

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON  
FACULTAD DE MEDICINA



**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE  
COMPUESTOS CON ACTIVIDAD BACTERICIDA  
Y/O BACTERIOSTATICA DE PLANTAS DEL  
NORESTE DE MEXICO SOBRE CEPAS DE  
*Mycobacterium tuberculosis* SENSIBLES Y  
MULTIDROGORRESISTENTES**

Por

**M.C. GLORIA MARIA MOLINA SALINAS**

Como requisito parcial para obtener el grado de  
**DOCTOR EN CIENCIAS** con Especialidad en  
**Química Biomédica**

Diciembre del 2004

M.C. GLORIA MARIA MOLINA SALINAS

TD  
RC311  
.4  
.M6  
2004  
c.1



1080078315

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON  
FACULTAD DE MEDICINA



AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE  
COMPUESTOS CON ACTIVIDAD BACTERICIDA  
Y/O BACTERIOSTATICA DE PLANTAS DEL  
NORESTE DE MEXICO SOBRE CEPAS DE  
*Mycobacterium tuberculosis* SENSIBLES Y  
MULTIDROGORRESISTENTES

Por

M.C. GLORIA MARIA MOLINA SALINAS

Como requisito parcial para obtener el grado de  
DOCTOR EN CIENCIAS con Especialidad en  
Química Biomédica

Diciembre del 2004



TD

RC 311

.4

. MC

2004

Raw 2004/1/18

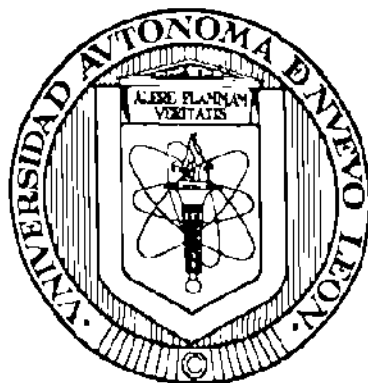
UAML

FONDO

TESIS DOCTORADO

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE MEDICINA**



**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE COMPUESTOS  
 CON ACTIVIDAD BACTERICIDA Y/O BACTERIOSTÁTICA  
 DE PLANTAS DEL NORESTE DE MÉXICO  
 SOBRE CEPAS DE *Mycobacterium tuberculosis*  
 SENSIBLES Y MULTIDROGORRESISTENTES**

**Por**

**M.C. GLORIA MARÍA MOLINA SALINAS**

**Como requisito parcial para obtener el grado de  
 DOCTOR EN CIENCIAS con Especialidad en  
 Química Biomédica**

**Diciembre del 2004**

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE COMPUESTOS CON ACTIVIDAD  
BACTERICIDA Y/O BACTERIOSTÁTICA DE PLANTAS DEL NORESTE DE  
MÉXICO SOBRE CEPAS DE *Mycobacterium tuberculosis* SENSIBLES Y  
MULTIDROGORRESISTENTES**

**Aprobación de la Tesis:**



**DRA. NOEMI WAKSMAN DE TORRES**

Director de Tesis



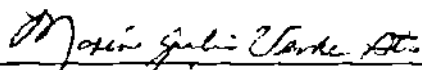
**DR. SALVADOR SAID FERNÁNDEZ**

Co-Director de Tesis



**DRA. HERMINIA G. MARTÍNEZ RODRÍGUEZ**

Comisión de Tesis



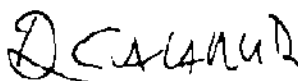
**DRA. MARÍA JULIA VERDE STAR**

Comisión de Tesis



**DRA. VERÓNICA MAYELA RIVAS GALINDO**

Comisión de Tesis



**DR. BIONICIO A. GALARZA DELGADO**

Subdirector  
de Estudios de Posgrado

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE COMPUESTOS CON  
ACTIVIDAD BACTERICIDA Y/O BACTERIOSTÁTICA DE PLANTAS DEL  
NORESTE DE MÉXICO SOBRE CEPAS DE *Mycobacterium tuberculosis*  
SENSIBLES Y MULTIDROGORRESISTENTES**

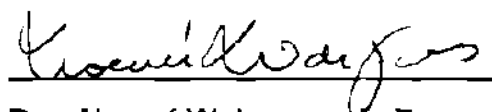
**Presentado por:**

**M.C. GLORIA MARÍA MOLINA SALINAS**

Este trabajo se realizó en los laboratorios del Departamento de Química Analítica de la Facultad de Medicina UANL, el laboratorio de Micobacteriología de la División de Biología Celular del CIBIN-IMSS y el laboratorio de Farmacología de la División de Farmacología y Toxicología del CIBIN-IMSS, bajo la Dirección de la Dra. Noemí Waksman de Torres y la Co-Dirección del Dr. Salvador Said-Fernández.

**Firmas**

**Director**



**Dra. Noemí Waksman de Torres**

**Co-Director**



**Dr. Salvador Said-Fernández**



## RESUMEN

Gloria Maria Molina-Salinas

Fecha de Graduación: Diciembre del 2004

Universidad Autónoma de Nuevo León  
Facultad de Medicina

**Título del Estudio:** AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE COMPUESTOS CON ACTIVIDAD BACTERICIDA Y/O BACTERIOSTÁTICA DE PLANTAS DEL NORESTE DE MÉXICO SOBRE CEPAS DE *Mycobacterium tuberculosis* SENSIBLES Y MULTIDROGORRESISTENTES

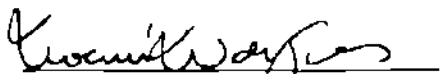
Número de páginas: 147

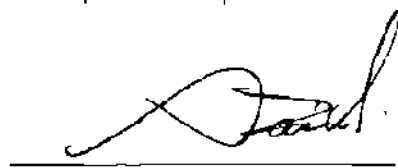
Candidata para el grado de Doctor en Ciencias con Especialidad en Química Biomédica

**Área de Estudio:** Química Biomédica

**Propósito y Método de Estudio:** El incremento de cepas de *M. tuberculosis* resistentes a los medicamentos nos conduce a la necesidad urgente de la búsqueda de nuevos compuestos con actividad antiTB; una excelente alternativa son los productos naturales. Así, mediante la evaluación antiTB *in vitro* de extractos de plantas regionales seleccionadas tanto por criterios etnofarmacológicos como quimiotaxonómicos sobre cepas sensibles y MDR de *M. tuberculosis*, y mediante el empleo del Método de Alamar Azul en microplaca fue posible seleccionar al extracto metanólico de raíz de *Leucophyllum frutescens* como el candidato para continuar con el fraccionamiento biodirigido. Para la purificación se utilizaron ELL, VLC y Cromatografías a Baja Presión FR. Se establecieron las estructuras mediante el uso de métodos espectroscópicos: UV-Vis, IR, <sup>1</sup>H RMN, <sup>13</sup>C RMN, DEPT, HMBC, HMQC y COSY. Para los compuestos puros se determinaron sus MICs y se caracterizó su actividad antiTB, así como también se realizó la evaluación de CL<sub>50</sub> de éstos para las larvas de *Artemia salina* en microplaca.

**Conclusiones y Contribuciones:** La evaluación de la actividad antiTB de extractos de 20 plantas regionales mostró que el extracto metanólico de raíz de *L. frutescens*, el etéreo de raíz de *Chrysactinia mexicana* y el hexánico del fruto de *Schinus molle* resultaron activos sobre ambas cepas micobacterianas. Las tres especies vegetales fueron seleccionadas en el Noreste de México por criterios etnofarmacológicos. El fraccionamiento biodirigido del extracto de raíz de *L. frutescens* condujo al aislamiento y caracterización de dos diterpenos: el compuesto 3 con una MIC de 12.5 µg/mL para ambas cepas micobacterianas y el compuesto 4 con una MIC de 12.5 y 6.25 µg/mL para la cepa sensible y MDR de *M. tuberculosis*, respectivamente. Ambos compuestos fueron micobactericidas y son 8 y 16 veces más potentes que estreptomycin y rifampicina para la cepa MDR de *M. tuberculosis*. Los compuestos fueron identificados como 5-[1,5-dimetil-4-hexenil]-5,6,7,8-tetrahidro-3,8-dimetil-1-naftalenol y resultaron ser diastereoisómeros. Las CL<sub>50</sub> para las larvas de *A. salina* fueron: 9.87 y 8.72 µg/mL para los compuestos 3 y 4, respectivamente. Los naftalenoles aislados tienen 3 carbonos quirales por lo que es necesario establecer su estereoquímica absoluta. De igual manera sería deseable realizar los estudios preclínicos para definir su eficacia y seguridad.

  
Dra. Noemi Waksman de Torres  
Director

  
Dr. Salvador Said-Fernández  
Co-Director

El Señor es mi pastor nada me faltará.

**Salmo 23**

Las oportunidades son para quien está preparado.

**Louis Pasteur**

If one advances confidently in the direction of his dreams  
and endeavors to live the life which he has imagined,  
he will meet with a success unexpected in common hours.

**Henry David Thoreau**

El mundo está en las manos de aquellos  
que tienen el coraje de soñar  
y correr el riesgo de vivir sus sueños.

**Paulo Coelho**

## DEDICATORIA

**A mis padres** Elio y Domy,  
como un pequeño tributo a su vida  
llena de humildad, sacrificio y amor.

**A mis hermanos** Elio Jr. y Natalia,  
Mirna Elizabeth y Raúl,  
Cynthia Laura y José Juan,  
por su cariño y apoyo incondicional.

**A mis sobrinos** Monique Aleth,  
Elio III, Emilio, Raúl Iván y Hazel,  
por ser mi gran fuente de alegría.

**A mi abuela** Angélica  
ejemplo de perseverancia,  
ayuda al prójimo y amor.

**A mis familiares, amigos y  
compañeros** por apoyarme siempre.

## AGRADECIMIENTOS

A **Dios** por permitirme existir.

A la **Dra. Noemí Waksman de Torres** y al **Dr. Salvador Said-Fernández**, por su dirección, asesoría, consejos, sugerencias y apoyo para realizar este trabajo. Gracias por creer en mí.

A los miembros de la Comisión de Tesis, **Dra. Herminia Martínez-Rodríguez**, **Dra. María Julia Verde-Star** y **Dra. Verónica M. Rivas-Galindo** por su ayuda, estímulos y valiosos consejos recibidos durante este trabajo, así como por la revisión final de este escrito.

A la **M.C. Pola Becerril-Montes**, por compartir conmigo su conocimiento sobre Micobacteriología; gracias por su guía magistral y la amistad que ahora nos une.

A los **Dr. Scott G. Franzblau**, Director del Instituto para la Investigación de la Tuberculosis y al **Dr. Guido F. Pauli**, Profesor del Depto. de Química Médica y Farmacognosia de la Escuela de Farmacia, Universidad de Illinois en Chicago, por sus consejos y asesorías para la optimización del MABA.

A la **Dra. Alicia Lagarto-Parra** del Laboratorio de Toxicología del Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos del Ministerio de Salud de Cuba, por su asesoría y apoyo para el desarrollo en microescala del ensayo de letalidad de *Artemia salina*.

Al **Dr. Luis Manuel Peña-Rodríguez** Coordinador del Posgrado en Ciencias y Biotecnología de Plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán, por las facilidades brindadas para la obtención de bibliografía así como sus palabras de apoyo en el momento indicado.

Al **Dr. Carlos E. Medina de la Garza** Titular de la Dirección de Relaciones Internacionales-UANL, por su amistad incondicional, consejos y apoyo siempre.

Al **Biól. Humberto Sánchez Vega**, por su asesoría en las colectas de las especies vegetales de interés.

A la **Sra. Milagro Aguirre** por compartirme su conocimiento sobre el uso de las plantas medicinales regionales.

A todos mis maestros de Pre- y Posgrado, a quienes les debo en parte lo que soy; en especial a Lidia, Elsa, Juany y Lucha por sus consejos y apoyo.

A todos y cada uno de mis viejos y nuevos amigos y compañeros del Posgrado, con quienes compartí muchas horas de estrés, malos ratos, desvelos y preocupaciones, al igual que momentos de alegría, reconocimientos, premios, metas cumplidas, logros profesionales y personales. Nora, Angeles, Paula, Adelina, Adriana, Norma, Marcela, Alicia, Aurora, Anabel, Olga, Benjamín, Ricardo, Alex, Xóchitl y Yolanda, gracias por su amistad y compañía.

Al **IMSS** por la beca como empleado Matrícula 11572035.

Al **FoFoI-IMSS** por el apoyo brindado al proyecto 2001/029.

Al **PAICYT-UANL** por el apoyo brindado al proyecto SA 596-01.

Al **CONACYT** por el apoyo brindado al proyecto 36544-N, por la beca de Doctorado No. 89894 y por la beca obtenida del proyecto 36544-N.

Al proyecto **X.11 PIBATUB** del **CYTED**.

**Por su ayuda, asesoría y facilidades para la realización  
de este trabajo, mil gracias a:**

**Del Depto. de Química Analítica:**

- Grupo de Fitoquímica: Ivonne, Alex, Marce, Lucy, Erika y Rosalba
- Grupo de Espectroscopía: Vero y Adriana
- Personal Técnico y de Apoyo: Marivel, Graciela, Agustín y Héctor
- Personal Administrativo y de Compras: M. Lidia, Gloria, Martha y Vero

**Del CIBIN-IMSS:**

- Juan Antonio, Javier, Benito, Francisco, Hugo y Paty de la División de Biología Celular y Molecular
- Silvia y Diego de la División de Farmacología y Toxicología
- Elva y Carlos de la División de Genética
- Pedro, Julio, Cristy, Anita y Alma de Administración
- Abel y Cecy de Biblioteca

**Del Laboratorio de Fitofármacos de la Unidad de Enfermedades  
Neurológicas-IMSS:**

Dr. Xavier Lozoya-Legorreta

**De la Unidad de Investigación Médica en Farmacología de Productos  
Naturales-IMSS:**

Dra. Mariana Meckes y Dra. Adelina Jiménez-Arellanes

**De la Dirección de Servicios Periciales de la Procuraduría General de  
Justicia en el estado de Nuevo León:**

Dr. Adolfo Caballero-Quintero

**De Waters, México:**

M.C. Víctor M. Torres de la Cruz

**De Enertec, S de RL:**

L.Q.I. Ricardo Flores-Lira

**De Industrial Orgánica, SA de CV:**

M.C. Ricardo Montoya-Olvera

**De la Subdirección de Estudios de Posgrado:**

Normita y Nancy

**Del Centro de Innovación Tecnológica y Competitividad-UANL:**

Dr. Juan Manuel Alcocer-González, Lic. Gabriel Gorjón Gómez y Q.F.B.  
Alicia Deni González

## TABLA DE CONTENIDO

CAPÍTULO	Página
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Tuberculosis	1
1.1.1 Definición y Epidemiología	1
1.1.2 TB Drogorresistente	2
1.2 La Quimioterapia de la TB	4
1.3 La Medicina Herbolaria	7
1.3.1 Los productos naturales como fuentes de posibles agentes antiTB	11
1.4 Bioensayos para evaluar la actividad de agentes antiTB	15
1.4.1 Método Radiométrico Bactec 460	16
1.4.2 Luminiscencia, expresión del gen de la luciferasa	16
1.4.3 Métodos de microdilución en medio líquido	17
1.4.3.1 Método del Alamar Azul en microplaca	18
1.4.3.2 Métodos que utilizan sales de Tetrazolio en microplaca	19
1.5 Bioensayos para evaluar la toxicidad de agentes antiTB	20
1.5.1 Letalidad sobre larvas de <i>Artemia salina</i>	20
1.5.2 Citotoxicidad	21
2. ANTECEDENTES	23
2.1 Descripción del Problema	23
2.2 Justificación	26
2.3 Hipótesis	27
2.4 Objetivos	27
2.4.1 Objetivo General	27
2.4.2 Objetivos Específicos	28

<b>3 MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>29</b>
<b>3.1 Equipo, Material y Reactivos</b>	<b>29</b>
3.1.1 Equipo	29
3.1.2 Material	30
3.1.3 Reactivos y Solventes	33
3.1.4 Material Biológico	35
<b>3.2 Métodos</b>	<b>36</b>
3.2.1 Búsqueda, recolección, clasificación y registro de las especies de plantas regionales	36
3.2.2 Obtención de los extractos metanólicos y acuosos de la especies de plantas recolectadas	37
3.2.3 Tamizaje de los extractos para identificar los que poseen actividad antiTB <i>in vitro</i>	38
3.2.4 Fraccionamiento biodirigido del extracto metanólico de corteza de raíz de <i>Leucophyllum frutescens</i>	42
3.2.5 Purificación y determinación de la estructura del o los compuesto(s) antiTB	51
3.2.6 Determinación de las MICs de los compuestos puros para las cepas H37Rv y CIBIN/UMF15:99 de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	55
3.2.7 Determinación de la actividad bactericida o bacteriostática de los compuestos 3 y 4 aislados de <i>L. frutescens</i>	55
3.2.8 Evaluación de la toxicidad de los compuestos 3 y 4 mediante el bioensayo de letalidad en larvas de <i>A. salina</i> en microplaca	56
<b>4. RESULTADOS</b>	<b>58</b>
4.1 Plantas regionales seleccionadas para su evaluación antiTB	58
4.2 Obtención de los extractos de las plantas seleccionadas	60
4.3 Tamizaje de la actividad antiTB de extractos obtenidos de plantas del Noreste de México	63
4.4 Fraccionamiento Biodirigido	70
4.5 Purificación y determinación de la estructura de los compuestos antiTB	79
4.6 MICs de los compuestos antiTB puros	103



4.7 Actividad antiTB Bactericida o Bacteriostática	105
4.8 Toxicidad de los compuestos 3 y 4 para larvas de <i>A. salina</i>	106
5. DISCUSIÓN	107
6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	131
REFERENCIAS	135

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Página</b>
1. Estructura química de la 12-demetilmulticaulina, aislada de <i>Salvia multicaulis</i>	12
2. Fotografías de las mezclas de Alamar Azul y extracto de <i>Schinus molle</i>	63
3. Fotografías del efecto inhibitorio del DMSO sobre ambas cepas de <i>M. tuberculosis</i>	64
4. Curvas de crecimiento de ambas cepas de <i>M. tuberculosis</i>	66
5. Cromatograma obtenido con DAD de la fracción VLC 20:1	73
6. Cromatogramas obtenidos con DAD y EM de la fracción VLC 20:1	74
7. Cromatogramas obtenidos con DAD y EM de la fracción VLC 15:1	75
8. Cromatogramas obtenidos con DAD y EM de la fracción VLC 10:1	76
9. Cromatograma obtenido con DAD de la F3; 90:10	78
10. Cromatograma obtenido con DAD de la F4; 100 MeOH	78
11. Cromatograma y espectro UV-Vis del compuesto 3 contenido en tubo el 70	80
12. Cromatograma y espectro UV-Vis del compuesto 3 contenido en tubo 73	81
13. Cromatograma y espectro UV-Vis del compuesto 4	82
14. Cromatograma y espectro UV-Vis de la mezcla de los compuestos 3 y 4	84
15. Espectro UV-Vis del compuesto 3 aislado de raíz de <i>L. frutescens</i>	86

16.	Espectro UV-Vis del compuesto 4 aislado de raíz de <i>L. frutescens</i>	87
17.	Espectro IR del compuesto 4 aislado de raíz de <i>L. frutescens</i>	88
18.	Espectro de Masas del compuesto 3 aislado de raíz de <i>L. frutescens</i>	89
19.	Espectro de Masas del compuesto 4 aislado de raíz de <i>L. frutescens</i>	89
20.	Espectro de $^1\text{H}$ RMN del compuesto 3 aislado de raíz de <i>L. frutescens</i>	91
21.	Espectro de $^1\text{H}$ RMN del compuesto 4 aislado de raíz de <i>L. frutescens</i>	92
22.	Espectro de $^{13}\text{C}$ RMN del compuesto 3 aislado de raíz de <i>L. frutescens</i>	93
23.	Espectro de $^{13}\text{C}$ RMN del compuesto 4 aislado de raíz de <i>L. frutescens</i>	94
24.	DEPT-135 de los compuestos 3 y 4 aislados de raíz de <i>L. frutescens</i>	95
25.	HMQC del compuestos 3 aislado de raíz de <i>L. frutescens</i>	96
26.	HMQC del compuestos 4 aislado de raíz de <i>L. frutescens</i>	97
27.	HMBC del compuestos 3 aislado de raíz de <i>L. frutescens</i>	98
28.	HMBC del compuestos 4 aislado de raíz de <i>L. frutescens</i>	99
29.	COSY 45 del compuesto 3 aislado de raíz de <i>L. frutescens</i>	100
30.	COSY 45 del compuesto 4 aislado de raíz de <i>L. frutescens</i>	101
31.	Fotografía del MABA para los compuestos 3 y 4 aislados de <i>L. frutescens</i>	104
32.	Fotografía de la caracterización de la actividad antiTB de los compuestos 3 y 4 aislados de <i>L. frutescens</i>	105
33.	Fotografías de la planta <i>L. frutescens</i>	115

34.	Estructura planar y EM del 2,5-dimetil-8-(1-metiletil)-5,6,7,8-tetrahidro-1-naftalenol	118
35.	Estructura planar de los compuestos antiTB 3 y 4 aislados de <i>L. frutescens</i>	124
36.	Estructura absoluta del 7-hidroxierogorgiaeno aislado de <i>Pseudopterogorgia elisabethae</i>	126
37.	Estructura absoluta del elisabethanol	126

## LISTA DE TABLAS

	<b>Página</b>
1. Productos naturales con actividad antimicobacteriana y antiTB (Copp BR, 2003)	14
2. Productos naturales con actividad antimicobacteriana y antiTB (Okunade AL y cols., 2004)	15
3. Evaluación antiTB de productos naturales usando cepas de <i>M. tuberculosis</i> resistentes	25
4. Las especies de plantas del Noreste seleccionadas y colectadas	58
5. Extractos orgánicos y porcentajes de recuperación	60
6. Extractos acuosos y porcentajes de recuperación	62
7. MICs de los extractos orgánicos sobre cepas de <i>M. tuberculosis</i> sensible y MDR	67
8. MICs de los extractos acuosos sobre cepas de <i>M. tuberculosis</i> sensible y MDR	69
9. Extractos activos	69
10. MICs ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) de las fracciones obtenidas por ELL	70
11. Identificación de grupos funcionales en fracciones antiTB	71
12. MICs y rendimientos de las fracciones obtenidas por VLC	72
13. MICs y rendimientos de las fracciones obtenidas por Cromatografía en Columna a Baja Presión FR	77
14. Rendimiento (% p/p)	85
15. MICs y rendimientos de los compuestos antiTB	103
16. MICs de los antiTB de 1a. línea para las cepas sensibles y MDR de <i>M. tuberculosis</i>	103

17.	CL <sub>50</sub> de los compuestos antiTB aislados de la raíz de <i>L. frutescens</i> sobre larvas de <i>A. salina</i>	106
18.	Desplazamientos químicos y multiplicidad de los <sup>1</sup> H de los compuestos 3 y 4	122
19.	Desplazamientos químicos de los <sup>13</sup> C de los compuestos 3 y 4	123

## ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

AcOEt	Acetato de Etilo
ACN	Acetonitrilo
ACS	American Chemical Society
ATCC	American Type Culture Collection
ATR	Attenuated Total Reflection
BCG	Bacilo de Calmette-Guerin
BuOH	Butanol
C	Carbono
°C	Grados Celsius
CAS	Chemical Abstract Service
CCF	Cromatografía en Capa Fina
CDCl <sub>3</sub>	Cloroformo Deuterado
CG	Cromatografía de Gases
CIBIN	Centro de Investigación Biomédica del Noreste
CL <sub>50</sub>	Concentración Letal Cincuenta
cm	Centímetros
Coah.	Coahuila
cols.	Colaboradores
COSY	Correlation Spectroscopy
CYTED	Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo
DAD	Detector de Arreglo de Diodos
DCM	Diclorometano
DEPT-135	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer $\theta_3=135^\circ$
Depto.	Departamento
DL <sub>50</sub>	Dosis Letal Cincuenta

dm	Decímetro
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNF	Dinitrofenilhidrazina
D <sub>2</sub> O	Agua Deuterada
ELL	Extracción líquido líquido
EM	Espectrometría de Masas
EtOH	Etanol
ev	Electrovolts
EEUU	Estados Unidos de América
FE	Fase Estacionaria
FM	Fase Móvil
FR	Fase Reversa
g	gramos
H	Hidrógeno
h	Horas
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Correlation
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
Hz	Hertz
IC	Intervalo de Confianza
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
IR	Infrarrojo
L	Litro
MeOH	Metanol
m	Metro
mg	Miligramos
MIC	Minimal Inhibitory Concentration
min	Minutos
MHz	Megahertz
mL	Mililitros



mm	Milímetros
µg	Microgramos
µL	Microlitros
NAPRALERT	Natural Products Alert
N	Concentración Normal
N.L.	Nuevo León
nm	Nanómetro
No.	Número
O	Oxígeno
PIBATUB	Proyecto Iberoamericano de Búsqueda y Evaluación de Agentes Naturales Antituberculosos
PFTE	Politetrafluoroetileno
ppm	Partes por millón (unidades de medición en <sup>1</sup> HRMN y <sup>13</sup> CRMN)
rBCG	Bacilo de Calmette-Guerin recombinante
Rf	Factor de retardo (cociente de frentes)
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
<sup>13</sup> C RMN	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono
<sup>1</sup> H RMN	Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno
tR	Tiempo de Retención
seg	Segundo
UFC	Unidad Formadora de Colonias
uma	Unidades de masa atómica
UMF	Unidad de Medicina Familiar
USDA	United States Department of Agriculture
UV	Ultravioleta
UV-Vis	Ultravioleta Visible
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana
VLC	Vacuum Liquid Chromatography
TLC	Thin Layer Chromatography

TIC	Total Ion Chromatogram
UANL	Universidad Autónoma de Nuevo León
$\delta$	Desplazamiento químico relativo al estándar
$\lambda$	Longitud de onda
+	Positivo
-	Negativo
$\leq$	Menor o igual que
%	Porcentaje
p/p	peso/peso (g/100 g)
v/v	volumen/volumen (mL/100 mL)

# CAPÍTULO 1

## INTRODUCCIÓN

### 1.1 Tuberculosis

#### 1.1.1 Definición y Epidemiología:

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecto-contagiosa de curso subagudo o crónico. En el hombre esta infección puede afectar a diversos órganos, pero se localiza en los pulmones con mayor frecuencia. La TB pulmonar (TBP) es causada principalmente por *Mycobacterium tuberculosis*, aunque *M. bovis* y *M. africanum* también son agentes etiológicos de esta enfermedad. Otras especies como *M. kansasii*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. xenopi* y *M. fortuitum*, producen en el hombre síntomas clínicos similares a los de la TBP (Nolte FS y B Metchock, 1995).

La TB es considerada como un problema mundial de Salud Pública por su amplia distribución, prevalencia y mortalidad (Ramírez CE y Cicero SR, 1994). La Organización Mundial de la Salud declaró que esta enfermedad

debe ser considerada como una emergencia global (Raviglione MC y cols., 1995). Un tercio de la población mundial está infectada con *M. tuberculosis*. Ocho millones de nuevos casos y 3 millones de muertes ocurren anualmente (WHO Report, 2002).

En México el panorama epidemiológico de la TB es tan preocupante como en el resto de los países en desarrollo; en la segunda mitad de los años 50's, la tasa de incidencia de TBP era de 33.5 casos nuevos/100,000 habitantes y disminuyó a 17.4/100,000 habitantes en la segunda mitad de los 60's (Organización Panamericana de la Salud, 1994). Datos recientes del boletín del Sistema de Vigilancia Epidemiológica en México, indican que durante el año 2003 se registraron un total de 13760 casos de TBP en nuestro país, 2713 (19.71%) correspondieron a la Región Norte del IMSS que incluye a los estados de Aguascalientes, Coahuila, Chihuahua, Durango, Nuevo León, San Luis Potosí, Tamaulipas y Zacatecas. De esta región fueron Nuevo León y Tamaulipas los que registraron el mayor número, 701 y 725 casos respectivamente (Epidemiología, 2004).

### **1.1.2 TB Drogorresistente:**

Los medicamentos antimicrobianos contra la mayoría de las enfermedades infectocontagiosas fueron desarrollados entre 1930 y 1970 y con éstos las naciones industrializadas consideraron que estas enfermedades pertenecían al pasado. Los agentes antituberculosos (antiTB) eficaces fueron

descubiertos desde finales de 1940's y 1950's siendo el último la rifampicina, introducido en 1963 (citado por Cantrell CL y cols., 2001). Sin embargo, la presencia de microorganismos resistentes a los mismos ha incrementado por el uso, sobre uso y mal uso de los agentes antimicrobianos principalmente en países en desarrollo, donde la pobreza y el uso inadecuado de la terapéutica promueven el desarrollo de resistencia. Las cepas resistentes pueden fácilmente expandirse por todo el mundo, convirtiéndose en un problema mundial (Brundtland GH, 2000).

El incremento de las cepas resistentes a los medicamentos antiTB y principalmente las cepas resistentes a isoniazida y rifampicina, llamadas multidrogorresistentes (MDR) están dificultando el control del TB, porque éstos son los medicamentos antiTB más efectivos hasta la fecha (Rattan A y cols., 1998).

La presencia en nuestro país de cepas de *M. tuberculosis* MDR está bien documentada. En 1995 se reporta en la Cd. de México el aislamiento de 59 cepas de *M. tuberculosis* de las cuales el 30% resultaron monorresistentes (Sifuentes-Osornio J y cols., 1995). Durante el mismo año en el estado de Chiapas de un total de 18 cultivos positivos de *M. tuberculosis*, 13 (72.2%) fueron resistentes a uno o más medicamentos (Alvarez-Gordillo GC y cols., 1995). En 1999 en otro estudio realizado en Chiapas, se encontró que de 61 cultivos positivos de pacientes con TBP, el 33.3% fue resistente a un

medicamento y 66.7% a dos o más (Alvarez Gordillo GC y cols., 1999). Posteriormente en el 2000 durante un estudio realizado en Orizaba Veracruz, se encontró que de 328 casos de TBP la tasa de drogorresistencia fue de 24.2 % y de multidrogorresistencia de 7.7% (Garcia-Garcia ML y cols., 2000). En nuestra región existen reportes del aislamiento de cepas MDR de *M. tuberculosis*. Uno de éstos es el estudio realizado en el CIBIN en el cual se caracterizaron durante el período comprendido entre enero de 1998 y enero del 2000, un total de 65 cepas de *M. tuberculosis*, aisladas de pacientes adscritos a la UMF No. 28 del IMSS; 52.3% de las cepas resultaron ser resistentes a uno o más agentes antiTB, se demostró un 20% de resistencia primaria, y un 27.7% de resistencia secundaria (Said-Fernández S y cols., 2001). En otro estudio realizado en el Hospital Universitario de la UANL se reporta que de 186 aislados clínicos de *M. tuberculosis*, el 32 % fue monorresistente y el 18% MDR (Yang ZH y cols., 2001).

## **1.2 La Quimioterapia de la TB**

La quimioterapia de enfermedades infecciosas usando la sulfamida y la penicilina fue un gran éxito; lamentablemente estas moléculas eran ineficaces contra *M. tuberculosis*. Desde 1914, Selman A. Waksman había estado evaluando sistemáticamente bacterias del suelo y hongos; en la Universidad de California en 1939 descubrió el marcado efecto inhibitorio de

ciertos hongos, especialmente actinomicetos sobre el crecimiento bacteriano. En 1940, él y su equipo lograron aislar un antibiótico con actividad antiTB, la actinomicina, que lamentablemente demostró ser demasiado tóxica para el uso en seres humanos o animales. Sin embargo en 1943, comprobó que la estreptomycinina, purificada de *Streptomyces griseus*, combinaba la máxima inhibición de *M. tuberculosis* con una toxicidad relativamente baja en animales de laboratorio. En noviembre de 1944, el antibiótico fue administrado por primera vez a un paciente críticamente enfermo de TB. El efecto casi inmediato fue impresionante. Su avanzada enfermedad disminuyó visiblemente, las bacterias desaparecieron de su esputo, y se logró su rápida recuperación (NJMS National Tuberculosis Center, 1996).

Una sucesión rápida de los fármacos antiTB apareció en los años siguientes. A través de la monoterapia, mediante el uso de la estreptomycinina, las cepas mutantes resistentes comenzaron a aparecer en algunos meses, poniendo en peligro el éxito del tratamiento. Otros fármacos se descubrieron en años subsiguientes. Después de la estreptomycinina, fueron introducidos otros agentes antiTB: el ácido p-amino-salicílico (1949), la isoniazida (1952), la pirazinamida (1954), la cicloserina (1955), el etambutol (1962) y la rifampina (1963) (Enarson DA y cols., 2000). Rápidamente fue demostrado que el problema de la resistencia se podría superar con la combinación de dos o tres fármacos (NJMS National Tuberculosis Center, 1996).

Actualmente los medicamentos para tratar la TB se dividen en dos grandes categorías. Los compuestos de primera línea combinan eficacia con un grado aceptable de toxicidad; incluyen isoniazida, rifampicina, etambutol, estreptomina y pirazinamida. La mayor parte de los pacientes con TBP pueden ser tratados satisfactoriamente con ellos. Por la aparición de resistencia microbiana o por factores propios del paciente como infección por VIH, a veces se necesita recurrir a fármacos de segunda línea adicionales; de esta manera el tratamiento se inicia con cinco a seis productos de esta categoría como ofloxacina, ciprofloxacina, etionamida, ácido p-amino-salicílico, cicloserina, amikacina, kanamicina y capreomicina (Mandell GL y WA Petri, 1997; Iseman MD, 1993; WHO 1997).

*El surgimiento de cepas MDR de M. tuberculosis requiere el desarrollo urgente de nuevos agentes antiTB (Rieder HL, 2002). La producción y desarrollo de tales agentes no habían sido percibidos como de alta prioridad por las compañías farmacéuticas hasta hace pocos años. Actualmente no solo existe un esfuerzo coordinado por parte de la industria farmacéutica y de los gobiernos de numerosos países para mantener vigentes y en producción los compuestos antiTB generales desarrollados hasta ahora (Bloom BR, 1994; Orme I, 2001), sino que también estas mismas entidades reconocen la necesidad de descubrir y desarrollar medicamentos antiTB más efectivos y seguros y de diseñar mejores estrategias para el uso de los medicamentos existentes (Cohn DL y cols., 1997). Los regímenes y su administración*



deberían quizá ser designados e individualizados, para prevenir la emergencia de nuevas cepas MDR (Sutherland I, 1999).

En nuestros días existe una necesidad urgente de nuevos medicamentos antiTB y para su desarrollo existen dos estrategias: por un lado la síntesis química y por otro el aislamiento a partir de productos naturales como plantas terrestres, organismos marinos y microorganismos. El mundo de las plantas superiores es uno de los más ricos en distintas estructuras químicas y con variadas actividades biológicas. Este hecho, aunado al gran acervo cultural de las etnias en el uso popular de las plantas medicinales para curar enfermedades o tratar afecciones de distinto tipo, hace a la Medicina Herbolaria fuertemente atractiva para su estudio como fuente de nuevos medicamentos (Rates S, 2001).

### **1.3 La Medicina Herbolaria**

Las más antiguas civilizaciones conocidas crearon, desarrollaron y transmitieron la costumbre de recurrir a las virtudes curativas de determinadas plantas y productos animales. Puede decirse que se trata de uno de los primeros esfuerzos del hombre para comprender y, por tanto utilizar la naturaleza como remedio para la enfermedad y el sufrimiento. Este conjunto de conocimientos que la humanidad ha acumulado acerca del uso terapéutico de los productos naturales, ha perdurado durante milenios.

Podríamos considerar cuatro grandes periodos en el progreso del conocimiento humano relativo a las plantas medicinales (Cabrera L, 1996; Martínez M, 1987; Aguilar-Contreras A y cols., 1998).

***Primer periodo:*** Durante la antigüedad, egipcios, griegos y romanos, acumularon grandes conocimientos empíricos que fueron transmitidos a través de los árabes. Los egipcios utilizaban multitud de plantas para curar. Las escuelas de Medicina, situadas generalmente en los templos, mantenían un jardín de plantas medicinales. Fueron los griegos y después los romanos quienes, a esos conocimientos heredados de Egipto, les otorgaron un nivel superior. Los griegos reunieron en un tratado todos los conocimientos médicos de su tiempo. Durante la Edad Media los monjes fueron los conservadores del saber antiguo. En los jardines de los monasterios se cultivaban las plantas utilizadas para el tratamiento de las enfermedades que eran después elaboradas en la farmacia monástica.

***Segundo periodo:*** En el Renacimiento, con la revaloración de la experimentación y observación directa y con el desarrollo de los grandes viajes geográficos, surgiría un periodo nuevo en el conocimiento de las plantas y su aplicación en Medicina. El desarrollo de las rutas marítimas permitió la llegada a Europa de plantas nuevas procedentes de países lejanos. Sólo de Oriente en el siglo XVII se trajeron a nuestro continente 1350 plantas nuevas.

El catálogo de plantas medicinales se enriqueció, se precisó en la descripción de sus características y la manera de emplearlas. Sin embargo, a menudo, sólo se sabía el efecto que producían las plantas en determinadas enfermedades, pero no se conocía la causa por la cual actuaban ni tampoco su composición.

**Tercer período:** A comienzos del siglo XIX se introduce el concepto de célula; nace la Biología que junto con la Bioquímica permiten reconocer y aislar entre otros, la morfina del opio, la estricnina de la nuez vómica y la quinina de la corteza del quino. A partir de ese momento se pudieron reconocer las virtudes terapéuticas de las plantas por los componentes químicos o principios activos que contienen.

**Cuarto período:** En nuestro tiempo es sabido que los principios activos de las plantas medicinales son aislados, purificados y caracterizados químicamente; además pueden ser sintetizados en el laboratorio y sujetos a modificaciones estructurales para que aumenten su potencia y disminuyan su toxicidad (Cabrera L, 1996; Martínez M, 1987; Aguilar-Contreras A y cols., 1998).

Es un hecho incontrovertible aceptado por la ciencia médica hace más de ciento cincuenta años, que un número importante de fármacos en uso por la Medicina contemporánea son obtenidos de vegetales o de subproductos de

éstos. Sin embargo, el siglo XX nos ha enseñado que el papel que juegan los recursos herbolarios en el contexto de las llamadas “medicinas tradicionales o indígenas” es además de práctico o empírico en el fundamento de su aplicación, profundamente social por estar vinculado a diversos aspectos de la cultura.

La Etnobotánica, rama de la Botánica que asume la valoración cultural de los recursos vegetales por las diversas etnias, ha centrado sus esfuerzos en la clasificación científica de las especies vegetales y en la sistematización de la información popular sobre el uso, casi siempre ancestral, que de las plantas medicinales hace una comunidad en particular. La información etnobotánica se difunde habitualmente mediante la creación de herbarios (colecciones de plantas secas taxonómicamente organizadas), libros y catálogos de modelos computarizados que reúnen los datos sistematizados sobre las propiedades medicinales atribuidas a los vegetales medicinales, colectados en los territorios donde se utilizan estos recursos biológicos (Aguilar-Contreras A y cols., 1998).

Es a partir de la información etnobotánica, que en la actualidad se inicia el proceso de investigación científica de una planta medicinal; proceso que implica el diseño y aplicación de una metodología, que valore la utilidad del recurso vegetal utilizado en la práctica médica popular o tradicional. Mientras no se realice la evaluación y corroboración científica de los beneficios

medicinales atribuidos a una especie, la información etnobotánica no pasará de ser un valioso testimonio impreso de la cultura popular. Esta reflexión viene a lugar por la transición científico-tecnológica que está teniendo lugar en la Medicina de nuestros días y en nuestro país, y que seguramente determinará el paradigma médico del siglo XXI. La incorporación de los recursos de las medicinas "alternativas" o "tradicionales", al acervo de conocimientos médicos del futuro inmediato, dependerá de su grado de corroboración experimental y científica (Lozoya X. y cols., 1989; Lozoya X y cols., 1992; Navarro V y cols., 1996; Lentz DL y cols., 1998; Encarnacion-Dimayuga R y cols., 1998; O'Hara M y cols., 1998; Matthews HB, 1999).

### **1.3.1 Los productos naturales como fuentes de posibles agentes antiTB:**

Se han encontrado 4 revisiones importantes de la evaluación de la actividad de los productos naturales como posibles agentes antiTB.

Newton SM y cols. (2000) incluyen los reportes de 30 años acerca de la evaluación de actividad antimicobacteriana (especies distintas a *M. tuberculosis*) o antiTB (anti-*M. tuberculosis*) de extractos, fracciones o compuestos aislados de plantas. Las especies más activas mencionadas son: *Allium sativum*, *Borrhichia frutescens*, *Ferula communis*, *Heracleum maximu*, *Karwinskia humboldtiana*, *Leucas volkensis*, *Monesses uniflora*, *Oplopanax horridus*, *Salvia multicaulis* y *Strobilanthus cusia*.

En el 2001 Cantrell CL y cols., hacen una recopilación de los reportes acerca de terpenoides aislados de plantas que han demostrado de moderada a alta actividad *in vitro* contra *M. tuberculosis*. En esta revisión se incluyen 118 nuevos compuestos activos del tipo mono-, sesqui-, di- y triterpenos, y esteroides así como análogos y derivados semisintéticos. El compuesto más activo contra *M. tuberculosis* de este grupo es el diterpeno 12-demetilmulticaulina (Figura 1) aislado de *Salvia multicaulis* con una MIC (*Minimal Inhibitory Concentration* por sus siglas en inglés) de 0.46 µg/mL el cual es más activo que etambutol y cercano a la rifampicina (Ulubelen y cols., 1997).

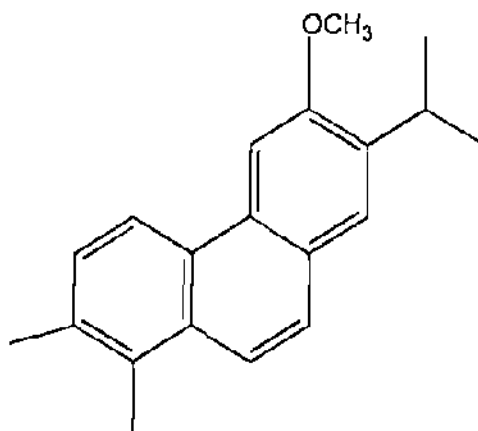


Figura 1. Estructura química de la 12-demetilmulticaulina, aislada de *S. multicaulis*.

También se encuentran otros terpenoides activos como el guaianólido dehidrocostus lactona aislado de *Saussurea lappa* con una MIC de 2 µg/mL (Cantrell CL y cols., 1998), el ergosterol-5,8-endoperóxido aislado de *Ajuga*

*remota* con una MIC de 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Cantrell CL y cols., 1999) y el E-fitol aislado de *Leucas volkensii* con una MIC de 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Rajab MS y cols., 1998).

En el 2003 Copp BR publica una revisión sobre productos naturales antimicrobianos aislados y caracterizados entre 1990 y 2002. Durante este período existen 248 citas y 352 compuestos aislados tanto de fuentes terrestres como marinas. Los productos naturales incluidos son de naturaleza química muy diversa. Menciona a ácidos grasos, aromáticos, quinonas, péptidos, alcaloides, terpenos y esteroides. Los productos naturales antimicrobianos y antiTB más activos (MICs  $\leq 4$   $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) identificados durante este período están incluidos en la Tabla 1.

Tabla 1. Productos naturales con actividad antimicobacteriana y antiTB (Copp BR, 2003).

Compuesto aislado	Naturaleza química	Fuente del Producto Natural	Especie de <i>Mycobacterium</i>	MIC (µg/mL)
tubelactomicina A	lactona	<i>Nocardia sp</i> (Bacteria)	<i>M. smegmatis</i>	0.1
drummondinas	fenol	<i>Hypericum drummondii</i> (Planta)	<i>M. smegmatis</i>	1.56
ferulenol	fenol	<i>Ferula communis</i> (Planta)	<i>M. intracellulare</i> , <i>M. xenopi</i> y <i>M. smegmatis</i>	1.25
phomoxantonas	xantona	<i>Phomopsis sp</i> (Hongo)	<i>M. tuberculosis</i> H37Ra	0.5
brasiliquinonas A y B	quinona	<i>Nocardia brasiliensis</i> (Bacteria)	<i>M. smegmatis</i>	0.39 y 0.78
sampangina	antraquinona	<i>Cananga odorata</i> (Planta)	<i>M. intracellulare</i>	0.39
manzamines	alcaloide	<i>Didiscus oxeata</i> (Esponja)	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	0.91-3.13
ácido fusicico	esteroide	<i>Bomichia frutescens</i> (Planta)	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	4
saringosterol (mezcla de epímeros C-24)	esteroide	<i>Lessonia nigrescens</i> (Planta)	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	0.25
ergosterol-5,8-endoperóxido	esteroide	<i>Ajuga remota</i> (Planta)	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	1

Okunade AL y cols., publican a principios del 2004, una nueva revisión de metabolitos naturales antimicobacterianos. Incluyen 88 compuestos aislados de plantas, hongos y organismos marinos y análogos semisintéticos que demostraron actividad antiTB y sobre otras micobacterias; en la Tabla 2 se incluyen los más activos.



Tabla 2. Productos naturales con actividad antimicobacteriana y antiTB (Okunade AL y cols., 2004).

Compuesto aislado	Naturaleza química	Fuente del Producto Natural	Especie de <i>Mycobacterium</i>	MIC $\mu\text{g/mL}$
preussomerinas	polifenoles	<i>Microsphaeropsis sp</i> (Hongo)	<i>M. tuberculosis</i>	1.56-3.12
enniatinas	pépticos	<i>Verticillium hemiptergenum</i> (Hongo)	<i>M. tuberculosis</i>	1.56-6.25
ascididemina	alcaloide	<i>Didemnum sp</i> (Organismo Marino)	<i>M. aurum</i>	0.25
éster forbol	terpenoide	<i>Sapium indicum</i> (Planta)	<i>M. tuberculosis</i>	3.12
epidioxisterol	esteroide	<i>Morinda citrifolia</i> (Planta)	<i>M. tuberculosis</i>	2.5

A pesar de que debido a su toxicidad, solubilidad y/o limitaciones farmacocinéticas, estos ejemplos específicos no han podido aún ser desarrollados como medicamentos *per se*, sus esqueletos podrían proveer estructuras bases útiles para el desarrollo de nuevos agentes antiTB.

#### 1.4 Bioensayos para evaluar la actividad de agentes antiTB

Recientemente se han desarrollado métodos eficientes y rápidos para la identificación y evaluación de los perfiles de resistencia a antiTB de cepas de *M. tuberculosis*, los cuales han sido adaptados para utilizarse en la evaluación de nuevos agentes antiTB. De manera general estos métodos los podemos clasificar como sigue:

**1.4.1 Método Radiométrico Bactec 460 Becton Dickinson Laboratories, USA (Inderlier CB y cols., 1996; Collins LA y SG Franzblau, 1997):**

Se basa en la evaluación del índice de crecimiento de los cultivos en 4 mL de medio de Middlebrook 7H9 suplementado con ácido palmítico marcado con  $^{14}\text{C}$ ; cuando el ácido palmítico es metabolizado por las micobacterias, genera  $[^{14}\text{C}]\text{-CO}_2$ , que es detectado aún en muy pequeñas cantidades. Cuando una cepa se inocula en este medio (medio 12B), adicionado de un antiTB en una concentración predeterminada (ó crítica) y se mide el crecimiento, comparándolo con el obtenido en un medio sin el medicamento, puede obtenerse una relación expresada en porcentaje de inhibición en comparación al control. Aunque este sistema reduce el tiempo de evaluación de posibles agentes antiTB, a 6-8 días, los costos son elevados. Mediante este bioensayo se puede obtener el porcentaje de inhibición del crecimiento micobacteriano y la MIC de un posible compuesto antiTB. Se requiere de la compra del equipo y contar con una licencia oficial para el manejo y uso de radioisótopos. Este método está siendo substituido por uno que utiliza fluorescencia, el cual es llamado por el fabricante (Becton Dickinson) Bactec 960.

**1.4.2 Luminiscencia, expresión del gen de la luciferasa (Shawar RH y cols., 1997; Cooksey RC y cols., 1993):**

El método utiliza cepas recombinantes de *M. bovis* (BCG) y *M. intracellulare* que expresan el gen de la enzima luciferasa de la luciémaga. Los análisis se

realizan en microplaca de 96 pozos. Este método permite el análisis rápido de la enzima luciferasa para detectar la actividad antiTB de extractos de plantas. Los controles y los extractos problemas son muestreados inmediatamente después de la inoculación, y después de 3 días (*M. intracellulare* recombinante) y 5 días (r BCG) de incubación para medir la luminiscencia con un luminómetro; se calcula el cambio relativo en luminiscencia, reportándose como porcentaje. Los resultados sugieren que el análisis de la expresión de la luciferasa es rápido y exacto, además que posee un gran potencial de acelerar la evaluación de la actividad antimicobacteriana *in vitro* de los extractos de plantas al trabajar con micobacterias de crecimiento rápido. Con este método es posible realizar el tamizaje de un gran número de muestras en un corto periodo de tiempo. También se puede trabajar con la cepa *M. tuberculosis* H37Ra y definir la MIC después de 21 días de incubación.

#### **1.4.3 Métodos de microdilución en medio líquido:**

En este caso microplacas de 96 pozos contienen concentraciones decrecientes del determinado "posible agente antiTB". La micobacteria en estudio es inoculada en los diferentes micropozos de la microplaca y la MIC es determinada después de la incubación, con la utilización o no de un indicador de viabilidad.

**1.4.3.1 Método del Alamar Azul en microplaca, MABA (por sus siglas en inglés, *Microplate Assay Blue Alamar*)** (Collins LA y SG Franzblau, 1997; Franzblau SG y cols., 1998):

El Alamar Azul es un indicador del potencial de óxido-reducción, que mide la proporción de micobacterias resistentes a una o varias concentraciones de diferentes antiTB; ésto mediante los cambios de color promovidos por la capacidad de las micobacterias viables de reducir el indicador presente en el medio de cultivo. Cuando las micobacterias están creciendo, el Alamar Azul cambia de color y el medio de cultivo vira del color azul a un color rosa intenso. En cambio, si la velocidad de crecimiento disminuye y con ello el metabolismo bacteriano, los microorganismos no reducen el indicador y no se observa un cambio en el color del medio. Así, la intensidad en el viraje de color es un indicativo del efecto de las diferentes concentraciones del antiTB sobre la población de las micobacterias presente en los pozos de la microplaca. Dichos cambios de color se comparan con los de cultivos testigos, los cuales no han recibido medicamentos o aquellos que se han lisado completamente de manera intencional (cultivos no viables). Al igual que con el sistema Bactec 460, mediante MABA es posible determinar tanto el porcentaje de inhibición a una concentración de interés como la MIC al utilizar un lector de microplacas para cuantificar ya sea fluorescencia o la permanencia del color azul (UV-Vis). El costo del MABA es menor y los resultados se obtienen rápidamente (4-8 días). Además este método puede semi-automatizarse con un microdilutor. Este método tiene actualmente gran

aceptación en los laboratorios de Micobacteriología Clínica, debido a que es rápido, reproducible, de bajo costo y adecuado también para su utilización en el rastreo de la actividad antiTB.

#### **1.4.3.2 Métodos que utilizan sales de Tetrazolio en Microplaca, TEMA (por sus siglas en inglés, *Tetrazolium Microplate Assay*):**

Estos métodos utilizan sales de Tetrazolio como indicador de viabilidad celular, las cuales son reducidas a formazán. El costo del TEMA en comparación con MABA es menor, precisamente por el costo del indicador.

Dentro de las sales que recientemente se han introducido al laboratorio de Micobacteriología Clínica se encuentra el 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio. El viraje del color al violeta sucede cuando las micobacterias son metabólicamente activas y en el caso contrario el indicador permanece de color amarillo (Foongladda S y cols., 2002; Morcillo N y cols., 2004; Lemus D y cols., 2004). Es de nuestro conocimiento que este bioensayo, se utiliza actualmente para la evaluación de posibles nuevos agentes antiTB aislados a partir de productos naturales (Dra. Rosario Rojas 2004, comunicación personal).

Se reporta también el uso de la sal disódica de tetrazolio: 2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolio-5-carboxanilida para la evaluación de actividad del hidrocloreuro de cryptolepina, aislado de la planta asiática

*Cryptolepis sanguinolenta*, sobre micobacterias de crecimiento rápido: *M. fortuitum*, *M. smegmatis*, *M. phlei*, *M. abscessus* y *M. aurum*. La determinación de la MIC se facilita por la adición de 20  $\mu$ L de MTT después de la reincubación por 20 minutos. Se considera que el crecimiento es positivo por el viraje del indicador del amarillo al azul (Gibbons S y cols., 2003).

## **1.5 Bioensayos para evaluar la toxicidad de agentes antiTB**

### **1.5.1 Letalidad sobre larvas de *Artemia salina*:**

Es conocido que los extractos, fracciones o compuestos puros obtenidos de plantas y con "posible actividad farmacológica" pueden someterse a una batería de bioensayos para detectar su toxicidad, que involucran líneas celulares animales y humanas específicas o animales de laboratorio como ratones, ratas o conejos; estos ensayos son costosos y requieren de infraestructura sofisticada. Sin embargo existe un bioensayo de los conocidos como de mesa de laboratorio, el cual es simple, económico, rápido, reproducible y no necesita de condiciones extremas de asepsia: el bioensayo de letalidad en larvas de *A. salina*.

*A. salina* (Artemiidae) larva del camarón, es un invertebrado de la fauna de ecosistemas acuáticos salinos y marinos. Este crustáceo juega un importante papel en el flujo de la cadena alimenticia y es un organismo que ha sido

usado en el laboratorio de bioensayos con el propósito de determinar toxicidad por estimación de la CL<sub>50</sub> (µg/mL) de los compuestos en medio salino. Existen reportes de la evaluación de la toxicidad de micotoxinas (Hlywka JJ y cols., 1997), de nuevos materiales dentales (Pelka M y cols., 2000), de metales pesados como cadmio (Sarabia R y cols., 2002) y arsénico (Brix KV y cols., 2003), de surfactantes catiónicos (Nalecz-Jawecki G y cols., 2003).

El uso de este bioensayo para evaluar la toxicidad de productos naturales está reportada por Logarto-Parra A y cols., en el 2001. En este estudio evaluaron la efectividad del bioensayo de *A. salina* para predecir la toxicidad de 20 extractos hidroalcohólicos y acuosos de plantas medicinales cubanas, en comparación con los resultados de DL<sub>50</sub> obtenidas por intoxicación oral aguda en ratones albinos Swiss.

### **1.5.2 Citotoxicidad:**

La evaluación *in vitro* de la toxicidad de posibles agentes antiTB tanto obtenidos por síntesis química como aislados de fuentes naturales está ampliamente reportada. Para realizar los ensayos de citotoxicidad se utiliza principalmente una línea celular de mono verde africano conocida como Vero (Cantrell CL y cols., 1996; Suling WJ y cols., 1998; Mangalindan GC y cols., 2000; Foroumadi A, y cols., 2001; 2002 a; 2002 b; 2003 a; 2003 b; Wachter

GA y cols., 2001; Solaja BA y cols., 2002; Vongvanich N y cols., 2002; Zarranz B y cols., 2003; Ningsanont N y cols., 2003; Woldemichael GM y cols., 2004; Gu JQ y cols., 2004 a). También existen reportes en los cuales además de las células Vero se emplean la líneas celulares KB (carcinoma epidermoide oral humano) y BC-1 (macrófagos derivados de leucemia linfoblástica humana) (Kittakoop P y cols., 2001; Seephonkai P y cols., 2002).



## CAPÍTULO 2

### ANTECEDENTES

#### 2.1 Descripción del Problema

Las micobacterias aisladas de pacientes con TBP en la población del Norte de la República y en el resto del mundo son más frecuentemente resistentes a rifampicina e isoniazida (Ávila Carmona MR y cols., 2000). La duración y el costo del tratamiento de enfermos con TBP infectados por cepas MDR son considerablemente mayores que los de los pacientes portadores de cepas sensibles: hasta 18.5 y 8.5 veces, respectivamente (Ávila Carmona MR y cols., 2000). En numerosos casos de TBP causada por cepas MDR el desenlace es mortal (Reechaipichitkul W, 2002; Palmero DJ y cols., 2004). La Norma Oficial Mexicana NOM-006-SSA2-1993 (Diario Oficial, 2000) para la prevención y control de la TB en la atención primaria a la salud y la Guía Técnica Operativa de TBP en Medicina Familiar del IMSS (IMSS, 2001) disponen que los pacientes con TBP portadores de cepas sensibles a medicamentos de primera línea deben seguir el tratamiento acortado estrictamente supervisado (TAES), el cual consiste en tomar, por dos meses,

rifampicina, isoniazida y pirazinamida, y por cuatro meses rifampicina e isoniazida. Idealmente este tratamiento cura, en 6 meses, entre el 95% y 98% de los casos sin tratamiento previo antiTB. Sin embargo, un grupo de 6 directores de UMF del IMSS, Delegación Nuevo León, realizaron una investigación sobre la eficacia del TAES en sus unidades y concluyeron que el 23% de los pacientes con TBP sin tratamiento previo que se atendían en sus UMF, no respondieron al TAES. Los mismos autores preveían que el porcentaje de pacientes sin tratamiento previo que no responden seguirá creciendo en los próximos años (Ávila-Carmona MR y cols., 2000). Lo anterior es congruente con el estudio realizado por Said-Fernández y cols., en el 2001 y con Becerril-Montes y cols., 2004 (manuscrito en preparación), quienes encontraron que en esta misma urbe, el 19.3 % de cepas aisladas de pacientes con TBP sin tratamiento previo antiTB, eran portadores de cepas resistentes a cuando menos un medicamento de primera línea. El problema de resistencia primaria (cepas aisladas de pacientes sin tratamiento previo) y secundaria (cepas aisladas de pacientes multitratados) es extensivo a todo el mundo, y sobre todo a los países en desarrollo (Durmaz R y cols., 2004; Kordy FN y cols., 2004; Ruiz P y cols., 2004; Ramaswamy SV y cols., 2004).

Por ello, es muy recomendable encontrar nuevas alternativas de tratamiento antiTB. Una fuente con gran potencial son los productos naturales, en especial las plantas (Rates S, 2001; Fabricant DS y NR Farnsworth, 2001).

La cepa H37Rv de *M. tuberculosis* es el modelo universal para estos trabajos, la cual es sensible a todos los medicamentos de primera línea: estreptomicina, isoniazida, rifampicina, etambutol y priazinamida. Existen sólo algunos reportes de evaluación antiTB usando cepas de *M. tuberculosis* drogorresistentes, los cuales se incluyen en la Tabla 3.

Tabla 3. Evaluación antiTB de productos naturales usando cepas de *M. tuberculosis* resistentes.

<b>Referencia</b>	<b>Fuente del Producto natural</b>	<b><i>M. tuberculosis</i> resistente a</b>	<b>Observaciones</b>
Lall N y cols., 1999	Plantas sudafricanas	Ri	extractos activos= 100 µg/ml
Lall N y cols., 2001	<i>Euclea natalensis</i>	RI, SIE, SIRE, SIR	Diospirina, MIC= 100 µg/mL
Xie JP y cols., 2003	Veneno de víbora	I, IR, SI, SIR, SIRE	Péptido Vgf-1, MIC= 8.5 µg/mL
Jimenez-Arellanes A y cols., 2003	Plantas del centro y sur de México	SIRE, IRE, IE	Fracción cromatográfica de <i>Lantana hispida</i> MICs >25µg/mL

S=Estreptomicina, I=Isoniazida, R=Rifampicina, E=Etambutol y P=Pirazinamida

Considerando que los compuestos puros con actividad antimicobacteriana y/o antiTB aislados de productos naturales poseen estructuras químicas muy diferentes a los medicamentos antiTB disponibles hasta ahora, se incluyó para el desarrollo del presente trabajo una cepa de *M. tuberculosis* MDR a la combinación de los 5 medicamentos antiTB de primera línea, ya que esta cepa MDR podría ser susceptible a los compuestos aislados, purificados y caracterizados durante este trabajo.

## 2.2 Justificación

El incremento de cepas *M. tuberculosis* resistentes a los medicamentos antiTB nos conduce a la necesidad urgente de intensificar la búsqueda y/o síntesis de nuevos compuestos con actividad antiTB. Tanto de extractos crudos como de compuestos puros aislados de plantas, ha sido reportada ampliamente actividad antimicobacteriana y antiTB, de aquí que los productos naturales son una excelente alternativa.

A pesar de que el pueblo mexicano tiene una larga y basta experiencia con el uso de remedios de origen natural para tratar las más diversas y en no pocas ocasiones, graves enfermedades, en nuestro país se tiene relativamente poca experiencia en el manejo de productos herbolarios en el ámbito de la Medicina Institucional. Sin embargo, si los medicamentos fallan, los remedios naturales constituyen una alternativa plausible.

De acuerdo con lo anterior, en la naturaleza pueden existir nuevos productos con actividad bactericida o bacteriostática contra cepas de micobacterias sensibles o MDR. Nuestro país tiene una gran biodiversidad. Se han identificado especies de plantas con actividad antimicobacteriana en el Sureste y Centro de la República Mexicana, pero no existen investigaciones tendientes a aislar esos principios activos de plantas del Noreste de México seleccionadas bajo los criterios etnofarmacológicos y/o quimiotaxonómicos,

que utilicen bioensayos bien establecidos para rastrear esa actividad desde los extractos crudos hasta los compuestos puros; tampoco existen trabajos de química de productos naturales para identificar y caracterizar los principios activos de estas plantas.

## **2.3 Hipótesis**

Existen plantas en el Noreste de México que contienen compuestos con actividad bactericida y/o bacteriostática contra cepas H37Rv y CIBIN/UMF15:99 de *Mycobacterium tuberculosis*.

## **2.4 Objetivos**

### **2.4.1. Objetivo General:**

Purificar y caracterizar compuesto(s) de plantas del Noreste de México con actividad bactericida y/o bacteriostática contra cepas H37Rv y CIBIN/UMF15:99 de *Mycobacterium tuberculosis*.

#### **2.4.2. Objetivos Específicos:**

1. Búsqueda, recolección, clasificación y registro de las especies de plantas regionales que resultaron seleccionadas por criterios etnofarmacológicos y/o quimiotaxonómicos.
2. Obtención de los extractos metanólicos y acuosos de cada una de las partes (raíces, tallos, hojas y en su caso flores y/o frutos) de cada especie de plantas recolectadas.
3. Tamizaje de los extractos mediante el Método de Alamar Azul en Microplaca para identificar los que posean actividad antituberculosa.
4. Fraccionamiento biodirigido del o los extractos antituberculosos.
5. Purificación y determinación de la estructura química del o los compuesto(s) antituberculosos.
6. Determinación de la MIC del compuesto(s) puro(s) contra de las cepas H37Rv y CIBIN/UMF15:99 de *Mycobacterium tuberculosis*.
7. Determinación de la actividad bactericida o bacteriostática del o los compuestos.
8. Evaluación de la toxicidad del o los compuestos mediante el bioensayo de letalidad en larvas de *Artemia salina* en microplaca.

## **CAPÍTULO 3**

### **MATERIAL Y MÉTODOS**

#### **3.1 Equipo, Material y Reactivos**

##### **3.1.1 Equipo:**

- Molino Thomas Wiley, Laboratory Mill, modelo 4, malla 2 mm
- Licuadora OSTERIZER
- Balanza analítica Ohaus
- Balanza analítica Ohaus-Analytical Plus
- Rotavapor Büchi modelo 461 con baño de agua Büchi RE 121
- Rotavapor- R Büchi con baño de agua HB4 Basic Kika Labortechnik
- Pistola de desecación Desaga Hidelberg Trockenpult, Type 134100
- Liofilizadora Labconco 7522800 Freeze Dry-12; Fr
- Bomba de vacío Gast US Patent Number 3,658,250
- Lámpara Spectroline Highest Ultraviolet Intensty
- Incubadora VWR
- Refrigerador TORREY
- Congelador Revco a  $-70^{\circ}\text{C}$
- Campana de Bioseguridad NUAIRE
- Campana extractora de humos VECTON

- Microscopio Invertido Iroscope Modelo SI-PH
- Microscopio Estereoscópico American Optical Co.
- Densitómetro Densimat bioMerieux
- Cronómetro Sper Scientific
- Cromatógrafo Waters con Bomba 600 y Detector de Arreglo de Diodos 2996
- Espectrofotómetro UV-Vis Beckman DU 7500
- Cromatógrafo Waters acoplado a Espectrómetro de Masas Thermabeam Mass Detector y Detector de Arreglo de Diodos
- Espectrofotómetro de Infrarrojo con Transformada de Fourier Perkin Elmer, Spectrum One
- Espectrómetro RMN Bruker Modelo Avance DPX400, de 9.4 Teslas de campo magnético, operado a frecuencia para  $^1\text{H}$  de 400.13 MHz y para  $^{13}\text{C}$  de 100.61 y temperatura controlada por la unidad Eurotherm Bruker, equipado con una sonda de detección directa de 5 mm
- Polarímetro Perkin Elmer con control de Temperatura Modelo 341, con lámpara de sodio, filtro de 589 nm y una celda de 1 dm de longitud y 1 mL de capacidad

### 3.1.2 Material:

- Matraces Erlenmeyer Pyrex de 500 mL
- Pomaderas ámbar
- Microtubos eppendorf de 1.5 mL
- Torundas de algodón Curity
- Gasas Le Roy 20 cm x 12 cm
- Matraces de separación Pyrex de 250 mL
- Viales de vidrio con tapón de rosca de teflón de 4 ml Wheaton



- Cartuchos para cromatografía a Baja Presión LiChrorep RP-18 (40-63  $\mu\text{m}$ ) Merck Tamaños de 240 x 10 y 310 x 25
- Embudo de filtración Pyrex de 150 mL fondo de vidrio poroso de poro Fino
- Matraces Erlenmeyer Pyrex de 250 mL
- Tapones de hule horadados
- Probetas de 100, 250 y 500 mL
- Pipetas lineales de 5 y 10 mL
- Matraces Erlenmeyer Pyrex de 250 mL
- Cajas para tubos eppendorf
- Cubas para desarrollar cromatografías TLC 121 X 108 X 83 mm
- Cuba para desarrollar cromatografía TLC 27.5 X 27.5 X 7.5 cm
- Pipetas automáticas Eppendorf de una punta de volumen variable de 1000 a 100, 200-10, 2-20  $\mu\text{L}$
- Pipetas automáticas Eppendorf de 8 canales de volumen variable de 10-100 y 20-300  $\mu\text{L}$
- Tubos de vidrio de 13 x100 mm de tapón de rosca
- Frasco para liofilizar Labconco capacidad de 900 mL
- Placas de porcelana
- Cromatofolios AL TLC de Sílica Gel F254 Merck
- Capilares de 2 y 5  $\mu\text{L}$
- Embudos de filtración rápida
- Cajas de petri de vidrio
- Pipetas pasteur
- Cajas de petri desechables
- Acrodiscos PTFE de 13 mm diámetro y tamaño de poro de 0.22  $\mu\text{m}$  Millipore
- Acrodiscos de Nylon 13 mm diámetro y tamaño de poro de 0.22  $\mu\text{m}$  Millipore

- Membranas Durapore GWPO1300 13 mm diámetro y tamaño de poro de 0.22  $\mu\text{m}$  Millipore
- Membranas Durapore HATF04700 47mm diámetro y de tamaño de poro de 0.45 $\mu\text{m}$  Millipore
- Microplacas de 96 pozos de baja evaporación Costar
- Jeringas de 1 mL Becton-Dickinson
- Espátulas
- Vasos de precipitado
- Papel filtro No. 40
- Papel aluminio
- Parafilm
- Batas quirúrgica y estériles Barrier
- Guantes estériles
- Lentes de Seguridad
- Cubiertas para calzado Tyvek
- Gorras para cirujano Tyvek
- Respirador N 95 3M
- Apósitos desechables KENDALL
- Puntas desechables para pipeta azules Axygen
- Puntas desechables para pipeta amarillas Axygen
- Puntas desechables con filtro y estériles de 200  $\mu\text{L}$  Axygen
- Puntas desechables con filtro y estériles de 1000  $\mu\text{L}$  Axygen
- Puntas desechables con filtro y estériles de 20  $\mu\text{L}$  Axygen
- Bolsas Ziploc Johnson& Son Racine, Wisconsin, U.S.A
- Crioviales de 2 mL estériles Daigger
- Tubos cónicos de 15mL con tapón de rosca y estériles Daigger
- Columna Cromolith Performance Merck RP 5  $\mu\text{m}$ , 18E 100-4.6 mm
- Columna Symmetry C18 5  $\mu\text{m}$ , 3.9 X 150 mm No. Serie WAT 046980
- Columna Polarity dC18 3  $\mu\text{m}$  2.1 X 50 cm

### 3.1.3 Reactivos y Solventes:

- Bromo Sigma
- Tetracloruro de Carbono ACS Fermont
- Permanganato de Potasio Sigma
- 2-4 dinitrofenilhidrazina Sigma
- Ácido Sulfúrico ACS Fermont
- Cloruro Férrico Sigma
- Anhídrido acético Baker
- $\alpha$ -naftol Sigma
- p-dimetilaminobenzaldehído Sigma
- Ácido clorhídrico Baker
- Hidróxido de Sodio Sigma
- Ácido pícrico Sigma
- Hidróxido de Potasio Sigma
- Limadura de Mg Productos Químicos Monterrey
- Nitrato de Bismuto Productos Químicos Monterrey
- Ácido acético glacial Baker
- Yoduro de Potasio Sigma
- Agua MiliQ
- Agua desionizada
- Agua Bidestilada
- MeOH ACS Fermont
- Hexano ACS Fermont
- ButOH ACS Fermont
- AcOEt ACS Fermont
- Cloroformo ACS Fermont
- Acetona ACS Fermont
- Diclorometano ACS Fermont

- Acetonitrilo ACS Fermont
- Clorformo-d, Sigma 100% D
- D<sub>2</sub>O Aldrich 99.9% D
- DMSO ACS Sigma
- Nitrógeno gas de alta pureza, AGA
- Argón de alta pureza, AGA
- Helio, AGA
- Yodo en cristales
- Fenol
- EtOH al 70%
- Ácido fórmico
- Agua bidestilada esteril
- Indicador de viabilidad celular Blue Alamar Trek Diagnostic
- Medio de cultivo líquido Middlebrook 7H9 broth Difco
- Medio de cultivo sólido Lowenstein-Jensen Merck
- Glicerol Sigma Aldrich
- Enriquecimiento para medio de cultivo OADC (oleic acid, albumin, dextrose, catalase) Becton Dickinson
- Tween-80 Sigma Aldrich
- Ofloxacina Sigma
- Rifampicina Sigma
- Sal para preparar agua de mar Ocean Pacific
- Extracto de levadura Bioxon
- Dicromato de potasio Sigma
- EtOH absoluto Sigma
- Sílica Gel 60 Merck para placas de Cromatografía en Capa Fina Preparativa

#### **3.1.4 Material Biológico:**

- Cepa de *M. tuberculosis* H37Rv ATCC 27294 sensible a los medicamentos antiTB de primera línea (estreptomina, isoniazida, rifampicina, etambutol y pirazinamida)
- Cepa de *M. tuberculosis* CIBIN/UMF15:99 resistente a estreptomina, isoniazida, rifampicina, etambutol y pirazinamida de un paciente con TPB avanzada la cual fue aislada, identificada y caracterizada en el laboratorio de Micobacteriología del CIBIN-IMSS
- Huevecillos de *Artemia salina* Great Lake

## **3.2 Métodos**

### **3.2.1 Búsqueda, recolección, clasificación y registro de las especies de plantas regionales que resultaron seleccionadas por criterios etnofarmacológicos y/o quimiotaxonómicos:**

Para la búsqueda de las plantas, se utilizaron tanto criterios etnofarmacológicos como quimiotaxonómicos. Se investigó en libros, tesis, revistas científicas, bases de datos etnobotánicas y etnofarmacológicas: Infotrieve, Medline, Chemical Abstract, NAPRALERT, Rain-tree. Además se hizo investigación de campo en mercados y hierberías de la ciudad de Monterrey y entrevistas con personas que viven en la zona rural en Linares, Cerralvo y Agualeguas N.L., así como en Parras Coah. de las plantas medicinales localizadas en la región Noreste de México y que la Medicina Herbolaria refiere con actividad antiTB, antimicótica y/o antilepra, así como para tratar enfermedades pulmonares.

De todas las especies seleccionadas se recolectó parte aérea y raíz y en los casos de que las hubiera también flor y frutos. Las fechas de colecta fueron entre octubre del 2000 y octubre del 2002. Los lugares de colecta están dentro de los estados de Nuevo León y Coahuila. Estas actividades fueron asesoradas por el M.C. Humberto Sánchez Vega, especialista en Botánica.

La clasificación y registro en el herbario de la Facultad de Ciencias Biológicas de los especímenes de las plantas regionales se realizó por el Biól. Marco Antonio Guzmán Lucio y M.C. María del Consuelo González de la Rosa del Depto. de Botánica de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL.

### **3.2.2 Obtención de los extractos metanólicos y acuosos de cada una de las partes (raíces, tallos, hojas y en su caso flores y/o frutos) de cada especie de plantas recolectadas:**

Las plantas completas se secaron a temperatura ambiente por dos semanas; posteriormente se separaron las hojas, corteza, fruto, raíz o flores, las cuales se molieron en molino o licuadora. Se realizaron 3 extracciones de 100 g del molido obtenido vía maceración a temperatura ambiente con 300 mL de MeOH. El residuo originado se extrajo 3 veces con 200 mL de agua bidestilada, también por maceración; esto sólo se realizó con la parte de la planta que la etnofarmacología informaba de su uso.

Los extractos metanólicos se evaporaron por destilación a temperatura controlada de 37°C con rotavapor y los acuosos mediante liofilización; ambos extractos se secaron totalmente bajo atmósfera de N<sub>2</sub>, se guardaron en refrigeración a 4°C y protegidos de la luz para la evaluación posterior de su actividad antiTB. Todos los extractos fueron secados durante 24 h a 37°C en

pistola de desecación bajo atmósfera de N<sub>2</sub>, antes de evaluar su actividad antiTB.

### **3.2.3 Tamizaje de los extractos mediante Método de Alamar Azul en Microplaca para identificar los que poseen actividad antiTB *in vitro*:**

Para la evaluación de la actividad antiTB se siguió el Bioensayo MABA establecido por Franzblau SG y cols., 1998 y modificado por Jimenez-Arellanes A y cols., 2003.

#### **3.2.3.1 Evaluación de la interferencia del color propio del extracto sobre la apreciación del viraje del indicador redox Alamar Azul:**

Se prepararon soluciones en medio Middlebrook suplementado con OADC de Alamar Azul + Tween 80 al 20 % (v/v) en estado oxidado (color azul) y estado reducido (rosa) y del extracto más oscuro obtenido y a la mayor concentración a evaluar (*Schinus molle*, 500 µg/mL) y se realizaron los espectros UV-Vis (200-800 nm). Posteriormente se hicieron mezclas del extracto tanto con el indicador en estado oxidado como reducido y se tomaron los espectros UV-Vis de ambas mezclas.



### **3.2.3.2 Determinación del efecto inhibitorio del DMSO sobre las micobacterias:**

En una microplaca se incluyeron una serie de diluciones seriadas de DMSO que abarcaba el rango de concentración del 25.00 al 0.78 % v/v del disolvente en medio Middlebrook 7H9 enriquecido (por duplicado); el bioensayo que se realizó fue MABA descrito a detalle en 3.2.3.5. Se consideró como un efecto tóxico del DMSO hasta el micropozo que se correspondió con la mínima concentración que inhibe el crecimiento de la micobacteria, en términos de la que previene o evita el viraje del color del Alamar Azul del azul a cualquier tonalidad de violeta o rosa. En todos los casos la mínima concentración inhibitoria fue confirmada por revisión al Microscopio Invertido. El efecto inhibitorio del DMSO se evaluó para ambas cepas micobacterianas.

### **3.2.3.3 Preparación de los extractos:**

En el caso de los extractos orgánicos crudos obtenidos, éstos se disolvieron en DMSO a una concentración de 2 mg/mL y fueron esterilizadas por paso a través de un acrodisco de PFTE 0.22  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro. Los extractos acuosos fueron disueltos directamente en medio Middlebrook 7H9 enriquecido con 10% de OADC también a una concentración de 2 mg/mL y esterilizados por filtración a través de acrodiscos de Nylon de tamaño de poro de 0.22  $\mu\text{m}$ .

#### **3.2.3.4 Preparación de los inóculos micobacterianos:**

Se realizaron cultivos primarios de ambas cepas micobacterianas en medio sólido Lowenstein-Jensen, a partir de los cuales se tomó una asada de colonias para realizar una suspensión micobacteriana en 1 mL de agua bidestilada con ayuda de perlas de vidrio de 3 mm estériles. Los cultivos secundarios se realizaron inoculando 0.1 mL de esta suspensión en 2.5 mL de medio Middlebrook 7H9 enriquecido y se dejaron crecer hasta que la bacteria alcanzaba su fase logarítmica comparable al estándar No. 1 de Mc Farland para lo cual se empleó un densitómetro. Posteriormente se preparó una dilución 1:50 que contenía  $6 \times 10^5$  UFC/mL, que se correspondía con el inóculo de trabajo.

#### **3.2.3.5 Evaluación de la actividad antiTB de extractos crudos:**

MABA fue realizado en microplacas de poliestireno de 96 pozos con tapa de baja evaporación y estériles. Doscientos microlitros de agua desionizada estéril fueron añadidos en los pozos de la periferia para minimizar la evaporación. Las placas se manejaron entonces con 10 hileras con 6 filas cada una. Se agregaron 100  $\mu$ L de medio Middlebrook enriquecido al resto de los micropozos. Cien  $\mu$ L de los extractos estériles a evaluar fueron añadidos al primer micropozo de cada fila y se realizaron diluciones a través de las 6 hileras disponibles. Se incluyeron 2 hileras con diluciones seriadas de los controles positivos: rifampicina y ofloxacina; en otra hilera se

destinaron un micropozo como control de esterilidad del medio de cultivo (sin inóculo), 4 micropozos para controles de crecimiento de las micobacterias (inóculo libre de antiTB o extracto) y un micropozo adicional con el control de crecimiento en dilución 1:100 del inóculo de trabajo (método de las proporciones, recomendado para Micobacteriología). Cien  $\mu\text{L}$  del inóculo bacteriano fueron añadidos a cada micropozo con los extractos prueba, los medicamentos antiTB y los controles de crecimiento. El rango de concentración final fue para los extractos de 500.00 a 15.63  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; para rifampicina de 0.06-2.00  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y para ofloxacina 0.50-16.00  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Las microplacas fueron introducidas en bolsas de plástico e incubadas a 37°C por 5 días en atmósfera con 5% de  $\text{CO}_2$ . Al quinto día, 32  $\mu\text{L}$  de una mezcla recientemente preparada de Alamar Azul y Tween 80 estéril al 20% v/v 1.6:1 (v/v) fueron añadidos a uno de los micropozos del control de crecimiento y las placas se re-incubaron por 24 h bajo las mismas condiciones. Si el color azul del indicador redox viraba al rosa (lo que indicaba que las micobacterias eran metabólicamente activas), 32  $\mu\text{L}$  de la mezcla se añadían al resto de los micropozos. Las microplacas se re-incubaron por 24 h adicionales bajo las mismas condiciones. El viraje del color azul al rosa fue considerado como indicativo de crecimiento bacteriano. La actividad antiTB de los extractos fue considerada en términos de MIC. La MIC fue definida como la menor concentración del extracto que inhibió el crecimiento bacteriano, medido como aquel que previene o evita el cambio de color del Alamar Azul del azul

a cualquier tonalidad de violeta o rosa; en todos los casos fue confirmada por revisión del crecimiento en cada uno de los micropozos al Microscopio Invertido en campo claro y con aumento de 100X.

#### **3.2.4 Fraccionamiento biodirigido del extracto metanólico de corteza de raíz de *Leucophyllum frutescens*:**

A partir de 6 especímenes de aproximadamente 1.5 m de altura se obtuvieron 200 g de corteza de raíz y 200 g de hojas molidas; cada una de ellas fueron extraídas con MeOH vía maceración como se describió en 3.2.2. De manera general se utilizaron técnicas analíticas de separación seguidas por la evaluación biológica para identificar en que fracción se concentraba o mantenía la actividad antiTB.

##### **3.2.4.1 ELL con polaridad diferencial de los extractos metanólicos de hojas y raíz de *L. frutescens*:**

Quince gramos de los extractos metanólicos crudos de corteza de hojas y raíz fueron re-disueltos en 50 mL de MeOH. A partir de estas soluciones metanólicas se realizaron ELL con 150 mL de hexano por triplicado. El residuo metanólico se diluyó 1:2 con agua bidestilada; el extracto hidroalcohólico (150 mL), fue extraído con 450 mL de AcOEt. El mismo procedimiento se repitió con 300 mL de ButOH.

Las fracciones obtenidas después de la ELL con polaridad diferencial, fueron evaporadas en rotavapor, llevadas a sequedad total y almacenadas bajo las condiciones antes mencionadas.

#### **3.2.4.2 Evaluación de la actividad antiTB de las fracciones obtenidas por ELL:**

Las fracciones fueron evaluadas mediante MABA, como se explicó en 3.2.3.3, 3.2.3.4 y 3.2.3.5.

#### **3.2.4.3 Identificación de los grupos fitoquímicos de las fracciones antiTB obtenidas de los extractos metanólicos de raíz y hoja de *L. frutescens*:**

Por medio de pruebas colorimétricas se identificaron los grupos fitoquímicos presente en las fracciones activas obtenidas de corteza de raíz y de hojas de *L. frutescens* (Dominguez XA, 1979).

##### **3.2.4.3.1 Instauraciones**

**Prueba del  $\text{Br}_2/\text{CCl}_4$ :** Se disolvieron 1-2 mg de la muestra en 1 mL de  $\text{CCl}_4$  y se agregó gota a gota una solución de Bromo al 2% en  $\text{CCl}_4$ . La decoloración de la solución se consideró como prueba positiva.

**Prueba del  $\text{KMnO}_4$ :** Se disolvieron 1-2 mg de la muestra en MeOH y se añadió gota a gota una solución acuosa de  $\text{KMnO}_4$  al 2%; la prueba se consideró positiva si hubo decoloración o formación de un precipitado café.

#### **3.2.4.3.2 Grupo Carbonilo**

**Prueba de la 2-4 dinitrofenilhidrazina:** 1-2 mg de la muestra se disolvieron en EtOH y se añadió gota a gota solución saturada de 2,4 dinitrofenilhidrazina en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 6N. La formación de un precipitado amarillo o naranja indicó la presencia del grupo carbonilo.

#### **3.2.4.3.3 Oxhidrilos fenólicos**

**Prueba del FeCl<sub>3</sub>:** 1-2 mg de la muestra se disolvieron en MeOH y posteriormente se le añadió una gota de cloruro férrico al 12.5% en agua. La aparición de un precipitado rojo, azul violeta o verde se consideró como prueba positiva.

#### **3.2.4.3.4 Esteroides y Triterpenos**

**Prueba de Liebermann-Burchard:** Se disolvieron 1-2 mg de la muestra en cloroformo y se agregó gota a gota una mezcla 1:1 de anhídrido acético:cloroformo recién preparada. La aparición de cualquier color en el lapso de 1h fue considerado como prueba positiva.

**Prueba de Salkowski:** 1-2 mg de la muestra se disolvieron en cloroformo y se agrega 1mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; el desarrollo de un color amarillo o rojo se consideró prueba positiva para esteroides y metil-esteroides.

#### **3.2.4.3.5 Carbohidratos**

**Prueba de Molish:** A 1-2 mg de la muestra se le agregó el reactivo de Molish que consiste en: 1)  $\alpha$ -naftol (1% en EtOH) y 2)  $H_2SO_4$  concentrado. La prueba se consideró positiva por la formación de un anillo coloreado en la interfase.

#### **3.2.4.3.6 Grupo Furano**

**Prueba de Erlich:** 1-2 mg de la muestra se disolvieron en EtOH y se le agregaron 5 gotas de p-dimetilaminobenzaldehído al 5% en EtOH. La muestra se colocó en una cuba con vapores de HCl; la aparición de un color naranja se consideró como prueba positiva.

#### **3.2.4.3.7 Coumarinas**

Se disolvieron 1-2 mg de la muestra en solución de NaOH al 10% y la aparición de una coloración amarilla la cual desaparece al acidular fue considerada como prueba positiva.

#### **3.2.4.3.8 Sesquiterpenlactonas**

**Prueba de Baljet:** Se mezclaron 2-3 mg de la muestra con 4 gotas de la mezcla 1:1 de la solución A: solución B (solución A: ácido pícrico 1% en EtOH y solución B: NaOH al 10% acuosa) la cual fue preparada

inmediatamente antes de usarse. La prueba se consideró como positiva si se formó una coloración anaranjada o roja oscura.

#### **3.2.4.3.9 Quinonas**

**Prueba de Bornträger:** 2 mg en una solución de NaOH al 5% se pusieron a hervir por 10 min; se dejó enfriar y se aciduló con HCl 2%. Se realizó extracción con Benceno al cual se le agregó KOH. La decoloración de la fase bencénica y un color rojo en la fase alcalina, se consideró como prueba positiva.

#### **3.2.4.3.10 Flavonoides**

**Prueba del H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>:** Se disolvió una pequeña cantidad de la muestra en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado. La aparición de un color amarillo se consideró positivo para flavonas y flavonoles; naranja-rojo oscuro para flavonas y rojo-azuloso para chalconas.

**Prueba de Shinoda:** A una solución de la muestra en EtOH se le agregó limadura de Mg y se calentó a 60 °C a Baño María; posteriormente se le agregaron unas gotas de HCl concentrado. Se consideró positiva la prueba por la presencia de colores naranja, rojo, rosa-azuloso y violeta.



### **3.2.4.3.11 Alcaloides**

#### **Prueba de Dragendorff, con modificaciones de Munier y Machaelobuf:**

El reactivo utilizado consiste de dos soluciones:

Solución A: 0.85 g de nitrato de bismuto en una mezcla de 10 mL de ácido acético glacial y 40 mL de agua

Solución B: solución acuosa de KI al 40%

El reactivo consiste de 5 mL de la solución A, 4 de la solución B y 100 mL de agua. Para esta prueba se corrieron CCF de la muestra y se reveló la placa con este reactivo; la persistencia por 24 h de un color rojo o naranja fue considerada como prueba positiva.

#### **3.2.4.4 Fraccionamiento mediante Cromatografía de Líquidos al Vacío de la fracción hexánica:**

Para realizar la Cromatografía de Líquidos al Vacío (VLC, por sus siglas en inglés *Vacuum Liquid Chromatography*) se siguió el procedimiento descrito por Coll JC y BF Bowden, 1986. Se realizaron 2 cromatografías de la fracción hexánica de corteza de raíz, una con 3 g y la segunda con 2 g. En embudos de filtración con fondo de vidrio poroso de 150 mL se colocaron 60 g de Sílica Gel 60 G. Se disolvieron por separado los 3 y 2 g de la fracción en el *mínimo volumen de hexano* y posteriormente se mezclaron con 9 y 6 g de Sílica respectivamente hasta sequedad. Las muestras se sembraron aplicando vacío para lograr su perfecto empaquetamiento.

La elución se realizó usando como fase móvil mezclas de distinta polaridad de hexano y AcOEt (20:1, 15:1, 10:1, 5:1, 3:1, 2:1, 1:1), continuando con AcOEt y MeOH. El volumen de elución en cada caso fue de 300 mL.

Las fracciones obtenidas mediante VLC fueron evaporadas en rotavapor, llevadas a sequedad total y guardadas bajo las condiciones antes mencionadas.

El monitoreo de la separación química se realizó mediante las técnicas cromatográficas CCF-FN y HPLC-FR-DAD. También fue realizado el rastreo de metabolitos por HPLC-EM.

Las CCFs se realizaron en cromatofolios de sílica Gel 60 con indicador de fluorescencia con distintos sistemas de elución con mezclas de hexano:AcOEt (3:1, 2:1, 1:1), hexano:DCM, (3:1, 2:1, 1:1) benceno:acetona (3:1, 2:1, 1:1), DCM con 1, 3, 4, y 7% de MeOH y DCM con 1, 3, 4, y 7% de acetona. La detección se realizó mediante exposición a luz UV de 254 y 365 nm, así como a vapores de yodo.

Para las HPLC-DAD se pesaron 2 mg de la fracción activa, los cuales se disolvieron en MeOH grado HPLC y se filtraron a través de una membrana Durapore. El análisis cromatográfico se realizó en un cromatógrafo Waters con bomba 600 y DAD 2996, bajo las siguientes condiciones: Columna

Cromolith Performance Merck RP 5  $\mu\text{m}$ , 18E 100-4.6 mm y Fase Móvil:

MeOH:agua 70:30, con el siguiente gradiente:

Tiempo (min)	Flujo (mL/min)	% MeOH	% Agua	Curva
0	1	70	30	6
8	1	100	0	6
23	1	100	0	6
25	1	70	30	6
30	1	70	30	6

La longitud de onda de monitoreo fue de 254 nm.

Para realizar los cromatogramas en el **HPLC-EM** se utilizó un Cromatógrafo Waters acoplado al Espectrómetro de Masas Integrity. Las condiciones de trabajo fueron:

Fase Estacionaria	Columna Polarity $\mu\text{C18}$ 3 $\mu\text{m}$ 2.1 X 50 cm
Fase Móvil	A) ácido fórmico 0.1% en agua B) ácido fórmico 0.1% en ACN
Gradiente	5% al 95% de B en 12.5 min
Flujo	0.3 mL/min
$\lambda$ de barrido	210 a 450 nm
Intervalo de Masa	60-650 uma
Filamento	70 eV
Adquisición de datos	Barrido completo a velocidad de 1 espectro/ seg
Flujo He	20 mm
Temperatura Nebulizador	75 °C
Temperatura de la región de expansión	75 °C
Temperatura de la cámara de ionización	200 °C

Cinco mg de cada compuesto se prepararon como se describe para HPLC-DAD y se realizó la cromatografía a 10  $\mu$ L de esta solución. Del cromatograma obtenido del Barrido de Masas, se extrajo el cromatograma a la m/z del pico base, se hizo una combinación de espectros de la parte central del pico y se restó el ruido de fondo.

Las fracciones fueron evaluadas mediante MABA, como se explicó en 3.2.3.3, 3.2.3.4 y 3.2.3.5.

#### **3.2.4.5 Fraccionamiento mediante Cromatografía a Baja Presión-FR de la fracción VLC 20:1:**

La fracción obtenida de la VLC con el sistema hexano:AcOEt 20:1 (VLC 20:1) se purificó por Cromatografía a Baja Presión en una columna RP-18, tamaño 310 x 25. La columna se acondicionó primeramente con una mezcla 50:50 y posteriormente con 70:30 de MeOH:agua; 812 mg de la fracción activa se disolvieron en MeOH y unas gotas de cloroformo y se sembró inmediatamente en la columna. La elución se realizó con 300 mL de los siguientes disolventes: mezclas de MeOH:agua 70:30, 80:20, 90:10; MeOH, 50:50 MeOH:acetona y acetona. La velocidad de elución fue de 2 mL/min.

Las fracciones obtenidas mediante la Cromatografía en Columna a Baja Presión-FR fueron evaporadas en rotavapor, llevadas a sequedad total y guardadas bajo las condiciones antes mencionadas.

El monitoreo de la separación química se realizó mediante las técnicas cromatográficas CCF y HPLC-DAD, como se describe en 3.2.4.4.

Las fracciones fueron evaluadas mediante MABA, como se explicó en 3.2.3.3, 3.2.3.4 y 3.2.3.5; el rango de concentración usado fue entre 100.00 y 3.13  $\mu\text{g/mL}$ .

### **3.2.5 Purificación y determinación de la estructura del o los compuesto(s) antiTB:**

#### **3.2.5.1 Purificación de la fracción cromatográfica antiTB F3, 90:10:**

Sesenta y cinco mg de la fracción obtenida de la Cromatografía a Baja Presión-FR con el sistema MeOH:agua 90:1 (F3 90:10), se disolvieron en MeOH y fueron sembrados en una columna RP-18, tamaño 240 X10. La elución se realizó usando 60 mL de las mezclas MeOH:agua (80:20), MeOH:agua (90:10) y MeOH, se recogieron alícuotas en volúmenes de 2 mL.

El monitoreo de las fracciones obtenidas se realizó mediante HPLC; se tomaron alícuotas de las mismas (cada 5 tubos) y se prepararon como se

describe en 3.2.4.4; se usó una columna Symmetry C18 5 $\mu$ m, 3.9 X 150 mm No. Serie WAT 046980 y como Fase Móvil: MeOH:agua 70:30, con el siguiente gradiente:

Tiempo (min)	Flujo (mL/min)	% MeOH	% Agua	Curva
0	1	70	30	4
23	1	100	0	4
28	1	70	30	6
33	1	70	30	6

Las longitudes de onda de monitoreo fueron 235, 254 y 275 nm.

### **3.2.5.2 Purificación de la fracción cromatográfica antiTB F4, 100 MeOH:**

Doscientos cincuenta mg de la fracción obtenida de la Cromatografía a Baja Presión-FR con MeOH (**F4, 100 MeOH**), se disolvieron en MeOH y fueron sembrados en un columna RP-18, tamaño 240 X10. La elución se realizó con 60 mL de las mezclas MeOH:agua (80:20), MeOH:agua 90:10 y MeOH. La purificación fue monitoreada por HPLC bajo las condiciones mencionadas en 3.2.5.1.

### **3.2.5.3 Evaluación de la Pureza Cromatográfica:**

La evaluación de la pureza cromatográfica se realizó mediante las técnicas CCF y HPLC, como se describe en 3.2.4.4. Paralelamente se realizaron las co-cromatografías en ambas técnicas.

#### **3.2.5.4 Determinación de la estructura de los compuestos 3 y 4 purificados a partir de las fracciones antiTB F3 90:10 y F4 MeOH:**

Se hizo uso de los distintos tipos de espectros obtenidos como se explica a continuación:

##### **3.2.5.4.1 Espectros UV-Vis:**

Se realizaron en el Espectrofotómetro Beckman DU 7500 con arreglo de Diodos. A partir de 2 mg de cada **compuesto** que se disolvieron en MeOH se realizaron los barridos espectrales de 200 a 800 nm previa sustracción del blanco (MeOH).

##### **3.2.5.3.2 Espectro IR:**

Se tomaron los espectros de fondo de 4000 y 650  $\text{cm}^{-1}$  con número de barridos de 8. Posteriormente se hizo la película con 2 mg del **compuesto 4** sobre el cristal del ATR y se obtuvo su espectro con el mismo número de barridos.

##### **3.2.5.3.3 Espectros de Masas:**

Los espectros de Masas fueron obtenidos en el Espectrómetro de Masas Integrity acoplado al Cromatógrafo Waters utilizando las condiciones descritas en 3.2.4.4.

#### **3.2.5.3.4 Espectros de RMN:**

Cinco mg de los **compuestos** previamente llevados a sequedad total en la pistola de desecación se disolvieron en cloroformo-d (100% D), se filtraron y desgasificaron por burbujeo con Argón y ultrasonificación. Estas soluciones se colocaron en una sonda de detección directa para RMN de 5 mm de diámetro y se llevaron a cabo los siguientes espectros:  $^1\text{H}$  RMN,  $^{13}\text{C}$  RMN, DEPT-135, HMBC, HMQC y COSY.

Para los experimentos de  $^1\text{H}$  RMN de intercambio con deuterio se añadieron como máximo 50  $\mu\text{L}$  de  $\text{D}_2\text{O}$ .

#### **3.2.5.3.5 Poder Rotatorio:**

Se prepararon soluciones en cloroformo de los **compuestos 3 y 4** a concentraciones de 0.225 g/100 mL y 0.147 g/100 mL, respectivamente.

El blanco y las soluciones de los compuestos se colocaron en una celda y se observó que el camino estuviera libre de burbujas, para inmediatamente después registrar la rotación óptica a 589 nm (línea del sodio).



### **3.2.6 Determinación de las MICs del compuesto(s) puro(s) para las cepas H37Rv y CIBIN/UMF15:99 de *M. tuberculosis*:**

Se siguió el procedimiento descrito en 3.2.4.6. Los dos compuestos fueron evaluados por duplicado; se reveló con la mezcla Alamar Azul+Tween 80 solamente una de las hileras.

### **3.2.7 Determinación de la actividad bactericida o bacteriostática de los compuestos 3 y 4 aislados de *L. frutescens*:**

Se tomaron 5  $\mu$ L de los micropozos que correspondían a la MIC, 2X y 4X la MIC del **compuesto 3 y 4** incluidos en la hilera que no fue revelada con el indicador redox, los cuales fueron dispensados en micropozos que contenían 195  $\mu$ L de medio de cultivo enriquecido. Las resiembras se realizaron por triplicado. El mismo procedimiento se siguió con los micropozos que contenían rifampicina y ofloxacina, así como controles de crecimiento. De igual manera se incluyó el control de esterilidad del medio de cultivo. Las microplacas fueron introducidas en bolsas de plástico e incubadas a 37°C en atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub>. Se realizó la revisión al microscopio diariamente de los micropozos del control de crecimiento y los medicamentos antiTB, así como de los compuestos 3 y 4, hasta el día en que el crecimiento fue evidente en los controles y entonces uno de los micropozos control de crecimiento fue revelado con el indicador redox, siguiendo el procedimiento descrito en 3.2.3.5.

### **3.2.8 Evaluación de la toxicidad de los compuestos 3 y 4 mediante el bioensayo de letalidad en larvas de *A. salina* en microplaca:**

Para realizar esta evaluación se siguieron los procedimientos descritos por Solís PN y cols., 1993 y Logarto-Parra A y cols., 2001 con algunas modificaciones.

En una cuba para CCF se agregaron 100 mg de huevecillos de *A. salina* por cada 100 mL de agua de mar preparada con 40 g de sales para agua de mar Instant Ocean y 6 mg/L de levadura seca. Los huevecillos fueron incubados a 25°C por 36 horas. Posteriormente a esta incubación las larvas fueron colectadas con una pipeta Pasteur con ayuda de una lámpara de luz blanca que sirvió para guiar las larvas viables, separándolas de los restos de huevecillos y huevecillos sin eclosionar. Estas larvas se colocaron en placas de Petri que contenía agua de mar suplementada.

Se pesaron 1.70 mg del compuesto 3 y 2.10 mg del compuesto 4 los cuales fueron disueltos en DMSO para obtener una concentración de 8 mg/mL. Como control positivo se usó dicromato de potasio el cual se preparó a la misma concentración. Se trabajó en 2 microplacas de poliestireno de 96 pozos con tapa de baja evaporación y estériles, en las cuales fueron dispensados 200 µL de agua de mar suplementada en los pozos de la periferia para minimizar la evaporación. Las microplacas se manejaron

entonces con 10 hileras y 6 filas cada una. Cien  $\mu\text{L}$  de agua de mar suplementada fueron agregados al resto de los micropozos. En la primera fila de todas las columnas de la microplaca No. 1 se añadieron 95  $\mu\text{L}$  más de agua de mar suplementada. En esta misma fila se añadieron 5  $\mu\text{L}$  de los dos compuestos a evaluar por triplicado así como del control positivo; la fila 10 sirvió como control del disolvente (5  $\mu\text{L}$  DMSO). Se realizaron diluciones a través de las 6 hileras disponibles de la microplaca No. 1 y se continuó diluyendo en la segunda microplaca. El rango de concentración final para los compuestos y el control positivo fue de 100.00 a 0.79  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y para el DMSO de 2.50 a 0.02 % v/v. En los micropozos disponibles de la segunda microplaca se incluyeron controles negativos por triplicado (solo agua de mar). En cada uno de los micropozos se agregan 10 larvas en 100  $\mu\text{L}$  de agua de mar suplementada. Las microplacas tapadas se incubaron 24 horas a 25°C. Posteriormente las microplacas fueron revisadas bajo el Estereoscopio (X12.5) y fue contado el número de larvas muertas en cada uno de los micropozos. Para confirmar el número de larvas expuestas a cada concentración del tóxico se agregaron 100  $\mu\text{L}$  de MeOH los cuales se dejaron actuar por 15 min, para posteriormente realizar el conteo del número de larvas totales por micropozo. El análisis estadístico para determinar la  $\text{CL}_{50}$  fue realizado usando el PROBIT incluido en el programa SPSS 10.0 (All rights reserved. SPSS Inc. Headquarters, 233 S. Wacker Drive, 11th floor Chicago, Illinois 60606).

## CAPÍTULO 4

### RESULTADOS

#### 4.1 Plantas regionales seleccionadas para su evaluación antiTB

Las plantas seleccionadas, colectadas, clasificadas y registradas en el herbario de la Facultad de Ciencias Biológicas están incluidas en la Tabla 4.

Tabla 4. Las especies de plantas del Noreste seleccionadas y colectadas.

Planta (Familia)	Nombre vulgar	Uso Popular/ Referencia	Lugar de colecta	Número de Voucher UAN
<i>Ceanothus coeruleus</i> Lag. (Rhamnaceae)	Conchinchilla	Fiebre, dolor de garganta	ACh	024099
<i>Clematis drummondii</i> T & G. (Ranunculaceae)	Barbas de Chivo	Congestión Nasal	GNL	024164
<i>Colubna greggii</i> Wats. (Rhamanceae)	Guajolote	EI Schly HN y cols., 1999	SNL	024169
<i>Cordia boissieri</i> A. DC. (Borraginaceae)	Anacahuita	TB y Tos	MNL	024167
<i>Chrysactinia mexicana</i> Gray (Compositae)	Hierba de San Nicolás	Infecciones respiratorias y Cantrell CL y cols., 1998	ACh	024102
<i>Cyperus alternifolius</i> L. (Cyperaceae)	Papiro	Inespecífica	SNL	024101
<i>Eupatorium cardiophyium</i> Rab. (Compositae)	No encontrado	Cantrell CL y cols., 1998	SNL	024094

<i>Eupatorium odoratum</i> L. (Compositae)	Crucita	Congestión de pecho, enfermedades pulmonares	SNL	024100
<i>Heliotropium angiospermum</i> Murr (Borraginaceae)	Cola de escorpión	Enfermedades pulmonares, faringitis	GNL	024172
<i>Leucophyllum frutescens</i> (Berl.) I.M. Johnst. (Escrophulariaceae)	Cenizo	TB, bronquitis	MNL	024165
<i>Portiera angustifolia</i> (Zigophylaceae)	Guayacán	TB, Tos, Calorfríos	ANL	024173
<i>Phyla nodiflora</i> (L.) Greene. (Verbenaceae)	Cola de Caballo	Febre, Calorfríos	SNL	024168
<i>Rivinia humilis</i> L. (Phytolacaceae)	Coralillo	Inespecífica	SNL	024170
<i>Salvia chia</i> Fernalc (Labiatae)	No encontrado	Ulubelen A y cols., 1997	SNL	024103
<i>Salvia coccinea</i> Murr (Labiatae)	Mirto	Ulubelen A y cols., 1997	SNL	024096
<i>Salvia reflexa</i> Hornem (Labiatae)	Hierba del pajarito	Ulubelen A y cols., 1997	SNL	024095
<i>Sambucus mexicana</i> Presl. (Capripholiaceae)	Sauco	Congestión de Pecho, Tos, Frio, Fiebre, Dolor de garganta	SNL	024171
<i>Schinus molle</i> L. (Anacardiaceae)	Pirul	TB, bronquitis, calorfríos, fiebre, expectorante asma	ACh	024166
<i>Scutellaria elliptica</i> Muhl (Labiatae)	No encontrado	Tos, expectorante, fiebre y calorfríos y SG Franzblau 1986	ACh	024104
<i>Smilax bona nox</i> L. (Smilacaceae)	Zarzaparrilla	Tos, fiebre, lepra, calorfríos y expectorante	SNL	024098

ACh: Arteaga, Coahuila, MNL: Monterrey Nuevo León, SNL: Santiago Nuevo León,  
GNL: García Nuevo León, ANL: Agualeguas, Nuevo León

## 4.2 Obtención de los extractos de las plantas seleccionadas

### 4.2.1 Extractos orgánicos:

Los porcentajes de recuperación de los extractos orgánicos obtenidos de las plantas seleccionadas se incluyen en la Tabla 5.

Tabla 5. Extractos orgánicos y porcentajes de recuperación obtenidos de las distintas partes de las plantas del Noreste de México.

Planta	Parte de la planta	Solvente de Extracción	% de recuperación
<i>Ceanothus coeruleus</i>	H	M	14.4
	Fl/Fr	M	29.2
	R	M	13.8
<i>Clematis drumondii</i>	H/T	M	9.5
<i>Colubrina greggi</i>	H	M	12.7
	Fl	M	12.0
	R	M	5.6
<i>Cordia boissieri</i>	H	M	10.0
	Fl	M	17.8
	Fr	M	5.0
	R	M	2.9
<i>Chrysactinia mexicana</i>	H	Et E	6.5
		M	7.7
	Fl	Et E	2.3
		M	6.5
	R	Et E	7.7
		M	2.3
<i>Cyperus alternifolius</i>	H	M	10.4
	R	M	9.0
<i>Eupatorium cardiophyllum</i>	H	M	7.3
	Fl	M	5.7
	R	M	5.3
<i>Eupatorium odoratum</i>	H	M	8.5
	Fl	M	16.4
	R	M	3.6
<i>Heliotropium angiospermum</i>	H	M	8.0
	F	M	7.5
<i>Leucophyllum frutescens</i>	H	M	22.8
	Fl	M	39.2
	R	M	7.3

<i>Portiera angustifolia</i>	H	M	14.4
	R	M	12
<i>Phylla nodiflora</i>	H	M	5.5
	R	M	19.8
<i>Rivinia humilis</i>	H	M	6.2
	Fl/Fr	M	10.2
	R	M	18.4
<i>Salvia chia</i>	H	M	6.5
	Fl/Fr	M	7.7
	R	M	2.3
<i>Salvia coccinea</i>	H	M	32.1
	R	M	8.0
<i>Salvia reflexa</i>	H	M	9.8
	Fl	M	13.4
	R	M	3.8
<i>Sambucus mexicana</i>	H	M	11.1
	Fl/Fr	M	24.5
<i>Schinus molle</i>	H	M	15.5
	Fl	M	18.1
	C	M	4.3
	Fr	H	6.7
	R	M	13.2
<i>Scutellaria elliptica</i>	H	M	1.5
	Fl/Fr	M	11.0
	R	M	2.4
<i>Smilax bona nox</i>	H	M	27.1
	R	M	14.8

C: corteza, Fl: flor, Fr: fruto, H: hojas, R: raíz, T: tallo, M: MeOH, H: hexano, EtE: éter etílico

#### 4.2.2 Extractos acuosos:

Los porcentajes de recuperación de los extractos acuosos obtenidos de las plantas seleccionadas se incluyen en la Tabla 6.

Tabla 6. Extractos acuosos y porcentajes de recuperación obtenidos de las distintas partes de las plantas del Noreste.

Planta	Parte de la planta	% de recuperación
<i>Cordia bassien</i>	Fl	8.8
	Fr	2.4
<i>Leucophyllum frutescens</i>	H	6.3
<i>Phyla nodiflora</i>	H	8.9
<i>Salvia coccinea</i>	H	5.4
<i>Salvia reflexa</i>	H	9.0
<i>Schinus molle</i>	C	2.8
	H	3.5
<i>Smilax Bona- Nox L</i>	H	4.9



### 4.3 Tamizaje de la actividad antiTB de extractos obtenidos de plantas del Norte de México

#### 4.3.1 Interferencia del color propio del extracto sobre la apreciación del viraje del Alamar Azul:

La Figura 2 incluye las fotografías de los tubos de ensayo que contienen las soluciones de Alamar Azul (en estado oxidado y reducido) y las mezclas de Alamar Azul y extracto crudo de *Schinus molle*.

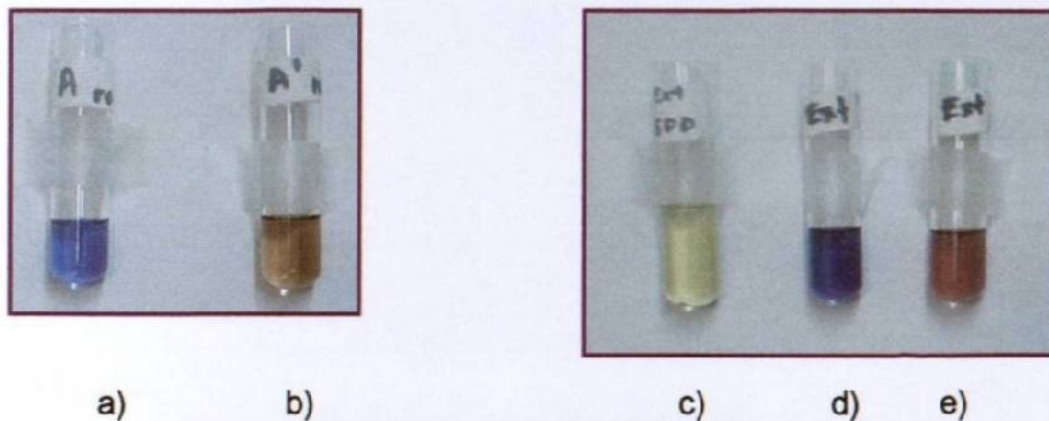


Figura 2. Fotografías de los tubos de ensayo que contienen las soluciones de Alamar Azul y las mezclas de Alamar Azul y extracto crudo de *S. molle*.

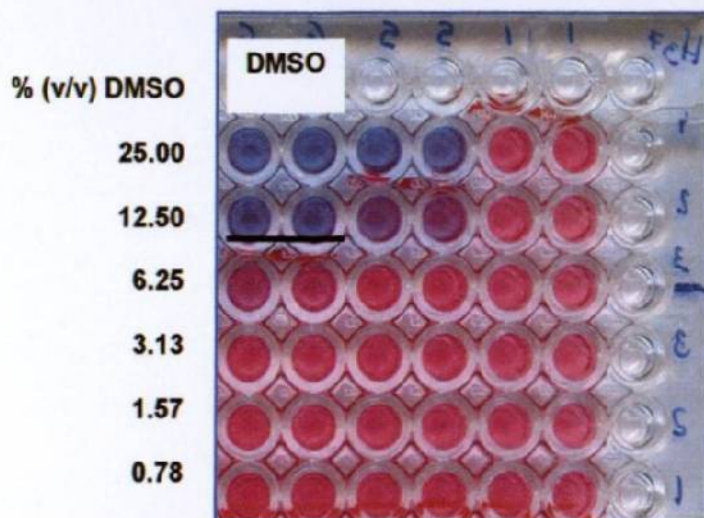
- a) Alamar azul oxidado: color azul
- b) Alamar azul reducido: color rosa
- c) 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de extracto MeOH de *S. molle*
- d) 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de extracto MeOH de *S. molle* + Alamar azul oxidado
- e) 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de extracto MeOH de *S. molle* + Alamar azul reducido

Los resultados mostraron que no existía interferencia por el color propio del extracto sobre los colores del indicador redox, tanto en su estado oxidado o azul como reducido o rosa.

### 4.3.2 Efecto inhibitorio del DMSO sobre ambas cepas micobacterianas:

Los resultados obtenidos muestran que el DMSO posee efecto inhibitorio en ambas cepas. La inhibición del crecimiento micobacteriano se observó hasta el micropozo número 2 que corresponde a la concentración de 12.5% v/v de DMSO (Figura 3).

a) *M. tuberculosis* H37Rv



b) *M. tuberculosis* CIBIN/UMF15:99

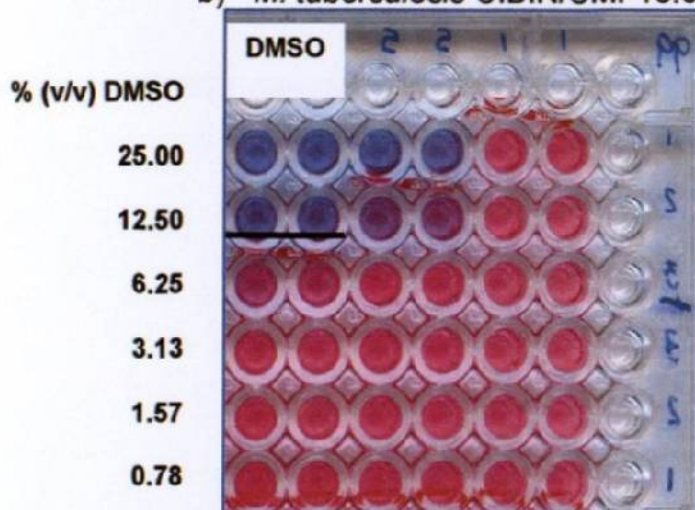
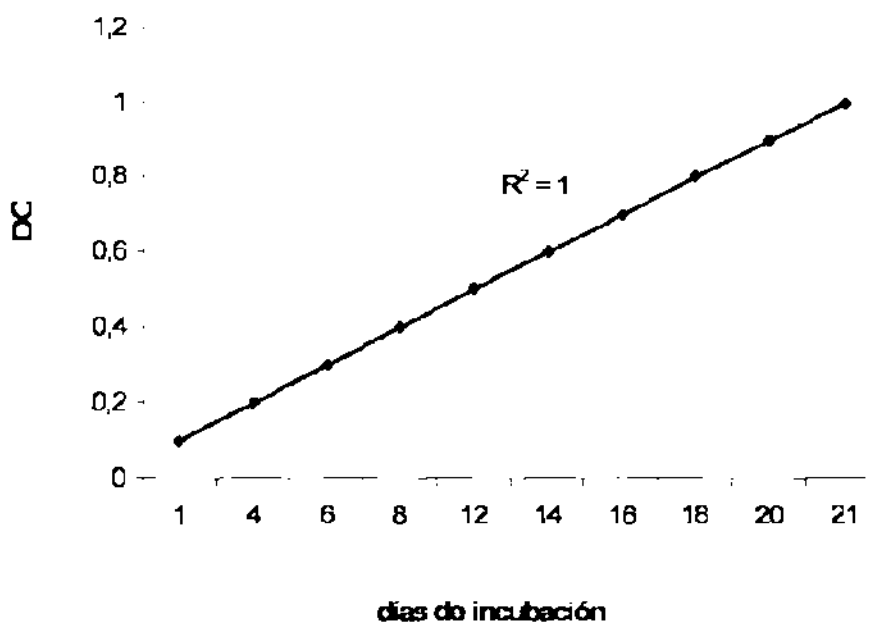


Figura 3. Determinación del efecto inhibitorio del DMSO sobre la actividad metabólica de las cepas (a) H37Rv y (b) CIBIN/UMF15:99 de *M. tuberculosis*.

### **4.3.3 Preparación de los inóculos micobacterianos:**

La obtención de cultivos secundarios de ambas micobacterias a partir de cultivos primarios jóvenes (en medio Lowenstein-Jensen), demostró que son alrededor de 18 a 21 días los requeridos para alcanzar la turbidez comparable al estándar 1 de McFarland necesario para realizar el bioensayo (Figura 4).

a) *M. tuberculosis* H37Rv



b) *M. tuberculosis* CIBIN/UMF15:99

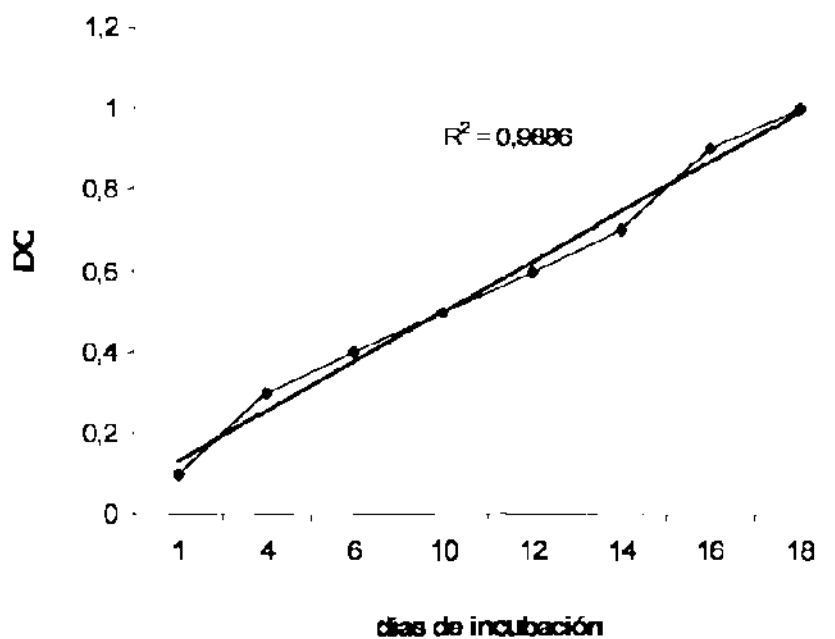


Figura 4. Curvas de crecimiento de las cepas de *M. tuberculosis* (a) H37 Rv y (b) CIBIN/UMF15:99. DO: densidad óptica a 600 nm.

#### 4.3.4 Evaluación de la actividad antiTB de los extractos crudos:

Los resultados de la actividad antiTB de los extractos orgánicos obtenidos de las plantas seleccionadas se incluyen en la Tabla 7.

Tabla 7. MICs ( $\mu\text{g/mL}$ ) de los extractos orgánicos obtenidos de plantas del Noreste de México sobre cepas de *M. tuberculosis* sensibles y MDR.

Planta	Parte de la planta	Extracto orgánico	MICs ( $\mu\text{g/mL}$ )	
			<i>M tb</i> S	<i>M tb</i> MDR
<i>Ceanothus coeruleus</i>	H	M	>500	>500
	Fl/Fr	M	500	500
	R	M	>500	>500
<i>Clematis drumondii</i>	H/T	M	>500	>500
<i>Colubrina greggi</i>	H	M	>500	>500
	Fl	M	>500	>500
	R	M	>500	>500
<i>Cordia boissieri</i>	H	M	500	500
	Fl	M	500	500
	Fr	M	>500	>500
	R	M	>500	>500
<i>Chrysactinia mexicana</i>	H	Et E	500	500
		M	>500	>500
	Fl	Et E	>500	>500
		M	>500	>500
	R	Et E	62.50	62.50
		M	500	500
<i>Cyperus alternifolius</i>	H	M	500	500
	R	M	>500	>500
<i>Eupatorium cardiophyllum</i>	H	M	>500	>500
	Fl	M	>500	>500
	R	M	>500	>500
<i>Eupatorium odoratum</i>	H	M	500	500
	Fl	M	>500	>500
	R	M	>500	>500
<i>Heliotropium angiospermum</i>	H	M	>500	500
	F	M	>500	500
<i>Leucophyllum frutescens</i>	H	M	250	125
	Fl	M	>500	>500
	R	M	62.50	62.50
<i>Portieria angustifolia</i>	H	M	> 500	500
	R	M	> 500	500

<i>Phylla nodiflora</i>	H	M	>500	>500
	R	M	>500	>500
<i>Rivinia humilis</i>	H	M	>500	>500
	Fl/Fr	M	>500	>500
	R	M	>500	>500
<i>Salvia chia</i>	H	M	500	>500
	Fl/Fr	M	500	>500
	R	M	>500	>500
<i>Salvia coccinea</i>	H	M	>500	>500
	R	M	>500	>500
<i>Salvia reflexa</i>	H	M	500	500
	Fl	M	>500	>500
	R	M	>500	>500
<i>Sambucus mexicana</i>	H	M	>500	500
	Fl/Fr	M	500	500
<i>Schinus molle</i>	H	M	>500	>500
	Fl	M	500	500
	C	M	500	500
	Fr	H	125	250
	R	M	>500	>500
<i>Scutellaria elliptica</i>	H	M	>500	>500
	Fl/Fr	M	500	500
	R	M	>500	>500
<i>Smilax bona nox</i>	H	M	>500	>500
	R	M	>500	>500

H: Hojas, Fl: Flores, Fr: Fruto, T: Tallos, R: Raíz. M: MeOH; Et E: Eter etílico; H: Hexano. *M tb S*: cepa sensible a SIREP de *M. tuberculosis* H37Rv ATCC 27294, *M tb MDR*: cepa MDR (a SIREP) de *M. tuberculosis* CIBIN/UMF15:99

Los resultados de la actividad antiTB de los extractos acuosos obtenidos de las plantas seleccionadas se incluyen en la Tabla 8.

Tabla 8. MICs ( $\mu\text{g/mL}$ ) de los extractos acuosos obtenidos de plantas del Noreste de México sobre cepas de *M. tuberculosis* sensibles y MDR.

Planta	Parte de la planta	MIC ( $\mu\text{g/mL}$ )	
		<i>M tb S</i>	<i>M tb MDR</i>
<i>Cordia bossieri</i>	Fl	>500	>500
	Fr	>500	>500
<i>Leucophyllum frutescens</i>	H	>500	>500
<i>Phyla nodiflora</i>	H	>500	>500
<i>Salvia coccinea</i>	H	>500	>500
<i>Salvia reflexa</i>	H	>500	>500
<i>Schinus molle</i>	C	>500	>500
	H	>500	>500
<i>Smilax Bona- Nox L</i>	H	>500	>500

Del total de 65 extractos evaluados los activos fueron solo 4 y se incluyen en la Tabla 9.

Tabla 9. Extractos activos.

Planta	Parte de la planta	MIC ( $\mu\text{g/mL}$ )	
		<i>M tb S</i>	<i>M tb MDR</i>
<i>Chrysactinia mexicana</i>	R	62.50	62.50
<i>Leucophyllum frutescens</i>	L	250	125
	R	62.50	62.50
<i>Schinus molle</i>	Fr	125	250

El resto de los extractos orgánicos de las plantas evaluadas mostraron una MIC  $\geq 500 \mu\text{g/mL}$  para ambas cepas de micobacterias.

Las MICs para los extractos acuosos evaluados fueron > 500µg/mL para ambas cepas.

#### 4.4 Fraccionamiento Biodirigido

##### 4.4.1 ELL del extracto metanólico de raíz de *L. frutescens*:

Por medio de la ELL con polaridad diferencial de los extractos metanólicos de hojas y raíz de *L. frutescens* se obtuvieron 6 fracciones. Las MICs para las cepas micobacterianas y los rendimientos en g obtenidos de estas fracciones están en la Tabla 10.

Tabla 10. MICs (µg/mL) de las fracciones obtenidas por ELL del extracto metanólico de corteza de raíz y hojas de *L. frutescens* para las cepas de *M. tuberculosis* sensibles y MDR.

Parte de la planta	Extracto/ Fracción	MIC (µg/mL)		Rendimiento (g)
		<i>M tb S</i>	<i>M tb MDR</i>	
Hoja	Metanólico crudo	250	125	45.60
	Hexánica	500	250	3.70
	AcOEt	500	125	9.51
	Butanólico	>500	500	27.74
Corteza de Raíz	Metanólico crudo	62.50	62.50	15.80
	Hexánica	31.25	31.25	5.70
	AcOEt	250	125	7.30
	Butanólica	>500	500	1.80



Los resultados de la identificación de los grupos funcionales presentes en las fracciones antiTB están incluidas en la Tabla 11.

Tabla 11. Identificación de grupos funcionales en fracciones antiTB de *L. frutescens*.

Grupos Funcionales	Hoja		Corteza de Raíz	
	Fracción Hexánica	Fracción AcOEt	Fracción Hexánica	Fracción AcOEt
<b>Insaturaciones</b>				
Br <sub>2</sub> /CCl <sub>4</sub>	+	+	+	+
KMnO <sub>4</sub>	+	+	+	+
<b>Grupo Carbonilo</b>				
2-4, DNFH	+	-	+	+
<b>Oxhidrilos fenólicos</b>				
FeCl <sub>3</sub>	-	-	+	+
<b>Esteroides y Triterpenos</b>				
Prueba de Liebermann-Buchard	+	+	+	+
Prueba de Salkowski	+	+	+	+
<b>Carbohidratos</b>				
Prueba de Molish	+	+	+	+
<b>Grupo Furano</b>				
Prueba de Erlich	-	-	-	-
<b>Coumarinas</b>				
	-	-	-	-
<b>Sesquiterpenlactonas</b>				
Prueba de Baljet	+	+	+	+
<b>Quinonas</b>				
Prueba de Bornträger	-	-	-	-
<b>Flavonoides</b>				
Prueba del H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	+; flavonas	+; flavonas	+; flavonas	+; flavonas
Prueba de Shinoda	-	-	-	-
<b>Alcaloides</b>				
Prueba de Dragendorff modificada por Munier y Machaelobuf	+	-	+	+

**4.4.2 VLC de la fracción hexánica del extracto metanólico de raíz de *L. frutescens*:**

**4.4.2.1 Actividad antiTB:**

Luego de la VLC del extracto metanólico de raíz de *L. frutescens* se obtuvieron 9 fracciones cromatográficas; las MICs de estas fracciones para las cepas micobacterianas y los rendimientos en g obtenidos están en la Tabla 12.

Tabla 12. MICs ( $\mu\text{g/mL}$ ) y rendimientos de las fracciones obtenidas por VLC de la fracción hexánica de *L. frutescens* para las cepas de *M. tuberculosis* sensibles y MDR.

Fracción	MIC( $\mu\text{g/mL}$ )		Rendimiento (g)
	<i>M tb S</i>	<i>M tb MDR</i>	
fracción hexánica	31.25	31.25	
VLC 20:1 (hexano:AcOEt)	15.63	15.63	2.40
VLC 15:1	62.50	62.50	0.40
VLC 10:1	62.50	125.00	0.20
VLC 5:1	125.00	125.00	0.20
VLC 3:1	62.50	125.00	0.07
VLC 2:1	62.50	250.00	0.50
VLC 1:1	250.00	250.00	0.10
AcOEt	125.00	250.00	0.10
MeOH	250.00	250.00	0.40

**4.4.2.2 Perfiles cromatográficos de la fracción VLC 20:1:**

Por CCF los mejores resultados de resolución se obtuvieron usando como Fase Móvil DCM con 3% de acetona, se evidenció la presencia de al menos 4 compuestos al observarse bajo luz fluorescente y tras revelado con vapores de yodo.

A continuación se observa el cromatograma de la fracción más activa, VLC 20:1 obtenido por HPLC (Figura 5).

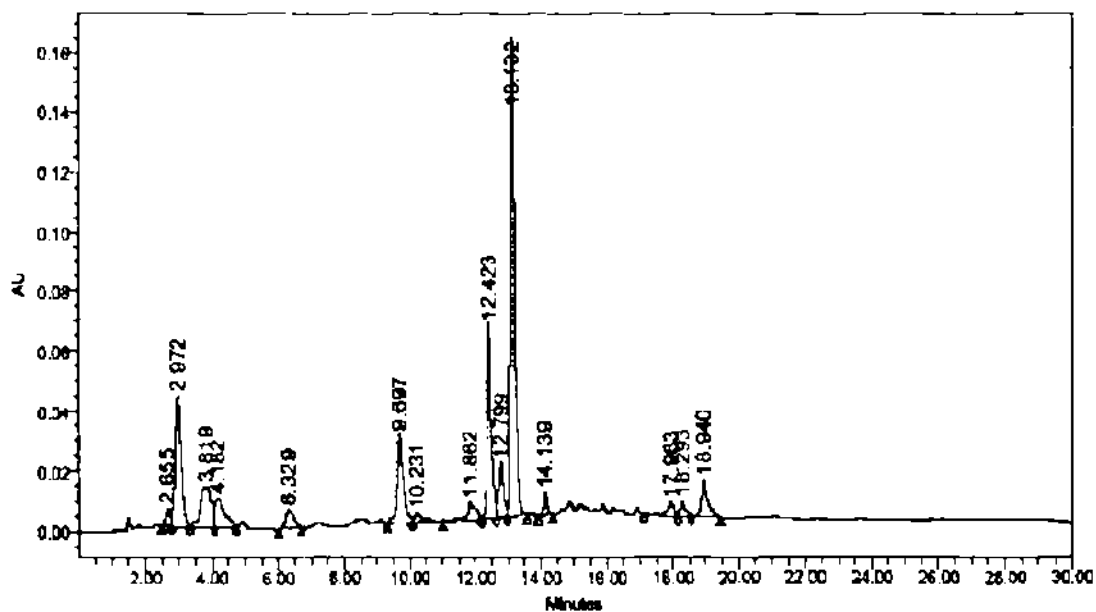
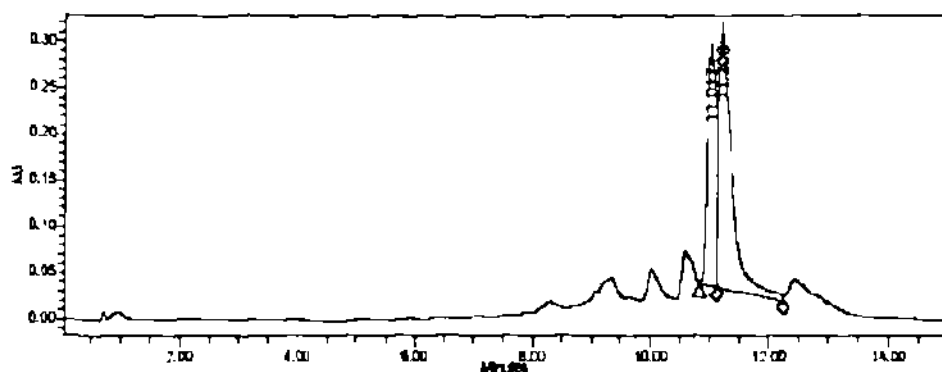


Figura 5. Cromatograma de la fracción VLC 20:1 obtenido con columna Cromolith Performance Merck RP 5  $\mu\text{m}$ , 18E 100-4.6 mm como Fase Estacionaria y MeOH:agua 70:30 como Fase Móvil, con las condiciones descritas en 3.2.4.4.

Los cromatogramas de las fracciones VLC 20:1, VLC 15:1 y VLC 10:1 obtenidos en el HPLC-DAD-EM mediante las condiciones descritas en 3.2.4.4 se incluyen en la Figuras 6, 7 y 8.

a) Detector: DAD  $\lambda = 258.2$  nm



b) TIC, Detector EM

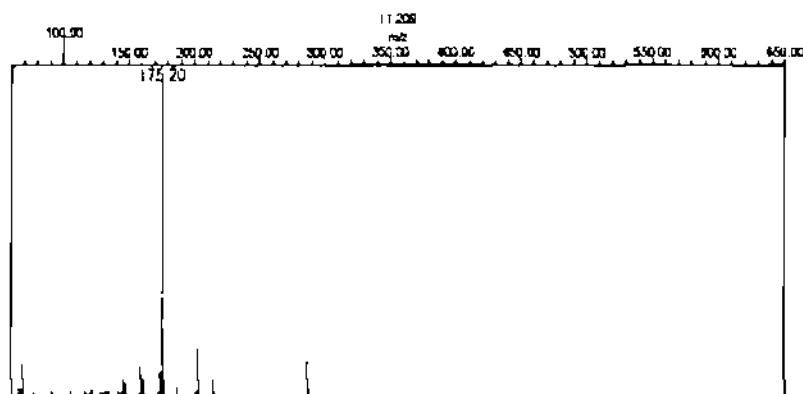
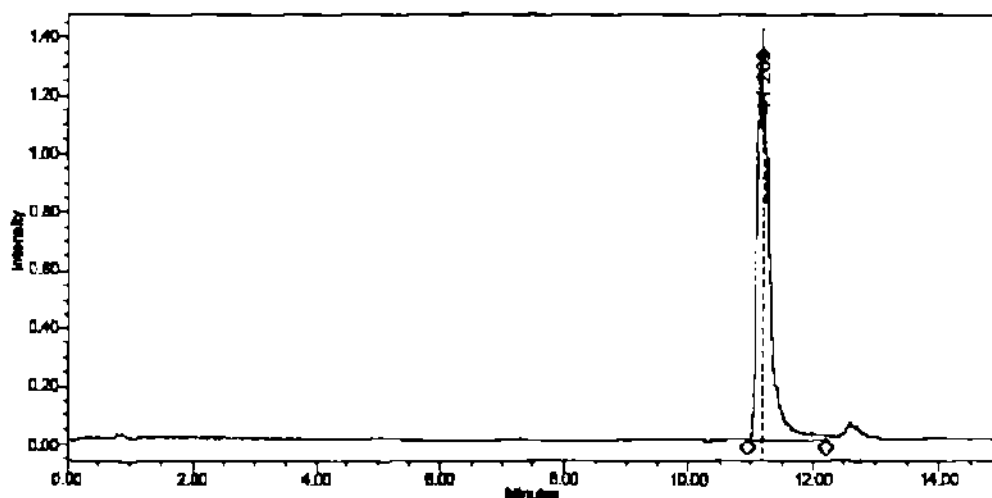
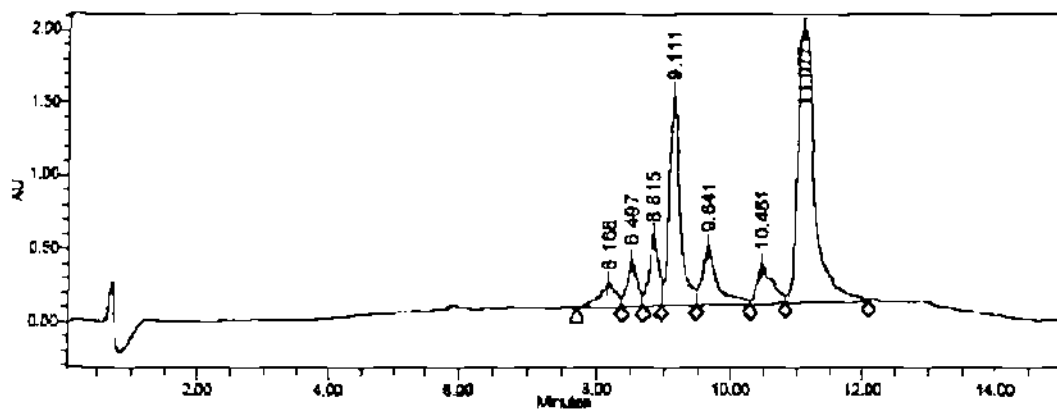


Figura 6. Cromatograma de la fracción VLC 20:1 obtenido con Columna Polarity dC18 3  $\mu\text{m}$  2.1 X 50 cm como Fase Estacionaria y ácido fórmico 0.1% en agua y ácido fórmico 0.1% en ACN como Fase Móvil, con las condiciones descritas en 3.2.4.4 y detector a) DAD y b) EM.

a) DAD,  $\lambda = 209.5$  nm



b) TIC, Detector EM

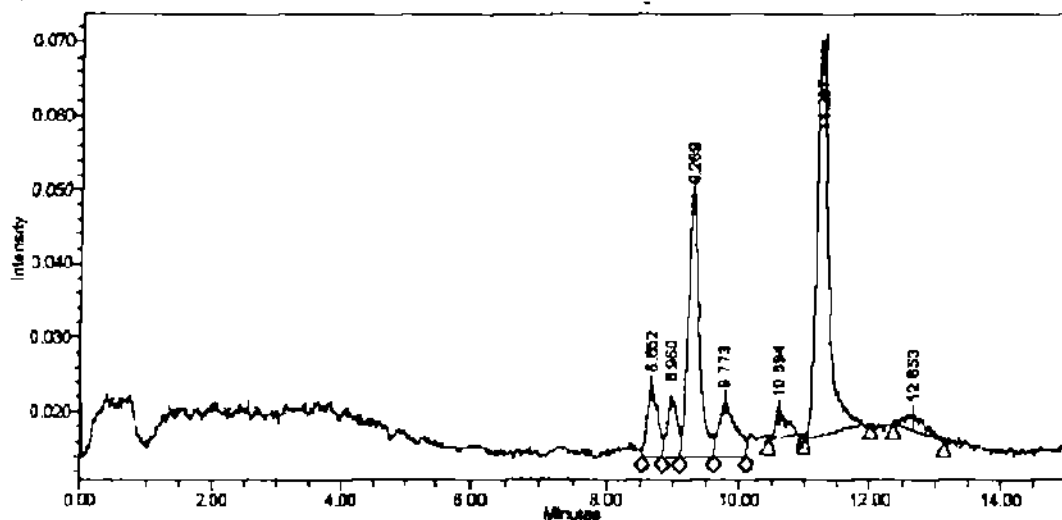
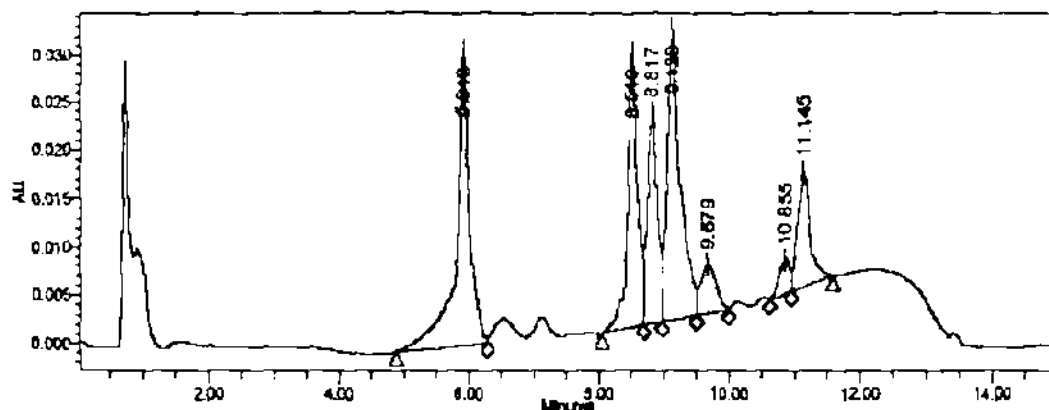


Figura 7. Cromatograma de la Fracción VLC 15:1 obtenido con Columna Polarity dC18 3  $\mu$ m 2.1 X 50 cm como Fase Estacionaria y ácido fórmico 0.1% en agua y ácido fórmico 0.1% en ACN como Fase Móvil, con las condiciones descritas en 3.2.4.4 y detector a) DAD y b) EM.

a) DAD  $\lambda = 282.3 \text{ nm}$



b) TIC, Detector EM

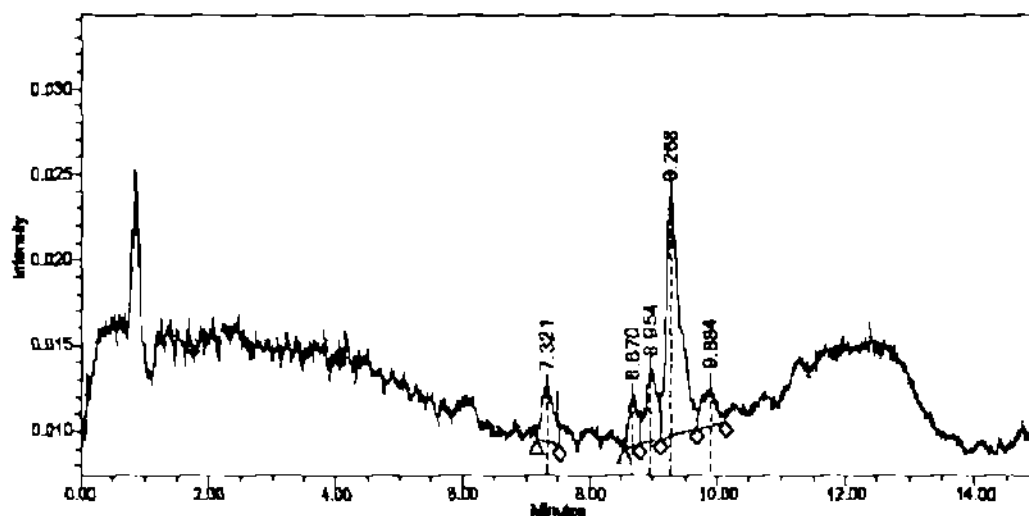


Figura 8. Cromatograma de la Fracción VLC 10:1 obtenido con Columna Polarity dC18  $3 \mu\text{m}$   $2.1 \times 50 \text{ cm}$  como Fase Estacionaria y ácido fórmico 0.1% en agua y ácido fórmico 0.1% en ACN como Fase Móvil, con las condiciones descritas en 3.2.4.4 y detector a) DAD y b) EM.

**4.4.3 Cromatografía en Columna a Baja Presión-FR de la fracción VLC 20:1 de la fracción hexánica del extracto metanólico de raíz de *L. frutescens*:**

**4.4.3.1 Actividad antiTB:**

Se obtuvieron 6 fracciones cromatográficas cuyas MICs para las cepas micobacterianas y rendimientos están en la Tabla 13.

Tabla 13. MICs ( $\mu\text{g/mL}$ ) y rendimientos de las fracciones obtenidas por Cromatografía en Columna a Baja Presión-FR de la Fracción VLC 20:1 de *L. frutescens* para las cepas de *M. tuberculosis* sensibles y MDR.

Fracción	MIC ( $\mu\text{g/mL}$ )		Rendimiento (mg)
	<i>M tb S</i>	<i>M tb MDR</i>	
VLC 20:1	12.50	12.50	
Fracción 1, 70:30 (MeOH:agua)	50.00	50.00	3.50
F 2, 80:20	50.00	50.00	2.16
F 3, 90:10	25.00	12.50	102.10
F 4, 100 MeOH	12.50	12.50	418.90
F 5, 50:50 (MeOH:acetona)	>100.00	>100.00	266.90
F 6, 100 acetona	>100.00	>100.00	48.90

**4.4.3.2 Perfiles cromatográficos de las fracciones 3 y 4:**

La CCF usando como sistema de elución DCM con 3% de acetona indicó la presencia de un solo compuesto en cada fracción y con idéntico  $R_f$  de 0.73.

Los cromatogramas obtenidos por HPLC de las fracciones 3 y 4 se observan en las Figuras 9 y 10 y fueron obtenidos con las condiciones descritas en 3.2.4.4.

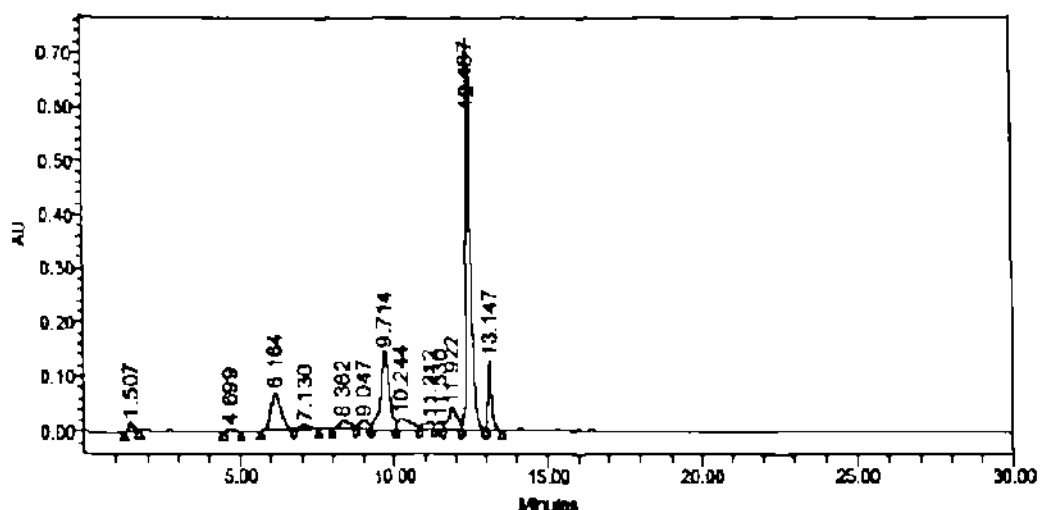


Figura 9. Cromatograma de la **F3, 90:10** obtenido usando como Fase Estacionaria: Columna Cromolith Performance Merck RP 5  $\mu\text{m}$ , 18E 100-4.6 mm y como Fase Móvil: MeOH:agua 70:30, con las condiciones descritas en 3.2.4.4.

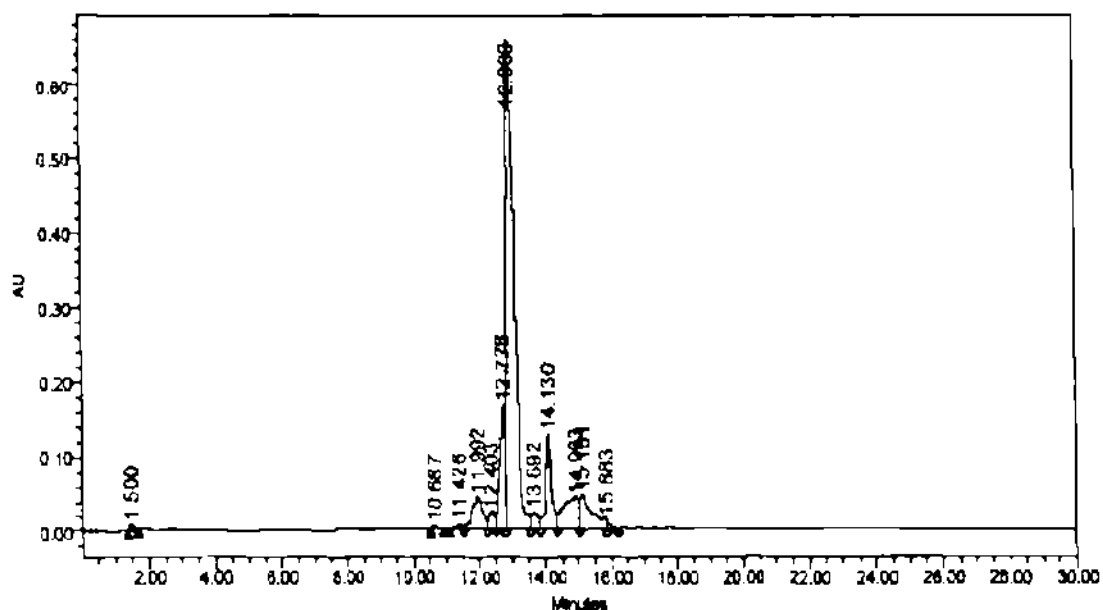


Figura 10. Cromatograma de la **F4, 100 MeOH** obtenido usando como Fase Estacionaria: Columna Cromolith Performance Merck RP 5  $\mu\text{m}$ , 18E 100-4.6 mm y como Fase Móvil: MeOH:agua 70:30, con las condiciones descritas en 3.2.4.4.



## **4.5 Purificación y determinación de la estructura de los compuestos antiTB**

### **4.5.1 Purificación de los compuestos antiTB:**

#### **4.5.1.1 A partir de F3, 90:10:**

Mediante la segunda Cromatografía en Columna a Baja Presión-FR se logró purificar en el sistema 90:10, el compuesto mayoritario presente en **F3, 90:10**. Se colectaron 120 fracciones. Los cromatogramas de los tubos 62, 65, 70 y 73 mostraron la presencia de un solo pico en los tubos dentro de este rango (Figuras 11 y 12). A este compuesto se le llamó como **compuesto 3** por originarse de la **F3, 90:10**.

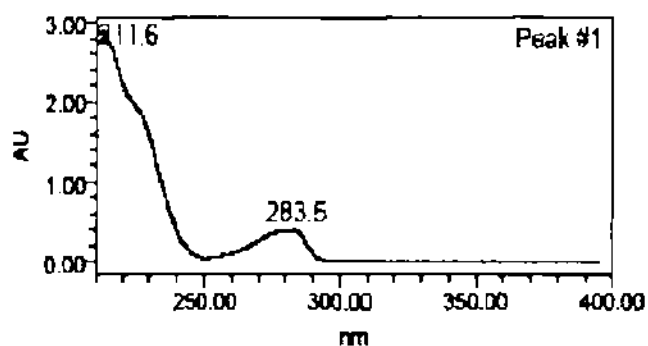
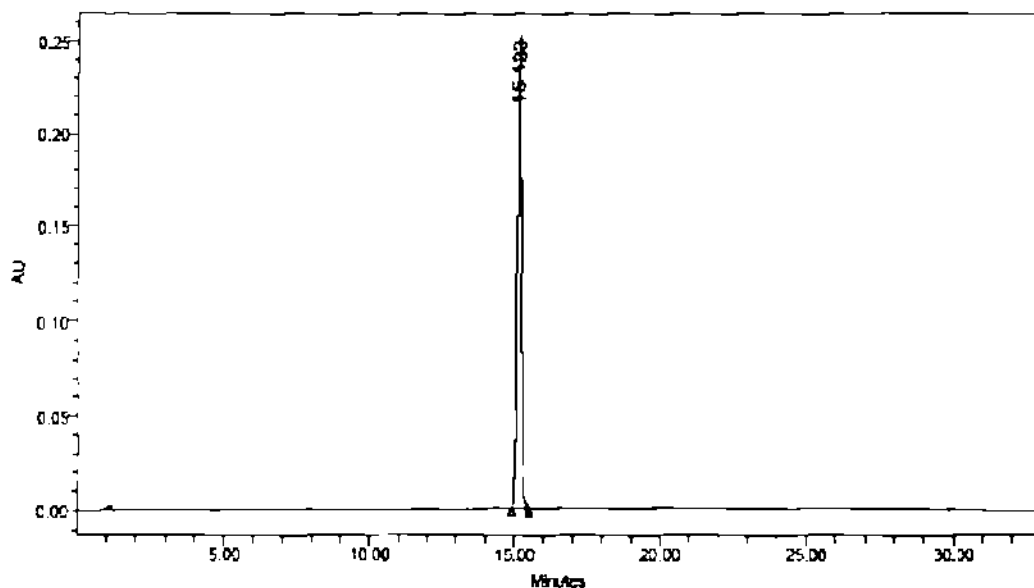


Figura 11. Cromatograma y Espectro UV-Vis del **compuesto 3** (contenido en el tubo 70) obtenidos usando como Fase Estacionaria una columna Symmetry C18 5 $\mu$ m, 3.9 X 150 mm No. Serie WAT 046980 y como Fase Móvil: MeOH:agua 70:30, con las condiciones descritas en 3.2.5.1.

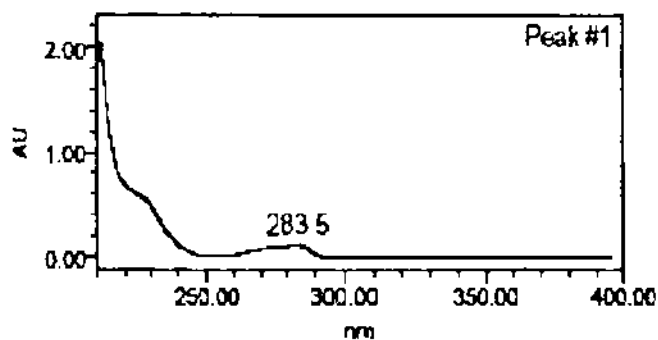
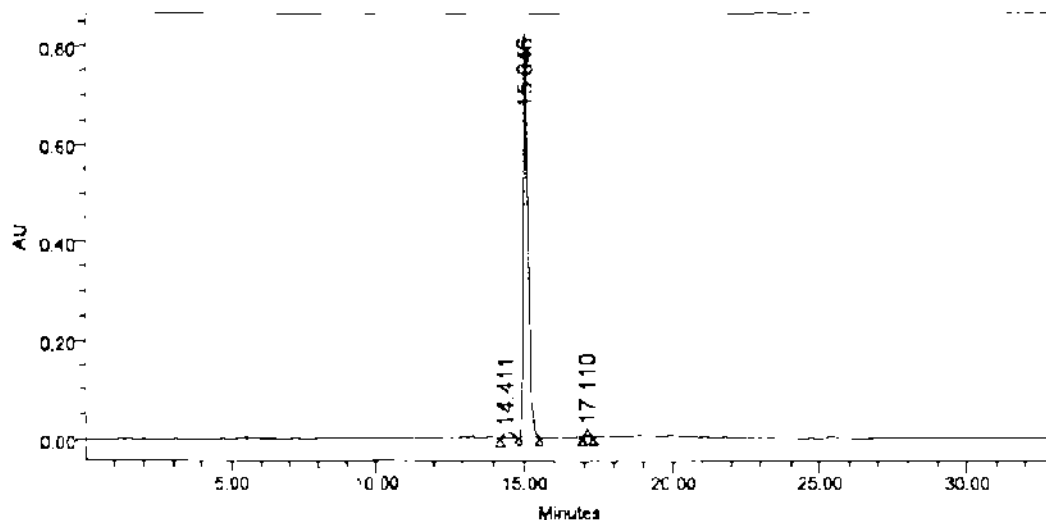


Figura 12. Cromatograma y Espectro UV-Vis del **compuesto 3** (contenido en el tubo 73) obtenidos usando como Fase Estacionaria una columna Symmetry C18 5 $\mu$ m, 3.9 X 150 mm No. Serie WAT 046980 y como Fase Móvil: MeOH:agua 70:30, con las condiciones descritas en 3.2.5.1.

#### 4.5.1.2 A partir de F4, 100 MeOH:

El desarrollo de la Cromatografía en Columna a Baja Presión-FR condujo a la purificación del compuesto mayoritario presente en **F4, 100 MeOH**. Los resultados mostraron que el compuesto puro se concentra únicamente en la fracción eluida con 100 % de MeOH (Figura 13). A este compuesto se le llamó como **compuesto 4**.

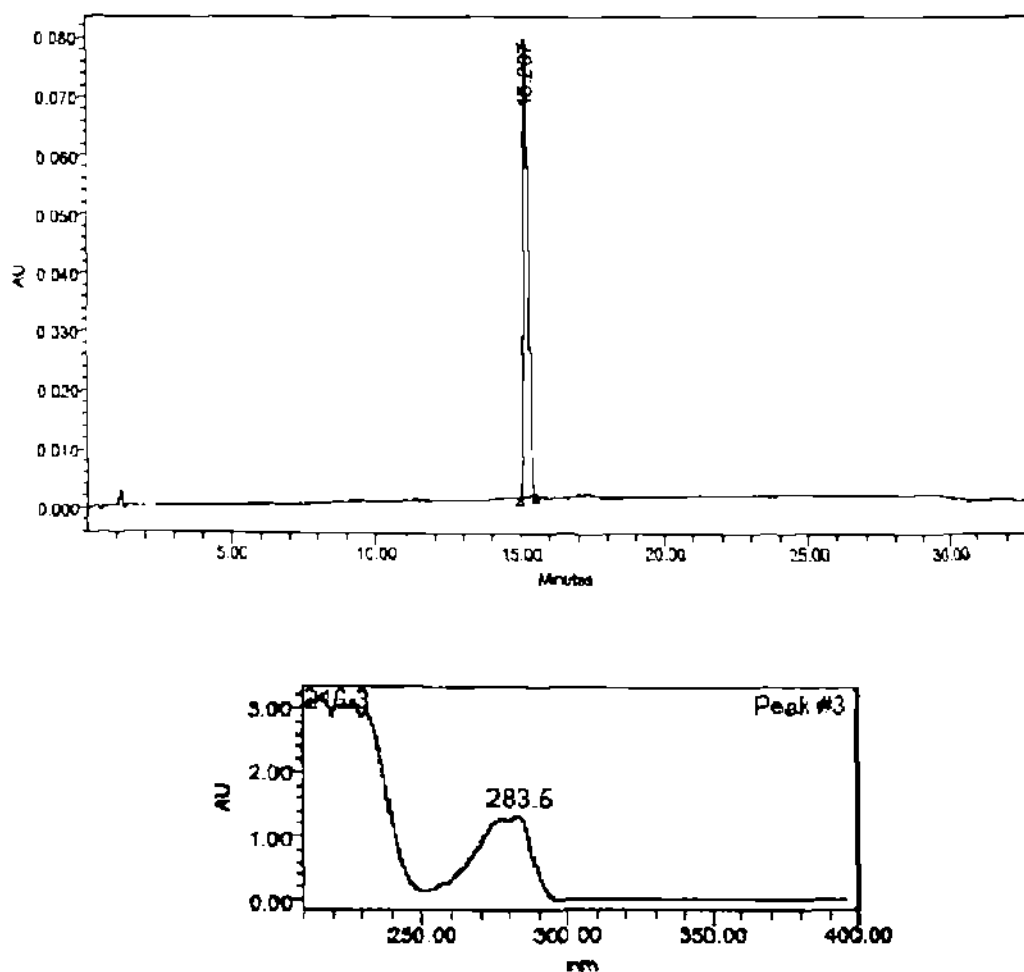


Figura 13. Cromatograma y Espectro UV-Vis del **compuesto 4** usando como Fase Estacionaria una columna Symmetry C18 5 $\mu$ m, 3.9 X 150 mm No. Serie WAT 046980 y como Fase Móvil: MeOH:agua 70:30, con las condiciones descritas en 3.2.5.1.

#### **4.5.1.3 Pureza Cromatográfica:**

El resultado de la co-cromatografía de la mezcla de los **compuestos 3 y 4** en CCF (DCM al 3% de acetona) observada bajo la luz UV y vapores de yodo indicó la presencia de solo una mancha al mismo con un valor de  $R_f$  de 0.73.

El cromatograma y los espectros obtenidos de la co-cromatografía de los **compuestos 3 y 4** se incluyen en la Figura 14.

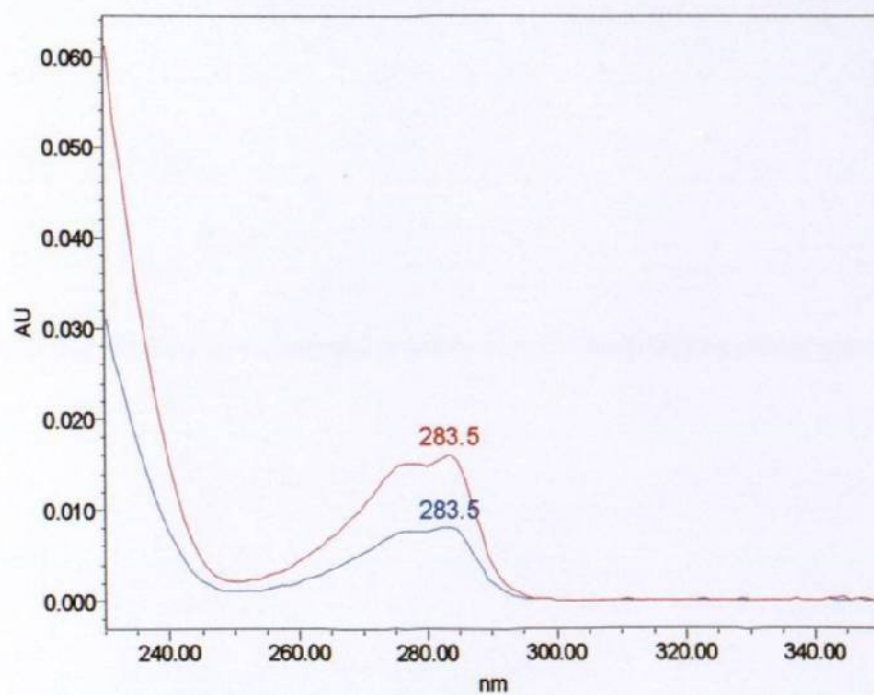
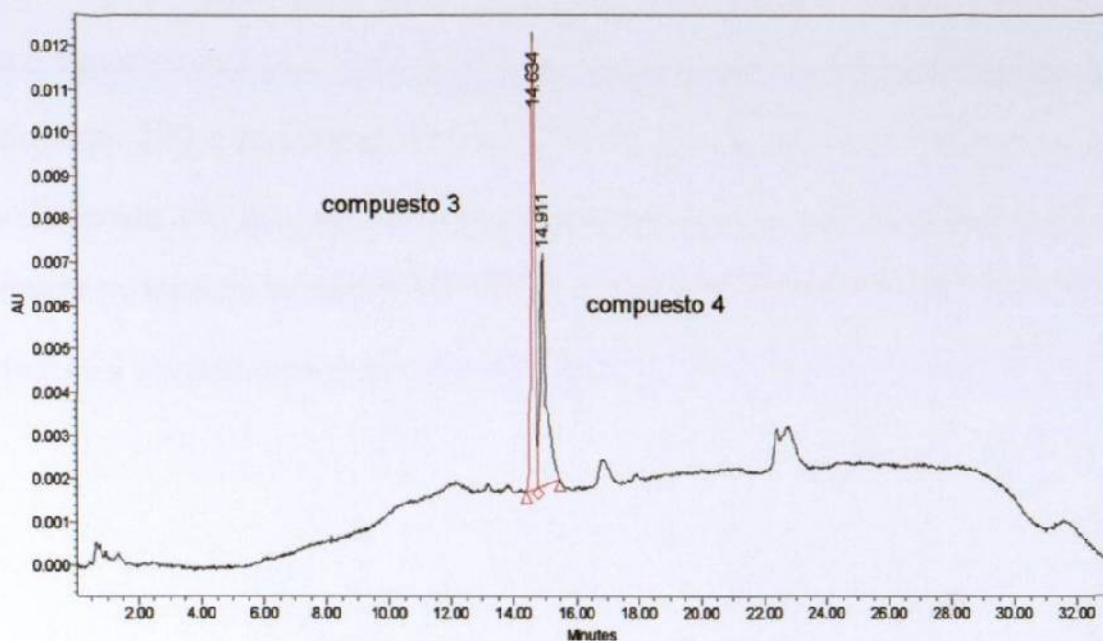


Figura 14. Cromatograma y Espectros UV-Vis de la mezcla de los **compuestos 3 y 4**. (Se utilizó el mismo sistema cromatográfico que en 3.2.5.1).

#### 4.5.1.3 Rendimiento (%p/p):

De 6 especímenes de *L. frutescens* de aproximadamente 1.5 m de altura se obtuvieron 200 g de corteza de raíz molida. En la Tabla 14 se incluyen los rendimientos (% p/p) en cada paso del Fraccionamiento Biodirigido del extracto metanólico de corteza de raíz de *L. frutescens* para cada uno de sus fracciones y compuestos con actividad antiTB.

Tabla 14. Rendimiento (% p/p).

Corteza de raíz de <i>L. frutescens</i>	% p/p
extracto metanólico crudo	7.900
fracción ELL hexánica	3.002
fracción VLC 20:1	1.368
<b>F3</b> , 90:10, Cromatografía en Columna a Baja Presión	0.151
<b>F4</b> , 100 MeOH, Cromatografía en Columna a Baja Presión	0.618
<b>compuesto 3</b>	0.019
<b>compuesto 4</b>	0.181

#### 4.5.2 Determinación de la Estructura de los compuestos antiTB:

##### 4.5.2.1 Espectroscopía UV-Vis:

Las Figuras 15 y 16 muestran los espectros UV-Vis de los compuestos **3** y **4** disueltos en MeOH.

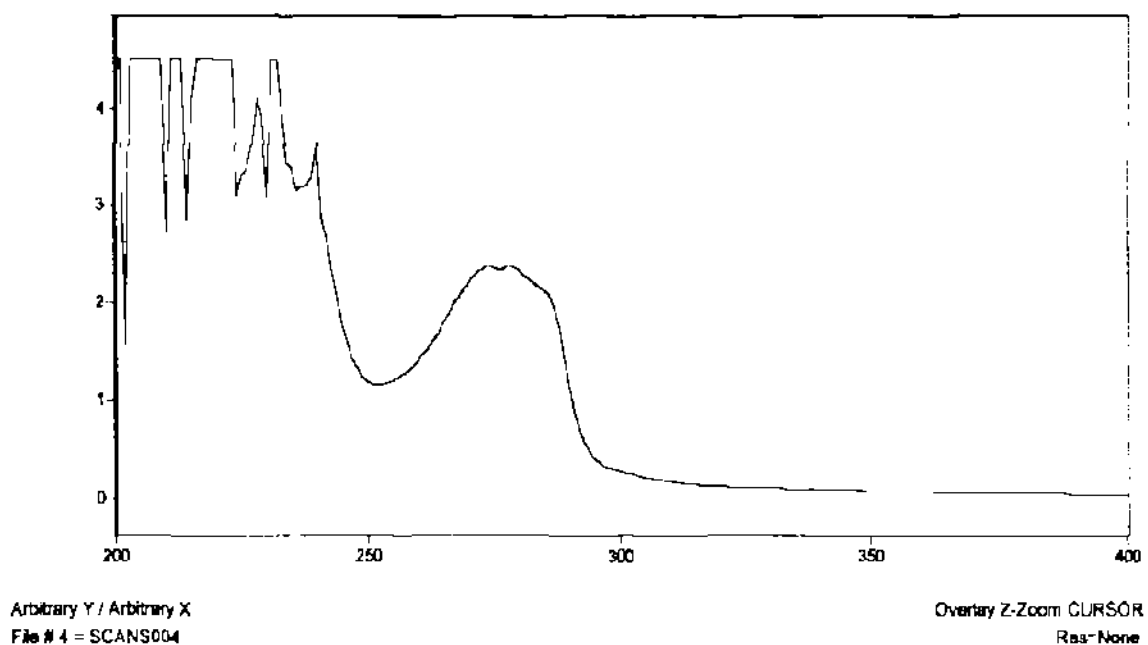


Figura 15. Espectro UV-Vis del compuesto **3** aislado de raíz de *L. frutescens*.



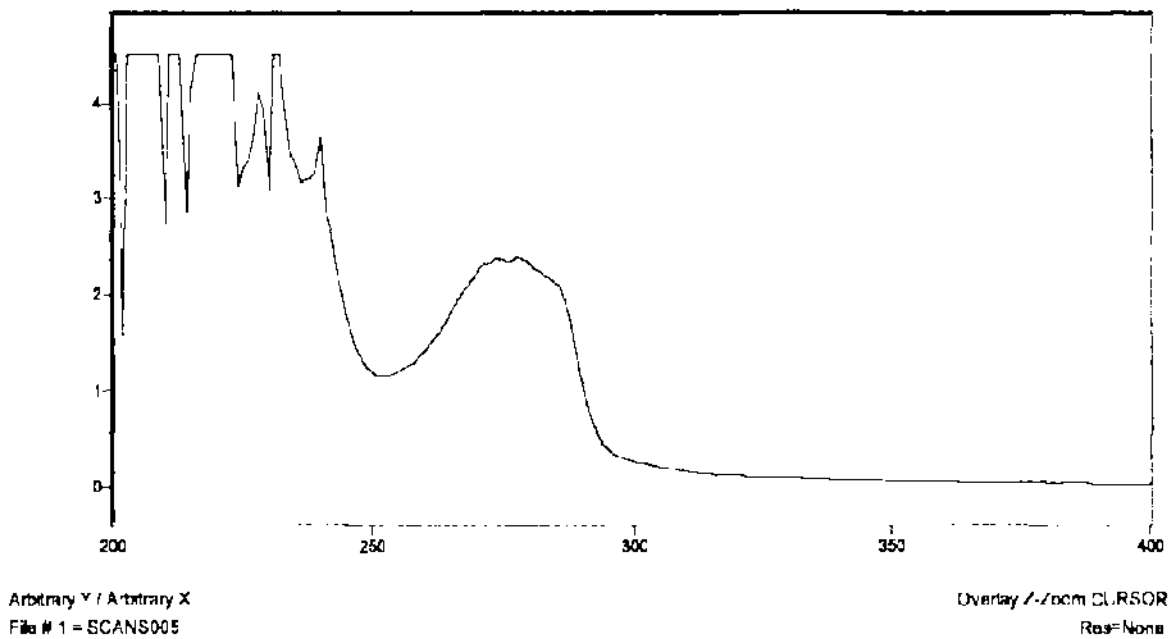


Figura 16. Espectro UV-Vis del **compuesto 4** aislado de raíz de *L. frutescens*.

#### 4.5.2.2 Espectroscopía IR:

La Figura 17 muestra el espectro IR del **compuesto 4**.

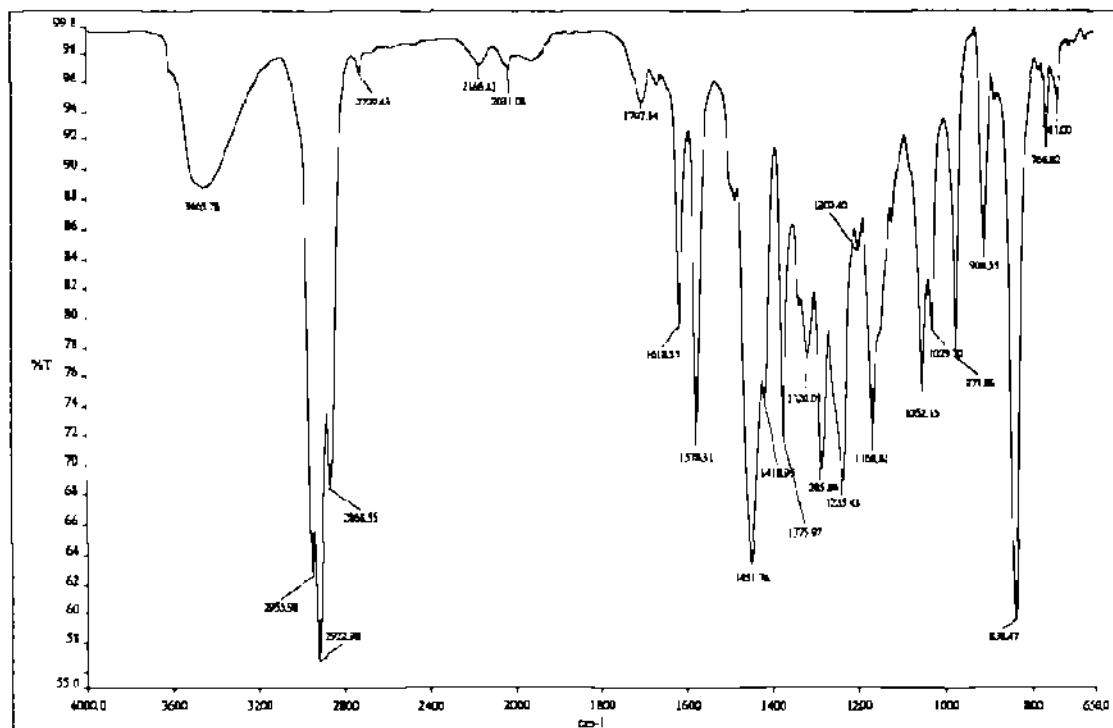


Figura 17. Espectro IR del **compuesto 4** aislado de raíz de *L. frutescens*.

#### 4.5.2.3 Espectrometría de Masas:

Las Figuras 18 y 19 corresponden a los espectros de Masas obtenidos de los **compuestos 3 y 4**. El peso molecular resultante para ambos compuestos fue de 286 g/mol y la fórmula molecular  $C_{20}H_{30}O$ .

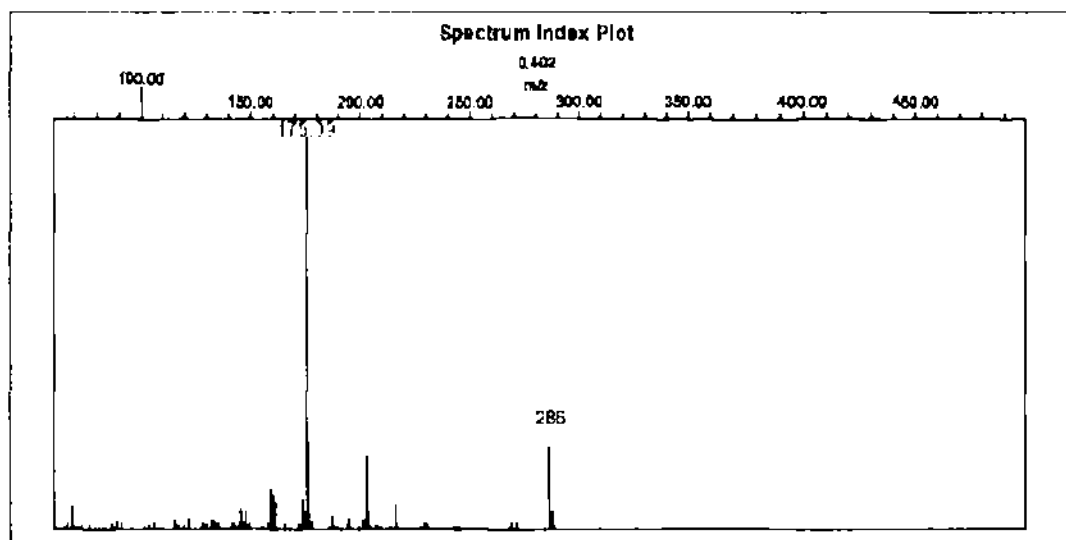


Figura 18. Espectro de Masas del **compuesto 3** aislado de raíz de *L. frutescens*.

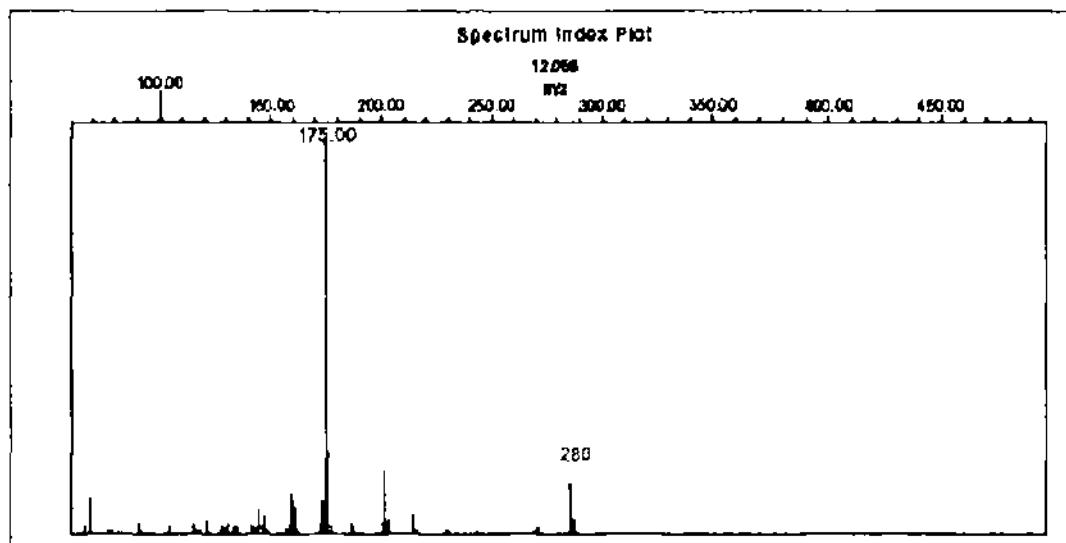


Figura 19. Espectro de Masas del **compuesto 4** aislado de raíz de *L. frutescens*.

#### **4.5.2.4 Espectroscopía RMN:**

**$^1\text{H}$  RMN:** Las Figuras 20 y 21 corresponden a los Espectros de  $^1\text{H}$  RMN de los compuestos 3 y 4.

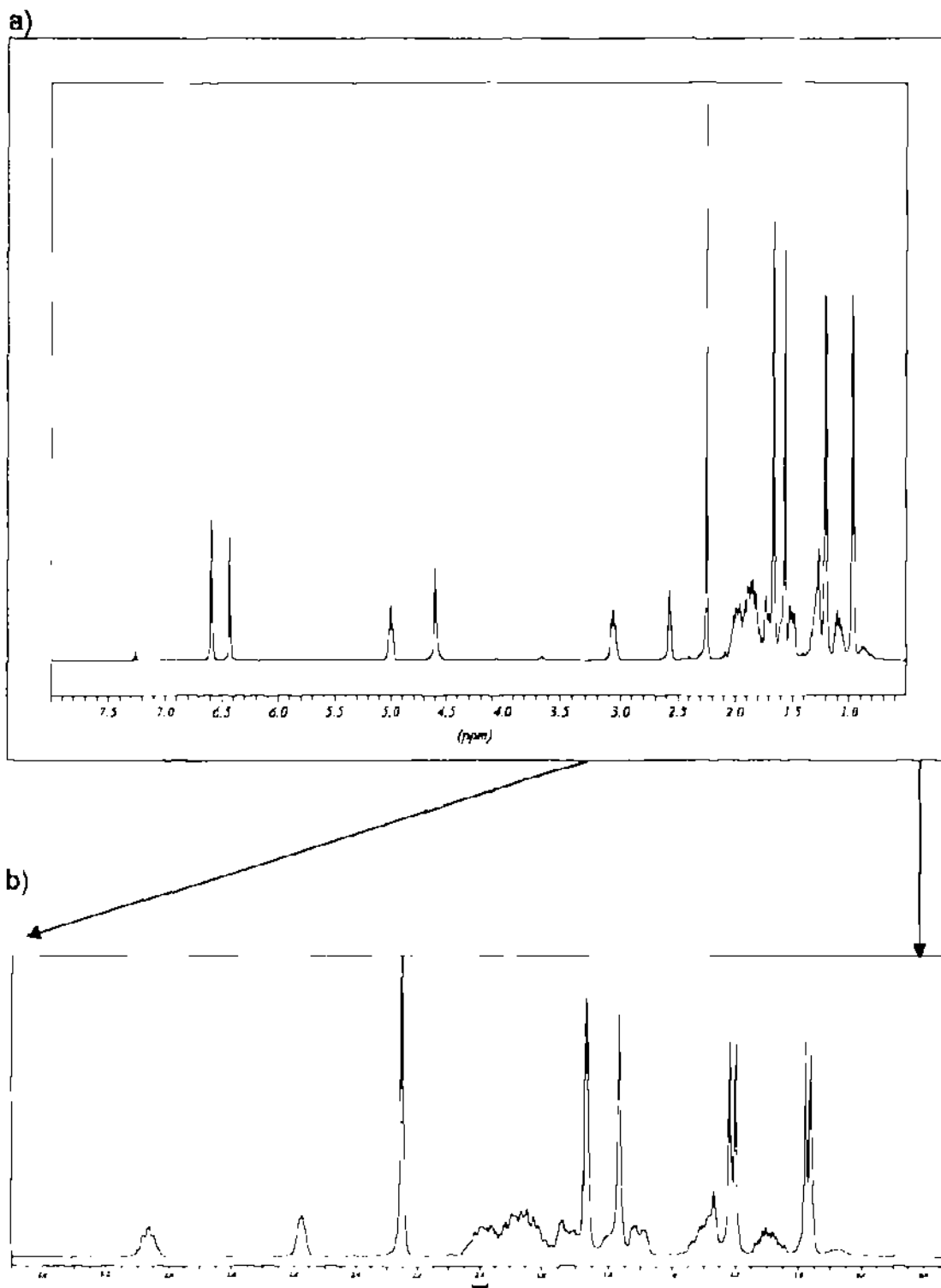


Figura 20. a) Espectro de  $^1\text{H}$  RMN del **compuesto 3** aislado de raíz de *L. frutescens*, b) Ampliación de la zona del Espectro  $^1\text{H}$  RMN del **compuesto 3** entre 0.5 y 3.5 ppm.

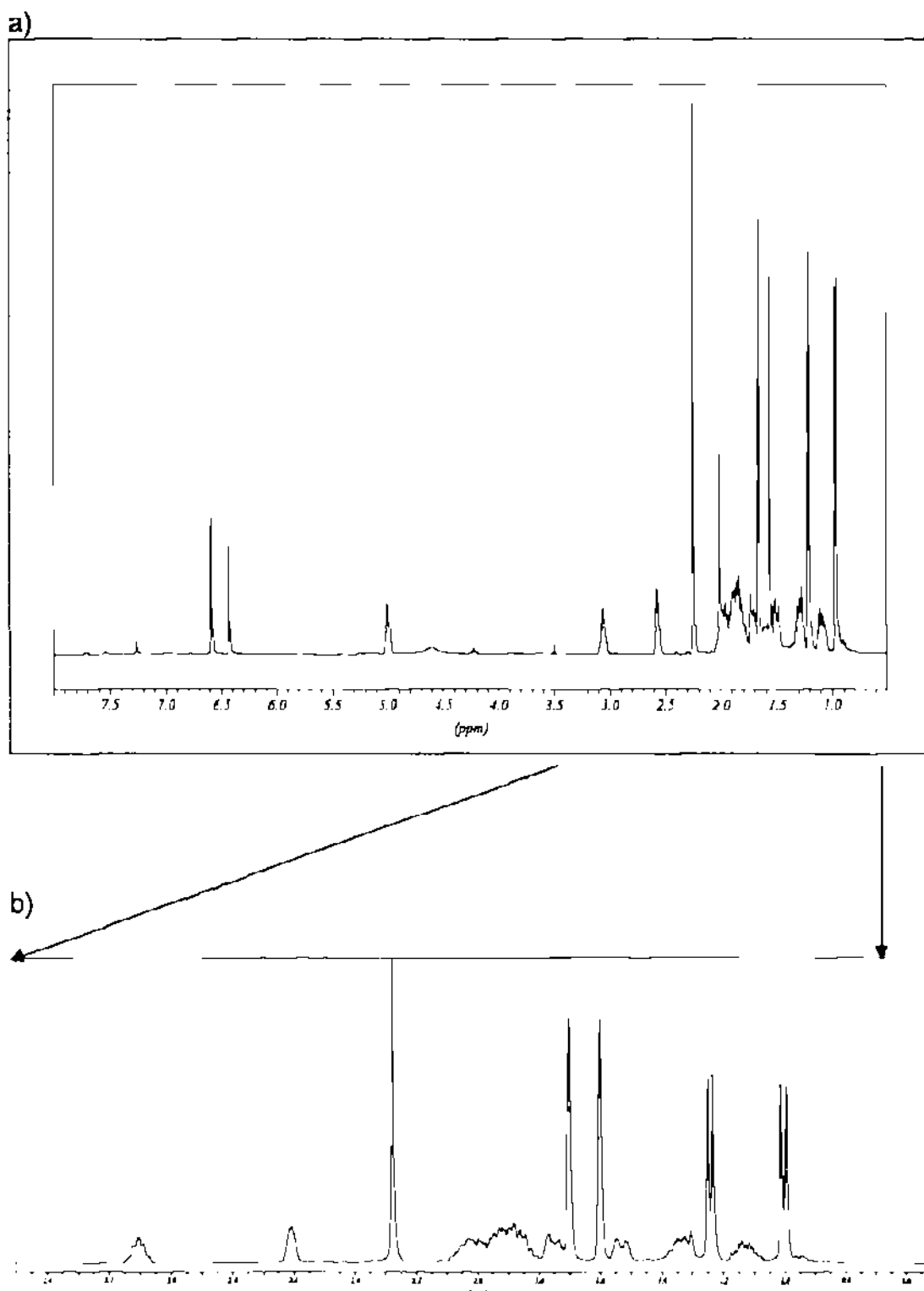


Figura 21. a) Espectro de <sup>1</sup>H RMN del **compuesto 4** aislado de raíz de *L. frutescens*, b) Ampliación de la zona del Espectro <sup>1</sup>H RMN del **compuesto 4** entre 0.5 y 3.5 ppm.

**$^{13}\text{C}$  RMN:** Las Figuras 22 y 23 corresponden a los Espectros de  $^{13}\text{C}$  RMN de los compuestos 3 y 4.

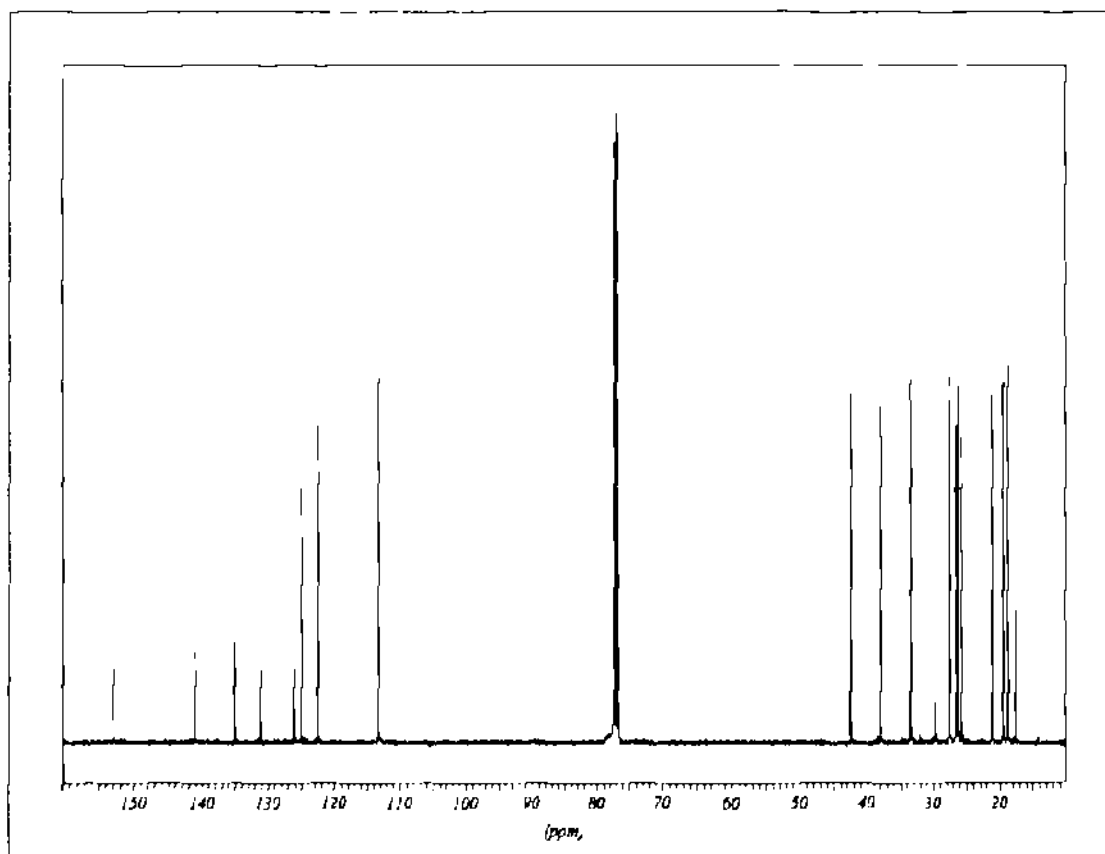


Figura 22. Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN del compuesto 3 aislado de raíz de *L. frutescens*.

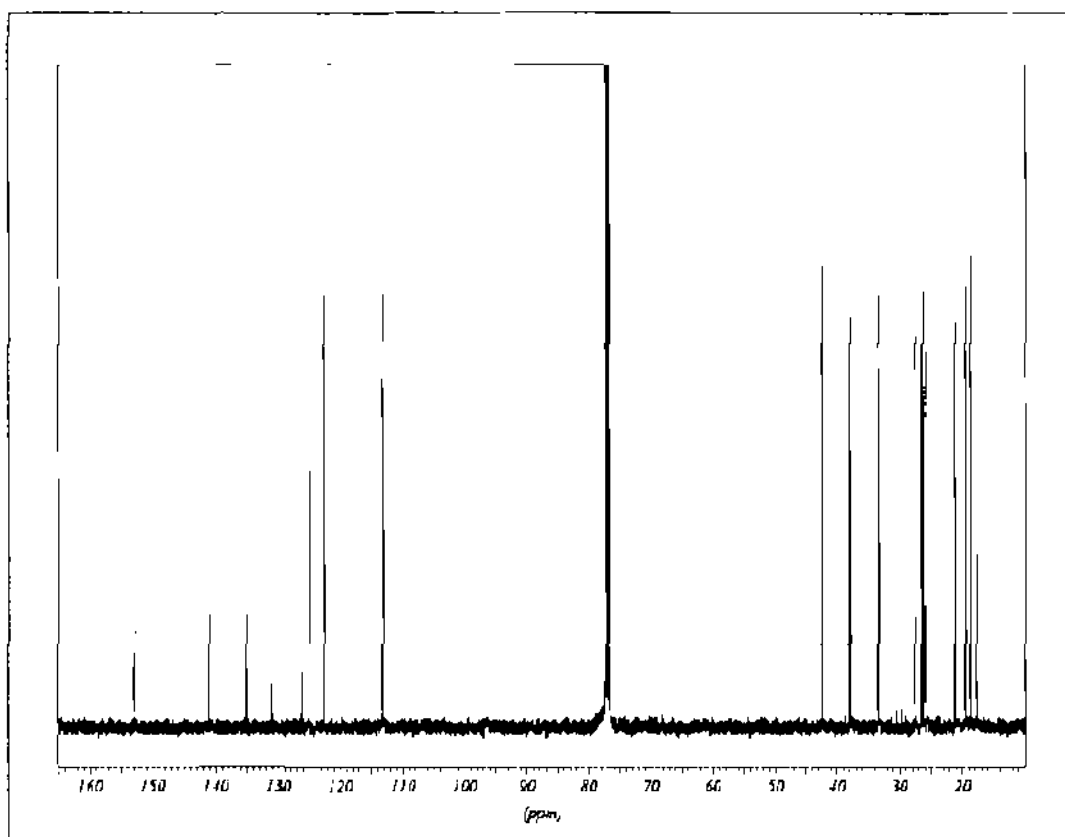
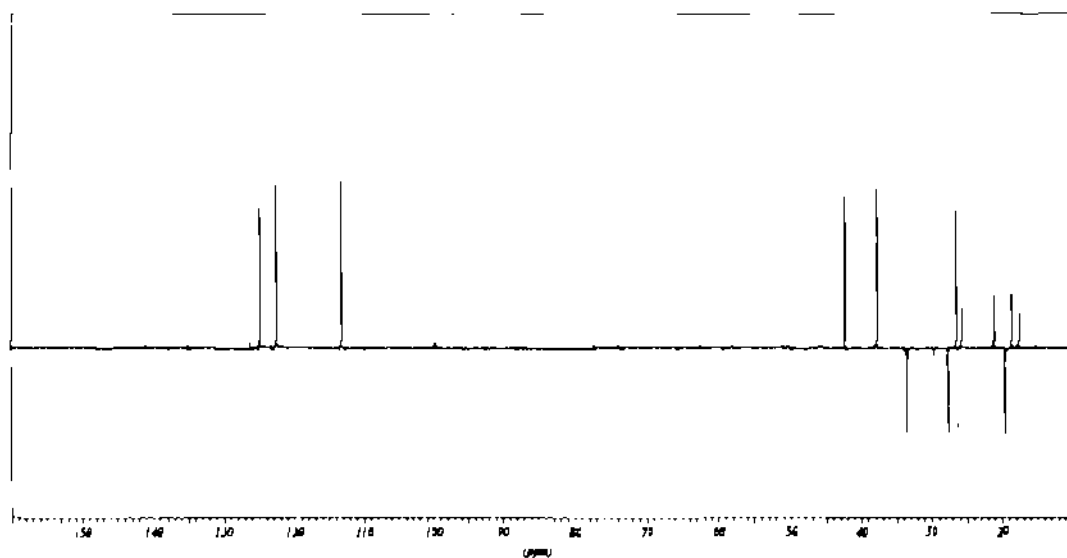


Figura 23. Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN del **compuesto 4** aislado de raíz de *L. frutescens*.



La Figura 24 corresponde a los DEPT-135 de los **compuestos 3** (a) y **4** (b).

**a) compuesto 3:**



**b) compuesto 4:**

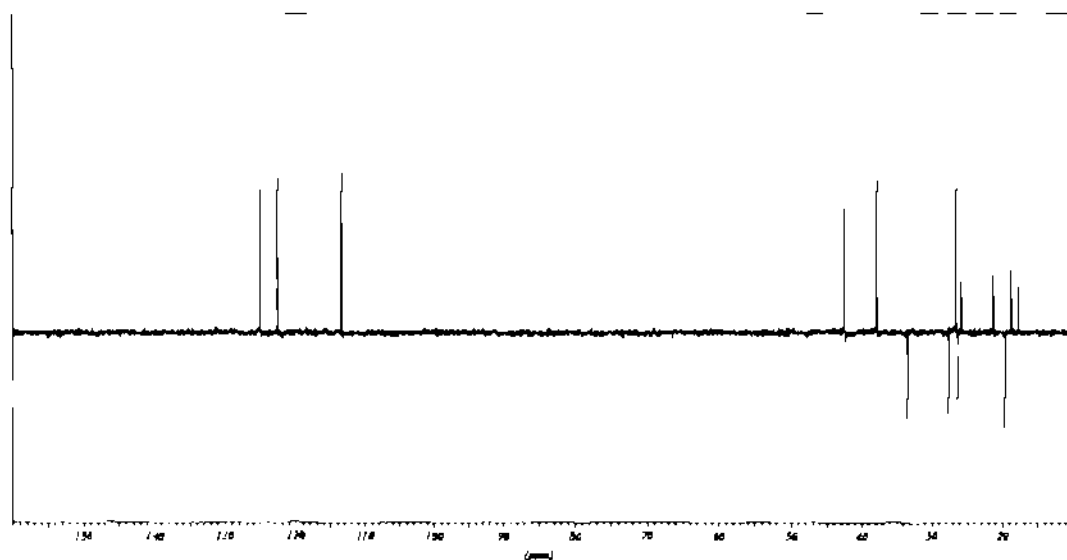


Figura 24. DEPT-135 de los **compuestos a) 3** y **b) 4** aislados de raíz de *L. frutescens*.

Las Figuras 25 y 26 corresponden a los HMQC de los **compuestos 3 y 4**.

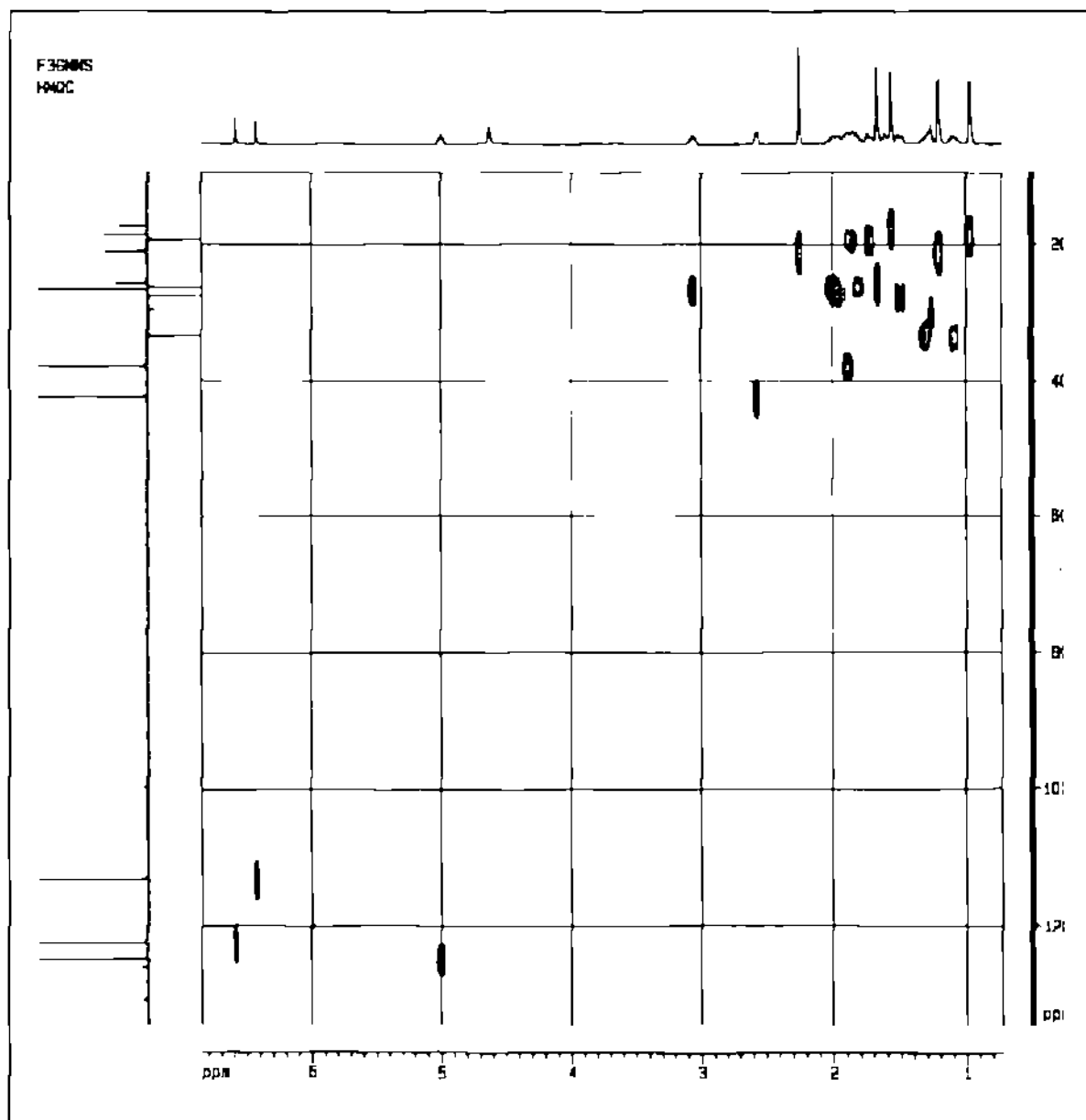


Figura 25. HMQC del **compuesto 3** aislado de raíz de *L. frutescens*.

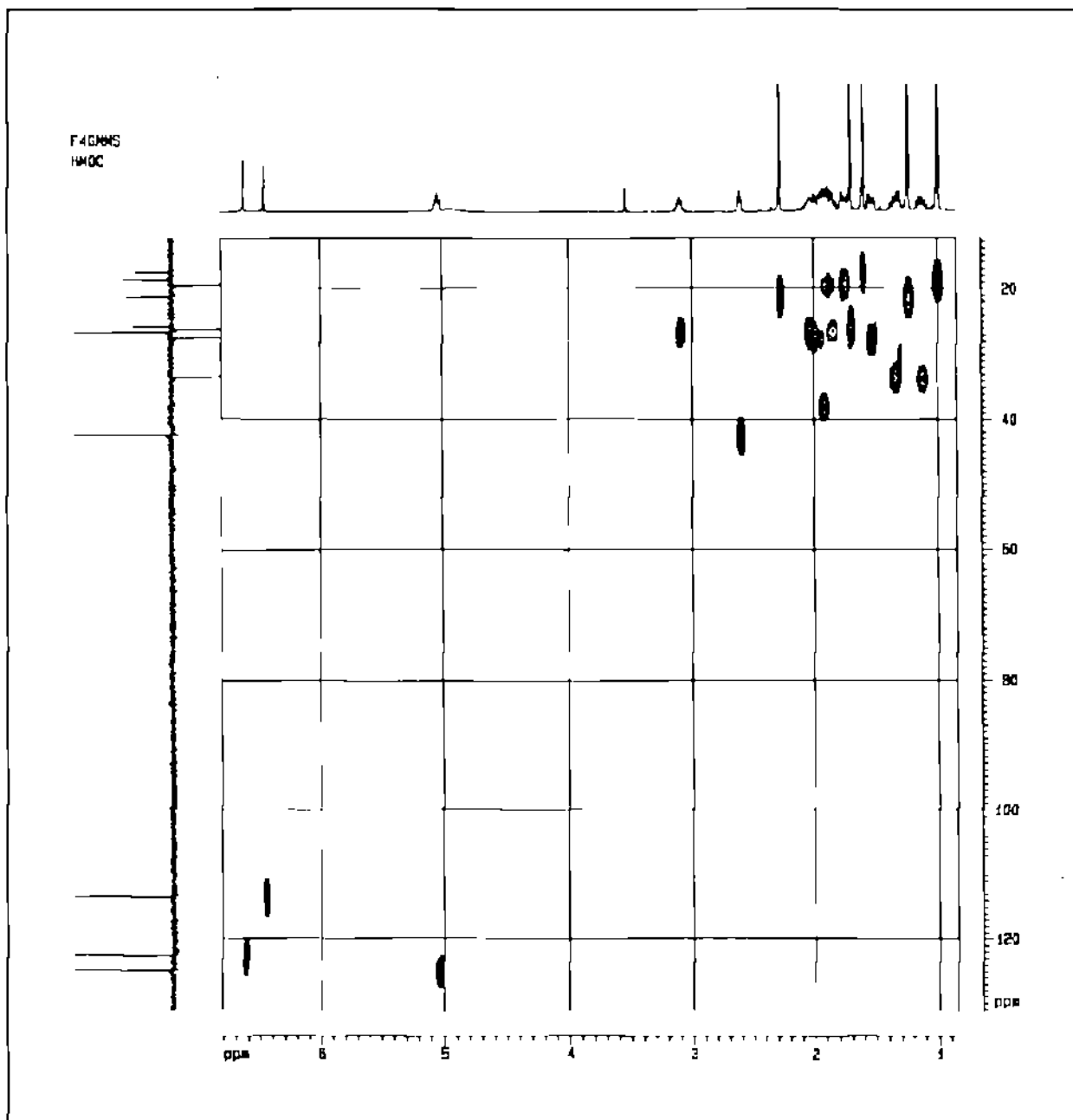


Figura 26. HMQC del **compuesto 4** aislado de raíz de *L. frutescens*.

Las Figuras 27 y 28 corresponden a los HMBC de los **compuestos 3 y 4**.

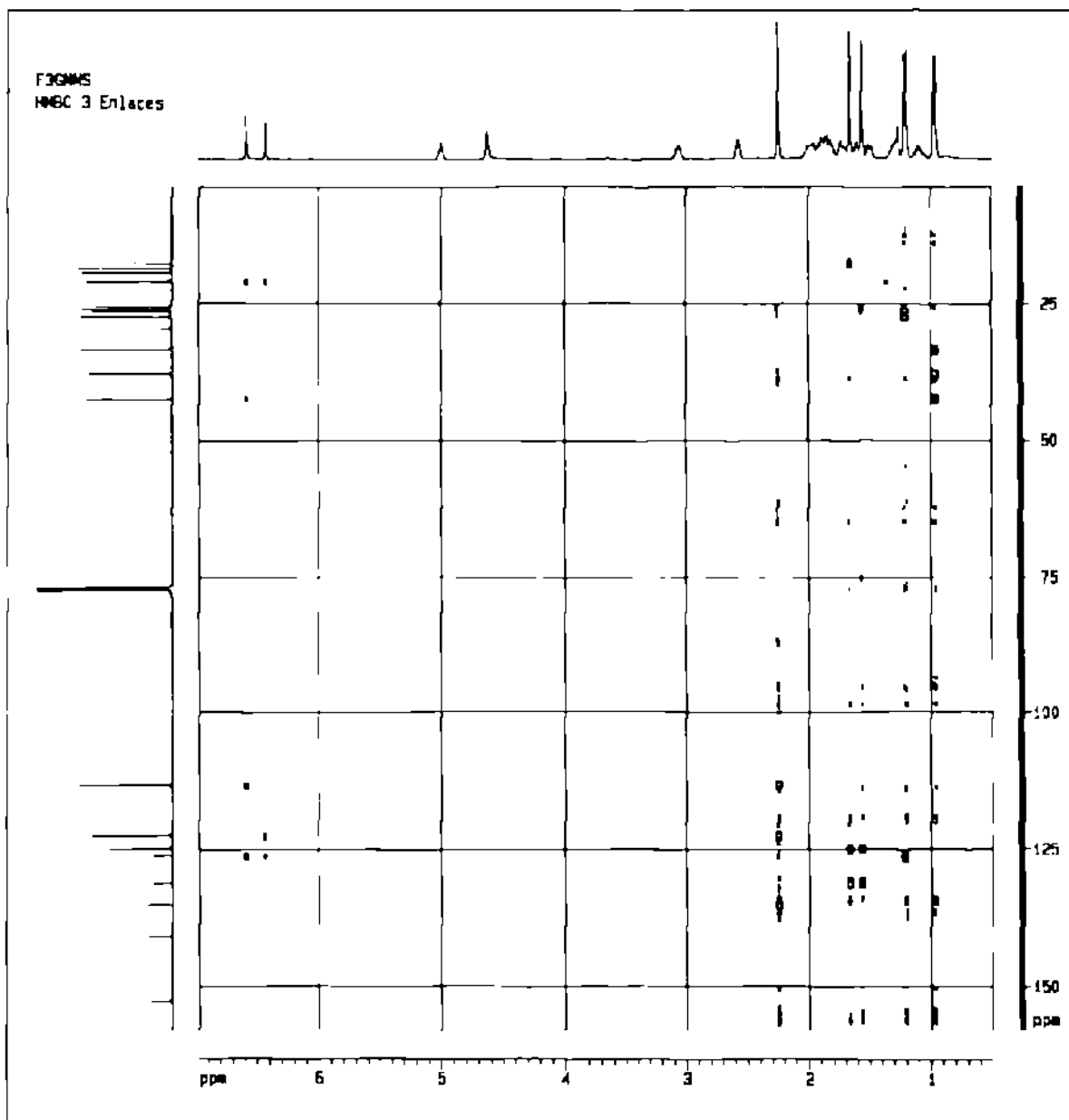


Figura 27. HMBC del **compuesto 3** aislado de raíz de *L. frutescens*.

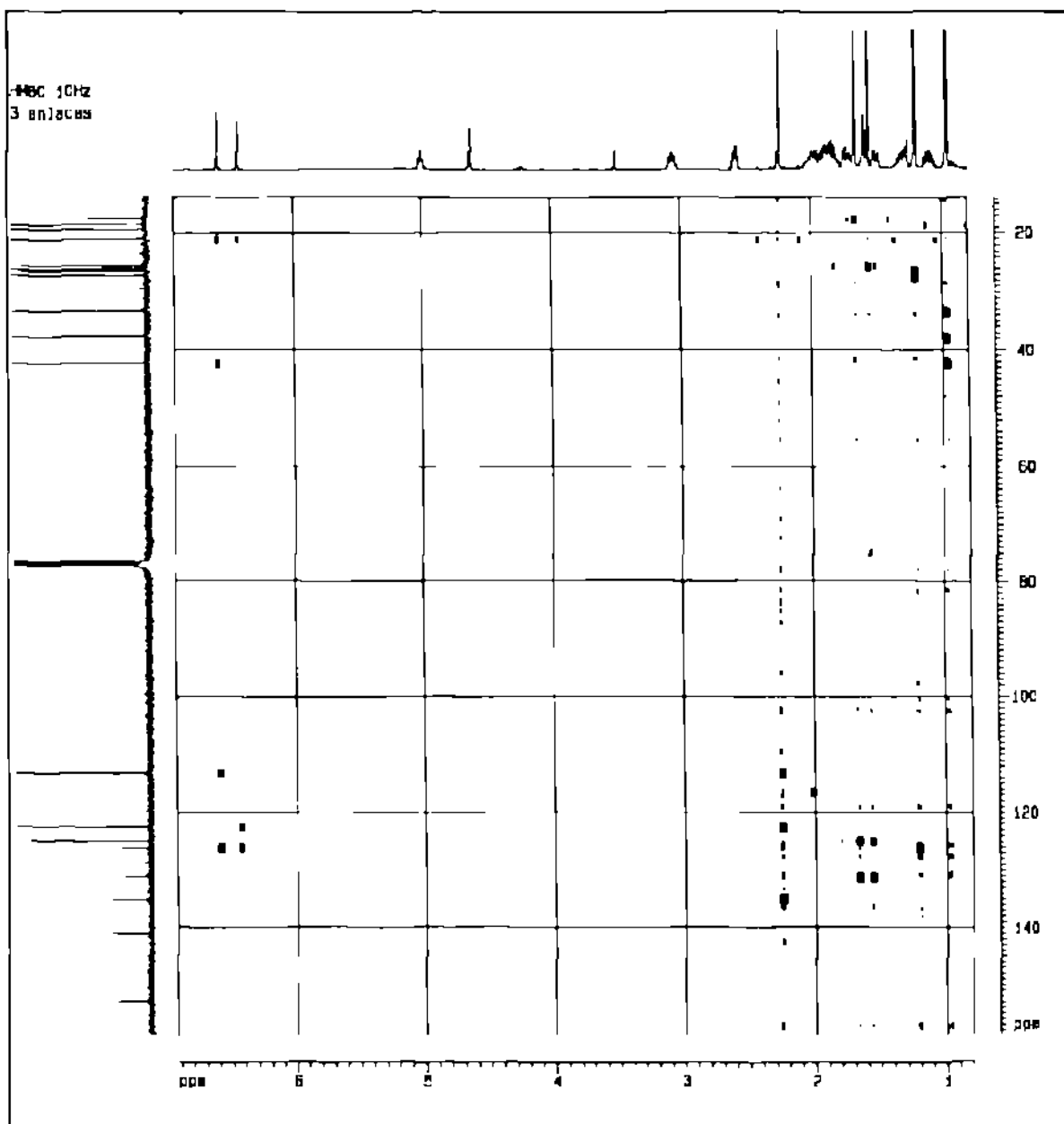


Figura 28. HMBC del **compuesto 4** aislado de raíz de *L. frutescens*.

Las Figuras 29 y 30 corresponden a los COSY de los **compuestos 3 y 4**.

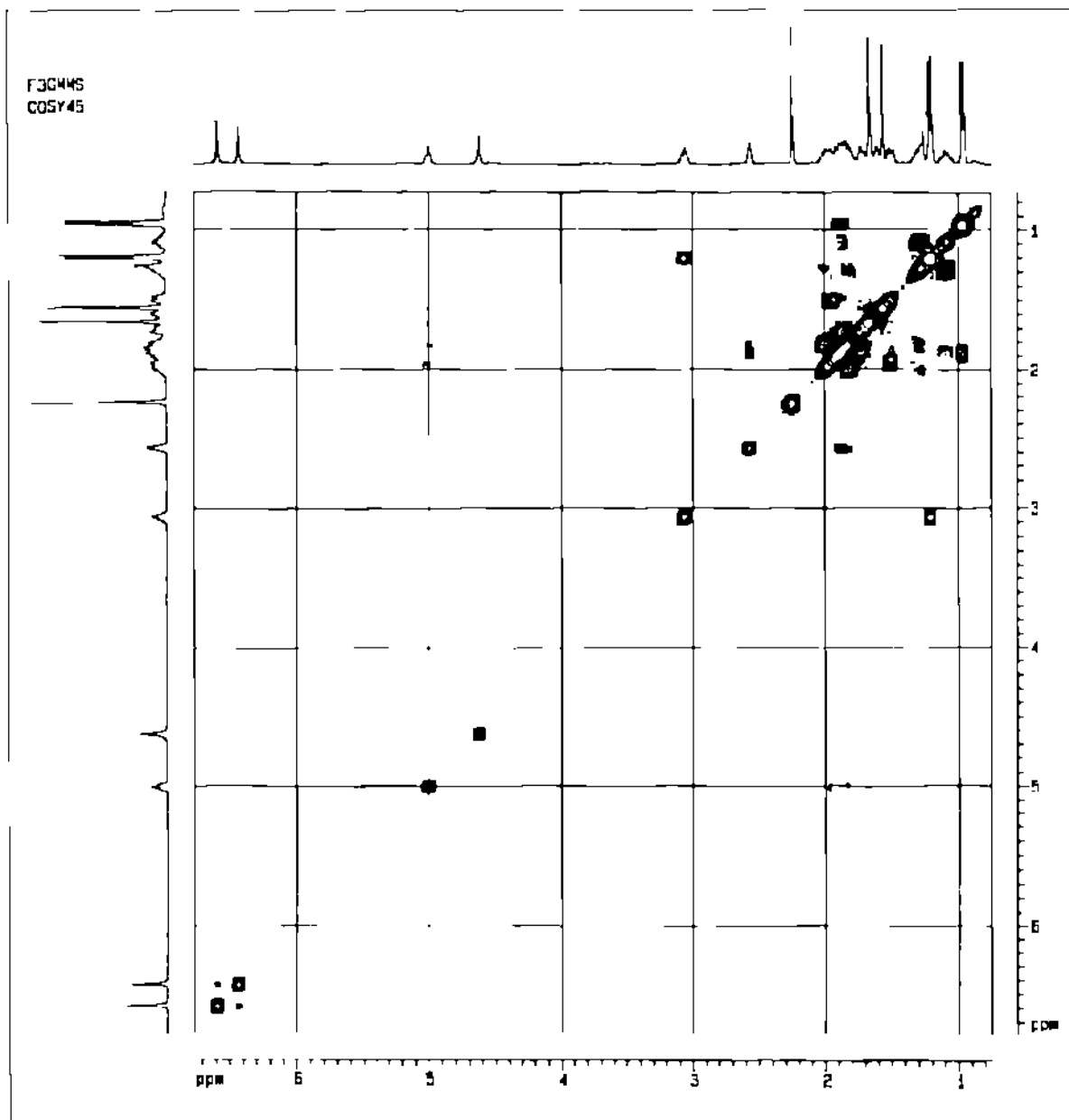


Figura 29. COSY del **compuesto 3** aislado de raíz de *L. frutescens*.

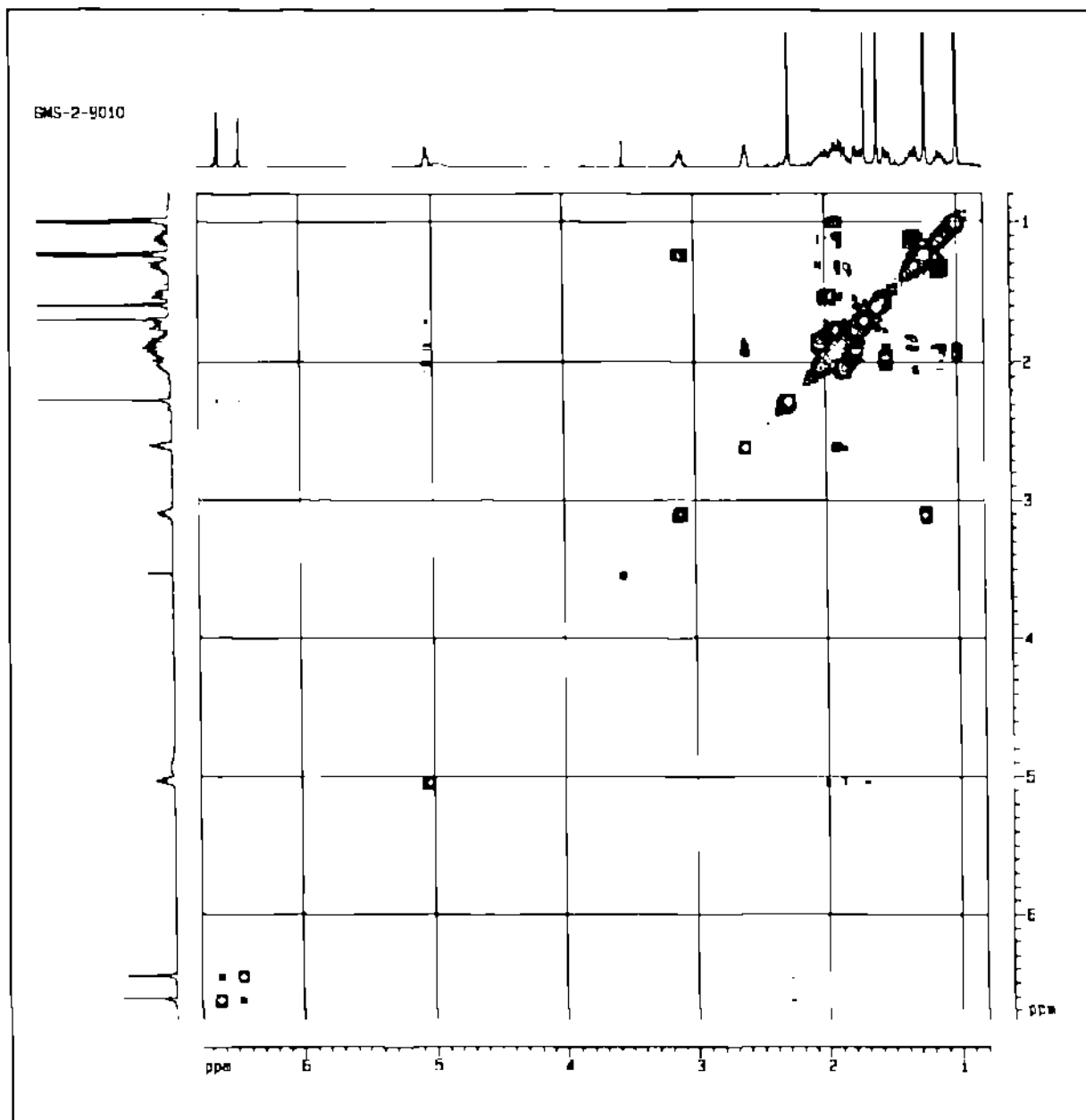


Figura 30. COSY del **compuesto 4** aislado de raíz de *L. frutescens*.

#### 4.5.2.5 Poder Rotatorio:

$$[\alpha]_D = \alpha / l C,$$

Donde: =  $\alpha$  = rotación específica experimental

$l$  = es longitud de la celda (dm)

$C$  = concentración g/100 mL

Los valores de  $\alpha$  para los **compuestos 3** y **4** aislados de *L. frutescens* fueron -0.065 y -0.048, respectivamente. Los resultados del poder rotatorio para los compuestos fueron:

**compuesto 3:**  $[\alpha]_D = (-) 0.28$

**compuesto 4:**  $[\alpha]_D = (-) 0.32$



#### 4.6 MICs de los compuestos antiTB puros

Las MICs para cada compuesto se presentan en la Tabla 15. La Tabla 16 incluye las MICs de los antiTB de primera línea para ambas cepas.

Tabla 15. MICs y rendimientos de los compuestos antiTB aislados de raíz de *L. frutescens* para las cepas de *M. tuberculosis* sensibles y MDR.

<i>L. frutescens</i>	MIC ( $\mu\text{g/mL}$ )		Rendimiento (mg)
	<i>M tb S</i>	<i>M tb MDR</i>	
compuesto 3	12.50	12.50	25.00
compuesto 4	12.50	6.25	216.00

Tabla 16. MICs de los antiTB de primera línea para las cepas sensibles y MDR de *M. tuberculosis*.

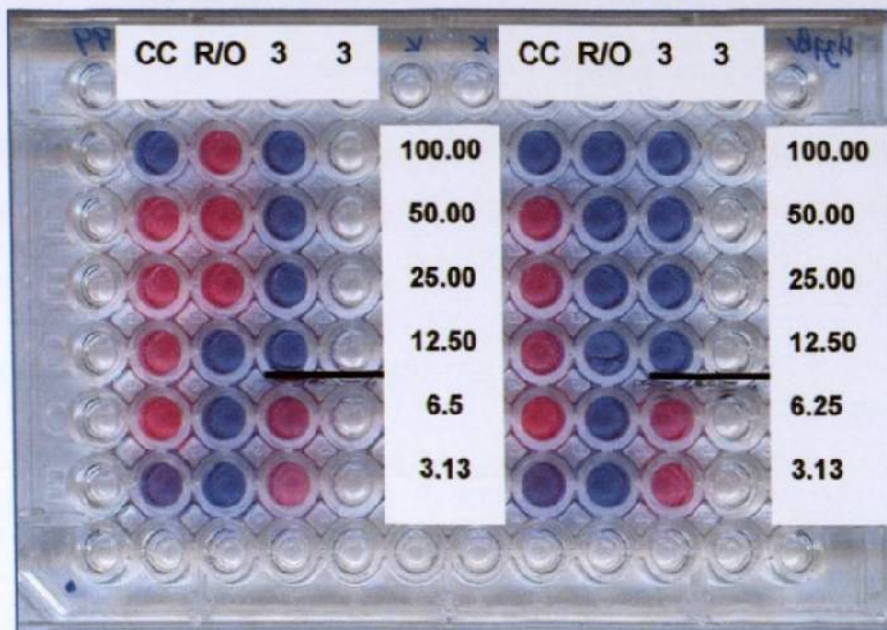
AntiTB	MIC ( $\mu\text{g/mL}$ )	
	<i>M tb S</i>	<i>M tb MDR</i>
estreptomina	0.50	$\geq 100.00$
isoniazida	0.06	3.13
rifampicina	0.06	100.00
etambutol	2.00	8.00

La Figura 31 es la fotografía de MABA para los **compuestos 3 y 4** aislados de *L. frutescens*.

**Compuesto 3:**

*M. tuberculosis*  
CIBIN/UMF15:99

*M. tuberculosis*  
H37Rv



**Compuesto 4:**

*M. tuberculosis*  
CIBIN/UMF15:99

*M. tuberculosis*  
H37Rv

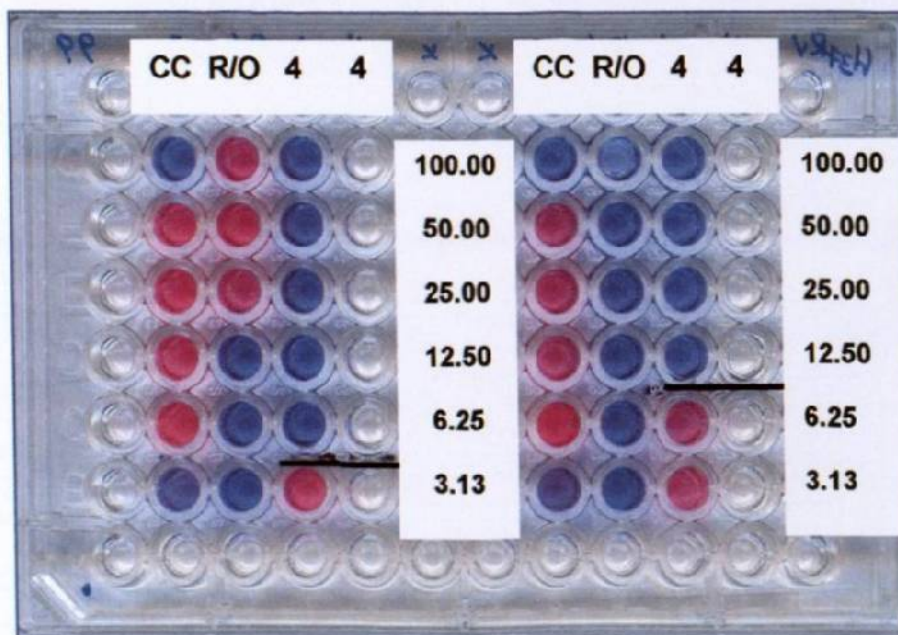


Figura 31. Fotografía del MABA para los **compuestos 3 y 4**. La columna de números a la derecha corresponde a la concentración de los compuestos (µg/ mL). Las líneas horizontales corresponden a la MIC. CC: Controles de Crecimiento; R: rifampicina; O: ofloxacin; 3: compuesto 3 y 4: compuesto 4.

#### 4.7 Actividad antiTB Bactericida o Bacteriostática

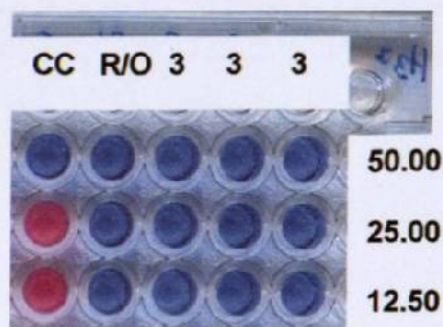
Los dos compuestos resultaron bactericidas (permanencia del color azul del indicador) a las Concentraciones consideradas como Mínimas Inhibitorias para ambas cepas micobacterianas (Ver Figura 32):

##### Compuesto 3:

*M. tuberculosis*  
CIBIN/UMF15:99

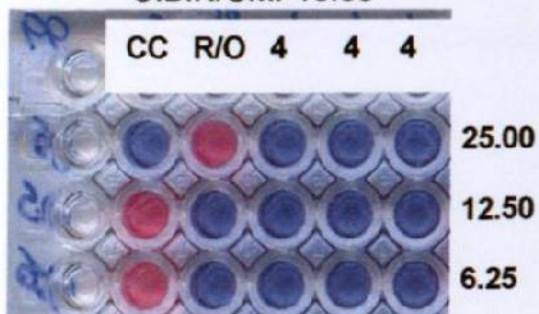


*M. tuberculosis*  
H37Rv



##### Compuesto 4:

*M. tuberculosis*  
CIBIN/UMF15:99



*M. tuberculosis*  
H37Rv

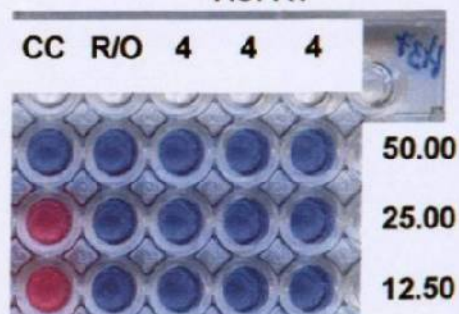


Figura 32. Fotografía del MABA en el cual se caracterizó a los **compuestos 3 y 4** aislados de *L. frutescens* como bactericidas. La columna de números a la derecha corresponde a la concentración de los compuestos ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). CC: Controles de Crecimiento; R: rifampicina; O: ofloxacina; 3: compuesto 3 y 4: compuesto 4.

#### 4.8 Toxicidad de los compuestos 3 y 4 para larvas de *A. salina*

Las  $CL_{50}$  de los compuestos antiTB aislados de la raíz de *L. frutescens*, así como el control positivo y los intervalos de confianza (IC) se incluyen en la Tabla 17.

Tabla 17. Las  $CL_{50}$  de los compuestos antiTB aislados de la raíz de *L. frutescens* para larvas de *A. salina*.

	$CL_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	IC (95%)
compuesto 3	9.87	6.18-15.18
compuesto 4	8.72	7.20-10.50
dicromato de potasio	15.60	11.02-22.68

## CAPÍTULO 5

### DISCUSIÓN

La mayoría de las plantas evaluadas en este estudio fueron seleccionadas en base a criterios etnofarmacológicos; sin embargo algunas de ellas fueron recolectadas por consideración a reportes previos de actividad antiTB de otras especies como el caso de las especies de *Salvia* (Ulubelen A y cols., 1997) o actividad antimicobacteriana para el caso de la especie regional de *Scutellaria* (Franzblau SG y C Croos, 1986) (Tabla 4).

Se usó MeOH como sistema extractante en general ya que con éste asegurábamos arrastrar principios activos polares y medianamente polares, al igual que los rastreos de actividad antiTB y antimicobacteriana reportados por Asres K y cols., 2001; Newton SM y cols., 2002 y Jiménez-Arellanes y cols., 2003. Sin embargo, para el caso del fruto de *S. molle* se realizó la extracción con hexano en lugar de MeOH porque se obtuvo un molido muy aceitoso. En el caso de los molidos de hojas y raíz de *C. mexicana* se realizaron extracciones de sus aceites esenciales con éter etílico

previamente a la extracción metanólica, pues al realizar el molido fue evidente el gran contenido de aceites los cuales el MeOH no extraería eficientemente.

Aunque originalmente se propuso obtener extractos acuosos de todas las plantas seleccionadas por criterios etnofarmacológicos no se prosiguió con ésto, ya que los primeros resultados mostraron que ninguno de los extractos evaluados fue activo. Las posibles razones pueden ser 1) nuestra estrategia de obtención del extracto acuoso a partir del residuo metanólico y no directamente del material vegetal molido; 2) debido a que al igual que los productos naturales con actividad antiTB reportados por otros grupos de investigación, éstos son de naturaleza no polar a medianamente polar. Nuestros resultados concuerdan con Lall N y JJ Meyer quienes en 1999, reportaron que de 20 extractos acuosos obtenidos de plantas sudafricanas sólo uno de ellos, el obtenido de la raíz de *Euclea natalensis* presentó actividad antiTB a 500 µg/mL y con los resultados publicados por Jimenez-Arellanes y cols., quienes en el 2003 reportaron que ninguno de los 22 extractos acuosos obtenidos de plantas mexicanas mostraron actividad antiTB a una concentración de 200 µg/mL. Así también, en la reunión del PIBATUB-CYTED celebrada en marzo del 2004, fue considerado que para la obtención de principios con actividad antiTB a partir de productos naturales el

uso del agua como extractante no es recomendable (comunicación personal, Dra. Noemí Waksman).

La evaluación de la actividad antimicobacteriana y antiTB de productos naturales ha sido realizada utilizando diversos métodos. Entre los citados están el método de las proporciones (Grange JM y NJC Snell, 1996; Lall N y JJ Meyer, 1999; Asres K y cols., 2001), difusión en disco (McCutcheon y cols., 1992; Kobaisy M y cols., 1997; Luesch H y cols., 2001; Osterhage C y cols., 2002), incorporación de [ $H^3$ ]-uracilo (Ingólfssdóttir K y cols., 1998) y el sistema Bactec 460 (Caldwell y cols., 2000; Cantrell y cols., 1998; Cantrell y cols., 1999). Estos métodos tienen algunas limitaciones tales como alto costo, tiempos prolongados para obtener resultados (lo que incrementa la probabilidad de la descomposición de la sustancia prueba), uso de radioisótopos y necesidad de grandes cantidades de extractos, fracciones o compuestos puros para su evaluación. La implementación de métodos de microdilución permite realizar con rapidez el tamizaje de posibles nuevos agentes antiTB (Ulubelen A y cols., 1997; ElSohly HN y cols., 1999; Topcu G y cols., 1999; Houghton PJ y cols., 1999). En nuestro caso usamos el método de microdilución, que utiliza como indicador de viabilidad celular el indicador redox Alamar Azul (descrito en 1.4.3.1) que representa una excelente alternativa para determinar la actividad antiTB de extractos crudos, fracciones o compuestos puros aislados de productos naturales (Pietro y

cols., 2000; Jimenez-Arellanes y cols., 2003; Woldemichael GM y cols., 2004; Gu JQ y cols., 2004 b).

Al iniciar este trabajo en el año 2000 no existían reportes del uso del MABA para la evaluación antiTB de extractos crudos, fracciones o compuestos puros aislados de productos naturales; ni tampoco había evidencia de su uso para evaluar compuestos sintéticos como posibles agentes antiTB. El MABA solo se empleaba en la Micobacteriología Clínica para determinar MIC de los medicamentos antiTB sobre los aislados clínicos de *M. tuberculosis* con el uso de un fluorómetro para microplacas (Collins LA y SG Franzblau 1997, Franzblau y cols., 1998). En nuestro laboratorio no contábamos con un fluorómetro, por lo que el viraje del indicador de viabilidad del azul al rosa por apreciación visual y no la emisión de fluorescencia fue la característica utilizada para determinar la MIC. La evaluación de la posible interferencia del color mismo del extracto y los distintos estados redox del indicador demostró que no existía interferencia de los colores (Figura 2). Así, fue posible la determinación de MIC mediante la apreciación visual de la permanencia del color azul en el micropozo confirmada por revisión al microscopio del crecimiento micobacteriano.

En este estudio se incluyeron la cepa H37Rv y el aislado clínico CIBIN/UMF 15:99 de *M. tuberculosis*. La primera cepa es la cepa estándar (sensible a todos los antiTB de primera línea) y la segunda CIBIN/UMF15:99, es



resistente a todos ellos. Esta última micobacteria MDR es una de las 65 cepas de *M. tuberculosis* aisladas y caracterizadas de pacientes con TBP adscritos a la UMF del IMSS No. 15 (Said-Fernández S y cols., 2001). El uso de la cepa MDR de *M. tuberculosis* podría conducirnos a identificar extractos de plantas candidatos para realizar su fraccionamiento biodirigido hasta lograr el aislamiento y caracterización de compuestos de estructura novedosa, los cuales podrían controlar la TB-MDR.

Con la premisa de que el DMSO es un disolvente universal pero sabiendo además que este compuesto permeabiliza la membrana celular, se determinó su efecto tóxico sobre las dos cepas de micobacterias utilizadas en el presente trabajo. El DMSO demostró efecto inhibitorio sobre ambas cepas a una concentración de 12.50 % (v/v). Consecuentemente, los extractos orgánicos se prepararon al 20% de DMSO para que por la misma técnica del MABA (dilución 1:4) la concentración de DMSO en el micropozo número 1 fuera del 5%, de esta manera asegurábamos estar trabajando a concentraciones subtóxicas del disolvente.

Existen distintos criterios de los puntos de corte sobre la MIC para considerar un extracto crudo activo y buen candidato para proseguir con su fraccionamiento biodirigido. Por ejemplo para Lall N y JJ Meyer en 1999 fue 500 µg/mL; para Asres K y cols., en el 2001 fue 100 µg/mL; para Newton SM

y cols., en el 2002 fue 62.5 µg/mL; para Jimenez-Arellanes y cols., en el 2003 fue 200 µg/mL y recientemente para Tosun F y cols., 2004 fue 50 µg/mL.

Nosotros decidimos considerar como activos únicamente a aquellos extractos con una MIC de  $\leq 250$  µg/mL. Los resultados obtenidos en el presente trabajo nos permitieron identificar tres especies activas: *C. mexicana*, *L. frutescens* y *S. molle*, las cuales poseen actividad antiTB contra ambas cepas de *M. tuberculosis*, con MICs entre 62.50 y 250 µg/mL (Tabla 9). Es interesante considerar que estas tres especies fueron elegidas por criterios etnofarmacológicos; además cabe resaltar que *L. frutescens* y *S. molle* han sido referidas específicamente para el tratamiento de la TB. (Tabla 4). Así, la selección de plantas por criterios etnofarmacológicos incrementa fuertemente la probabilidad de identificar especies con principios antiTB. Estas tres plantas regionales son excelentes candidatas para el aislamiento de los nuevos compuestos antiTB.

A continuación se refieren los datos reportados para las tres especies que resultaron activas en el presente trabajo. Los extractos medianamente polares de la parte aérea de *C. mexicana* fueron previamente reportados con actividad anti-*M. tuberculosis* por Cantrell CL y cols., en 1998; por medio de estudios fitoquímicos se logró el aislamiento y la caracterización de

monoterpenos, sin embargo no se reportó evaluación de actividad biológica (Delgado G y MY Rios, 1991).

Rimando AM y cols. en 1999, aislaron lignanos con actividad fitotóxica de *L. frutescens*. Rojas S y cols. en el 2003, aislaron de una especie muy relacionada, *L. ambiguum*, lignanos inhibidores de la calmodulina. Sin embargo, no existen reportes previos de actividad antiTB en extractos crudos, fracciones o compuestos puros aislados del género *Leucophyllum*.

Dikshit A y cols. en 1986, reportaron actividad antifúngica de los aceites esenciales contenidos en hojas de *S. molle*; los aceites esenciales fueron caracterizados por CG y resultaron ser principalmente mirceno, limoneno y  $\beta$ -cariofileno. Gundidza M en 1993, reportó actividad de los aceites esenciales de hojas frescas de *S. molle* contra distintas especies bacterianas: *Klebsiella pneumoniae*, *Alcaligenes faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Leuconostoc cremoris*, *Enterobacter aerogenes*, *Proteus vulgaris*, *Clostridium sporogenes*, *Acinetobacter calcoacetica*, *Escherichia coli*, *Beneckea natriegens*, *Citrobacter freundii*, *Serratia marcescens*, *Bacillus subtilis* y *Brochothrix thermosphacata* y contra hongos patógenos, *Aspergillus ochraceus*, *A. parasiticus*, *Fusarium culmorum* y *Alternaria alternata*. Ruffa MJ y cols. en el 2002, describieron el efecto citotóxico de extractos metanólicos de hojas y frutos de esta especie sobre carcinoma hepatocelular (Hep G2). Yueqin Z y

cols. en el 2003, aislaron del fruto de *S. molle* dos triterpenoides y una biflavona con actividad anti-inflamatoria. Hayashi T y cols. en 1986 aislaron de *S. terebinthifolius* pentagalloylglucosa, un inhibidor de xantina oxidasa.

Para elegir el extracto con el cual se continuaría el fraccionamiento biodirigido se plantearon los siguientes criterios:

- mayor actividad antiTB (menor MIC)
- mayor porcentaje de recuperación
- facilidad de obtener la planta regional

Con el conocimiento de que las MICs de los extractos de corteza de raíz de *L. frutescens* y raíz de *C. mexicana* fueron 62.50 µg/mL para ambas cepas y cuyos porcentajes de recuperación fueron de 7.9 y 7.7 %, respectivamente, se decidió continuar con el fraccionamiento biodirigido de los extractos de *L. frutescens* por tratarse de un arbusto abundante en nuestra región en comparación de *C. mexicana* que es una planta pequeña y escasa.

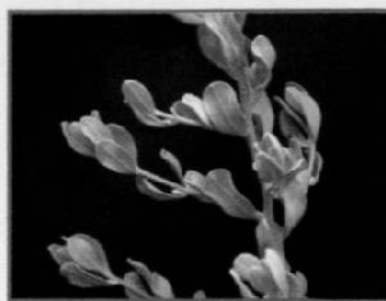
Así pues el estudio se continuó con el fraccionamiento biodirigido de los extractos metanólicos de corteza de raíz y hojas de *L. frutescens*, conocido como cenizo de Monterrey, la cual es una planta regional medicinal que pertenece a la familia *Scrophulariaceae*. Esta planta es un arbusto que alcanza más de un metro de altura, sus hojas son pequeñas, ovaladas y

vellosas, de color blanquecino pardo (de ahí su nombre de cenizo) y sus flores son pequeñas de color lila. *L. frutescens* crece silvestre en todo el Noreste de México, en algunas regiones del altiplano potosino y también en el Sureste de EEUU (Figura 33) (Universidad de Connecticut; USDA).

a) planta completa



b) hojas



c) flores

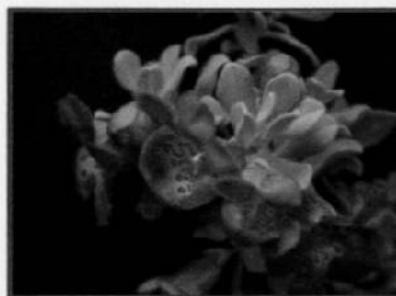


Figura 33. Fotografías de la planta *L. frutescens*.

De manera general, el efecto inhibitorio sobre ambas cepas micobacterianas se concentró en las fracciones no polares y medianamente polares de hojas y corteza de raíz de *L. frutescens*, mientras que las polares (butanólicas) fueron las menos activas (Tabla 10).

Las tres fracciones obtenidas por ELL del extracto de hojas presentaron MICs mayores que la del extracto crudo sobre la cepa sensible de *M. tuberculosis*, mientras que para la cepa MDR solo la fracción medianamente polar (AcOEt) es tan activa como el extracto original, con una MIC de 125µg/mL (Tabla 10).

Por otro lado la fracción hexánica de raíz mostró ser dos veces más activa (MIC = 31.25 µg/mL) que el extracto original (MIC = 62.50 µg/mL) sobre ambas cepas (Tabla 10). Por esta razón se decidió seguir con el fraccionamiento biodirigido de la fracción hexánica. Se inició el fraccionamiento por VLC, técnica cromatográfica ampliamente reportada y utilizada para la separación de mezclas complejas de naturaleza no polar como terpenos e inclusive metabolitos con actividad antiTB (Cantrell CL y cols., 1996; Kobaisy M y cols., 1997; Ulubelen A y cols., 1997; Saludes JP y cols., 2002; Peng J y cols., 2003). Por VLC se obtuvieron 8 fracciones. La fracción con mayor actividad sobre ambas cepas de *M. tuberculosis* fue la eluida con la mezcla hexano:AcOEt 20:1. Esta nueva fracción resultó ser dos veces más activa que la original. La actividad antiTB en términos de MIC fue igual para ambas cepas: 15.63 µg/mL (Tabla 12).

El perfil cromatográfico obtenido por HPLC-DAD de la fracción más activa VLC 20:1 (Figura 5), indicó la presencia de 5 compuestos mayoritarios (> 5% área) con tR de 2.972, 3.819, 9.697, 12.423 y 13.132 min.

Por CCF de la VLC 20:1 fueron evidentes 4 manchas tanto por revelado con los vapores de yodo como por exposición a la luz UV.

El análisis de la fracción VLC 20:1 por HPLC-EM (Figura 6) demostró la presencia de 2 señales: en el cromatograma a la m/z 175 apareció un pico a 11.209 min, y solo se obtuvo un compuesto probable con un 19% de coincidencia, el 2,5-dimetil-8-(1-metiletil)-5,6,7,8-tetrahidro-1-naftalenol con peso molecular de 218.1675065 g/mol, fórmula  $C_{15}H_{22}O$  y pico base de m/z 175 (Figura 34) (Tirado-Castillo A, 2004).

En la fracción VLC 20:1 no se detectaron lignanos, metabolitos secundarios que habían sido aislados, caracterizados y evaluados en esta especie y en una especie estrechamente relacionada (Rimando AM y cols., 1999; Rojas S y cols., 2003). La presencia de los lignanos quedó demostrada en la fracción VLC 10:1, que incluye un pico con tR de 8.672 min (Figura 8) y cuyo EM obtenido a la m/z 149 se comparó contra las dos bibliotecas y se logró identificar como asarinina. Este lignano también se encontró en la fracción VLC 15:1 (Figura 7) (Tirado-Castillo A, 2004).

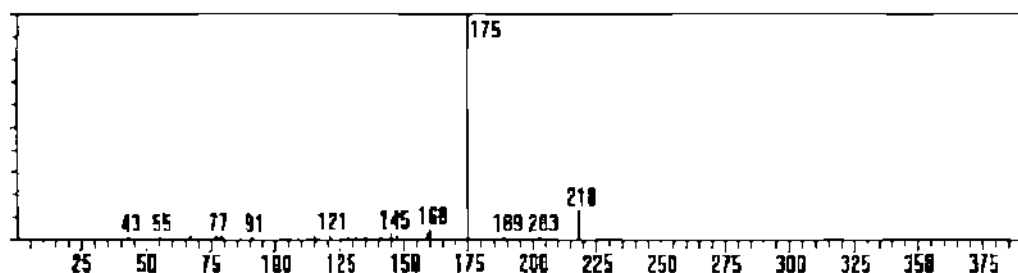
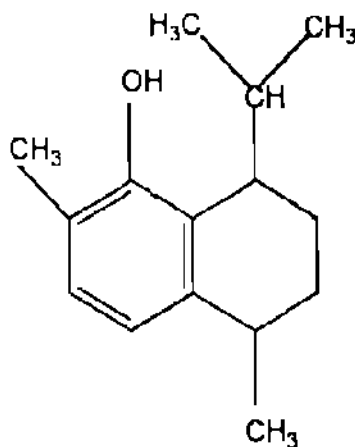


Figura 34. Estructura planar y EM del 2,5-dimetil-8-(1-metiletil)-5,6,7,8-tetrahidro-1-naftalenol.

Resulta interesante resaltar que el resto de las fracciones eluidas con las proporciones 10:1, 3:1, 2:1 hexano:AcOEt y solo AcOEt fueron más activas sobre la cepa sensible que sobre la MDR de *M. tuberculosis* (Tabla 12).

La fracción más activa VLC 20:1, se purificó por medio de Cromatografía a Baja Presión-FR, técnica de separación que asegura el suministro y flujo constante de solvente y con mayor resolución que la VLC. Se obtuvieron 6 fracciones cromatográficas. Las fracciones 3 y 4 eluidas con MeOH:agua (90:10) y MeOH respectivamente, mostraron la mayor actividad antiTB. La



**fracción 4** resultó tener igual actividad sobre ambas cepas: MIC=12.50  $\mu\text{g/mL}$ ; mientras que la **fracción 3** fue más activa sobre la cepa MDR (MIC= 12.50  $\mu\text{g/mL}$ ) que sobre la cepa sensible de *M. tuberculosis* (MIC= 25.00  $\mu\text{g/mL}$ ) (Tabla 13).

El perfil cromatográfico obtenido por HPLC de la **fracción 3** mostró un pico principal con un tR de 12.467 min (Figura 9). El perfil cromatográfico obtenido por HPLC de la **fracción 4** mostró también un pico principal con un tR de 12.968 min (Figura 10).

Los espectros UV-Vis de ambos compuestos obtenidos resultaron idénticos y su longitud de onda máxima fue 283.5 nm.

De la **fracción 3** se logró purificar el **compuesto 3** mediante una nueva Cromatografía a Baja Presión-FR con MeOH:agua (90:10) como eluente (Figuras 11 y 12). La purificación del compuesto antiTB presente en la fracción 3 se reflejó en su actividad biológica, ya que la MIC para la cepa sensible de *M. tuberculosis* disminuyó de 25.00 a 12.50  $\mu\text{g/mL}$  (Tabla 15). La purificación del **compuesto 4** a partir de la **fracción 4**, fue posible por medio de una nueva Cromatografía a Baja Presión-FR con MeOH como eluente (Figura 13). El **compuesto 4** puro mostró una MIC menor a la de **fracción 4** sobre la cepa MDR de *M. tuberculosis* (Tabla 15).

Los **compuestos 3 y 4** presentaron prácticamente los mismos espectros de **UV-Vis y EM**. El peso molecular de ambos compuestos es 286 g/mol y la fórmula molecular posible es  $C_{20}H_{30}O$ . Para ambos compuestos el pico base del EM es de  $m/z$  175, el cual coincide con el pico base del 2,5-dimetil-8-(1-metiletil)-5,6,7,8-tetrahidro-1-naftalenol, compuesto probable identificado en la fracción VLC 20:1 (Figuras 18, 19 y 34).

Debido a la poca cantidad del **compuesto 3** solo se logró realizar el **espectro IR** para el **compuesto 4** y que presenta bandas a  $3463.78\text{ cm}^{-1}$  que corresponde al estiramiento del enlace O-H; bandas a  $2955.98$ ,  $2922.98$  y  $2868.55\text{ cm}^{-1}$  que corresponde a los estiramientos C-H de  $-CH_3$ ,  $-CH_2$  y  $-CH$ . Una banda a  $1618\text{ cm}^{-1}$  que corresponde al estiramiento de  $-C=C-$ .

En los espectros de  $^1\text{H RMN}$  de los **compuestos 3 y 4** (Figuras 20 y 21) se observan 5 señales de metilos, dos dobletes y un singulete. Uno de los singuletes aparece desplazado a campo bajo (compuesto 3: 2.25 ppm y compuesto 4: 2.27 ppm) lo cual indica su posible unión a un anillo aromático. Los otros dos singuletes a campo más alto indican posible unión a olefina (**compuesto 3**: 1.67 y 1.57 ppm; **compuesto 4**: 1.69 y 1.59 ppm). Además se observan 2 señales de metino (3.06 y 2.58 ppm para el **compuesto 3**; 3.09 y 2.60 ppm para el **compuesto 4**) lo cual indica metinos unidos a aromático. A 4.61 ppm para el **compuesto 3** y 4.63 ppm para el **compuesto 4** se observa un singulete intercambiable con  $D_2O$ , indicativo de que se trata

de un oxhidrilo posiblemente fenólico, dado que la prueba de  $\text{FeCl}_3$  resultó positiva. En la zona de olefinas y aromáticos se observan 3 señales: la señal múltiple a 5.00 ppm del **compuesto 3** y 5.03 ppm del **compuesto 4** integra para 1 H y se asignó a un metino de olefina; la señales simples a 6.59 y 6.43 ppm del **compuesto 3** y 6.44 y 6.61 ppm del **compuesto 4** se asignaron a H aromáticos.

Los espectros  $^{13}\text{C}$  RMN de estos compuestos presentan 20 señales (Figuras 22 y 23). El análisis de los DEPT 135 de los **compuestos 3** y **4** (Figura 24) nos indica que 4 C son metilenos (señales negativas), 5 C son metilos, 6 C son metinos y el resto de los C (5) son cuaternarios.

Los desplazamientos químicos de los H y C asignados para los **compuestos 3** y **4** se presentan en las Tablas 18 y 19.

Tabla 18. Desplazamientos químicos y multiplicidad de los  $^1\text{H}$  de los **compuestos 3 y 4**, aislados de *L. trufescens*.

Hidrógeno		$\delta$ (ppm)	
		compuesto 3	compuesto 4
1	CH	3.06 (m)	3.09 (m)
2	CH <sub>2</sub>	1.51 (m)	1.53 (m)
		1.96 (m)	1.95 (m)
3	CH <sub>2</sub>	1.82 (m)	1.75 (m)
		1.88 (m)	1.88 (m)
4	CH	2.58 (m)	2.60 (m)
5	CH	6.43 (s)	6.61 (s)
7	CH	6.59 (s)	6.44 (s)
11	CH	1.91 (m)	1.91 (m)
12	CH <sub>2</sub>	1.10 (m)	1.12 (m)
		1.31 (m)	1.32 (m)
13	CH <sub>2</sub>	1.99(m)	2.05 (m)
		1.85 (m)	1.83 (m)
14	CH	5.00 (m)	5.03 (m)
16	CH <sub>3</sub>	1.67 (s)	1.69 (s)
17	CH <sub>3</sub>	1.57 (s)	1.59 (s)
18	CH <sub>3</sub>	0.97 (d)	0.99 (d)
19	CH <sub>3</sub>	2.25 (s)	2.27 (s)
20	CH <sub>3</sub>	1.21 (d)	1.23 (d)
	OH	4.61 (s)	4.63 (s)

(s): singulete, (d) doblete, (m) multiplete

Tabla 19. Desplazamientos químicos de los  $^{13}\text{C}$  de los **compuestos 3 y 4**, aislados de *L. trutescens*.

Carbono		$\delta$ (ppm)	
		compuesto 3	compuesto 4
1	CH	26.596	26.559
2	CH <sub>2</sub>	27.502	27.472
3	CH <sub>2</sub>	19.463	19.427
4	CH	42.393	42.365
5	CH	122.551	122.300
6	C	135.093	134.828
7	CH	113.216	113.251
8	C	152.970	153.009
9	C	126.148	126.381
10	C	140.991	140.812
11	CH	37.884	37.739
12	CH <sub>2</sub>	33.435	33.328
13	CH <sub>2</sub>	26.254	26.164
14	CH	124.933	124.906
15	C	131.147	130.953
16	CH <sub>3</sub>	25.704	25.593
17	CH <sub>3</sub>	17.618	17.490
18	CH <sub>3</sub>	18.732	18.635
19	CH <sub>3</sub>	21.080	20.959
20	CH <sub>3</sub>	21.181	21.127

La elucidación completa se hizo mediante el análisis de los espectros de doble dimensión COSY 45, HMBC y HMQC.

Para los **compuestos 3 y 4**, los espectros UV-Vis fueron idénticos y los espectros de  $^1\text{H}$  RMN y  $^{13}\text{C}$  RMN muy parecidos por lo que se realizó una co-cromatografía de una mezcla de ambos. En el cromatograma resultante se observan dos picos con tR de 14.634 y 14.911 min que corresponden al

**compuesto 3 y 4**, respectivamente. Lo anterior confirma que se trata de dos compuestos diferentes (Figura 14).

El análisis de todos los espectros UV-Vis, IR, EM,  $^1\text{H}$  RMN,  $^{13}\text{C}$  RMN, junto a los espectros de RMN de doble dimensión hizo posible determinar que los **compuestos 3 y 4** presentan la siguiente estructura planar (Figura 35):

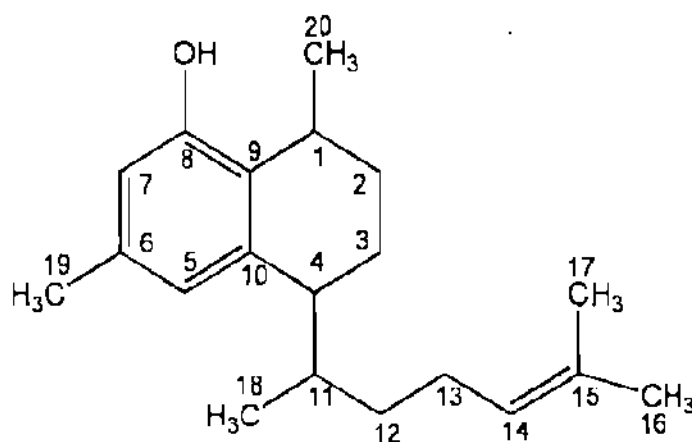


Figura 35. Estructura planar de los compuestos antiTB aislados de *L. frutescens*

Esta estructura presenta 3 carbonos quirales: C1, C4 y C11 lo que hace posible la existencia de 8 esteroisómeros. Los experimentos de determinación del poder rotatorio indicaron que ambos compuestos giran el plano de la luz polarizada a la izquierda. Los **compuestos 3 y 4** antiTB aislados de *L. frutescens* resultaron ser diasteroisómeros, característica confirmada por su separación cromatográfica al realizar la co-cromatografía en el HPLC (Figura 14).

El nombre IUPAC de los **compuestos 3 y 4** es 5-[1,5-dimetil-4-hexenil]-5,6,7,8-tetrahidro-3,8-dimetil-1-naftalenol. Estos compuestos pertenecen a los terpenoides como la mayoría de los compuestos con actividad antiTB o antimicobacterianos aislados de plantas (Cantrell CL y cols., 2001). Dentro de los diterpenos aislados de plantas con actividad antiTB tenemos a la 12-demetilcaulina aislada de *S. multicaulis* con una MIC de 0.46  $\mu\text{g/mL}$  (Ulubelen A y cols., 1997) y el mulinano aislado de *Azorella madreponica* con una MIC de 20  $\mu\text{g/mL}$  (Wachter GA y cols., 1998).

Rodriguez AD y C Ramirez en el 2001 aislaron y caracterizaron a partir del coral *Pseudopterogorgia elisabethae* Bayer, 4 diterpenos tipo serrulatanos con actividad antiTB. Uno de éstos el 7-hidroxierogorgiaeno (Figura 35) presenta estructura muy semejante a los compuestos aislados de *L. frutescens* en esta tesis; la diferencia en la estructura planar es la posición del grupo -OH en el anillo aromático (Figuras 35 y 36). Con respecto a la actividad antiTB el 7-hidroxierogorgiaeno inhibe el crecimiento *M. tuberculosis* H37Rv en un 77% a 6.25  $\mu\text{g/mL}$  y los compuestos **3 y 4** aislados de *L. frutescens* tienen una MIC 12.5  $\mu\text{g/mL}$  sobre esta misma cepa.

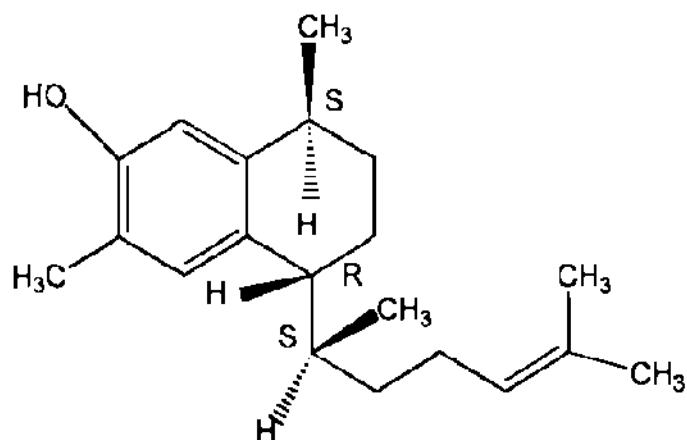


Figura 36. Estructura absoluta del 7-hidroxierogorgiaeno aislado de *P. elisabethae*.

Por otro lado, la búsqueda de reportes previos de este compuesto en la base de datos Science Finder indicó que solo está reportado el isómero 5-[(1S)-1,5-dimetil-4-hexenil]-5,6,7,8-tetrahidro-3,8-dimetil-(5R,8S)-1-naftalenol, con el número de registro CAS 433300-41-5; se le conoce también como elisabethanol (Figura 37).

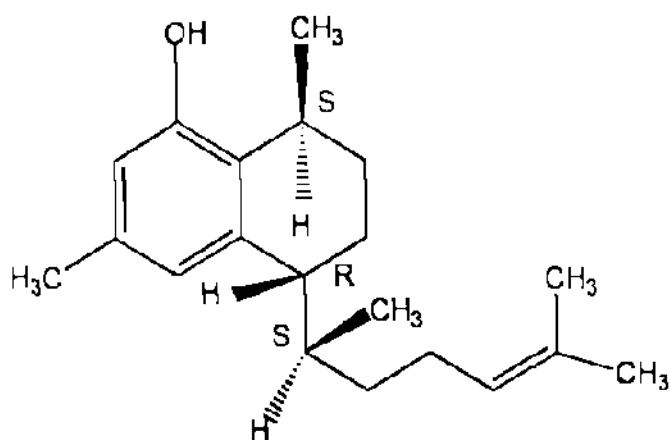


Figura 37. Estructura absoluta del elisabethanol.



Con respecto a la actividad antiTB tenemos que si bien los valores de MICs obtenidos para los **compuestos 3 y 4**, no son los que poseen los medicamentos antiTB de primera línea sobre la cepa sensible de *M. tuberculosis*, resulta muy interesante resaltar que en términos de MIC ( $\mu\text{g/mL}$ ), los **compuestos 3 y 4** son 8 y 16 veces más potentes que estreptomycin y rifampicina para la cepa MDR de *M. tuberculosis*, como se puede ver en la Tabla 16.

En base a los resultados de actividad antiTB obtenidos se decidió caracterizar si la actividad inhibitoria de estos compuestos era micobactericida o micobacteriostática, para lo cual se implementó el bioensayo antes descrito basado en la resiembra de los cultivos expuestos al "compuesto prueba" en medio de cultivo líquido libre de éste que corresponde a una dilución 1:40 y realizar un MABA posterior a la incubación. El desarrollo de este bioensayo nos permitió determinar que ambos principios activos aislados del *L. frutescens* son micobactericidas. Es interesante remarcar que los medicamentos antiTB de primera línea estreptomycin, isoniazida y rifampicina, también son bactericidas. Esta característica hace a los compuestos reportados en esta tesis más valiosos como posible agentes antiTB.

El bioensayo realizado para caracterizar la actividad antiTB como micobactericida, posee la ventaja de ser más rápido en comparación a los que realizan resiembras en medios de cultivo sólidos. Al sexto día posterior a la resiembra el crecimiento bacteriano fue adecuado en los controles de crecimiento revisados al microscopio, para lograr el viraje del indicador redox. La gran diferencia con los métodos clásicos de resiembras en medios sólidos como Lowenstein-Jensen o Middlebrook 7 H11, radica en que el crecimiento bacteriano en forma de UFC es evidente hasta después de tres semanas de incubación.

Hemos encontrado que existen solo dos reportes en la literatura sobre la caracterización de la actividad de productos naturales como micobactericida o micobacteriostática. El primero publicado por Rastogi N y cols., en 1998, quienes primeramente evaluaron la actividad contra *M. tuberculosis*, *M. avium* y *M. kansasii* de compuestos aislados de la Flora Caribeña de Guadalupe por el sistema Bactec 460 y paralelamente determinaron si la actividad de los compuestos era bactericida, por resiembra de las suspensiones bacterianas de los viales de medio Bactec 12B en Medio Middlebrook 7H11 antes y después de los experimentos de evaluación antimicobacteriana. Las UFC fueron contadas después de 21 días de incubación de las placas de agar. El segundo fue un reporte publicado por Friss-Moller y cols. en el 2002, quienes evaluaron la actividad antimiticobacteriana mediante el sistema Bactec 460 de la licochalcona A,

aislada de raíz de *Glycyrrhiza inflata* sobre varias cepas de *M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. bovis* y *M. intracellulare*. La evaluación de la actividad bactericida de licochalcona A se realizó mediante resiembras de las suspensiones bacterianas al día cero y al final del experimento en medio de cultivo Lowenstein-Jensen, los cuales se incubaron por tres semanas y posteriormente se realizó la cuenta de las UFC.

Para tener una idea preliminar del grado de toxicidad de los compuestos aislados, se evaluaron mediante el bioensayo de letalidad sobre larvas de *A. salina*. Las CL<sub>50</sub> de los **compuesto 3 y 4** aislados en este trabajo a partir de raíz de *L. frutescens* en el bioensayo de *A. salina* fueron 9.87 y 8.72 µg/mL, respectivamente. Los extractos evaluados por Logarto-Parra A y cols. en el 2001 que mostraron CL<sub>50</sub> semejantes para la larva de camarón fueron los hidroalcohólicos de *Cymbopogon citratus* (9.83 µg/mL), *Ocimum basilicum* (9.92 µg/mL) y *Senna alata* (7.74 µg/mL); para estos mismos extractos las DL<sub>50</sub> para ratón fueron 460.00, 956.50 y 1459.32 mg/kg, respectivamente; por esto se hace evidente que no existe una buena correlación entre la CL<sub>50</sub> determinada sobre *A. salina* y la DL<sub>50</sub> en ratones especialmente para estos tres extractos. El coeficiente de correlación encontrado entre CL<sub>50</sub> y DL<sub>50</sub> de los 20 extractos de las plantas cubanas evaluados fue de tan solo 0.85 (p<0.05) (prueba de Spearman's). Así nuestros resultados de toxicidad de los compuestos antiTB obtenidos mediante el bioensayo de letalidad en

larvas de *A. salina* no son determinantes. Es necesario evaluar la toxicidad de los **compuestos 3 y 4** mediante el uso tanto de ensayos *in vitro*: líneas celulares animales y humanas como ensayos *in vivo*: ratones y ratas.

## CAPÍTULO 6

### CONCLUSIONES

Tres de las 20 plantas evaluadas fueron activas sobre las cepas sensibles y MDR de *M. tuberculosis*: *L. frutescens*, *C. mexicana* y *S. molle*.

Se comprobó el uso de las tres especies vegetales en la Medicina Tradicional y específicamente de *L. frutescens* y *S. molle* para tratar TB.

Los extractos metanólicos de raíz de *L. frutescens* y etéreos de raíz de *C. mexicana* fueron los más activos (MICs de 62.50 µg/mL para ambas cepas).

Mediante el fraccionamiento biodirigido del extracto metanólico de corteza de raíz de *L. frutescens* se obtuvieron los **compuestos 3 y 4** que son 8 y 16 veces más potentes que estreptomicina y rifampicina para la cepa MDR de *M. tuberculosis*.

Los 5-[1,5-dimetil-4-hexenil]-5,6,7,8-tetrahidro-3,8-dimetil-1-naftalenoles son micobactericidas para ambas cepas.

## PERSPECTIVAS

1. Dado que se han aislado 2 compuestos bactericidas para las cepas de *M. tuberculosis* sensibles y resistentes a los 5 antiTB de primera línea, los cuales son incluso hasta 16 veces más potentes que estreptomycinina y rifampicina, entonces sería deseable realizar los estudios preclínicos para definir su eficacia y seguridad.
2. Es necesario establecer la estereoquímica absoluta de cada uno de los compuestos, con el fin de conocer la similitud y diferencias con el compuesto ya registrado, lo cual nos daría además la posibilidad de explorar el interés de la Industria Farmacéutica.
3. Durante el fraccionamiento biodirigido se obtuvieron varias fracciones cromatográficas activas que podrían contener compuestos distintos estructuralmente, los cuales valdría la pena aislar, caracterizar químicamente y realizar su evaluación antiTB.

4. Por otro lado, el extracto etéreo de raíz de *C. mexicana* mostró ser tan activo como el obtenido de raíz de *L. frutescens*, lo que justifica su estudio sistemático como una posible fuente de compuestos antiTB.



## REFERENCIAS

Aguilar Contreras A, Camacho Pulido JR, Chino Vargas S, Jacques Ríos P. **Las Plantas Medicinales del Herbario del IMSS**. Su distribución por Enfermedad. (1998). IMSS- Roche. 1ª. Ed. pp. 11-2.

Alvarez-Gordillo GC, Halperin-Frisch D, Blancarte-Melendres L, Vazquez-Castellanos JL (1995). Risk factors for antitubercular drug resistance in Chiapas, Mexico. **Salud Pub Mex** 37 (5):408-16.

Alvarez Gordillo GC, Sandoval Trujillo H, Bojalil Jaber LF (1999). Tuberculosis resistant to treatment with antitubercular drugs. A study in the state of Chiapas, Mexico. **Aten Prim** 24 (4):209-14.

Asres K, Bucar F, Edelsbrunner S, Karting T, Höger G, Thiel W. (2001). Investigations on antimycobacterial activity of some Ethiopian medicinal plants. **Phytother Res** 15 (4):323-26.

Ávila Carmona M.R., Cuellar Rodríguez L.N., Rodríguez Uribe G., Morales Cavazos R., Córdoba Ruiz J.A., Huerta González J (2000). "Estrategia 2000" Tercer Diplomado de Capacitación Gerencial 1999-2000. **Instituto Mexicano del Seguro Social**, Delegación Nuevo León. p. 75.

Becerril-Montes P, Caballero-Olín G, Navarro Marmolejo L, Flores Ibarra L, Valdovinos-Chávez SB, Luna Herrera J, Enciso-Moreno A, Torres (2004). Frequency of drug resistance to first and second line antituberculosis drugs in Mycobacterium tuberculosis strains isolated in workers attended at the Mexican Institute of Social Security in Monterrey, Mexico (**en preparación**).

Bloom BR (1994). Tuberculosis: Patogenesis, Protection and Control. **American Society for Microbiology**. ASM Press Washington D.C. p. 559.

Brix KV, Cardwell RD, Adams WJ (2003). Chronic toxicity of arsenic to the Great Salt Lake brine shrimp, *Artemia franciscana*. **Ecotoxicol Environ Saf** 54 (2):169-75.

Brundtland, GH. Overcoming Microbial Resistant. (2000). World Health Organization Report on Infectious Diseases.

Cabrera L (1996). *Tratado de plantas curativas de México*. Colección **Herbolaria y Naturismo**. Editores Mexicanos Unidos, S.A. Mexico.

Caldwell CG, Franzblau SG, Suarez W, Timmermann BN (2000). Oleanane triterpenes from *Junellia tridens*. **J Nat Prod** 63 (12):1611-4.

Cantrell CL, Lu T, Fronczek FR, Adams LB, Franzblau SG y NH Fische (1996). Antimycobacterial Cycloartranes from *Borrchia frutescens*. **Planta Med** 59 (12):1131-6.

Cantrell CL, Fischer NH, Urbatsch L, McGuire MS, SG Franzblau (1998). Antimycobacterial crude plant extracts from South, Central and North America. **Phytomedicine** 5 (2):137-45.

Cantrell CL, Nunez IS, Castaneda-Acosta J, Foroozesh FR, Fischer NH, Franzblau SG (1998). Antimycobacterial activities of dehidrocosterol lactone and its oxidation products. **J Nat Prod** 61 (10):1181-6.

Cantrell CL, Rajab MS, Franzblau SG, Fischer NH (1999). Antimycobacterial ergosterol-5,8endoperoxide from *Ajuga remota*. **Planta Med**; 65 (8):732-4.

Cantrell CL, Franzblau SG, Fischer NH (2001). Antimycobacterial plant terpenoids. **Planta Med** 67 (8):685-94.

Caviedes L, Delgado J y RH Gilman (2002). Tetrazolium microplate assay as a rapid and inexpensive colorimetric method for determination of antibiotic susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis*. **J Clin Microbiol** 40 (5):1873-4.

Cohn DL, Bustreo F, Raudione MC (1997). Drug-resistant tuberculosis: review of the worldwide situation and the WHO/IUATLD Global Surveillance Project. International Union against Tuberculosis and Lung Disease. **Clin Infect Dis** 24 S1:21-30.

Coll JC y Bowden BF (1986). The application of Vacuum Liquid Chromatography to separation of terpene mixture. **J Nat Prod** 49 (5):934-6.

Collins L, Franzblau SG (1997). Microplate Alamar blue assay versus BACTEC 460 system for high-throughput screening of compound against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium*. **Antimicrob Agents Chemother** 41 (5):1004-9.

Cooksey RC, Crawford JT, Jacobs WR y TM Shinnick (1993). A rapid method from screening antimicrobial agents. **Antimicrob Agents Chemother** 37 (6):1348-52.

Copp BR (2003). Antimycobacterial Natural Products. **Nat Prod Rep** 20, 535-57.

Delgado G, Rios MY (1991). Monoterpenes from *Chrysactinia mexicana*. **Phytochemistry** 30:3129-31.

Diario Oficial Segunda Sección del martes 31 de Octubre de 2000. Modificación a la Norma Oficial Mexicana NOM-006-SSA2-1993.

Dikshit A, Naqvi AA, Husain A (1986). *Schinus molle*: a new source of natural fungitoxicant. **Appl Environ Microbiol** 51 (5):1085-8.

Dirección de Prestaciones Médicas. Coordinación de Atención Médica. Guía Técnica Operativa de TBP en Medicina Familiar. Coordinación General de Comunicación Social del Instituto Mexicano del Seguro Social, 2001.

Dominguez XA (1979). **Fitoquímica** 1ª. Edición, México. Editorial Limusa.

Durmaz R, Ozerol IH, Durmaz B, Gunal S, Senoglu A, Evliyaoglu E (2003). Primary drug resistance and molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from patients in a population with high tuberculosis incidence in Turkey. **Microb Drug Resist** 9 (4):361-6.

EISohly HN, Danner S, Li XC, Nimrod AC, Clark AM (1999). New antimycobacterial saponin from *Colubrina retusa*. **J Nat Prod** 62 (9):1341-2.

Enarson DA, Rieder HL, Arnadottir T (2000). Management of tuberculosis. A guide for low income countries, 5 ed. Paris: **International Union against Tuberculosis and Lung Diseases**, pp. 1-89.

Encarnación-Dimayuga R, Virgen M y Ochoa N (1998). Antimicrobial activity of medicinal plants from Baja California Sur (Mexico). **Pharm Biol** 36 (1):33-43.

EPIDEMIOLOGÍA 2004, No. 2 Vol. 21 Semana 2. Secretaría de Salud México.

Fabricant DS y Farnsworth NR (2001). The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. **Environ Health Perspect** 109 Suppl 1:69-75.

Foongladda S, Roengsanthia D, Arjattanakool W, Chuchottaworn C, Chaiprasert A, Franzblau SG (2002). Rapid and simple MTT method for rifampicin and isoniazid susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. **Int J Tuberc Lung Dis** 6 (12):1118-22.

- Foroumadi A, Mirzaei M, Shafiee A (2001). Antituberculosis agents II. Evaluation of in vitro antituberculosis activity and cytotoxicity of some 2-(1-methyl-5-nitro-2-imidazolyl)-1,3,4-thiadiazole derivatives. **Farmaco** 56 (8):621-3.
- Foroumadi A, Asadipour A, Mirzaei M, Karimi J, Emami S (2002 a). Antituberculosis agents. V. Synthesis, evaluation of in vitro antituberculosis activity and cytotoxicity of some 2-(5-nitro-2-furyl)-1,3,4-thiadiazole derivatives. **Farmaco** 57 (9):765-9.
- Foroumadi A, Soltani F, Emami S, Davood A (2002 b). Antituberculosis agents. III. In vitro evaluation of antimycobacterial activity and cytotoxicity of some N-piperazinyl quinolone derivatives. **Boll Chim Farm** 141 (3):247-9.
- Foroumadi A, Soltani F, Asadipour A (2003 a). Antituberculosis agents. VII. Synthesis and in vitro evaluation of antimycobacterial activity and cytotoxicity of some N-piperazinyl quinolone derivatives. **Boll Chim Farm** 142(3):130-4.
- Foroumadi A, Soltani F, Mirzaei M (2003 b). Antituberculosis agents IV: in vitro antimycobacterial activity and cytotoxicity of N-piperazinyl quinolone derivatives containing 2-thienyl and 2-furyl moiety. **Pharmazie** 58 (5):347-8.
- Franzblau SG, Cross C. (1986). Comparative in vitro antimicrobial activity of Chinese medicinal herbs. **J Ethnopharmacol** 15 (3): 279-88.
- Franzblau SG, Witzig RS, McLaughlin JC, Torres P, Madico G, Hernandez A, Degnan MT, Cook MB, Quenzer VK, Ferguson RM, Gilman RH (1998). Rapid, low-technology MIC determination with clinical Mycobacterium tuberculosis isolates by using the microplate Alamar Blue assay. **J Clin Microbiol** 6 (2):362-6.
- Friis-Moller A, Chen M, Fursted K, Christensen SB, Kharazmi A (2002). In vitro antimycobacterial and antilegionella activity of licochalcone A from Chinese licorice roots. **Planta Med** 68 (5):416-9.
- Garcia-Garcia ML, Jimenez-Corona ME, Ponce-de-Leon A, Jimenez-Corona A, Palacios-Martinez M, Balandrano-Campos S, Ferreyra-Reyes L, Juarez-Sandino L, Sifuentes-Osornio J, Olivera-Diaz H, Valdespino-Gomez JL, Small PM (2000). Mycobacterium tuberculosis drug resistance in a suburban community in southern Mexico. **Int J Tuberc Lung Dis** 4 (12 Suppl 2):S16.
- Gibbons S, Fallah F, CW Wright (2003). Cryptolepine hydrochloride: a potent antimycobacterial alkaloid derived from *Cryptolepis sanguinolenta*. **Phytother Res** 17 (4):434-6.

Grange JM, Snell NJC (1996). Activity of bromhexanoine and ambroxol, semi-synthetic derivatives of vasicine from the Indian shrub *Adhatoda vasica*, against *Mycobacterium tuberculosis* in vitro. **J Ethnopharmacol** 50 (1):49-53.

Gu JQ, Wang Y, Franzblau SG, Montenegro G, Yang D, Timmermann BN (2004 a). Antitubercular constituents of *Valeriana laxiflora*. **Planta Med** 70 (6):509-14.

Gu JQ, Wang Y, Franzblau SG, Montenegro G, Timmermann BN (2004 b). Constituents of *Senecio chionophilus* with Potential Antitubercular Activity. **J Nat Prod** 67 (9):1483-7.

Gundidza M (1993). Antimicrobial activity of essential oil from *Schinus molle* Linn. **Centl Afr J Med** 39 (11):231-4.

Hayashi T, Nagayama K, Arisawa A, Shimizu M, Suzuki S, Yoshizaki M, Morita N, Ferro E, Basualdo I, Berganza LH (1989). Pentagalloylglucose, a xantine oxidase inhibitor from a Paraguayan crude drug, "Mollei" (*Schinus terebinthifolius*) **J Nat Prod** 52 (1):210-1.

Hlywka JJ, Beck MM, Bulleman LB (1997). The use of the chicken embryo screening test and brine shrimp (*Artemia salina*) bioassays to assess the toxicity of fusomisin B1 mycotoxin. **Food Chem Toxicol** 35 (10-11):991-9.

Houghton PJ, Woldemariam TZ, Watanabe Y y M Yates (1999). Activity against *Mycobacterium tuberculosis* of alkaloid constituents of *Angostura Bark*, *Galipea officinalis*. **Planta Med** 65 (3):250-54.

Inderlier, C.B., Nash, K.A (1996). Antimycobacterial Agents: in vitro susceptibility testing, spectra of activity, mechanisms of action and resistance, and assays for activity in biological fluids. In: **Antibiotics in Laboratory Medicine**. 4th ed. Ed: Lorian, V., Williams and Wilkins, Baltimore. pp. 127-75.

Ingólfssdóttir K, Cheng GAC, Skúlason VG, Gissuarson SR, Vilhelmsdóttir M (1998). Antimycobacterial activity of lichen metabolites in vitro. **Eur J Pharm Sci** 6 (2):141-4.

Iseman MD (1993). Treatment of multidrug-resistant tuberculosis. **N Engl J Med** 329 (11):784-91.

Jimenez-Arellanes A, Meckes M, Ramirez R, Torres J, Luna-Herrera J (2003). Activity against multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Mexican plants used to treat respiratory diseases. **Phytother Res** 17 (8):903-8.

Kittakoop P, Wanasith S, Watts P, Kramyu J, Tanticharoen M, Thebtaranonth Y (2001). Potent antiviral potamogetonyde and potamogetonol, new furanoid labdane diterpenes from *Potamogeton malaianus*. **J Nat Prod** 64 (3):385-8.

Kobaisy M, Abramowski Z, Lerner L, Saxena G, Hancock RE, Towers GH, Doxsee D, Stokes RW (1997). Antimycobacterial polyynes of Devil's Club (*Oplopanax horridus*), a North American native medicinal plant. **J Nat Prod** 60 (11):1210-3.

Kordy FN, Al-Thawadi S, Alrajhi AA (2004). Drug resistance patterns of *Mycobacterium tuberculosis* in Riyadh, Saudi Arabia. **Int J Tuberc Lung Dis** 8(8):1007-11.

Lall N, JJM Meyer (1999). In vitro inhibition of drug-resistant and drug-sensitive strains of *Mycobacterium tuberculosis* by ethnobotanically selected South African plants. **J Ethnopharmacol** 66 (3):347-54.

Lall N, JJM Meyer (2001). Inhibition of drug-sensitive and drug-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* by diospyrin, isolated from *Euclea natalensis*. **J Ethnopharmacol** 78 (2-3):213-6.

Lemus D, Martin A, Montoro E, Portaels F, Palomino JC (2004). Rapid alternative methods for detection of rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **J Antimicrob Chemother** 54 (1):130-3.

Lentz DL, Clark AM, Hufford CD, Meurer-Grimes B, PassreiterM CM, Cordero J, Ibrahimi O, Okunade AL (1998). Antimicrobial properties of Honduran medicinal plants. **J Ethnopharmacol** 63 (3):253-63.

Logarto Parra A, Silva-Yhebra R, Guerra-Sardinas I, Iglesias-Buela L (2001). Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. **Phytomedicine** 8 (5):395-400.

Lozoya X., Navarro V., Arnason J.T., Kourany E (1989). Experimental evaluation of *Mimosa tenuiflora* (Willd) poir (tepescouite). I. Screening of antimicrobial properties of barks extract. **Arch Invest Med** 20 (1):87-93.

Lozoya X., Navarro V (1992). *Solanum chrystricum*. A plant used in México for the treatment of skin mycosis. **J Ethnopharmacol** 36 (2):127-32.

Luesch H, Pangilinan R, Yoshida WY, Moore RE, Paul VL (2001). Pitepeptolides A and B, new cyclodepsipeptides from the marine cyanobacterium *Lyngbya majuscula*. **J Nat Prod** 64 (3):304-7.

Mandell GL y Petri WA. Los Fármacos antimicrobianos: fármacos usados en la quimioterapia de la tuberculosis, la enfermedad causada por el complejo *Mycobacterium avium* y la lepra. En Hardman JG, Limbird LE, Molinoff PB, Ruddon RW y Goodman Gilman A (Eds). **Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica**. 9ª. Ed. McGraw-Hill Interamericana México 1997. pp.1225-9, 1233-5.

Mangalindan GC, Talaue MT, Cruz LJ, Franzblau SG, Adams LB, Richardson AD, Ireland CM, Concepcion GP (2000). Agelasine F from a Philippine Agelas sp. sponge exhibits in vitro antituberculosis activity. **Planta Med** 66 (4):364-5.

Martínez M (1987). Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas medicinales. Fondo de Cultura Económica. México.

Matthews HB, Lucier GW, KD Fisher (1999). Medicinal Herbs in the United States: Research Needs. **Environ Health Perspect**; 107 (10):773-8.

McCutcheon AR, Strokes RW, Thorson LM, Ellis SM, Hancock REW, Towers GHN (1992). Antibiotic screening of medicinal plants of the British Colombian native peoples. **J Ethnopharmacol** 37 (3):213-23.

Morcillo N, Di Giulio B, Testani B, Pontino M, Chirico C, Dolmann A (2004). A microplate indicator-based method for determining the susceptibility of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* to antimicrobial agents. **Int J Tuberc Lung Dis** 8 (2):253-9.

Nalecz-Jawecki G, Grabinska-Sota E, Narkiewicz P (2003). The toxicity of cationics surfactants in four bioassays. **Ecotoxicol Environ Saf** 54 (1):87-91.

Navarro V, Villarreal ML, Rojas G, Lozoya X (1996). Antimicrobial evaluation of some plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of infectious diseases. **J Ethnopharmacol** 53 (3):143-7.

Newton SM, Lau C y CW Wright (2000). A review of antimycobacterial natural products. **Phytother Res** 14 (5):303-22.

Newton SM, Lau C, Gurcha SS, Besra S y CW Wright (2002). The evaluation of forty-three plants species for in vitro antimycobacterial activities; isolation of active constituents from *Psoralea corylifolia* and *Sanguinaria canadensis*. **J Ethnopharmacol** 79 (1):57-67.

Ningsanont N, Black DS, Chanphen R, Thebtaranonth Y (2003). Synthesis of ethyl 5-phenyl-6-oxa-1-azabicyclo[3.1.0]hexane-2-carboxylate derivatives and evaluation of their antimalarial activities. **J Med Chem** 46 (12):2397-403.

NJMS National Tuberculosis Center.  
<http://www.umdnj.edu/~ntbcweb/history.html>.

Nolte, F.S. y Metchock B (1995). Mycobacterium in: **Manual of Clinical Microbiology**. 6th ed. ASM. Press, Washington D.C. pp. 400-37.

O'Hara M, Kiefer MD; Farrell K, Kemper K (1998). A Review of 12 Commonly Used Medicinal Herbs. **Arch Fam Med** 7(6):523-36.

Okunade AL, Elvin-Lewis MP, Lewis WH (2004). Natural antimycobacterial metabolites: current status. **Phytochemistry** 65 (8):1017-32.

Organización Panamericana de la salud (1994). "Bulletin of Sanit Panam 116 (3):251-263.

Orme I (2001). Tuberculosis Drug Screening Program. Search for new drugs for treatment of tuberculosis. **Antimicrob Agents Chemother** 45 (7):1943-6.

Osterhage C, Koning GM, Holler U, Wrtight AD (2002). Rare sesquiterpenes from the algicolous fungus *Drechslera dematiodea*. **J Nat Prod** 65 (3):306-13.

Palmero DJ, Ambroggi M, Brea A, De Lucas M, Fulgenzi A, Martinez D, Mosca C, Musella R, Natiello M, Gonzalez C, Abbate E (2004). Treatment and follow-up of HIV-negative multidrug-resistant tuberculosis patients in an infectious diseases reference hospital, Buenos Aires, Argentina. **Int J Tuberc Lung Dis** 8 (6):778-84.

Pelka M, Danzl C, Distler W, Petschelt A (2000) A new screening test for toxicity testing of dental materials. **J Dent** 28 (5):341-5.

Peng J, Hu J-F, Kazi AB, Li Z, Avery M, Peraud O, Hill RT, Franzblau SG, Zhang F, Schinazi RF, Wirtz SS, Thamish P, Kelly M, Wahyuono S y Hamann MT (2003). Manadomanzamines A y B: A novel alkaloid ring system with potent activity against Mycobacteria and HIV-1. **J Am Chem Soc** 125 (44):13382-6.

Persoone G, Van de Vel A, Steertegem, De Nayer B (1989). Predictive value of laboratory test with aquatic invertebrates: influence of experimental conditions. **Aquatic Toxicology** 14:149-66.

Pietro RCLR, Kashima S, Sato DN, Januario AH y Franca SC (2000). In vitro antimycobacterial activities of *Physalis angulata* L. **Phytomedicine** 7 (4): 335-8.



Rajab MS, Cantrell CL, Franzblau SG, Fischer NH (1998). Antimycobacterial activity of (E)-phytol and derivatives. A preliminary structure-activity study. **Planta Med** 64 (1):2-4.

Ramaswamy SV, Dou SJ, Rendon A, Yang Z, Cave MD, Graviss EA (2004). Genotypic analysis of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Monterrey, Mexico. **J Med Microbiol**. 53 (Pt 2):107-13.

Ramírez CE, Cicero SR (1994). Lo esencial en diagnóstico y tratamiento de la tuberculosis. **Medicine**. 16: 880-86.

Rastogi N, Abaul J, Goh KS, Devallois A, Philogène E, P Bourgeois (1998). Antimycobacterial activity of chemically defined natural substances from Caribbean flora in Guadeloupe. **FEMS Immunol Med Microbiol** 20 (4):267-73.

Rates S. Plants as source of drugs (2001). **Toxicon** 39 (5):603-13.

Rattan A, Kalia A, and Ahmad N (1998). Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis*: Molecular Perspectives. **Emerg Infect Dis** 4 (2):195-209.

Raviglione MC, Snider DE Jr, Kochi A. (1995) Global epidemiology of tuberculosis: morbidity and mortality of a worldwide epidemic. **JAMA** 273 (3):220-6.

Reechaipichitkul W (2002). Multidrug-resistant tuberculosis at Srinagarind Hospital, Khon Kaen, Thailand **Southeast Asian J Trop Med Public Health** 33 (3):570-4.

Rieder H L (2002). Interventions for Tuberculosis Control and Elimination, presented in International Union Against Tuberculosis and Lung Disease. 68, Boulevard Saint Michel, 75006 Paris France. United States Centers for Disease Control and Prevention, The British Columbia Lung Association, The French Ministry of Foreign Affairs and the Norwegian Royal Ministry of Foreign Affairs. pp.5-26.

Rimando AM, Dayan FE, Mikell JR, Moraes RM (1999) Phytotoxic lignans of *Leucophyllum futescens*. **Natural toxins** 7 (1): 39-43.

Rodriguez AD, Ramirez C (2001). Serrulatane diterpenes with antimycobacterial activity isolated from the West Indian sea whip *Pseudopterogorgia elisabethae*. **J Nat Prod** 64 (1):100-2.

Rojas R, Reunión CYTED Proyecto PIBATUB en México DF marzo 2004, comunicación personal.

Rojas S, Acevedo L, Macias M, Toscano RA, Bye R, Timmermann B, Mata R (2003) Calmodulin inhibitors from *Leucophyllum ambiguum*. **J Nat Prod** 66 (2):221-4.

Ruffa MJ, Ferraro F, Wagner ML, Calcagno ML, Campos RH, Cavallaro L (2002). Cytotoxic effect of Argentine medicinal plant extracts on human hepatocellular carcinoma cell line. **J Ethnopharmacol** 79 (3): 335-9.

Ruiz P, Gutierrez J, Rodriguez-Cano F, Zerolo FJ, Casal M (2004). Activity of rifampin against *Mycobacterium tuberculosis* in a reference center. **Microb Drug Resist** 10 (3):239-42.

Said-Fernández S, Enciso JA, Torres-López J, Castro-Garza J, Navarro-Marmolejo L, Becerril-Montes P, Rojas-Alvarado MA, Caballero-Olin G, Valdez H, Flores LL, Pernas N, Valdovinos-Chávez S, Martínez-Rodríguez HG, Luna-Herrera J (2001). Epidemiología molecular de la tuberculosis pulmonar en el Norte de México. En García C, Reyes H, Viniestra L Eds. **Las múltiples facetas de la investigación en salud**. ISBN: 968-7729-14-7. Editorial Sestantes, S.A. de C.V. México DF. Pp. 201-19.

Saludes JP, Garson MJ, Franzblau SG, Aguinaldo AM (2002). Antitubercular constituents of *Morinda citrifolia* Linn (Rubiaceae). **Phytoter Res** 16 (7) 683-5.

Sarabia R, Del Rio RJ, Varo I, Diaz-Mayans J, Torreblanca A (2002). Comparing the acute response to cadmium toxicity of nauplii from different populations of *Artemia*. **Environ Toxicol Chem** 21 (2):437-44.

Seephonkai P, Isaka M, Kittakoop P, Palittapongarnpim P, Kamchonwongpaisan S, Tanticharoen M, Thebtaranonth Y (2002). Evaluation of antimycobacterial, antiplasmodial and cytotoxic activities of preussomerins isolated from the lichenicolous fungus *Microsphaeropsis* sp. BCC 3050. **Planta Med** 68 (1):45-8.

Shawar RM, Humble DJ, Van Dalfsen JM, Stover CK, Hickey MJ, Steele S, Mitscher LA, Baker W (1997). Rapid Screening of Natural Products for Antimycobacterial Activity by Using Luciferase-Expressing Strains of *Mycobacterium bovis* BCG and *Mycobacterium intracellulare*. **Antimicrob Agents and Chemother** 41 (3): 570-4.

Sifuentes-Osorio J, Ponce-de-Leon LA, Camacho-Mezquita FE, Bobadilla-del-Valle JM, Infante-Suarez ML, Ramirez-Fernandez N, Hernandez-Gomez L, Nelson AM (1995). Resistance of *Mycobacterium tuberculosis* in Mexican patients. I. Clinical features and risk factors. **Rev Invest Clin** 47 (4):273-81.

Solaja BA, Terzic N, Pocsfalvi G, Gerena L, Tinant B, Opsenica D, Milhous WK (2002). Mixed steroidal 1,2,4,5-tetraoxanes: antimalarial and antimycobacterial activity. **J Med Chem** 45 (16):3331-6.

Solis PN, Wright CW, Anderson MM, Gupta MP, Phillipson JD (1993). A microwell cytotoxicity assay using *Artemia salina* (brine shrimp). **Planta Med** 59 (3):250-2.

Suling WJ, Reynolds RC, Barrow EW, Wilson LN, Piper JR, Barrow WW (1998). Susceptibilities of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium* complex to lipophilic deazapteridine derivatives, inhibitors of dihydrofolate reductase. **J Antimicrob Chemother** 42 (6):811-5.

Sutherland I. The epidemiology of tuberculosis-is prevention better than cure? (1981). **Bull Int Union Tuberc** 56 (3-4):127-34.

Tirado-Castillo A (2004). Desarrollo de un método por CLAR-EM para la identificación de componentes de extractos de plantas biológicamente activos. **Tesis de Maestría**, Facultad de Medicina, UANL.

Topcu G, Ramazan E, Osman C, Johansson CB, Celik C, Chai H-B, Pezzuto JM (1999). Diterpenes from the berries of *Juniperus excelsa*. **Phytochemistry** 50 (7):1195-9.

Tosun F, Kizilay CA, Sener B, Vural M, Palittapongarnpim P (2004). Antimycobacterial screening of some Turkish plants. **J Ethnopharmacol** 95 (2-3):273-5.

Ulubelen A, Topcu G, Johansson CB (1997). Norditerpenoids and diterpenoids from *Salvia multicaulis* with antituberculous activity. **J Nat Prod** 60 (12):1275-80.

University of Connecticut: [www.eeb.uconn.edu/acc\\_num/198501464.html](http://www.eeb.uconn.edu/acc_num/198501464.html)

USDA: [http://plants.usda.gov/classification/output\\_report.cgi?LEFR3](http://plants.usda.gov/classification/output_report.cgi?LEFR3)

Vongvanich N, Kittakoop P, Isaka M, Trakulnaleamsai S, Vimutipong S, Tanticharoen M, Thebtaranonth Y (2002) Hirsutellide A, a new antimycobacterial cyclohexadepsipeptide from the entomopathogenic fungus *Hirsutella kobayasii*. **J Nat Prod** 65 (9):1346-8.

Wachter GA, Franzblau SG, Montenegro G, Suarez E, Fortunato RH, Saavedra E, Timmermann BN (1998). A new antitubercular mulinane diterpenoid from *Azorella madreporica* Clos. **J Nat Prod** 61 (7):965-8.

Wachter GA, Franzblau SG, Montenegro G, Hoffmann JJ, Maiese WM, Timmermann BN (2001). Inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* growth by saringosterol from *Lessonia nigrescens*. **J Nat Prod** 64 (11):1463-4.

WHO (1997). Treatment of tuberculosis: guidelines for national programs. Second edition Geneva: WHO. WHO/TB/97.220:1-66.

WHO Report (2002). Global tuberculosis control. Surveillance, Planning Financing. <http://www.who.int/gtb/publications/globrep02/downloadpage.html>

Woldemichael GM, Gutierrez-Lugo MT, Franzblau SG, Wang Y, Suarez E, Timmermann BN (2004). *Mycobacterium tuberculosis* growth inhibition by constituents of *Sapium haematospermum*. **J Nat Prod** 67 (4):598-603.

Xie JP, Yue J, Xiong YL, Wang WY, Yu SQ, Wang HH (2003). In vitro activities of small peptides from snake venom against clinical isolates of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. **Inter J Antimicrob Agents** 22 (2):172-4.

Yang ZH, Rendon A, Flores A, Medina R, Ijaz K, Llica J, Eisenach KD, Bates JH, Villarreal A, Cave MD (2001). A clinic-based molecular epidemiologic study of tuberculosis in Monterrey, Mexico. **Inter J Tuber Lung Dis** 5 (4):313-20.

Yuequin Z, Recio MC, Manez S, Giner RM, Cerda-Nicolas M, Rios JL (2003). Isolation of two triterpenoids and biflavone with anti-inflammatory activity from *Schinus molle* fruits. **Planta Med** 69 (10):893-8.

Zarranz B, Jaso A, Aldana I, Monge A (2003). Synthesis and antimycobacterial activity of new quinoxaline-2-carboxamide 1,4-di-N-oxide derivatives. **Bioorg Med Chem** 11 (10):2149-56.

# RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

**Gloria María Molina-Salinas**

**Candidata para el grado de Doctor en Ciencias  
con Especialidad en Química Biomédica**

**Título de la Tesis: Aislamiento y caracterización de compuestos con actividad bactericida y/o bacteriostática de plantas del Noreste de México sobre cepas de *Mycobacterium tuberculosis* sensibles y multidrogosresistentes**

**Área de Estudio: Química Biomédica**

## **Biografía:**

**Datos Personales:** Nacida el 30 de Abril de 1970 en Monterrey N.L.; hija del Sr. Elio Molina Salinas y la Sra. Domy Salinas Garcia de Molina.

## **Escolaridad:**

- Obtención del Título de Licenciatura de Químico Clínico Biólogo, en la Facultad de Medicina-UANL (1992).
- Obtención del grado de Maestría en Ciencias con Especialidad en Química Analítica Biomédica, en la Facultad de Medicina-UANL (1998).

## **Experiencia Profesional:**

- Químico del Laboratorio de Patología Clínica del Hospital Universitario-UANL, de Febrero de 1993 a Agosto de 1994.
- Químico del Laboratorio de la Clínica de Servicios Médicos-UANL, de Agosto de 1993 a Agosto 1994.
- Profesor Asociado A de la Cátedra de Bioquímica de la Facultad de Odontología-UANL, de Agosto de 1996 a Agosto del 2003.
- Profesor Invitado de la Cátedra de Bioquímica del Ejercicio de la Maestría en Ciencias del Ejercicio de la Facultad de Organización Deportiva-UANL, desde Agosto de 1998.
- Técnico en Investigación del Centro de Investigación Biomédica del Noreste del Instituto Mexicano del Seguro Social, desde Septiembre de 1997.



OFFICE OF THE DIRECTOR

