

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

SUBDIRECCIÓN DE POSGRADO



**EVALUACIÓN FITOQUÍMICA Y MICROBIOLÓGICA DE EXTRACTOS  
DE *Carya illinoensis* y *Juglans mollis* Y SU INCORPORACIÓN EN  
NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS PARA SU POTENCIAL  
APLICACIÓN COMO AGENTE ANTITUBERCULOSO**

TESIS

Que presenta

M.C. MARÍA DE LOS ANGELES SÁENZ ESQUEDA

Como requisito parcial para obtener el grado de DOCTOR EN CIENCIAS con  
Acentuación en Química de Productos Naturales

Junio 2012

**EVALUACIÓN FITOQUÍMICA Y MICROBIOLÓGICA DE EXTRACTOS  
DE *Carya illinoensis* y *Juglans mollis* Y SU INCORPORACIÓN EN  
NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS PARA SU POTENCIAL  
APLICACIÓN COMO AGENTE ANTITUBERCULOSO**

Comité de Tesis

---

Presidente: Dr. Abelardo Chávez Montes

---

Secretario: Dr. Sergio A. Galindo Rodríguez

---

Vocal: Dr. Ricardo Gómez Flores

---

Vocal: Dra. María Julia Verde Star

---

Vocal: Dra. Azucena Oranday Cárdenas

Nuestra recompensa se encuentra en el esfuerzo  
y no en el resultado.

Un esfuerzo total es una victoria completa.

**Mahatma Gandhi**

## La alegoría del carruaje IV

Adelante el sendero se abre en abanico. Por lo menos cinco rumbos diferentes se me ofrecen. Ninguno pretende ser elegido, solo están allí. Un anciano está sentado sobre una piedra, en la encrucijada.

Me animo a preguntar:

-¿En qué dirección, anciano?

-Depende de lo que busques –me contesta sin moverse.

-Quiero ser feliz –le digo.

-Cualquiera de estos caminos te puede llevar en esa dirección.

Me sorprendo:

-Entonces... ¿da lo mismo?

-No.

-Tú dijiste...

-No. Yo no dije que cualquiera te llevaría; dije que cualquiera puede ser el que te lleve.

-No entiendo.

-Te llevará el que elijas, si eliges correctamente.

-¿Y cuál es el camino correcto?

El anciano se queda en silencio.

Comprendo que no hay respuesta a mi pregunta.

Decido cambiarla por otras:

-¿Cómo podre elegir con sabiduría? ¿Qué debo hacer para no equivocarme?

Esta vez el anciano contesta:

-No preguntes... No preguntes.

Allí están los caminos.

Sé que es una decisión importante. No puedo equivocarme...

El cochero me habla al oído, propone el sendero de la derecha.

Los caballos parecen querer tomar el escarpado camino de la izquierda.

El carruaje tiende a deslizarse en pendiente, recto, hacia el frente.

Y yo, el pasajero, creo que sería mejor tomar el pequeño caminito elevado del costado.

Todos somos uno y, sin embargo, estamos en problemas.

Un instante después veo como, muy despacio, por primera vez con tanta claridad, el cochero, el carruaje y los caballos se funden en mí. También el anciano deja de ser y se suma, se agregan los caminos recorridos hasta aquí y cada una de las personas que conocí.

No soy nada de eso, pero lo incluyo todo. Soy yo el que ahora, completo, debe decidir el camino. Me siento en el lugar que ocupaba el anciano y me tomo un tiempo, simplemente el tiempo que necesito para tomar esa decisión. Sin urgencias. No quiero adivinar, quiero elegir.

Llueve. Me doy cuenta de que no me gusta cuando llueve. Tampoco me gustaría que no lloviera nunca. Parece que quiero que llueva solamente cuando tengo ganas. Y sin embargo, no estoy muy seguro de querer verdaderamente eso. Creo que solo asisto a mi fastidio, como si no fuera mío, como si yo no tuviera nada que ver. De hecho no tengo nada que ver con la lluvia. Pero es mío el fastidio, es mía la no aceptación, soy yo el que está molesto.

¿Es por mojarme?

No.

Más adelante también llueve.

Que importa si las gotas me mojan un poco, importa el camino.

No importa llegar, importa el camino.

En realidad nada importa, solo el camino.

## AGRADECIMIENTOS

Son muchas las personas especiales a las que me gustaría agradecer su amistad, apoyo, ánimo y compañía en esta etapa de mi vida. Algunas aun están aquí conmigo y otras en mis recuerdos y en el corazón. Sin importar donde estén o si alguna vez llegan a leer estas líneas quiero darles las gracias por formar parte de mí y por todo lo que me han brindado y por todas sus bendiciones.

Primeramente le agradezco a Dios por el maravilloso don de la vida, por todo lo bueno y lo malo que has puesto en mi camino.

A mi familia, por ser mi apoyo a lo largo de este camino, por brindarme todo su amor sobre todo cuando menos lo merecía, por consolarme en mis momentos de desilusión, por eso les agradezco de todo corazón que estén a mi lado.

A mis amigos y compañeros de laboratorio Osvelia, David, Lily, Brenda, Álvaro, Erika, Gerardo, Vero, Janeth por todos los consejos dados, por los debates vespertinos acerca de la vida, por la oportunidad de poder aprender juntos tanto en el aspecto académico como en el humano, por hacer más llevadero el día cuando las cosas se complicaban y por muchas cosas más que quizás se me escapen en este momento les estaré agradecida eternamente.

Rolando, Aldo, Alfredo, Ariel, Magda, Chelita, Paty, Xoco, Isbar y Mario gracias por cada momento que pase en su compañía, por esas comidas interminables, por los cafecitos, por salir en mi socorro más de una vez; y aunque los hice renegar y metí en aprietos más de una vez saben que es porque los quiero mucho.

Mary José, Eli, Ma. Inés, Esther aunque por razones geográficas estuvimos alejadas, agradezco sus consejos, sus llamadas, mensajes y todas sus maneras de mostrarme su apoyo en los momentos más difíciles y no dejarme desistir a mitad del camino. Les mando un fuerte abrazo hasta Querétaro, Oaxaca, España y Durango.

A todas las personas que contribuyeron en mi formación a lo largo de estos 3 años, Dr. Abelardo, Dr. Sergio, Dra. Azucena, Dra. Julia, Dra. Rocío por haber confiado en mí para llevar a cabo este trabajo.

A Shekináh, gracias muchachos, por mostrarme un lado maravilloso de la vida cuando me era imposible o muy difícil poder verlo, por haberme dado nuevos bríos para seguir adelante, por hacerme sentir satisfecha conmigo misma y sobre todo por haber encontrado excelentes amigos. Una de los mejores recuerdos que me llevo conmigo.

A ti, que me enseñaste que nunca hay que dar nada por sentado, que la vida es demasiado corta y que el dolor puede convertirse en uno de los motores para salir adelante. Te extrañamos mucho!!

Gracias a todos ustedes por haberme impulsado cada día un poco más hasta alcanzar esta meta. Más allá de todo lo que logre aprender académicamente, agradezco a Dios por los momentos compartidos.

*“Nuestra recompensa se encuentra  
en el esfuerzo y no en el resultado.  
Un esfuerzo total es una victoria completa”*

**Mahatma Gandhi**

## **AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES**

Al Consejo de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo financiero otorgado, mediante la beca No. de registro 201536.

Al Programa de Apoyo a la Investigación Científica y Tecnológica de la Universidad Autónoma de Nuevo León (PAICYT, UANL) por el apoyo financiero brindado con los proyectos PAICYT, IT 142-09.

## TABLA DE CONTENIDO

<b>Sección</b>	<b>Página</b>
LISTA DE FIGURAS .....	iv
LISTA DE TABLAS .....	vi
NOMENCLATURA .....	vii
RESUMEN .....	ix
ABSTRACT.....	x
1.INTRODUCCIÓN .....	1
2.HIPÓTESIS.....	3
3.OBJETIVOS .....	4
3.1Objetivo general.....	4
3.2Objetivos particulares.....	4
4.ANTECEDENTES .....	5
4.1Tuberculosis pulmonar.....	5
4.1.1Tuberculosis farmacorresistente.....	6
4.1.2Tratamiento .....	7
4.1.3Epidemiología .....	9

4.2	Plantas medicinales .....	9
4.3	Productos naturales con actividad antimicobacteriana.....	11
4.4	Fitoquímicos con actividad antimicobacteriana .....	13
4.4.1	Compuestos fenólicos .....	13
4.4.2	Fitoesteroles .....	15
4.4.3	Terpenos .....	17
4.4.4	Alcaloides.....	19
4.5	Sistemas acarreadores de fármacos .....	20
4.5.1	Nanopartículas poliméricas como vectores farmacéuticos .....	21
4.5.2	Nanopartículas en el tratamiento de la Tuberculosis .....	23
5.	MÉTODOS .....	24
5.1	Estrategia general .....	24
5.2	Recolección y preparación del extracto.....	25
5.2.1	Clasificación y descripción botánica de <i>Carya illinoensis</i> .....	25
5.2.2	Clasificación y descripción botánica de <i>Juglans mollis</i> .....	27
5.3	Partición del extracto.....	28
5.4	Caracterización fitoquímica .....	28
5.5	Análisis cromatográfico por HPLC-DAD.....	30
5.6	Caracterización del extracto por GC-MS .....	30
5.7	Preparación de las nanopartículas biodegradables con extracto .....	31
5.8	Activación de la cepa <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv .....	33
5.9	Evaluación de la actividad antituberculosa .....	33
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	35
6.1	Obtención del extracto .....	35
6.2	Partición del extracto.....	36
6.3	Análisis cromatográfico por HPLC-DAD .....	37
6.4	Caracterización del extracto por GC-MS	

6.5Elaboración y caracterización de nanopartículas poliméricas.....	43
6.6Evaluación de la actividad antituberculosa .....	44
7.CONCLUSIONES .....	50
8.BIBLIOGRAFÍA .....	51

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
1.Esquema de tratamientos y retratamiento denominado Pirámide del Éxito .....	8
2.Origen de algunos metabolitos secundarios en el metabolismo primario de las plantas .....	11
3.Estructura química general de los flavonoides .....	14
4.Estructura química general de los esteroides .....	16
5.Síntesis de terpenos y su clasificación según las unidades de isopreno que contienen .....	18
6.Representación esquemática de las nanocápsulas y nanoesferas poliméricas .....	22
7.Corteza de <i>Carya illinoensis</i> (Wangenh) Koch .....	25
8.Corteza de <i>Juglans mollis</i> .....	27
9.Método de nanoprecipitación para la encapsulación del extracto de <i>Carya illinoensis</i> .....	32
10.Método de emulsificación-difusión para la encapsulación del extracto de <i>Juglans mollis</i> .....	33

11. Esquema de montaje de la placa para la evaluación de la actividad antituberculosa por la técnica del Azul de Alamar.....	34
12. Análisis por medio de HPLC-DAD a) cromatograma del extracto hexánico de corteza de <i>C. illinoensis</i> , b) cromatograma de la fracción metanólica del extracto de <i>C. illinoensis</i> y c) cromatograma de la fracción no metanólica del extracto de <i>C. illinoensis</i> .....	38
13. Cromatograma de gases del estándar de ácido ursólico derivatizado con trimetilsilano.....	39
14. Comparación de espectros de masas del total de iones de: a) estándar de ácido betulínico y b) muestra de extracto hexánico de corteza de <i>C. illinoensis</i> .....	40
15. Comparación de espectros de masas de: a) estándar $\beta$ -sitosterol y b) muestra de extracto de <i>C. illinoensis</i> .....	41
16. Análisis por medio de GC-MS : a) cromatogramas del extracto hexánico de corteza de <i>C. illinoensis</i> , b) cromatograma del estándar de ácido betulínico y c) cromatograma del estándar de $\beta$ -sitosterol.....	42
17. Espectro de masas de las nanopartículas biodegradables cargadas con extracto hexánico de <i>C. illinoensis</i> (NCI) .....	43
18. Micrografía electrónica de barrido de nanopartículas poliméricas biodegradables cargadas con extracto hexánico de <i>Carya illinoensis</i> .....	44
19. Efecto inhibitorio determinado por la técnica de reducción de Azul de Alamar de la clofazimina contra <i>M. tuberculosis</i> H37Rv .....	45

20.Efecto inhibitorio determinado por la técnica de reducción de Azul de Alamar de los extractos hexánicos de <i>C. illinoensis</i> y <i>J. mollis</i> contra el crecimiento de la cepa H37Rv de <i>M. tuberculosis</i> .....	46
21.Efecto inhibitorio determinado por la técnica de reducción de Azul de Alamar de las fracciones metanólicas y no metanólicas del extracto de <i>C. illinoensis</i> contra el crecimiento de la cepa H37Rv de <i>M. tuberculosis</i> .....	47
22.Efecto inhibitorio determinado por la técnica de reducción de Azul de Alamar de las nanopartículas cargadas con extracto hexánico de <i>C. illinoensis</i> contra el crecimiento de la cepa H37Rv de <i>M. tuberculosis</i> .....	49

## LISTA DE TABLAS

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
1.Resultados del rendimiento y caracterización fitoquímica de los extractos de corteza de <i>C. illinoensis</i> y <i>J. mollis</i> .....	36

## NOMENCLATURA

<b>AB</b>	Ácido betulínico
<b>AcNH<sub>4</sub></b>	Acetato de amonio
<b>AU</b>	Ácido ursólico
<b>CH<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Ácido fórmico
<b>CIFM</b>	Fracción metanólica de <i>Carya illinoensis</i>
<b>CIFNM</b>	Fracción no metanólica de <i>C. illinoensis</i>
<b>CIH</b>	Extracto hexánico de <i>C. illinoensis</i>
<b>CLF</b>	Clofazimina
<b>CMI</b>	Concentración mínima inhibitoria
<b>E</b>	Etambutol
<b>GC-MS</b>	Cromatografía de gases-Espectrometría de masas
<b>H</b>	Isoniazida
<b>HPLC-DAD</b>	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución con arreglo de diodos
<b>JMH</b>	Extracto hexánico de <i>Juglans mollis</i>
<b>Me CN</b>	Acetonitrilo
<b>MeOH</b>	Metanol
<b>MT</b>	Medicina tradicional
<b>NCI</b>	Nanopartículas poliméricas cargadas con extracto de <i>C. illinoensis</i>
<b>NPS</b>	Nanopartículas poliméricas sólidas
<b>PLA</b>	Ácido poli láctico

<b>PLG</b>	Poli (DL-láctico-co-glicólico)
<b>PLGA</b>	Poli (láctico-co-glicólico)
<b>R</b>	Rifampicina
<b>S</b>	Estreptomina
<b>Tr</b>	Tiempo de retención
<b>P</b>	Pirazinamida

## RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue desarrollar una formulación de nanopartículas poliméricas biodegradables cargadas con extracto hexánico de *Carya illinoensis* (CIH) y extracto hexánico de *Juglans mollis* (JMH) como un tratamiento alternativo para el combate de la tuberculosis. Se evaluó la actividad antituberculosa del JMI, CIH, dos de sus fracciones, metanólica (CIFM) y no metanólica (CIFNM) y de la formulación de nanopartículas poliméricas cargadas con extracto de *C. illinoensis* (NCI), identificando las moléculas responsables de esta actividad. Tanto CIH, como CIFM, CIFNM y NCI presentaron actividad antimicobacteriana a una concentración de  $125 \mu\text{g mL}^{-1}$ , con 80%, 50% y 70% de inhibición, respectivamente. La muestra JMH mostró una actividad antituberculosa baja, obteniendo un máximo de 60% de inhibición con una concentración de  $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Como fármaco control se utilizó la clofazimina (CLF). De acuerdo a los resultados de la actividad antituberculosa se elaboró la formulación de las nanopartículas poliméricas incorporando el extracto hexánico de *C. illinoensis*, este proceso se realizó por el método de nanoprecipitación; obteniéndose un tamaño de partícula 180 nm. En la caracterización por cromatografía líquida y cromatografía de gases acoplada a masas se encontró que los principales componentes de CIH, CIFM y CIFNM, son tres fitoesteros, el  $\beta$ -sitosterol,  $\alpha$ -amirina y sitostenona además de un triterpenoide pentacíclico, el ácido betulínico; el componente encontrado en la NCI fue  $\beta$ -sitosterol. La presencia de estos compuestos ofrece un nuevo panorama de las moléculas responsables de la actividad antituberculosa en la corteza de CIH y la posibilidad de explorar otras aplicaciones farmacéuticas para esta planta.

## ABSTRACT

The objective of this research was to develop a formulation of biodegradable polymeric nanoparticles loaded with hexane extract of *Carya illinoensis* (CIH) and hexane extract of *Juglans mollis* (JMH) as an alternative tuberculosis treatment. Antituberculosis activity was assessed from JMI, CIH, two of their fractions, methanol fraction (CIFM) and no methanol fraction (CIFNM) and the development of polymeric nanoparticles loaded with extracts of *C. illinoensis* (NCI), identifying the molecules responsible for this activity. Both CIH, as CIFM, CIFNM and NCI antimycobacterial activity showed a concentration of  $125 \mu\text{g mL}^{-1}$ , with 80%, 50% and 70% inhibition, respectively. Sample JMH showed a poor anti-tuberculosis activity, obtaining a maximum of 60% inhibition at a concentration of  $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ . The antimycobacterial drug clofazimine (CLF) was used as a control. According to the antituberculosis activity the results of the polymeric nanoparticles formulation was developed incorporating the hexane extract of *C. illinoensis*, this process was performed by nanoprecipitation method, yielding a particle size of 180 nm. Characterization by liquid chromatography and gas chromatography coupled to mass found that the main components of CIH, CIFM and CIFNM, three pentacyclic triterpenoid phytosterols and:  $\beta$ -sitosterol,  $\alpha$  - amyirin, betulinic acid and sitostenone and component found at the NCI was  $\beta$ -sitosterol. The presence of these compounds provides a new picture of the molecules responsible for the antituberculosis activity in the CIH cortex and the possibility of exploring other pharmaceutical applications for this plant

## 1. INTRODUCCIÓN

La tuberculosis es una enfermedad infecciosa que suele afectar a los pulmones y es causada por la bacteria *Mycobacterium tuberculosis*. Se transmite de una persona a otra a través de gotículas de saliva generadas en el aparato respiratorio de pacientes con enfermedad pulmonar activa. La afección es prevenible y curable.

Según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), esta enfermedad es considerada la segunda causa de muerte por enfermedades infecciosas a nivel mundial debido principalmente a factores como el abandono del tratamiento por parte de los pacientes, la coinfección con VIH y la aparición de cepas resistentes a la farmacoterapia disponible (OMS 2007).

En la actualidad la OMS señala algunas prioridades para el control de la tuberculosis, de las que sobresalen, la búsqueda y el desarrollo de nuevos fármacos, mejorar los esquemas de tratamiento, acortar la duración total de los mismos, así como ofrecer tratamiento contra cepas MDR-TB (WHO, 2006).

El desarrollo de resistencia microbiana hacia los antibióticos, entre otras aplicaciones, ha llevado a muchos investigadores a la búsqueda de actividad antimicrobiana en plantas medicinales (Nostro, *et al.*, 2000). De acuerdo a la OMS se estima que 4 billones de personas utilizan plantas medicinales para el cuidado de su salud.

Otra estrategia que se ha explorado en los últimos años consiste en los sistemas acarreadores de fármacos, dentro de los cuales se menciona la nanoencapsulación de fármacos en polímeros biodegradables.

Estos sistemas coloidales ofrecen ventajas remarcables, tales como la protección del fármaco contra agentes externos que inducen su degradación, el direccionamiento del principio activo a sitios específicos de acción (órganos, tejidos o células) y la liberación de moléculas biológicas como proteínas, péptidos y oligonucleótidos (Jones *et al.*, 2004).

Debido al interés de las investigaciones dedicadas a demostrar los beneficios que nos pueden dar ciertos componentes extraídos de las plantas; han situado a México en un papel relevante, ya que posee aproximadamente 30,000 especies de plantas, de las cuales 3,000 han reportado que tienen propiedades medicinales (Bye *et al.*, 1995).

Algunas investigaciones han demostrado que las especies de bacterias pertenecientes al género *Mycobacterium* demuestran sensibilidad a triterpenos, debido al alto contenido de esterol que poseen (Daffe *et al.*, 1988). *Gymnosperma glutinosum*, *Juglans regia*, *Carya illinoensis* y *Juglans mollis* son algunas ejemplos de plantas con este efecto sobre la micobacteria (Gómez-Flores *et al.*, 2005; Cruz-Vega *et al.*, 2008).

Debido a la urgencia de encontrar un tratamiento alternativo para la tuberculosis y al mismo tiempo mejorar dicho tratamiento con el uso terapéutico de los sistemas acarreadores, se optó por desarrollar una formulación de nanopartículas poliméricas cargadas con extracto de *Carya illinoensis* o *Juglans mollis*, ya que existen investigaciones previas sobre el efecto inhibitorio de estas especies sobre *M. tuberculosis*, además de considerarse plantas endémicas del estado de Nuevo León.

## **2. HIPÓTESIS**

El extracto hexánico de *Carya illinoensis* o *Juglans mollis* incorporado en nanopartículas poliméricas biodegradables representará una alternativa al tratamiento de la tuberculosis.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo general

Desarrollar una formulación de nanopartículas poliméricas biodegradables que incorpore un extracto hexánico de *C. illinoensis* o *J. mollis* para su potencial aplicación como agente tuberculoso.

#### 3.2 Objetivos específicos

1. Obtener y caracterizar fitoquímicamente los extractos hexánicos de corteza de *C. illinoensis* y *J. mollis*.
2. Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los extractos hexánicos contra *M. tuberculosis*.
3. Obtener el perfil cromatográfico de los extractos hexánicos por cromatografía de líquidos de alta resolución.
4. Incorporar los extractos hexánicos de corteza de *C. illinoensis* y *J. mollis* en nanopartículas poliméricas biodegradables.
5. Caracterizar las formulaciones de nanopartículas poliméricas.
6. Determinar la CMI de las formulaciones de los extractos hexánicos incorporados en nanopartículas poliméricas contra *Mycobacterium tuberculosis*.

## 4. ANTECEDENTES

### 4.1 Tuberculosis pulmonar

La tuberculosis es una enfermedad infecto-contagiosa, prevenible y curable que suele afectar a los pulmones y es causada por la bacteria *Mycobacterium tuberculosis*; se transmite de una persona a otra por vía aérea, ya sea por toser, estornudar, hablar o escupir. Aunque la tuberculosis puede afectar cualquier órgano, el pulmón es la vía de entrada en prácticamente todos los casos (SSA , 2008; Parish *et al.*, 1998; OMS, 2007).

Una vez que la bacteria se introduce en el pulmón se forma un granuloma que es la infección primaria de la tuberculosis, este proceso no produce síntomas y en el 95% de los casos se recupera solo sin más problema. La bacteria de la tuberculosis pasa así a una fase de inactividad, encerrada en un granuloma. La tuberculosis pulmonar primaria se desarrolla en pocas personas cuyo sistema inmune no contiene con éxito la infección primaria. En este caso, la enfermedad puede aparecer unas semanas después de la infección o puede permanecer latente por años y reaparecer después de que la infección inicial ha sido contenida. El riesgo de enfermarse aumenta cuando el sistema inmunológico de la persona está debilitado. Algunos factores que incrementan el riesgo de desarrollar esta enfermedad son enfermedades como VIH/SIDA, diabetes mellitus, desnutrición, cáncer y/o por uso de medicamentos esteroides o inmunosupresores (SSA, 2006; ONUSIDA, 2008).

El tratamiento incompleto para las infecciones de tuberculosis, por ejemplo, no tomar los medicamentos durante el tiempo prescrito, puede contribuir a la aparición de cepas de bacterias resistentes a los medicamentos. Cada paciente de tuberculosis puede llegar a contagiar en un año entre 10 y 15 personas (OMS, 2007).

#### **4.1.1 Tuberculosis farmacorresistente**

La tuberculosis multirresistente (MDR) está causada por bacterias que son resistentes por lo menos a la isoniazida y a la rifampicina, los fármacos antituberculosos más eficaces. La tuberculosis MDR puede ser consecuencia de una infección primaria por bacterias resistentes, o puede aparecer en el curso del tratamiento del paciente (SSA-TB, 2008).

La tuberculosis ultrarresistente (XDR) es una forma de tuberculosis causada por bacterias resistentes a la isoniazida y la rifampicina (es decir, tuberculosis MDR) así cualquiera de los fármacos antituberculosos inyectables de segunda línea (amikacina, kanamicina o capreomicina) (WHO, 2006).

Esas formas de tuberculosis no responden al tratamiento convencional de seis meses con fármacos antituberculosos de primera línea, y su tratamiento con fármacos menos potentes, más tóxicos dura dos años o más. Asimismo otro inconveniente es el costo ya que mientras el tratamiento con fármacos antituberculosos convencionales cuesta aproximadamente US\$ 20, los fármacos contra la tuberculosis MDR pueden costar hasta US\$ 5000, y el de la tuberculosis XDR mucho más caro (OMS, 2010).

Se calcula que en 2008 se registraron 9,4 millones de nuevos casos de tuberculosis, y 1,8 millones de defunciones. Se estima que ese mismo año aparecieron 440 000 casos de tuberculosis MDR, que causaron 150 000 muertes. No se han realizado estimaciones oficiales del número de casos de tuberculosis XDR, pero puede que se eleven a 25 000 al año, la mayoría de ellos letales. Desde que se definió por primera vez la tuberculosis XDR en 2006, un total de 58 países han notificado por lo menos un caso de tuberculosis XDR (OMS 2010).

#### 4.1.2 Tratamiento

El principal objetivo del tratamiento es curar al enfermo e interrumpir la cadena de transmisión. La quimioterapia de la tuberculosis debe de considerar la asociación de dos o más fármacos antifímicos, mantener el tratamiento por un mínimo de seis meses y supervisar el tratamiento (SSA, 2006).

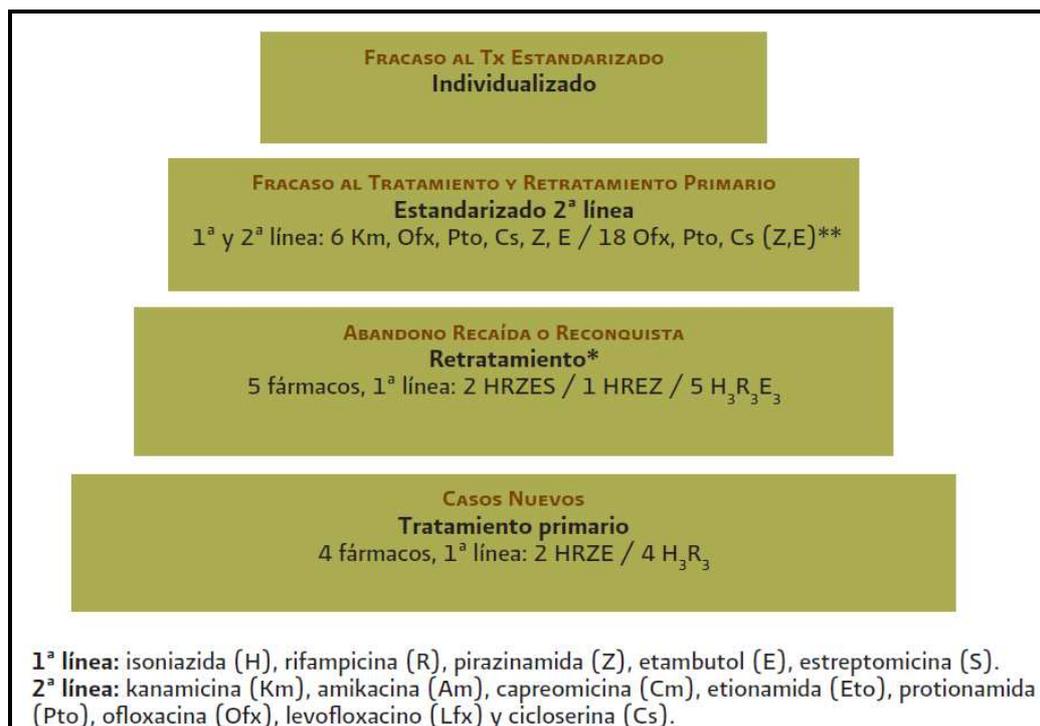
El Programa Acción Tuberculosis apoyado en las recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Unión Internacional de Lucha Contra la Tuberculosis y Enfermedades Respiratorias (UICTER) recomienda incluir a todos los pacientes nunca antes tratados a un esquema de tratamiento primario acortado con cuatro fármacos antituberculosis. México ha definido las pautas para el tratamiento y retratamiento de la tuberculosis en cuatro esquemas diferentes de tratamiento, a los cuales en conjunto se les ha denominado Pirámide del éxito terapéutico (**Fig. 1**), con la cual se pretende evitar la selección de cepas mutantes resistentes, disminuir la capacidad infectante del bacilo y evitar las recaídas, además de garantizar concentraciones séricas efectivas de los fármacos debido a la administración del tratamiento combinado. La pirámide del éxito terapéutico se compone de cuatro tratamientos, el tratamiento primario acortado, el retratamiento primario, el retratamiento estandarizado y el retratamiento individualizado (SSA-TB, 2008).

El tratamiento primario acortado, que se aplica a todos los casos nuevos de tuberculosis, incluye la administración oral de Isoniacida (H), Rifampicina (R), Pirazinamida (Z) y Etambutol (E), tiene una duración de seis meses y se divide en dos etapas, la fase bactericida o intensiva y fase de sostén (SPLF, 2004).

El retratamiento primario, se aplica cuando hay abandono, fracaso o recaída del tratamiento primario, los fármacos utilizados son los mismos que en el tratamiento primario junto con la Estreptomina (S) y con un agente administrado de forma

parenteral, la duración de este retratamiento debe de ser de ocho meses, los cuales se reparten en dos fases intensivas y una fase de sostén (Enarson *et al.*, 2000).

En los casos en que existe una elevada probabilidad de tuberculosis farmacorresistente, debido a que no se logró una curación de los pacientes con los esquemas terapéuticos anteriores, se recurre al retratamiento estandarizado en el cual se utilizan fármacos de segunda línea los cuales son Kanamicina (Km), Amikacina (Am), Ofloxacina (Ofx), Protionamida (Pto), Levofloxacino (Lfx), Cicloserina (Cs), Pirazinamida (Z) y Capreomicina (Cm). Este esquema se debe de seguir por dieciocho meses, y se divide en una fase intensiva y una de sostén (SSA-TB, 2008).



**Figura 1.** Esquema de tratamientos y retratamiento denominado Pirámide del Éxito.

### **4.1.3 Epidemiología**

La Organización Mundial de la Salud (OMS), en 2010, señaló que existen más de 2,000 millones de casos de TB, de estas personas, una de cada diez contraerá TB activa en algún momento de su vida. En 2009, murieron de TB, 1.7 millones de personas ( de las que 380, 000 tenían VIH) y hubo 9.4 millones de casos nuevos. La tasa de incidencia mundial de la TB esta disminuyendo, pero a un ritmo muy lento, menos del 1% cada año (OMS, 2010).

En México, de acuerdo con la información disponible en el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE), en el año 2007, se presentaron 17, 143 casos nuevos de tuberculosis, mientras que los últimos datos de defunciones registradas por esta infección corresponden al año 2006, con 1,896 muertes (SSA, 2008).

Debido a que esta infección es un problema de salud a nivel mundial, la OMS ha optado por planear diferentes estrategias para hacerle frente, la última de ellas es la estrategia “Alto a la Tuberculosis”, en la cual se encuentran inscritos 189 países. México es uno de los países que se ha comprometido con la estrategia anteriormente mencionada, por lo cual la prevención y control de la tuberculosis se encuentra en el Plan Nacional de Salud 2007-2012, y los medicamentos que se utilizan para el tratamiento de la misma pertenecen al Cuadro Básico de Medicamentos (SDR, 2005-2011).

## **4.2 Plantas medicinales**

La medicina tradicional (MT) responde a las necesidades de salud de la gran mayoría de la población en los países en desarrollo, donde el acceso a la atención médica y a la medicina ‘moderna’ está limitado por factores económicos y culturales. La MT se usa extensamente en estos países (Balasubramanian, 1997;

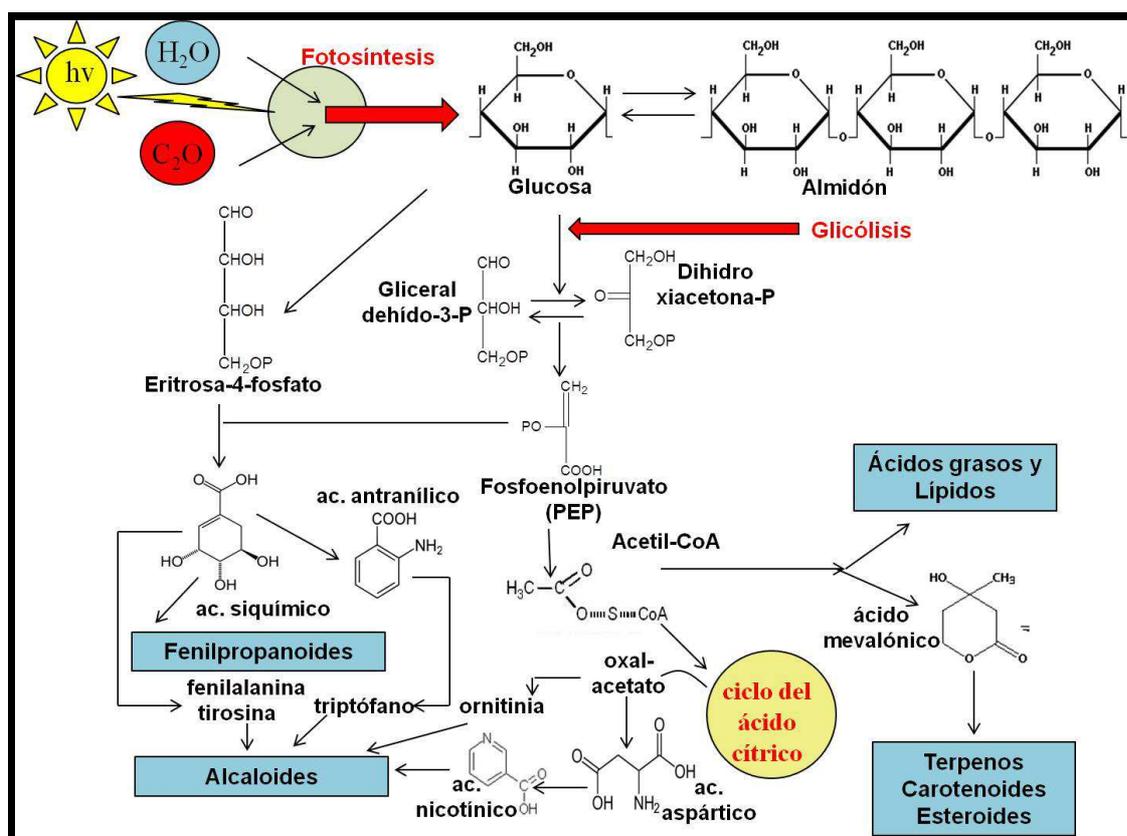
Correa, 2002) y con frecuencia es el único tratamiento al que pueden acceder las poblaciones pobres y las comunidades remotas. En un contexto de pobreza persistente y marginalidad (Hirst *et al.*, 1996; Khur, 2000; UNDP, 2001) y, en especial, en vista de los altos precios de los medicamentos patentados (Kettler, 2002; OXFAM 2001) la MT puede, en un futuro, adquirir mayor relevancia en los países en desarrollo.

Los productos naturales han empezado a ser nuevas estrategias comerciales y se han implementado en programas de salud alternativa en países desarrollados sin excluir a los no desarrollados (Bezanger-Beauquesne *et al.*, 1986). La demanda de plantas medicinales ha crecido en Europa y todo el mundo (Hersch-Martínez, 1995); la comercialización de plantas medicinales significa cada año un negocio de 20,000 millones de dólares en todo el mundo. Siendo un área de gran importancia a nivel internacional tanto para químicos, biólogos y farmacéuticos (Hersch-Martínez INAH, 1995).

La MT también desempeña un papel importante en los países desarrollados. Muchos productos farmacéuticos que se producen y utilizan en estos países se basan en materiales biológicos obtenidos a partir de la MT o están compuestos por dichos materiales. Entre estos productos se pueden mencionar los compuestos extraídos de las plantas y algas así como de fuentes microbianas y animales. Las plantas, en particular, son una fuente indispensable para los productos farmacéuticos (Lambert *et al.*, 1997; Ten Kate *et al.*, 1999).

La actividad farmacológica de las plantas reside principalmente en los metabolitos secundarios los cuales se desprenden del metabolismo primario de las plantas (**Fig. 2**) y han llegado a un primer plano de interés debido a su variada actividad biológica. Estas sustancias comprenden más de 30,000 compuestos diferentes identificados hasta ahora y los cuales se han clasificado en diferentes grupos, entre los principales se encuentran: triterpenos, saponinas, fitoesteroles y/o sus precursores (Kristo *et al.*, 2001; Urech *et al.*, 2005; Brieskorn *et al.*, 1974).

México tiene una larga tradición en el uso de plantas medicinales, ya que hasta el momento se tiene estimado que existen cerca de 30,000 especies de plantas de las cuales el Instituto Nacional Indigenista documentó 3,000 con usos medicinales, lo que representa solo el 10% del total de la riqueza florística del país (Argueta, 1994).



**Figura 2.** Origen de algunos metabolitos secundarios (alcaloides, fenilpropanoides y terpenos) en el metabolismo primario de las plantas.

#### 4.3 Productos naturales con actividad antimicrobacteriana

Los productos naturales y sus derivados semisintéticos, son importantes fuentes de nuevos fármacos anti-infecciosos (Shu, 1998), que juegan un papel significativo

en la quimioterapia contra la tuberculosis. Antibióticos aminoglicósidos, como la estreptomina, aislada de *Streptomyces griseus* (Kuehl *et al.*, 1947) y sus derivados, kanamicina (Cron *et al.*, 1958) y su análogo amikacina (Kawaguchi *et al.*, 1972); péptidos cíclicos como la viomicina (Haskell *et al.*, 1952) y las capreomicinas 1A y 1B aisladas de *Streptomyces capreolus* NRRL 2773 (Herr *et al.*, 1966; Nomoto *et al.*, 1978); la rifamicina, rifabutina y rifapentina, análogos de la rifampicina (Burman *et al.*, 2001) aislada de *Streptomyces mediterranei* (Pape *et al.*, 1985), se utilizan en combinación con otros fármacos antituberculosos como fármacos de primera o segunda línea.

Estos productos naturales exhiben un amplio rango de actividad *in vitro* contra *M. tuberculosis* con concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) que va desde 0.2  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para la rifampicina, 0.5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para estreptomina, 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para la amikacina, 4  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para la viomicina, 5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para las capreomicinas hasta 6  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para la kanamicina (Barry III *et al.*, 2000).

Los productos naturales representan una ruta alterna en la búsqueda de nuevos agentes antituberculosos, la caracterización de los compuestos presentes en los extractos naturales es el primer paso para encontrar nuevos fitoquímicos (Frame *et al.*, 1998; Sindambiwe *et al.*, 1999; Lall *et al.*, 1999; Newton *et al.*, 2000; Usha *et al.*, 2001).

Se ha reportado que las plantas pertenecientes a la familia Juglandaceae, la cual esta ampliamente distribuida en el mundo, presentan propiedades astringentes, antifúngicas y antimicrobianas, aunque esta última solamente se ha reportado en corteza (Haskell *et al.*, 1952; Nomoto *et al.*, 1978; Burman *et al.*, 2001; Barry III *et al.*, 2000).

Salinas González (2004), reportó que extractos hexánicos de la corteza de *Carya illinoensis*, *Juglans mollis* y *Juglans regia* presentaron actividad antimicrobiana, mostrando una CMI de 31.25, 50 y 100  $\mu\text{g/ml}$  respectivamente, así como el extracto

etanólico de *J. mollis* con una CMI de 100 µg/ml, además el extracto metanólico de *C. illinoensis* y *J. mollis* presentaron una CMI de 125 µg/ml. Indicando que la actividad de los extractos hexánicos de la corteza de éstas plantas, se debe probablemente al contenido de compuestos no polares, sugiriendo quinonas y la presencia de triterpenos.

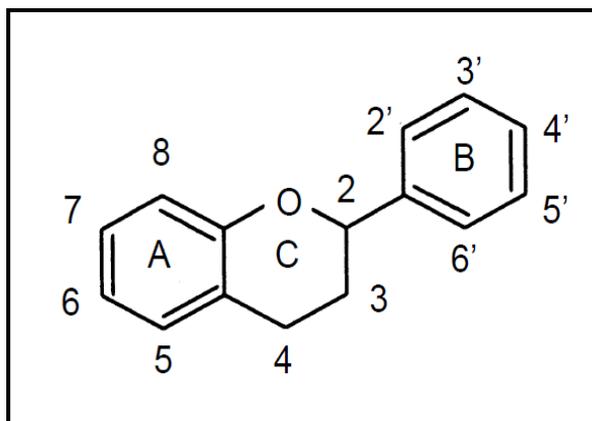
En el 2008, Cruz-Vega *et al.*, probaron la actividad antituberculosa de extractos hexánicos de *Juglans mollis* y *J. regia*, obteniendo una CMI de 50 µg/mL para la primera especie y una CMI 100 µg/mL para la segunda.

#### **4.4 Fitoquímicos con actividad antimicobacteriana**

##### **4.4.1 Compuestos fenólicos**

Las plantas sintetizan una gran variedad de productos secundarios que contienen un grupo fenol. Estas sustancias reciben el nombre de compuestos fenólicos, polifenoles o fenilpropanoides y derivan todas ellas del fenol, un anillo aromático con un grupo hidroxilo. Son un grupo muy diverso que comprende desde moléculas sencillas como los ácidos fenólicos hasta los flavonoides. De acuerdo a su estructura química se clasifican en compuestos no flavonoides y compuestos flavonoides (Gimeno-Creus, 2004; Valls *et al.*, 2000).

Los flavonoides son uno de los grupos más numerosos y ampliamente distribuidos de constituyentes naturales. Se conocen diez clases de flavonoides, estos compuestos contienen quince átomos de carbono en su núcleo básico y están arreglados bajo un sistema C6-C3-C6, en el cual dos anillos aromáticos llamados A y B están unidos por una unidad de tres carbonos que pueden o no formar un tercer anillo, que en caso de existir es llamado anillo C (**Fig. 3**) (OMS/OPS, 2001).



**Figura 3.** Estructura química general de los flavonoides.

Cada una de las clases de flavonoides, suele encontrarse bajo la forma de glucósidos con una o tres unidades de azúcar, generalmente en los carbonos 3 y/o 7, siendo los azúcares más comunes la glucosa, galactosa, ramnosa, xilosa y arabinosa. Asimismo es frecuente que diferentes azúcares se hallen unidos a una misma aglicona y en diferentes posiciones lo que hace mayor el número de glucósidos conocidos (Bravo, 1998).

Los flavonoides se encuentran generalmente en mezclas como agliconas y/o glucósidos, se hallan presentes en todas las partes de las plantas, algunas clases se encuentran más ampliamente distribuidas que otras, siendo más comunes las flavonas y flavonoles, y más restringidas en su ocurrencia las isoflavonas, las chalconas y auronas (Hertog *et al.*, 1993).

Estos metabolitos secundarios protegen a las plantas contra daños oxidativos y llevan la misma función en el organismo humano. La característica principal de los flavonoides es su habilidad para bloquear la acción de enzimas específicas que causan inflamación. También inhiben la activación de carcinógenos, atrapan radicales libres y previenen que estos dañen a las moléculas de ácido

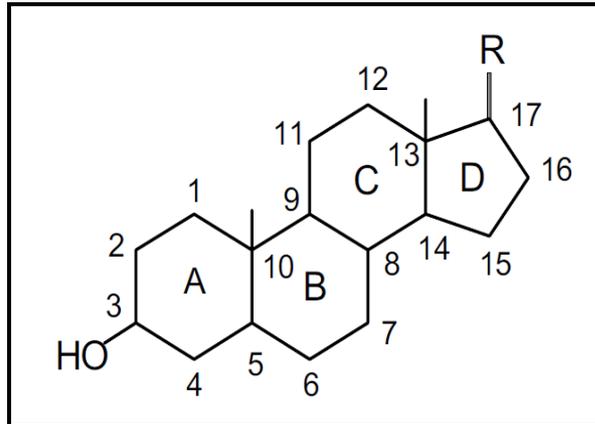
desoxirribonucleico (ADN). Cabe destacar que otra propiedad que se ha reportado para ciertas flavonas es su actividad antimicobacteriana (Hertog *et al.*, 1993).

Algunos ejemplos de flavonoides que inhiben el crecimiento de *M. tuberculosis* son la ermanina una flavona aislada de *Haplopappus sonorensis* (Murillo *et al.*, 2003) y *Larrea divaricata* (Rivero-Cruz *et al.*, 2005), la isosakuranetina que es una flavanona aislada de *Chromolaena odorata* (Suksamrarn *et al.*, 2004) y la rubrofasarina una naftopirona triciclica que fue aislada de *Senna oblique* (Graham *et al.*, 2004).

#### 4.4.2 Fitoesteroles

Los esteroides contienen un núcleo ciclopentanoperhidrofenantreno y presentan un grupo hidroxilo en el carbono 3. La mayoría de los esteroides naturales poseen una cadena lateral de 8 a 10 átomos de carbono y un enlace doble en el C-5 (**Fig. 4**). Los distintos esteroides sólo difieren en su cadena lateral y sin embargo, presentan grandes diferencias en sus acciones biológicas en el organismo humano (Martínez, 2002).

Este grupo de moléculas está ampliamente distribuido en la naturaleza. En los animales superiores se encuentra fundamentalmente el colesterol, el cual es un constituyente fundamental de membranas y precursor de sustancias fisiológicamente importantes (hormonas, ácidos biliares, vitamina D, etc.). En las plantas superiores se encuentran principalmente los denominados fitosteroides:  $\beta$ -sitosterol, campesterol, y estigmasterol. Los fitosteroides son compuestos solamente sintetizados por las plantas, que están presentes en los animales como una consecuencia de su ingestión en la dieta (Martínez, 2002).



**Figura 4.** Estructura química general de los esteroides.

Los fitoesteroides se encuentran en aceites esenciales, frutas y verduras. Estos se sintetizan por la vía del ácido mevalónico y están presentes en casi todas las partes de las plantas, pero sobre todo en las semillas y retoños. Debido a las propiedades benéficas que presentan sobre la salud se ha incrementado su estudio en los últimos años (Pegel, 1997; Adlercreutz *et al.*, 1997; Adlercreutz *et al.*, 1998).

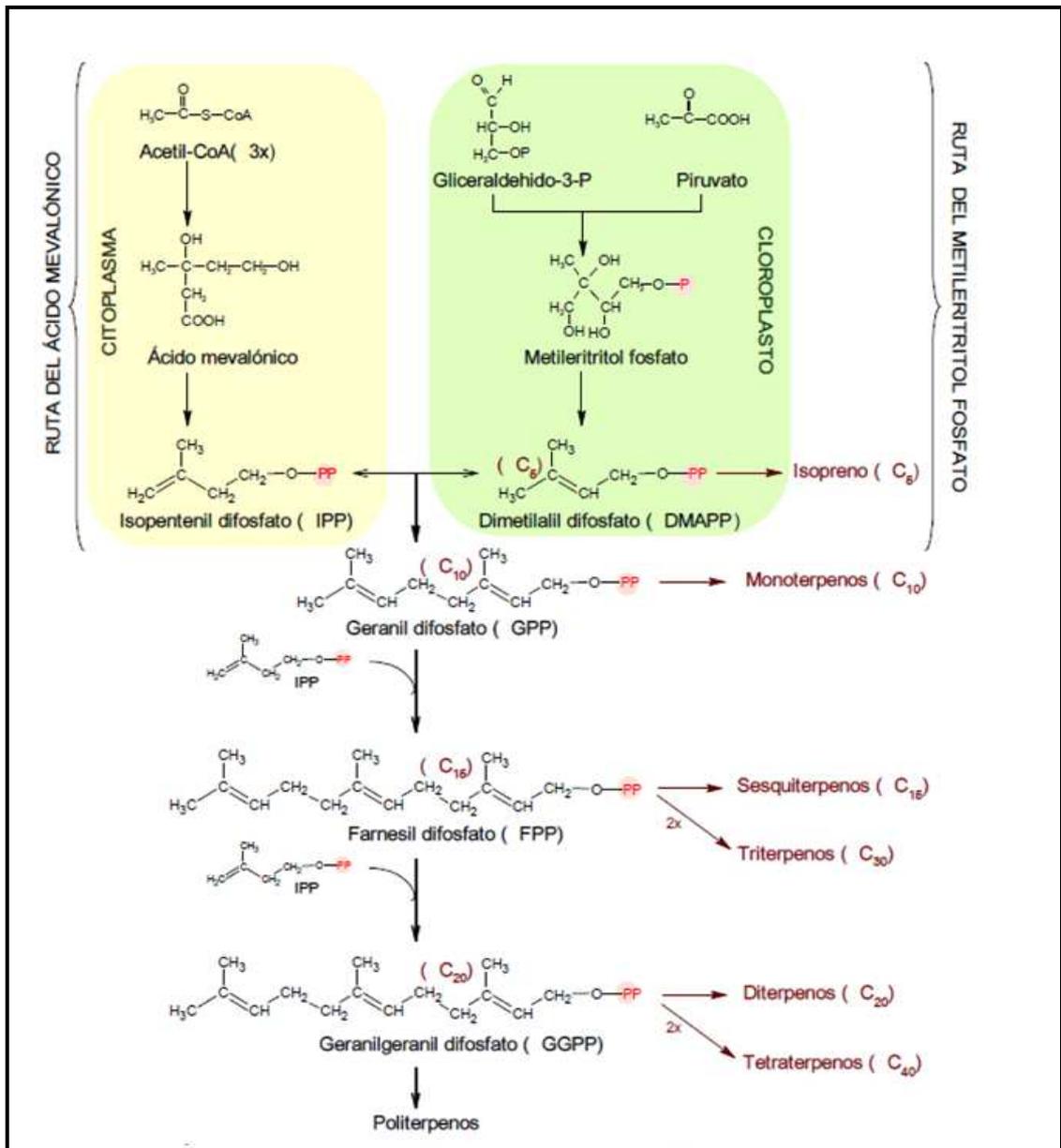
El  $\beta$ -sitosterol es uno de los fitoesteroides más abundantes en las plantas, y se ha demostrado su efectividad biológica en varios estudios preclínicos y clínicos llevados a cabo en tratamientos de enfermedades como el cáncer estómago (De Stefani *et al.*, 2000), de colon (Raich *et al.*, 1980), próstata (Awad *et al.*, 2001) y mama (Awad *et al.*, 2000), así como en úlceras (Hanifa *et al.*, 1984), VIH (Breytenbach *et al.*, 2001; Bouic *et al.*, 1997; Scoot, 1996) y tuberculosis (Donald *et al.*, 1997).

### 4.4.3 Terpenos

Los terpenos son metabolitos secundarios sintetizados por las plantas, organismos marinos y hongos. El término terpeno se refiere a un grupo de sustancias que se biosintetizan siguiendo la llamada “regla del isopreno”, esbozada por Wallach en 1866. Los terpenos se clasifican en: monoterpenos (C10), sesquiterpenos (C15), diterpenos (C20), triterpenos (30), tetraterpenos (C40) según el número de unidades de isopreno (2,3,...8) que los forma (**Fig. 5**) (OMS/OPS, 2001).

Los terpenos tienen muchas aplicaciones en la industria. Por ejemplo el linalol se usa en la industria de la perfumería (FAO, 1995). El citral es usado como repelente de mosquitos (Oyedele *et al.*, 2002) y como precursor de la síntesis de la vitamina A (Theagarajan, 1995), artemisinina es un sesquiterpeno con una gran actividad antimalaria (Gershenzon, 2007). Taxol y curcubitacinas (Wani *et al.*, 1971; Tannin-Spitz *et al.*, 2007) son compuestos antitumorales. Finalmente, los derivados de panaxadiol y panaxatriol son inmunoestimulantes (Kaneko *et al.*, 2004).

Investigaciones previas han reportado que las especies de bacterias pertenecientes al género *Mycobacterium* son sensibles a algunos triterpenos, como el ácido betulínico (Daffe *et al.*, 1988). La principal fuente del ácido betulínico son las plantas pertenecientes a las familias *Betulaceae*, *Ebenaceae* y *Poniaceae*. El interés en este compuesto ha crecido en los últimos diez años, debido a sus propiedades farmacológicas, como la actividad anticancerígena, anti-VIH y antituberculosa (Einznhamer, 2004; Tolstikova *et al.*, 2006; Gu *et al.*, 2004).



**Figura 5.** Síntesis de terpenos y su clasificación según las unidades de isopreno que contienen.

#### 4.4.4 Alcaloides

Los alcaloides son una gran familia de más de 15,000 metabolitos secundarios (Avalos-García *et al.*, 2009) que tienen en común tres características: contienen uno o más átomos de nitrógeno como parte de un sistema cíclico, manifiestan significativa actividad farmacológica y han sido biosintetizados de aminoácidos como precursores. Se encuentran en las semillas raíces, cortezas y hojas; en estado libre o como glucósidos y son solubles en agua (OMS/OPS, 2001).

La mayoría son heterocíclicos aunque algunos son compuestos nitrogenados alifáticos (no cíclicos) como la colchicina. Se encuentran en el 20% aproximadamente de las plantas vasculares, la mayoría dicotiledóneas herbáceas (Avalos-García *et al.*, 2009). La función de los alcaloides en las plantas no es muy conocida, aunque se reporta que algunos intervienen como reguladores del crecimiento y como repelentes o atractores de insectos. Sin embargo, por años ha sido conocida la acción fisiológica de muchos de ellos (OMS/OPS, 2001).

En humanos, los alcaloides generan respuestas fisiológicas la mayoría de ellas consecuencia de su interacción con neurotransmisores. A dosis altas, casi todos los alcaloides son muy tóxicos. Sin embargo, a dosis bajas tienen un alto valor terapéutico como: relajantes musculares, tranquilizantes, antitusivos, analgésicos y antimicobacterianos (Avalos-García *et al.*, 2009).

La cefaranona B (Singh *et al.*, 1996), piperolactama A (Desai *et al.*, 1988) y cefaradiona B (Mata *et al.*, 2004) aisladas de las hojas de las plantas del genero *Piper* y algunos alcaloides aislados de *Evodia rutaecarpa* exhiben actividad contra *M. tuberculosis* (Adams *et al.*, 2005).

#### 4.5 Sistemas acarreadores de fármacos

Una segunda estrategia que se ha explorado en los últimos años en el área farmacéutica consiste en los sistemas acarreadores de fármacos, dentro de los cuales se menciona la microencapsulación y nanoencapsulación de fármacos en polímeros biodegradables, la cual es considerada como una tecnología emergente (Falk *et al.*, 1997). Algunos polímeros usados frecuentemente en la encapsulación de fármacos son el ácido poli láctico (PLA) y poli (DL-láctico-co-glicólico) (PLG), los cuales son biodegradables, biocompatibles y no inmunogénicos (Dhiman *et al.*, 2000).

El interés de la liberación de fármacos a través de portadores se ha incrementado considerablemente durante los últimos años. Las razones, son obvias, si el portador tiene el potencial para dirigir el fármaco a su sitio de acción, un efecto farmacológico óptimo podría obtenerse y al mismo tiempo, los efectos adversos de los fármacos podrían disminuir. Este deseo de dirigir los fármacos a los órganos blancos específicos es un viejo sueño discutido desde hace 30 años (Román, 1990).

La ciencia farmacológica actual encamina sus estudios hacia la búsqueda de un vehículo capaz de transportar el fármaco hasta su lugar de acción, a fin de evitar, en lo posible, sus efectos adversos. De acuerdo a este criterio, se han desarrollado últimamente nuevos sistemas de administración de fármacos, como las micropartículas, liposomas y las nanopartículas, entre otros, siendo los particulados coloidales los que preferentemente se emplean como sistemas de liberación de fármacos (Valero *et al.*, 1985).

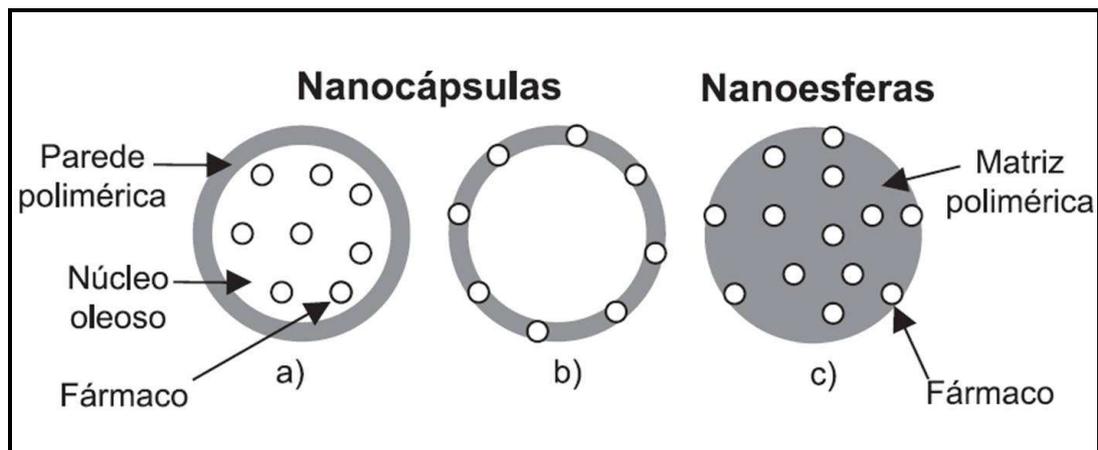
Las nanopartículas muestran ventajas sobre las micropartículas y los liposomas, debido a su gran estabilidad y a la capacidad de liberar el fármaco de manera controlada (McClean *et al.*, 1998).

#### 4.5.1 Nanopartículas poliméricas como vectores farmacéuticos

Las nanopartículas poliméricas solidas (NPS) son partículas de menos de 1  $\mu\text{m}$  de diámetro que se prepararan a partir de polímeros naturales o sintéticos. El desarrollo de NPS se ha convertido en un área de investigación importante en el campo de la administración de fármacos, ya que tienen la capacidad de suministrar una amplia gama de compuestos para las diferentes vías de administración por períodos de tiempo sostenido.

El término nanopartícula es el nombre colectivo que reciben tanto nanoesferas como nanocápsulas, las cuales difieren entre sí de acuerdo a la composición y organización estructural (**Fig. 6**). Las nanoesferas son de tipo matricial y en este caso los fármacos pueden ser adsorbidos en la superficie de la esfera o encapsulada dentro de la partícula (Llabot *et al.*, 2008). Las nanocápsulas son sistemas vesiculares en los que el principio activo es vehiculizado en la cavidad interior; el sistema consiste en un núcleo líquido rodeado por una membrana polimérica. En este caso, las sustancias activas suelen ser disueltas en el núcleo interno, pero también pueden ser adsorbidas a la superficie de la cápsula (Couvreur *et al.*, 1995).

Los vehículos por los cuales pueden ser acarreados los fármacos pueden tener la característica de ser hidrofílicos o hidrófobos; así como de acuerdo a su origen pueden ser proteínas o macromoléculas biológicas. Se pueden formular para la absorción selectiva por el sistema linfático, el cerebro, las paredes arteriales, pulmones, hígado, bazo o circulación sistémica (Cebrián-Hernández *et al.*, 2005).



**Figura 6.** Representación esquemática de las nanocápsulas y nanoesferas poliméricas: a) fármaco disuelto en el núcleo oleoso de las nanocápsulas; b) fármaco absorbido en la pared polimérica de las nanocápsulas; c) fármaco retenido en la matriz polimérica de nanoesfera.

Por otra parte, los polímeros naturales no han sido ampliamente utilizados para este fin, ya que varían en pureza, y a menudo requieren entrecruzamientos para aumentar la estabilidad física del sistema, lo que podría desvirtuar la encapsulación de fármacos. En consecuencia, los polímeros sintéticos han recibido mayor atención en este ámbito. Los más utilizados son poli (ácido láctico) (PLA), poli (ácido glicólico) (PGA) y sus copolímeros, poli (láctico-co-glicólico) (PLGA). Además, estos polímeros son conocidos por su biocompatibilidad y por la posibilidad de manipular la tasa de degradación y, en consecuencia, la velocidad de liberación de fármacos, por aumento de hidrofobicidad o un aumento de hidrofiliidad de la nanopartícula (Llabot *et al.*, 2008).

#### 4.5.2 Nanopartículas en el tratamiento de la tuberculosis

La nanotecnología se ha convertido en la principal opción para el tratamiento de la tuberculosis, debido a que las nuevas formulaciones que se están desarrollando con esta tecnología tienen la finalidad de aumentar la concentración en los órganos infectados, disminuir los efectos adversos, aumentar la estabilidad del fármaco y conseguir una liberación controlada del mismo (Zhang *et al.*, 2000).

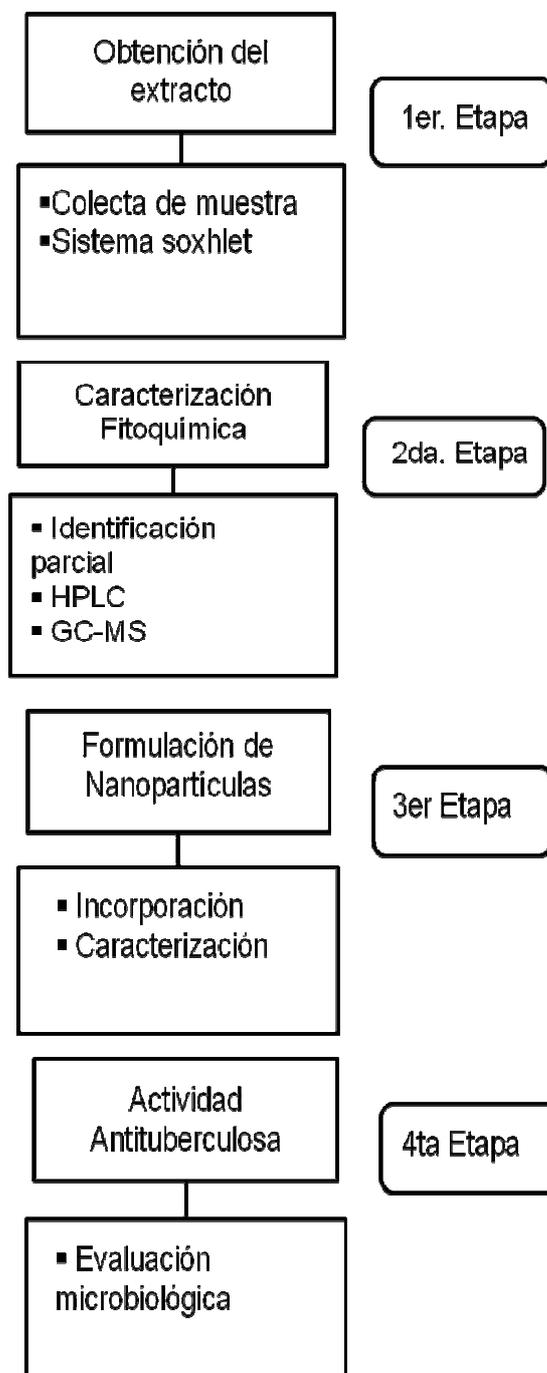
La isoniazida (H) (Dutt *et al.*, 2001a), rifampicina (R) (Dutt *et al.*, 2001b), pirazinamida (Z) (Dutt *et al.*, 2001c) y clofazimina (Burman *et al.*, 2001) han sido exitosamente encapsulados en micropartículas polímeros biodegradables como PLG, con los cuales se logra una liberación de manera controlada a nivel terapéutico (Barry III *et al.*, 2000). Además de estas investigaciones, en los últimos años se ha visto el desarrollo de una serie de formulaciones de liberación controlada de R con el objetivo de mejorar la eficacia clínica del fármaco (Frame *et al.*, 1998; Sindambiwe *et al.*, 1999).

Calleja-Avellanal *et al.*, (2003), desarrollaron nanopartículas biodegradables de rifampicina (R) para el tratamiento de la tuberculosis, las cuales mostraron capacidad para proteger al fármaco y evitar su degradación, así como permitir la encapsulación de altas concentraciones de R y conseguir una liberación controlada del mismo.

En el 2008, Ohashi *et al.*, desarrollaron una formulación de nanopartículas de rifampicina (R) las cuales fueron aplicadas por medio de inhalación para el tratamiento de la tuberculosis, en el cual se observó que las nanopartículas de R fueron retenidas en los pulmones, alcanzando las células blanco, es decir macrófagos infectados, ubicados en los alvéolos.

## 5. MÉTODOS

### 5.1 Estrategia general



## 5.2 Recolección y preparación del extracto

La corteza de *Carya illinoensis* y *Juglans mollis* fueron recolectadas en el municipio de General Terán, Nuevo León, México para su posterior identificación en el herbario de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL por la Dra. Marcela González Álvarez . Las muestras de corteza fueron molidas en un molino manual. De cada muestra se pesaron 60 g y se adicionaron 500 mL de hexano (JT Baker, México). Cada mezcla se colocó en reflujo continuo en un sistema soxhlet por 20 h. Una vez obtenidos los extractos, se procedió a eliminar el solvente a presión reducida (Rotavapor Laborata 4003, Heidolph Instruments, Alemania). Los extractos se almacenaron en frascos de vidrio protegidos de la luz y la humedad hasta su uso.

### 5.2.1 Clasificación y descripción botánica de *Carya illinoensis*



**Figura 7.** Corteza de *Carya illinoensis* (Wangenh) Koch.

**Reino:** Plantae

**Subreino:** Tracheobionta

**Superdivisión:** Spermatophyta

**División:** Magnoliophyta

**Clase:** Magnoliopsida

**Subclase:** Hamamelidae

**Orden:** Juglandales

**Familia:** Juglandaceae

**Género:** *Carya Nutt*

**Especie:** *Carya illinoensis* (Wangenh.) Koch

**Nombres comunes:** nogal liso, nogal pecanero, pecan, hickory.

Son árboles de alrededor de 50 m de alto, con un tronco erecto masivo de hasta 2 m de diámetro que frecuentemente se agranda y refuerza en la base. La corteza es gruesa, pardo claro matizada con rojo y profundamente dividida en canales y bordes irregulares. La copa ramosa y extendida es de forma esférica comprimida. Las hojas se disponen irregularmente a lo largo de la rama, son aromáticas y alcanzan de 29 a 40 cm de largo y 19 a 29 cm de ancho. Los frutos se presentan en grupos de 3 a 11, son ovoides a más o menos elipsoides, adelgazados en la punta, redondeados en la base angosta, tetraalados y aquillados a lo largo de las suturas, alcanzan de 25 a 65 mm de largo y 12-25 mm de grueso; son de color pardo oscuro y están más o menos densamente cubiertos con escamas amarillas; la cáscara es delgada, quebradiza, y se abre casi hasta la base en la madurez y frecuentemente persiste sobre la rama durante el invierno después de soltar la nuez. La nuez generalmente es de cubierta delgada y se adelgaza en ambos extremos, su color es pardo rojizo brillante y la almendra es dulce, pardo rojiza a amarillo brillante (Narave, 1983).

### 5.2.2 Clasificación y descripción botánica de *Juglans mollis*



**Figura 8.** Corteza de *Juglans mollis*.

**Reino:** Plantae

**Subreino:** Tracheobionta

**Superdivisión:** Spermatophyta

**División:** Magnoliophyta

**Clase:** Magnoliopsida

**Subclase:** Hamamelidae

**Orden:** Juglandales

**Familia:** Juglandaceae

**Género:** *Juglans* L

**Especie:** *Juglans mollis*

**Nombres comunes:** Nogal de nuez meca, nogal encarcelado.

Nogal silvestre que crece en áreas cercanas a ríos y arroyos, alcanza a medir hasta 18 m. de altura. Hojas compuestas de 5 a 9 hojuelas afelpadas. Las nueces no comestibles, de 3 a 4 cm., de la forma, color y tamaño de un limón. Se localiza en Nuevo León y en el Norte de San Luis Potosí (Martínez, 1979).

### 5.3 Partición del extracto

A partir del extracto hexánico de *C. illinoensis* (CIH) se extrajo la parte soluble en metanol, para lo cual se pesaron 500 mg de extracto y se adicionaron 25 mL de metanol (CTR Scientific, México). Una vez realizada la partición, la fracción soluble (CFM) se llevó a sequedad a presión reducida y se guardó para su posterior uso. La fracción insoluble (CFNM) también fue secada, pesada y almacenada hasta su uso.

### 5.4 Caracterización Fitoquímica

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

- Liebermann-Burchard: Para triterpenos y compuestos esteroidales. Se disolvieron 1.5 mg de muestra en cloroformo y luego se añadieron unas gotas del reactivo, observándose cambios de coloración.
- Salkowski: Para esteroides y metilesteroides. De 1 a 2 mg de la muestra se disolvieron en 1 mL de cloroformo se agregó 1 mL de ácido sulfúrico, observándose colores amarillo o rojo.
- Shinoda: Para compuestos tipo flavonoide. 1 mg de muestra se disolvió en etanol agregándose limaduras de magnesio, se le aplicó calor y después se le adicionaron unas gotas de ácido clorhídrico. Se consideró positiva con la aparición de coloraciones, anaranjada, rojo, rosa, azul y violeta.
- Baljet: Para sesquiterpenlactonas. Se utilizaron dos soluciones que se mezclaron en volúmenes iguales antes de usarse, solución A, Se disolvió 1 g de ácido pícrico en 100 mL de etanol; solución B, se disolvieron 10 g de hidróxido de sodio en 100 mL de agua. Para la prueba se mezclaron tres gotas del reactivo con la

muestra. Se consideró positiva si apareció una coloración anaranjada o roja oscura.

- **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.
- **Dragendorff:** Para alcaloides. Modificación de Munier y Machelobuf. En la solución A, se disolvieron 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 disolvieron 8 g de yoduro de potasio en 20 mL de agua. A 2 mg de muestra se agregaron 4 gotas del reactivo, la prueba fue positiva para alcaloides al observarse coloraciones rojas o anaranjadas.
- **Permanganato de potasio:** Para dobles enlaces. Se preparó una solución de permanganato de potasio al 2% en agua, al mismo tiempo se disolvieron 0.2 mg de muestra en agua, acetona o metanol. Una vez disuelta la muestra se agregaron unas gotas de la solución de permanganato de potasio. La prueba se consideró positiva si hay decoloración del reactivo.
- **Cloruro férrico:** Para oxhidrilos fenólicos. Se disolvió una pequeña cantidad de muestra en etanol y se añadió 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.
- **2,4-dinitrofenilhidracina:** Para identificar el grupo carbonilo. En un tubo de ensaye se disolvieron 50 mg de 2,4-dinitrofenilhidracina en 1 mL de etanol, se agregó 1 mg del compuesto y se calienta a baño maría por 3 a 5 min. Se dejó reposar y luego se enfrió, la aparición de un precipitado anaranjado indica la presencia de un grupo carbonilo.

- Molish: Para azúcares. En un tubo de ensaye se colocó la muestra y se añadieron tres gotas del reactivo de Molish y agitó. Se depositaron 2 mL de ácido sulfúrico concentrado. Es positivo cuando se forma un anillo coloreado en la interfase.

### 5.5 Análisis cromatográfico por HPLC-DAD

La caracterización del extracto y sus fracciones se realizó un utilizando un cromatógrafo de líquidos (Varian, EUA) equipado con una bomba 9012, automuestreador 9100 y un detector de arreglo de diodos Polychrom 9065, con una columna Microsorb C<sub>18</sub> (5 µm, 150 x 4.6 mm; Varian, EUA). La fase móvil se conformó por la solución A que consistió en metanol (MeOH) (HPLC J.T. Baker, México) y la solución B compuesta por ácido fórmico (CH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (100 mM pH 3.0) 55:45 v/v; con un flujo de 0.8 mL min<sup>-1</sup>. El volumen de inyección fue de 20 µL y la longitud de onda utilizada fue de 254 nm. El extracto hexánico de *C. illinoensis* (CIH) y las dos fracciones obtenidas de éste, fracción metanólica (CIFM) y fracción no metanólica (CIFNM) fueron disueltas en cloroformo (CTR Scientific, México) y filtradas usando membranas de filtración Durapore® de 0.45 µm (Millipore, EUA).

Para el análisis de ácido ursólico (AU) y CIFM, se utilizó una columna Microsorb C<sub>18</sub> 5 µm 150 x 4.6 mm (Varian, EUA). La fase móvil consistió en una mezcla MeOH/agua acidificada con CH<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (pH 3.0) 65:35 v/v; con un flujo de 1.0 mL min<sup>-1</sup>. Las variables modificadas para optimizar la separación fueron el pH y la proporción de buffer en la fase móvil.

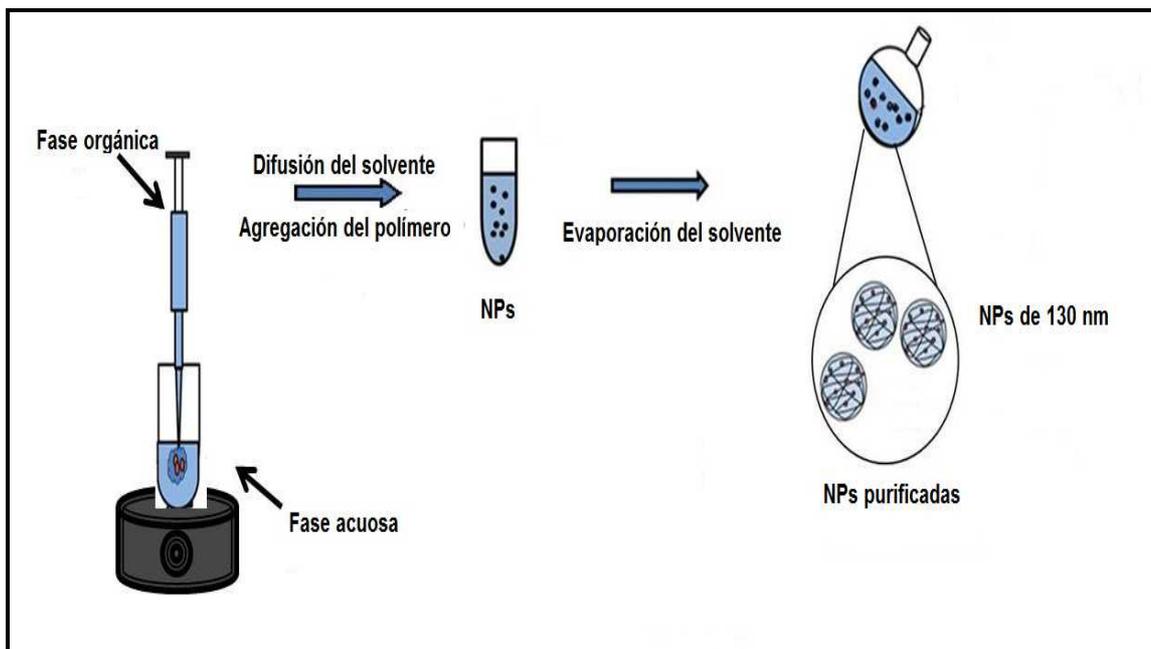
### 5.6 Caracterización del extracto por GC-MS

Se llevó a cabo empleando un cromatógrafo de gases HP modelo 6890 (Agilent Technologies, Alemania) equipado con una columna HP 5ms (Agilent Technologies, Alemania); las dimensiones de la columna fueron 30 m x 0.25 mm x

0.25  $\mu\text{m}$ . El gas acarreador fue helio. El programa de temperatura del horno fue: inicial 70 °C (2 min), 15 °C  $\text{min}^{-1}$  a 200 °C (5 min), 10 °C  $\text{min}^{-1}$  a 320 °C (10 min). La temperatura del inyector fue 270 °C. La detección del espectro de masas fue llevada a cabo en un detector cuadrupolo HP modelo 5973. La fuente de ionización fue de impacto electrónico. Los datos se obtuvieron por exploración completa en un rango de 30-550 uma. Se utilizó la librería Wiley Edición 7N. Las muestras se disolvieron en cloruro de metileno y la derivatización se realizó con trimetilsilano.

### **5.7 Preparación de las nanopartículas biodegradables con extracto**

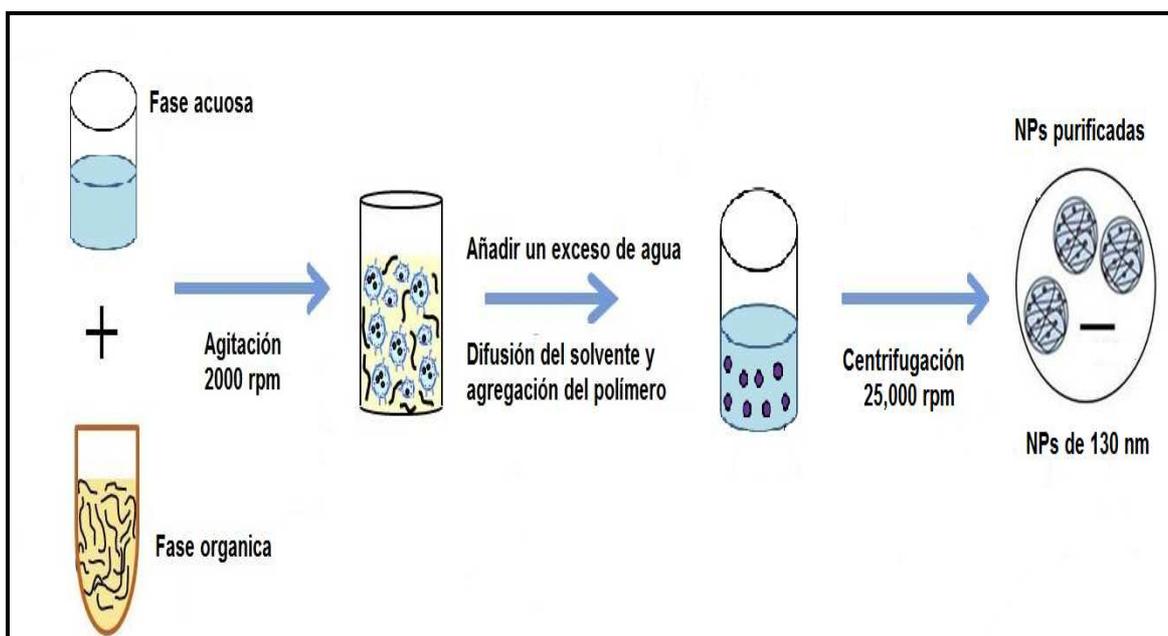
Las nanopartículas cargadas con extracto fueron preparadas por la técnica de nanoprecipitación (**Fig. 9**) para el extracto hexánico de *Carya illinoensis* y por la técnica de emulsificación-difusión (**Fig. 10**) para el extracto hexánico de *Juglans mollis*. En la técnica de nanoprecipitación se utilizó una relación polímero:extracto de 1:0.05 (p/p). La formulación de las nanopartículas consistió en la adición de una fase orgánica en una fase acuosa; donde la fase orgánica se compuso de 100 mg de polímero Eudragit<sup>®</sup> L 100-55, 5 mg de extracto hexánico de *C. illinoensis* disueltos en 10 mL de isopropanol/acetona 50:50 (v/v) y la fase acuosa correspondió a 25 mL de agua. La adición de una fase en otra se llevó a cabo por inyección en agitación continua y después se eliminó el solvente a presión reducida.



**Figura 9.** Método de nanoprecipitación para la encapsulación del extracto de *Carya illinoensis*.

Para la técnica de emulsificación-difusión se utilizaron 2.1 g de fase orgánica la cual consistió en 105 mg de Eudragit<sup>®</sup> L 100-55, 1.995 g de alcohol bencílico y 2.5 mg de extracto hexánico de *J. mollis*, a la cual se le adicionaron 3 g de una fase acuosa con 0.42 g de alcohol polivinílico al 14% p/p y 2.58 g de agua. Ambas fases fueron emulsificadas a 2000 rpm (EUROSTAR power-b, IKA<sup>®</sup>-WERKE) durante 20 min. Posteriormente se adicionaron 66 g de agua destilada para difundir el solvente e inducir la formación de nanopartículas.

Se midió el tamaño de las nanopartículas biodegradables por el procedimiento de dispersión de luz dinámica, en un Zetasizer Nano ZS (Malvern).



**Figura 10.** Método de emulsificación-difusión para la encapsulación del extracto de *Juglans mollis*.

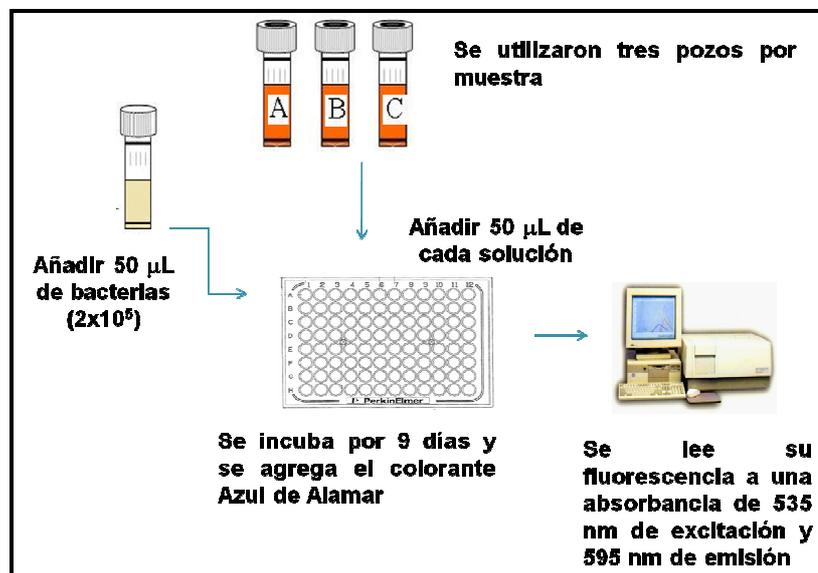
### 5.8 Activación de la cepa *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv

Para la activación la cepa se sembró por extensión en agar Middlebrook 7H10 (BBL, Becton-Dickinson; Cockeysville, MD), se incubó durante 21 días a 37 °C de temperatura en una atmosfera húmeda. Una vez transcurrido ese tiempo se observó crecimiento suficiente confirmándose la presencia de *M. tuberculosis* por medio de la tinción Ziehl-Neelsen. Posteriormente se tomaron las colonias de la micobacteria y se suspendieron en PBS, se tomó una muestra para contabilizar el número de bacterias en la cámara de Neubauer y se ajustó a una concentración de  $1 \times 10^6$  bacterias  $\text{mL}^{-1}$  en medio Middlebrook 7H9 (Difco Laboratories, Detroit, Mich.).

### 5.9 Evaluación de la actividad antituberculosa

Se utilizaron placas de 96 pozos estériles de fondo plano con tapa. Por cada muestra se sembró una caja y para cada concentración se tomaron tres pozos por

fila. Los rangos de las concentraciones finales de las diluciones de las muestras fueron: para la clofazimina (CLF) 5-0.312  $\mu\text{g mL}^{-1}$  la cual funge como fármaco control, para CIH, CIFM y CIFNM 500-62  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Se agregaron 50  $\mu\text{L}$  de medio Middlebrook 7H9 suplementado con OADC (ácido oleico, albúmina, dextrosa y catalasa) (Becton Dickison and Company, E.U.A) en donde se encuentra la muestra disuelta. Posteriormente se añadieron 50  $\mu\text{L}$  de la suspensión de *M. tuberculosis* ( $1 \times 10^5$  bacterias  $\text{mL}^{-1}$ ) a cada pozo, se dejaron 2 pozos como control de crecimiento de la bacteria. Los pozos del perímetro fueron llenados con agua estéril para minimizar la evaporación en la placa. Las placas fueron selladas con cinta adhesiva e incubadas a 37 °C por 10 días en una atmósfera húmeda. Al décimo día se añadieron 15  $\mu\text{L}$  de una mezcla de Azul de Alamar (Trek Sistemas Diagnóstico Ltd, Reino Unido) 1:1 con Tween 80 (Polisorbato 80, Sorbitan-Oleato, Poli-Oxietileno, Materiales y abastos especializados, México) al 10 % a cada uno de los pozos. Las placas se incubaron por 16 h y después se leyó su fluorescencia a una absorbancia de 535 nm de excitación y 595 nm de emisión (**Fig. 11**).



**Figura 11.** Esquema de montaje de la placa para la evaluación de la actividad antituberculosa por la técnica del Azul.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1 Obtención de los extractos

El material vegetal fue depositado e identificado con voucher No 025528 para *Carya illinoensis* y No 025551 para *Juglan mollis*. La obtención tanto del extracto hexánico de *C. illinoensis* (CIH) como del extracto hexánico de *J. mollis* (CJM) se realizó con soxhlet, debido a que este método tiene una eficiencia de extracción alta (Furton *et al.*, 1991). Con la utilización de este método, la eficiencia de la extracción fue de 1.32% como se observa en la **Tabla 1**, este valor coincide con lo reportado por Salinas González (2004) para esta especie. Los componentes químicos de la corteza se dividen en lipofílicos e hidrofílicos, la fracción lipofílica está constituida por sustancias solubles en solventes poco polares (hexano, éter etílico, diclorometano) como terpenos, terpenoides, ceras, grasas y alcoholes alifáticos superiores. La fracción hidrofílica está constituida por sustancias extraíbles en agua o por solventes de alta polaridad (acetona, alcohol etílico) y contiene gran cantidad de compuestos fenólicos. La acumulación de compuestos poco polares en la corteza es menor en comparación con los compuestos encontrados en la fracción hidrofílica. Debido a lo descrito anteriormente se explica el bajo rendimiento del extracto CIH, en comparación con una extracción realizada a partir de un solvente de alta polaridad, como lo reporta Orea-Igarza *et al.*, en el 2006.

De acuerdo a las pruebas coloridas, la caracterización fitoquímica preliminar resultó positiva para esteroides, terpenos, flavonoides, cumarinas y alcaloides. Tomando en cuenta que se analizó un extracto de naturaleza poco polar, los grupos de mayor presencia serán los que posean baja polaridad entre los cuales se encuentran los esteroides y terpenos.

**Tabla 1.-** Resultados del rendimiento y caracterización fitoquímica de los extractos de corteza de *C. illinoensis* y *J. mollis*.

<b>Especie</b>	<b>Rendimiento</b>	<b>Identificación parcial con reacciones coloridas</b>
<i>Juglans mollis</i>	3.205 %	Esteroles, flavonoides, terpenos ,cumarinas, alcaloides
<i>Carya illinoensis</i>	1.320 %	

## 6.2 Partición del extracto

En la partición llevada a cabo con metanol a partir del CIH se obtuvieron las fracciones CIFM y CIFNM, debido a la polaridad del solvente en la primera fracción se encuentran los componentes de mayor polaridad, mientras que en la segunda fracción se encuentran los componentes de menor polaridad. El resultado de haber realizado la partición se reflejó en la diferencia del número de señales observadas en los cromatogramas del extracto y sus dos fracciones. El número de señales registradas en los cromatogramas de CIFM y CIFNM es menor en comparación con el número de señales observadas en el cromatograma de CIH, como lo muestra la **Fig. 10**. Posteriormente se decidió determinar la presencia de ácido ursólico (AU) en la CIFM partiendo de dos argumentos, el primero fue la naturaleza polar de éste fitoquímico lo cual le permitiría tener afinidad por el solvente utilizado en la partición y el segundo se basó en el estudio desarrollado por Bankeu *et al.*,<sup>64</sup> donde se reportó la presencia de AU en extractos metanólicos de la corteza de algunos árboles.

### 6.3 Análisis cromatográfico por HPLC-DAD

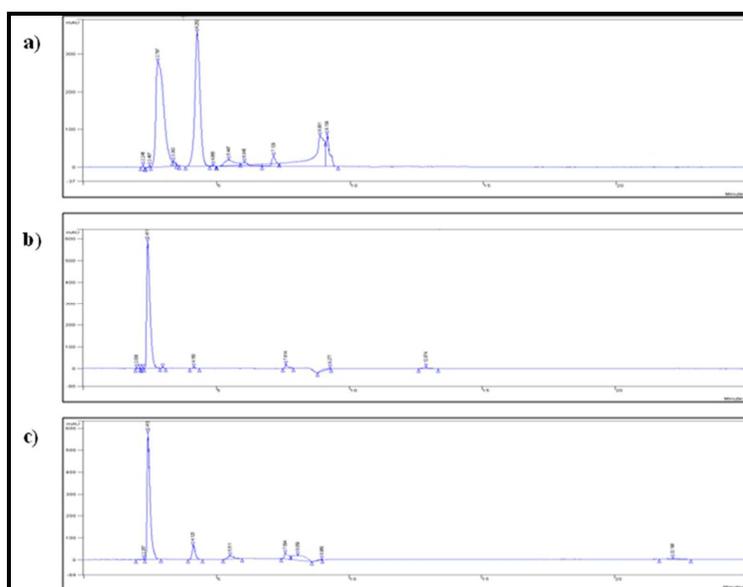
Para su caracterización el extracto y sus fracciones se analizaron por HPLC. La primer etapa consistió en obtener las condiciones de separación de los componentes de manera optimizada con el fin de obtener el mayor número de señales posibles.

Inicialmente se utilizó una columna  $C_{18}$  con una fase móvil de acetonitrilo (MeCN), sin embargo con esta fase se obtuvieron varias señales traslapadas y con un bajo tiempo de retención (Tr). Posteriormente se probó un gradiente de una mezcla de dos soluciones según recomendación de Weber 2003; solución A: (MeCN) y solución acuosa acetato de amonio ( $AcNH_4$ ) 50 mM pH 6.0 (90:10) y solución B: MeCN y solución acuosa  $AcNH_4$  50 mM pH 6.0 (10:90).

Se probaron cinco mezclas de las soluciones (A/B): 90/10, 75/25, 50/50, 25/75 y 10/90 pero bajo estas condiciones no se detectó ninguna señal de los compuestos del extracto, razón por la cual se optó por evaluar una fase móvil con una solución amortiguadora a menor concentración y se ensayaron mezclas de MeCN y  $AcNH_4$  10 mM pH 6.0 en diferentes proporciones: 80:20 y 70:30; con esta última elección se obtuvo una separación aceptable de la muestra ya que se obtuvieron seis señales, no obstante, el Tr de la muestra fue muy corto. Para aumentar el Tr se probó una fase móvil con una solución amortiguadora ácida; MeCN y solución acuosa de ácido fórmico 100 mM pH 4.85 en las proporciones: 60:40, 70:30, 75:25 y 80:20; mejorando aún más la separación ya que se obtuvieron diez señales, pero con una pobre resolución debido al Tr bajo. En todos los sistemas anteriores se usó un flujo de  $1 \text{ mL min}^{-1}$ .

Finalmente se utilizó MeOH y solución acuosa de  $CH_2O_2$  100 mM con un pH menor de 3.0, en las siguientes proporciones: 70:30, 55:45 y 50:50 con un flujo de  $0.8 \text{ mL min}^{-1}$ , seleccionado éste último como el mejor sistema, ya que se obtuvieron ocho señales y se logró mejorar el Tr. En el perfil cromatográfico de CIH se registraron las ocho señales, contando la señal del tiempo muerto con un Tr de

2.433 min. La inyección del estándar de AU fue de particular interés ya que se identificó la señal del mismo, el cual tiene un Tr de 6.050 min, además de que se comparó con el cromatograma de CIFM obteniéndose una coincidencia en el Tr del AU. Para este compuesto existen reportes previos de su presencia en la corteza de otras especies como es el caso de *Physocarpus intermedius* (Bankeu *et al.*, 2010). Debido a los resultados satisfactorios obtenidos bajo estas condiciones, se decidió analizar las fracciones CIFM y CIFNM bajo las mismas condiciones (**Fig. 12**). En base a los resultados obtenidos en este análisis se planteó someter las muestras a una espectrometría de masas.

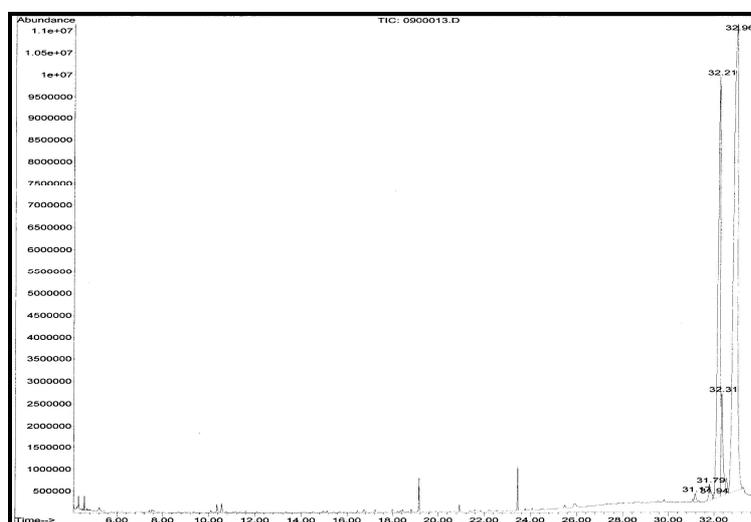


**Figura 12.** Análisis por medio de HPLC-DAD a) cromatograma del extracto hexánico de corteza de *C. illinoensis*, b) cromatograma de la fracción metanólica del extracto de *C. illinoensis* y c) cromatograma de la fracción no metanólica del extracto de *C. illinoensis*.

## 6.4 Caracterización del extracto por GC-MS

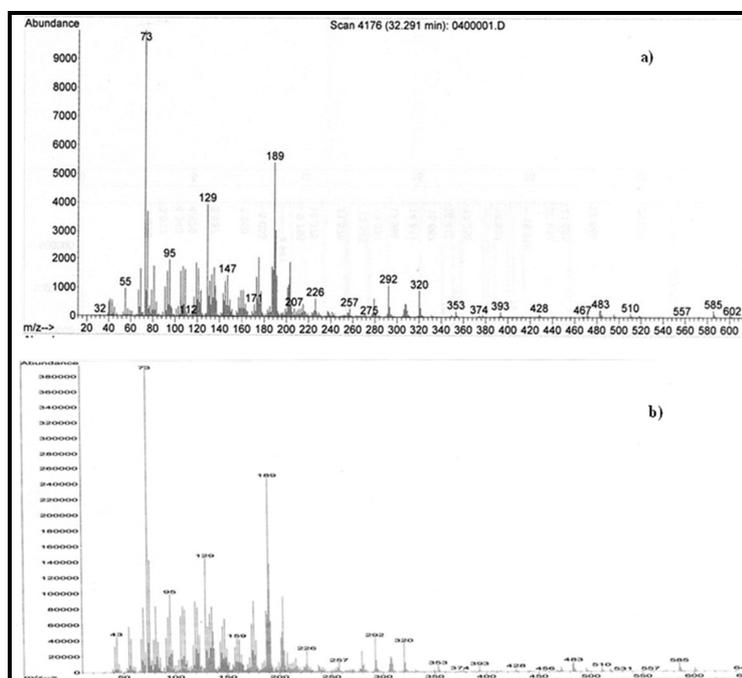
Antes de llevar a cabo el análisis de GC-MS, todas las muestras fueron derivatizadas con trimetilsilano, este procedimiento se llevó a cabo debido a que la mayoría de los compuestos encontrados en CIH, CIFM y CFNM así como cada uno de los estándares estudiados poseen un peso molecular superior a 300 uma (Tanachatchairatana, 2008), además de grupos funcionales con hidrógenos activos (COOH, OH, NH y SH) ya que ambas características afectan negativamente la volatilidad de estos compuestos.

Al analizar el estándar de AU por GC-MS este mostró un Tr de 32.96 min (**Fig. 13**). Una vez obtenido el espectro de masas del AU se comparó con el espectro de masas obtenido por el componente que presentó el mismo Tr presente en la muestra CIH. Sin embargo, ambos espectros difirieron entre sí, lo que permitió descartar la presencia de AU en la fracción estudiada.



**Figura 13.** Cromatograma de gases del estándar de ácido ursólico derivatizado con trimetilsilano.

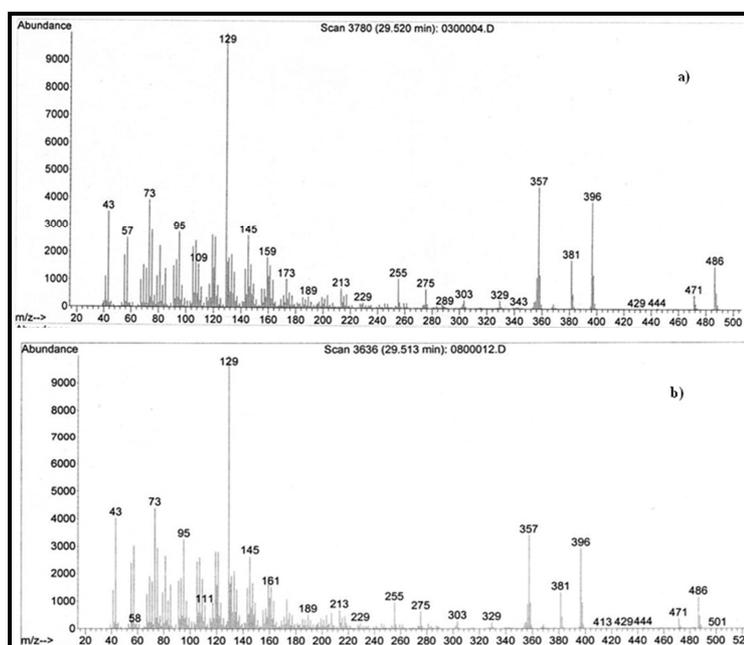
No obstante, se cotejaron todas las señales obtenidas de CIH en la librería Wiley Ed. 7N, la señal que registró un Tr de 32.3 min fue identificada como ácido betulínico (AB). Considerando la identificación realizada por la librería Wiley Ed. 7N, se analizó el estándar de AB para confirmar la presencia de este compuesto en dicha muestra. El estándar de AB mostró el mismo Tr y espectro de masas que el componente presente en CIH, lo cual confirmó la presencia de dicho triterpeno en la misma (**Fig. 14**).



**Figura 14.** Comparación de espectros de masas del total de iones de: a) estándar de ácido betulínico y b) muestra de extracto hexánico de corteza de *C. illinoensis*.

De igual manera la señal con un Tr de 29.52 min fue identificada como  $\beta$ -sitosterol por la librería Wiley Ed. 7N, en este caso también se analizó un estándar de dicho compuesto. Tanto el Tr como el espectro de masas fueron iguales en ambas

muestras, lo cual confirmó la presencia de éste fitoesterol en la muestra de CIH (**Fig. 15** y **Fig. 16**).

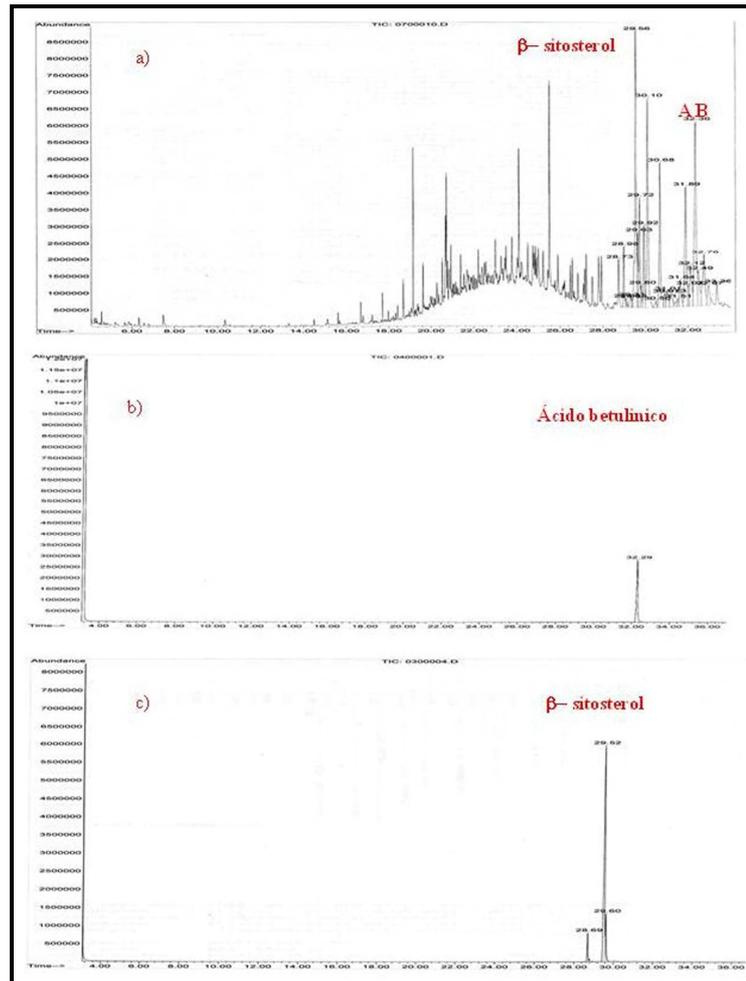


**Figura 15.-** Comparación de espectros de masas de: a) estándar  $\beta$ - sitosterol y b) muestra de extracto de *C. illinoensis*.

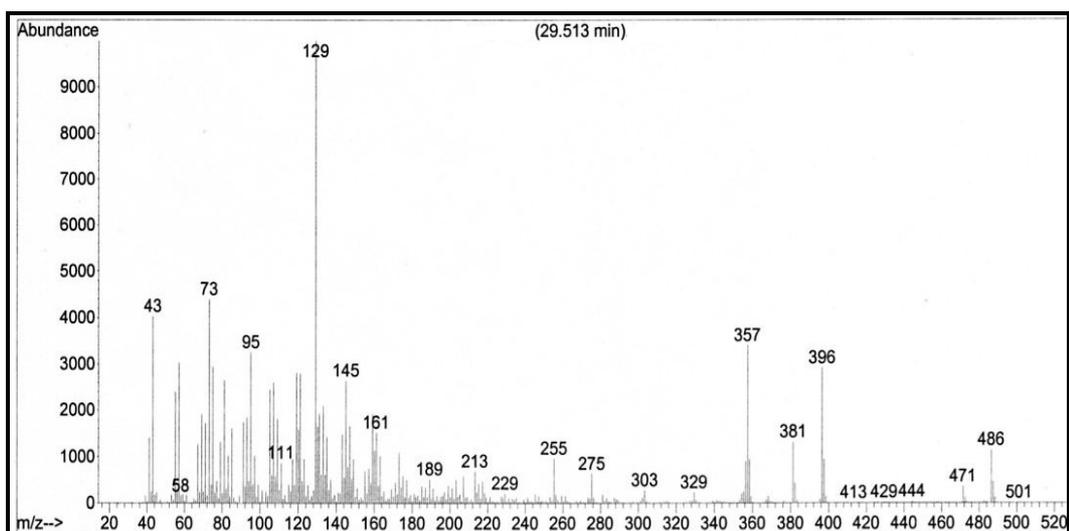
Cabe señalar que el AB y el  $\beta$ - sitosterol también se identificaron en la fracción CIFM y ambos compuestos también han sido utilizados en investigaciones previas por sus propiedades antiTB, como lo reportan los trabajos desarrollados por Tanachatchairatana y col., en el 2008 y Salutes *et al.*, en el 2002. Por otro lado, en la muestra CIFNM, los compuestos identificados fueron  $\gamma$ - sitosterol,  $\alpha$ - amirina y sitostenona, de los cuales, solamente la  $\alpha$ -amirina cuenta con reportes sobre su acción biológica frente a *M. tuberculosis*.

También se analizó el contenido de la nanopartícula cargada con extracto de *C. illinoensis* (NIC), identificándose el  $\beta$ -sitosterol como el compuesto encapsulado en las nanopartículas (**Fig. 17**). La naturaleza hidrofóbica del  $\beta$ -sitosterol fue el factor

determinante para que este compuesto se incorporará a la nanopartícula. Se han desarrollado estudios donde se ha logrado incorporar compuestos hidrofóbicos como el el  $\beta$ -caroteno (Tan y Nakajima, 2005; Yuan et al., 2007) y fitoesteros (Schubert y Engel, 2004) en sistemas nanodispersados.



**Figura 16.** Análisis por medio de GC-MS : a) cromatogramas del extracto hexánico de corteza de *C. illinoensis*, b) cromatograma del estándar de ácido betulínico y c) cromatograma del estándar de  $\beta$ -sitosterol.

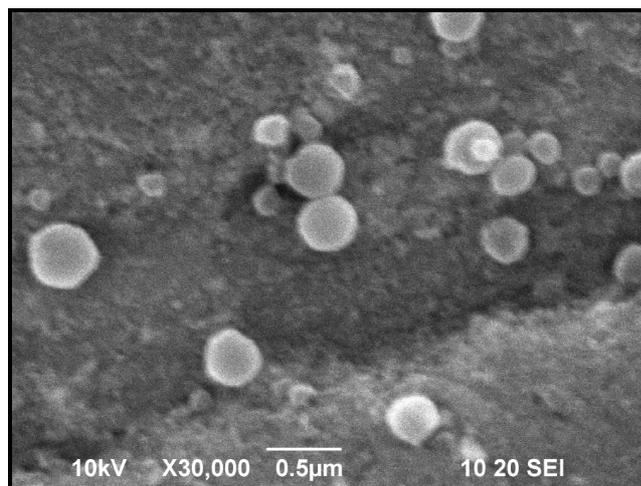


**Figura 17.** Espectro de masas de las nanopartículas biodegradables cargadas con extracto hexánico de *C. illinoensis* (NCI).

### 6.5 Elaboración y caracterización de nanopartículas poliméricas

Para la elaboración de las nanopartículas poliméricas cargadas con extracto de *J. mollis* (NJM) se utilizó el polímero Eudragit® L100-55 con la técnica de emulsificación-difusión obteniéndose nanopartículas de 130 nm con un índice de polidispersidad (PI) de 0.100. El polímero utilizado para la preparación de las nanopartículas poliméricas cargadas con extracto de *C. illinoensis* (NCI) fue D-ácido láctico. El tamaño de las NCI fue de 180 nm con PI de 0.070. El PI es un parámetro para la amplitud de la dispersión de la distribución del tamaño de las partículas.

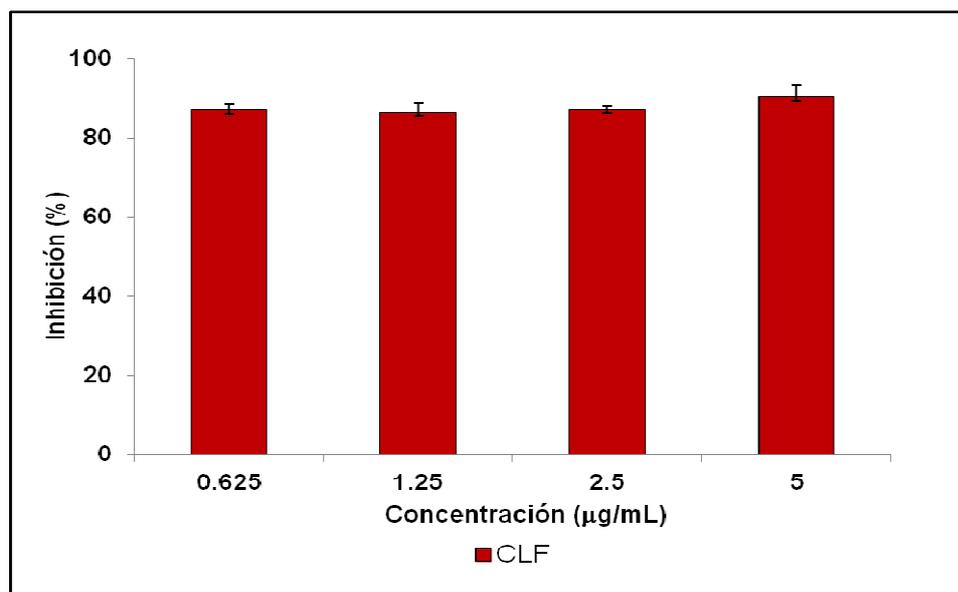
Se realizó una microscopía electrónica de barrido para observar la morfología de las nanopartículas, las cual confirmó que poseen forma esférica con una superficie lisa, como se muestra en la **Fig. 18**.



**Figura 18.** Micrografía electrónica de barrido de nanopartículas poliméricas biodegradables cargadas con extracto hexánico de *Carya illinoensis*.

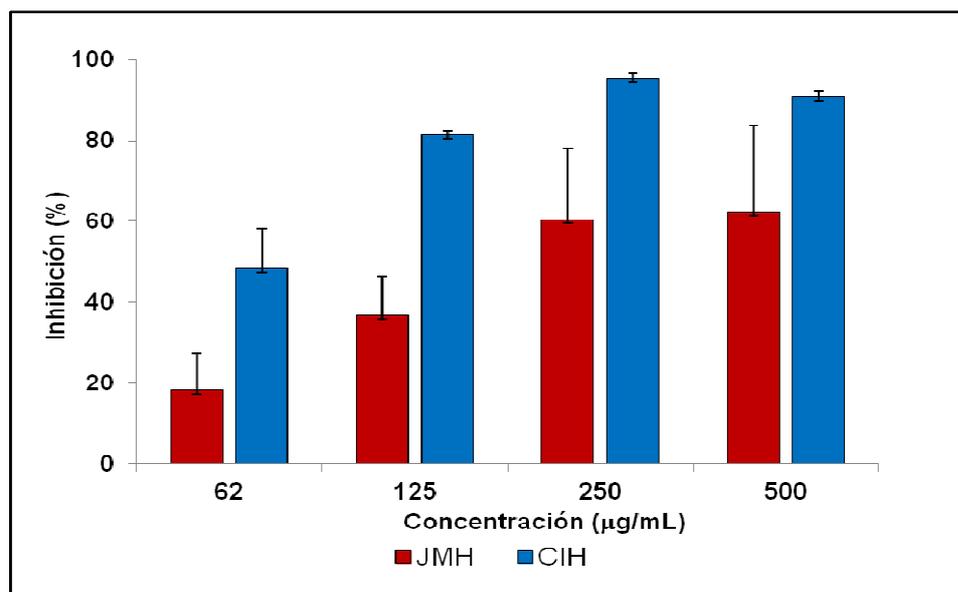
## 6.6 Evaluación de la actividad antituberculosa

La actividad antimicobacteriana de los extractos y las fracciones se evaluó con el método colorimétrico de azul de alamar a partir de diluciones seriadas. Antes de llevar a cabo la evaluación de los mismos se realizó el ensayo con CLF, de esta manera se determinó la concentración empleada como control positivo en cada ensayo. El rango de concentraciones utilizado en la evaluación biológica de CLF fue de 5 hasta  $0.312 \mu\text{g mL}^{-1}$ , todas las concentraciones presentaron una inhibición superior del 80% (**Fig. 19**). Para cada ensayo, se utilizó la concentración de  $0.500 \mu\text{g mL}^{-1}$  de CLF como control positivo.



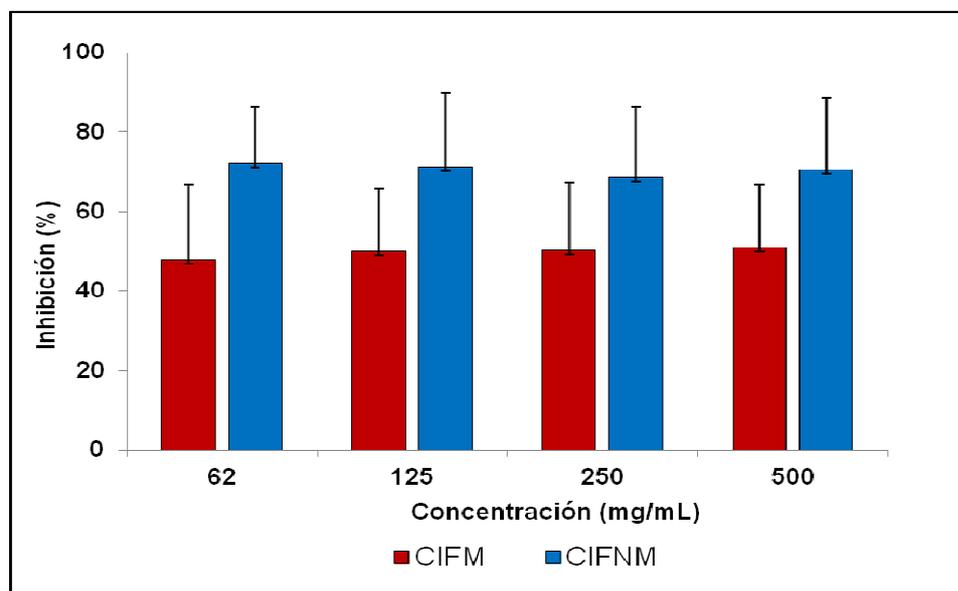
**Figura 19.** Efecto inhibitorio determinado por la técnica de reducción de Azul de Alamar de la clofazimina contra *M. tuberculosis H37Rv*.

El rango de concentraciones evaluadas para JMh, CIH, CIfM y CIfNM, fue de 500-31 µg mL<sup>-1</sup>. Como puede observarse CIH mostró un rango de inhibición entre 80 y 90% en las tres concentraciones más altas ensayadas 500, 250 y 125 µg mL<sup>-1</sup>. En lo que respecta a JMh, esta exhibió un máximo de 60% de inhibición a una concentración de 500 µg mL<sup>-1</sup>, estos resultados indican la pobre actividad antituberculosa de esta muestra comparada con CIH (**Fig. 20**). En base a esta observación se decidió elaborar solo las nanopartículas poliméricas cargadas con extracto hexánico de *C. illionensis*.



**Figura 20.** Efecto inhibitorio determinado por la técnica de reducción de Azul de Alamar de los extractos hexánicos de *C. illinoensis* y *J. mollis* contra el crecimiento de la cepa H37Rv de *M. tuberculosis*.

En la **Fig. 21** se muestran los resultados obtenidos para CIFM y CIFNM. Como se observa ninguna de las concentraciones evaluadas para la fracción CIFM mostró una inhibición superior del 50%. Por su parte la fracción CIFNM, exhibió un 70% de inhibición en cada una de las concentraciones evaluadas. Cabe destacar la diferencia en el porcentaje de inhibición exhibido por CIH y CIFNM a concentraciones bajas, por ejemplo el extracto completo a  $62 \mu\text{g}^{-1}$  presentó aproximadamente el 50% de inhibición mientras que la fracción CIFNM presentó una inhibición aproximadamente de 70%. A pesar de la alta inhibición conseguida a una baja concentración por parte de CIFNM, se aprecia que el porcentaje de inhibición no guarda proporción con las diferentes concentraciones ensayadas ya que en todas las concentraciones la inhibición alcanzada no tuvo variación; siendo superada esta inhibición por la obtenida con CIH, razón por la cual se plantea que existe una sinergia entre los componentes del CIH lo que permite que esta muestra supere a la CFNM.



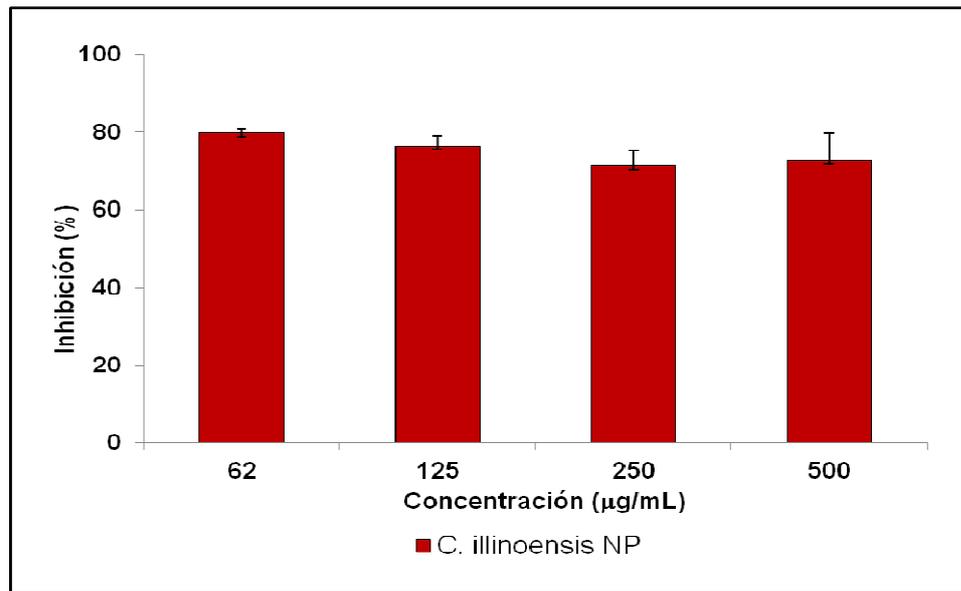
**Figura 21.** Efecto inhibitorio determinado por la técnica de reducción de Azul de Alamar de las fracciones metanólicas y no metanólicas del extracto de *C. illinoensis* contra el crecimiento de la cepa H37Rv de *M. tuberculosis*.

Para el caso de la evaluación de la actividad antituberculosa de la formulación de NCI se probó un rango de concentraciones de 5-0.312  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Los resultados de NCI muestran una actividad promedio de 70% (**Fig. 22**); lo que demuestra que la actividad del extracto no se vio afectada en gran medida por el proceso de elaboración de las nanopartículas. Sin embargo de acuerdo a lo señalado en el análisis por cromatografía de gases el componente principal de la NCI fue el  $\beta$ -sitosterol, mientras que en CIH también se identificaron el ácido betulínico y estigmasterol, lo anterior nos indica que no todos los compuestos del extracto libre fueron encapsulados en las nanopartículas. Además de la evaluación de NCI también se evaluó una formulación de nanopartículas blanco como control para determinar el efecto del polímero sobre la viabilidad de la micobacteria.

El polímero utilizado en este estudio fue D- ácido láctico, el cual de acuerdo a un estudio de perfil de liberación, tarda hasta cuatro semanas en liberar el principio activo que esta encapsulado; situación que puede haber influido en el nulo resultado obtenido al aplicar el tratamiento con la nanopartícula sólida (Miller *et al.*, 1977; Heya *et al.*, 1991). Debido a que cuando se administraron en su forma sólida no hubo interacción con la micobacteria, se decidió alterar la integridad de las NIC mediante la disolución del material polimérico constituyente de la partícula y liberar el contenido.

Debido a las aplicaciones terapéuticas atribuidas a los esteroides y triterpenos para el tratamiento de la tuberculosis pulmonar, se han desarrollado algunas investigaciones para descubrir los mecanismos de acción bajo los cuales estos compuestos actúan contra el bacilo de *M. tuberculosis*. La alta lipofiliidad de las sustancias ha sido reportado como una característica importante de la actividad antimicobacteriana (Silva *et al.*, 2007). Debido al hecho de que el pared celular de las micobacterias contienen sustancias lipofílicas tal como ácido micólico, sustancias más lipofílicas son capaces de penetrar más fácilmente en la célula (Palomino *et al.*, 2002). Se ha demostrado con una serie de terpenos que la actividad mejora con la lipofiliidad de la sustancia, en comparación con su análogos más polares (Rivera *et al.*, 2001). Conjuntamente se han encontrado evidencias del efecto inmunomodulador de los esteroides usando una mezcla de beta-sitosterol/sitosterina. En este estudio se plantea que el mecanismo de acción posiblemente está relacionado con un efecto sobre el control de las citocinas inflamatorias. Esta modulación en la producción y actividad de citocinas, ejerce efectos beneficiosos en pacientes con enfermedades infecciosas (Bouic y Lamprecht, 1999; Bouic, 2001). A pesar de que el mecanismo exacto de acción de los esteroides aun no se conoce se sugiere que puede estar relacionado con el metabolismo del colesterol o los efectos antiinflamatorios a través de una interferencia en el metabolismo de la prostaglandina (Lowe y Ku, 1996) .

El ácido betulínico también tiene un efecto modulador de la respuesta inmune (Yun *et al.*, 2003). Al igual que en el caso de los esteroides, el mecanismo de acción de terpenos no se entiende completamente, pero se especula que implican disrupción de la membrana por los compuestos lipofílicos (Mendoza *et al.*, 1997).



**Figura 22.** Efecto inhibitorio determinado por la técnica de reducción de Azul de Alamar de las nanopartículas cargadas con extracto hexánico de *C. illinoensis* contra el crecimiento de la cepa H37Rv de *M. tuberculosis*.

## 7. CONCLUSIONES

El extracto hexánico de corteza de *C. illinoensis* mostró un rango de inhibición entre 80 y 95 % en las tres concentraciones más altas ensayadas 125, 250 y 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , lo cual representa una potencial alternativa para el tratamiento quimioterapéutico de la tuberculosis debido a la actividad antituberculosa que posee. Se sugiere que la acción antimicobacteriana se presenta por la sinergia de sus componentes ya que el fraccionamiento disminuye dicha actividad. Finalmente una vez evaluada su actividad antituberculosa, éste se analizó por GC-MS y se identificó la presencia de ácido betulínico, no reportado en esta especie, y  $\beta$ -sitosterol, moléculas a las cuales se les atribuye la actividad biológica que presenta el extracto.

Se desarrolló un método para la nanoencapsulación del extracto hexánico de *C. illinoensis*; estas nanopartículas mostraron una actividad promedio de 70% de inhibición. Aunque solo ciertos compuestos activos fueron atrapados en el proceso de encapsulación esto no afectó la actividad antituberculosa del extracto.

El desarrollo de un método para la encapsulación de un extracto, abre el camino para seguir estudiando nuevas moléculas provenientes de plantas; así como de emplear tecnologías farmacéuticas emergentes como nuevas formas de administración

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Adams M, Wube AA, Bucar F, Bauer R, Kunert O, Haslinger E. 2005. Quinolone alkaloids from *Evodia rutaecarpa*: a potent new group of antimycobacterial compounds. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 26(3): 262-264.
- 2.- Adlercreutz H. 1998. Epidemiology of phytoestrogens. *Baillière's Clinical Endocrin. Metab.* 12: 605-623.
- 3.- Adlercreutz H, Mazur W. 1997. Phytoestrogens and western diseases. The Finish Medical Society. *DUODECIM. Ann. Med.* 29: 95-120.
- 4.- Argueta A. 1994. Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana. Instituto Nacional Indigenista. Vol. 3, 172.
- 5.- Avalos-García A, Pérez-Urria Carril E. 2009. Metabolismo secundario de plantas. *REDUCA (Biología). Serie fisiología vegetal.* 2(3): 119-145.
- 6.- Awad AB, Downie A, Finks CS, Kim U. 2000. Dietary phytosterol inhibits the growth and metastasis of MDA-MB-231 human breast cancer cell grown in SCID mice. *Anticancer Res.* 20: 821-824.
- 7.- Balasubramanian K. 1997. Herbal remedies: consumer protection, concerns. Consumers International, Penang.
- 8.- Bankeu JJK, Mustafa SAA, Gojayev AS, Lenta BD, Nougouè DT, Ngouela SA, Asaad K, Choudhary MI, Prigge S, Guliyev AA, Nkengfack AE, Tsamo E, Shaiq Ali M.

2010. Ceramide and cerebroside from the steam bark of *Ficus mucosa* (Moraceae). *Chemical Pharmacology Bulletin*, 58: 1661-1665

9.- Barry III CE, Slayden RA, Sampson AE, Lee RE. Use of genomics and combinatorial chemistry in the development of a new antimycobacterial drugs. *Biochem. Pharmacol.* 2000, 59: 221-231.

10.- Bezanger-Beauquesne L, Pinkas M y Torck M. 1986. *Les plantes dans la therapeutique moderne*. Maloine, París.

11.- Bravo L. 1998. Polyphenol: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. *Nutr. Rev.* 56(11): 317-333.

12.- Breytenbach U, Clark A, Lamprecht J, Bouic P. 2001. Flow cytometric analysis of the Th1-Th2 balance in healthy individuals and patients infected with the human immunodeficiency-virus (HIV) receiving a plant sterol/sterolin mixture. *Cell. Biol. Int.* 25:43-49.

13.- Brieskorn CH, Suss HP. Triterpenoids from the peels of pear and apple. *Arch. Pharm. (Weinheim Ger.)* 307: 949-960.

14.- Bouic PJD. 1997. Immunomodulation of the HIV/AIDS: The Tygerberg/Stellenbosch University experience. *AIDS Bull.* 6: 18-20.

15.- Bouic PJD. 2001. The role of phytosterols and phytosterolins in immunomodulation: a review of the past 10 years. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* 4: 471-475.

16.- Bouic PJD, Lamprecht JH. 1999. Plant sterols and sterolins: a review of their immunomodulating properties. *Altern. Med. Rev.* 4: 170-177.

- 17.- Burman WJ, Gallicano K, Peloquin C. 2001. Comparative pharmacokinetics and pharmacodynamics of the rifamycin antibacterials. *Clin. Pharmacokinet.* 40: 327-341.
- 18.- Bye R, Estrada LE, Linares M.E. 1995. Recursos genéticos en plantas medicinales de México. en Ortega, P.R. *et al.*, (eds). Avances en el estudio de los recursos fitogénitos de México. Sociedad Mexicana de Fitogenética. 341-359.
- 19.- Calleja-Avellanal I, Dios-Vieitez, MC, Ruz-Exposito N, Renedo-Omaecheverría MJ, Blanco-Prieto MJ. 2003. Desarrollo y caracterización de nanopartículas de rifampicina para su aplicación en el tratamiento de la tuberculosis. *Tecnología Farmacéutica. VI Congreso de la Sociedad Española de Farmacia Industrial y Galénica (SEFIG).* 57-59.
- 20.- Cantrell CL, Franzblau SG, Fischer NH. 2001. Antimycobacterial plant terpenoids. *Planta Med* 65: 685-694.
- 21.- Cebrián- Hernández A, Infante-Blanco R, Vara-Vallejo A. 2005. Los polímeros en medicina. *Química y Tecnología de macromoléculas. Escuela de Ingenierías Industriales. Universidad de Valladolid.*
- 22.-Correa CM. 2002. Protección y promoción de la medicina tradicional: consecuencias para la salud pública en los países en desarrollo. *Universidad de Buenos Aires.*
- 23.- Couvreur P, Dubernet C, Puisieux F. 1995. Controlled drug delivery with nanoparticles current possibilities and future trends. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 41: 2-13.
- 24.- Cron MJ, Farding OB, Johnson DL, Schmitz H, Whitehead DF, Hooper IR, Lemieux RU. 1958. The chemistry of Kanamycin. *J. Am. Chem. Soc.* 80: 2342.
- 25.- Cruz-Vega DE, Verde-Star MJ, Salinas-González N, Rosales-Hernández B, Estrada-García I, Méndez-Aragón P, Carranza-Rosales P, González-Garza MT, Castro-

Garza J. 2008. Antimycobacterial activity of *Juglans regia*, *Juglans mollis*, *Carya illinoensis* and *Bocconia frutescens*. *Phytother. Res.* 4:557-559.

26.- Daffe M, Draper P, 1988. The envelope layers of mycobacteria with reference to their pathogenicity. *Adv. Microbiol. Physiol.* 39: 131-203.

27.- Desai SJ, Prabhu BR, Mulchandani NB. 1988. Aristolactams and 4,5-dioxoaporphines from *Piper longum*. 27(5): 1511-1515.

28.- De Stefani E, Boffeta P, Ronco AL, Brennan P, Deneo-Pellegrini H, Carzoglio JC, Mendilaharsu M. 2000. Plant sterols and risk of stomach cancer: a case study in Uruguay. *Nutr. Cancer.* 37: 140-144.

29.- Dhiman N, Dutt M, Khuller GK. 2000. Poly(DL-lactide-co-glycolide) based delivery systems for vaccines and drugs. *Indian J. Exp. Biol.* 38: 746-752.

30.- Donald PR, Lampredit JH, Freestone M, Albrecht CF, Bouic PJD, Kofze D, Van Jaarsveld PP. 1997. A randomized placebo-controlled trial of the efficacy of beta sitosterol and its glucoside as adjuvants in the treatment of pulmonary tuberculosis. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 6: 518-522.

31.- Dutt M, Khuller GK. 2001a. Sustained release of isoniazida from single injectable dose of poly(DL-lactide-co-glycolide) microparticles as a therapeutic approach towards tuberculosis. *Int. J. Antimicrob. Agents Chemother.* 17: 115-122.

32.- Dutt M, Khuller GK. 2001b. Chemotherapy of *Mycobacterium tuberculosis* infections in mice by combination of isoniazida and rifampicina drugs entrapped in poly (DL-lactide-co-glycolide) microparticles. *J. Antimicrob. Chemother.* 47: 829-835.

- 33.- Dutt M, Khuller GK. 2001c. Therapeutic efficacy of poly(DL-lactide-co-glycolide) encapsulated antitubercular drug against M. tuberculosis infection induced in mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45: 363-366.
- 34.- Einzhamer DA, Xu ZQ. 2004. *Drugs.* 7: 359-373.
- 35.- Enarson DA, Rieder HL, Arnadottir T, Trébucq A. 2000. Management of tuberculosis: a guide for low income countries. 5th ed. Paris: International Union against Tuberculosis and lung disease. Disponible en: [www.iuatld.org](http://www.iuatld.org).
- 36.- Falk R, Randolph TW, Meyer JD, Kelly RM, Manning MC. 1997. Controlled release of ionic compounds from poly(L-lactide) microspheres produced by precipitation with a compressed anti-solvent. *J. Control Rel.* 44: 77-85.
- 37.- Food and Agriculture Organization (FAO). 1995. Flavours and fragrances of plant origin. Roma: FAO.
- 38.- Frame AD, Ríos-Olivares E, De Jesús L, Ortiz D, Pagan J, Mendez S. 1998. Plants from Puerto Rico with anti-Myco bacterium tuberculosis properties. *Puerto Rico Health Sci. J.* 17: 243-252.
- 39.- Furton KG, Perez MI. A sensual separation science experiment: Solvent extraction and chromatographic separation of menthol utilizing various consumer products. *J. Chem. Ed.* 1991; 68: 946-947.
- 40.- Gershenzon J, Dudareva N. 2007. The function of terpene natural products in the natural world. *Nature Chemical Biology.* 3 (7): 408-414.
- 41.- Gobierno del Estado de Puebla. 2005-2011. Secretaría de Desarrollo Rural. Cultivo de plantas medicinales.

- 42.- Gómez-Flores R, Quintanilla-Licea R, Rodríguez-Padilla C. 2005. *Actividades Antimicrobiana y antitumoral del extracto de hojas de *Gymnosperma glutinosum**. San Nicolas de los Garza, UANL.
- 43.- Graham JG, Zhang H, Pendland SL, Santarsiero BD, Mesecar AD, Cabieses F, Farnsworth NR. 2004. Antimycobacterial naphthopyrones from *Senna obliqua*. *J. Nat. Prod.* 67: 225.
- 44.- Gu JQ, Wang Y, Franzblau SG, Montenegro G, Yang D, Timmerman BN. Antitubercular constituents of *Valeriana loxiflora*. *Planta Med.* 70: 509-514.
- 45.- Gutiérrez MC, Droguet M. La cromatografía de gases y la espectrometría de masas: Identificación de compuestos causantes de mal olor. 2002. *Boletín intexter.* 122: 35-41.
- 46.- Hanifa Moursi SA, Al-Khatib IM. Effect of *Melia azedarach* fruits on gipsing restraint stress-induced ulcers in rats. *Jpn J. Pharmacol.* 36: 527-533.
- 47.- Haskell TH, Fusari SA, Frohardt RP, Bartz QR. 1952. The chemistry of viomycin. *J. Am. Chem. Soc.* 74: 599-602.
- 48.- Herr EB y Redstone MO. 1966. Chemical and physical characterization of capreomycin. *Am. NY Acad. Sci.* 135: 940.
- 49.- Hersch-Martínez P. 1995. Commercialization of wild medicinal plants from southwest. *Economy Botany.* 49: 197-206.
- 50.- Hersch-Martínez P. 1995. Destino común: los recolectores y su flora medicinal. Instituto Nacional de Antropología e Historia.

- 51.- Hertog MGL, Feskens EJM, Kromhout D, Hollman PCH, Katan MB. 1993. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen elderly study. *The Lancet*. 342(8878): 1007-1011.
- 52.- Hertog MGL, Hollman PCH, Van de Putte B. 1993. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of tea infusions, wines and fruit juices. *J. Agric. Food Chem.* 41: 1242-1246.
- 53.- Hirst P y Thompson G. 1996. *Globalization in question*. Polity Press.
- 54.- Jores K, Mehnert W, Bunjes H, Drechsler M, Mäder K. 2004. Investigations on structure of solid lipid nanoparticles (SLN) and oil-loaded solid lipid nanoparticles by photon correlation spectroscopy, field-flow fractionation and transmission electron microscopy. *J. Control. Release* 95, 217-227.
- 55.- Kaneko H, Nakanishi K. Proof of the mysterious efficacy of ginseng basic and clinical trials: clinical effects of medical ginseng, korean red ginseng: especially its anti-stress action for prevention of disease. *J. Pharmacol. Sci.* 95: 158-162.
- 56.- Kawaguchi H, Naito T, Nakagawa S, Fujisawa K. 1972. BB-K a new semisynthetic aminoglycoside antibiotic. *J. Antibiot.* 25: 695.
- 57.- Kettler H. Using intellectual property regimes to meet global health needs. Comisión sobre derechos de propiedad intelectual. Study paper 2b. Disponible en: [www.ipreommission.uk](http://www.ipreommission.uk).
- 58.- Kristo TS, Terdy PP, Simandi B, Szoke E, Lemberkovics E, Kery A. 2001. Efficiency of supercritical fluid extraction for the production of non-volatile terpenoids from *Taraxaci radix*. *Acta Pharm. Hung.* 71: 318-324.

- 59.- Kuehl FA, Peck RL, Hoffhine CE, Peel EW, Folkers K. 1947. Streptomyces antibiotics XIV. The position of the linkage of streptobiosamine to streptidine in streptomycin. J. Am. Chem. Soc. 69: 1234.
- 60.- Lall N, Meyer JJM. 1999. In vitro inhibition of drug-resistant and drug-sensitive strains of *Mycobacterium tuberculosis* by ethnobotanically selected South African plants. J. Etnopharm. 66: 347-354.
- 61.- Lambert SJ, Srivastava J y Vieyer N. 1997. Medicinal plants rescuing a global heritage. World Bank Technical Paper N° 355. World Bank, Washington, DC.
- 62.- Llabot JM, Palma SD, Allemand DA. 2008. Nanopartículas poliméricas sólidas. Revista Nuestra Farmacia. 53: 40-47.
- 63.- Lowe FC, Ku JC. 1996. Phytotherapy in treatment of benign prostatic hyperplasia: a critical review. Urol 48(1):12-20.
- 64.- Martínez A. 2002. Esteroles. Facultad de Química Farmacéutica. Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia.
- 65.- Martínez M. 1979. Plantas Mexicanas, Catálogo de Nombres Vulgares y Científicos. Fondo de Cultura Económica. México. 636 y 1142.
- 66.- Mata R, Morales I, Perez O, Rivero-Cruz I, Acevedo L, Enriquez-Mendoza I, Bye R, Franzblau S, Timmermann B. 2004. Antimycobacterial Compounds from *Piper sanctum*. J. Nat. Prod. 67(12): 1961-1968.

- 67.- McClean S, Prosser E, Meehan E, O'Malley D, Clarke N, Ramtoola Z, Brayden D. 1998. Binding and uptake of biodegradable poly-lactide micro and nanoparticles in intestinal epithelia. *Eur. J. Pharm. Sci.* 6: 153-163.
- 68.- Mendoza, L., M. Wilkens, and A. Urzua. 1997. Antimicrobial study of the resinous exudates and of diterpenoids and flavonoids isolated from some Chilean *Pseudognaphalium* (Asteraceae). *J. Ethnopharmacol.* 58:85–88.
- 69.- Miller RA, Brady JM, Cutright DE. 1977. Degradation rates of oral resorbable implants (polylactates and polyglycolates): Rate modification with changes in PLA/PGA copolymer ratios. *J. Biome. Mater. Res.* 11 (5): 711-719.
- 70.- Murillo JI, Encarnación-Dimayuga R, Malmstrom J, Christophersen C, Franzblau SG. 2003. Antimycobacterial flavones from *Haplopappus sonorensis*. *Fitoterapia.* 74:226.
- 71.- Narave FH. 1983. Flora De Veracruz, Junglandaceae. Instituto De Investigaciones Sobre Recursos Bioticos. Xalapa, Mexico. 11-12.
- 72.- Newton SM, Law C, Wrigth CW. 2000. A review of antimycobacterial natural products. *Phytother. Res.* 14: 303-322.
- 73.- Nomoto S, Teshima T, Shiba T. 1978. Total synthesis of capreomycin. *Tetrahedron.* 34: 921-927.
- 74.- Nostro A, Germano MP, D'Angelo V, Marino A, Cannatelli MA. 2000. Extraction Methods and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity. *Lett. Appl. Microbiol.*, 30(5) 379-384.

- 75.- Ohashi K, Kabasawa T, Ozeki T, Okada H. 2008. One-step preparation of rifampicin/poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticle-containing mannitol microspheres using a four-fluid nozzle spray drier for inhalation therapy of tuberculosis. *J Control Release*.
- 76.- ONUSIDA. Junio 2008. Programa conjunto de las Naciones Unidas sobre el VIH/SIDA. Tuberculosis y VIH.
- 77.- Organización Mundial de la Salud. Marzo 2007. Tuberculosis, Nota descriptiva N° 104.
- 78.- Organización Mundial de la Salud. Marzo 2010. Comunicado de prensa. La tuberculosis farmacorresistente alcanza niveles desconocidos hasta ahora.
- 79.- Organización Mundial de la Salud. Noviembre 2010. 10 datos sobre la tuberculosis.
- 80.- Organización Mundial de la Salud/Organización Panamericana de la Salud. 2001. Manual de Fitoterapia. Análisis fitoquímico y metabolitos secundarios. Capítulo IV. Disponible en: [www.bvsde.paho.org](http://www.bvsde.paho.org).
- 81.- Oyedele A, Gbodale A, Sosan M, Adewoyin F, Soyelu O, Orafidiyo O. 2002. Formulation of an effective mosquito-repellent topical product from Lemongrass oil. *Phytomedicine*. 9: 259-262.
- 82.- Oxford Committee for Famine Relief (Oxfam). 2001. Cut the cost fatal side effects: medicine patents under the microscope. Oxford, GB.
- 83.- Palomino JC, Martin A, Guerra H, Swings J, Portaels F. 2002. Resazurin microtiter assay plate: Simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 46: 2720-2722.

- 84.- Parish T y Stoker NG. 1998. Mycobacteria: Bugs and bugbears in Parish T y Stoker NG (eds). Mycobacteria protocols, Methods in molecular biology. Human Press. Totowa, NJ, Chapter 1. 1-13.
- 85.- Pape H, Rehm HJ. 1985. Microbial products. In: Rehm HJ, Reed G. (eds). Biotechnology, VCH. 436-457.
- 86.- Pegel KH. 1997. The importance of sitosterol and sitosterolin in human and animal nutrition. South African J. Sc. 93: 263-267.
- 87.- Raicht RF, Cohen BI, Fazzini ED, Sarwal AN, Takahashi M. 1980. Protective effect of plant sterols against chemically induced colon tumors in rats. Cancer Res. 40: 403-405.
- 88.- Rivero-Cruz I, Acevedo L, Guerrero JA, Martínez S, Bye R, Pereda-Miranda R, Franzblau S, Timmerman BN, Mata R. 2005. Antimycobacterial agents from selected Mexican medicinal plants. J. Pharm. Pharmacol. 57:1117.
- 89.- Román J. 1990. Polímeros biodegradables de interes en cirugía (II). Comportamiento biodegradativo y aplicaciones biomedicas. Rev. Plasticos Modernos. 414.
- 90.- 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.
- 91.- Saludes J, Garson MJ, Franzblau SG, Aguinaldo AM. Antitubercular constituents from the hexane fraction of *Morinda citrifolia* Linn. (Rubiacea). Phytother Res. 2002; 16: 683-685.

- 92.- Scoot G. 1996. Complementary and alternative medicines (CAM). In the treatment of HIV/AIDS: Paper presented at the 1<sup>st</sup> Int. IOCD-Symposium, Victoria Falls, Zimbabwe. [www.afroaidsinfo.org/content/healthworkers/altmeds/camtreatment.pdf](http://www.afroaidsinfo.org/content/healthworkers/altmeds/camtreatment.pdf).
- 93.- Secretaría de Salud. Noviembre 2006. Boletín de práctica médica efectiva. Tuberculosis pulmonar. Diagnóstico y tratamiento.
- 94.- Secretaría de Salud. 2008. Programa de acción contra la tuberculosis.
- 95.- Secretaría de Salud. 2008. Vigilancia Epidemiológica Semana 13.
- 96.- Shu YZ. Recent natural products based drug development: a pharmaceutical industry perspective. J. Nat. Prod. 61:1053.
- 97.- Silva PEA, Aínsa JA 2007. Drugs and drug interactions. In: Palomino JC, Leão SC, Ritacco V, editors, Tuberculosis. From Basic Science to Patient Care. <http://www.TuberculosisTextbook.com>
- 98.- Sindambiwe JB, Calomme M, Cos P, Totté J, Pieters L, Vlietnick A, Vanden Borghe D. 1999. Screening of seven selected Rwandan medicinal plants for antimicrobial and antiviral activities. J. Ethnopharm. 65: 71-77.
- 99.- Singh SK, Prasad AK, Olsen CE, Jha A, Jain SC, Parmar US, Wengel J. 1996. Neolignans and alkaloids from *Piper argyrophyllum*. Phytochemistry. 43(6): 1355.
- 100.- Société de Pneumologie de Langue Française. 2004. Recommandations de la Société de Pneumologie de Langue Française sur la prise en charge de la tuberculose en France. Rev. Mal. Respir. 21 (3).

- 101.- Suksamrarn A, Chofipong A, Suavansri T, Boongird S, Timsuksai P, Vimuttipong S, Chuaynugul A. 2004. Antimycobacterial activity and cytotoxicity of flavonoids from the flowers of *Chromolaena odorata*. *Archiv. Pharm. Rev.* 27(5): 507-511.
- 102.- Tanachatchairatana T, Bremner JB, Ratchanaporn C, Suksamrarn A. 2008. Antimycobacterial activity of cinnamate-based esters of the triterpenes betulinic, oleanolic and ursolic Acids. *Chem. Pharm. Bull.* 56: 194-198.
- 103.- Tannin-Spitz T, Grossman S, Dourat S, Gottlieb HE, Bergman ML. 2007. Growth inhibitory activity of cucurbitacin glucosides isolated from *Citrullus colocynthis* on human breast cancer cells. *Biochem. Pharmacol.* 73 (1): 56-67.
- 104.- Ten Kate K y Laird S. 1999. The commercial use of biodiversity access to genetic resources and benefit sharing. Earthscan.
- 105.- Theagarajan K, Kumar V. 1995. Essential oils of commercial importance in India: utilization and future prospects. *Ind. Perf.* 39: 49-61.
- 106.- Tolstikova TG, Sorokina N, Tolstikov GA, Flekhter OB. 2006. Biological activity and pharmacological prospects of lupane terpenoids: I Natural lupane derivatives. *Russian J. Bioorg. Chem.* 32: 37-49.
- 107.- United Nations Development Programme (UNDP). 2001. Human development report: making new technologies work for human development, NY.
- 108.- Urech K, Scher JM, Hostanska K, Becker H. 2005. Apoptosis inducing activity of viscin a lipophilic extract from *Viscum album* L. *J. Pharm. Pharmacol.* 57: 101-109.
- 109.- Usha K, Saroja S. 2001 Antitubercular potential of selected plant materials. *J. Med. Aromat. Plant Sci.* 22: 182-184.

- 110.- Valero J, Egea MA, Alsina MA, García ML. 1985. Sistemas poliméricos de administración de fármacos. 93.
- 111.- Valls J, Lampreaue M, Nadal M, Arola L. 2000. Importancia de los compuestos fenólicos en la calidad de los vinos tintos de crianza. *Enología*. 119-124.
- 112.-Wani MC, Taylor HL, Wall ME, Coggon P, Mcphail AT. 1971. Plant antitumor agents by the isolation and structure of taxol a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *J. Am. Chem. Soc.* 93:2325-2327.
- 113.- Weber HA, Zart MK, Hodges AE, Molloy HM, O'brien BM, Moody LA, Clark AP, Roger KH, Overstreet JD, Smith CS. Chemical comparison of goldenseal (*Hydrastis canadensis* L.) root powder from three commercial suppliers. *J. Agric. Food Chem.* 2003; 51: 7352-7358.
- 114.- World Health Organization. 2006. The global plan to stop TB, 2006-2015. Action for life-towards a world free of tuberculosis. Ginebra. (who/htm/stb/2006.35).
- 115.- World Health Organization. 2006. The stop TB strategy. Building on and enhancing DOTS to meet the TB- related millennium development goals.
- 116.- Zhang W, Jiang X, Hu J, Fu C. 2000. Rifampicin polylactic acid microspheres for lung targeting. *J. Microencapsulation*. 17(6): 785-788.