

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD DE EXTRACTOS  
CRUDOS DE

*Juglans regia* L., *Juglans mollis* y  
*Carya illinoensis* contra  
*Mycobacterium tuberculosis*

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD  
EN QUÍMICA DE PRODUCTOS NATURALES

POR

M.C.P. NOE RAFAEL SALINAS GONZALEZ

SAN NICOLAS DE LOS GARZA, N. L.

Octubre del 2004

TN

Z5320

FCB

2004

.S3

M.C.P. NOE RAFAEL SALINAS GONZALEZ



1020150253

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**



**ANALISIS DE LA ACTIVIDAD DE EXTRACTOS  
CRUDOS DE  
*Juglans regia* L., *Juglans mollis* y  
*Carya illinoensis* contra  
*Mycobacterium tuberculosis***

**TESIS**

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD  
EN QUIMICA DE PRODUCTOS NATURALES**

**POR**

**M.C.P. NOE RAFAEL SALINAS GONZALEZ**

**SAN NICOLAS DE LOS GARZA, N.L.  
Octubre del 2004**

988996

TM  
Z5320  
FEB  
2004  
.S3



FONDO  
TESIS

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

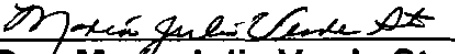


ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD DE EXTRACTOS CRUDOS DE  
*Juglans regia* L., *Juglans mollis* y *Carya illinoensis* contra  
*Mycobacterium tuberculosis*

Tesis

Presentada como requisito parcial para obtener el grado de  
maestro en ciencias con especialidad en Química de Productos  
Naturales por:

**M.C.P. Noé Rafael Salinas González**

  
Dra. María Julia Verde Star  
Directora

  
Dra. Delia Elva Cruz Vega  
Directora Externa

  
Dra. María Teresa González Garza Y Barrón  
Co-Directora Externa

  
Dra. Azucena Oranday Cárdenas  
Asesora

  
Dr. Jorge Castro Garza  
Asesor

San Nicolás de los Garza, N.L.

Octubre 2004

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD DE EXTRACTOS CRUDOS DE  
*Juglans regia* L., *Juglans mollis* y *Carya illinoensis* CONTRA  
*Mycobacterium tuberculosis*

Por

**M.C.P. Noé Rafael Salinas González**

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en la División de Biología Celular y Molecular. CIBIN, IMSS; Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN; Laboratorio de Fitoquímica, FCB, UANL. Bajo la dirección de la Dra. María Julia Verde Star, la co-dirección de la Dra. Delia Elva Cruz Vega y de la Dra. María Teresa González Garza Y Barrón. Fungieron como asesores la Dra. Azucena Oranday y el Dr. Jorge Castro Garza.

Apoyo recibido para la realización de este trabajo: UANL-PAICYT-SA58-01

## DEDICATORIAS

**A MI ESPOSA: María Elda Barbosa.**

Porque un día ella me dijo que sí se podía, y yo le creí.  
Dios quiera que nunca cambie.

**A MIS HIJOS: Marisol, Ricardo, Paola, Diego y Abril.**

Por concederme el tiempo, la fuerza y el sentido necesarios para  
exigirme siempre seguir estudiando.

**A MIS PADRES: Noé Salinas y María del Rosario González.**

Por aquel sueño que un día sembraron en mí. El de buscar aliviar  
el sufrimiento de los enfermos.

**A LA TÍA DE MIS HIJOS: María de los Ángeles Barbosa.**

Por su gran dedicación y vocación de tía ejemplar.  
Sin su valioso apoyo, mi tesis no hubiera sido posible.



## AGRADECIMIENTOS

Mi más sincero agradecimiento a:

**Dra. Ma. Julia Verde Star.**

Por su apoyo constante. Da gusto y entusiasmo descubrir que la calidez es compatible con la exigencia y el rigor del trabajo profesional.

**Dra. Delia Elva Cruz.**

Por su preocupación constante en asesorarme, de la mejor manera, en las actitudes y conocimientos necesarios en el trabajo científico.

**Dra. María Teresa González Garza Y Barrón.**

Sus clases, sus ideas y su calidad profesional y humana son ejemplo a seguir. Siempre estaré en deuda por todo su apoyo.

**Dra. Azucena Oranday Cárdenas.**

Por hacer tan digeribles y amenas sus clases, y sobre todo por ese ánimo transmitido a través de sus palabras, su amistad y su ejemplo.

**Dr. Jorge Castro Garza.**

Sus conocimientos y asesorías, su compañerismo y exigencia han sido un invaluable apoyo en la realización de esta tesis.

**Dra. Iris Estrada Parra y M.C. Patricia Méndez Aragon.**

Por su apoyo para la realización de las pruebas contra *M. tuberculosis*.

## **AGRADECIMIENTOS**

Mi agradecimiento por siempre a:

### **UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

Por la oportunidad y facilidades brindadas no solo para realizar mi trabajo de investigación, sino de permitirme además crecer como persona.

### **FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Por el apoyo brindado en la utilización de los equipos y aparatos del laboratorio de Fitoquímica.

### **DIVISIÓN DE POSTGRADO**

Por las facilidades otorgadas en toda ocasión que se requirió obtener documentación, información o apoyo financiero.

### **INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL**

En especial a la **División de Biología Celular y molecular del Centro de Investigación Biomédica del Noreste**. Por todos los medios materiales y humanos facilitados en el desarrollo desde su origen de la presente tesis.

### **INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

Que por medio de la **Escuela Nacional de Ciencias Biológicas** nos otorgaron los apoyos necesarios en la realización de las pruebas contra *M. tuberculosis*.

## INDICE

Resumen	1
Abstract	2
1. INTRODUCCION	3
2. ANTECEDENTES	6
2.1. Antecedentes tuberculosis	6
2.2. Factores que han contribuido al aumento de tuberculosis	7
2.2.1. El virus de inmunodeficiencia humana	7
2.2.2. Aparición de cepas drogo resistentes	8
2.2.3. Medidas de control mal llevadas	10
2.2.4. Otros factores que han contribuido al aumento de la tuberculosis	10
2.3. Agente causal	11
2.4. Patogenia de la tuberculosis	12
2.5. Productos naturales como fuente de nuevos fármacos	15
2.6. Medicina tradicional y herbolaria	16
2.7. Búsqueda de nuevos compuestos anti-fílmicos	17
2.7.1. Búsqueda de nuevos anti-fílmicos en productos naturales	18
2.8. Plantas utilizadas en este estudio	21
2.8.1. <i>Juglans regia</i>	24
2.8.2. <i>Carya illinoensis</i>	26
2.8.3. <i>Juglans mollis</i>	27
3. JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO	29
4. HIPOTESIS Y OBJETIVOS	30

4.1. Hipótesis	30
4.2. Objetivo general	30
4.3. Objetivos específicos	30
5. MATERIALES Y METODOS	31
5.1. Recolección	31
5.2. Obtención de extractos	31
5.3. Determinación de la actividad de los extractos sobre <i>M. tuberculosis</i>	33
5.3.1. Microorganismo de prueba	33
5.3.2. Determinación de la concentración mínima inhibitoria	33
5.4. Pruebas de identificación de grupos químicos	35
6. RESULTADOS	38
6.1. Recolección y clasificación del material vegetal	38
6.2. Rendimientos de los procesos de extracción	38
6.3. Concentraciones mínimas inhibitorias de los extractos contra <i>M. tuberculosis</i>	41
6.4. Identificación de grupos químicos.	42
7. DISCUSIÓN	46
8. CONCLUSIONES	54
9. PERSPECTIVAS	55
10. LITERATURA CITADA	56

## LISTA DE FIGURAS

1.- Fotografía de nogal <i>Juglans regia</i> -----	28
2.- Fotografía de nogal <i>Carya illinoensis</i> -----	28
3.- Fotografía de nogal <i>Juglans mollis</i> -----	28
4.- <i>Carya illinoensis</i> . Porcentajes de rendimientos de extracción con solvente hexánico, metabólico, acuoso, y etanólico.---	39
5.- <i>Juglans mollis</i> . . Porcentajes de rendimientos de extracción con solvente hexánico, metabólico, acuoso, y etanólico.---	40
6.- <i>Juglans regia</i> . Porcentajes de rendimientos de extracción con solvente hexánico, metabólico, acuoso, y etanólico.---	40
7.- Microplacas. CMI de extracto hexánico de corteza de <i>Carya illinoensis</i> .-----	41

## LISTA DE TABLAS

1.-Plantas más conocidas de la familia Juglandaceae.-----	23
2.-Número de voucher y lugar de origen de las tres especies de nogales-----	38
3.-Concentraciones mínimas inhibitorias de las tres especies de nogal estudiados.-----	42
4.-Identificación de grupos químicos en los extractos de <i>Carya illinoensis</i> .-----	43
5.-Identificación de grupos químicos en los extractos de <i>Juglans mollis</i> .-----	44
6.- Identificación de grupos químicos en los extractos de <i>Juglans regia</i> .-----	45

## ABREVIATURAS Y SIMBOLOGÍA

Aq	Acuoso
AODC	Acido oleico con dextrosa y catalasa
CLV	Cromatografía Líquida-Vacío
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
DMSO	Dimetilsulfóxido
DOTS	Direct observation therapy, shortcourse
EMMAA	Ensayo con Método de Microplaca Azul Alamar
Et	Etanólico
F	Fracción
Hex	Hexánico
HTT	Hipersensibilidad de tipo tardía
IFN- $\gamma$	Interferón gama
IMC	Inmunidad mediada por células
INH	Isoniacida
INI	Instituto Nacional Indigenista
MA	Macrófagos alveolares
MCA	Medicina complementaria/alternativa
MDR	Multi- drogoresistente
MT	Medicina tradicional
MTT	3(4,5-dimetietiazol-2-yl)-2,5bromuro difeniltetrazolium
OMS	Organización Mundial de la Salud
OPS	Organización Panamericana de la Salud
PAS	Acido Paraminosalisílico
pH	Potencial de hidrógeno
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
SNM	Sobre el nivel del mar
TB	Tuberculosis
TNF	Factor de necrosis tumoral
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humano

## RESUMEN

La tuberculosis, declarada una enfermedad de emergencia global desde 1993 por la Organización Mundial de la Salud (OMS), causa aproximadamente dos millones de defunciones al año. La expansión del VIH/SIDA y el surgimiento de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* multi-drogoresistentes contribuyen al impacto de esta enfermedad. La búsqueda de nuevos fármacos anti-micobacterianos es prioritaria. El objetivo de este trabajo fue evaluar la actividad anti-micobacteriana de extractos crudos de hoja y corteza de *Juglans regia* (nogal de Castilla), *Juglans mollis* (nogal encarcelado) y *Carya illinoensis* (nogal pecanero). Estas tres especies corresponden a la familia Juglandaceae la cual ha sido empleada como planta medicinal en muchos padecimientos incluyendo "la tisis" y la "escrófula", sinónimos de tuberculosis y de tuberculosis ganglionar respectivamente. Las muestras de hoja y corteza de *J. regia* fueron recolectadas en el estado de Hidalgo y las de *J. mollis* y *C. illinoensis* en el estado de Nuevo León. Los extractos hexánico, metanólico, etanólico y acuoso de hoja o corteza, obtenidos de cada planta, se probaron contra *M. tuberculosis* cepa H37Rv mediante el método en microplaca de Azul de Alamar (EMMAA), utilizándose isoniacida como control positivo de inhibición de crecimiento. Los extractos probados que presentaron la mejor actividad fueron: los hexánicos de corteza de *C. illinoensis*, *J. mollis* y *J. regia* con una concentración mínima inhibitoria (CMI) de 31.25, 50 y 100 µg/ml respectivamente, así como también el etanólico de corteza de *J. mollis* con una CMI de 100 µg/ml. Los restantes extractos de *C. illinoensis* y *J. mollis*, con excepción de los acuosos presentaron una CMI de 125 µg/ml, así como el metanólico de *J. regia*. La identificación parcial (grupos químicos) de los componentes de los extractos reveló que los extractos con mayor actividad anti-micobacteriana (hexánicos de corteza de *C. illinoensis*, *J. mollis* y *J. regia*) contienen compuestos no polares, con presencia de triterpenos. Los resultados de este trabajo apoyan el uso medicinal que se les ha dado a estas especies en el tratamiento de la tuberculosis, y a la idea de seleccionar plantas mediante criterios etnobotánicos para aumentar la probabilidad de encontrar compuestos con actividad antimicrobiana. Así como continuar investigando estas especies para identificar y aislar los compuestos activos.

## ABSTRACT

Tuberculosis (TB), declared as a global emergency disease since 1993 by the World Health Organization (WHO) kills approximately 2 million people each year. The spread of HIV/AIDS and the emergence of multidrug-resistant TB are contributing to the impact of this disease, demanding the search for new antimycobacterial drugs. The main objective of this work was to evaluate the antimycobacterial activity of crude extracts of leaves and bark from *Juglans regia* (english walnut) *Juglans mollis* (incarcerated walnut) and *Carya illinoensis* (pecan). These trees belong to the Juglandaceae family, which has been used as a medicinal plant in many ailments including “tisis” and “scrofula”, synonymous of tuberculosis and tuberculosis of cervical glands respectively, since long time ago. Leaves and bark of *J. regia* were collected in the state of Hidalgo, México, and leaves and bark of *J. mollis* and *C. illinoensis* were collected in the state of Nuevo León, México. The hexane, methanol, ethanol and aqueous extracts of leaves and bark, were evaluated for their activity against *M. tuberculosis* H37Rv by microplate Alamar blue assay. Hexane bark extracts from *C. illinoensis*, *J. mollis* and *J. regia* were active at minimal inhibitory concentration (MIC) of 31.25, 50 and 100 µg/ml, respectively. Ethanol bark extract from *J. mollis* had a MIC of 100 µg/ml. Methanol and ethanol leaves and bark extracts from *C. illinoensis*, leaves from *J. mollis*, and bark methanol extracts from *J. mollis* showed a MIC of 125 µg/ml as also did the methanol extract of leaves from *J. regia* and the hexane extracts of leaves from *C. illinoensis* and *J. mollis*. None of the aqueous extracts had antimycobacterial activity. Isoniazid (MIC=0.036 µg/ml) was used as a growth inhibitor control. The partial identification of compounds by chemistry color reactions showed that the most active extracts against *M. tuberculosis* (hexane extracts of bark from *C. illinoensis*, *J. mollis* and *J. regia*) contained non-polar compounds and triterpenes. This work supports the medicinal use of these plants against tuberculosis, and the fact that selecting plants by ethnobotanical criteria enhances the probability of finding species with activity against mycobacteria. Also a further study is needed to identify the active compounds of these plants.



## 1.- INTRODUCCIÓN

El uso de plantas con fines curativos antecede a la historia de la humanidad y corresponde en parte, al origen de lo que hoy conocemos como farmacología moderna. Muchas de las drogas convencionales provienen de fuentes vegetales: hace cien años, la mayor parte de las pocas drogas efectivas derivaban de las plantas (Vickers y Zollman, 1999). Actualmente, la medicina moderna ha logrado combatir con eficacia numerosas enfermedades que antes eran incurables e incluso mortales, principalmente infecciones que fueron controladas gracias al empleo de las sulfamidas, productos de microorganismos o sus derivados sintéticos como es el caso de los antibióticos tradicionales, y otros compuestos químicos (Cowan, 1999). Sin embargo, las plantas medicinales y los remedios no han quedado totalmente olvidados. Sus reservas de materias primas siguen siendo explotadas, para extraer de ellas sustancias de gran valor. Del mismo modo, la medicina popular y los herbolarios nunca han dejado de recurrir a las plantas medicinales, esforzándose en conservar viva una tradición terapéutica conocida desde la prehistoria (OMS, 2002). Los etnobotánicos están actualmente librando una batalla contra el tiempo para recoger esta información antes de que se pierda con la presente generación y con ello, posibles atajos para llegar a descubrir algunas plantas medicinales (Trease, 1987)

Se estima entre 250,000 y 500,000 el número de especies de plantas en el planeta, distribuidas cuando menos en unas 300 familias y 10,500 géneros, de

las cuales un pequeño porcentaje, aproximadamente entre el 1 y 10%, son usadas como alimento por los humanos y los animales. Un porcentaje aún mayor son utilizadas con propósitos medicinales (Cowan, 1999). El desarrollo de fármacos a partir de especies vegetales continúa con el apoyo de compañías farmacéuticas comprometidas en estudios farmacológicos de productos naturales a gran escala (Vickers y Zollman, 1999; Turner, 1999). A pesar de lo anterior, solo una pequeña parte de la totalidad de las especies ha sido investigada en relación con sus propiedades medicinales y principios bioactivos. Un ejemplo lo tenemos en las plantas medicinales de las sociedades Indígenas Nativas de Norteamérica; muchos productos botánicos utilizados por los nativos americanos han sido comercializados como suplementos alimenticios, y representan tan solo una pequeña parte de las más de 2,800 especies conocidas por sus propiedades medicinales por los habitantes indígenas de Norteamérica (Borchers, *et al*, 2000).

México, en toda su extensión territorial (1,964,375 Km<sup>2</sup>) cuenta con una gran diversidad de suelos y climas, con presencia oceánica en ambos litorales que explican la gran variedad de vegetación. Posee una diversidad vegetal de las más ricas en el mundo con al menos 26,000 especies, lo que significa un 10% de la flora mundial y mayor cantidad que Estados Unidos de América y Canadá juntos. México tiene más especies de pinos, magueyes, cactus y encinos, que ningún otro país del mundo (Gómez-Pompa, 1985). En la actualidad ya han sido identificadas más de 5,000 especies mexicanas que tienen aplicaciones curativas, aunque muchos de los usos estén restringidos a determinadas

regiones o localidades por condiciones como el medio ambiente natural y el modo de vida de la población (Valdez-Aguilar, 2001).

Recientemente, la aceptación de la medicina tradicional como forma alternativa en el cuidado de la salud y el desarrollo de resistencia microbiana hacia los antibióticos, entre otras aplicaciones, ha llevado a muchos investigadores a la búsqueda de actividad antimicrobiana en plantas medicinales (Nostro, 2000). Una de las enfermedades consideradas actualmente como un problema de salud pública mundial es la tuberculosis (TB). Es una enfermedad re-emergente y fue declarada una emergencia global en 1993 por la Organización Mundial de la Salud (OMS) (OMS, 1994). Existen tres razones principales para desarrollar nuevos fármacos contra la TB: (1) mejorar los esquemas de tratamiento acortando su duración total u ofrecer tratamientos intermitentes ampliamente espaciados, (2) mejorar el tratamiento de la tuberculosis multi-resistente, y (3) ofrecer tratamientos más efectivos en la TB latente (O'Brien, 2001). Tomando en cuenta que la TB va en aumento, y que tiene una morbilidad y mortalidad de las más elevadas a nivel mundial (OMS, 2004), es urgente la búsqueda de nuevos y mejores fármacos para combatirla.

## **2.- ANTECEDENTES**

### **2.1. Tuberculosis**

La tuberculosis (TB), conocida desde siglos atrás como “tisis” o “consunción” haciendo alusión a su naturaleza desgastante, produce la muerte de aproximadamente dos millones de personas al año (OMS, 2004). Es una enfermedad infecciosa conocida desde la antigüedad que afecta al ser humano en forma epidémica de acuerdo con registros y evidencias arqueológicas (Smith, 2003). La tuberculosis, considerada como una epidemia en crecimiento, es la causa mundial más importante de defunción por un solo agente infeccioso (Rossman, y Mac Gregor, 1996).

De acuerdo a la OMS, en 1990 había casi 8 millones de casos activos, de los cuales 7.6 millones se presentaron en países subdesarrollados (Schlossberg, 2000). Actualmente, la incidencia de TB se encuentra en un rango que va desde menos de 10 por 100,000 habitantes en Norteamérica a 100 a 300 por 100,000 habitantes en Asia y Rusia Occidental, hasta más de 300 por 100,000 habitantes en África del Sur y Central. Hoy se sabe que 8.2 millones de personas desarrollan TB cada año, de los cuales un 60% de personas sin tratamiento morirán (Smith, 2003; OPS/OMS, 2004).

Estimaciones indican que entre 2002 y 2020, aproximadamente 1000 millones de personas adquirirán contagio por primera vez, de éstas, más de 150 millones

enfermarán, y 36 millones morirán de tuberculosis si no se logra reforzar el control de esta enfermedad (OMS, 2002).

El agente responsable de esta enfermedad, *Mycobacterium tuberculosis*, pertenece a un grupo de bacterias caracterizadas por tener una envoltura con estructura compleja, tanto en su composición molecular como en el arreglo estructural de sus componentes. Está caracterizada por su alto contenido de lípidos, hasta un 60% del peso seco de la bacteria, con una variedad de estructuras poco usuales, algunas de las cuales son exclusivas de micobacterias (Pérez, *et al*, 2004). La tuberculosis se disemina a través de los núcleos de gotitas infecciosos y por lo tanto, en la mayor parte de los casos la vía de entrada es el pulmón. En la mayoría de los pacientes la enfermedad se conserva latente por tiempo indefinido y cuando sobreviene un momento de debilitamiento del sistema inmune, la enfermedad comienza a desarrollarse (Rossman, y Mac Gregor, 1996).

## **2.2. Factores que han contribuido al aumento de la tuberculosis.**

### **2.2.1. El virus de inmunodeficiencia humana (VIH).**

Alrededor de dos millones de casos de tuberculosis por año ocurren en África sub-Sahara. Esta cifra está en aumento como resultado de la epidemia VIH/SIDA. (OMS, 2002). VIH y TB forman una combinación letal, cada una acelerando el progreso de la otra. VIH debilita el sistema inmune; un individuo VIH positivo infectado con TB tiene mayores posibilidades de enfermar de tuberculosis que alguien infectado con TB siendo VIH-negativo. La tuberculosis

es una causa importante de muerte entre personas VIH-positivas, representa alrededor del 13% de las muertes en personas con SIDA a escala mundial y aunque se le ataca como problema, este se encuentra lejos de ser actualmente resuelto (OPS/OMS, 2004). En África, el VIH es el factor más importante en forma aislada que ha determinado el incremento de la incidencia de tuberculosis en los últimos diez años (OMS, 2004). Se ha estimado que dos millones de muertes resultaron por tuberculosis en 2002. Las cifras más elevadas de muertes se encuentran en la región del Sudeste Asiático, pero la mortalidad mayor *per capita* está en la región de África, en donde el VIH ha favorecido el rápido incremento de la incidencia de TB, incrementando la probabilidad de morir por TB (OMS, 2004).

### **2.2.2. Aparición de cepas drogo resistentes.**

Hasta hace cincuenta años, no había medicamentos que curaran la tuberculosis. El descubrimiento y desarrollo de antibióticos activos contra *M. tuberculosis* creó expectativas sobre la probable eliminación de la enfermedad. Los primeros “éxitos” terapéuticos conseguidos con la estreptomina fueron en la década de los 40; sin embargo, pronto se detectó *M. tuberculosis* resistente a la monoterapia (Rodríguez y Morfin, 2002). La capacidad de *M. tuberculosis* para mutar y desarrollar resistencia a los antibióticos hizo fracasar al tratamiento único de la tuberculosis ya que podían aparecer microorganismos resistentes a las cuatro semanas de tratamiento (Rossman, y MacGregor, 1996). En la década de los 50 aparecieron otros medicamentos para el manejo de la tuberculosis, como la isoniacida y el ácido paraaminosalicílico (PABA), y

se demostró que la quimioterapia combinada reducía mucho la probabilidad de la resistencia adquirida a los medicamentos (Guerrero y Rendón, 2002).

Actualmente, se tiene conocimiento de cepas resistentes a una droga en cada uno de los países bajo supervisión, además del surgimiento de cepas de bacilos tuberculosos resistentes a todas las drogas anti-TB más importantes (OMS, 2004). La tuberculosis drogo resistente es causada, entre otros factores por los tratamientos incompletos, mal llevados, cuando los pacientes no completan los esquemas terapéuticos, abandonando los tratamientos cuando se sienten mejor y cuando los médicos prescriben mal los regímenes de tratamiento. Una forma particularmente peligrosa de tuberculosis drogo resistente es la tuberculosis multi-drogoresistente (TB-MDR) la que se define como la enfermedad debida a TB resistente al menos a isoniazida y rifampicina, las dos drogas anti-TB más potentes (OMS, 2004). En nuestro país se han reportado tasas de multirresistencia de 2.4 a 6% (Guerrero y Rendón, 2002). En 1997 un estudio realizado en tres estados de la República Mexicana, demostró resistencia primaria a la isoniacida en 11% y resistencia a la isoniacida después del tratamiento previo de 41%, porcentajes que indicaron la necesidad de cambiar la estrategia de tres a cuatro fármacos en la fase inicial como se hace actualmente (Rodríguez y Morfín, 2002). Hoy sabemos que la ocurrencia de TB-MDR es alta en algunos países, especialmente en la antigua Unión Soviética, amenazando todos los esfuerzos para controlar esta enfermedad (OMS, 2004).

### **2.2.3. Medidas de control mal llevadas.**

De las diferentes causas que provocaron la re-emergencia de TB en los Estados Unidos de Norteamérica, las malas medidas de control fue lo que mas impacto tuvo en el aumento de TB en niños (Starke, 2004). En México por ejemplo, se detectó que los pacientes sin supervisión no completaban los seis meses de tratamiento, que el personal de salud desconocía en muchos casos la forma correcta de administrar los antibióticos anti-TB, y se confió en que la vacuna BCG protegería (Rodríguez y Morfin, 2002).

### **2.2.4. Otros factores que han contribuido al aumento de la tuberculosis**

Otras causas de la expansión de tuberculosis a escala mundial, son factores derivados de la pobreza (desnutrición y hacinamiento), lugares confinados como las prisiones, asilos, internados y los servicios de salud carentes de programas de control adecuado (Schloosberg, 1999). De acuerdo al informe para las Américas de la Organización Panamericana de la Salud (OPS), el 98% de todas las defunciones por TB se encuentran en los países en vías de desarrollo (OPS/OMS, 2004).

Un ejemplo de lo que un buen programa de control de TB puede lograr lo tiene la OMS y sus aliados internacionales desde 1991 denominado "Equipo de Trabajo DOTS-plus" (directly observed therapy, shortcourse) (O'Brain, *et al.*, 2001) el cual intenta determinar las mejores estrategias posibles para manejar la TB-MDR. Una de las metas de DOTS-plus es el de incrementar el acceso a los costosos fármacos anti-TB de segunda línea para los programas de control



de TB aprobados por la OMS en países de bajos y medianos ingresos (OMS, 2002).

El programa DOTS de la OMS contempla cinco elementos: compromiso de los gobiernos, servicio microscópico, provisión de fármacos, sistemas de vigilancia y monitoreo, y uso de regímenes eficaces con vigilancia directa de los tratamientos. Las metas propuestas por la OMS, son las de detectar el 70% de los nuevos casos de infecciones y curar el 85% de aquellos detectados, como ya se logró en países como Perú y la mitad de China entre otros en el año 2000 (OMS, 2002). Sin embargo, en el año 2003 los casos de TB en África y en la antigua URSS siguen en aumento. Los problemas de TB/HIV y TB-MDR están siendo atendidos pero se encuentran lejos de ser resueltos (OPS, 2004).

### **2.3. Agente causal**

Roberto Koch en 1882 describió el agente causal, conocido hoy en día como *Mycobacterium tuberculosis*, el cual es un bacilo, ligeramente curvo, que mide entre 0.2 a 0.6 x 2.0 a 5.0  $\mu\text{m}$ . Es una bacteria aerobia, ácido-alcohol resistente y sin motilidad que no produce endosporas. El género *Mycobacterium* comprende un grupo único de bacterias caracterizadas por una pared celular que contiene una capa de lípidos (ésteres micolatos) arreglada para formar una barrera de permeabilidad a moléculas polares, además de una envoltura celular externa formada por una mezcla de polisacáridos, proteínas y lípidos (Daffé, 1999). La principal especie patógena para el hombre es *M. tuberculosis*. El bacilo tuberculoso crece lentamente, se reproduce cada 24 a 48 horas bajo

condiciones óptimas de presión parcial de oxígeno de 140 mm Hg. Por esta razón crece mejor en las partes del cuerpo con una alta concentración de oxígeno (Schlossberg, 1999).

#### **2.4. Patogenia de la tuberculosis**

En el contagio, la transmisión de *M. tuberculosis* es de persona a persona, usualmente mediante la inhalación de gotitas de aerosol diseminadas en el ambiente cuando una persona enferma tose, estornuda, ríe, canta o incluso respira. La infectividad está relacionada a ciertas características de la persona, y a factores ambientales específicos tales como una pobre circulación del aire, además del número de microorganismos requeridos para infectar a alguien, el cual se ha estimado en menos de diez bacilos (Bloom, 1994; Starke, 2004). El bacilo inhalado llega al alvéolo, en una primera etapa, un macrófago alveolar (MA) ingiere el bacilo inhalado y a menudo lo destruye (Schlossberg, 1999). *M. tuberculosis* es capaz de sobrevivir dentro de los macrófagos, porque componentes de su pared celular inhiben la fusión de los lisosomas con las vacuolas fagocíticas (Méresse, 1999; Fratti, 2003; Vergne, 2003). Si el MA original no puede destruir al bacilo, éste se multiplica dentro del macrófago. Posteriormente, los bacilos son ingeridos por otros MA y por macrófagos provenientes de la sangre, desarrollando así la segunda etapa, en la que ni los macrófagos del hospedero, ni los bacilos se causan daño (Fenton, 1996). Con el tiempo se acumulan cada vez más macrófagos y bacilos en estos sitios de infección (Schlossberg, 1999).

Después de 6 a 8 semanas de la infección, se afectan los ganglios linfáticos regionales y se activan las células T  $CD_4^+$ . Estas células T producen IFN- $\gamma$  que activa a los macrófagos y aumenta su capacidad para matar a las bacterias fagocitadas (Arce-Mendoza, *et al.*, 2004). El TNF producido por las células T y los macrófagos también participa en la inflamación local y en la activación de los macrófagos (Abbas, *et al.*, 1999). La necrosis caseosa se inicia a través de una reacción de Hipersensibilidad de Tipo Tardío (HTT) que se desencadena por las altas concentraciones locales de productos provenientes de los bacilos. Los linfocitos de tipo Th1 son los responsables de la especificidad de esta reacción (Schlossberg, 1999). La HTT es un mecanismo por medio del cual se destruyen los macrófagos no activados cargados de bacilos. Esto elimina un ambiente favorable para el crecimiento bacteriano, pero ocurre mediante un proceso de necrosis caseificante y que corresponde a una tercera etapa y a costo de los tejidos del hospedero (Rossman, y MacGregor, 1996). Durante la etapa inicial de esta necrosis caseosa caracterizada por ser sólida, los bacilos sobreviven sin poderse multiplicar, probablemente por las condiciones de anoxia, de pH ácido y la presencia de ácidos grasos inhibidores (Schlossberg, 1999). Los bacilos sobreviven en los focos caseosos sólidos durante años. A este estado se le ha llamado latencia (Smith, 2003).

Sin embargo, en personas no inmunocomprometidas, con frecuencia hay lisis de la proteína semisólida coagulada, por enzimas hidrolíticas y la HTT y la masa se reblandece, correspondiendo a la etapa cuatro (Rook, y Hernández, 1996). La sustancia licuada puede ser evacuada por los bronquios y eliminarse

como esputo, siendo tóxico a los tejidos por la presencia de la HTT, propagando la infección a otras zonas pulmonares y a otras personas (Fenton, 1996). En una quinta etapa, al vaciarse el absceso caseoso, se produce la caverna tuberculosa pulmonar, de máxima importancia clínica (Hinshaw, 1981). Cabe señalar que los macrófagos no sobreviven en este material debido a ácidos grasos tóxicos de las células del hospedero, de los bacilos o ambos. De este modo, los macrófagos activados resultan ineficaces para controlar la multiplicación extracelular de los bacilos que se encuentran en una caverna (Schlossberg, 1999).

Otra respuesta inmunológica presente es la Inmunidad mediada por células (IMC), ésta aporta un beneficio al hospedero y se caracteriza por una mayor población de linfocitos T específicos de tipo Th1 que producen citocinas (Arce-Mendoza, *et al.*, 2004). Éstas atraen a los monocitos/macrófagos de la circulación hacia la lesión y los activan. Los macrófagos activados liberan productos intermedios de oxígeno y nitrógeno, enzimas lisosomales y otros factores que matan y digieren a los bacilos tuberculosos (Smith, 2003). Mientras mayor sea la acumulación local de macrófagos con activación completa, mayor será la capacidad del hospedero para destruir al bacilo tuberculoso (Rossman y MacGregor, 1996). La HTT implica el mismo proceso inmunitario que la IMC, el cual incluye a las células T de tipo Th1 y sus citocinas. La HTT con daño a los tejidos y que produce necrosis local, detiene el crecimiento de los bacilos dentro de los macrófagos inactivos, lo cual le brinda tiempo al hospedero para que se desarrolle la IMC y logre la activación

local de los macrófagos. Tomando en cuenta todo lo anterior, una terapéutica antimicrobiana adecuada puede reducir de manera notoria la cantidad de bacilos viables, y con el tiempo detener la enfermedad (Schlossberg, 1999).

## **2.5. Productos naturales como fuente de nuevos fármacos**

Las plantas continúan siendo utilizadas en todo el mundo, para el tratamiento de múltiples enfermedades y nuevos fármacos se desarrollan a partir de la investigación de productos naturales (Turner, 1996; Borris, 1996). A través de la historia encontramos numerosos ejemplos. En 1757, el Rev. Sr. Edmund Stone de Oxfordshire, había probado un remedio popular para la fiebre de la corteza del sauce (*Salix alba*), cuyo principio activo fue llamado ácido salicílico en 1838 por Raffaele Piria en París, hoy le conocemos como aspirina (Waissman 1991). En 1799, John Ferriar atribuye a la digital una acción primaria en el corazón, hoy en día se emplea en la insuficiencia cardiaca congestiva (Goodman, et al., 1974). De la quinina, alcaloide de la quina, se ha derivado la quinolina, acridina y otros compuestos anti-palúdicos empleados hoy en día en la terapéutica de la malaria (Antoun, 2001).

El *Taxus brevifolius* demostró actividad anti-cancerígena, su compuesto activo, Taxol resultó ser un diterpenoide. Tanto Taxol como su análogo semisintético Taxotere, están en uso clínico en quimioterapia contra el cáncer, (Mathew y Wall, 1995). La podofilina, encontrada en la resina del árbol *Podophyllum peltatum*, posee el lignano podofilotoxina de donde se deriva el etopósido, utilizado en el tratamiento de cáncer de pulmón y de testículo (Phillipson, 1999).

México y sus culturas han aportado especies medicinales de gran importancia, como es el caso del barbasco, *Dioscorea* spp, materia prima para obtener hormonas esteroides y sus derivados (Gómez-Pompa, 1985); ciertos laxantes, entre ellos la hoja sen (*Cassia angustissima*) y los tranquilizantes *Valeriana* sp y *Pasiflora* sp. La gran mayoría de las plantas medicinales importantes de México, aún no han sido catalogadas como fitofármacos, aunque comienza a ser frecuente la inclusión de algunas de ellas también en las farmacias. México importa especies como *Peumus boldus*, *Árnica montana*, indicada en las contusiones; *Atropa belladonna*, midriático y narcótico; y hojas de alcachofa, hipoglucemiante. Y exporta plantas medicinales como *Uva ursi*, diurético; *Valeriana mexicana*, tranquilizante; *Mimosa tenuiflora*, cicatrizante; *Opuntia* sp, hipoglucemiante (Quintero, 1998).

Cabe agregar que hoy en día, existe un interés creciente en la medicina botánica (fitofármacos) como parte de la medicina complementaria (OMS, 2002) y que éstos productos naturales se comercializan como suplementos dietéticos en muchos países, la mayoría son plantas, aunque muchos de ellos están aún en vías de ser estudiadas científicamente en cuanto a su principio activo, farmacodinamia, efectos colaterales, toxicología, etc. (Borchers, 2000).

## **2.6. Medicina tradicional y herbolaria**

La medicina tradicional (MT) se utiliza ampliamente y es un sistema sanitario que está creciendo rápidamente y de gran importancia económica. En África hasta un 80% de la población utiliza la MT para ayudar a satisfacer sus

necesidades sanitarias, en China, la MT contabiliza alrededor de un 40% de la atención sanitaria (OMS, 2002). En Latinoamérica, las poblaciones siguen utilizando la MT como resultado de circunstancias históricas y creencias culturales (Valdez-Aguilar, 2001). En países desarrollados, la medicina complementaria/alternativa (MCA) se está haciendo cada vez más popular. El porcentaje de población que utiliza la MCA al menos una vez es de un 48% en Australia, un 70% en Canadá, un 42% en EE UU, un 38% en Bélgica y un 75% en Francia (OMS. 2002).

México es considerado un país con un sistema “tolerante” de la medicina tradicional y otras formas de atención médica no institucionales. Al encontrarse la medicina tradicional mexicana fuera de este reconocimiento oficial, es difícil determinar el número de mexicanos que recurren a ella para el tratamiento de sus problemas de salud. Se calcula que entre 15 y 20 millones de mexicanos son pacientes de la medicina tradicional. Según investigaciones realizadas, una cantidad bastante elevada de derechohabientes del Instituto Mexicano del Seguro Social, mantiene su relación con la medicina tradicional. (Quintero, 1998). En la actualidad ya han sido identificadas más de 5,000 especies mexicanas que tienen aplicaciones curativas (Valdez-Aguilar, 2001).

## **2.7. Búsqueda de nuevos compuestos antifímicos**

Hasta hace cincuenta años, no había medicamentos que curaran la tuberculosis. En 1944, Schatz, Bugie y Waksman anunciaron el descubrimiento de la estreptomicina, sustancia producida por una cepa de *Streptomyces*

*griseus*, como agente eficaz en el tratamiento de la tuberculosis experimental (Smith, 2003), y meses mas tarde, se publicaron los primeros estudios clínicos exitosos. Al poco tiempo, en 1946, se publican las contribuciones de Lehmann en la síntesis y el empleo del ácido paraminosalicílico (PAS) (Hinshaw, 1981). La isoniacida (INH) en 1945, fue descubierta por Chorine cuando advirtió que la nicotinamida tenía acción tuberculostática, cuando se estudiaron compuestos afines a la nicotinamida, se sintetizó la tiosemicarbazona del isonicotín aldehído a partir del éster metílico del ácido isonicotín, y el primer producto intermedio fue la isonicotinilhidrazida llamada isoniacida (Weinstein, 1974), el mas potente de todos los tuberculostáticos conocidos hasta ese momento. Por otro lado, Thomas en 1961, observó que la N,N'-diisopropiletilendiamina era eficaz para el tratamiento de las infecciones tuberculosas experimentales del ratón. Se probaron algunos derivados de esta sustancia y, el que más actividad tuberculostática presentó fue el diclorohidrato de etilendiamino-di-1-butanol (etambutol). La rifampina, producida por *Streptomyces mediterranei*, fue aislado en 1959, mostró actividad contra *M. tuberculosis in-vitro* en 1968, es muy eficaz en el tratamiento de la tuberculosis humana (Goodman, *et al* , 1974) Sin embargo, *M. tuberculosis* tiene una gran capacidad para mutar y desarrollar resistencia a los antibióticos (Rossman, y MacGregor, 1996).

### **2.7.1 Búsqueda de nuevos antifímicos en productos naturales.**

Se ha encontrado actividad del *Allium sativum* contra varias cepas de *M. tuberculosis* con concentraciones inhibitorias de 11.72, 22.29, y 32 µg/ml (Newton, *et al.*, 2000). Las fracciones polares del extracto crudo de flor de



*Borrhchia frutescens* (33 µg/ml) inhibieron en un 95% el crecimiento de *M. tuberculosis* (H37Rv). La investigación química de estas fracciones llevó al aislamiento de nuevos triterpenos y un triterpeno previamente conocido. Los compuestos (24R)-24,25-epoxicicloartan-3-ona y (3αH,24R)-24,25-epoxicicloartan-3-ol, este último ya conocido, mostraron una CMI de 8 µg/ml (Cantrell, *et al.*, 1996).

También se ensayaron las CMIs contra *M. tuberculosis* de un número de extractos de plantas de la región sureste de los Estados Unidos de Norte-América, incluyendo *Magnolia grandiflora* y *M. virginiana*. Entre sus componentes puros estaban, las sesquiterpenlactonas costunólidos y partenólidos, junto con una serie de germacranólidos y sus derivados. La lactona más lipofílica, costunólido mostró una CMI de 32 y 128 µg/ml contra *M. tuberculosis* y *M. avium*, respectivamente. Su derivado 4,5-epóxido, partenólido, fue el germacrólido más activo con CMIs de 16 y 64 µg/ml, contra *M. tuberculosis* y *M. avium* respectivamente (Ficher, *et al.*, 1998).

En otra investigación, el extracto metanólico de las semillas de *Melia volkensii* mostró 99% de inhibición a 100 µg/ml. Fracciones cromatográficas mostraron la presencia de los triterpenos kulactona, y kulunato y los compuestos no reportados previamente, 12β-hidroxikulactona y 6β-hidroxikulactona. Con CMIs de 16 y 4 µg/ml contra *M. tuberculosis* (H37Rv) (Cantrell, *et al.*, 1999).

En Puerto Rico, se analizó la actividad anti-micobacteriana de un número de extractos etanólicos de plantas pertenecientes a la flora de ese país. El extracto de hoja de *Ficus citrifolia* y *Pisonia borinquena* produjeron el 85% o más de inhibición de crecimiento micobacteriano a 100 µg/ml de extracto (Antoun, *et al.*, 2001).

Por otro lado, fracciones cromatográficas de extractos celulares de *Aschersonia tubulata* BCC 1785, hongo insecto-patógeno, contenían varios compuestos triterpénicos, entre ellos el dustatin y un compuesto nuevo 3<sup>2</sup>-acetoxo-15, 22-dihidroxyhopano, los cuales tuvieron una CMI de 12.5 µg/ml contra *M. tuberculosis* (Boonphong, *et al.*, 2001).

A partir de la parte aérea de la planta *Physalis angulata* se obtuvieron los compuestos puros physalina B y D que mostraron CMIs de 128 y 32 µg/ml contra *M. tuberculosis* cepa H37Rv respectivamente (Januárico, *et al.*, 2002).

El extracto etanólico y las fracciones hexánicas de *Morinda citrifolia* (noni) mostraron 89 % y 95 % de inhibición respectivamente contra *M. tuberculosis* a 100 µg/ml. Cuando se probaron contra *M. tuberculosis* los componentes terpénicos aislados (E)-phytol y cycloartenol, éstos registraron CMIs de 32 y 64 µg/ml respectivamente. Los aislados cetosteroides β-sitosterol, estigmasterol y el epidioxisterol registraron CMIs de 128, 32 y 25 µg/ml respectivamente, mientras que una mezcla de 2:1 de dos cetosteroides estigmasta mostró una CMI de 2.0 µg/ml (Saludes *et al.*, 2002).

Se analizó la actividad del clorhidrato de criptolepina, una sal del alcaloide indoloquinolínico de la planta medicinal africana *Criptolepis sanguinolenta*, contra micobacterias de rápido crecimiento y mostró CMI de 16 µg/ml para *Mycobacterium fortuitum*, 4 µg/ml para *M. phlei* . 2 µg/ml para *M. aurum*, 8 µg/ml para *M. smegmatis*, 32 µg/ml para *M. abscessus* , así como 12.5 µg/ml para *M. bovis* BCG (Gibbons, et al., 2003).

Investigadores mexicanos encontraron que los extractos hexánicos de *Artemisia ludoviciana*, *Chamaedora tepejilote*, *Lantana hispida*, y *Malva parviflora* tienen una CMI de 200 µg/ml contra *M. tuberculosis* y los extractos hexánico y metanólico de *Juniperus communis* una CMI de 100 µg/ml. Además el extracto hexánico de *L. hispida* mostró una CMI de 25 µg/ml contra 8 aislados de *M. tuberculosis* multi-drogoresistentes. Finalmente, una (fracción FVI) de ocho fracciones obtenidas del extracto hexánico de *L. hispida* inhibió el crecimiento de *M. tuberculosis* H37Rv y *M. avium* a una concentración de 12.5 µg/ml. (Jiménez, et al., 2003).

## **2.8. Plantas utilizadas en este estudio.**

### **Los nogales**

La información acerca de la utilización de los nogales en la medicina tradicional contra la tuberculosis data de la época de los romanos quienes lo dedicaron a Júpiter, y de aquí su nombre latino *juglans*, abreviatura de *jovis glans*, que

significa nuez de Júpiter. Dioscórides y Plinio lo recomendaron únicamente en aplicaciones externas en las mordeduras de perros y hombres, y para sanar gangrenas (Chamouleau, 1990). En México, Esteyneffer en 1710 menciona en su obra "Florilegio Medicinal de todas las Enfermedades" al Nogal de Castilla y sus usos en la tisis. Gregorio López en el siglo XVII refiere su uso "...contra mordeduras de perros rabiosos y del hombre; en gangrenas, carbuncos y en la tiña...". En el siglo XX Maximino Martínez la reporta como: antiblenorrágico y antiescrofuloso. Años después la Sociedad Farmacéutica de México cita los siguientes usos: aftas, antiblenorrágico, antiescrofuloso, astringente, cicatrizal, regenerativo, depurativo, eupéptico, metrorragias y otitis. A diferencia del nogal de Castilla, *C. illinoensis* tiene poca documentación sobre sus aplicaciones medicinales y cuando se leen dan la impresión de que se confunden con las del nogal de Castilla. Los indios de Norte América utilizaron preparaciones de las especies de *Carya* con fines medicinales durante siglos (Grauke, 1988). Según registros históricos, la tribu Kiowa utilizaba cocimientos de la corteza del nogal pecanero (*C. illinoensis*) para el tratamiento de la tuberculosis, así como la tribu comanche utilizaba las hojas molidas frotadas en la piel afectada por parásitos (<http://www.umd.umich.edu/egi-bin/herb>). Por otro lado, el nogal gozaba de una buena reputación para aliviar la tuberculosis de acuerdo con el testimonio de personas de más de 70 años de edad en los estados de Tamaulipas y Nuevo León, quienes recuerdan el uso del té de corteza de nogal para tratar la tuberculosis hace mas de cincuenta años, antes del advenimiento de los modernos fármacos anti-TB, (comunicación verbal). En la región de Parras, Coahuila, la gente acostumbra tomar el té de hojas de nogal para la tos, aunque

no la refieren para la tuberculosis (comunicación verbal). Los nogales pertenecen a la orden de los Juglandales, esta orden comprende una sola familia, Juglandaceae. Los registros fósiles más antiguos de esta familia datan del periodo Cretáceo, hace aproximadamente 135 millones de años (Grauke, 2004). La familia Juglandaceae son árboles caducifolios, leñosos, de flores monoicas, unisexuales, apétalas, hojas innatas compuestas y espaciadas, y fruto en nuez rodeado de una especie de cúpula. La familia Juglandaceae abarca siete géneros los cuales comprenden aproximadamente 70 especies (Brison, 1974).

**Tabla 1.-** Plantas más conocidas de la familia Juglandaceae.

<b>Género</b>	<b>Especie</b>	<b>Nombre común</b>
<i>Juglans</i>	<i>nigra</i>	Nogal negro
<i>Juglans</i>	<i>regia</i>	Nogal persa, nogal de Castilla, Walnut
<i>Juglans</i>	<i>microcarpa</i>	Nogal negro de Texas
<i>Juglans</i>	<i>rupestris</i>	Nogal (nuez) de piedra
<i>Juglans</i>	<i>major</i>	Nogal negro de Arizona
<i>Juglans</i>	<i>cinerea</i>	Nogal (nuez) de mantequilla
<i>Juglans</i>	<i>sieboldiana</i>	Nogal japonés
<i>Pterocarya</i>	<i>stenoptera</i>	Nuez alada de China
<i>Carya</i>	<i>illinoensis</i>	Nogal pecadero y hicory
<i>Carya</i>	<i>aquática</i>	Nogal amargo
<i>Carya</i>	<i>laciniocea</i>	Nogal de corteza fina
<i>Carya</i>	<i>ovata</i>	Nogal peludo
<i>Carya</i>	<i>texana</i>	Nogal negro
<i>Carya</i>	<i>alba</i>	Nogal blanco

### **2.8.1. *Juglans regia***

#### ***Clasificación Botánica***

Reino *Plantae*

Subreino *Tracheobionta*.

Superdivisión *Spermatophyta*.

División *Magnoliophyta*.

Clase *Magnoliopsida*.

Subclase *Hamamelidae*.

Orden *Juglandales*.

Familia *Juglandaceae*.

Género *Juglans* L.

Especie *Juglans regia* L.

#### **Descripción.**

Conocido como hoja de nogal, nogal de Castilla, nogal persa, nuez, nuez criollo, nuez de Castilla. Árbol que mide de ocho a quince metros de altura, con hojas de tres a cuatro centímetros de largo de color verde claro y lisas por el anverso, y en el reverso con pelos suaves (Martínez, 1987). Los frutos se encuentran en pares y la semilla es una bellota con forma ovoide. Originaria del sureste de Europa, oeste de Asia; Asia occidental, región del Himalaya. *J. regia* vive en

clima templado entre los 1600 a los 2,750 m snm. Asociada a bosque mixto de pino-encino y de juníferos (INI, 1989). De las hojas se han identificado los monoterpenos borneol, beta-farneseno, limoneno, linalol, mirceno,  $\alpha$  y  $\beta$  ocimeno,  $\alpha$  y  $\beta$  pineno y sabineno; Los sesquiterpenos cariofileno,  $\alpha$  farneseno y germacreno; y la juglona. En las hojas y pericarpio del fruto se han encontrado los componentes ácidos caféico, clorogénico, cumárico, ferúlico y sinápico. El fruto contiene las quinonas juglona y 1,4-naftaquinona. En la corteza la juglona y regiolona; los triterpenos betulina y ácido botulínico;  $\beta$  sitosterol; el alcaloide berberina; el flavonoide catequina; y el ácido cafeico. La raíz contiene las quinonas juglona, 3-3'-bis-juglona y ciclo-tri-juglona; y beta sitosterol. El extracto etanólico de tallo mostró actividad contra *Candida albicans*, *C. tropicales*, *Sporotrichium schenkii*, además de actividad antihelmíntica del acuoso sobre *Haemonchus contortis*. La dosis letal media de los extractos etanólico-acuoso de hoja y corteza en ratones por vía intraperitoneal resultó de 1000 mg/Kg, y de 75 mg/Kg respectivamente (INI, 1989). Extractos acuosos de *J. regia* inhibieron el crecimiento de los dermatofitos *Microsporum canis* y *Trichophyton violaceum*, (Ali-Shtaych, 1999).

## 2.8.2. *Carya illinoensis*

### Clasificación Botánica

Reino *Plantae*

Subreino *Tracheobionta*.

Superdivisión *Spermatophyta*.

División *Magnoliophyta*.

Clase *Magnoliopsida*.

Subclase *Hamamelidae*.

Orden Juglandales.

Familia *Juglandaceae*.

Género *Carya Nutt.*

Especie *Carya illinoensis* (Wangenh.) K

### Descripción

*Carya illinoensis* se localiza en los estados del norte de México, en algunos estados del centro de México y casi la mitad del territorio de Estados Unidos. También conocido como nogal liso, nogal pecanero, pecan, hickory. Manchester (1981) indica que la familia Juglandaceae es originaria de Norte América, indicando que esta área es el origen de la familia. Cabeza de Vaca en 1533 describe este nogal y las nueces comparándolas con la nuez de Galicia (Castilla), en el río Guadalupe en Texas (Brison, 1974).



### 2.8.3. *Juglans mollis*

#### Clasificación Botánica

Reino *Plantae*

Subreino *Tracheobionta*.

Superdivisión *Spermatophyta*.

División *Magnoliophyta*.

Clase *Magnoliopsida*.

Subclase *Hamamelidae*.

Orden Juglandales.

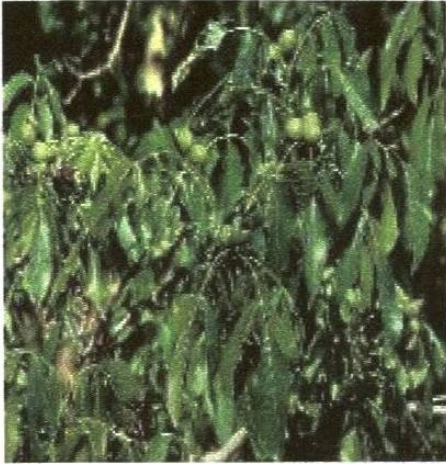
Familia *Juglandaceae*.

Género *Juglans* L.

Especie *Juglans mollis*.

#### Descripción

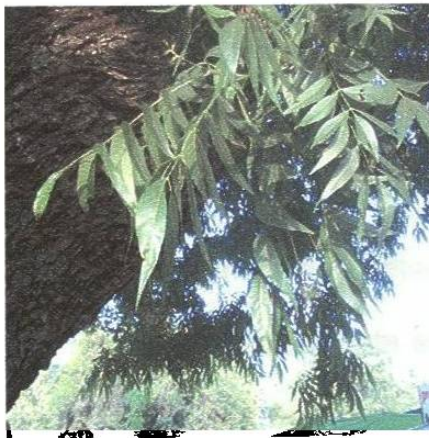
Llamado nogal de nuez meca y nogal encarcelado, es un nogal silvestre que crece en áreas cercanas a ríos y arroyos, alcanza hasta 18 m de altura. Hojas compuestas de 9 a 5 hojuelas afelpadas. Las nueces no comestibles, de 3 a 4 cm, de la forma, color y tamaño de un limón. Se localiza en Nuevo León y Norte de S.L.P. (Martínez, 1987). Abunda en las riveras de arroyos y ríos que cruzan la carretera Nacional, en La Estanzuela, en Villa de Santiago N.L., en Allende, N.L. y en el municipio de Guadalupe, N.L. a lo largo del río La Silla. No posee referencias en cuanto a usos medicinales en la literatura.



**Figura 1.-** Fotografía del nogal *Juglans regia*.



**Figura 2.-** Fotografía del nogal *Carya illinoensis*



**Figura 3.-** Fotografía del nogal *Juglans mollis*.

### 3. JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO

Tres razones principales justifican la necesidad de desarrollar nuevos medicamentos anti-TB: (1) mejorar los tratamientos actuales acortando la duración del tratamiento y/o proveyendo tratamientos intermitentes mas ampliamente espaciados, (2) mejorar el tratamiento de la TB-MDR, y (2) suministrar un tratamiento mas efectivo a la infección de la tuberculosis latente en programas que permitan implantar esta práctica (O'Brien y Nunn, 2001). El crecimiento reciente de la incidencia de la tuberculosis, con cifras alarmantes de mortalidad a nivel mundial, pero sobre todo en países en vías de desarrollo (OMS, 2004), hacen prioritario la búsqueda de nuevos y mas efectivos fármacos anti-TB que provean una terapéutica antimicrobiana adecuada para reducir de manera notoria la cantidad de bacilos viables, y con el tiempo detener la enfermedad (Schlossberg, 1999).

Por otro lado, debido a que muchos productos naturales usados en medicina tradicional involucran componentes que no han sido rigurosamente caracterizados, existe una gran necesidad de validar científicamente los usos populares de muchas plantas a través de procedimientos científicos (Talalay, 2001). Este trabajo aporta elementos que validan el uso de diferentes partes, de tres especies de nogales en el tratamiento de la TB, introduciendo estas plantas en el estudio de sus actividades anti-TB.

## 4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

### 4.1. Hipótesis

Los extractos de corteza y hoja de *Juglans regia*, *Juglans mollis* y *Carya illinoensis* presentan actividad *in vitro* contra *Mycobacterium tuberculosis*.

### 4.2. Objetivo general

Determinar la actividad anti-micobacteriana *in vitro* de los extractos acuoso, etanólico, metanólico y hexánico de la corteza y hoja de *Juglans regia*, *Juglans mollis* y *Carya illinoensis*.

### 4.3. Objetivos específicos

1. Localizar, identificar y recolectar muestras de las tres especies de nogales en estudio.
2. Obtener los extractos acuoso, etanólico, metanólico y hexánico a partir de las muestras colectadas.
3. Comprobar la actividad *in vitro* de los extractos contra *Mycobacterium tuberculosis*.
4. Identificar parcialmente los compuestos de los extractos que presenten actividad.

## 5. MATERIAL Y MÉTODOS

### 5.1 Recolección:

Se llevó a cabo la recolecta de muestras de hoja y corteza de *J. regia*, *J. mollis* y *C. illinoensis*. Las muestras de hoja y corteza de *J. regia* L., fueron recolectadas en la comunidad de Mineral del Chico, en el estado de Hidalgo, durante el mes de julio por ser el mes previo al inicio de la defoliación. *J. mollis* fue recolectada en la comunidad de El Álamo, Villa de Santiago, Nuevo León, durante el mes de junio. *C. illinoensis* fue recolectada en Monterrey Nuevo León, durante el mes de junio del 2002. El material recolectado se dejó secar a temperatura ambiente a la sombra. Se depositó una muestra de cada especie en el herbario IMSSM para su clasificación y obtención del número de voucher.

### 5.2 Obtención de Extractos:

De cada muestra de hojas y corteza de los tres nogales se obtuvo un extracto acuoso, etanólico, metanólico y hexánico.

*Extracto acuoso:* Muestras de corteza y hojas se molieron por separado, la corteza en molino eléctrico y la hoja en licuadora eléctrica. De cada muestra molida se pesaron 15 g y se agregaron a 250 ml de agua en ebullición retirándose inmediatamente del fuego. La infusión se dejó en reposo hasta que alcanzó la temperatura ambiente. El extracto resultante de cada uno se filtró a través de papel filtro y se liofilizó. Se colocaron los extractos en frasco oscuro

para su almacenamiento a temperatura ambiente. Para las pruebas, la concentración de las soluciones se ajustó con agua bidestilada y se esterilizaron por filtración.

*Extracto Etanólico:* Muestras de corteza y hojas se molieron por separado, la corteza en molino eléctrico y la hoja con liquidadora eléctrica, de cada uno de éstos materiales se pesaron 60 g y se maceraron con 60 g de etanol (76.4 ml) hasta obtener una pasta. Estos materiales se dejaron reposar por una semana en frasco oscuro, aplicando agitación manual diaria. Posteriormente se filtró por presión mecánica a través de un lienzo de algodón crudo. El extracto resultante se llevó a sequedad total en un rotavapor. Para los bioensayos, el extracto se resuspendió y ajustó a las concentraciones deseadas con dimetilsulfóxido (DMSO) y se esterilizó por filtración. Los extractos se almacenaron en frasco de vidrio oscuro, a temperatura ambiente, por no más de 3 meses.

*Extracto Hexánico:* Muestras de la corteza y hojas, se molieron por separado hasta obtener un polvo fino, de este material se pesaron 60 g y se colocaron con 700 ml de hexano bajo reflujo continuo en soxtlet por 7 días. El extracto resultante se llevó a sequedad total en rotavapor. Los extractos se conservaron en frasco de vidrio oscuro, a temperatura ambiente hasta la fecha de los bioensayos (no mas de seis meses). Para las pruebas se resuspendió y ajusto a las concentraciones deseadas con DMSO, y se esterilizó por filtración

*Extracto Metanólico:* Las muestras residuales de corteza u hojas de la extracción por hexano se colocaron en 700 ml de metanol bajo reflujo continuo en soxhlet por 7 días. El extracto resultante se llevó a sequedad total en rotavapor. Los extractos se conservaron en frasco de vidrio oscuro, a temperatura ambiente, hasta la fecha de los bioensayos (no mas de seis meses). Para las pruebas se resuspendió y ajustó a las concentraciones deseadas con DMSO y se esterilizó por filtración.

### **5.3. Determinación de la actividad de los extractos sobre *M. tuberculosis***

#### **5.3.1 Microorganismo de prueba**

*Mycobacterium tuberculosis*, cepa H37Rv. Los bacilos se cultivaron a 37°C por diez días, en medio Middlebrook 7H9 (7H9) suplementado con AODC. Para los ensayos de actividad antimicrobiana, la densidad de los cultivos se ajustó con el nefelómetro de McFarland al tubo No.1 (D.O. de 0.6) y se diluyó 25:1 para obtener una concentración final de  $1 \times 10^4$  bac/ml. Esta densidad bacteriana fue utilizada para inocular la microplaca.

#### **5.3.2. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria.**

Para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) se utilizó El Ensayo del Método Azul de Alamar (EMAA), el cual es un indicador de óxido-reducción que presenta un cambio de color al ser reducido por organismos vivos (Yajko, 1995) y permite una lectura visual directa de los resultados (Collins y Franzblau, 1997; Palomino y Portaels, 1999).

Se prepararon soluciones de trabajo de los extractos, diluyendo con agua o DMSO como se indicó anteriormente. En microplacas de 96 pozos se colocaron en una hilera las concentraciones iniciales (1000, 100 y 10  $\mu\text{g/ml}$ ) de los diferentes extractos a probar. Todos los extractos se probaron por triplicado. A partir de las concentraciones iniciales, se efectuaron diluciones seriadas 1:2 de los extractos en las microplacas (concentración final de 3.90, 0.390 y 0.039  $\mu\text{g/ml}$ ). Una hilera se dejó sin extracto, el cual sirvió como control positivo de crecimiento bacteriano. Se realizaron las mismas diluciones con DMSO, utilizado como disolvente en la preparación de las muestras. Todos los pozos del perímetro externo de la placa se llenaron con 200  $\mu\text{l}$  de agua bidestilada con la finalidad de mantener la humedad en toda la microplaca. Como control positivo de actividad antifúngica se utilizó la isoniacida (concentración inicial de 125  $\mu\text{g/ml}$ ). Una vez preparadas todas las diluciones de los extractos, se colocaron 100  $\mu\text{l}$  de la dilución 1:25 de la suspensión bacteriana en medio 7H9 suplementado con OADC en todos los pozos. Las microplacas fueron incubadas a 37°C por 5 días, agregándose al quinto día a un pozo de control positivo de crecimiento, 50  $\mu\text{l}$  de solución de una mezcla 1:1 de Azul de Alamar y tween 80 al 10%. Las placas fueron reincubadas a 37°C por 24 h más. Posterior a la incubación, en caso de no virar, el colorante era agregado a otro pozo control y reincubado un día más. Si el color del pozo viró hacia rosa indicó el crecimiento de las micobacterias, y se procedió a agregar la solución de Azul de Alamar al resto de los pozos, e incubándose por otras 24 h. Luego de este tiempo, aquellos pozos con color rosa bien definido fueron registrados como positivos para el crecimiento. Se definió la concentración



mínima inhibitoria (CMI) como la concentración más baja del extracto que previno el cambio de color hacia rosa. (Collins y Franzblau, 1997; Palomino y Portaels, 1999). Todos aquellos extractos que presentaron CMI de 125 µg/ml o menos fueron considerados activos. Los extractos que presentaron actividad por debajo de 100 µg/ml fueron probados a concentraciones menores.

#### **5.4 Pruebas de identificación de grupos químicos**

Las pruebas de identificación de grupos químicos se realizaron de acuerdo a lo propuesto por Domínguez, 1973.

Naftaquinonas y antraquinonas: prueba de Börntrager. Se hirvió por 10 min una pequeña porción de extracto con hidróxido de potasio (KOH 2-5%) para luego enfriarla, se aciduló con HCl 1N y se extrajo con benceno. La capa se separó y se agitó con un poco de la solución de KOH. Si la fase del benceno se decoloró y la alcalina se tornó roja, esto indicó presencia de quinonas.

Identificación de lactonas: se hicieron reaccionar 1-2 mg de una porción de extracto con solución alcohólica de hidróxido de sodio (NaOH) al 10%. Un color amarillo o anaranjado que desapareció al agregar unas gotas de ácido clorhídrico indicó la presencia de un anillo lactónico.

Identificación de flavonoides: se disolvió una pequeña porción de extracto en etanol, tratándola con limaduras de magnesio (Mg) y aplicándole calor (60°C),

luego se agregaron unas gotas de ácido clorhídrico concentrado, la prueba se consideró positiva al presentar colores naranja, rojo, rosa-azul o violeta.

Identificación de sesquiterpenlactonas: prueba de Baljet. Se utilizaron 2 soluciones que se mezclaron en volúmenes iguales antes de usarse. Sol A: 1 g de ácido pícrico en 100 ml de etanol. Sol B: 10 g de NaOH en 100 ml de agua. Se colocaron de 2-3 mg del extracto y de tres a cuatro gotas de reactivo. Un color naranja o rojo fue positivo.

Identificación de insaturaciones: Prueba de permanganato de potasio ( $\text{KMnO}_4$ ). Se agregó a una pequeña porción del extracto gota a gota, una solución de  $\text{KMnO}_4$  al 2 % en agua. Se registró como positiva si el extracto presentó una decoloración al aplicar más de tres gotas de reactivo.

Prueba para oxihidrilos fenólicos: prueba del cloruro férrico  $\text{FeCl}_3$ . Se disolvieron 1 a 2 mg del extracto muestra en 1 ml de etanol, mas una gota de solución de cloruro férrico en agua al 15 %. Fue positiva para la presencia de oxihidrilos fenólicos la aparición de coloración o precipitado rojo, azul violeta o verde.

Triterpenos y esteroides: prueba de Liebermann-Burchard. Se disolvieron 1.5 mg de extracto muestra en cloroformo para luego añadirse el reactivo que se preparó agregando una gota de ácido sulfúrico en una mezcla de 1 ml de anhídrido acético con 1 ml de cloroformo. La aparición de cualquier color en el

lapso de una hora indicó que es positiva. La prueba fue positiva para esteroides si hubo formación de color azul o verde, y para triterpenos si hubo rojo anaranjado, violeta o morado.

Coumarinas: Se disolvió una porción de extracto muestra (1-2 mg) en solución alcohólica de KOH al 10 %. Una coloración amarilla, que desapareció al acidular con HCL 1N se registró como positiva.

Alcaloides: prueba de Dragendorff. El reactivo de Dragendorff se preparó mezclando 5 ml de la solución A (0.85 g de nitrato de bismuto en una mezcla de 10 ml de ácido acético glacial y 40 ml de agua) y 4 ml de solución B (8 g de yoduro de potasio en 20 ml de agua), este reactivo es estable por un año. Se disolvieron de 1-2 mg de la muestra en etanol y se colocaron unas gotas en una placa de porcelana, luego se añadieron unas gotas del reactivo de Dragendorff. La prueba fue positiva al aparecer un precipitado naranja marrón.

## 6.-RESULTADOS

### 6.1. Recolección y clasificación del material vegetal

Las muestras de hoja y corteza de *Juglans regia* L., fueron recolectadas en la comunidad de Mineral del Chico, en el estado de Hidalgo, durante el mes de julio del 2002. *Juglans mollis* fue recolectada en la comunidad de El Álamo, Villa de Santiago, Nuevo León, durante el mes de junio del 2002. *Carya illinoensis* fue recolectada en Monterrey Nuevo León, durante el mes de junio del 2002. Se envió una muestra de cada especie al Herbario IMSSM en la Ciudad de México, donde fueron identificadas y depositadas como: *Juglans mollis*, *Juglans regia* y *Carya illinoensis* con los números de voucher 14319, 14318 y 14320 respectivamente.

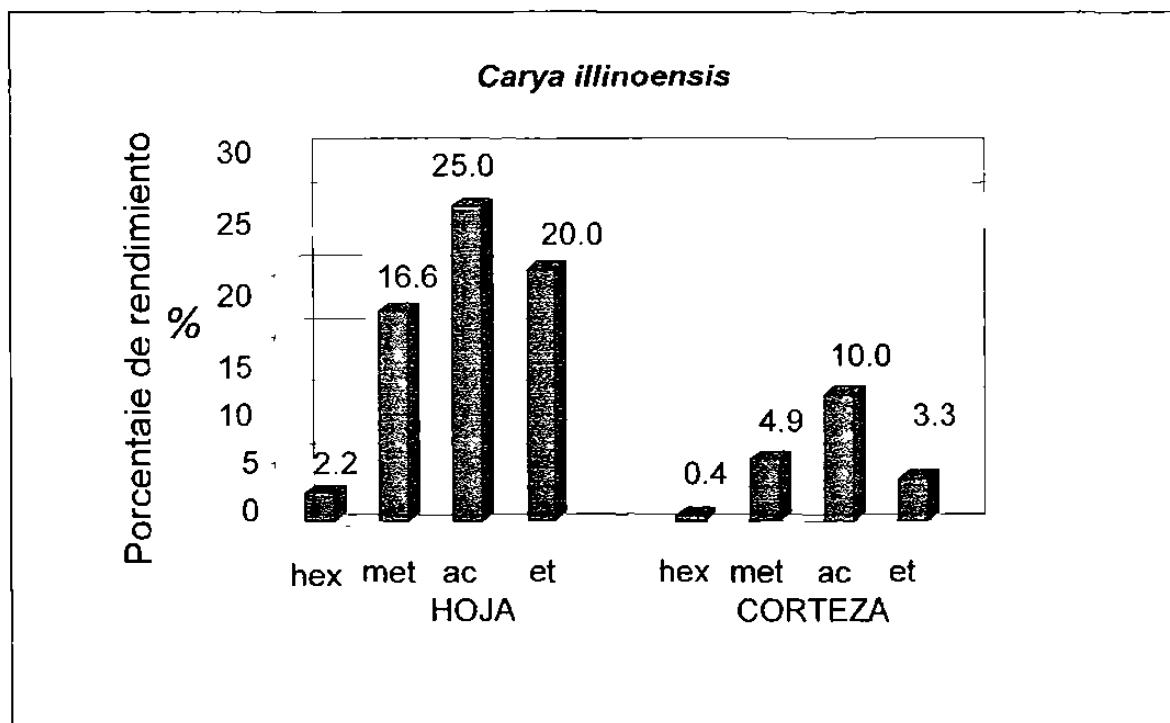
**TABLA 2.-** No. de voucher y de origen de las tres especies de nogales.

<b>Especie de nogal</b>	<b>No. de voucher</b>	<b>Lugar de recolección</b>
<i>Carya illinoensis</i>	14320	Monterrey, N. L.
<i>Juglans mollis</i>	14319	Santiago, N.L.
<i>Juglans regia</i>	14318	Mineral del Chico, Hgo.

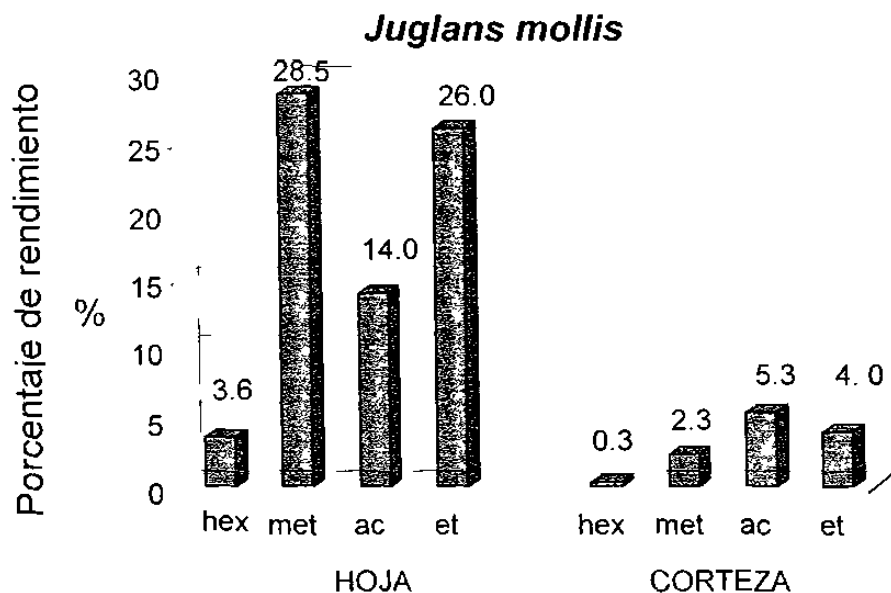
### 6.2. Rendimientos de los Procesos de Extracción.

Los rendimientos de los procesos de extracción se calcularon pesando el total de la muestra molida (antes de entrar al proceso de extracción), y pesando la porción del extracto seco. Luego el peso de la muestra al inicio se dividió entre el peso de la muestra al final del proceso de extracción y se multiplicó por 100.

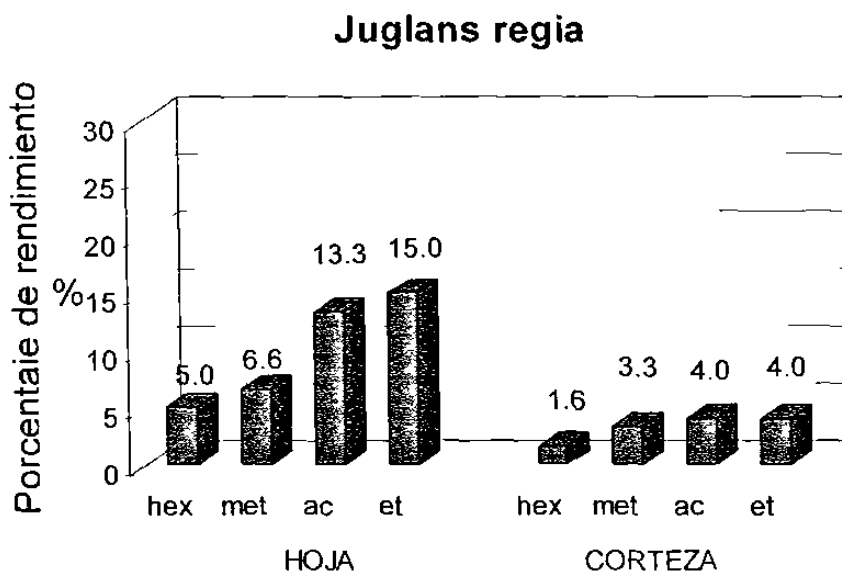
Encontramos los máximos rendimientos en los extractos alcohólicos y acuosos de las hojas: 16.6% (metanólico), 25% (acuoso) y 20% (etanólico) en *C. illinoensis*; 14% (acuoso), 28.5% (metanólico) y 26% (etanólico) en *J. mollis*; y 6.6% (metanólico), 15% (etanólico) y 13.3% (acuoso) en *J. regia*. En cambio los rendimientos más bajos están en los extractos hexánicos de cortezas registrando en *C. illinoensis* 0.4%, *J. mollis* 0.3% y *J. regia* con 1.6% (ver gráficas 1, 2 y 3).



**Figura 4.-** *Carya illinoensis*. Porcentajes de rendimientos de extracción con solvente hexánico (hex), metanólico (met), acuoso (ac) y etanólico (et).



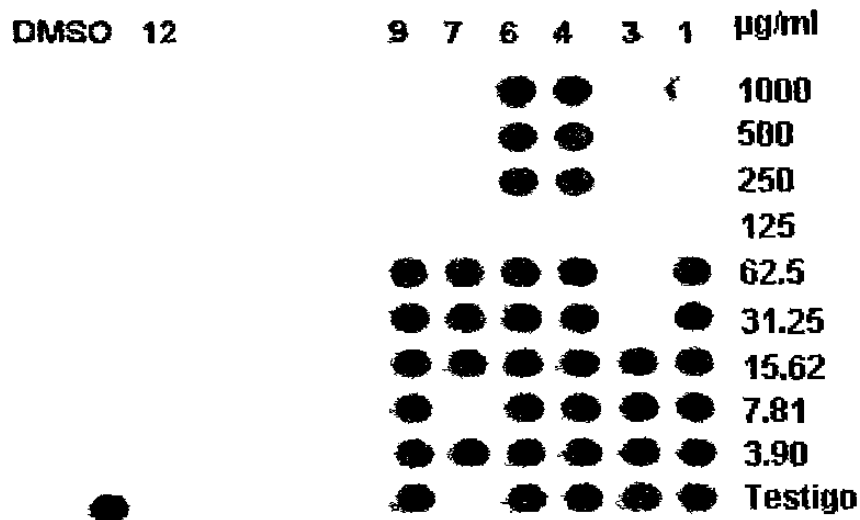
**Figura 5.-** *Juglans mollis*. Porcentaje de rendimientos de extracción con solvente hexánico (hex), metanólico (met), acuoso (ac) y etanólico (et).



**Figura 6.-** *Juglans regia*. Porcentaje de rendimientos extracción con solvente hexánico (hex), metanólico (met), acuoso (ac) y etanólico (et).

### 6.3. Concentraciones mínimas inhibitorias de los extractos contra *M. tuberculosis*.

La determinación de la CMI de los extractos vegetales sobre *M. tuberculosis* H37Rv se realizó mediante la técnica de azul alamar. Los extractos probados que presentaron la mejor actividad fueron: los hexánicos de corteza de *C. illinoensis*, *J. mollis* y *J. regia* con una concentración mínima inhibitoria (CMI) de 31.25, 50 y 100 µg/ml respectivamente. El extracto etanólico de corteza de *J. mollis* también presentó una CMI de 100 µg/ml. Todos los extractos restantes de *C. illinoensis* y *J. mollis* con excepción de los acuosos y el metanólico de *J.regia* presentaron una CMI de 125 µg/ml, (Tabla 2).



**Figura 7.-** Determinación de actividad antimicobacteriana de los extractos de *C. illinoensis* sobre *M. tuberculosis* cepa H37Rv mediante la técnica de azul alamar. Columna 1: extracto hexánico de hoja; columna 3: extracto hexánico de corteza; columna 4: extractos metanólico de hoja; columna 6: extractos metanólico de corteza; columna 7: extracto etanólico de hoja y columna 9 extracto etanólico de corteza. Las concentraciones usadas están dadas en µg/ml.

**Tabla 3.-**Concentraciones mínimas inhibitorias de las tres especies de nogal.

Nogal	Concentracion Minima Inhibitoria		
	Extractos	Hoja (µg/ml)	Corteza (µg/ml)
<i>Carya illinoensis</i>	hexánico	125	31.25
	metanólico	125	125
	etanólico	≥ 125	125
	acuoso	-	≥1000
<i>Juglans mollis</i>	hexánico	125	50
	metanólico	≥ 125	125
	etanólico	125	100
	acuoso	≥1000	≥1000
<i>Juglans regia</i>	hexánico	≥1000	100
	metanólico	125	≥1000
	etanólico	≥1000	>1000
	acuoso	≥1000	≥1000
Isoniacida (0.036 µg/ml)			

#### 6.4 Identificación de grupos químicos.

**C. illinoensis.** Del total de grupos químicos estudiados mediante pruebas químicas coloridas en la hoja y corteza de esta especie, resalta la presencia de triterpenos y quinonas en el extracto de la corteza. Lo mismo en cuanto a esteroides y lactonas pero en hoja. Aparecen cumarinas solamente en los extractos hexánicos de hoja y corteza (Ver Tabla 3).



**Tabla 4.-** Identificación de grupos químicos en los extractos de *Carya illinoensis*.

<i>Carya illinoensis</i>	HOJA				CORTEZA			
	aq	et	met	hex	aq	et	met	hex
<b>Esteroles y triterpenos</b>	√	√	√	√	√	√	√	√
<b>alcaloides</b>	√				√			
<b>quinonas</b>	√				√	√	√	√
<b>lactonas</b>	√	√	√	√				
<b>sesquiterpenlactonas</b>	√	√			√	√	√	
<b>oxidrilos fenólicos</b>	√	√			√	√		
<b>cumarinas</b>				√				√
<b>flavonoides</b>	√		√		√	√	√	

**J. mollis.** Del total de grupos químicos estudiados mediante pruebas químicas coloridas en la hoja y corteza de esta especie, se observó la presencia de triterpenos y sesquiterpenlactonas en los extractos etanólico, metanólico y hexánico de corteza. Las quinonas aparecieron solamente en el extracto etanólico de corteza y los alcaloides en los extractos acuoso y etanólico de hoja y corteza, y metanólico de hoja. No detectamos lactonas en el extracto hexánico de hoja y corteza. Mientras que se detectaron esteroides, sesquiterpenlactonas y oxihidrilos fenólicos en los extractos etanólico, metanólico y hexánico de hoja (Ver Tabla 4).

**Tabla 5.- *Juglans mollis*.** Resultados de las pruebas de identificación de grupos químicos.

<i>Juglans mollis</i>	HOJA				CORTEZA			
	aq	et	met	hex	aq	et	met	hex
esteroles y triterpenos		√	√	√		√	√	√
alcaloides	√	√	√		√	√		
quinonas						√		
lactonas	√	√	√		√	√	√	
sesquiterpenlactonas		√	√	√		√	√	√
oxidrilos fenólicos	√	√	√	√		√	√	
cumarinas								
flavonoides					√		√	

*J. regia*. Se detectó la presencia de triterpenos y oxihidrilos fenólicos en los extractos etanólico, metanólico y hexánico de corteza. Quinonas estuvieron presentes solamente en los extractos etanólico de corteza (como en *J. mollis*). Los oxihidrilos fenólicos también estuvieron presentes en los cuatro extractos de hoja. Se detectaron alcaloides en el extracto acuoso y metanólico de hoja. Mientras que se encontraron lactonas y sesquiterpenlactonas en los extractos acuoso, etanólico y metanólico de hoja y metanólico de corteza. Los extractos etanólico, metanólico y hexánico de hoja contenían esteroides (Tabla 5).

**Tabla 6.- *Juglans regia*. Resultados de las pruebas de identificación de grupos químicos.**

<b><i>Juglans regia</i></b>	<b>HOJA</b>				<b>CORTEZA</b>			
	aq	et	met	hex	aq	et	met	hex
<b>esteroles y triterpenos</b>		√	√	√		√	√	√
<b>alcaloides</b>	√		√					
<b>quinonas</b>						√		
<b>lactonas</b>	√	√	√			√	√	
<b>sesquiterpenlactonas</b>	√	√	√				√	
<b>oxidrilos fenólicos</b>	√	√	√	√		√	√	√
<b>cumarinas</b>			√				√	
<b>flavonoides</b>								√

## 7. DISCUSIÓN

El conocimiento empírico y/o popular del uso de plantas con fines medicinales es una base sólida que sirve como un factor orientador y predictivo en la búsqueda e identificación de nuevos agentes terapéuticos. Esta información constituye un criterio etnobotánico que hemos utilizado para la selección de tres especies de nogal y analizar su actividad contra la cepa H37Rv de *M. tuberculosis*.

Los nogales han sido, a través de la historia, parte integrante de numerosas preparaciones, y su uso medicinal es mencionado por Dioscórides al igual que Plinio quienes la recomiendan en aplicaciones externas contra mordeduras y gangrenas, posteriormente Galeno recomienda al nogal como astringente y tónico para la sangre. Su uso en la "tisis", término griego que significa acabamiento, aparece en Europa en libros de herbolaria. En 1708, Juan de Esteyneffer, médico y farmacéutico que estudió en Praga y que en 1700 se incorporó a las misiones del noroeste de La Nueva España, menciona los usos del nogal de Castilla (*Juglans regia*) tanto en la tisis como en la "escrofulosis", término empleado para designar la tuberculosis ganglionar. Podemos decir que el uso del nogal en la tuberculosis por lo tanto, fue introducido en América por los misioneros que practicaban medicina. Posteriormente, Vestal y Schultes (1939) mencionan el uso de la corteza de nogal pecanero (*C. illinoensis*) en la tuberculosis por los indios de la tribu Kiowa.

En Nuevo León y Tamaulipas, hasta el advenimiento de los antibióticos anti-TB, la gente empleaba la corteza del nogal pecanero en el tratamiento de la tuberculosis, además de usarlo como antibiótico, antifúngico y antiséptico local.

Por otro lado, para la preparación de los extractos de nogal, eligimos los extractos acuosos y etanólicos de hoja y de corteza, por ser los más usados a nivel popular. A nuestro estudio agregamos los extractos obtenidos por reflujo con metanol y hexano con la finalidad de incluir compuestos con diferente polaridad. Así tendríamos desde moléculas no polares extraídas con el hexano hasta aquellas altamente polares extraídas con agua.

Los porcentajes de rendimientos de las muestras sometidas a los procesos de extracción fueron diferentes para cada muestra. Los más elevados, en orden decreciente, fueron los extractos etanólico, metanólico y acuoso de hojas, y los más bajos los hexánicos de corteza. Dada la actividad antimicobacteriana encontrada en los extractos etanólicos y metanólicos de las hojas y sus altos rendimientos en la obtención de los extractos, permiten considerarlos como un posible fitoquímico al alcance de aquellos enfermos de escasos recursos. Además, las hojas del *Carya illinoensis* constituyen un recurso natural medicinal renovable, ya que esta especie es un nogal que desfolia anualmente y abunda en los estados del norte de México y gran parte de los Estados Unidos de América, en donde es extensamente cultivado para la comercialización de sus frutos. Para ello es necesario continuar los estudios para validar su aplicabilidad a nivel clínico en pacientes con tuberculosis.

Las diferencias en las características genéticas de las tres especies de nogales en este estudio, y sus condiciones de crecimiento (ubicación sobre el nivel del mar, características del suelo, clima, precipitación pluvial anual, humedad relativa en el ambiente, condiciones de los nogales, así como el mes en que se efectuaron las recolectas, pueden influir en las variaciones de los porcentajes de los rendimientos obtenidos, en los compuestos presentes y en su concentración. Brison (1975) reportó que todos estos factores afectan en la producción del fruto, en calidad y cantidad del mismo, la floración, los tallos, etc. En el presente trabajo cuidamos de registrar el sitio exacto de colecta y hacerla durante la misma época del año para reducir esta variación lo más posible.

Para determinación de la actividad antimicobacteriana, utilizamos el Ensayo del Método Azul de Alamar (EMAA) por ser este un método sencillo que emplea una concentración crítica de cada droga, con resultados disponibles dentro de 8-10 días, y que permite una lectura visual directa de los mismos (Palomino, 1999). Este método es utilizado en pruebas para medir la viabilidad, toxicidad y crecimiento celular. El reactivo de Azul de Alamar cambia de azul cuando se encuentra en estado oxidado, a rosa cuando es reducido, no requiere el uso de radioisótopos, y es ideal para determinación de concentraciones mínimas inhibitorias (Yajko, 1995). Además, adaptado a un sistema de microplaca facilita la determinación de CMI en una gran cantidad de compuestos de manera rápida y confiable (Collins y Franzblau, 1997).

La reducción del Azul Alamar, se lleva a cabo en el ambiente interno de la célula metabólicamente activa el cual está más reducido que el de las células no viables. De manera específica, moléculas con capacidad reductora (intermediarios metabólicos) aceptores de electrones, mantienen una relación - NADPH/NADP, FADH/FAD, FMNH/FMN, y NADH/NAD - que se incrementa durante la proliferación celular (Bhagavan, 1983). Algunos compuestos tales como las sales de tetrazolium y el Azul de Alamar son reducidos por estos intermediarios metabólicos, resultando útiles en el monitoreo de células viables, ya que su reducción es acompañada de un cambio en su color, detectable visualmente y medible espectrofotométricamente. El potencial de oxidación-reducción del Azul de Alamar es +380 mV a pH 7.0, a 25°C. Por lo tanto, el Azul de Alamar puede ser reducido por NADPH ( $E_o = -320$  mV), FADH ( $E_o = -220$  MV), FMNH ( $E_o = -210$  mV), NADH ( $E_o = -320$ mV), al igual que los citocromos ( $E_o = 290$  mV a + 80 mV). Como está comprobado que la reducción de Azul de Alamar requiere de su captación dentro de la célula, el Azul de Alamar no es reducido por compuestos en los medios de cultivo celular, implicando que la reducción del compuesto solo se debe al metabolismo dentro de las células vivas.

Los resultados indican que las tres especies de nogales presentan actividad inhibitoria antimicobacteriana, tanto en hojas como en corteza. Los extractos hexánicos de corteza fueron los que presentaron mayor actividad, mientras que ninguno de los extractos acuosos tuvo actividad. Esto ha sido visto por otros autores que han encontrado la mayor actividad antimicobacetriana en los

extractos y fracciones hexánicas. Así como reportan Jiménez-Arellanes y cols. (2003), donde los extractos hexánicos de la planta mexicana *Lantana hispida* mostraron la mayor actividad contra *M. tuberculosis* H37Rv. En otro estudio, extractos crudos y fracciones hexánicas de la planta *Morinda citrifolia*, mostraron 89% y 95% de inhibición del crecimiento de *M. tuberculosis* respectivamente. Los compuestos identificados en estas fracciones: diterpeno E-phytol y triterpeno cycloartenol, registraron CMI de 32 y 64 µg/ml respectivamente. Además los esteroides  $\beta$ -sitosterol, estigmasterol y epidioxisterol mostraron CMI de 128, 32 y 2.5 µg/ml respectivamente. Mientras que una mezcla de 2:1 de cetosteroides estigmasta-4-en-3-on y estigmasta-4-22-dien-3-ona registraron CMI de 2.0 µg/ml. Esto sugiere la prometedora actividad antimicobacteriana de las estructuras lipídicas presentes en estas fracciones (Saludes, 2002).

La presencia de triterpenos en todos los extractos activos tanto los hexánicos de corteza de las tres especies como los extractos metanólicos y etanólicos de hojas de *C. illinoensis* y *J. mollis* y metanólicos de hoja de *J. regia*, concuerda con los hallazgos de otros autores. Cantrell, y col, (1999) encontraron Triterpenos antimicobacterianos en extracto crudo de *Melia volkensii* presentando una CMI de 100 µg/ml, componentes aislados de estos mismos extractos dieron CMI de 16, 4, y 16 µg/ml. Boonphong y col, (2001) aportaron un nuevo triterpeno antimicobacteriano, el dihidroxihopano que junto con el ya conocido dustatin también de estructura triterpénica, del Hongo *Aschersonia tubulata*. dieron CMI de 12.5 µg/ml. Cantrell y col, (1996) estudiaron los



triterpenos cicloartanos de *Borrchia frutescens.*, los cuales mostraron CMI de  $\leq 10 \mu\text{g/ml}$ .

De las tres especies probadas en este trabajo, *Carya illinoensis* fue la más activa de todas, registró una CMI de  $31.25 \mu\text{g/ml}$ , a este extracto le sigue *Juglans mollis* con una CMI de  $50 \mu\text{g/ml}$  y *Juglans regia* con CMI de  $100 \mu\text{g/ml}$ .

En todos los extractos de hoja (etanólico, metanólico y hexánico de *C. illinoensis* y *J. mollis*, y metanólico de *J. regia*) que presentaron actividad se identificó la presencia de esteroides. Nuestros resultados concuerdan con lo de otros autores, ya que han sido reportadas actividad antimicrobiana de algunas estructuras lipídicas. Los aislados cetosteroides de fracciones hexánicas de *Morinda citrifolia* (noni),  $\beta$ -sitosterol, estigmasterol y el epidioxisterol registraron CMI de 128, 32 y  $25 \mu\text{g/ml}$  respectivamente, mientras que una mezcla de 2:1 de dos cetosteroides estigmasta mostró una CMI de  $2.0 \mu\text{g/ml}$  (Saludes *et al.*, 2002).

Un aspecto importante es el hecho de que analizando los resultados obtenidos, se puede observar que las CMI más importantes corresponden principalmente a los extractos hexánicos y nula actividad en los acuosos, esto podría ser explicado por el hecho de que *M. tuberculosis* está constituido por una pared celular rica en estructuras lipídicas conocidas como ácidos micólicos. Esta pared celular compleja que rodea a la membrana celular es parecida a la pared de las bacterias Gram positivas con la diferencia de poseer una capa de lípidos

(esteres micolatos) los cuales están estructurados para formar una barrera de permeabilidad a las moléculas polares (Daffé, *et.al.*, 1999). La pared celular debe ser penetrada como requisito para lograr que cualquier molécula dirigida a lograr acción anti-micobacteriana logre llegar a los sitios vulnerables del bacilo. El conocimiento de los mecanismos moleculares de los principios activos de cualquier sustancia que haya probado acción anti-micobacteriana es clave para el desarrollo de nuevos y más efectivos fármacos anti-TB.

La presencia de otros grupos orgánicos como lactonas, sesquiterpenlactonas, cumarinas, flavonoides, alcaloides, oxidrilos fenólicos, presentaron una gran variabilidad entre los diferentes extractos, en comparación a los triterpenos detectados en los extractos de corteza de los tres nogales.

Sin embargo, nuestros resultados orientan hacia los triterpenos en cuanto al grupo orgánico responsable de las actividades antimicobacterianas encontradas en los extractos hexánicos de corteza de las tres especies, y esteroides en los extractos alcohólicos de hojas, sin descartar la posibilidad de quinonas como responsables de la actividad de algunos de nuestros extractos activos.

Por otro lado es necesario realizar un fraccionamiento de los extractos que presentaron actividad para identificar plenamente al o los compuestos responsables de la actividad encontrada. De manera que aquellos no revelados en este estudio, por encontrarse en menor concentración o enmascarse con otros compuestos integrantes de los extractos, puedan ser dilucidados. Ya que

por los resultados mostrados, la familia de nogales Juglandaceae posee prometedores compuestos antimicobacterianos.

La importancia de este trabajo radica en que, de acuerdo a nuestros resultados, la familia de nogales Juglandaceae tiene actividad anti-micobacteriana, lo cual nos motiva a seguir analizando otras partes de estas plantas y otras especies de esta misma familia, en relación a la actividad anti-micobacteriana. Este trabajo aporta la introducción de tres plantas al campo de la investigación fitoquímica dirigida a encontrar nuevos productos naturales contra la tuberculosis, validando el uso dado, a través de siglos, a los nogales en el tratamiento de la tuberculosis.

## 8. CONCLUSIONES

1. Los extractos crudos de *Juglans regia*, *Juglans mollis*, y *Carya illinoensis* tienen actividad anti-micobacteriana.
2. Los extractos de nogal que presentaron la mayor actividad contra *M. tuberculosis* fueron los hexánicos de corteza de *C. illinoensis*, *J. mollis* y *J. regia* con CMI de 32.25, 50.0 y 100.0 µg/mL respectivamente, y el extracto etanólico de corteza de *J. mollis* con una CMI de 100 µg/mL.
3. En los extractos con mayor actividad se encuentran compuestos no polares, entre ellos triterpenos.
4. Los resultados obtenidos apoyan el uso de los nogales en medicina tradicional (herbolaria) en el tratamiento de la tuberculosis.
5. Este trabajo aporta alternativas de nuevas fuentes de posibles productos medicinales (extractos de nogales) con actividad biológica anti-TB.
6. Este trabajo Introduce tres especies de la familia *Juglandaceae* en la investigación biomédica, encaminada a la identificación del o los compuestos responsables de su actividad biológica en contra de *M. tuberculosis*.

## 9. PERSPECTIVAS DE INVESTIGACIÓN

- Aislar e identificar los compuestos activos presentes en los extractos crudos que presentaron una CMI hasta de 125 µg/ml.
- Ensayar la actividad antimicobacteriana en cepas de *M. tuberculosis* multidrogoresistente.
- Evaluar la citotoxicidad de los extractos con actividad en células humanas en cultivo.
- Ensayar la actividad antimicrobiana en modelos de infección celular.
- Ensayar la actividad antimicobacteriana en modelos in vivo.
- Investigar otras partes de las plantas estudiadas.
- Ensayar extractos de otras especies de la familia Juglandaceae.
- Validar o descartar la acción de las quinonas, triterpenos y esteroides como responsables de la acción anti-micobacteriana observada en este estudio.

## 10. LITERATURA CITADA

- Abbas, A.K., A.H. Lichtman, J.S. Pober. 1999. *Inmunología Celular y Molecular*. Ed. Mc Graw Hill. Madrid. p. 389.
- Antoun, M.D., Z. Ramos, J. Vázquez, I. Oquendo, G.R. Proctor, L. Gerena y S.G. Franzblau, 2001. Evaluation of the flora of Puerto Rico for *in vitro* Antiplasmodial and Antimycobacterial Activities. *Phytotherapy Research* **15**: 638-642.
- Arce-Mendoza, A., G. Arellano-Rangel, A. Revol, A. Rendón, M.C. Salinas-Carmona, A.G. Rosas-Taraco, 2004. Citocinas en el lavado broncoalveolar de pacientes con tuberculosis. *Medicina Universitaria*. **6**: 88-95.
- Bhagavan, N.V., 1983. *BIOQUÍMICA*, Nueva Editorial Interamericana, p.158, 854. México, D.F.
- Bloom, B.R., 1994. *Tuberculosis, Pathogenesis, Protection, and Control*, ASM PRESS, Washington, D.C. p. 62
- Boonphong, S., P. Kittakoop, M. Isaca, P. Palittapongarnpim, A. Jaturapat, K. Danwisetkanjana, M. Tanticharoen, Y. Thebtaranonth, 2001 A New Antibacterial 3<sup>2</sup>-Acetoxy-15<sub>+</sub>,22-dihydroxyhopane, from the Insect Pathogenic Fungus *Aschersonia tubulata*. *Planta Medica*. **67**: 279-281.
- Borchers, A.T., C.L. Keen, J.S. Stern, M.E. Gershwin, 2000. Inflammation and Native American medicine: the role of botanicals. *American Journal of Clinical Nutrition*. **72**: 339-347.
- Borris, R.P., 1996. Natural Products Research: perspectives from a major pharmaceutical company. *Journal of Ethnopharmacology*. **51**: 29-38.

- Cantrell, C.L., T. Lu, R.R. Fronczek, N.H. Fisher, L.B. Adams, S.G. Franzblau, 1996. Antimycobacterial Cycloartanes from *Borrichia frutescens*. *Journal of Natural Products*. **59**: 1131-1136.
- Cantrel, C.L., M.S. Rajab, S.G. Franzblau, y N.H. Fisher, 1999. Antimycobacterial Triterpenes from *Melia volkensii*. *Journal of Natural Products*, **62**:546-548.
- Chamouleau, A. y J. Chamouleau, 1990. La curación por la plantas. Guía práctica de fitoterapia. Ed. Roca. México D.F. p.127-129 y 337.
- Collins, L.A., S.G. Franzblau, 1997. Microplate Alamar Blue Assay versus BACTEC 460 System for High-Throughput Screening of Compounds against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium*. *Antimicrobial agents and Chemotherapy*, p. 1004-1009.
- Cowan, M.M., 1999. Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews*, **12**: 564-582.
- Daffé, M., G. Etienne, 1999. The capsule of *Mycobacterium tuberculosis* and its implications for pathogenicity. *Tubercle and Lung Disease* **79**: 153-169.
- Delaha, E.C., V.F. Garagusi, 1985. Inhibition of *Mycobacteria* by garlic extract (*Allium sativum*). *Antimicrob. Agents Chemother.* **27**: 485-6.
- Dominguez, X.A., 1973. Métodos de investigación fitoquímica. Ed. LIMUSA, 4ª reimpresión. México, D.F. p. 281.
- Fisher, N.H., T. Lu, C.L. Cantrel, J. Castañeda –Acosta, L. Quijano, S.G. Franzblau, 1998. Antimycobacterial Evaluation of Germacranolides. *Phytochemistry*, **49**: 559-564.

- Franzblau, S.G., R.S. Witzig, J.C. McLaughlin, P. Torres, J. Madico, A. Hernández, M.T. Dignan, M.B. Cook, V.K. Quenzer, R.M. Ferguson, R.H. Gilman, 1998. Rapid, low technology MIC determination with clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates by using the microplate Alamar Blue assay. *J Clin Microbiol*, **36**: 362-366.
- Fratti, R.A., J. Chua, I. Vergne, and V. Deretic, 2003. *Mycobacterium tuberculosis* glycosylated phosphatidylinositol causes phagosome maturation arrest. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **100**: 5437-5442.
- Gentry, E.J., H.B. Jampani, A. Keshavarz-Shokri, M.D. Morton, D.V. Velde, Telikepalli, H., L.A. Mitscher, R. Shawar, D. Humble, W. Baker, 1998. Antitubercular natural products: berberine from the roots of commercial *Hydrastis Canadensis* powder. Isolation of inactive-8-oxotetrahydrothalifendine, canadine, beta-hydrastine, and two new quinic acid esters, hycandinic acid esters-1 and-2. *J Nat Prod* **61**: 1187-93.
- Gibbons, S., F. Fallah, y C.W. Wright, 2003. Criptolepine Hydrochloride: A Potent Antimycobacterial Alkaloid Derived from *Criptolepis sanguinolenta*. *Phytotherapy Research* **17**: 434-436.
- Gomez-Pompa, A., 1985. Los Recursos Bióticos de México. Alambra mexicana. Xalapa, Veracruz, México. p.29.
- Grauke, L.J., 2004. An Introduction to the genus *Carya*. [aggiehorticulture.tamu.edu/carya/species](http://aggiehorticulture.tamu.edu/carya/species) Agricultural Research Service. United States Department of Agriculture.



- **Guerrero-Chapa, A., L.A. Rendón-Pérez**, 2002. Tuberculosis Multiresistente. *Medicina Universitaria*. **4**: 217-221.
- Harborne, J.B.**, 1984. *Phytochemical Methods. A guide to modern techniques of plant analysis*. Chapman and Hall, Second Edition, London U.K. p. 95.
- Instituto Nacional Indigenista**, 1989. Atlas de las plantas de la medicina tradicional Mexicana. México, D.F. 2 p. 1048-49.
- Jain, R.C.**, 1998. Anti tubercular activity of garlic oil. *Indian J. Pathol. Microbiol.* **41**:131.
- Januario, A.H., E.R. Filho, R.C.L.R. Pietro, S. Kashima, D.N. Sato, y S.C.França**, 2002. Antimycobacterial Physalins from *Physalis angulata* (*Solanaceae*). *Phytotherapy Research*. **16**: 445-448.
- Jiménez-Arellanes, A., M. Meckes, R. Ramírez, J. Torres, y J. Luna-Herrera**, 2003. Activity against Multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Mexican Plants Used to Treat Respiratory Diseases. *Phytotherapy Research*. **17**: 903-908.
- Martínez, M.**, 1979. *Plantas Mexicanas, Catálogo de Nombres Vulgares y Científicos*. Fondo de Cultura Económica, México. p. 636 y 1142.
- Méresse, S., O. Steele-Mortimer, E. Moreno, M. Desjardins, B. Finlay, and J.P. Gorvel**, 1999. Controlling the maturation of pathogen-containing vacuoles a matter of life and death. *Nature Cell Biology*, **1**: E183-E188.
- Mills, J.A., K. Motichka, M. Jucker, H.P. Wu, B.C. Ulick, R.J.Stern, M.S.Scherman, V.D. Vissa, F. Pan, M. Kundu, and M. McN** , 20 4  
Inactivation of the Mycobacterial Ramnosyltransferasa, wich is needed for the

formation of the Arabinogalactan-Peptidoglycan Linker, Leads to Irreversible Loss of Viability. JBC Papers in Press, Manuscript M407782200.

-**Newton, S.M., C. Lau, y C.W. Wright**, 2000. A Review of Antimycobacterial Natural Products. *Phytotherapy Research*. **14**: 303-322.

-**Nostro, A., M.P. Germano, V. D'Angelo, A. Marino, and M.A. Cannatelli**, 2000. Extraction Methods and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity. *Letters in Applied Microbiology*. **30**: 379-384.

-**O'Brain, R.J., y P.P. Nunn**, 2001. The need for new drugs against tuberculosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. **162**:1055-1058.

-**Organización Mundial de la Salud**, 2002. Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2002-2005. Ginebra, Organización Mundial de la Salud (documento de referencia WHO/EDM/TRM/2002.1).

-**Palomino, J.C., F. Portaels**, 1999. Simple Procedure for Drug Susceptibility Testing of *Mycobacterium tuberculosis* Using a Commercial Colorimetric Assay *Eur J Clin Microbiol Dis* **18**: 380-383.

-**Pan American Health Organization / World Health Organization**, 2004 Epidemiological status of TB (Region of the Americas).

-**Pérez, E., P. Constant, A. Lemassu, F. Laval, M. Daffé y C. Guilhot**, 2004. Caracterización de tres glicosiltransferasas involucradas en la biosíntesis de los antígenos glicolípidos fenólicos del Complejo *Micobacterium tuberculosis*. The American Society for Biochemistry and Molecular Biology. Inc. JBC Papers in Press. Manuscript M406246200.

- Phillipson, J.D.**, 1999. New Drugs from Nature-It Could be Yew. *Phytotherapy Research* **13**: 2-8.
- Quintero, R.**, 1998. *Memorias del Cuarto Curso Internacional Teórico-Práctico de Biotecnología*. Facultad de Ciencias Biológicas, U.A.N.L.
- Rodríguez-Noriega E., R. Morfín-Otero**, 2002. La epidemia de tuberculosis multiresistente. México,2002. *Medicina Universitaria*, **4**:199-201.
- Rook, G.A.W., R. Hernández-Pando**, 1996. The Pathogenesis of Tuberculosis. *Annu. Rev. Microbiology*, **50**: 259-284.
- Rossmann, M.D., R.R. Mac Gregor**, 1996. TUBERCULOSIS. Mc Graw Hill ° Interamericana, Philadelphia, Pennsylvania. p. 464.
- Saludes, J.P., M.J. Garson, S.G.Franzblau, A.M. Aguinaldo**, 2002. Antitubercular Constituents from the Hexane Fraction of *Morinda citrifolia* Linn (Rubiaceae). *Phytotherapy Research*. **16**: 683-685.
- Schlossberg, D.**, 1999. TUBERCULOSIS e infecciones por micobacterias no tuberculosas. Mc Graw Hill, Philadelphia, Pennsylvania. p.472
- Smith, I.**, 2003. *Mycobacterium tuberculosis* Pathogenesis and Molecular Determinants of Virulence. *Clinical Microbiology Reviews*, **16**: 463-496.
- Starke, J.R.**, 2004. Tuberculosis in Children. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine* **25**: 353-364.
- Stites, D.P., A.I. Terr, T.G. Parslow**, 1996. *Inmunología básica y clínica*. Manual Moderno, México D.F., p.1099.
- Suffnes, M., y M.E. Wall**, 1995. Discovery and Development of Taxol En Suffnes, M., ed. *TAXOL Science and applications*. Boca Raton, Florida. p 3-25

- Tran, T., E. Saheba, A. V. Arcerio, V. Chávez, Q. Li, L.E. Martínez, y T. P. Prim, 2004. Quinones as antimycobacterial agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **12**: 4809-4813.
- Trease, G.E., W.C. Evans, 1987. *Tratado De Farmacognosia*. Interamericana, México, D.F., p.846
- Turner, D.V., 1996. Natural Product source material use in the pharmaceutical industry: The Glaxo experience. *Journal of Ethnopharmacology*, **51**: 39-44.
- Uchida, Y., T. Takahashi, N. Sato, 1975. The characteristics of the antibacterial activity. *Jpn J Antibiot.*, **28**: 638-42.
- Valdez-Aguilar, R., 1999. *Herbolaria Mexicana*. México Desconocido 4, p. 43.
- Valdez-Aguilar, R., 2001. Plantas medicinales. *Guía México Desconocido, Edición Especial*, **4**: 7-8.
- Vergne, I., J. Chua, and V. Deretic, 2003. Tuberculosis toxin Blocking Phagosome Maturation Inhibits a Novel  $Ca^{2+}$ /Calmodulin -P13K h VPS34 cascade. *The Journal of Experimental Medicine*, **198**: 653-659.
- Vickers, A. y C. Zollman, 1999. *ABC of Complementary Medicine Herbal Medicine*. *BMJ*, **319**:1050-1053.
- Weinstein, L., 1974. Medicamentos usados en la quimioterapia de la lepra y la tuberculosis, En Goodman, L.S. y A. Gilman, ed. *Bases Farmacológicas de la Terapéutica*. Interamericana. México D.F. p.1108.
- Weissmann, G., 1991. Aspirin. *Scientific American*. **264**: 58-64.
- World Health Organization, 1994. TB: A Global Emerge cy. *G e va*. WHO/TB/94.177.
- World Health Organization, 2004. Tuberculosis. *Fact Sheet N°104*.

-Yajko, D.M., J.J. Madej, M.V. Lancaster, C.A. Sanders, V.L. Cawthon, B. Gee, A. Babst, W.K. Hadley, 1995. Colorimetric Method for Determining MICs of Antimicrobial Agents for *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Clinical Microbiology*, **33**: 2324-2327.

