

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE COMPUESTOS DERIVADOS
DE PLANTAS DE LA FAMILIA JUGLANDACEAE CON EFECTO
ANTIMICROBIANO SOBRE *Mycobacterium tuberculosis***

POR:

Q.B.P. MARTHA PATRICIA RODRÍGUEZ MAGAÑA

**COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS CON ACENTUACIÓN EN
QUÍMICA DE PRODUCTOS NATURALES**

**SAN NICOLAS DE LOS GARZA, N. L. MÉXICO
NOVIEMBRE DEL 2011**

DEDICATORIA

A José Octavio y Alejandro por ser mi motor y mi ancla, gracias por todo su amor, comprensión y paciencia.

A mis padres que siempre confiaron en mí.

A mi hermana Claudia y mi cuñado Juan por todo su cariño.

A mis sobrinos José Juan y Andrew Lee que con sus sonrisas alegran mis días.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Azucena Oranday por darme la oportunidad de realizar este proyecto a su lado, por todo su apoyo y confianza.

A la Dra. María Julia Verde y la Dra. Catalina Rivas por permitirme, por segunda ocasión, ser su alumna y seguir aprendiendo de ellas.

Al Dr. Ricardo Gómez Flores por una amistad renovada y su apoyo incondicional.

Al Dr. Ramiro Quintanilla Licea por compartir sus conocimientos y su tiempo conmigo.

Al M.C. Raúl Zárate porque sin su insistencia no hubiera logrado esto.

Al M.C. Sergio García que fue mi guía, por todas sus enseñanzas, sus consejos, sugerencias y los tacos de cabeza.

A mis entrañables amigos y compañeros de la Preparatoria 15 que siempre me apoyaron incondicionalmente, los extraño.

A mis nuevos amigos y compañeros de maestría que me aceptaron en su grupo y por sus palabras de aliento.

A todos y cada uno de aquellos que de alguna manera contribuyeron con este trabajo.....

¡¡ Muchas Gracias !!

ÍNDICE

	Pág.
Resumen	1
Abstract	2
1.- INTRODUCCIÓN	3
2.- HIPÓTESIS	6
3.- OBJETIVOS	7
3.1 Objetivo General	7
3.2 Objetivos Particulares	7
4.- ANTECEDENTES	8
4.1 Tuberculosis pulmonar (TB)	8
4.1.1 Historia	8
4.1.2 Etiología	11
4.1.3 Patogenia	14
4.1.4 Tratamiento	19
4.2 Plantas que han sido activas contra <i>M. tuberculosis</i>	22
5.- METODOLOGÍA	27
5.1 Material biológico	27
5.1.1 <i>Juglans regia</i> L.	27
5.1.1.1 Descripción botánica	27
5.1.2 <i>Juglans mollis</i>	29
5.1.2.1 Descripción botánica	29
5.2 Recolección del material vegetal	31
5.3 Obtención de extractos	31
5.4 Pruebas de identificación parcial de compuestos químicos	31
5.5 Métodos cromatográficos	35
5.5.1 Cromatografía en capa fina	35
5.5.2 Cromatografía preparativa en capa fina	36
5.5.3 Agentes cromogénicos	37
5.6 Evaluación de la actividad tóxica	37

5.6.1 Determinación de la actividad de los extractos sobre <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv	38
5.6.2 Determinación de la concentración mínima inhibitoria	38
6.- RESULTADOS	40
6.1 Recolección y clasificación de material vegetal	40
6.2 Rendimiento de los procesos de extracción	40
6.3 Identificación de grupos y metabolitos secundarios en extractos crudos	41
6.3.1 Reacciones coloridas	41
6.3.2 Cromatografía de gases acoplada a espectro de masas	42
6.4 Evaluación de la actividad tóxica	47
6.5 Determinación de la concentración mínima inhibitoria sobre <i>M. tuberculosis</i>	47
6.6 Métodos cromatográficos	48
6.6.1 Fracciones obtenidas del extracto hexánico de <i>J. mollis</i>	51
7.- DISCUSIÓN	59
8.- CONCLUSIÓN	63
9.- LITERATURA CITADA	64

LISTA DE FIGURAS

No. Figura	Nombre	Pág.
1	Evolución de la tuberculosis	8
2	Giba de pott	9
3	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	11
4	Pared celular de <i>M. tuberculosis</i>	12
5	Factor cordón de <i>M. tuberculosis</i>	13
6	Transmisión de la tuberculosis	14
7	Macrófago alveolar	15
8	Cavernas tuberculosas	17
9	Distribución de la tuberculosis a nivel mundial 2009	18
10	Tratamiento de primera línea	20
11	Árbol, fruto y corteza de <i>Juglans regia</i>	28
12	Corteza, árbol y frutos de <i>Juglans mollis</i>	30
13	Cromatografía en capa fina	36
14	Cromatografía preparativa en placa fina	37
15	Cromatograma del extracto crudo de <i>J. regia</i>	43
16	Cromatograma del extracto clorofórmico de corteza de <i>J. mollis</i>	44
17	Cromatograma de extracto clorofórmico de hojas de <i>J. mollis</i>	45
18	Cromatograma del extracto hexánico de hojas de <i>J. mollis</i>	46
19	Cromatografía comparativa del estándar de ácido ursólico y el extracto de <i>J. mollis</i>	49
20	Cromatografía comparativa entre ácido ursólico y el extracto de <i>J. regia</i>	49
21	Cromatograma de la fracción 1 del extracto hexánico de corteza de <i>J. mollis</i>	51
22	Stigmastane-3,6-dione	52
23	4-stigmasten-3-one	53
24	Cromatograma de la fracción 2 del extracto hexánico de corteza de <i>J. mollis</i>	54
25	Ácido betulínico	55
26	Ácido ursólico	56
27	Ácido oleanólico	57
28	Cromatograma de la fracción 3 del extracto hexánico de corteza de <i>J. mollis</i>	58

LISTA DE TABLAS

Tabla No.		Pág.
1	Porcentaje de rendimiento de extractos hexánicos	40
2	Grupos químicos presentes en <i>J. mollis</i>	41
3	Grupos químicos presentes en <i>J. regia</i>	42
4	Metabolitos presentes en corteza de <i>J. regia</i>	42
5	Metabolitos presentes en corteza y hojas de <i>J. mollis</i>	44
6	Viabilidad para <i>J. mollis</i> sobre <i>A. salina</i>	47
7	Viabilidad para <i>J. regia</i> sobre <i>A. salina</i>	47
8	CMI de los extractos hexánicos de <i>J. regia</i> y <i>J. mollis</i> sobre <i>M. tuberculosis</i>	48

R E S U M E N

La tuberculosis pulmonar (TB) fue declarada una emergencia global desde 1993 por la Organización Mundial de la Salud. Se han estimado 1.7 millones de defunciones y 9.4 millones de nuevos casos en 2009 por TB. Debido a la incidencia de esta enfermedad y a la resistencia que ha manifestado a los diversos fármacos, es prioritaria la búsqueda de nuevas alternativas para su tratamiento. El objetivo de este trabajo fue separar e identificar los compuestos de los extractos de *Juglans mollis* y *J. regia* previamente evaluados sobre *Mycobacterium tuberculosis*, además de determinar su toxicidad mediante el ensayo de letalidad sobre *Artemia salina*. En los extractos hexánicos de ambas especies se presentó la mayor actividad y se identificó la presencia principalmente de esteroides y triterpenos por medio de reacciones coloridas y con un cromatógrafo de gases acoplado a espectro de masas HP 19091J-433 (Hewlett Packard, Avondale, PA). En el ensayo de letalidad de *A. salina*, ambos extractos presentaron una CL_{50} mayor de 1000 ppm lo que indica, que no presentan toxicidad. El extracto de *J. mollis* fue separado por cromatografía en capa delgada (CCD) y en CCD preparativa, se obtuvieron tres fracciones, la número 1 con un $R_f = 0.57$, la 2 con $R_f = 0.33$ y la 3 con $R_f = 0.31$, éstas se purificaron y se analizaron en el equipo mencionado, la fracción No. 3 no fue identificada; la No. 2 corresponde a tres triterpenos: ácido betulínico, ácido oleanólico y ácido ursólico, los cuales son isómeros estructurales por lo que es difícil separarlos, esta mezcla de compuestos se ha reportado en otras plantas, con una actividad relevante contra *M. tuberculosis*; la fracción No. 1 presentó actividad contra *M. tuberculosis* a una concentración de 500 $\mu\text{g/ml}$ y en ella se identificaron: 4-stigmasten-3-ona y stigamstan-3,6-diona, compuestos que no han sido reportados con esta actividad. Estos resultados nos indican que la corteza de *J. mollis*, contiene compuestos con actividad contra *M. tuberculosis* con probable sinergismo entre ellos y con este estudio validamos el uso tradicional de la corteza de nogal contra la tuberculosis.

A B S T R A C T

Pulmonary tuberculosis (TB) was declared a global emergency in 1993 by the World Health Organization. We estimated 1.7 million deaths and 9.4 million new TB cases in 2009. Because the incidence of this disease and has shown resistance to several drugs, priority is the search for new alternatives for treatment. The aim of this study was to separate and identify compounds from extracts of *Juglans mollis* and *J. regia* who were assessed for *Mycobacterium tuberculosis* previously and to determine their toxicity by testing of *Artemia salina* lethality. In hexane extracts of both species were those with higher activity, were identified sterols and triterpenes mainly through reactions with colorful and a gas chromatograph coupled to mass spectrum 19091J-433 HP (Hewlett Packard, Avondale, PA). In the study of mortality of *A. salina*, both extracts showed an LC₅₀ greater than 1000 ppm indicating do not exhibit toxicity. The extract of *J. mollis* was separated by thin layer chromatography (TLC) and TLC preparative three fractions were obtained, the number 1 with an R_f = 0.57, the 2 with R_f = 0.33 and 3 with R_f = 0.31, they were purified and analyzed equipment mentioned, in the fraction No. 3 was not identified, the No. 2 corresponds to three triterpenes: betulinic acid, oleanolic acid and ursolic acid, which are structural isomers and it is difficult to separate, this mixture of compounds has been reported in other plants, with significant activity against *M. tuberculosis*; fraction No. 1 had activity against *M. tuberculosis* at a concentration of 500 µg / ml and in it were identified: 4 - stigmasten-3-one and stigamstan-3 ,6-dione compounds have been reported with this activity. These results indicate that the bark of *J. mollis*, containing compounds with activity against *M. tuberculosis* with probable synergism between them and this study validated the traditional use of bark walnut against tuberculosis.

1.-INTRODUCCIÓN

Desde tiempos antiguos la naturaleza ha sido la fuente de recursos más valiosa que el ser humano ha tenido a su disposición, le ha proporcionado no solo alimento sino que además, le ha ayudado a recuperar o mantener su salud. En la actualidad, la medicina moderna ha logrado combatir, con eficiencia, numerosas enfermedades que antes eran incurables e incluso mortales, principalmente infecciones que fueron controladas gracias al empleo de las sulfamidas, productos de microorganismos o sus derivados sintéticos como es el caso de los antibióticos tradicionales, y otros compuestos químicos (Cowan, 1999). Existe un interés creciente en nuestros días por la etnobotánica como alternativa terapéutica, ya que en las plantas se hallan principios activos biológicamente equilibrados en sustancias complejas y complementarias, que se potencian entre sí. Los etnobotánicos están actualmente librando una batalla contra el tiempo para recoger esta información antes de que se pierda con la presente generación y con ello, posibles atajos para llegar a descubrir algunas plantas medicinales (Trease, 1987).

Se estima entre 250,000 y 500,000 el número de especies de plantas en el planeta, distribuidas cuando menos en unas 300 familias y 10,500 géneros, de las cuales un pequeño porcentaje, aproximadamente un poco más del 10% son utilizadas con propósitos medicinales (Cowan, 1999). México es uno de los países que presenta una mayor diversidad biológica en el mundo, con aproximadamente 30,000 especies de plantas, lo cual representa un 10% de la flora mundial. De las especies de plantas presentes en México, menos de 5,000 especies han sido estudiadas fitoquímicamente, en 3,000 especies se han encontrado propiedades medicinales y a un número aún menor, se le han realizado estudios biológicos o farmacológicos (CONABIO, 2002). Aunque muchos de los usos estén restringidos a determinadas

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

Recientemente, la medicina tradicional ha sido aceptada como forma alternativa en el cuidado de la salud así como para el descubrimiento y desarrollo de nuevos compuestos para el tratamiento de infecciones causadas por microorganismos con resistencia a los antibióticos. Lo anterior ha llevado a muchos investigadores a la búsqueda de actividad antimicrobiana en plantas medicinales (Nostro, 2000).

Las plantas medicinales y sus productos han sido utilizados a lo largo de la historia contra la tuberculosis, enfermedad infecciosa causada principalmente por *Mycobacterium tuberculosis*. Cuando es positiva a la baciloscopía, es la forma más contagiosa (OPS, 1993). La tuberculosis pulmonar es considerada como una enfermedad infecciosa re-emergente y un problema de salud pública mundial, se estima que es la enfermedad que causa más muertes que cualquier otra enfermedad infecciosa curable y fue declarada una emergencia global desde 1993 por la Organización Mundial de la Salud (WHO, 2003). Se han estimado 1.7 millones de defunciones y 9.4 millones de nuevos casos de tuberculosis pulmonar en 2009 (WHO, 2010).

En la actualidad la OMS señala algunas prioridades para el control de la tuberculosis pulmonar, en la que sobresalen: 1) la búsqueda y desarrollo de nuevos fármacos, 2) mejorar los esquemas de tratamiento, 3) acortar la duración total de los mismos y, 4) ofrecer tratamiento contra cepas MDR-TB (WHO, 2003).

Como *M. tuberculosis* crece como un organismo intracelular que sobrevive y se multiplica dentro de los macrófagos y otras células del sistema retículo endotelial de pacientes infectados, dentro de las células, los bacilos pueden encontrar un medio adecuado para su crecimiento evadiendo los mecanismos inmunes antimicrobianos, por lo que es importante encontrar

futuros agentes antituberculosos que sean efectivos contra *M. tuberculosis*, y que presenten baja citotoxicidad.

2.-HIPÓTESIS

Los compuestos contenidos en los extractos de la corteza de *Juglans regia* y *J. mollis* presentan actividad contra *Mycobacterium tuberculosis* y no presentan toxicidad.

3.-OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

Aislar y caracterizar compuestos derivados de *Juglans regia* y *J. mollis* con efecto sobre *Mycobacterium tuberculosis*.

3.2 Objetivos Particulares

- ✿ Obtener extractos hexánicos de *Juglans regia* y *J. mollis* a partir de hojas y corteza.

- ✿ Identificar parcialmente los grupos químicos y metabolitos secundarios presentes en los extractos crudos mediante pruebas coloridas y CG/MS.

- ✿ Separar por métodos cromatográficos los extractos obtenidos.

- ✿ Determinar la actividad sobre *M. tuberculosis* de las fracciones obtenidas

- ✿ Evaluar la toxicidad de los extractos y fracciones activas sobre *Artemia salina*.

- ✿ Caracterizar la o las fracciones activas.

4.- ANTECEDENTES

4.1. Tuberculosis pulmonar (TB)

4.1.1 Historia

La historia de la tuberculosis en el siglo XXI, es nada más, el último capítulo de una historia prolongada y trascendental del impacto que ha tenido una bacteria sobre el género humano. Es por ello que debemos considerar esta enfermedad como parte integral de la historia de la medicina. Se acepta que el microorganismo que la origina evolucionó de otros microorganismos más primitivos dentro del propio género.

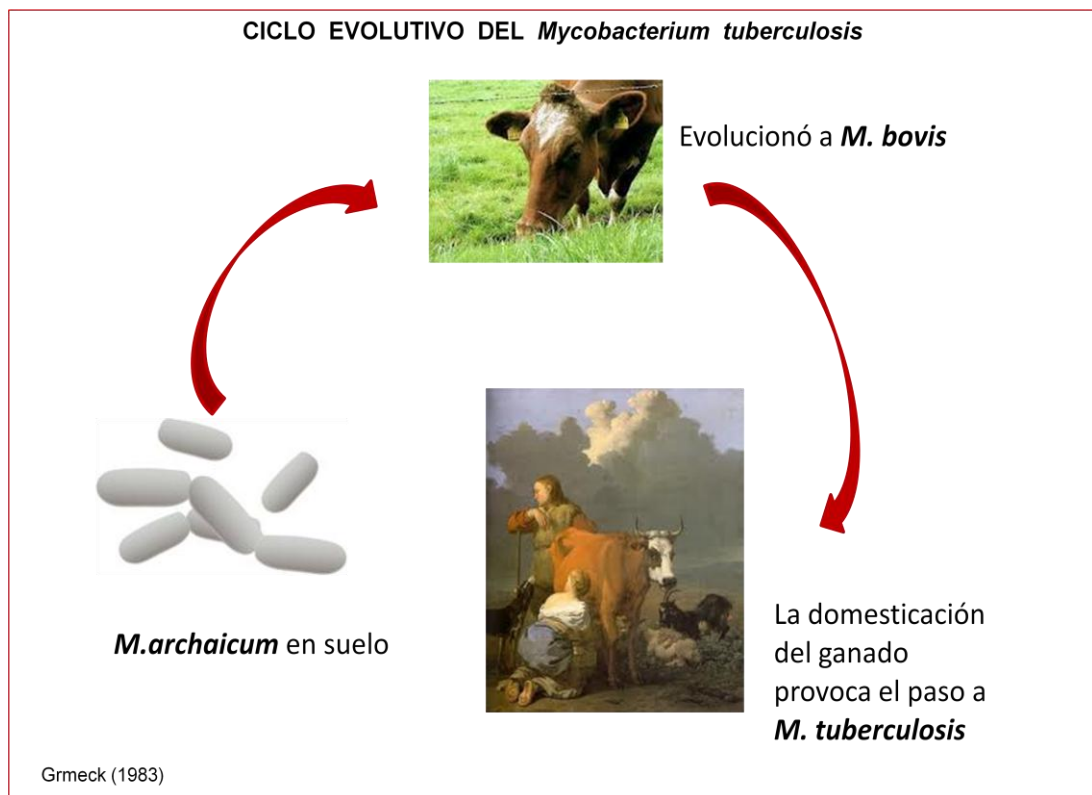


Fig. 1 Evolución de la tuberculosis

Se cree que en algún momento de la evolución, alguna especie de micobacteria saltó la barrera biológica por presión selectiva, y pasó a tener un reservorio en animales. Esto, posiblemente, dio lugar a un primer espécimen del *Mycobacterium bovis*, que es la más aceptada por la mayoría

como la más antigua de las especies que integran el denominado complejo *M. tuberculosis*. La siguiente etapa es el paso del *M. bovis* a la especie humana, coincidiendo con la domesticación de los animales por parte del hombre cuando empezó a vivir en grupos sociales (Fig. 1).

Se han encontrado lesiones raquídeas características de la tuberculosis en restos humanos del período neolítico (alrededor de 5 000 años A. C.); las figurillas de barro y las pinturas en las tumbas egipcias ponen de manifiesto la formación clásica de la giba de la enfermedad de Pott (Fig. 2).

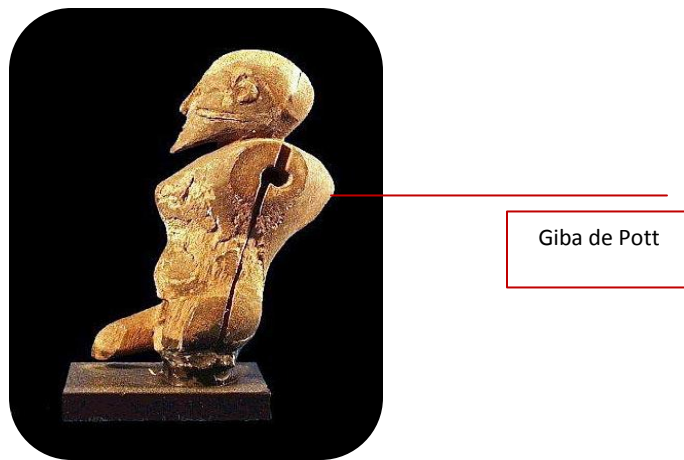


Fig. 2 Giba de Pott

Los primeros escritos sugerentes de tuberculosis proceden de la India, de cerca de 700 años A. C. y describen una enfermedad pulmonar crónica caracterizada por consunción. Aproximadamente en el año 380 A. C. Hipócrates efectuó una descripción detallada de un trastorno pulmonar llamado “tisis” que en términos literales significa “fundirse o derretirse”. Aristóteles, al observar que los contactos estrechos de los pacientes con tisis tendían a desarrollar la enfermedad, sugirió que era causada por alguna sustancia productora de la misma exhalada hacia el aire en el aliento del paciente, muchos autores griegos la creían hereditaria.

El médico griego Galeno, siglo II D. C., describió principios del tratamiento contra esta enfermedad que no se modificaron durante el siguiente milenio: reposo, eliminación de la tos, emplastos sobre el tórax, astringentes para la hemorragia (gargarismos de ácido tánico mezclado con miel), opio para la tos violenta e insistencia sobre la dieta. En 1839, Johann Schölein sugirió por primera vez el nombre de *tuberculosis*.

Basándose en los trabajos de Antoine Villemin (1869) que demostró que esta enfermedad se puede contagiar; Robert Koch, en 1882, empleando un novedoso método de tinción, describe por primera vez el agente causal de esta enfermedad: el *Mycobacterium tuberculosis*, o bacilo de Koch, en su honor. Siendo él el autor de la primera tuberculina obtenida a partir de extractos bacilares. En 1921 Albert Calmette y Camille Guérin producen la vacuna contra la tuberculosis conocida como BCG (Biliado de Calmette-Guérin), empleando una variante atenuada del *M. bovis*.

En los decenios de 1920 y de 1930, se puso cada vez más en claro que la ciencia creciente de microbiología permitiría el desarrollo de fármacos eficaces contra los agentes patógenos humanos. Como la tuberculosis se consideraba la infección de mayor importancia en esa época, entablaron una carrera los laboratorios de investigación de las universidades y los de las compañías farmacéuticas del mundo para desarrollar una farmacoterapia eficaz contra esta enfermedad. Entre 1940 y 1950, se descubrieron la mayoría de los fármacos antituberculosos conocidos hasta el momento, lo que prácticamente disminuyó la prevalencia de la enfermedad, con lo que se tuvo de nuevo la impresión de que se había ganado la batalla contra la tuberculosis. Empezaron a surgir esperanzas de que pronto se relegaría esta enfermedad a los libros de historia, y que ocuparía un lugar junto a la viruela como otro azote más de la humanidad que se había eliminado de la tierra. Sin embargo, las primeras lecciones se olvidaron, o incluso nunca se aprendieron. El fracaso para lograr que los pacientes terminaran el tratamiento; la migración a las grandes ciudades, el hacinamiento, la

malnutrición, y la aparición del virus de la Inmuno Deficiencia Humana (VIH) empeoró la situación, debido a que los pacientes con serología positiva para este virus, a menudo sufren infecciones diseminadas por *M. tuberculosis* o por *M. avium* (una micobacteria patógena oportunista) constituyendo una causa frecuente de muerte. El resurgimiento de la TB en países industrializados a mediados de los 80 y la aparición de cepas multirresistentes a los fármacos tradicionalmente empleados, demostró que, lejos de estar terminada, la batalla comenzaba nuevamente y que era necesario iniciar la búsqueda de nuevos compuestos con acciones antimicrobacterianas en plantas medicinales.

4.1.2. Etiología

Roberto Koch en 1882 describió a *M. tuberculosis* como el agente causal de la tuberculosis. El género *Mycobacterium* es el único que pertenece a la familia *Mycobacteriaceae* y al orden *Actinomycetales*.



Fig. 3 *Mycobacterium tuberculosis*

Es una bacteria resistente a ácidos y álcalis por la compleja estructura hidrofóbica presente en su pared gruesa y con un elevado contenido lipídico que supone el 60 % del peso seco de la misma. Su morfología característica suele ser bacilar, ligeramente curvos, son inmóviles, no esporulados, y no poseen flagelos ni cápsula, miden de 1 a 10 μm de longitud y 0.2 a 0.6 μm de ancho (Fig. 3). Forma colonias blancas cremosas, esféricas, opacas y polimorfos, de crecimiento lento, observándose desarrollo entre 3 y 5 semanas. El bacilo de la tuberculosis es aerobio estricto y su crecimiento es favorecido con una atmósfera del 5 – 10% de CO_2 , con temperatura óptima de 37°C (Wayne, 1994).

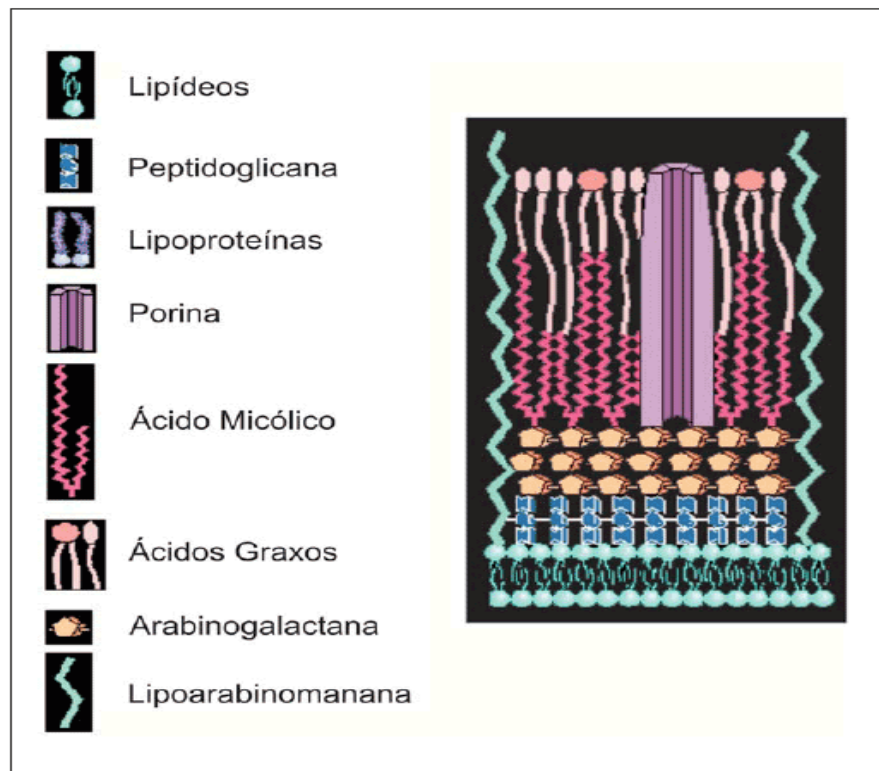


Fig. 4 Pared celular de *M. tuberculosis*

Es un patógeno intracelular facultativo que tiene la habilidad de persistir dentro de los macrófagos y otras células del sistema retículo endotelial (SER). *M. tuberculosis* al igual que los miembros de este género presentan

una estructura de la pared poco común (Fig. 4). El complejo de la pared celular consta de tres capas: 1) capa interna, constituida por el peptidoglicano con moléculas de N-actilglucosamina y ácido N-glucolilmurámico, esta capa da rigidez y forma a la bacteria, 2) capa media, compuesta por el arabinogalactano, en cuyos extremos distales están esterificados los ácidos micólicos, de tamaño y estructura única para las micobacterias, y 3) capa externa, a la cual se le atribuye una estructura glucolípida sulfatada, está formada por lípidos como el *cord factor* (trehalosa 6,6'-dimicolato)(Fig. 5) y por mucósidos.

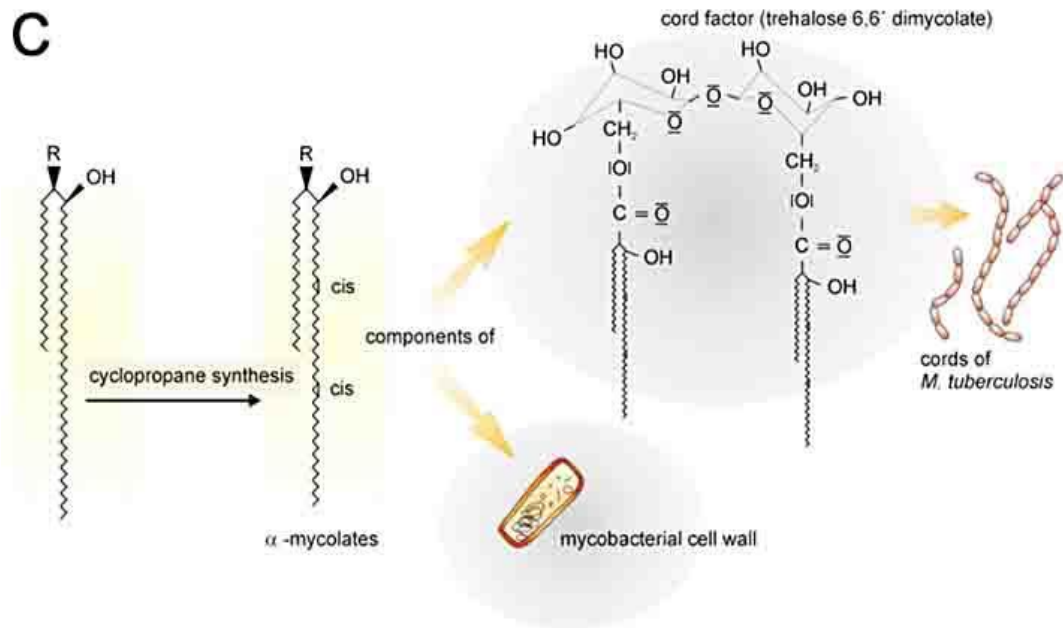


Fig. 5 Factor Cordón de *M. tuberculosis*

La membrana plasmática aparece en secciones ultra finas como una membrana trilaminar clásica, con dos capas electrodensas separadas por una capa transparente, (lo que les permite sobrevivir durante semanas o meses en el medio ambiente, tanto en superficies de objetos inanimados como en el suelo o el presentando algunos componentes distintivos como lipopolisacáridos, lipoarabinomanano (LAM), lipomananos y fosfatidil inositol-

monosidos. Por esta razón sus células presentan una superficie cerosa externa que le confiere propiedades importantes como resistencia a muchos antibióticos y protección contra ambientes adversos como la desecación y la congelación (lo que les permite sobrevivir durante semanas o meses en el medio ambiente, tanto en superficies de objetos inanimados como en el suelo o el estiércol), así como de la característica ácido-alcohol resistente con determinadas tinciones para su visualización microscópica (Brennan *et al.*, 1994). Sin embargo, deben permanecer al abrigo de la luz del sol, ya que los rayos ultravioleta son letales para los mismos. También, el calor (pasteurización) y determinados productos como el óxido de etileno, formaldehído, etanol 70%, glutaraldehído 2%, ácido peracético ó peróxido de hidrógeno estabilizado, entre otros, son eficaces contra esta bacteria (Alcaide, 2005).

4.1.3 PATOGENIA

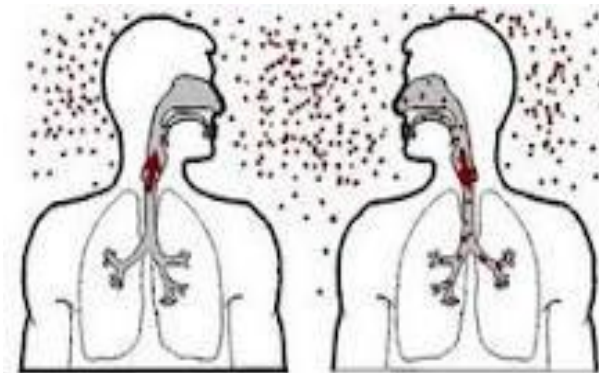


Fig. 6 Transmisión de la tuberculosis

La infección inicial por el *M. tuberculosis*, se transmite de persona a persona por el aire, mediante la inhalación de microgotas que contienen el bacilo, las cuales son diseminadas en el medio ambiente cuando una persona enferma

tose, estornuda, canta o incluso cuando respira (Fig. 6) (Edwards *et al.*, 1986; Bloom, 1994). Como *M. tuberculosis* no contiene enzimas que le permitan penetrar por el moco, los microorganismos deben encontrarse en partículas de tamaño suficientemente pequeño (menos de 5 μm), para penetrar en la zona alveolar, sitio en el que no hay moco. Una persona infectada puede permanecer así por muchos años, sin desarrollar la enfermedad y la única evidencia de un contacto previo con el bacilo o de infección, es la prueba positiva a la tuberculina. La infectividad está relacionada a ciertas características de la persona, a los factores ambientales específicos tales como una pobre circulación de aire, así como también el número de microorganismos requeridos para infectar a una persona, el cual se ha estimado en menos de diez bacilos (Bloom, 1994). El bacilo inhalado llega al árbol bronquial y se implanta en los bronquios respiratorios o en el alveolo, y en una primera etapa, un macrófago alveolar (MA) ingiere el bacilo inhalado y a menudo lo destruye (Fig. 7) (Kaufmann., 2002).



Fig. 7 Macrófago Alveolar

M. tuberculosis es capaz de sobrevivir dentro de los macrófagos, debido a que el bacilo inhibe la fusión de los lisosomas con las vacuolas fagocíticas, además de inhibir directamente los genes que codifican para el IFN- γ , ocasionando que los macrófagos no se activen, logrando así su supervivencia y multiplicación dentro de los macrófagos (Ting LM *et al.*, 1999). Posteriormente, los bacilos son ingeridos por otros MA y por macrófagos provenientes de la sangre, desarrollándose así la segunda etapa, en la que ni los macrófagos del hospedero, ni los bacilos se causan daño (Fenton *et al.*, 1996). Después de 6 a 8 semanas de la infección, se afectan los ganglios regionales y se activan las células TCD 4+, secretando IFN- γ , que activa a los macrófagos y aumenta su capacidad para matar a las bacterias fagocitadas (Robbins, 2004). El factor de necrosis total (TNF) producido por las células T y los macrófagos, atrae a los monocitos de la circulación, activándolos y diferenciándolos hacia los histiocitos epitelioides, característicos de la respuesta granulomatosa, además de producir la activación de macrófagos (Abbas, 1999; Robbins, 2004).

La necrosis caseosa se inicia a través de una reacción de hipersensibilidad de tipo tardío (HTT), el cual es un mecanismo mediante el cual se destruyen los macrófagos no activados cargados de bacilos, y elimina un ambiente favorable para el crecimiento del bacilo, pero ocurre a costa del tejido del hospedero, correspondiendo a una tercera etapa (Rossman *et al.*, 1996; Robbins, 2004). Mientras se lleva a cabo la HTT, el organismo desarrolla la inmunidad mediada por células (IMC), la cual se caracteriza por la producción de citocinas que atraen a los monocitos/macrófagos hacia la lesión y los activa. Los macrófagos activados liberan productos intermediarios de O₂ y N₂, enzimas lisosomales y otros factores que matan y digieren a los bacilos tuberculosos. Durante la necrosis caseosa, los bacilos sobreviven sin poderse multiplicar, debido a las condiciones hostiles que prevalecen en los focos caseosos (Smith, 2003).

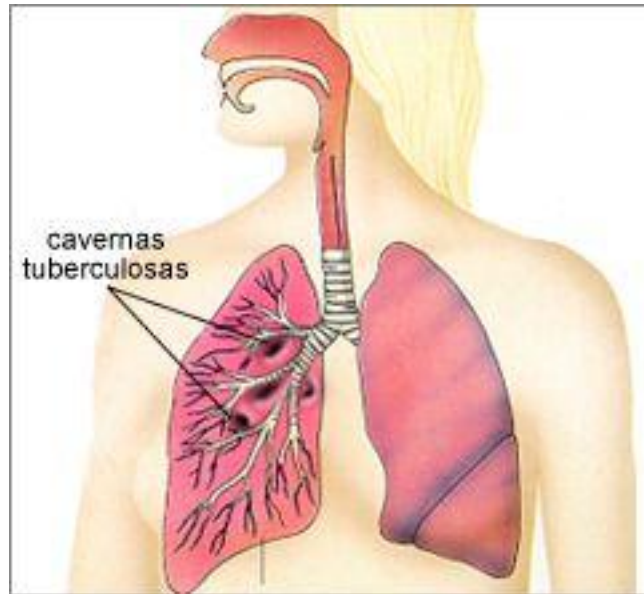


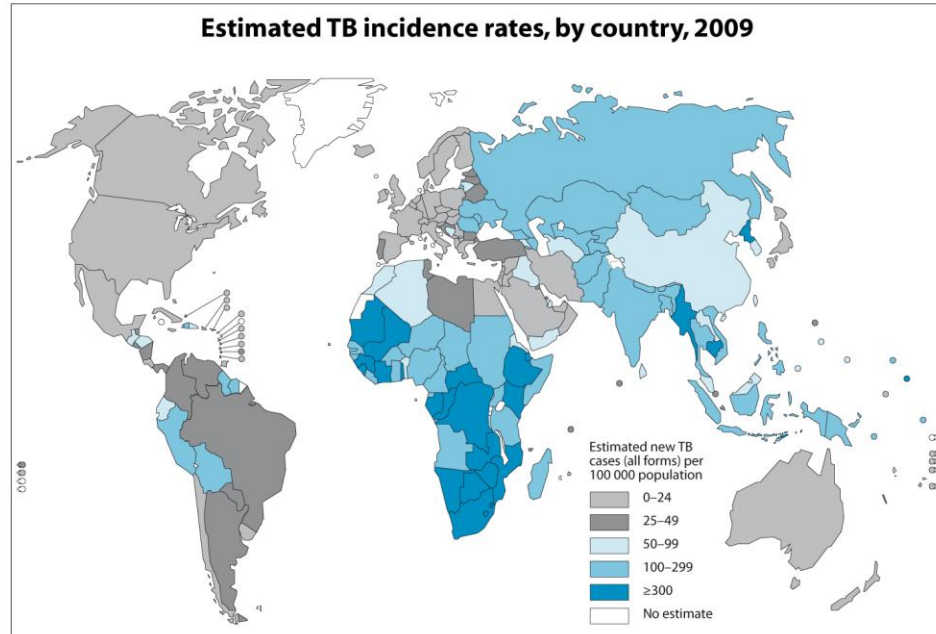
Fig. 8 Cavernas tuberculosas

La cuarta etapa se caracteriza, en personas no inmunocompetentes, por una lisis de la proteína semisólida coagulada, debido a la presencia de enzimas hidrolíticas, niveles altos de tuberculina reactiva y a la HTT licuando el tejido (Rook *et al.*, 1996). Esta sustancia licuada es evacuada por los bronquios y es eliminada como esputo, siendo tóxico a los tejidos por la presencia de la HTT, diseminándose a otras zonas del pulmón y al ambiente (Bloom, 1994). La quinta etapa puede presentarse, al vaciarse el absceso caseoso, produciéndose la caverna tuberculosa pulmonar (Fig. 8). En esta caverna los macrófagos no sobreviven debido a los ácidos grasos tóxicos de las células del hospedero, o de algunos componentes de los bacilos, siendo los macrófagos ineficaces para controlar la multiplicación extracelular de los bacilos que se encuentran en la caverna (Dannenberg *et al.*, 1994).

A pesar de los esfuerzos realizados para su control, en la actualidad constituye uno de los problemas sanitarios de mayor gravedad a nivel mundial. Según datos de la OMS, cerca de dos millones de personas murieron de tuberculosis en el 2009 (Fig. 9). Se calcula que alrededor de un

tercio de la población mundial está infectada por el bacilo tuberculoso y que cada segundo se infecta una persona más. Solo del 5 al 10% de los pacientes infectados desarrollarán la enfermedad. Un paciente tuberculoso, si evoluciona hacia la curación, suele permanecer contagioso unos dos años; si no se cura es contagioso durante toda su vida. En el 2009 se reportaron 9.4 millones de nuevos casos de tuberculosis y se estima que el 3.3 % son MDR-TB siendo el rango más alto reportado (WHO, 2010).

El principal factor que determina el pasaje de la infección a enfermedad es la calidad de la respuesta inmune celular del huésped. Por eso siempre la tuberculosis se asoció con: edad (mayor riesgo en infancia, adolescencia y edad avanzada), raza (negra), malnutrición, diabetes, insuficiencia renal, tumores linfoproliferativos, silicosis, administración de corticoides u otros inmunosupresores. Últimamente el factor de riesgo más importante es la infección por el VIH.



The boundaries and names shown and the designations used on this map do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the World Health Organization concerning the legal status of any country, territory, city or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries. Dotted lines on maps represent approximate border lines for which there may not yet be full agreement.

Source: *Global Tuberculosis Control 2010*. WHO, 2010.



© WHO 2010. All rights reserved.

Fig. 9 Distribución de la tuberculosis a nivel mundial en 2009

4.1.4 TRATAMIENTO

Aunque la tuberculosis es una enfermedad conocida desde hace mucho tiempo, su tratamiento farmacológico es relativamente reciente. Los progresos en la terapéutica se han sucedido de forma lenta pero continua desde que Waksman descubrió la estreptomycin en 1944. A partir de ese momento en el tratamiento de la tuberculosis existen tres fechas decisivas: el descubrimiento de la isoniacida en 1952, la introducción de la rifampicina en 1967 y cuando la pirazinamida se incorpora al tratamiento como medicamento de primera línea al final de la década de los 70, lo que permitió acortar el tratamiento a 6 meses. Sin embargo, pese a tener estas combinaciones efectivas de medicamentos, al ser tan prolongado el tratamiento se produce una elevada proporción de incumplimiento de éste por parte de los pacientes con esta enfermedad. Esto, y además de la negligencia en el control de la enfermedad, según la Organización Mundial de la Salud (OMS), está ocasionando la aparición de cepas multirresistentes a los fármacos (MDR-TB) en todo el mundo (García-Ramos *et al.*, 2003).

El régimen óptimo de tratamiento de cepas no resistentes de *M. tuberculosis* consiste en un coctel de tres, cuatro o cinco agentes de primera línea, según la categorización clínica, radiológica y bacteriológica del paciente: Isoniacida (H), Rifampicina (R), Pirazinamida (Z), Etambutol (E) y Estreptomycin (S). El tratamiento habitual consiste en una primera fase de dos meses de duración con H, R, Z y E, seguida de una segunda fase, de cuatro meses de duración con H y R (Fig. 10). Esta combinación de tratamientos es generalmente efectiva, aún si el microorganismo es resistente a una de las drogas usadas. Es interesante destacar que a excepción de R (un inhibidor de RNA polimerasas procarioticas) y S (un inhibidor de síntesis de proteínas), los demás fármacos usados actúan sobre la síntesis de ácidos grasos complejos de las micobacterias (Chopra, 1997).

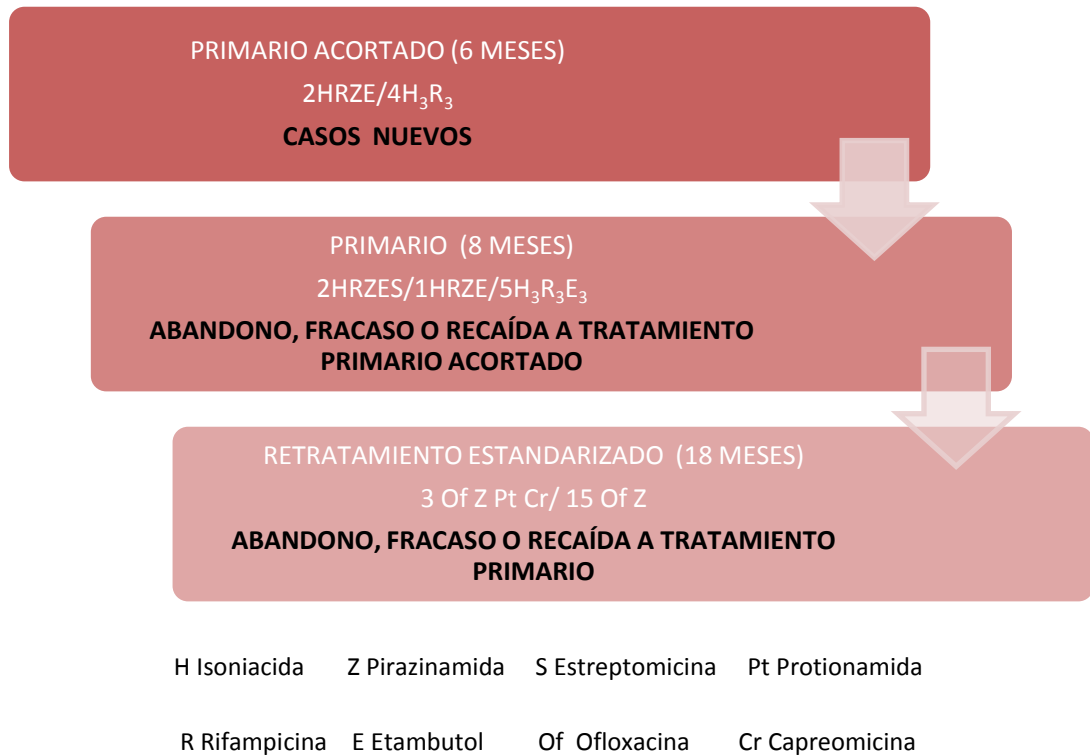


Fig. 10 Tratamiento de primera línea

Las técnicas de manipulación genética han permitido identificar una serie de blancos moleculares esenciales para la viabilidad y la virulencia de *M. tuberculosis*. A su vez, los progresos realizados con técnicas de química combinatoria brindan la posibilidad de producir compuestos que posteriormente se prueban sobre el bacilo de la tuberculosis, tanto sobre el crecimiento de cultivos como en infección de macrófagos. También se determina la actividad “in vitro” utilizando ensayos enzimáticos, basados en las enzimas identificadas como esenciales. Lo anteriormente mencionado, en conjunto con la aplicación de programas interdisciplinarios involucrados en la búsqueda e identificación de principios antimicobacterianos de origen natural, presentes en plantas, constituyen al presente, las herramientas más promisorias para la obtención de nuevos fármacos que pueden utilizarse en el tratamiento contra el *M. tuberculosis*. (Morbidoni, 2004).

Las plantas medicinales han recibido, recientemente, la atención de las comunidades científica y farmacéutica, y varias publicaciones han

documentado el valor terapéutico de los compuestos naturales, en un intento de validar su actividad biológica. Se ha puesto atención a las propiedades antimicrobianas de los metabolitos secundarios de las plantas, debido a la incidencia cada vez mayor de microorganismos patógenos resistentes a los fármacos utilizados en la actualidad. Algunas plantas han mostrado su capacidad para superar la resistencia de algunos microorganismos, y esto ha llevado a la búsqueda de sus mecanismos de acción y el aislamiento de compuestos activos (Das *et al.*, 2010).

Se ha estimado que del 14 – 28% de las plantas superiores tienen uso medicinal y que el 74% de los compuestos derivados de plantas con actividad farmacológica fueron descubiertos de plantas de uso tradicional. La medicina moderna es cada vez más receptiva al uso de medicamentos antimicrobianos y otros derivados de las plantas, debido a que los antibióticos tradicionales se están volviendo ineficaces y por el rápido ritmo de extinción de especies de plantas. Debido a esto, se tiene el riesgo de que productos naturales de importancia química y microbiológica, así como una multitud de estructuras fitoquímicas que potencialmente puedan ser químicamente sintetizadas puedan perderse irremediablemente (Cowan, 1999; Ncube, 2008).

Las plantas sintetizan una enorme variedad de compuestos tanto primarios, propios del metabolismo de la planta, y secundarios, metabolitos que estimulan la interacción entre estas y su medio ambiente. Las plantas, crudas o extractadas, pueden contener mezclas complejas de sustancias químicas orgánicas que incluyen: ácidos grasos, esteroides, alcaloides, flavonoides, glucósidos, saponinas, taninos y terpenos (López, 2009).

Se han reportado metabolitos secundarios que inhiben el crecimiento el *M. tuberculosis*. Algunos de estos han sido aislados de plantas y esto expresa el intento de desarrollar nuevos agentes antituberculosos (Copp, 2007).

4.2 PLANTAS QUE HAN RESULTADO ACTIVAS CONTRA *M. tuberculosis*

En la mayoría de los estudios que se han realizado en plantas, los extractos no polares son lo que han dado mejores resultados, por ejemplo, Suksamrarn *et al.*, (2003) reportaron que el extracto obtenido con cloroformo de *Limnophila geoffrayi* mostró actividad contra *M. tuberculosis*. En este mismo año, Jiménez-Arellanes reportó que los extractos hexánicos de *Artemisia ludoviciana*, *Chamaedora tepejilote*, *Lantana hispida*, *Juniperus communis* y *Malva parviflora*, y extractos metanólicos de *Artemisia ludoviciana* y *Juniperus communis* inhibieron el crecimiento de *M. tuberculosis*. Posteriormente, Gu *et al.*,(2004) reportaron que los extractos obtenidos con diclorometano de *Quinchamalium mayus* presentaron actividad antituberculosa. Así mismo, encontraron que los extractos obtenidos con diclorometano de *Senecio chionophilus* y extractos hexánicos de *Valeriana laxiflora* exhibían también actividad contra *M. tuberculosis*.

Las hojas, raíz y corteza de *Diospyros anisandra* fueron sometidas a investigación contra dos cepas de *M. tuberculosis*, una resistente y la otra susceptible a los antibióticos. La fracción lipofílica de raíz y corteza mostró una actividad inhibitoria significativa para ambas cepas. La fracción hexánica de la corteza presentó una fuerte actividad antimicobacteriana (CMI de 6.25 µg/ml) sobre la cepa resistente y una significativa actividad antimicrobiana (Borges-Argáes, 2007). Otros investigadores, como, Tan *et al.*, (2007) reportaron que extractos clorofórmicos de las hojas de *Pandanus tectorius Soland var. Laevis* mostraron inhibición del crecimiento de *M. tuberculosis* H37Rv con un CMI de 64 µg/ml.

Camacho-Corona *et al.*, (2007) evaluaron la actividad antimicobacteriana de nueve plantas usadas en la medicina tradicional mexicana para tratar la tuberculosis y otras enfermedades respiratorias. *Nasturtium officinale* mostró la mejor actividad (CMI de 100 µg/ml). *Citrus sinensis*, *Citrus aurantifolia*,

Foeniculum vulgare, *Larrea tridentata*, *Musa acuminata* y *Olea europaea* dieron un CMI de cerca de 200 µg/ml contra el bacilo de la tuberculosis.

Aunque se han encontrado activos, diversos compuestos químicos como veremos más adelante, los esteroides y terpenoides son metabolitos secundarios de las plantas que han sido reportados con actividad antimicótica relevante, algunos ejemplos de ellos son los siguientes: fracciones de extractos de *Chrysanthemum morifolium* identificadas como triterpenoides revelaron actividad contra *M. tuberculosis* mostrando una concentración mínima inhibitoria (CMI) en el rango de 4-64 µg/ml (Akihisa, 2005). Algunos compuestos, como los diterpenos carnosol, rosmadial y el ácido carnosico obtenidos a partir de extractos etanólicos de *Salvia africana-lutea* mostraron CMIs de 157 y 28 µM, respectivamente contra *M. tuberculosis* (Hussein, 2007). En la búsqueda de nuevos compuestos contra la tuberculosis, se aisló un nuevo triterpeno: el tetrahidroxiescualeno, a partir de extractos metanólicos de hojas de *Rhus taitensis*, el cual presentó una CMI de 10 µg/ml, mostrando una baja citotoxicidad. (Noro, 2008). Así como tres nuevos diterpenos obtenidos a partir de extractos de la planta completa de *Plectranthus ernstii* los cuales fueron activos contra *M. tuberculosis* de rápido crecimiento, con valores de CMI en un rango de 8 a 128 µg/ml (Stavri *et al.*, 2009). También se obtuvieron seis nuevos compuestos a partir de extractos de hoja y ramas de *Callicarpa pilosissima*, los cuales presentaron actividad contra *M. tuberculosis* H37Rv in vitro con CMIs ≤ 63.6 µM. (Chen, 2009).

Camacho-Corona *et al.*, (2009) se abocaron a la búsqueda de nuevos compuestos con actividad antituberculosa, derivados de plantas superiores, como *Bocconia arborea* (CMI 12.5 µg/ml), *Stephania dinklagei* (CMI 3.125 µg/ml), *Guarea rhopalocarpa* (CMI 12.5 µg/ml) entre otros; encontrando metabolitos secundarios del tipo de alcaloides, flavonas, quinonas, diterpenos y triterpenos; los cuales mostraron sensibilidad a *M. tuberculosis* multiresistente a los fármacos. Los bioensayos realizados con fracciones

aisladas de extractos clorofórmicos de hojas de *Byrsonima fagifolia* mostraron actividad antitubercular: el alcano dotriacontano (CMI = 62.5 µg/ml), triterpenoide como el ácido bassico (CMI = 2.5 µg/ml), α-amirinaacetato (CMI = 62.5 µg/ml), una mezcla de lupeol y β-amirina (CMI = 31.5 µg/ml), que fue determinada por el método de Azul de Alamar (Higuchi, 2009).

Nuevos lignanos fueron aislados a partir de extractos hexánicos de raíz de *Aristolochia taliscana* y probados por el método de Azul de Alamar, por microdilución, en cepas de *M. tuberculosis* H37Rv, los cuales dieron CMI en un rango de 3.12 – 12.5 µg/ml (León-Díaz *et al.*, 2010). En la continua búsqueda, Pan *et al.*, (2010) aislaron metabolitos secundarios a partir de extractos de la raíz de *Litsea hypophaea* los cuales mostraron actividad contra *M. tuberculosis* H37Rv con valores de CMI de 1.6 a 25 µg/ml. Así como Wu *et al.*, (2011) encontraron cromonas y flavonoides en extractos metanólicos de raíz y tallos de *Pisonia aculeata*, los cuales presentaron CMI ≤ 50.0 µg/ml contra cepas de *M. tuberculosis* H37Rv.

Esteroles de *Ruprechtia triflora* y diterpenos de *Calceolaria pinnifolia* tuvieron un efecto inhibitorio en el crecimiento de *M. tuberculosis*, encontrando para los esteroles de *R. triflora* valores de CMI en el rango de 2-128 µg/ml y para los diterpenos de *C. pinnifolia* valores de CMI de 4 µg/ml y triterpenos de *C. pinnifolia* mostrando una CMI entre 8 y 16 µg/ml. (Woldemichael, 2003).

De una planta tibetana *Gentianopsis paludosa*, Yeung *et al.*, (2009) aislaron 3 xantonas (1,7-dihidroxi-3,8-dimetoxixantona, 1,7,8-trihidroxi-3-metoxixantona, 1-hidroxi-3,7,8-trimetoxixantona) y el ácido oleanólico con efecto inhibitorio en el crecimiento de *M. smegmatis* y *M. tuberculosis*. Otras plantas del Tibet: *Lippia javanica* y *Hoslundia opposita* fueron estudiadas por Mujovo SF (2008) y reportaron que el ácido euscáico mostró una

concentración mínima inhibitoria de 50 µg/ml contra la última cepa mencionada.

Kim CE *et al.*, (2009) de plantas de la familia *Gerianaceae* aislaron ácido gálico y galato de metilo, mircetina y quercetina sustancias que estimulan la actividad contra el microorganismo productor de la tuberculosis por lo que concluyen que los extractos de estas plantas pueden ser útiles en el tratamiento de esta enfermedad.

Maneerat W (2008) aisló azadiradiona de semillas de *Chisocheton siamensis*, que mostró un fuerte efecto inhibitorio contra *M. tuberculosis* con un CMI de 6.25 µg/mL. Otros estudios fueron realizados con extractos obtenidos de la raíz de *Angelica sinensis*, este estudio midió la actividad antimicobacteriana *in vitro*. Los más potentes constituyentes antituberculosos fueron el falcarindiol y el 9Z,17-octadecadieno-12;14-diyne-1,11,16-triol,1-acetato con una CMI de 1.4 – 26.7 µg/mL (Deng S, 2008). A partir de los extractos etanólicos de *Dodonea angustifolia* y *Galenia africana*, Mativandlela SP y colaboradores (2008) encontraron que dichos extractos producían una CMI de 5.0 y 1.2 µg/mL respectivamente contra *M. tuberculosis*.

Por otra parte, en estudios recientes se han encontrado que algunas plantas no presentan una actividad directa sobre la bacteria, sino que se debe a una inmunoestimulación, favoreciendo con ello el control del crecimiento y desarrollo del agente.

A extractos metanólicos de *Plantago major* se les asoció con el aumento de la producción de óxido nítrico, así como la producción de TNF- α en macrófagos peritoneales de ratón (Gómez-Flores *et al.*, 2000). Kolodziej *et al.*, (2003) analizaron la planta *Pelargonium sidoides*, y encontraron actividad antimicobacteriana y actividad inmunoestimuladora, mediante una estimulación

de iNOS y TNF- α en macrófagos de médula ósea de ratón. Rosales Hernández (2004) reportó que los extractos hexánicos y metanólico de las hojas de *Bocconia frutescens* presentaron actividad directa contra *M. tuberculosis* mostrando una CMI de 125 $\mu\text{g/ml}$, y mediante ensayos de RT-PCR encontró que los extractos hexánico y metanólico de las hojas de *B. frutescens* indujeron la expresión de IL-1 β y la producción de la enzima óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS) en macrófagos medulares de ratones BALB/c, pero no indujeron la expresión de IL-10, sugiriendo que tienen una actividad inmunoestimuladora. El extracto metanólico de *Carpobrotus edulis* inhibió el crecimiento de *M. tuberculosis* una vez que estaban fagocitadas por monocitos derivados a macrófagos humanos (Martins, 2005).

Como podemos constatar con las referencias anteriores, existe un gran interés por encontrar plantas que contengan sustancias que sean activas contra *M. tuberculosis*. Salinas González (2004), reportó que extractos hexánicos de la corteza de *Carya illinoensis*, *Juglans mollis* y *Juglans regia* presentaron actividad antimicobacteriana, mostrando una CMI de 31.25, 50 y 100 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente, así como el extracto etanólico de *Juglans mollis* con una CMI de 100 $\mu\text{g/ml}$, además el extracto metanólico de *C. illinoensis* y *Juglans mollis* mostraron una CMI de 125 $\mu\text{g/ml}$. Indicando que la actividad de los extractos hexánicos de la corteza de éstas plantas, se deben probablemente al contenido de compuestos no polares como las quinonas y a la presencia de triterpenos (Cruz-Vega *et al.*, 2008). Estos antecedentes nos motivaron a continuar estudiando estas plantas, ahora fraccionando esos extractos que presentaron actividad antimicótica para identificar los compuestos activos. Salinas-Jasso C. (2008) reportó que los extractos metanólicos de *Bocconia frutescens* y *Juglans mollis* presentaron actividad antimicobacteriana presentando una CMI de 125 $\mu\text{g/ml}$ cada uno, también el extracto etanólico de *Juglans mollis* con 100 $\mu\text{g/ml}$ de CMI, así como los extractos Hexánicos de *Juglans regia* (100 $\mu\text{g/ml}$), *Juglans mollis* (50 $\mu\text{g/ml}$) y *Carya illinoensis* (35 $\mu\text{g/ml}$) contra *Mycobacterium tuberculosis*

5.-METODOLOGÍA

5.1 MATERIAL BIOLÓGICO

5.1.1 *Juglans regia* L.

Comúnmente se le conoce como nogal de castilla, nuez persa, nuez criolla, nuez de castilla.

Clasificación botánica

Reino: Plantae

Subreino: Tracheobionta

Superdivisión: Spermatophyta

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Hamamelidae

Orden: Juglandales

Familia: Juglandaceae

Género: *Juglans* L.

Especie: *Juglans regia* L.

5.1.1.1 Descripción botánica

Es un árbol que mide de ocho a quince metros de altura, con hojas de tres a cuatro centímetros de largo de color verde claro y lisas por el anverso, y en el reverso con pelos suaves (Martínez, 1979). Los frutos se encuentran en pares y la semilla es una bellota con forma ovoide (Fig. 11). Es originaria del sureste de Europa, oeste de Asia. *Juglans regia* vive en clima templado entre los 1,600 a los 2,750 m sobre el nivel del mar. Asociada a bosques mixtos de pino-encino y de juníperos. De las hojas se han identificado los monoterpenos borneol, beta-farneseno, limoneno, linalol, miraceno, α y β

acimeno, α y β pireno y sabineno, y los sesquiterpenos cariofileno, alfa-farneseno, germacreno, y la juglona. En las hojas y pericarpio del fruto se han encontrado los componentes ácidos caféico, clorogénico, cumárico, ferúlico y sináptico. El fruto contiene las quinonas juglona y 1,4-naftaquinona, el aceite de la nuez está constituida, en su mayoría, por ácidos grasos insaturados (principalmente por ácido linoléico, junto con pequeñas cantidades de ácido oleico y ácido linolénico). El aceite también incluye tocoferoles, fosfolípidos, esfingolípidos, esteroides, carbohidratos y compuestos volátiles (Martínez *et al.*, 2010). La corteza contiene las quinonas juglona y regiona; los triterpenos betulina y ácido betulínico; β -sitosterol; el alcaloide berberina; el flavonoide catequina; y el ácido caféico. La raíz contiene las quinonas juglona, 3,3'-bis-juglona, ciclo-tri-juglona; y β sitosterol (INI, 1989).



Fig. 11 Árbol, fruto y corteza de *Juglans regia*

5.1.2 *Juglans mollis*

Clasificación botánica

Comúnmente llamada nogal de nuez meca, nogal encarcelado, nuez corriente, Tih ti (mixteco), Tutiki (mixteco), cuatololote.

Reino: Plantae

Subreino: Tracheobionta

Superdivisión: Spermatophyta

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Hamamelidae

Orden: Juglandales

Familia: Juglandaceae

Género: *Juglans* L.

Especie: *Juglans mollis*

5.1.2.1 Descripción botánica

Es un nogal silvestre que crece en áreas cercanas a ríos y arroyos, alcanza a medir 18 m de altura. Hojas compuestas de 5 a 9 hojuelas afelpadas. Las nueces no son comestibles, de 3 a 4 cm, de la forma, color y tamaño de un limón (Fig. 12). Es un árbol característico del bosque mesófilo de las montañas del suroeste de Tamaulipas (Sharpe *et al*, 1950). Se localiza en Nuevo León y en el Norte de San Luis Potosí (Martínez, 1987). Abunda en las riveras de arroyos y ríos que cruzan la carretera Nacional, en la Estanzuela, en Santiago, Nuevo León, en Allende, Nuevo León y en el municipio de Guadalupe, Nuevo León a lo largo del río La Silla; y forma parte de la flora del Parque Nacional Cumbres de Monterrey, Nuevo León

(CONABIO, 2009). No posee referencias en cuanto a usos medicinales en la literatura.



Fig.12 Corteza, árbol y frutos de *Juglans mollis*

5.2 Recolección del material vegetal

Se realizó la recolección de hojas y corteza de *J. mollis* y de *J. regia*. Las hojas y corteza de *J. mollis* fue recolectada en la comunidad La Presa, Santiago, Nuevo León, durante el mes de mayo de 2009. En tanto las hojas y corteza de *J. regia* se colectaron en los jardines de la Unidad B de Facultad de Ciencias Biológicas, UANL, Ciudad Universitaria, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, en el mes de mayo de 2009. El material recolectado se dejó secar a temperatura ambiente a la sombra. Se depositó una muestra de cada especie en el Departamento de Botánica de la Facultad de Ciencias Biológicas, UANL, para su clasificación y obtención de registro.

5.3 Obtención de extractos

Las muestras colectadas de *J. regia* y *J. mollis* se molieron, por separado en un molino manual, de este material se pesaron 60 g y se sometieron a reflujos continuo en un sistema soxhlet por 40 h con 500 ml de hexano, Después de la obtención del extracto, el solvente se eliminó por evaporación, en un rotavapor (Yamato Rotary Evaporator RE 200) a presión reducida hasta sequedad. El extracto se almacenó en frascos de vidrio en un lugar fresco y seco hasta su uso.

5.4 Pruebas de identificación parcial de compuestos químicos

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

Prueba de Liebermann-Burchard

Para triterpenos y compuestos esteroidales. Se disuelven 1.5 mg de la muestra en cloroformo y luego se le añaden unas gotas del reactivo, observándose cambios de coloración; el reactivo se prepara agregando una gota de ácido sulfúrico a una mezcla de un ml de anhídrido acético y un ml de cloroformo.

Prueba de Salkowski

Para esteroides y metilesteroides. De 1 a 2 mg de la muestra en 1 ml de cloroformo se pone en contacto con 1 ml de ácido sulfúrico, se desarrollan colores amarillo o rojo.

Prueba de Shinoda

Para compuestos tipo flavonoides. A 1 mg de muestra disuelta en etanol y con limaduras de magnesio, se le aplica calor a 60°C y después se le agregan unas gotas de HCl por las paredes del tubo de ensaye. Se considera positiva con la aparición de coloraciones naranja, rojo, rosa, azul y violeta.

Prueba de ácido sulfúrico

Para flavonoides. Una pequeña cantidad de muestra se disuelve en ácido sulfúrico concentrado y se observan las coloraciones. Amarillo para flavonas y flavonoides; naranja-guinda para flavonas; rojo-azuloso para chalconas. También detecta quinonas con coloración rojo-púrpura.

Prueba de Baljet

Para sesquiterpenlactonas. Se utilizan dos soluciones que se mezclan en volúmenes iguales antes de usarse. Solución A, 1 g de ácido pícrico en 100 ml de etanol; solución B, 10 g de hidróxido de sodio en 100 ml de agua. Para la prueba se ponen de 2 a 3 mg de muestra y unas 3 gotas de reactivo, siendo positiva si se forma una coloración naranja o roja oscura.

Prueba para cumarinas

Como las Cumarinas son lactonas, se pueden disolver en soluciones alcalinas acuosas o alcohólicas con aparición de una coloración amarilla la cual desaparece al acidular.

Prueba de Dragendorff

Para alcaloides. Modificación de Munier y Machelobuf. En la solución A se disuelven 0.85 g de nitrato de bismuto en una mezcla de 10 ml de ácido acético glacial y 40 ml de agua; en la solución B, se disuelven 8 g de yoduro de potasio en 20 ml de agua. El reactivo se prepara mezclando 5 ml de la solución A, 4 ml de la solución B y 100 ml de agua, el reactivo es estable por un año. La prueba es positiva para alcaloides si se colocan 2 a 3 mg de la muestra y unas 3 a 4 gotas del reactivo, la placa de coloraciones rojas o naranjas persistentes por 24 horas.

Prueba de permanganato de potasio

Para dobles enlaces. Se prepara una solución de permanganato de potasio al 2% en agua, se disuelven 0.2 mg de muestra en agua, acetona o metanol

y se toma en capilar agregándole la solución de permanganato de potasio. La prueba es positiva si hay precipitado café ó decoloración del reactivo.

Prueba de cloruro férrico

Para oxhidrilos fenólicos. Se disuelve una pequeña cantidad de muestra en etanol y se añade una gota de solución de cloruro férrico en agua (2.5%). La aparición de una coloración o precipitado rojo, azul, violeta o verde se considera positiva. En algunos casos es necesario utilizar una solución no acuosa de cloruro férrico a la que se le añade una base débil, por ejemplo cloroformo-piridina, para hacer más sensible la determinación.

Prueba de 2,4-Dinitrofenilhidracina

Para grupo carbonilo. En un tubo de ensaye se disolverán 50 mg de 2,4-dinitrofenilhidracina en 1 ml de etanol caliente, se agregan 50 mg del compuesto carbonilico y se calienta a baño María por 10 a 15 min. Se deja en reposo y luego se enfría en baño de hielo, la aparición de un precipitado naranja indica la presencia de un grupo carbonilo.

Prueba de Molisch

Para azúcares. En un tubo de ensaye se coloca la muestra y se le añaden 3 gotas del reactivo de Molisch y se agita. Luego inclinar el tubo y depositar por la pared 2 ml de ácido sulfúrico concentrado. Es positivo cuando se forma un anillo coloreado en la interfase. El reactivo se prepara disolviendo 1 g de α -naftol en 100 ml de etanol al 95%.

Prueba de bicarbonato de sodio

Para saponinas. La sal se preparó al 10% en agua, uno o 2 mg de la muestra disuelta en agua o etanol se mezclan con unas gotas de la solución de bicarbonato y la aparición de burbujas indica su presencia.

5.5 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

En general la cromatografía es un proceso de migración diferencial en el cual los componentes de una mezcla son transportados por una fase móvil que puede ser un líquido o un gas, y son retenidos selectivamente por la fase estacionaria que también puede ser un líquido o un sólido. La idea básica es la separación de los componentes de una mezcla, haciéndola pasar a través de un sistema que consta de una fase móvil y una fase estacionaria. Las dos fases se eligen de tal forma que los componentes de la muestra se distribuyen de modo distinto entre la fase móvil y la fase estacionaria. Aquellos componentes que son retenidos con fuerza por la fase estacionaria se mueven lentamente con el flujo de la fase móvil; se mueven con rapidez. Como consecuencia de la distinta movilidad, los componentes de la muestra se separan en bandas discriminadas que pueden analizarse cualitativa o cuantitativamente.

5.5.1 Cromatografía en capa fina

Este método es usado para la identificación y aislamiento de los compuestos. Las placas cromatográficas se prepararon utilizando sílica gel 40G y agua destilada en proporción de 1:3 respectivamente, se aplicaron sobre las placas, se dejaron secar por 24 h a temperatura ambiente y posteriormente en la estufa a 100°C por 2 h.

En la placa seca se colocó la muestra, disuelta en cloroformo, por medio de un capilar, se deja secar y se repite la aplicación varias veces, asegurándose de colocarlas exactamente en la misma posición. La placa se colocó en una cámara de vidrio de boca ancha, se utilizó como eluente benceno-acetona 9:1. Para calcular el R_f se midió la distancia del punto de aplicación de la muestra hasta la mitad de la mancha detectada y se divide este valor entre la distancia del punto de aplicación y el frente del eluente (Fig. 13).

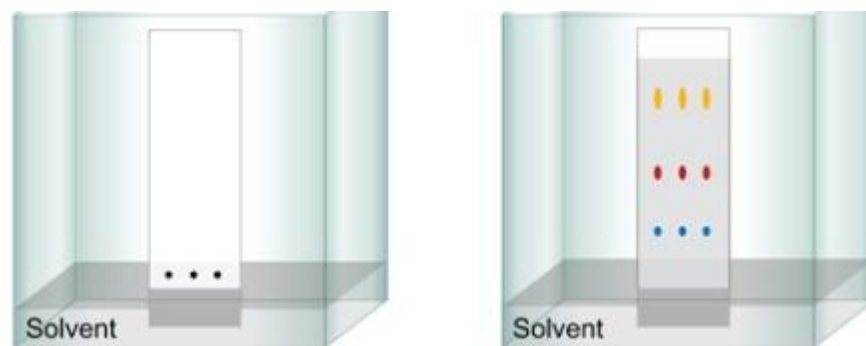


Fig. 13 Cromatografía en capa fina

5.5.2 Cromatografía preparativa en capa fina

Este método se utiliza para la separación y purificación de los componentes de mezclas difíciles de separar. Para ello se emplearon placas de cromatografía de capa delgada de mayores dimensiones, en las que el espesor de la capa absorbente es mayor. Las placas utilizadas son de 20 x 20 cm y 5 mm de espesor (Fig. 14). La muestra diluida en cloroformo, se aplicó en forma continua a todo lo ancho de la placa y se eluyó en un sistema de benceno-acetona 9:1. Después de eluida se dejó secar perfectamente, se localizaron las bandas deseadas por medio de luz ultravioleta y las placas se revelaron con cloruro de cobalto. Se separaron las bandas de gel de sílica que contienen los compuestos deseados y se extrajeron con cloroformo.

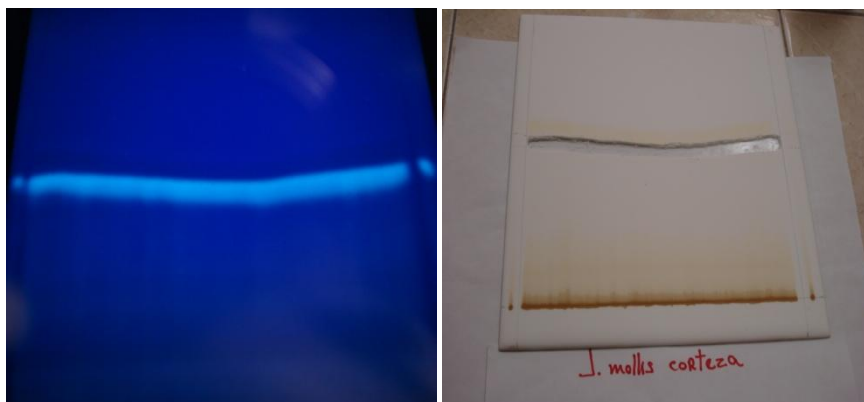


Fig. 14 Cromatografía preparativa en placa fina

5.5.3 Agentes cromogénicos:

Para observar los cromatogramas y localizar los componentes, que no son perceptibles en el espectro visible, se utilizó la lámpara de luz ultravioleta de 254-365 nm. Para revelar las placas se utilizó cloruro de cobalto 2%.

5.6 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD TÓXICA

Los huevecillos de *Artemia salina* son retirados de refrigeración y pesados en cantidad suficiente para la prueba (100 mg/L), una vez pesados se atemperan a 25°C por 24 h. El agua de mar se prepara a partir de sal de mar (40 g/L) en agua destilada y se ajusta el pH a 7.8. Una cuba rectangular, de acuerdo al método de Meyer, es lavada con agua destilada, en la cual se deposita el agua preparada y se distribuye hasta igualar los niveles en los compartimientos presentes, rebasando la altura del orificio por donde migraran los *nauplios* eclosionados. La cuba deberá ser tapada y dispuesta con una bomba de aeración continua de 24 a 48 h. Utilizando un foco de 60 watts, se mantiene la temperatura cercana a los 25°C y se coloca para iluminar el segundo espacio para el efecto fotorreceptor. Se toman de 8 a 12 *nauplios* y se colocan en cada pozo de la microplaca.

Se preparan soluciones con una concentración de 1000, 100 y 10 ppm de cada extracto, usando como diluyente DMSO, al igual que el control (agua de mar) se realizará por triplicado. Como control positivo se utilizó Dicromato de potasio 5%. Después de 24 h se registra el número de larvas vivas y muertas. Los datos se analizan mediante la prueba Probit para determinar la DL₅₀.

5.6.1 Determinación de la actividad de los extractos sobre *M. tuberculosis*

Microorganismo de prueba

Mycobacterium tuberculosis, cepa H37Rv. Los bacilos se cultivaron a 37°C por diez días, en medio Middlebrook 7H9 (7H9) suplementado con AODC (ácido oleico, albúmina, dextrosa y catalasa) (Franzblau, 1998). Para los ensayos de actividad antimicrobiana, la densidad de los cultivos se ajustó en cámara de Neubauer para obtener una concentración final de 2×10^5 UFC/ml. Esta densidad bacteriana fue utilizada para inocular la microplaca.

5.6.2 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria.

Para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) se utilizó el ensayo del Método de Azul de Alamar (EMAA), el cual es un indicador de óxido-reducción que presenta un cambio de color al ser reducido por organismos vivos (Yajko, 1995) y permite una lectura visual directa de los resultados (Collins y Franzblau, 1997; Franzblau, 1998; Palomino y Portaels, 1999).

Se prepararon soluciones de trabajo de los extractos, diluyendo con DMSO (dimetilsulfóxido). En microplacas de 96 pozos se colocaron en una hilera las

concentraciones de 500, 250, 125, 62, 31, 15 µg/ml de los diferentes extractos a probar. Todos los extractos se probaron en cuatro pozos cada uno. Una hilera se dejó sin extracto, el cual sirvió como control positivo de crecimiento bacteriano. Se realizaron las mismas diluciones con DMSO, utilizado como disolvente en la preparación de las muestras. Todos los pozos del perímetro externo de la placa se llenaron con 200 µl de agua bidestilada con la finalidad de mantener la humedad en toda la microplaca. Como control positivo de actividad antifúngica se utilizó la clofazimina (concentración inicial 5000 ng/ml). Una vez preparadas todas las diluciones de los extractos, se colocaron 50 µl de cada dilución con 50 µl de la suspensión bacteriana en medio 7H9 suplementado con OADC (ácido oleico, albúmina, dextrosa y catalasa), en todos los pozos. Las microplacas fueron incubadas a 37°C por 5 d, agregando al quinto día, a un pozo de control positivo de crecimiento, 50 µl de solución de una mezcla 1:1 de Azul de Alamar y tween 80 al 10%. Las placas fueron reincubadas a 37°C por 24 h mas. Posterior a la incubación, en caso de no virar, el colorante era agregado a otro pozo control y reincubado un día más. Si el color del pozo viró hacia rosa indicó el crecimiento de las micobacterias, y se procedió a agregar la solución de Azul del Alamar al resto de los pozos, e incubándose por otras 24 h. Luego de este tiempo, aquellos pozos con color rosa bien definido fueron registrados como positivos para el crecimiento. Se definió la concentración mínima inhibitoria (CMI) como la concentración más baja del extracto que previno el cambio de color hacia rosa (Collins y Franzblau, 1997; Franzblau, 1998; Palomino y Portaels, 1999).

6.- RESULTADOS

6.1 Recolección y clasificación del material vegetal

Las muestras de hoja y corteza de *J. regia* L., fueron recolectadas en los jardines de FCB, UANL, Ciudad Universitaria, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, durante el mes de mayo de 2009. *J. mollis* fue recolectada en la comunidad de La Presa, Villa de Santiago, Nuevo León, durante el mes de mayo de 2009. Se envió una muestra de cada especie al Departamento de Botánica de la Facultad de Ciencias Biológicas, UANL, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, donde fueron identificadas por la M.C. María del Consuelo González de la Rosa y depositadas como: *J. mollis* y *J. regia* L. con los números de registro 025551 y 025552 respectivamente.

6.2 Rendimiento de los procesos de extracción

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

Como podemos observar en la tabla 1, donde se presentan los porcentajes de rendimiento de los diferentes extractos, el que se obtuvo en mayor cantidad fueron las hojas de *J. regia* y el de menor cantidad la corteza de *J. mollis*.

TABLA 1.- Por ciento de rendimiento de extractos hexánicos.

<i>J. regia</i> L.		<i>J. mollis</i>	
Hojas	Corteza	Hojas	Corteza
5.12	4.33	4.99	3.07

6.3 Identificación de grupos y metabolitos secundarios en extractos crudos.

6.3.1 Reacciones coloridas.

J. mollis. En el extracto hexánico de hojas y corteza se encontraron azúcares, dobles enlaces, alcaloides, lactonas y carbonilos para ambas muestras. Solo en hojas se observó la presencia de triterpenos y sesquiterpenlactonas. Únicamente en la corteza se determinó la presencia de esteroides. (Tabla 2).

J. regia. En el extracto hexánico de hojas y corteza se determinó la presencia de dobles enlaces, alcaloides y esteroides para ambas muestras. Solo en hojas observamos la presencia de azúcares, triterpenos y carbonilos. En el caso de la corteza, aquí solo se encontraron sesquiterpenlactonas y flavonoides. (Tabla 3)

Tabla 2.- Grupos químicos presentes en *J. mollis*

<i>Juglans mollis</i>		
PRUEBA QUÍMICA	HOJAS	CORTEZA
Molish (azúcares)	+	+
KMnO ₄ (dobles enlaces)	+	+
Shinoda (flavonoides)	-	-
Dragendorff (alcaloides)	+	+
FeCl ₃ (Oxhidrilos fenólicos)	-	-
Liebermann-Burchard (triterpenos)	+	-
Cumarinas (lactonas)	+	+
Salkowski (esteroides)	-	+
2,4-dinitrofenihidracina (carbonilos)	+	+
Bicarbonato de sodio (saponinas)	-	-
Baljet (sesquiterpenlactonas)	+	-
Ácido sulfúrico (flavonoides)	-	-

Tabla 3.- Grupos químicos presentes en *J. regia*

<i>Juglans regia</i>		
PRUEBA QUÍMICA	HOJAS	CORTEZA
Molish (azúcares)	+	-
KMnO ₄ (dobles enlaces)	+	+
Shinoda (flavonoides)	-	+
Dragendorff (alcaloides)	+	+
FeCl ₃ (Oxhidrilos fenólicos)	-	-
Liebermann-Burchard (triterpenos)	+	-
Cumarinas (lactonas)	-	-
Salkowski (esteroles)	+	+
2,4-dinitrofenihidracina (carbonilos)	+	-
Bicarbonato de sodio (saponinas)	-	-
Baljet (sesquiterpenlactonas)	-	+
Ácido sulfúrico (flavonoides)	-	+

6.3.2 Cromatografía de gases acoplada a espectro de masas

Tabla 4.- Metabolitos presentes en corteza de *J. regia*

<i>J. regia</i> (Corteza)	
Extracto hexánico	Extracto clorofórmico
γ-sitosterol	γ-sitosterol
3-ceto-urs-12-ene	3-ceto-urs-12-ene
α-amirina	α-amirina

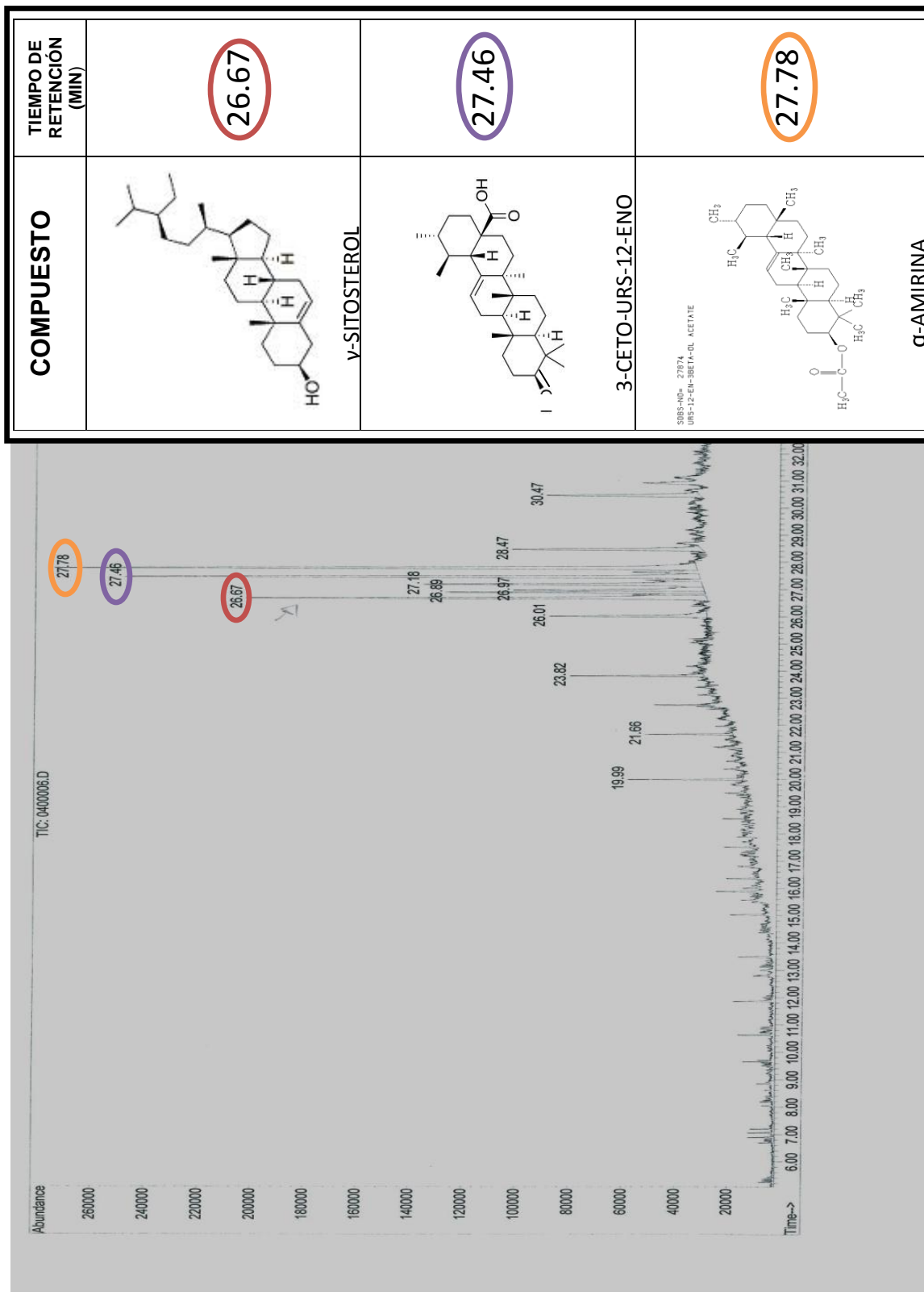


Fig. 15 Cromatograma del extracto crudo de *J. regia*

Tabla 5.- Metabolitos presentes en corteza y hojas de *J. mollis*

<i>J. mollis</i>		
CORTEZA	HOJAS	HOJAS
Extracto clorofórmico	Extracto clorofórmico	Extracto hexánico
γ -sitosterol	Fitol	1-eicosanol
4-stigmasten-3-one	9-hexacoseno	γ -sitosterol
	β -sitosterol	4-stigmasten-3-one

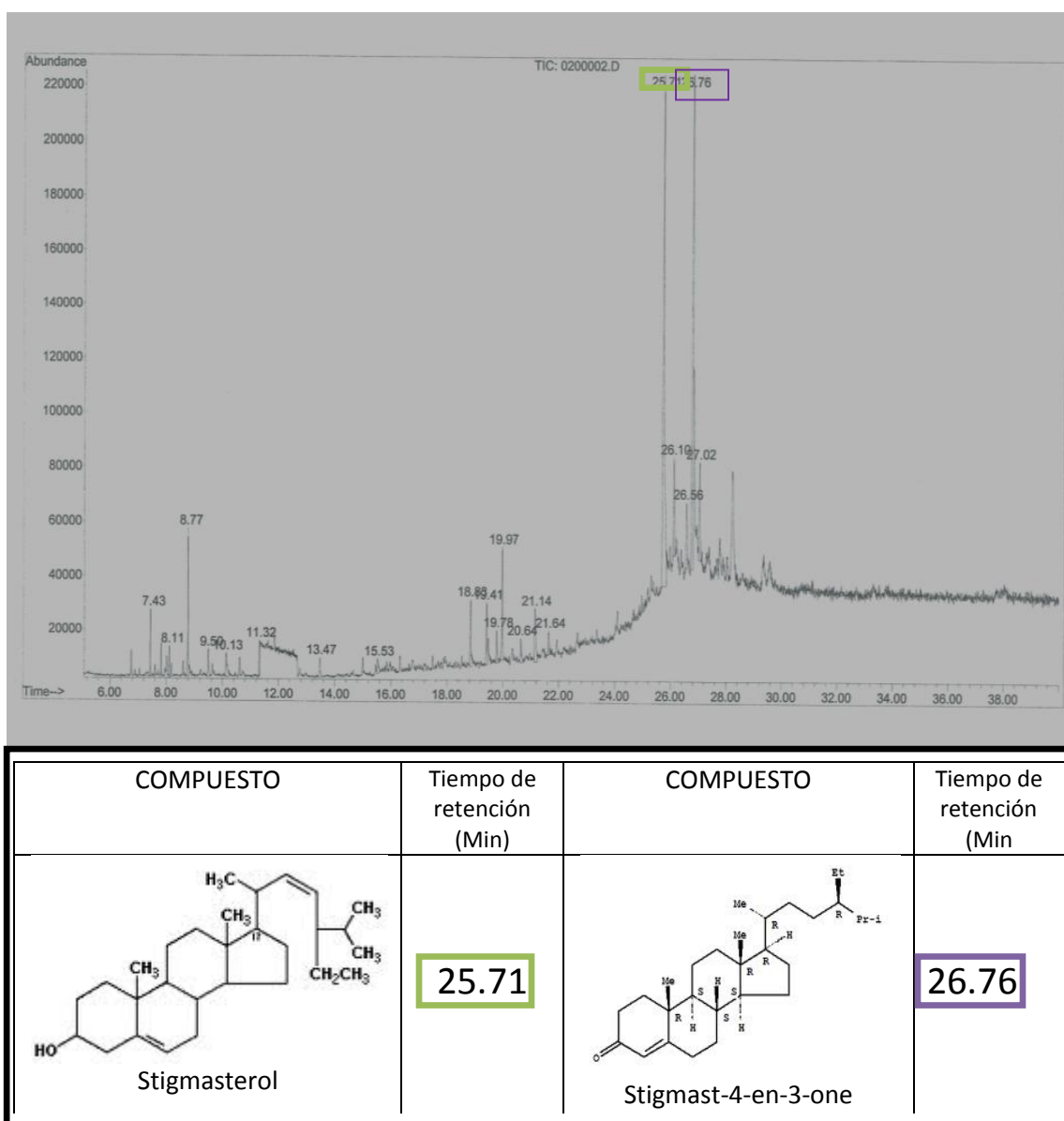
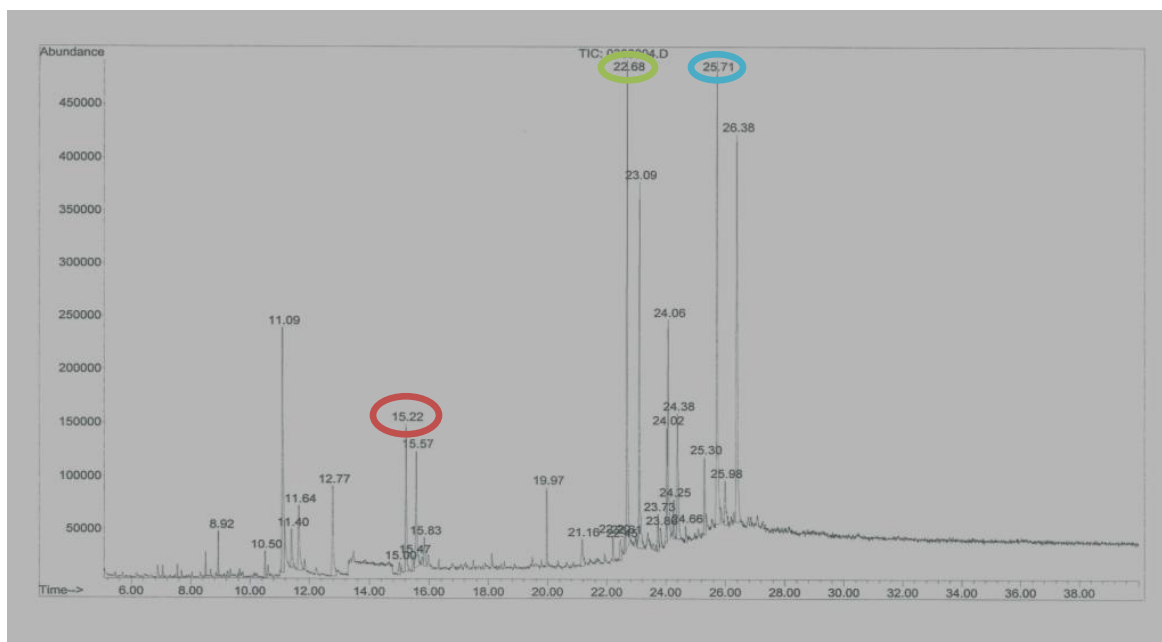


Fig. 16 Cromatograma del extracto clorofórmico de corteza de *J. mollis*



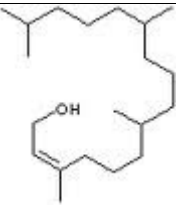
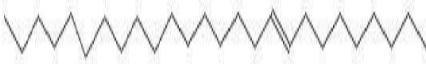
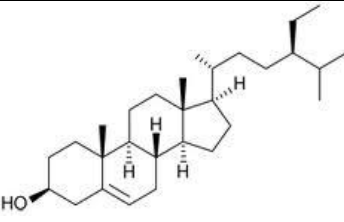
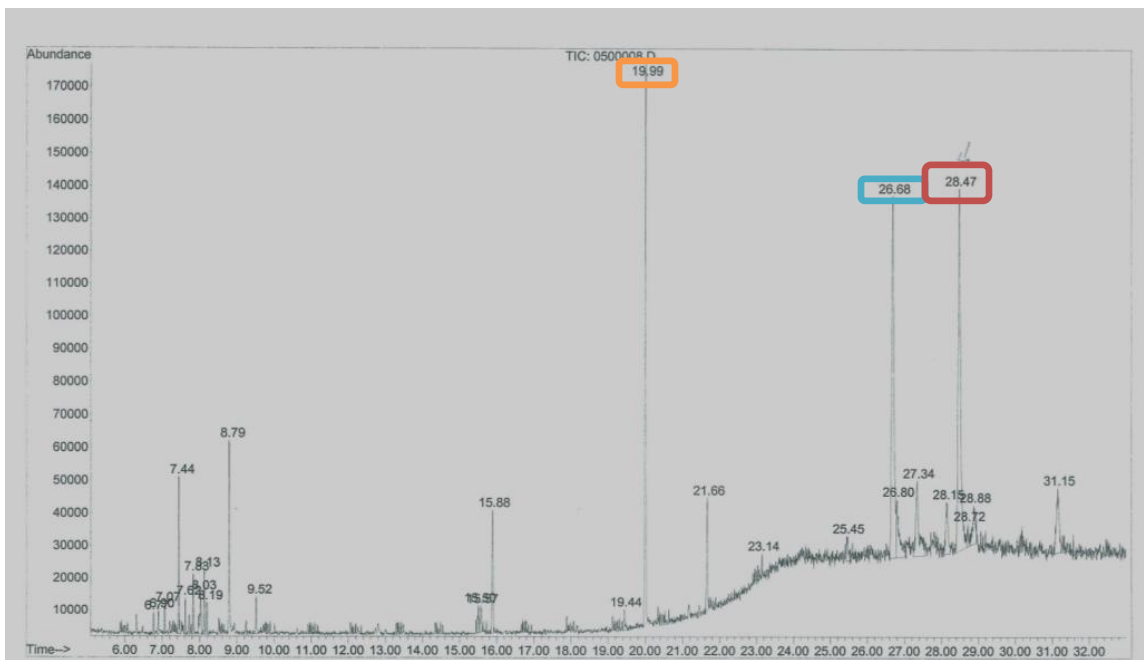
COMPUESTO	Tiempo de Retención (min)	COMPUESTO	Tiempo de Retención (min)
 <p>Fitol</p>	15.22	 <p>9-hexacoseno</p>	22.68
 <p>β-sitosterol</p>	25.71		

Fig. 17 Cromatograma del extracto clorofórmico de hojas de *J. mollis*




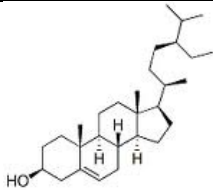
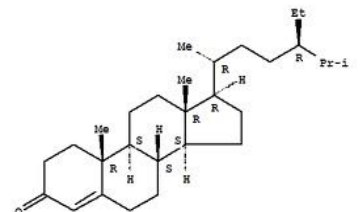
COMPUESTO	Tiempo de retención (min)	COMPUESTO	Tiempo de retención (min)
 1-icosanol	19.99	 γ-sitosterol	26.68
 Stigmast-4-en-3-one	28.47		

Fig. 18 Cromatograma del extracto hexánico de hojas de *J. mollis*

6.4 Evaluación de la actividad tóxica

El ensayo de toxicidad por el método de *Artemia salina* para los extractos hexánicos de *J. regia* y *J. mollis* mostraron como CL₅₀ la dosis de 1000 ppm después de 24 h de incubación, los cuales los clasifican como no tóxicos (Valdez-Iglesias, 2003; Meyer, 1982; Sanabria-Galindo, 1997), como se muestra en las siguientes tablas.

Tabla 6.- Viabilidad para *J. mollis* sobre *A. salina*

<i>Juglans mollis</i>				
10 ppm	100 ppm	1000 ppm	Control (-) Agua de Mar	Control (+) K ₂ Cr ₂ O ₇ 5%
0/13	0/8	0/13	0/9	9/9
0/15	0/8	0/12	0/9	8/8
0/9	0/10	0/10	0/9	12/12

Tabla 7.- Viabilidad para *J. regia* sobre *A. salina*

<i>Juglans regia L.</i>				
10 ppm	100 ppm	1000 ppm	Control (-) Agua de Mar	Control (+) K ₂ Cr ₂ O ₇ 5%
0/10	0/11	0/8	0/9	9/9
0/9	0/9	0/11	0/9	8/8
0/13	0/9	0/8	0/9	12/12

6.5 Determinación de la concentración mínima inhibitoria sobre *M. tuberculosis*

Para los ensayos biológicos, se determinó la viabilidad de la cepa *M. tuberculosis* H37Rv usando DMSO como vehículo para determinar la viabilidad de la cepa H37Rv, siendo ésta de un 100%. Para la determinación del porcentaje de inhibición de Clofazimina, como control positivo, presentó

un porcentaje de inhibición de 85% a una concentración final de 500 ng/ml, y los extractos de *J. regia* y *J. mollis* mostraron una concentración de inhibición de 125 µg/ml y 500 µg/ml respectivamente, así como también la fracción 1 del extracto hexánico de *J. mollis* mostró una inhibición de 500 µg/ml sobre la misma cepa.

Tabla 8.- CMI de los extractos hexánicos de *J. regia* y *J. mollis* sobre *M. tuberculosis*

<i>Juglans regia</i>	<i>Juglans mollis</i>
125 µg/ml	500 µg/ml

6.6 Métodos Cromatográficos

Los extractos de *J. regia* y *J. mollis* fueron separados por cromatografía comparativa en capa delgada (CCD) con el sistema benceno/acetona 9:1, se observó al ultravioleta (365 nm) y se reveló con CoCl₂ 2%, se utilizó un estándar de ácido ursólico, el cual se logró identificar en ambos extractos. En el carril 1 se colocó extracto clorofórmico crudo de *J. mollis* donde se observan diferentes tipos de compuestos, en el carril se corrió extracto hexánico crudo de *J. mollis*, obtenido en el 2009, donde se aprecia la coloración característica del ácido ursólico, el carril 3 es una muestra de extracto metanólico crudo de *J. mollis* en el cual son poco observables los indicios de compuestos; el carril 4 es un extracto hexánico crudo de *J. mollis* procesado en el 2010 el cual se observa muy semejante al carril 2; el carril 5 es el primer fraccionamiento el cual fue obtenido de la parte soluble en acetona del extracto hexánico de *J. mollis*; en el carril 6 se muestra la parte insoluble en acetona la cual se solubilizo en cloroformo y nos muestra probablemente hidrocarburos, el 7 es la muestra estándar de ácido ursólico y el carril 8 es extracto hexánico crudo de *J. regia* en el cual se aprecian varios compuestos, entre ellos el ácido ursólico (Fig. 19).

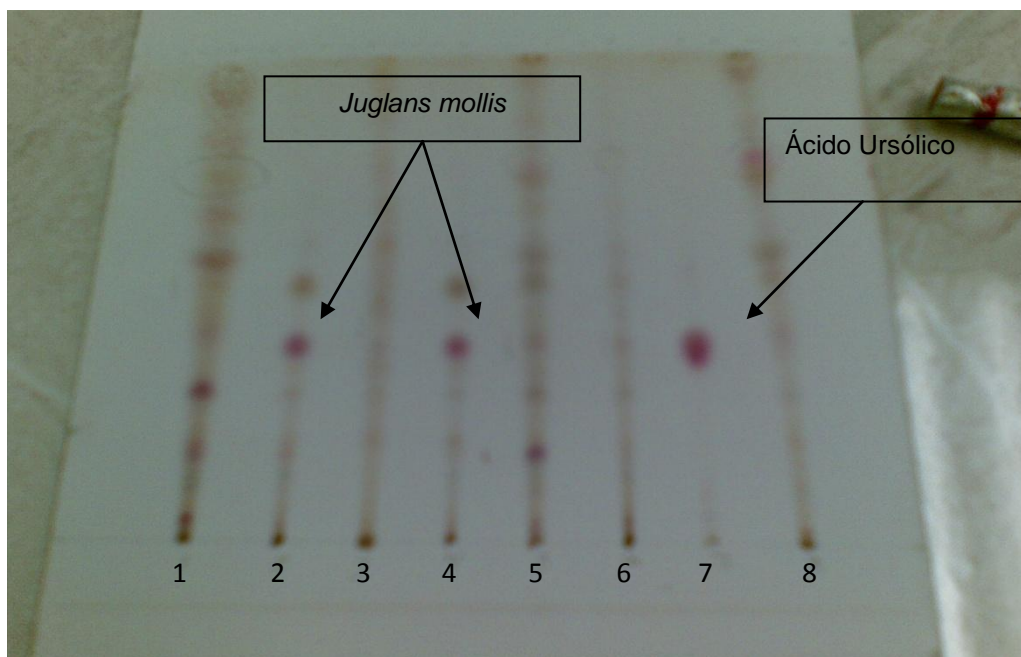


Fig. 19 Cromatografía comparativa del estándar de ácido ursólico y *J. mollis*

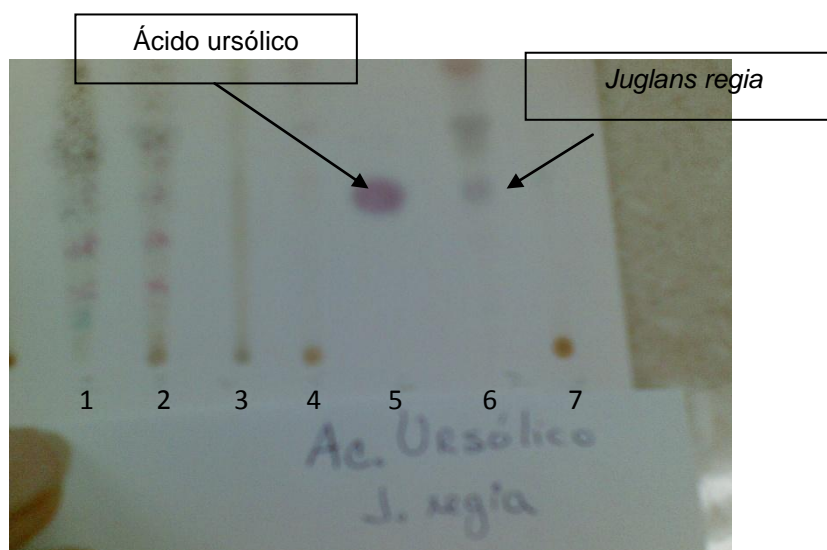


Fig. 20 Cromatografía comparativa entre ácido ursólico y *J. regia*

En el carril 1 se colocó extracto hexánico crudo de *J. regia* y se observan varios compuestos; al extracto se le agregó hexano y se filtró, en el carril 2 se colocó la parte insoluble en hexano y en el carril 3 la porción soluble en

hexano con probable presencia de hidrocarburos; a la fracción soluble en hexano se le agregó acetona y posteriormente se filtró, la fracción insoluble se solubilizó con cloroformo y se colocó en el carril 4, y la fracción soluble en acetona en el carril 6 donde aparece el ácido ursólico; en carril 5 se colocó el estándar del ácido ursólico y en el carril 7 se puso una muestra estándar de juglona (Fig. 20).

Las fracciones fueron obtenidas por medio de cromatografía en capa delgada preparativa a partir de los extractos crudos hexánicos de la corteza de *J. mollis*, siguiendo el procedimiento ya mencionado; donde la fracción 1 presentó un $R_f = 0.57$, la 2 con $R_f = 0.33$ y la 3 con $R_f = 0.31$. Las cuales se llevaron a analizar a un cromatógrafo de gases acoplado a espectro de masas HP 19091 J-433 (Hewlett Packard, Avondale, PA), en ambos extractos se encontraron triterpenos y esteroides como γ -sitosterol, 3-ceto-urs-12-ene, α -amirina, stigmasterol, stigmast-4-en-3-eno y derivados del ácido ursólico, compuestos presentes en otras plantas y que han sido reportados activos contra *M. tuberculosis*.

6.6.1 Fracciones obtenidas del extracto hexánico de *J. mollis*

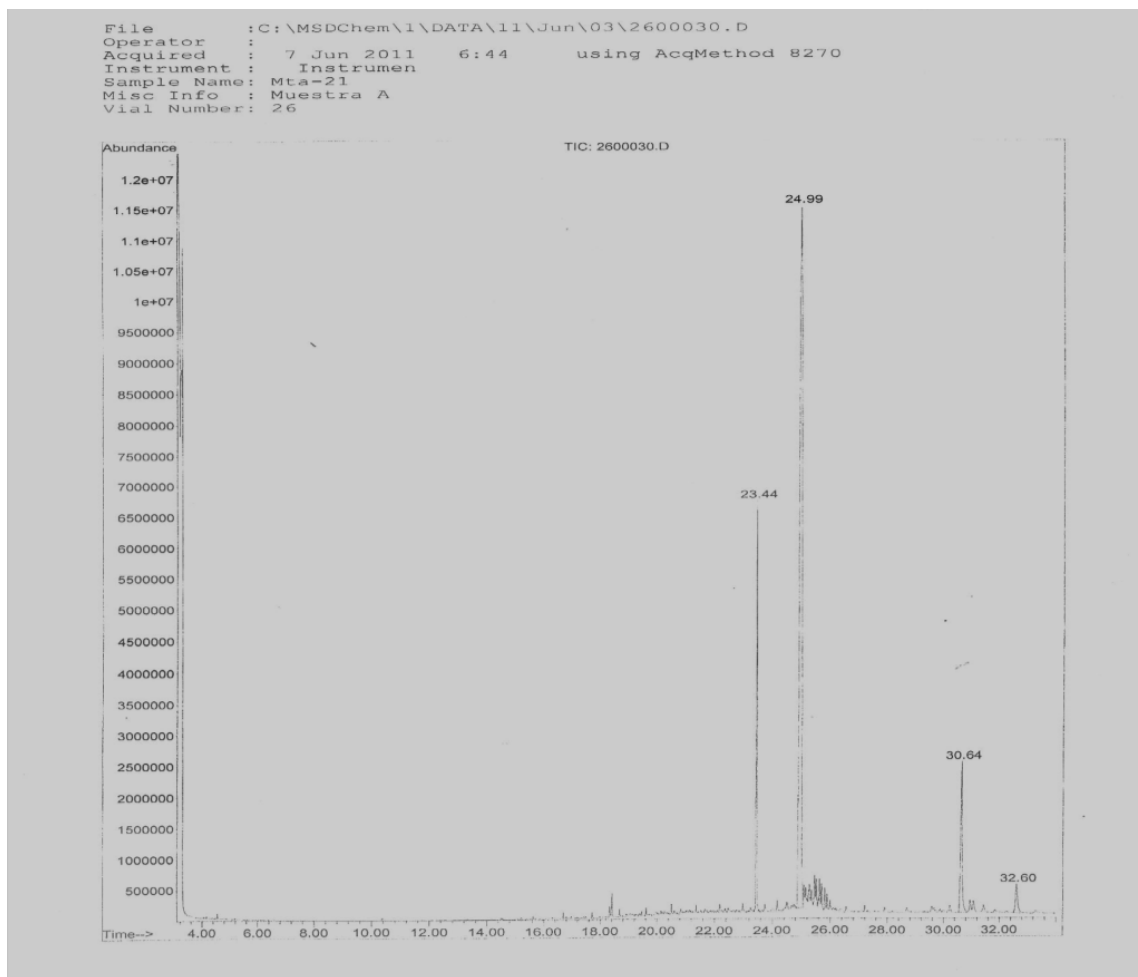


Fig. 21 Cromatograma de la fracción 1 del extracto hexánico de *J. mollis*

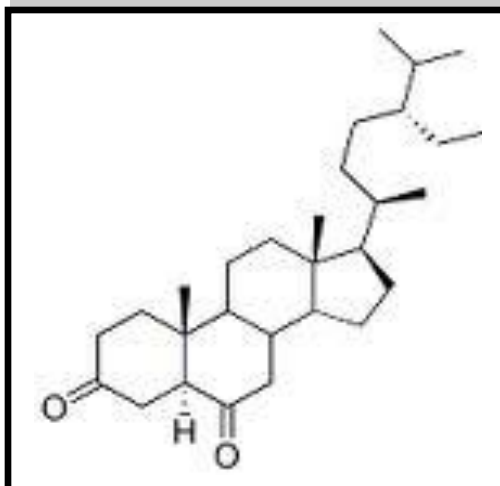
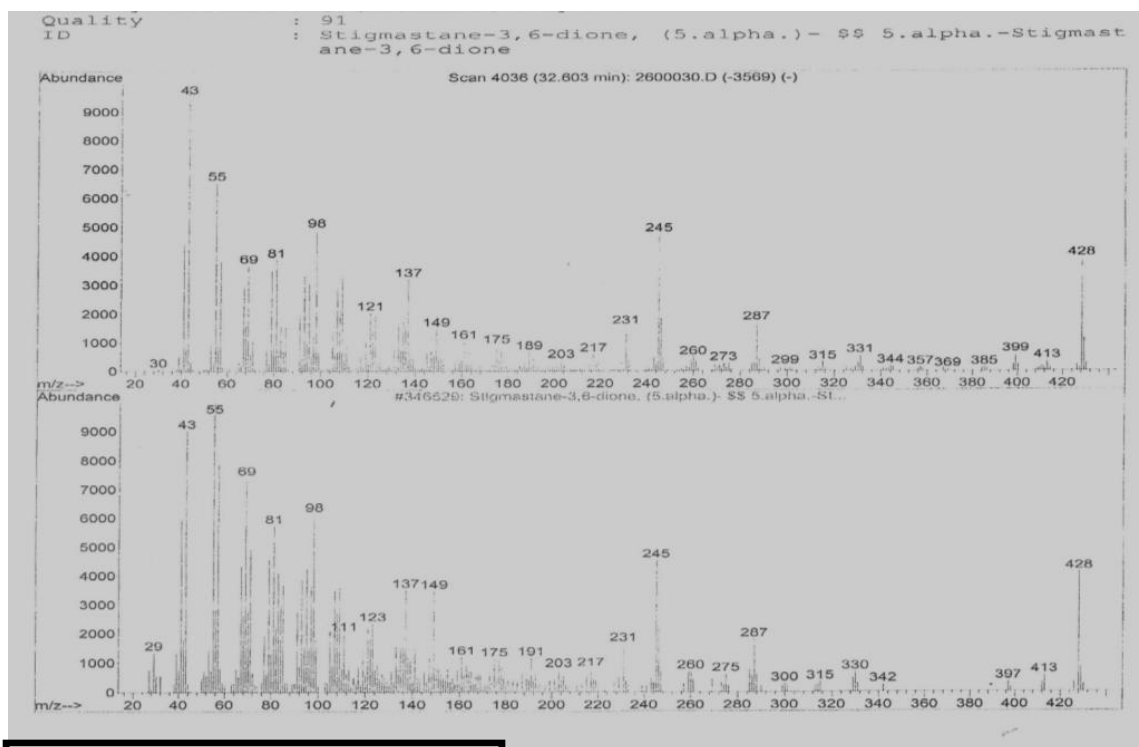


Fig. 22 Stigmastane-3,6-dione

Quality : 97
ID : Stigmast-4-en-3-one (CAS) \$\$ 4-Stigmasten-3-one \$\$.DEL
TA.4-Sitosterol-3-one \$\$ (24R)-4-STIGMASTEN-3-ONE \$\$ Si
tostenone

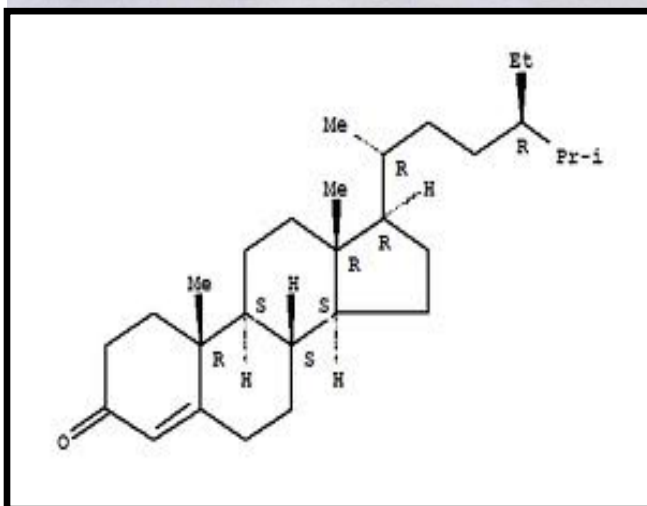
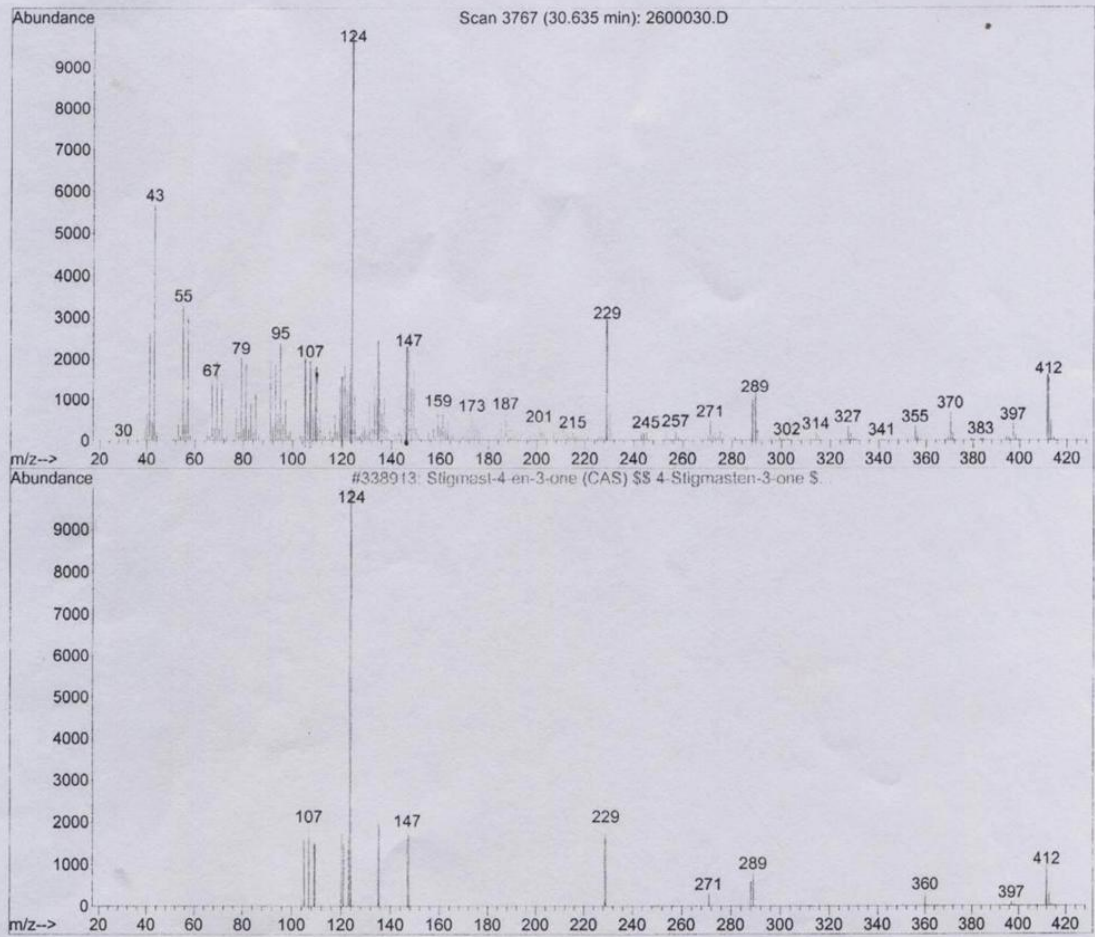


Fig. 23 Stigmast-4-en-3-one

File :C:\MSDCHEM\1\DATA\11\Jun\07\0400006.D
Operator :
Acquired : 7 Jun 2011 15:42 using AcqMethod 8270
Instrument : Instrumen
Sample Name: Mta-03
Misc Info : Muestra M
Vial Number: 4

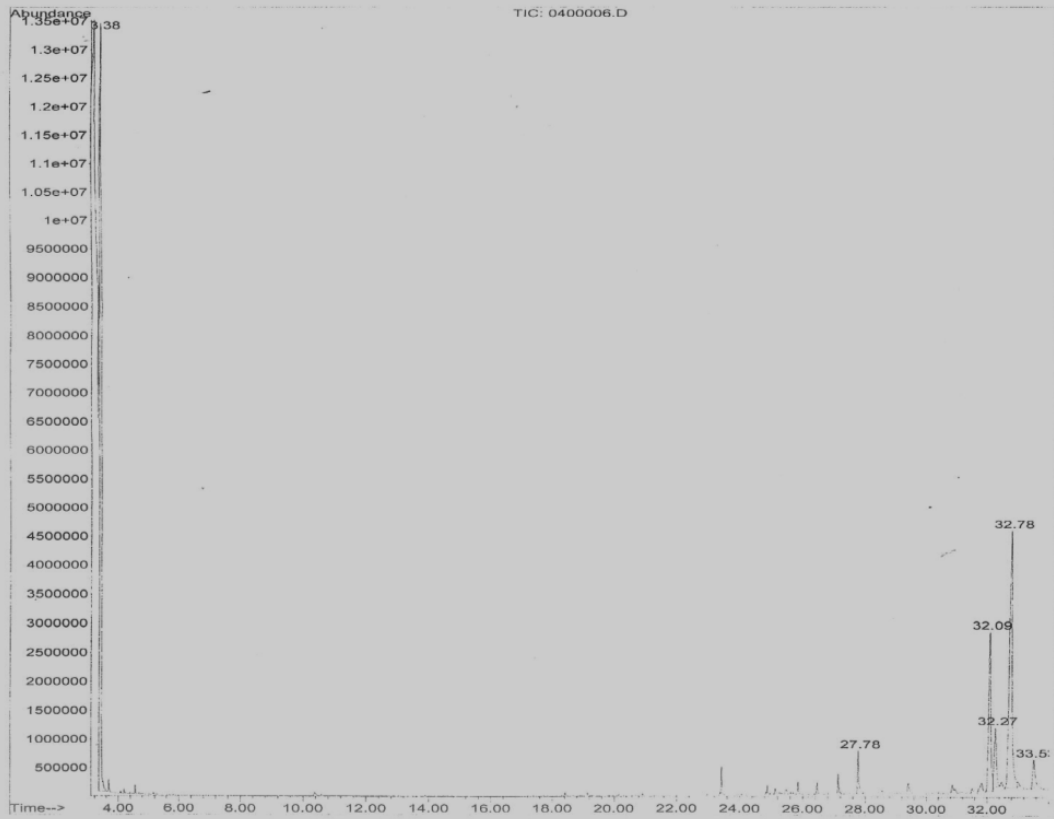


Fig. 24 Cromatograma de la fracción 2 del extracto hexánico de *J. mollis*

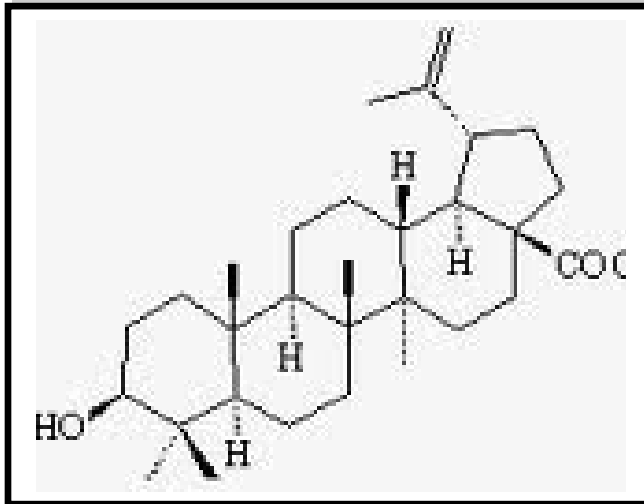
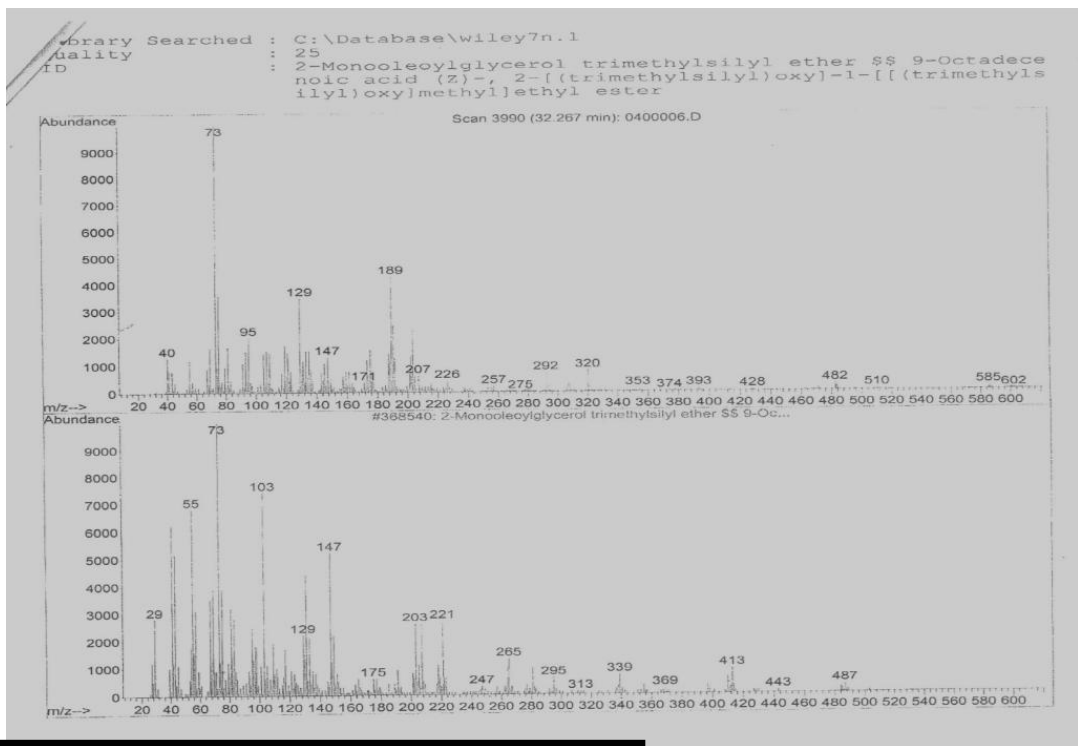


Fig. 25 Ácido betulínico

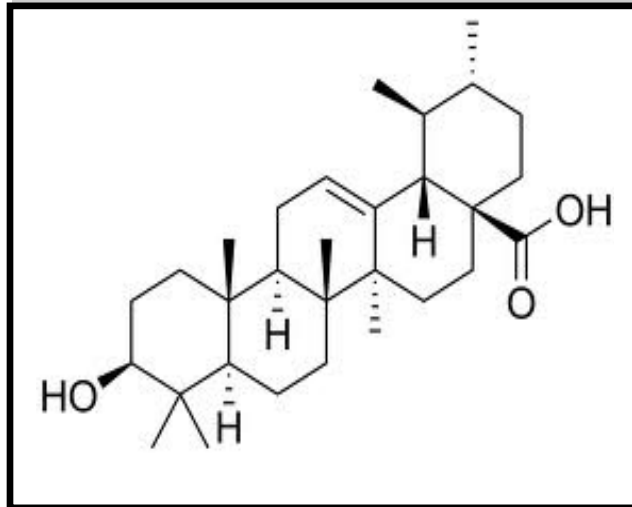
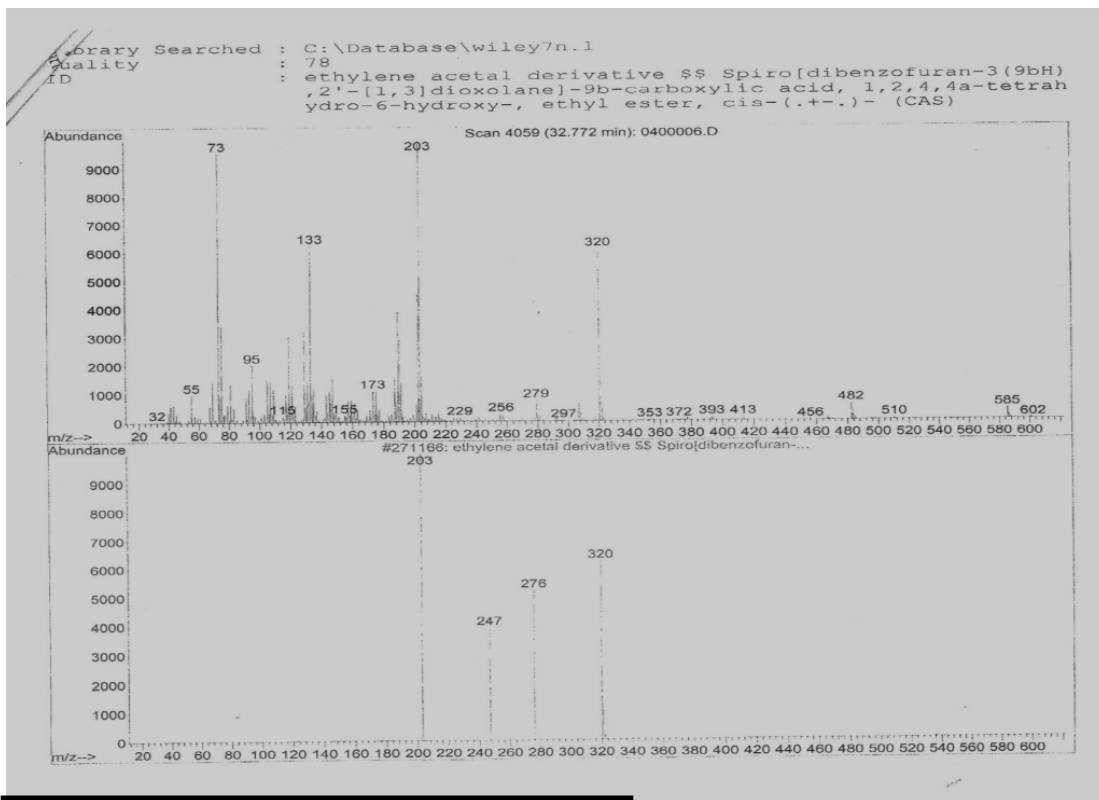


Fig. 26 Ácido ursólico

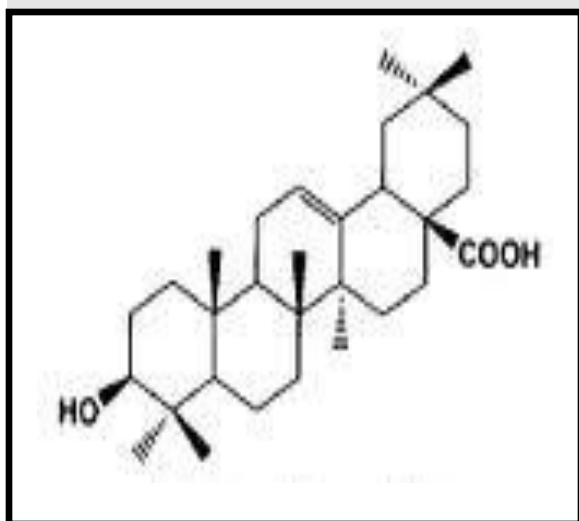
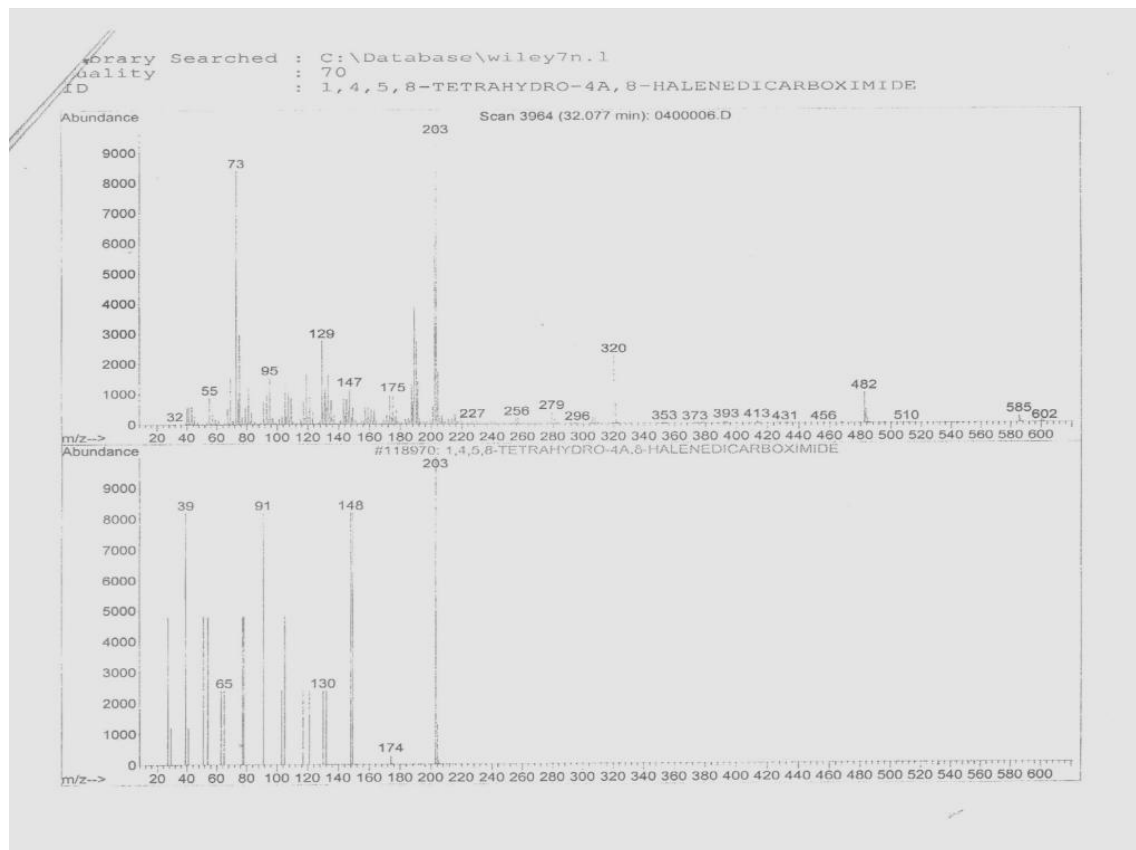


Fig. 27 Ácido oleanólico

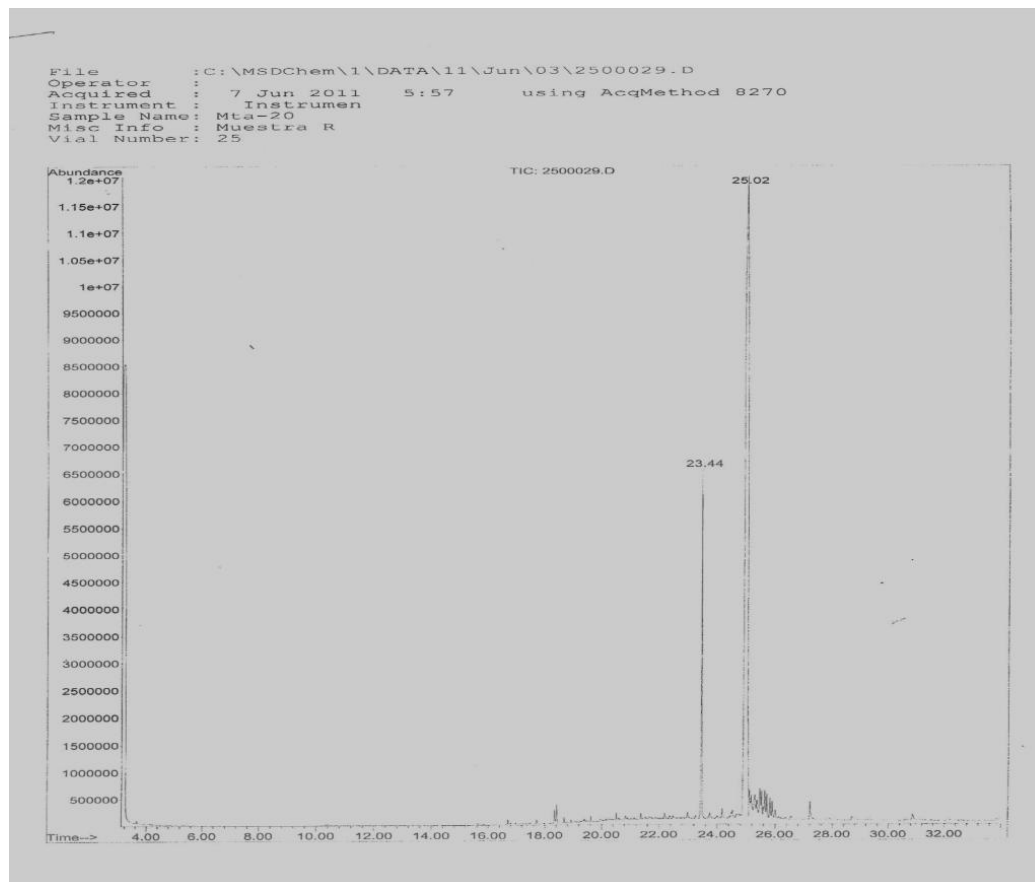


Fig. 28 Cromatograma de la fracción 3 del extracto de *J. mollis*

7.- DISCUSIÓN

La medicina tradicional, aceptada y utilizada por un gran número de personas, es considerada como una forma alternativa en el cuidado de la salud. Los productos naturales de origen vegetal son la mayor fuente de agentes terapéuticos innovadores para el tratamiento de enfermedades, entre ellas las causadas por agentes infecciosos (Altmann, 2001). Por lo que muchos investigadores se han enfocado a buscar en las plantas medicinales compuestos con actividad antimicrobiana (Nostro *et al.*, 2000). Es por esto que utilizando los antecedentes de las investigaciones realizadas por nuestro grupo de trabajo, seleccionamos las dos especies de nogales y analizamos su actividad contra la cepa H37Rv de *M. tuberculosis* (Rosales, 2004; Salinas, 2004)

La tuberculosis es una enfermedad infecciosa con alta morbilidad y mortalidad, y que en las dos últimas dos décadas su incidencia ha aumentado debido en gran parte a un seguimiento inadecuado del tratamiento y a su asociación con la infección con el VIH. Esto ha favorecido la aparición de cepas MDR-TB y XDR-TB que dejan a los pacientes con opciones muy limitadas para su tratamiento. El uso de medicamentos considerados de segunda línea, son más tóxicos y no tan efectivos por lo que el tratamiento se alarga, y aún así de 4 a 6 de cada 10 pacientes mueren, lo cual equivale al mismo porcentaje de pacientes dejados sin tratamiento (WHO, 2004; WHO, 2006; NIAID/NIH, 2006). Esto ha aumentado el interés por la búsqueda y desarrollo de nuevos compuestos antituberculosos. La medicina tradicional es una excelente fuente de agentes provenientes de plantas con potencial actividad contra *M. tuberculosis* (Molina-Salinas *et al.*, 2006; Molina-Salinas *et al.*, 2007; Vongvanich *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2006; Pereira *et al.*, 2005).

Recientemente se reportó que los extractos *B. frutescens*, *C. illinoensis*, *J. regia* y *J. mollis* inhibieron el crecimiento de *M. tuberculosis* con CMIs entre

35 – 125 µg/ml determinado por el método de azul de alamar (Rosales, 2004; Salinas, 2004).

En nuestros estudios utilizamos extractos obtenidos por reflujo con hexano con la finalidad de obtener los triterpenos y otros compuestos no polares. Los rendimientos obtenidos en nuestros extractos muestran muy poca diferencia a las reportadas anteriormente, aunque el tiempo de reflujo varió, de 7 d reportado anteriormente (Rosales, 2004; Salinas, 2004), a 40 h en este trabajo.

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

Los resultados indican que las dos especies de nogales presentan actividad inhibitoria antimicobacteriana, tanto en hojas como en corteza. Los extractos hexánicos de corteza fueron los que presentaron mayor actividad (Cruz-Vega, 2008), por lo cual se decidió continuar el estudio solo con estos extractos. Esto ha sido visto por otros autores que han encontrado la mayor actividad antimicobacteriana en extractos y fracciones hexánicas. Así como reportan Jiménez-Arellanes *et al.* (2003), donde los extractos hexánicos de la planta mexicana *Lantana hispida* mostraron la mayor actividad contra *M. tuberculosis* H37Rv.

Cantrell *et al*, (1999) encontraron triterpenos antimicobacterianos en extracto crudo de *Melia volkensii* presentando una CMI de 100 µg/ml, componentes aislados de estos mismos extractos dieron CMIs de 16, 4 y 16 µg/ml.

La presencia de triterpenos en todos los extractos activos hexánicos de corteza de las dos especies concuerda con los hallazgos de otros autores. Masa Islamcevic y colaboradores (2008) investigaron el contenido de la mezcla de triterpenos: ácido betulínico, ácido oleanólico y ácido ursólico en diferentes especies de Lamiaceae utilizando GC/MS. Ellos reportaron al igual que otros autores la dificultad para separarlos ya que son isómeros estructurales, sin embargo estos compuestos pudieron ser distinguidos por el orden de elusión en la cromatografía de gas y por la intensidad de las señales de los fragmentos en el espectro de masas, en nuestro caso también pudimos identificarlos tomando a éstos como referencia.

La mezcla de ácido betulínico, ácido oleanólico y ácido ursólico ha sido reportada como activa contra *M. tuberculosis* por varios autores, entre ellos Tashihiro Akishisa (2004), Jiménez-Arellanes (2006 y 2010), Kurek (2009) y Camacho-Corona (2009), Truong (2011).

El ácido ursólico (ácido 3β-hidroxiurs-12-en-28-oico) es un triterpenoide derivado de hojas de bayas, flores y frutas de varias plantas medicinales que despliega actividades biológicas varias: muchos reportes describen su actividad antiinflamatoria, antibacteriana, antiulcerosa, antidiabética hepatoprotectora, inmunomoduladora, antiproliferativa, antifúngica, citotóxica y antiviral de amplio espectro (Amico, 2006; Castilla, 2009; Kurek, 2009).

Con respecto a los compuestos encontrados en la fracción No.1, 4-stigamasten-3-ona y Stigmastan-3,6 diona, se tienen referencias con actividad biológica diferente a la antimicobacteriana (Zhao, 2005), sin embargo, esteroides con estructura similar como Stigmast-5-en-3β-ol-7-one, Stigmast-4-ene-6β-ol-3-one, Stigmast-5,22-dien-3β-ol-7-one y Stigmast-4,22-dien-6β-ol-3-one, encontrados en la parte aérea de *Thalia*

multiflora, se reportan con propiedades antituberculosas (Gutierrez-Lugo *et al.* 2005; Rukachaisirikul, 2007). Otros de los esteroides encontrados en los extractos de *J. mollis*, como el fitol y el β -sitosterol han sido reportados con inhibición en el crecimiento de *M. tuberculosis* (Rajab, 1998; Tan *et al.*, 2007)

La presencia de otros grupos orgánicos como lactonas, sesquiterpenlactonas, cumarina, flavonoides, alcaloides, oxhidrilos fenólicos, presentaron una gran variabilidad entre los extractos, en comparación a los triterpenos detectados, principalmente el ácido ursólico, entre los extractos de corteza de los dos nogales. Sin embargo, nuestros resultados se orientan hacia los triterpenos en cuanto grupo orgánico responsable de las actividades antimicobacterianas encontradas en los extractos hexánicos de corteza de las dos especies, sin descartar la posibilidad de quinonas, como por ejemplo, juglona, como responsables de la actividad de algunos de nuestros extractos activos y que ha sido reportada en *Juglans regia* por Jakopic (2009) y Cosmulescu (2011).

Este trabajo contribuye al conocimiento de los componentes químicos de dos especies de nogales, los antecedentes encontrados y los compuestos aislados, nos indican que el género *Juglans* contiene varias sustancias con actividad contra *M. tuberculosis*, lo que nos hace suponer que existe una sinergia entre ellos y que su interacción provoque un aumento en su actividad antimicobacteriana, por lo cual con estos resultados se valida el uso dado, durante siglos, a los nogales en el tratamiento de la tuberculosis.

8.- CONCLUSIONES

- Los extractos hexánicos de corteza de *J. regia* y *J. mollis* presentaron una CMI de 125 y 500 µg/ml respectivamente contra *M. tuberculosis*.
- Los extractos hexánicos de ambas especies presentaron una CL₅₀ mayor de 1000 ppm, sobre *Artemia salina*, lo que indica que no presentan toxicidad.
- El extracto crudo de *J. regia* contiene: γ-sitosterol, 3-ceto-urs-12-eno y α-amirina.
- Del extracto hexánico de *J. mollis* se aislaron 3 fracciones, en la No. 1 se identificaron: 4-stigmasten-3-ona y stigmastan-3,6-diona, la No. 2 corresponde a tres triterpenos: ácido betulínico, ácido oleanólico y ácido ursólico, y la No. 3 no fue identificada.
- La fracción que contiene 4-stigmasten-3-ona y stigmastan-3,6-diona del extracto hexánico de *J. mollis* presentó una CMI de 500 µg/ml.
- Los resultados obtenidos validan el uso de los nogales en medicina tradicional (etnobotánica) en el tratamiento de la tuberculosis.

9.- LITERATURA CITADA

1. Abbas, A., Litchman, A. 2004. Inmunología Celular y Molecular. Quinta Edición. Elsevier. Madrid, España.
2. Akihisa, T., Franzblau, S., Uriya, M., Okuda, H., Zhang, F., Yasukawa, K., Suzuki, T., Kimura, Y. 2005. Antitubercular Activity of triterpenoids from Asteraceae Flowers. *Biol. Pharm. Bull.* 28(1):158-160.
3. Alcaide, F., Esteban, J., González, J., Palacios, JJ. 2005. Procedimientos en Microbiología Clínica: 9^a Micobacterias.Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.
4. Altmann KH 2001. Microtubule-stabilizing agents: a growing class of important anticancer drugs. *Curr Opin Chem Biol* 5: 424-431.
5. Amico, V., Barresi, V., Condorelli, D., Spatafora, C., Tringali, C. 2006. Antiproliferative Terpenoids from Almond Hulls (*Prunus dulcis*): Identification and Structure-Activity Relationships. *J. Agric. Food Chem.* 54(3):810-814.
6. Bloom, B.R. 1994. Tuberculosis, Pathogenesis, Protection, and Control. ASM PRESS. Washington DC. pag. 62.
7. Borges-Argáez, R., Canche-Chay, C., Peña-Rodríguez, L., Said-Fernández, S., Molina-Salinas, G. 2007. Antimicrobial activity of *Diospyros anisandra*. *Phytoterapy.* 78(5):370-372.
8. Camacho-Corona, M., Favela-hernández, J., González-Santiago, O., Garza-González, E., Molina-Salinas, G., Said-Fernández, S., Delgado, G., Luna-Herrera, J. 2009. Evaluation of some plant-derived secondary metabolites against sensitive and multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Mex. Chem. Soc.* 53(2):71-75.
9. Camacho-Corona, M., Ramírez-Cabrera, M., González-Santiago, O., Garza-González, E., Palacios, I., Luna-Herrera, J. 2008. Activity against

drug resistant-tuberculosis strains of plants used in Mexican traditional medicine to treat tuberculosis and other respiratory diseases. *Phytother. Res.* 22, 82-85.

10. Cantrell, C.L., M.S. Rajab, S.G. Franzblau, y N.H. Fisher, 1999. Antimycobacterial Triterpenes from *Melia volkensii*. *Journal of Natural Products*, 62: 546 – 548.
11. Castilla, V., Ramírez, J., Coto, C. 2009. Prospectiva del uso de esteroides de plantas como antivirales. *Rev. Química Viva*. No. 1 año 8.
12. Chen, J., Wu, H., Peng, C., Chen. I., Chu, S. 2009. seco-Abietane Diterpenoids, a Phenylethanoid Derivative, and Antitubercular Constituents from *Callicarpa pilosissima*. *J. Nat. Prod.* 72(2):223-228.
13. Chen, J.J., Peng, C.F., Huang H. Y., Chen I.S. 2006. Benzopyrans, biphenyls and xanthenes from the root of *Garcinia linii* and their activity against *Mycobacterium tuberculosis*. *Planta Med.* 72: 473 – 477.
14. Chopra, I., Brennan, P. 1997. Molecular action of anti-micobacterial agents. *Tuber. Lungs. Dis.* 78(2):89-98.
15. Collins, L.A., S.G. Franzblau, 1997. Microplate Alamar Blue Assay versus BACTEC 460 System for High-Throughput Screening of Compounds against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium*. *Antimicrobial agents and Chemotherapy*, p. 1004 – 1009.
16. Copp, BR. 2003. Antimycobacterial natural products. *Nat. Prod. Rep.* 20(6):535-57.
17. Copp, BR., Pearce, AN. 2007. Natural product growth inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat. Prod. Rep.* 24(2):278-97.
18. Cowan, M.M., 1999. Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(4): 564 – 582.
19. Cruz-Vega, N Salinas Gonzalez, B Rosales Hernandez, J Castro-Garza, MJ Verde-Star, I Estrada-García, P Mendes-Aragón, P Carranza-Rosales and MT González-Garza. 2008. *In vitro* antimycobacterial activity of *Juglans regia* L., *Juglans mollis* Engelm., *Carya illinoensis* K. Koch, and *Bocconia frutescens* L. *Phytother Res.* 22(4): 557 – 559.

20. Cusmulescu, S., Trandafir, I., Achim, G., Baciú, A. 2011. Juglone Content in Leaf and Green husk of Five Walnut (*Juglans regia* L.) Cultivars. Not. Bot. Hort. Agrobot. Cluj. 39(1):237-240.
21. Dannenberg, Jr, A., Rook, G. 1994. Pathogenesis of pulmonary tuberculosis: an interplay of tissue-damaging and macrophage-activating immune responses-dual mechanisms that control bacillary multiplication. Tuberculosis, Pathogenesis, Protection, and Control. Pp. 459-483. Editado por Bloom, B.R. Washington, DC, USA. ASM.
22. Das, K., Tiwari, R., Shrivastava, D. 2010. Técnicas de evaluación de productos de plantas medicinales como agentes antimicrobianos: Los métodos actuales y tendencias futuras. Revista de Investigación de plantas medicinales. 4(2):104-111.
23. Deng, S., Wang, Y., Unui, T., Chen, S., Farnsworth, N., Cho, S., Franzblau, S., Pauli, G. 2008. Anti-TB polyynes from the roots of *Angelica sinensis*. Phytother. Res. 22(7):878-882.
24. Domínguez X. A. 1973. Métodos de investigación científica. 1ª Edición. Editorial Limusa. S. A. México.
25. Edwards, D., Kirkpatrick, C. 1986. The immunology of mycobacterial diseases. Am. Rev. Respir. Dis. 134:1062-1071.
26. Fenton, M., Vermeulen, M. 1996. Immunopathology of tuberculosis: roles of macrophages and monocytes. Infect. Immun. 64:683-690.
27. Fontanay, S., Grare, M., Mayer, J., Finance, C., Duval, RE. 2008. Ursolic, oleanolic and betulinic acids: antibacterial spectra and selectivity indexes. J. Ethnopharmacol. 120(2):272-6.
28. Franzblau S.G., Witzig R.S., McLaughlin J.C., Torres p., Madico G., Hernandez A., et al. 1998. Rapid low-technology MIC determination with clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates by using the microplate Alamar Blue assay. J Clin Microbiol 36: 362 – 366.
29. García-Ramos, R., LadoLado, F., Túnez-Bastida, V., Pérez, M., Cabarcos, A. 2003. Tratamiento actual de la tuberculosis. An. Med. Interna. SciELO. España.

30. Gómez-Flores, R., Calderon, C., Scherbel, L., Tamez-Guerra, P., Rodríguez-Padilla, C., Tamez-Guerra, R., Weber, R. 2000. Immunoenhancing properties of *Plantago major* leaf extracts. *Phytother. Res.* 14(8):617-622.
31. Gu, J., Wang, Y., Franzblau, S., Montenegro, G., Timmermann, B. 2004. Constituents of *Senecio chionophilus* whit Potential Antitubercular Activity. *J. Nat. Prod.* 67(9):1483-1487.
32. Gutierrez-Lugo, m., Wang, Y., Franzblau, S., Suarez, E., Timmermann, B. Antitubercular sterols from *Thalia multiflora* Horkel ex Koernicke. , *Phytother. Res.* 19(10):876-880
33. Higuchi, C., Sannomiya, M., Pavan, F., Leite, S., Sato, D., Franzblau, S., Sacramento, L., Vilegas, W., Leite, C. 2008. *Byrsonima fagifolia* Niedenzu Apolar Compounds whit Antitubercular Activity. *Oxford Journals.*
34. <http://www.conabio.gob.mx/medicinatradicional.2002>
35. <http://www.niaid.nih.gov/factsheets/tb.htm> (NIAID/NIH, 2006)
36. Hussein, A., Meyer, J., Jimeno, M., Rodríguez, B. 2007. Bioactive Diterpenes from *Orthosiphon labiatus* and *Salvia africana-lutea*. *J. Nat. Prod.* 70(2): 293-295.
37. Instituto Nacional Indigenista. 1989. Atlas de las plantas de la medicina tradicional Mexicana. México, D.F.
38. Islamcevic-Razborsek, M., Voncina, DB., Dolecek, V., Voncina, E. 2008. Determination of Oleanolic, Betulinic and Ursolic Acid in Lamiaceae and mass spectral fragmentation of their trimethylsilylated derivatives. *Chromatographia.* 67 (No. 5/6).
39. Jakopic, J., Veberic, R., Stampar, F. 2009. Extraction of phenolic compounds from green walnut fruits in different solvents. *Acta agriculturae Slovenica.* 93(1):11-15.
40. Jimenez-Arellanes, A., M. Meckes, R. Ramírez, J. Torres, y J. Luna-Herrera, 2003. Activity against Multidrug-resistant *Mycobacterium*

- tuberculosis* in Mexican plants Used to Treat Respiratory Diseases. *Phytotherapy Research*. 17: 903 – 908.
41. Jiménez-Arellanes, A., Meckes, M., Torres, J., Luna-Herrera, J. 2006. Antimycobacterial triterpenoids from *Lantana hispida*. *J. Ethnopharm.* 111:202-205.
 42. Jiménez-Arellanes, M., Cornejo, J., León, R. 2010. Las plantas medicinales mexicanas como fuente de compuestos antimicobacterianos. *Redalyc*. Vol. 41, No. 1:22-29.
 43. Kaufmann, S. 2002. Protection against tuberculosis: cytokinesis, T cells and macrophages. *Ann. Rheum. Dis.* 61:54-58.
 44. Kim, C., Griffiths, W., Taylor, P. 2009. Components derived from *Pelargonium* stimulate macrophage killing of *Mycobacterium* species. *J. Appl. Microbiol.* 106(4):1184-1193.
 45. Kolodziej, H., Kayser, O., Radtke, O., Kiderlen, A., Koch, E. 2003. Pharmacological profile of extracts of *Pelargonium sidoides* and their constituents. *Phytomed.* 10(4):18-24.
 46. Kurek, A., Grudniak, A., Szwed, M., Klicka, A., Samluk, L., Wolska, K., Janiszowska, W., Popowska, M. 2010. Oleanolic acid and ursolic acid affect peptidoglycan metabolism in *Listeria monocytogenes*. *Antonie van Leeuwenhoek*. 97:61-68.
 47. León-Díaz, R., Meckes, M., Said-Fernández, S., Molina-Salinas, G., Vargas-Villarreal, J., Torres, J., Luna-Herrera, J., Jiménez-Arellanes, A. 2010. Antimycobacterial neolignans isolated from *Aristolochia taliscana*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* vol. 105 No. 1.
 48. Liu, J. 1995. Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. *J. ethnopharmacol.* 49(2):57-68.
 49. López, S. 2009. El efecto inmunomodulador del ácido oleanólico y ácido ursólico sobre macrófagos humanos. Tesis. IPN.
 50. Maneerat, W., Laphookhieo, S., Koysoomboon, S., Chantrapromma, K. 2008. Antimalarial, antimycobacterial and cytotoxic limonoids from *Chisocheton siamensis*. *Phytomed.* 15(12):1130-1134.

51. Martínez ML., Labuckas, DO., Lamarque, AL., Maestri, DM. 2010. Walnut (*Juglans regia* L.): genetic resources, chemistry, by-products. J. Sci. Food Agric. 90(12):1959-67.
52. Martínez, M. 1979. Plantas Mexicanas, Catálogo de Nombres Vulgares y Científicos. Fondo de Cultura Económica. México.
53. Martínez, M., Labuckas, D., Lamarque, A., Maestri, D. 2010. Walnut (*Juglans regia* L.): genetic resources, chemistry, by-products. J. Sci. Food Agric. 90(12):1959-1967.
54. Martins, M., Schelz, Z., Martins, A., Hajos, G., Riedl, Z., Viveiros, M., Yalcin, I., Aki-Sener, E., Amaral, L. 2007. *In vitro* and *ex vivo* activity of thioridazine derivatives against *Mycobacterium tuberculosis*. Int. J. Antimicrob. Agents. 29:338-340.
55. Mativandlela, S., Meyer, J., Hussein, A., Houghton, P., Hamilton, C., Lall, N. 2008. Activity against *Mycobacterium smegmatis* y *M. tuberculosis* by extract of South African medicinal plants. Phytother. Rev. 22(6):841-845.
56. Meyer B.N., Ferrigni N.R., Putnam J.E., Jacobsen L.B., Nichols D.E., McLaughlin J.L. 1982. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. Plant Med. 45: 31 -34.
57. Molina-Salinas, G.M., Pérez-López, A., Becerril-Montes, P., Salazar-Aranda, R., Said-Fernández, S., de Torres, N.W. 2007. Evaluation of the flora of northern México for *in vitro* antimicrobial and antituberculosis activity. J. Ethnopharmacol. 109: 435 -441.
58. Molina-Salinas, G.M., Ramos-Guerra M.C., Vargas-Villarreal, J., Mata-Cardenas, B.D., Becerril-Montes, P., Said-Fernández, S. 2006. Bactericidal activity of organic extracts from *Flourensia cernua* DC against strains of *Mycobacterium tuberculosis*. Arch med res. 37: 45 -49.
59. Morbidoni, H. 2004. Tuberculosis: un viejo enemigo. Revista Química Viva. No. 3, año 3.
60. Mujovo, S., Hussein, A., Meyer, J., Muthivhi, T., Lall, N. 2008. Bioactive compounds from *Lippia javanica* and *Hoslundia opposita*. Nat. Prod. Res. 22(12):1047-1054.

61. Ncube, N., Afolayan, A., Okoh, A. 2008. Assessment techniques of microbial properties of natural compounds of plant origin: current methods and future trends. *African J. of Biotech.* 7(12):1797-1806.
62. Noro, J., Barrows, L., Gideon, O., Ireland, C., Koch, M., Maitainaho, T., Piskau, P., Pond, C., Bugni, T. 2008. Tetrahydroxysqualene from *Rhus taitensis* shows antimycobacterial activity against *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Nat. Prod.* 7(9):1623-1624.
63. Nostro, A., M.P. Germano, V. D'Angelo, A. Marino, and M.A. Cannatelli, 2000. Extraction Methods and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity. *Letters in Applied Microbiology.* 30: 379 – 384.
64. Organización Panamericana de la Salud. 1993. Epidemiological status of TB (Region of the Americas).
65. Palomino J.C., F. Portaels, 1999. Simple Procedure for Drug Susceptibility Testing of *Mycobacterium tuberculosis* Using a Commercial Colorimetric Assay. *Eur J Clin Microbiol Dis* 18: 380 – 383.
66. Pan, P., Cheng, M., Peng, C., Huang, H., Chen, J., Chen, I. 2010. Secondary Metabolites from the Roots of *Litsea hypophaea* and Their Antitubercular Activity. *J. Nat. Prod.* 73(5):890-896.
67. Pereira C.G., Leal, P.F., Sato, D.N., Meireles, M.A. 2005. Antioxidant and antimycobacterial activities of *Tabernaemontana catharinensis* extract obtained by supercritical CO₂ + cosolvent. *J Med Food.* 8: 533 – 538.
68. Quattrocchi, O., S. Abelarra & R. Laba. 1992. Introducción a la HPLC, aplicación y práctica. Artes Gráficas Farro, Buenos Aires, 422 pp.
69. Robbins, S., Cotran, R., Kumar, V. 2004. Patología Humana. Séptima Edición. Elsevier. Madrid, España.
70. Rook, G., Hernández-Pando, R. 1996. The Pathogenesis of tuberculosis. *Annu. Rev. Microbiology.* 50:259-284.
71. Rosales-Hernandez B. 2004. Actividad antimicobacteriana sobre *Mycobacterium tuberculosis* y/o activadora de macrófagos de extractos de plantas mexicanas conocidas como gordolobo. *Respyn. Ed. Esp. No. 4.*

72. Rossman, M., MacGregor, R. 1996. Tuberculosis. Ed. Mc Graw Hill Interamericana. Philadelphia, PA.
73. Rukachaisirikul, T., Saekee, A., Tharibun, C., Watkuolham, S., Suksamrarn, A. 2007. Biological activities of the chemical constituents of *Erythrina stricta* and *Erythrina subumbrans*. Arch. Pharm. Res. 30(11):1398-1403.
74. Salinas G.N. 2004. Análisis de la actividad de extractos crudos de *Juglans regia L*, *Juglans mollis* y *Carya illinoensis* contra *Mycobacterium tuberculosis*. FCB. UANL.
75. Sanabria-Galindo A., López S.I., Gualdrón R. 1997. Estudio fitoquímico preliminar y letalidad sobre *Artemia salina* de plantas colombianas. Rev. Col. Cienc. Quim. Farm. 26: 15 – 19.
76. Sharpe, H.M., Woollett, E.A., and Cuthbertson, W.F.J. 1950. Nature, London. 166: 651.
77. Smith, I. 2003. *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis and molecular determinants of virulence. Clin. Microbiol. Rev. 16:463-496.
78. Stavr, M., Paton, A., Skelton, A., Gibbons, S. 2009. Antibacterial Diterpenes from *Plectranthus ernstii*. J. Nat. Prod. 72(6):1191-1194.
79. Suksamrarn, A., Poomsing, P., Aroonrerk, N., Punjanon, T., Suksamrarn, S., Kongkun, S. 2003. Antimycobacterial and antioxidant flavones from *Limnophila geoffrayi*. Arch. Pharm. Res. 26:816-820.
80. Suksamrarn, A. 2007. Biological activities of the chemical constituents of *Erythrina stricta* and *Erythrina subumbrans*. Arch Pharm Res. 30(11):1398-403.
81. Tan, MA., Takayama, H., Aimi, N., Kitajima, M., Franzblau, SG., Nonato, MG. 2008. Antitubercular triterpenes and phytosterols from *Pandanus tectorius* Soland. Var. laevis. J. Nat. Med. 62(2);232-5.
82. Ting, L., Kim, A., Cattamanchi, A., Ernst, J. 1999. *Mycobacterium tuberculosis* inhibits INF- γ transcriptional responses without inhibiting activation of STAT1. J. Immunol. 3898-3906.

83. Trease, G.E., Evans, W.C., 1987. Tratado de Farmacognosia. Interamericana, México, D.F., p 846.
84. Truong, N., Pham, C., Doan, H., Nguyen, C., Nguyen, H., Zhang, H., Fong, H., Franzblau, S., Soejarto, D., Chau, M. 2011. Antituberculosis Cycloartane Triterpenoids from *Radermachera boniana*. J Nat Prod. 74(5):1318-1322.
85. Tuberculosis Pulmonar. Guías Diagnósticas de Neumología. Hospital General de México.
86. Valdez-Aguilar, R., 2001. Plantas Medicinales. Guía México Desconocido, Edición Especial, 4: 7-8.
87. Valdez-Iglesias O., Díaz N., Cabranes Y., Acevedo M.E., Areces A.J., Graña L., et. al. 2003. Macroalgas de la plataforma insular cubana como fuentes de extractos bioactivos. Avicennia. 16: 36 – 45.
88. Vongvanich, N., Kittakoop, P., Charoenchai, P., Intamas, S., Sriklung, K., Thebtaranonth, Y. 2006. Antiplasmodial, antimycobacterial, and cytotoxic principles from *Camchaya calcarea*. Planta med. 72(15):1427-1430.
89. Wayne, L. 1994. Cultivation of *Mycobacterium tuberculosis* for research purposes. In tuberculosis, Pathogenesis, Protection, and Control. Pp. 73-83.
90. Woldemichael, G., Franzblau, S., Zhang, F., Wang, Y., Timmermann, B. 2003. Inhibitory effect of sterols from *Ruprechtia triflora* and diterpenes from *Calceolaria pinnifolia* on the growth of *Mycobacterium tuberculosis*. Planta Med. 69:628-631.
91. World Health Organization. 2003. Día mundial de la tuberculosis 2003.
92. World Health Organization. 2004. Tuberculosis. Fact Sheet No104.
93. World Health Organization. 2006. Emergence of XDR-TB.
94. World Health Organization. 2010. Global tuberculosis control 2010
95. World Health Organization. 2010. Tuberculosis. Fact Sheet No104.
96. Wu, M., Peng, C., Chen, I., Tsai, I. 2011. Antitubercular Chromones and Flavonoids from *Pisonia aculeate*. J. Nat. Prod. 74(5):976-982.

97. Yajko, D.M., J.J. Mady, M.V. Lancaster, C.A. Sanders, V.L. Cawthon, B. Gee, A. Babst, W.K. Hadley. 1995. Colorimetric Method for Determining MICs of Antimicrobial Agents for *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 33: 2324 – 2327.
98. Yeung, M., Lau, C., Chan, R., Zong, Y., Che, C. 2009. Search for Antimycobacterial Constituents from Tibetan Medicinal Plant, *Gentianopsis paludosa*. *Phytother. Res.* 23:123-125.
99. Zhao, C., Shao, J., Li, X. 2009. Chemical constituents from fruits of *Ailanthus altissima*. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi.* 34(17):2197-2199.