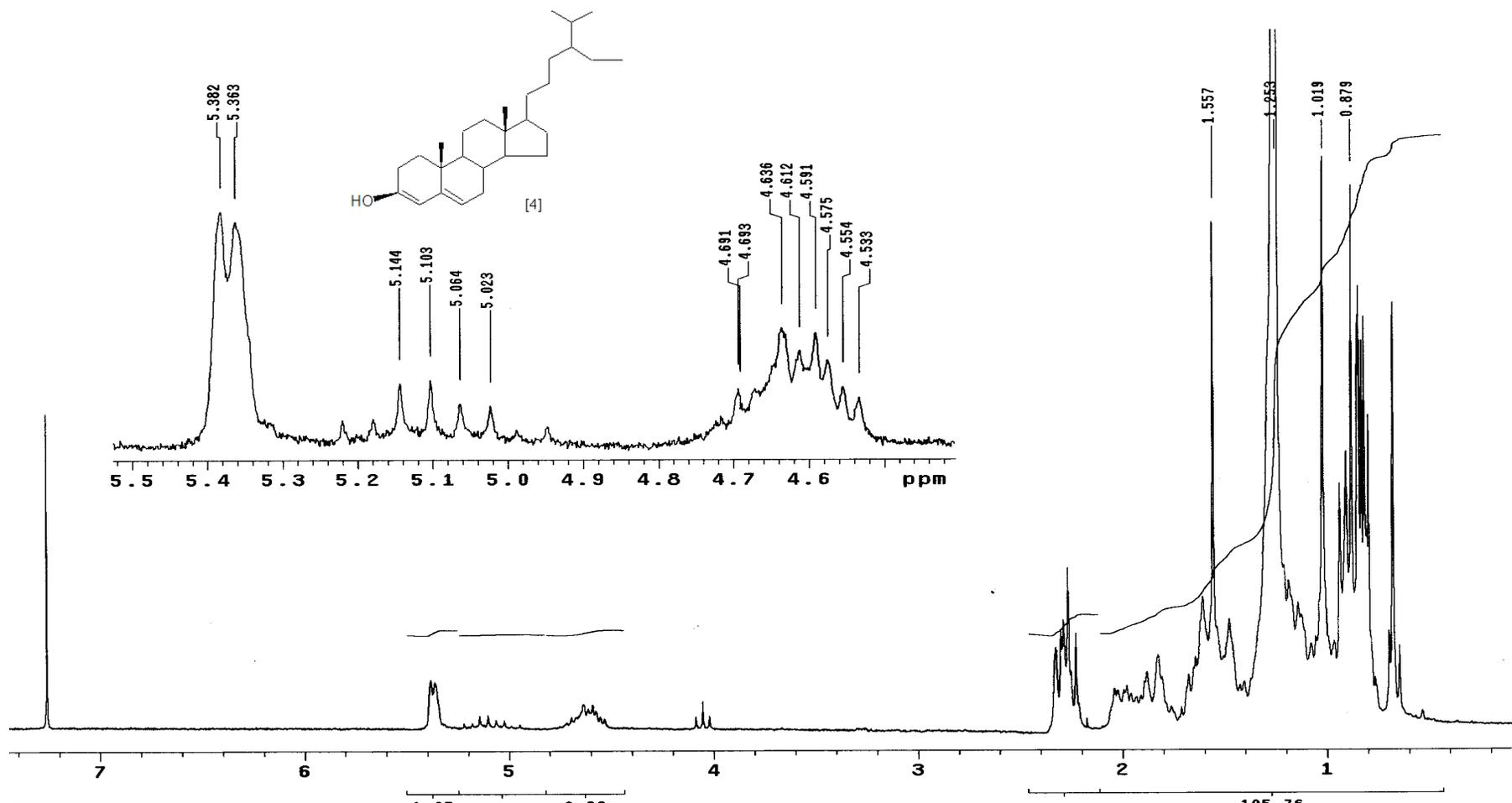
ION MODE : EI+
TIC Range : m/z 33 to 800



No.	RT [min]	Area	Area%	Height	Height%	Width [sec]	INTEG
1	13.23	3460.87	2.10	1207.03	3.70	2.69	BB
2	13.78	4130.02	2.50	1688.38	5.17	2.30	BB
3	18.84	4032.14	2.44	930.48	2.85	4.07	BB
4	19.09	10223.91	6.19	2363.76	7.24	4.06	BB
5	19.25	6678.46	4.05	2199.71	6.74	2.85	BB
6	19.42	13537.13	8.20	3254.84	9.98	3.91	BV
7	19.64	77838.32	47.15	13672.50	41.90	5.35	VB ✓
8	20.36	6788.75	4.11	1308.93	4.01	4.87	BB
9	23.01	3498.29	2.12	765.67	2.35	4.29	BB
10	23.23	5471.38	3.31	1153.49	3.54	4.45	BB
11	23.42	7104.56	4.30	1312.79	4.02	5.08	BB
12	23.62	14290.21	8.66	1707.13	5.23	7.86	BB
13	27.90	8026.55	4.86	1063.05	3.26	7.09	BB



Espectro 10: Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas del estigmastandieno.



Espectro 11: Resonancia magnética nuclear protónica del estigmastandieno.