

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD CONTRA
Mycobacterium smegmatis y *Mycobacterium tuberculosis*
DE EXTRACTOS DE PLANTAS DE USO MEDICINAL EN GUATEMALA

INFORME DE TESIS

Presentado por

LUIS ALBERTO FIGUEROA REYES

Para optar el título de

QUÍMICO BIÓLOGO

Guatemala, agosto del 2,000

JUNTA DIRECTIVA

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA
UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

DECANA: Licda. Hada Marieta Alvarado Beteta

SECRETARIO: Lic. Oscar Federico Nave Herrera

VOCAL I: Dr. Oscar Cobar Pinto

VOCAL II: Dr. Rubén Dariel Velasquez Miranda

VOCAL III: Lic. Rodrigo Herrera San José

VOCAL IV: Br. César Alfredo Flores López

VOCAL V: Br. Manuel Anibal Leal Gómez

DL
06
T(2044)

DEDICO ESTE ACTO

A DIOS NUESTRO SEÑOR Y VIRGEN MARIA

A MIS PADRES Luis Alberto Figueroa Alvarez
 María Emilia Reyes de Figueroa

A MIS HERMANOS David Alejandro
 Ricardo Rafael

DEDICO ESTA TESIS

A Guatemala,

A la Universidad de San Carlos de Guatemala,

A la facultad de Ciencias Químicas y Farmacia,

A mis asesores: Lics. Armando Cáceres y Eyda de Campollo,

A mis amigos y compañeros.

AGRADECIMIENTOS

Al Lic. Armando Cáceres Estrada, por su asesoría y apoyo brindado durante la elaboración de esta tesis.

Mi agradecimiento especial a la Licda. Eyda Mendía de Campollo por su asesoría, colaboración y ayuda en el desarrollo de la parte experimental de esta tesis.

Al departamento de Citohistología de la Escuela de Química Biológica por su financiamiento y colaboración prestada en el uso del equipo e instalaciones para el desarrollo de parte del trabajo experimental.

Al Laboratorio Microbiológico de Referencia (LAMIR), por su colaboración prestada en el uso de equipo.

Al Laboratorio de Productos Fitofarmacéuticos -FARMAYA- por el financiamiento y la colaboración en el desarrollo de la tesis.

Al Laboratorio Nacional de Salud por su financiamiento y colaboración prestada en el uso de equipo e instalaciones para el desarrollo de parte del trabajo experimental.

A todas las personas que, en una u otra forma colaboraron en la realización de esta tesis.

INDICE

TITULO	PAGINA
I.- Resumen	1
II.- Introducción	4
III.- Antecedentes	6
IV.- Justificación	41
V.- Objetivos	42
VI.- Hipótesis	43
VII.- Materiales y Métodos	44
VIII.- Resultados	58
IX.- Discusión de resultados	65
X.- Conclusiones	69
XI.- Recomendaciones	70
XII.- Referencias	71
XIII.- Anexos	80

I. RESUMEN

En el presente estudio se llevó a cabo la determinación de la actividad inhibitoria contra *Mycobacterium smegmatis* y *Mycobacterium tuberculosis* de extractos de plantas de uso medicinal en Guatemala.

El propósito de este estudio fue determinar si existía correlación entre la acción inhibitoria *in vitro* de extractos hexánicos, clorofórmicos, metanólicos y acuosos de las plantas: *Sida acuta*, *Enterolobium cyclocarpum*, *Piper auritum*, *Stachytarpheta cayennensis* y *Ocimum micranthum*, de una cepa de *Mycobacterium smegmatis* y una cepa multisensible, 3 de mediana resistencia y una multiresistente de *Mycobacterium tuberculosis*.

El estudio se realizó en dos etapas: en la primera se realizó el enfrentamiento de los extractos de plantas contra *Mycobacterium smegmatis* y la determinación de la concentración mínima inhibitoria de los extractos que mostraron actividad inhibitoria. Las plantas *Sida acuta* y *Enterolobium cyclocarpum* mostraron inhibición de crecimiento de *Mycobacterium smegmatis* a una concentración de 2 mg/ml.

En la segunda etapa se enfrentó a los extractos de

plantas contra 5 cepas de *Mycobacterium tuberculosis*: una multisensible, 3 de mediana resistencia y una multiresistente para determinar su actividad inhibitoria. De los extractos ensayados, 11 mostraron actividad inhibitoria a una concentración de 2 mg/ml. Posteriormente se determinó la concentración mínima inhibitoria de los extractos que mostraron actividad contra las cepas de *Mycobacterium tuberculosis*. Los resultados obtenidos mostraron que de cada una de las plantas en estudio, hubo al menos un extracto que inhibió el crecimiento por lo menos de una cepa de las 5 de *Mycobacterium tuberculosis* que fueron utilizadas en el presente estudio. La concentración mínima inhibitoria de los extractos que mostraron actividad inhibitoria fue de 2 mg/ml a excepción del extracto cloróformico de la planta *Sida acuta* que mostró inhibición de la cepa multisensible de *Mycobacterium tuberculosis* a una concentración de 1 mg/ml.

Por último, se compararon los resultados de inhibición obtenidos con los extractos contra las dos especies de micobacterias en estudio. Unicamente, dos extractos de la planta *Enterolobium cyclocarpum*, mostraron correlación en la inhibición de las dos especies de micobacterias a una concentración de 2 mg/ml por lo que se concluyó que no hubo relación significativa en cuanto a la inhibición del crecimiento micobacteriano por parte de los extractos de

plantas.

De los 24 extractos usados en el estudio, se determinó que 11 provocaron inhibición *in vitro* de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* a una concentración de 2 mg/ml, lo que sugiere que debe darsele continuidad al estudio, con el fin de encontrar tratamientos alternativos contra las cepas multiresistentes de *Mycobacterium tuberculosis*.

II. INTRODUCCION

La tuberculosis es una enfermedad de difusión mundial y se define como una infección crónica causada por *Mycobacterium tuberculosis*. Se caracteriza por la formación de granulomas en el tejido infectado y por presentar hipersensibilidad mediada por células. La infección primaria es pulmonar pero puede observarse tuberculosis extrapulmonar al comprometer otros órganos, por diseminación hematógena (1, 67).

Es una enfermedad de larga evolución y se ha demostrado que tanto características geográficas como socioeconómicas afectan el riesgo y severidad de infección, suponiendo una amenaza en áreas densamente pobladas en personas mayores de 50 años y menores de 5 años de edad y en enfermos crónicos. También está influenciada por la raza y el sexo del grupo de población (2).

En el mundo sigue siendo una de las principales causas de muerte. Se estima que hay entre 10-20 millones de casos nuevos por año con tuberculosis activa, muriendo al cabo del año unos 3 millones de personas a causa de esta enfermedad. Las tasas más altas de mortalidad se registran en Oriente, Asia, Africa y Latinoamérica, especialmente en lugares subdesarrollados, excediendo a

menudo los 300 por 100,000 habitantes (2, 3). Según criterios de la Organización Panamericana de la Salud, Guatemala se encuentra entre los países con problema grave de tuberculosis (67).

En el presente estudio se determinó la acción inhibitoria de los extractos de 5 plantas de uso tradicional en Guatemala empleadas para el tratamiento de enfermedades respiratorias contra *Mycobacterium smegmatis* y *Mycobacterium tuberculosis*. Se presenta el problema que *Mycobacterium tuberculosis* es una micobacteria de crecimiento lento y para determinar si los extractos de plantas presentan actividad se requiere mucho tiempo. Por otro lado *Mycobacterium smegmatis* es una micobacteria de crecimiento rápido de estructura y características muy similares a *Mycobacterium tuberculosis* que podría servir como un bioensayo rápido y seguro. Es por ello que uno de los objetivos de este trabajo es demostrar si existe correlación entre las dos micobacterias, esto con el propósito de hacer un tamizaje y un fraccionamiento bioguiado en forma más rápida para confirmar la actividad de extractos de plantas contra *Mycobacterium tuberculosis* (13, 68).

III. ANTECEDENTES

3.1 Infecciones Respiratorias

Las membranas finas del aparato respiratorio son muy susceptibles a la invasión por gérmenes patógenos a consecuencia del contacto de éstas con el aire, lo que provoca infecciones en el sistema respiratorio. Estas infecciones se dividen en: agudas (causadas por estreptococos y estafilococos) y crónicas (causadas por hongos y micobacterias) (3).

Las enfermedades provocadas por micobacterias se caracterizan por presentar tos productiva, disnea, pérdida de peso, fiebre, etc., por lo que el diagnóstico requiere de una historia clínica completa, análisis de laboratorio y estudios radiológicos (10).

Durante 1974 a 1976 la tuberculosis pulmonar fue la décima quinta causa de morbilidad en la república de Guatemala y la mortalidad tuvo el tercer lugar con respecto a los demás países de América. A partir de 1986 la tuberculosis se encontró entre la octava y décima causa de morbilidad y mortalidad, informándose para esa fecha un 17.65 por ciento de abandonos del tratamiento. Para 1988 fue la

quinta causa de morbilidad teniendo la ciudad capital de Guatemala una incidencia de 24 por ciento con respecto al total de la república. En el interior del país no se confirma la causa de defunción, razón por la cual la tasa de mortalidad dada hasta 1989 no es confiable. Sin embargo de acuerdo a la tasa de la enfermedad por cada 100,000 habitantes en 1995, la que mayor enfermedad presentó fue Retalhuleu con (78.07), le siguió Suchitepéquez (67.23), San Marcos (49.29), Quetzaltenango (40.25) y Escuintla (39.31) (11).

El tratamiento convencional de las infecciones respiratorias implica el uso de antibióticos que muchas veces son de difícil acceso para las comunidades rurales, quienes sufren de estas enfermedades con mayor severidad y frecuencia. En las infecciones crónicas se requiere de tratamientos prolongados, por lo que la mayoría de personas abandonan el tratamiento (12).

3.2 Género *Mycobacterium*

3.2.1 Generalidades

Las micobacterias pertenecen al orden *Actinomycetales* familia *Mycobacteriaceae* y género *Mycobacterium* (13).

Este grupo de bacterias son bacilos inmóviles, aerobios

estrictos, no poseen cápsula ni producen esporas, no produce tóxicas ni enzimas (1). Poseen de 0.2 a 0.6 micras de espesor y de 2 a 5 micras de longitud. Por lo general, su crecimiento es sumamente lento, la mayoría de las especies patógenas crecen después de 2 a 6 semanas de incubación a 37 °C, en el medio de Lowenstein-Jensen (14, 16).

Los bacilos tuberculosos suelen denominarse acidorresistentes porque absorben un colorante del fenol-fucsina cuando se calientan y una vez teñidos resisten la decoloración con ácidos fuertes y alcohol. Otros colorantes con los que se tiñe este microorganismo son los fluorocrómicos como Auramina O y otros derivados del arilmetano (17). Los bacilos crecen mejor en presencia de oxígeno y pueden sobrevivir la desecación por largo tiempo, pero pueden morir rápidamente expuestos a la acción directa del sol o de los rayos ultravioleta y su crecimiento puede ser inhibido por un pH inferior a 6.5 (15).

Los tipos principales de bacilos tuberculosos patógenos para el hombre son *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium bovis*, también existe otro grupo de micobacterias que poseen algunas características de los bacilos tuberculosos y pueden producir un cuadro clínico similar al de la tuberculosis. Los llamados bacilos

acidorresistentes atípicos y se conocen desde que Koch descubrió el bacilo tuberculoso (15).

3.2.2 Estructura de las micobacterias

Bajo el microscopio de luz blanca las micobacterias varían considerablemente en su morfología, desde células pequeñas casi cocoides, hasta largos filamentos de células que en algunas especies bajo ciertas condiciones del medio de cultivo, pueden presentar una formación parecida a la de un pseudomicelio. La microscopía electrónica muestra que las células micobacterianas poseen una pared celular muy delgada, separada de la membrana celular por una amplia zona translúcida de electrones denominada espacio periplásmico. Esta pared celular en si es una estructura compleja compuesta por 4 capas, la más interna se compone de mureína o peptidoglicanos que como en otros géneros bacterianos da a la célula su estructura y rigidez. Por encima de esta capa hay tres más totalmente diferentes, compuestas de complejos de péptidos, polisacáridos y lípidos que semejan filamentos arreglados en una matriz más homogénea. Esta estructura ha sido demostrada por medio de una técnica conocida como criofractura. Las estructuras de las tres capas difieren químicamente; las de la capa más externa son por lo general peptidoglicolípidos

denominados micósidos. En esencia, la estructura fina del citoplasma de las micobacterias no difiere de las demás bacterias. Su ADN se observa como un cuerpo nuclear indefinido que no está envuelto por una membrana, en su citoplasma se pueden observar ribosomas, cuerpos lipoides y gránulos compuestos de polifosfatos (18).

3.2.3 Micobacterias de desarrollo rápido

Dentro de éstas micobacterias tenemos a: *Mycobacterium chelonai*, *Mycobacterium fortuitum* (pueden llegar a causar enfermedad en los seres humanos y animales), *Mycobacterium phlei*, *Mycobacterium vaccae*, *Mycobacterium diernhoferi*, *Mycobacterium rhodesiae*, *Mycobacterium flavescens*, *Mycobacterium gilvium*, *Mycobacterium duvalli*, *Mycobacterium thermoresistibile*, *Mycobacterium nonchromogenicum* y *Mycobacterium smegmatis* (crecen en menos de 7 días)(18).

La mayoría de estas micobacterias son saprófitas, sin embargo hay excepciones; por ejemplo una cepa de *Mycobacterium smegmatis* fue aislada de ganglios linfáticos hiliares caseosos de un paciente que murió de neumonía respiratoria asociada con el cardíaco. Dentro de las

excepciones están tres grupos: especies termófilas (*Mycobacterium smegmatis* y *Mycobacterium phlei*), especies con actividad sacarolítica moderada (*Mycobacterium duvalii*, *Mycobacterium flevescens* y *Mycobacterium gilvum*) y un gran grupo de cepas con notable actividad sacarolítica cuya clasificación es incompleta (18).

3.2.4 *Mycobacterium smegmatis*

Mycobacterium smegmatis no se encuentra comúnmente, sólo en raras ocasiones. En 1897 fue descrita por primera vez como micobacteria de crecimiento rápido, esta micobacteria en particular junto a *Mycobacterium phlei* se han utilizado bastante en los estudios genéticos y bioquímicos por su desarrollo rápido en medios de cultivo muy sencillos sin ser un riesgo importante en el laboratorio. En realidad todos los estudios sobre la estructura y función del genoma micobacteriano y todos los intentos en la transferencia de material genético han empleado cepas de *Mycobacterium smegmatis* como modelo de investigación científica con enfoque micobacteriano (18, 68). Por lo general *Mycobacterium smegmatis* no es cromógena y su gama de variación o espectro de mutación es muy bajo, aún cuando es tratada con mutágenos no presenta más del 5 por ciento de

variación en relación con la cepa progenitora (18). Crece fácilmente en medios de cultivo específicos para micobacterias como lo son el Middlebrook 7H9 y Middlebrook 7H10 y también en Agar Sangre de Carnero, Chocolate y Müeller-Hinton, en un rango de temperatura de 30 °C a 37 °C (69).

3.2.5 *Mycobacterium tuberculosis*

También llamado bacilo de Koch, en honor a Robert Koch quien lo descubrió en 1882. Su temperatura óptima de crecimiento es de 37 °C, es una micobacteria aerobica, microaerofílica, no secreta una verdadera exotoxina pero sí libera endotoxinas en los medios de cultivo por autólisis. Para su aislamiento se requiere de medios a base de huevo (19).

Mycobacterium tuberculosis es alcohol-acido-resistente, este posee lípidos en la pared celular que constituyen el 60 por ciento de su peso en seco y se encuentran unidos a proteínas y polisacáridos confiriéndole impermeabilidad a las tinciones, hay un aumento en la hidrofobibidad de la superficie de la pared celular lo que impide la entrada de colorantes acuosos junto con la formación de un complejo colorante residual de ácido micólico que previene la salida de carbol-fucsina (20-22).

3.2.6 Medios de cultivo para micobacterias

Los medios sólidos pertenecen a dos grupos principales: los medios a base de huevo y los medios definidos o semidefinidos que contienen agar como medio solidificante. De hecho el medio más usado es el de Lowenstein-Jensen que contiene huevo. Este sirve como agente solidificante y la albúmina que contiene, ayuda a absorber los ácidos grasos tóxicos presentes en la muestra. La clara de huevo contribuye suministrando varios precursores de lípidos. Además del huevo, este medio contiene Asparagina o ácido glutámico como fuente de nitrógeno, glicerol como fuente de carbono, magnesio, fosfatos e iones citrato y el colorante de verde de malaquita como agente antiséptico. Otros medios a base de huevo incluyen, el Ogawa, el Stonebrink y el Dorset siendo este último un medio simple, adecuado para la propagación de cepas de laboratorio. También se han desarrollado medios basados en agar claro los cuales son muy utilizados por los investigadores, estos incluyen el agar oleico de Dubos, los agares Middlebrook 7H10, Middlebrook 7H11 y el medio de Pfeizer (18).

3.3 Tuberculosis

Es una enfermedad bacteriana crónica causada por *Mycobacterium tuberculosis* y caracterizada por la formación

de granulomas en el tejido infectado y por hipersensibilidad mediada por células. La infección primaria es pulmonar, pero puede haber tuberculosis extrapulmonar al comprometer otros órganos (1).

Por lo general, la vía de entrada es aerobia, llegando a los pulmones y muy raras veces por ingestión. En muy raras ocasiones, ocurre la implantación directa en la piel o en las mucosas (18).

Esta es una enfermedad que con ayuda de medicamentos e información ha sido controlada en muchos de los países desarrollados, sin embargo en países subdesarrollados como el nuestro a la fecha no ha sido controlada. En los últimos años, en Guatemala se ha incrementado el número de pacientes tuberculosos y/o con problemas respiratorios de distinta etiología, debido al advenimiento del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) (16).

3.3.1 Epidemiología y patología

Aunque la tuberculosis es en la actualidad una enfermedad tratable y hasta cierto punto susceptible de prevención, sigue siendo una infección bacteriana de considerable importancia. La verdadera incidencia en Guatemala no puede determinarse con exactitud debido a que

sólo algunas personas infectadas con *Mycobacterium tuberculosis* manifiestan enfermedad clínica activa en un momento dado y a que no se llegan a declarar todos los casos (11).

El origen de la infección tuberculosa en los niños suele ser un adulto, a veces un adolescente. Cuando una persona con tuberculosis pulmonar contagiosa tose o estornuda, dispersa en el aire gotitas de saliva (Pflüger), algunas de las cuales contienen bacilos tuberculosos. Cuando esta gotita que contiene gérmenes es inhalada hacia los pulmones, y llega al alveolo, es cuando se produce la infección. El número de bacilos tuberculosos eliminados en la atmósfera por un enfermo, depende de la gravedad de la enfermedad y así será el número de bacilos en el esputo, el volumen y carácter de éste, el tipo y frecuencia de la tos. Como la transmisión con gotitas de saliva explica la mayor parte de infecciones iniciales, casi todos los complejos primarios tienen lugar en los pulmones. En ocasiones, los bacilos ingeridos crean un foco primario en el intestino más rara vez, en una amígdala o en las mucosas de la boca. Otras lesiones primarias extrapulmonares, como las de la piel o la conjuntiva dependen de contacto local con bacilos tuberculosos. El hacinamiento y malas condiciones de vida hacen que la propagación de la enfermedad sea más

rápida, causando elevados índices de mortalidad en países de escasos recursos donde las personas carecen de una adecuada educación antituberculosa (15).

Casi inmediatamente después de la inhalación de bacilos tuberculosos viables, en los pulmones los histiocitos empiezan a transportar los microorganismos a los nódulos linfáticos regionales, formándose de éste modo el denominado complejo primario (26).

Los eventos subsecuentes al desarrollo de la lesión primaria depende de si el contacto ha sido previamente sensibilizado. En general en la patogenia de la tuberculosis se debe considerar la virulencia de la micobacteria, el papel de la hipersensibilidad inducida, el papel de la inmunidad o resistencia y la génesis del patrón granulomatoso de reacción tan característica de la tuberculosis (27).

En individuos con la enfermedad es común la presencia de síntomas vagos e inespecíficos. Los pacientes refieren malestar, dolor de cabeza, tos seca ocasional o persistente y elevación de la temperatura. También pérdida de peso, sudor nocturno y hemoptisis, aunque a veces pueden no ocurrir (27).

La declinación de la morbilidad y mortalidad causada por la tuberculosis está relacionada con el incremento en el

estándar en el nivel de vida, una mejor nutrición, menos individuos viviendo en hacinamiento, una mejor ventilación domiciliar, así como una terapia potente y apropiada (4, 23).

Existen otros factores determinantes de mortalidad en la tuberculosis, como alcoholismo, efectos socioeconómicos relacionados al alcoholismo y en particular hepatopatía alcohólica; posiblemente por limitar el tipo y dosis de drogas, para la terapia antituberculosa, así también a la inhibición de la actividad funcional y reducción en el número de linfocitos T (24, 25).

3.3.2 Inmunidad

La tuberculosis ha sido un problema infeccioso que permanece latente en la actualidad, una razón es que a pesar de décadas de investigación de los mecanismos inmunitarios relacionados con la tuberculosis no se ha encontrado una vacuna efectiva. El bacilo de Calmette-Guérin (BCG), cepa atenuada de *Mycobacterium bovis*, se ha utilizado durante más de 60 años y es capaz de conferir hipersensibilidad cutánea retardada pero no una inmunidad celular evidente. El anticuerpo sérico no tiene ninguna función en la inmunidad contra enfermedad por micobacteria. Los linfocitos T sensibilizados y los macrófagos activados, son los factores

críticos en la inmunidad. Se han analizado en detalle los componentes de la pared bacteriana de *Mycobacterium tuberculosis* que pueden conferir inmunidad. Las proteínas y polisacáridos tienen potencial inmunogénico y hay datos que apoyan una función importante de los componentes polisacáridos con epítomos clave para la inmunidad celular. Para medir la hipersensibilidad retardada contra *Mycobacterium tuberculosis*, se utiliza un derivado protéico purificado (P.P.D.) como antígeno intradérmico. Una prueba positiva de hipersensibilidad cutánea tardía demuestra exposición previa a la bacteria y a menudo se correlaciona con la inmunidad. Existe una correlación directa entre la prueba cutánea y la inmunidad, aunque la prueba no se utiliza en el diagnóstico clínico de alergias mediadas por células (28).

3.3.3 Diagnóstico de la enfermedad

La tuberculosis se diagnostica ya sea como resultado de las campañas para encontrar casos o mediante el examen del paciente que se presenta con signos y síntomas de la enfermedad (18).

La única forma definitiva para diagnosticar la tuberculosis depende de la demostración del bacilo en el

cultivo, que suele ser entre la cuarta y octava semana aproximadamente, más dos semanas para su identificación, lo que impide una rápida identificación positiva necesaria en pacientes inmunocomprometidos y en pacientes con SIDA (29). La historia clínica puede revelar factores que conduzcan a la sospecha de tuberculosis, estos incluyen contacto con un caso conocido, la exposición ocupacional (personal de un hospital), tratamiento con esteroides a largo plazo, diabetes, alcoholismo, SIDA o a cualquier proceso natural que conduzca a la supresión de la respuesta inmune. Los estudios radiológicos sugieren con frecuencia presencia de enfermedad y su extensión en el tórax (18). Sin embargo en la práctica clínica, la presencia de bacilos alcohol-ácido-resistentes al examen microscópico directo de la expectoración, a través de la baciloscopia confirma el diagnóstico de tuberculosis pulmonar.

Durante los últimos años la ciencia ha mejorado y se han creado nuevos métodos rápidos como lo son: métodos de cultivo radiométrico (BACTEC), métodos químicos (detección de antígenos y/o anticuerpos) y recombinación del ADN (5,29,31).

3.3.4 Pruebas de sensibilidad

De los métodos que se utilizan para establecer la

sensibilidad o la resistencia de una cepa de *Mycobacterium tuberculosis* a las distintas drogas antituberculosas, el más difundido y el que más se conoce en América es el método de las proporciones, que consiste en determinar la proporción de mutantes resistentes a cada droga que tenga la cepa (32).

Se han descrito dos principales técnicas para las pruebas de sensibilidad: el método de proporción y el de relación de resistencia. En el primero se determina la proporción exacta del cultivo que se resiste a los agentes antibacterianos al efectuar cuentas viables en los medios que contienen medicamentos y otros que carecen de ellos. Se realizan varias diluciones del inóculo que se añaden al medio con una concentración estándar de la droga. Entonces se cuenta el número de colonias que crecen en el control con diluciones adecuadas del inóculo y también en el medio conteniendo droga (18, 33).

En el método de relación de resistencia se compara la sensibilidad de las cepas en estudio con las de cepas sensibles estándar. Los inóculos estandarizados de la prueba y los microorganismos control se siembran en un medio sólido que contiene diluciones de medicamentos en concentración crítica. Después de la incubación, la cantidad de desarrollo

se registra y se compara con el desarrollo de los microorganismos estándar. Las concentraciones de medicamentos que causan cantidades similares de inhibición de desarrollo entre los microorganismos de la prueba y los estándar se expresan como una relación. Así si ambos son igualmente sensibles, la relación de resistencia será de 1. En general las cepas con relaciones que son iguales o menores que 1 son consideradas sensibles, en tanto que aquellas con relaciones mayores que 1 se consideran resistentes (18, 32).

3.3.5 Tratamiento

El objetivo principal del tratamiento antituberculoso es el de erradicar por completo el agente infeccioso, determinando así la curación del paciente y segundo es el de eliminar el estado de portador del paciente para reducir la transmisión de la enfermedad (18).

Las drogas utilizadas en la quimioterapia de la tuberculosis, constituyen un grupo heterogéneo que comprende quimioterapéuticos propiamente dichos de origen sintético y antibióticos de origen natural o semisintético cuya estructura química es diferente, la terapia antituberculosa no depende de una estructura común.

La quimioterapia eficaz de la tuberculosis humana comenzó con el descubrimiento de la estreptomina por Hinshaw y Feldman en 1945. Para tratar la tuberculosis actualmente se usan cuatro drogas antituberculosas de primera línea (isoniazida, estreptomina, rifampicina y etambutol) y un cierto número de agentes de segunda línea (pirazinamida, cicloserina, etionida, etc.) en diversas combinaciones.

Hay factores que conllevan al desarrollo de la resistencia, los bacilos farmacorresistentes aparecen a consecuencia de un error humano en relación con: la prescripción de la quimioterapia, la gestión del suministro de medicamentos, el tratamiento del caso, el procedimiento de entrega de la medicación a los pacientes (33, 51).

Es necesario encontrar una nueva terapéutica para esta enfermedad, por lo que se está recurriendo a la medicina natural como tratamiento alternativo, durante mucho tiempo la medicina natural fue el único recurso de que disponía el médico. A principios de siglo con el desarrollo de la química y el descubrimiento de procesos de síntesis orgánica, por parte de la industria farmacéutica se puso en marcha una nueva producción de medicamentos (52). Durante los siglos XII a XIII se prescribieron numerosas drogas vegetales de las cuales muchas se utilizan actualmente. En el siglo XIX se

practicaron los primeros análisis químicos de algunos de los principios de los vegetales, con la aplicación del microscopio y la química analítica, también se desarrolló un movimiento investigador a escala mundial, para conocer la composición química de los vegetales y se inició la base de la industria farmacéutica actual (53, 54).

Muchos de los principios activos de estas plantas son químicamente definidos, por ejemplo los alcaloides, mientras que otros son de composición química desconocida. A veces son mezclas de sustancias pero que forman grupos verdaderos, especialmente a causa de sus características físicas. De ahí que los principales constituyentes vegetales sean carbohidratos, incluyendo las gomas, glúcidos como saponinas y taninos; grasas; aceites volátiles y esenciales, resinas; alcaloides y otros metabolitos secundarios (55).

Entre los principales estudios relacionados con la actividad antimicrobiana de las plantas se encuentra el de Nickel realizado en 1959, quien investigó las plantas vasculares en la India y encontró que 157 familias contenían sustancias activas que ejercían acción inhibitoria en el crecimiento bacteriano (56).

Mitcher y colaboradores realizaron un estudio utilizando

extractos etanólicos de 1248 plantas superiores en siete microorganismos representantes de bacterias Gram positivo, Gram negativo y ácido resistentes, así como levaduras, encontrando que dos por ciento de las plantas tuvieron efecto contra alguno de los microorganismos (57).

Los estudios etnobotánicos y de revisión de literatura realizados en Guatemala han demostrado que la población utiliza cuando menos 231 plantas para tratar afecciones respiratorias (58). El tamizaje antibacteriano de 68 de ellas indica que el 41 por ciento tienen actividad contra bacterias Gram positivo causales de infección respiratoria tales como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* y *Streptococcus pyogenes* (59).

En 1994, se publicó un informe que integra dos estudios realizados en la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, uno realizado como parte del trabajo de tesis de una estudiante de la Facultad y el otro cofinanciado por el IIQB, en los que por medio de una técnica de dilución del agar Middlebrook 7H10 se realizó un tamizaje *in vitro* de la actividad contra tres cepas de *Mycobacterium tuberculosis* (248, 251, 280) de 11 extractos etanólicos de plantas popularmente utilizadas en Guatemala para el tratamiento de la tuberculosis. Cuatro extractos mostraron actividad

significativa contra alguna cepa: *Achillea millefolium* inhibió las tres cepas, *Sida acuta* inhibió dos y *Eucalyptus globulus* y *Sida rhombifolia* inhibieron solo una de las cepas.

3.3.6 Seguridad en el laboratorio

El manejo de muestras y cultivos expone al laboratorista a un peligro importante de contaminación. Por lo tanto, las medidas de bioseguridad esenciales y en algunos países son exigidas por la ley (6, 18).

Hay que tener en cuenta que la mayoría de los casos de infección tuberculosa se deben a la aspiración de partículas de aerosol conteniendo organismos viables. Estos aerosoles se producen por la manipulación de material patológico o cultivos: abrir tubos, preparar frotis o transfiriendo los cultivos usando pipetas o asas, durante la centrifugación o agitando los tubos y cuando los cultivos se rompen por accidente (71).

Para evitar cualquier entrada del bacilo al laboratorista se cuentan con medidas de bioseguridad en la bacteriología de la tuberculosis que son un conjunto de prácticas de sentido común que un personal consciente y bien

adiestrado debe cumplir estrictamente. Según la clasificación de organismos infecciosos de la Organización Mundial de la Salud al trabajar con *Mycobacterium tuberculosis* deben tomarse en cuenta los procedimientos de laboratorio de riesgo tipo III que son: Organización física del área de trabajo, uso de cabinas de seguridad biológica (CSB), seguridad de equipos, procedimientos y del personal.

3.3.6.1. Organización física del área de trabajo

Una habitación separada o "Laboratorio de Contención" es el indicado para la manipulación de todo el material que se sepa con seguridad o se sospeche pueda ser de carácter tuberculoso. Deberá estar a presión negativa en relación con el corredor o habitaciones adyacentes. Tendrá no menos de 6 preferiblemente 12 renovaciones de aire cada hora. Estará equipado con al menos una cabina de seguridad microbiológica y tener lavadores con grifos que se puedan manipular con el codo o con el pie.

3.3.6.2. Cabinas de Seguridad Biológica (CSB)

Hay dos tipos de CSB apropiadas para trabajar con los bacilos de la tuberculosis en los "Laboratorios de Contención": de Clase I; de protección exhaustiva, de Clase

II; de flujo laminar. Se podrá trabajar con cualquiera de las dos.

El principio de las CSB es transportar los aerosoles dispersos en el aire dentro de la cabina, hacia filtros de aire e impedir el ingreso de partículas extrañas a la misma. Poseen filtros de alta eficiencia que están diseñados para retener el 99 por ciento de todas las partículas de 0.3 micras o mayor tamaño.

Las CSB protegerán al usuario de aerosoles pero nunca contra sustancias químicas o material biológico que sea vertido dentro de las mismas, jamás se deberá guardar equipo innecesario dentro de éstas. Si se usan lámparas de luz ultravioleta (UV) éstas tendrán que ser controladas con un medidor de radiación UV de 253 nanómetros y registrar sus horas de funcionamiento, se cambiarán cuando la radiación disminuya un 30 por ciento de la inicial. Estas lámparas tendrán que permanecer encendidas por un lapso de 2 horas después de concluidas las tareas diarias, teniendo en cuenta que sólo se esterilizará el aire y superficies aledañas a la lámpara. Las entradas y salidas de aire deberán controlarse con un anemómetro para ajustar los indicadores de corriente de aire, cuando ésta esté por debajo de los límites acordados para el tipo de cabina, será necesario cambiar los filtros de aire después de ser descontaminados (71, 72).

3.3.6.3 Seguridad de equipos, procedimientos y personal

En todo momento se evitará la formación de aerosoles en el ambiente. Todo el equipo y área de trabajo deberá de ser desinfectado con fenol al 5 por ciento y el personal deberá lavarse las manos y uñas con desinfectante y jabón. Se usarán guantes y mascarillas desechables, se manipularán llaves de paso, de gas, etc., con papel desechable, nunca se sacará del laboratorio la ropa de protección la cual se dejará en cuarto especial con rayos ultravioleta. Se esterilizarán las batas antes de lavarlas y todo el material contaminado. No se quitará el polvo ni se barrerá el piso en seco; se limpiará con un trapo humedecido con parafina.

En cuanto al personal se evaluará el buen estado físico, examen radiológico cada seis meses, reacción positiva a la tuberculina con PPD (derivado protéico purificado), si la reacción es negativa se vacunará al personal con BCG y se evaluará nuevamente a los dos meses, si ésta es negativa de nuevo, no se podrá trabajar en el laboratorio de riesgo tipo III. Se impedirá la entrada de personas extrañas al laboratorio, se brindará educación sanitaria y formación técnica adecuada para que sea posible la correcta ejecución del trabajo del laboratorio (71, 72).

3.4 Tuberculosis y SIDA

El SIDA es causado por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), caracterizado por una deficiencia inmunitaria grave que determina infecciones oportunistas, malignidades y lesiones neurológicas en individuos sin antecedentes previos de anormalidad inmunológica.

El VIH infecta principalmente el subgrupo principal de células T, definido fenotípicamente como linfocitos T CD4 y funcionalmente como células inductoras/colaboradoras, las cuales quedan entonces agotadas dando una desproporción de las células CD4 en comparación con las CD8 supresora. Sin embargo, el virus es capaz de infectar algunas células no linfoideas, como los macrófagos y las células del tejido nervioso y probablemente permanece presente durante toda la vida. A continuación de la infección por VIH puede producirse una amplia variedad de efectos cualitativos y anormalidades funcionales de las células T, las células B, Natural Killer y los monocitos/macrófagos; es decir están afectados todos los componentes del sistema inmunitario (34, 35).

Mycobacterium tuberculosis, se comporta como un oportunista en los pacientes inmunocomprometidos, el proceso de infección está sujeto a disturbios en el

equilibrio entre *Mycobacterium tuberculosis* y los mecanismos de inmunidad del paciente infectado. La tuberculosis es un ejemplo de enfermedad en la cual la resistencia es mediada por inmunidad celular, por lo que se presenta en pacientes con SIDA. Los individuos homosexuales, los que utilizan drogas por vía intravenosa, las trabajadoras del sexo son grupos de alto riesgo para infectarse con el VIH y desarrollar posteriormente SIDA o si ya tienen la enfermedad tienen un riesgo significativo de desarrollar tuberculosis (31, 42-45, 50).

En países industrializados la tuberculosis ha tenido un resurgimiento bastante acelerado gracias al alto porcentaje de personas infectadas con VIH. En 1993 se hizo un estudio multiestatal en Estados Unidos con personas con tuberculosis y SIDA, los resultados demostraron que de las 8,031 personas con tuberculosis, 1,138 tenían también SIDA, por lo que VIH/SIDA ha alterado la epidemiología de la tuberculosis (39, 40, 48).

En un estudio retrospectivo, longitudinal, multicéntrico de pacientes italianos con SIDA, se contó con la participación de 23 hospitales de toda Italia, se investigaron 1,691 pacientes con SIDA diagnosticados en el periodo de 1988 a 1989. En 1990 se habían obtenido cultivos positivos de *Mycobacterium tuberculosis* de 190 pacientes,

todos estos pacientes con recuentos de CD4 menores de 500/mm, se llegó a la conclusión que en Italia la proporción de pacientes con SIDA que desarrollan tuberculosis es más alta que en otros países industrializados y que una de las principales causas es el nivel tan bajo de linfocitos y la inmunosupresión marcada de estos pacientes (47).

La relación entre el VIH/SIDA y tuberculosis en la ciudad de Nueva York, ha tenido un fuerte impacto ya que la tuberculosis en esta ciudad se redujo durante la mayor parte del presente siglo, esta disminución se observó incluso en los distritos más pobres, sobre todo en la parte central de Harlem. En el año de 1979 las tasas de tuberculosis comenzaron a subir a la vez que aumentaban las de virus de inmunodeficiencia humana (VIH). A mediados de los ochenta se incrementaron los casos de tuberculosis, pero no se le dio importancia al problema hasta que en 1991 se notificaron los primeros brotes nosocomiales de tuberculosis multirresistente en personas infectadas por VIH en Miami, Florida y la ciudad de Nueva York (46).

El hospital de St. Mary en Londres realizó un estudio para determinar si realmente la epidemia del VIH desempeña un papel central en el incremento de la tuberculosis, en poblaciones VIH seropositivas y seronegativas infectadas con

micobacterias, el principal patógeno aislado fue *Mycobacterium tuberculosis* y la población más afectada fue la VIH seropositiva (49).

La tuberculosis en pacientes con SIDA tiene diferentes manifestaciones, se pueden encontrar infiltrados en algunas zonas del pulmón y parecen no ser comunes las cavitaciones. Es frecuente encontrar en estos pacientes linfadenopatía de mediastino e hilar y tuberculosis extratorácica, muchos de los pacientes por toda una serie de complicaciones asociadas al SIDA mueren antes iniciar una terapia antituberculosa efectiva, o mueren antes de terminarla (29).

El diagnóstico de la tuberculosis en pacientes con SIDA es sumamente dificultoso, ya que en éstos pacientes la presentación de la enfermedad puede ser inespecífica y atípica y un examen al microscopio y cultivo de esputo presenta menor positividad, lo mejor será recurrir a las pruebas rápidas ya mencionadas para diagnosticar la enfermedad (5, 36, 41).

En 1993 se realizó un estudio donde el objetivo principal del mismo era determinar la eficacia y toxicidad del tratamiento estándar antituberculoso en pacientes con

infección por VIH. En forma prospectiva se evaluaron 89 pacientes con tuberculosis e infección con VIH, los pacientes recibieron isoniazida, rifampicina y pirazinamida con o sin etambutol, por 2 meses, seguido de isoniazida y rifampicina por 7 meses. Algunos pacientes recibieron otros tratamientos por crear resistencia o por intolerancia. El 45 por ciento de los pacientes murió durante el seguimiento de la terapia, después del tercer mes de tratamiento los pacientes mostraron mejorías y mostraron cultivos de esputo negativos, con lo que se demuestra que los tratamientos clásicos son efectivos en la mayoría de pacientes con SIDA, pero no en todos los pacientes (5).

En Japón se ha encontrado que en los últimos años las cepas de *Mycobacterium tuberculosis* han adquirido resistencia principalmente a la rifampicina y la isoniacina (37).

La resistencia de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* a las drogas antituberculosas es un problema creciente en todo el mundo y no sólo en los países industrializados. En Alemania se investigó, pacientes hospitalizados a través del método de las proporciones, el grado de resistencia a los medicamentos, y se concluyó que hubo incremento de resistencia a una y varias drogas,

encontrándose cepas multirresistentes, proponiéndose un regimen de cuatro drogas como terapia inicial. En base a lo anterior, todos los países industrializados han incrementado el estudio de resistencia como preocupación al incremento de resistencia de las drogas, no tanto de una manera individual, sino combinada (7, 38).

3.5 Plantas en estudio

Las plantas: *Sida acuta*, *Piper auritum*, *Ocimum micranthum* y *Stachytarpheta cayennensis* serán estudiadas por su uso tradicional para el tratamiento de enfermedades respiratorias en Guatemala (61, 62); y *Enterolobium cyclocarpum* se estudiará por su uso popular en Guatemala para el tratamiento específico de tuberculosis, esta planta es utilizada para tratar esta enfermedad y en la literatura hay información que confirma su uso (61, 63).

3.5.1 *Sida acuta* (Burm) (Malvaceae)

3.5.1.1 Nombre común: Escobillo

3.5.1.2 Descripción:

Es una hierba de 1 metro de largo, raramente alcanza 1.5 m de alto. Usualmente es erecta, el tallo es pequeño, las hojas son de forma lanceolada-oblonga a oval o escasamente lanceolada, de peciolo corto, las flores crecen en forma

solitaria, el cáliz es angulado de 6-8 cm de longitud (64, 65).

3.5.1.3 Origen y distribución

Está extendida en el trópico del Viejo Mundo. Fue introducida y naturalizada en Bermudas, crece en matorrales en lugares áridos o húmedo. A menudo es cultivada. Es más abundante a bajas altitudes. En Guatemala se encuentra principalmente en Alta Verapaz, Petén, Izabal, Zacapa, El Progreso, Baja Verapaz, Chiquimula, Jalapa, Jutiapa, Santa Rosa, Escuintla, Guatemala, Suchitepéquez, Retalhuleu, Huehuetenango y San Marcos (65, 63).

3.5.1.4 Usos medicinales

En Guatemala, la decocción de la planta es usada para la tos. En Yucatán, el tallo, hojas y flores son hervidos juntos en agua azucarada y la decocción es tomada para aliviar los resfríos, catarros crónicos, leucorrea y hemorragia nasal (65, 63).

Las hojas en forma de cataplasma son aplicadas en erisipela y furúnculos. Una infusión de la planta macerada es tomada en Brasil como tónica, febrífuga y como remedio para hemorroides, tos, bronquitis y otras complicaciones pulmonares. La decocción de las hojas es usada en la conjuntivitis (64, 65).

3.5.1.5 Composición química

Las hojas y tallos contienen saponinas. Las raíces asparagina y efedrina. Las hojas, raíces y semillas contienen un alcaloide aún desconocido (64, 63).

3.5.2 *Piper auritum* (HBK) (Piperaceae)

3.5.2.1 Nombre común: Hoja de jute, cordoncillo, hoja de Santa María.

3.5.2.2 Descripción

Es un arbusto herbáceo de 2.5 a 5 m de alto, con tallo grueso. Hojas alternas, elípticas, ovadas a aovadas, de 15 a 50 cm de largo y 8 a 31 cm de ancho, muy desiguales y profundamente corazonadas en la base. Flores en espigas delgadas, 10 a 25 cm de largo y 3 a 5 mm de ancho (61, 62).

3.5.2.3 Origen y distribución

Nativa el sureste de México hasta Colombia, cultivada y naturalizada en Cuba y el sureste de la Florida.

3.5.2.4 Usos Medicinales

En Guatemala se utiliza para la presión alta, dolor

de ovario, dolor de cabeza, dolores en general, como sudorífero, diurético, expectorante, vasodilatador, antiinflamatorio bronquial, fiebre, erisipela, angina, y como anestésico local (61, 62).

3.5.2.5 Composición química

La planta entera contiene aporfina, cefaradiona A y B, la hoja contiene compuestos fenólicos, aurantiamida I y II, el fruto contiene alcaloides, denominados piperina, piperetina y silvatina, ácido esteárico, linoléico, triacontano, colesterol, colestanol y β -sitosterol (61, 62).

3.5.3 *Ocimum micranthum* (Willd.) (Labiatae)

3.5.3.1 Nombre común: Albahaca silvestre, albahaca de monte, basin.

3.5.3.2 Descripción

Hierba anual erguida, fuertemente aromática, generalmente de 50 cm. de alto, Hojas opuestas delgadas, de péciolo corto, ampliamente aovadas u oblongo-aovadas, puntiagudas, redondeadas o puntiagudas en la base, irregularmente dentadas. Flores blancas con color lavanda. Semillas negras, lisas, cubiertas con mucílago (63).

3.5.3.3 Origen y distribución

Nativa de Honduras, crece desde México hasta el Perú y Brasil, principalmente en áreas cálidas.

3.5.3.4 Usos medicinales

Las ramas se utilizan para dolor de cabeza, como diurético, para regular la menstruación y para el tratamiento de resfriados. La hoja se utiliza contra la fiebre, bronquitis, pneumonia, hipertensión, tratamiento de resfriados y diarrea, para el dolor de ojo, dolor de oído y como digestivo. La planta entera se usa contra calambres y dolor de estómago. (63)

3.5.3.5 Composición química

La hoja contiene aceite esencial, taninos y saponinas, el aceite esencial contiene metil-cinamato, timol, eugenol y citral (63).

3.5.4 *Enterolobium cyclocarpum* (Griseb.) (Leguminosae)

3.5.4.1 Nombre común: Conacaste, Guanacaste

3.5.4.2 Descripción

Es uno de los árboles más grandes de América Central, pues llega a medir hasta 30 m de altura y unos 2 m de

diametro. Sus hojas son de color verde pálido de cáliz tubuloso, frutos lobulados grandes de color castaño, mesocarpo subcabernoso, semillas grandes en dos hileras (61, 62).

3.5.4.3 Origen y distribución

Crece desde el sur de Estados Unidos, México, en toda la América Central y en Sur América (61, 62).

3.5.4.4 Usos medicinales

La goma que exuda el tronco se usa contra la bronquitis, el jarabe preparado de la corteza se emplea contra los resfríos, contra la tuberculosis, sirve para cicatrizar granos, la decocción de la corteza, en gargarismos es descongestionante de las mucosas, expectorante, analgésica y para el alivio de la hemorroides con la decocción del fruto en baños de asiento (61, 62, 63).

3.5.4.5 Composición química

Las hojas y raíz contienen: flavonoides, glicósidos saponínicos, sesquiterpenlactonas, taninos, triterpenos. El tallo contiene: flavonoides, glicósidos saponínicos, sesquiterpenlactonas y taninos. La semilla y el fruto contiene: glucósidos, sesquiterpenlactonas y taninos (62).

3.5.5 *Stachytarpheta cayennensis* (Vahl) (Verbenaceae)

3.5.5.1 Nombre común: Gervao, verbena

3.5.5.2 Usos medicinales

Se utiliza mucho para el tratamiento de úlcera y como antiácido, desordenes intestinales, también tiene propiedades hepatoprotectoras y laxantes, fiebre, tos, catarro y resfrío (66).

3.5.5.3 Composición química

Es rica en iridoides, alcaloides y triterpenos, grasas, resinas, ácido tánico, ácido salicílico, citral y geraniol, flavonoides y aminas (66).

IV. JUSTIFICACION

El aumento de la pandemia de tuberculosis y el apareamiento de cepas multirresistentes de *Mycobacterium tuberculosis* es un problema creciente en todo el mundo, es por ello que es necesario buscar nuevas alternativas medicinales para el tratamiento de la enfermedad o cuando menos, descubrir las bases que permitan desarrollar una droga antimicobacteriana.

En Guatemala, existen plantas que son utilizadas empíricamente para el tratamiento de enfermedades respiratorias, como la tuberculosis. Es necesario contar con conocimientos científicos que contribuyan a validar estos recursos que se emplean popularmente para el tratamiento de dicha enfermedad, que sean efectivos, de fácil obtención y permitan combatir las cepas resistentes y multiresistentes de *Mycobacterium tuberculosis*. En este estudio se validará la actividad antimicobacteriana de las siguientes plantas: *Sida acuta*, *Enterolobium cyclocarpum*, *Stachytarpheta cayennensis*, *Piper auritum* y *Ocimum micranthum* utilizando para ello una micobacteria de crecimiento rápido: *Mycobacterium smegmatis* y *Mycobacterium tuberculosis* que es de crecimiento lento con el fin de comparar la inhibición que puedan provocar las plantas hacia las dos especies de micobacterias, con el objetivo de demostrar si existe una correlación entre las dos, para en un futuro confirmar la actividad de extractos de plantas contra *Mycobacterium tuberculosis* de forma más rápida.

V. OBJETIVOS

5.1 General

5.1.1 Validar el uso popular de las plantas usadas para el tratamiento de enfermedades respiratorias.

5.2 Específicos

5.2.1 Montar un método capaz de establecer la actividad inhibitoria *in vitro* de extractos de plantas frente a *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium smegmatis*.

5.2.2 Demostrar las propiedades inhibitorias *in vitro* en el crecimiento de *Mycobacterium smegmatis* y *Mycobacterium tuberculosis* de extractos hexánicos, clorofórmicos, metanólicos y acuosos de las plantas: *Sida acuta*, *Enterolobium cyclocarpum*, *Stachytarpheta cayennensis*, *Piper auritum* y *Ocimum micranthum* a las que se les atribuye propiedades curativas para enfermedades respiratorias.

5.2.3 Demostrar la correlación que existe entre los patrones de susceptibilidad entre las dos micobacterias en estudio.

VI. HIPOTESIS

- 6.1 De las 5 plantas en estudio, por lo menos una inhibe el crecimiento *in vitro* de las cepas resistentes y multiresistentes de *Mycobacterium tuberculosis*.
- 6.2 Existe correlación entre la inhibición de crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium smegmatis*, por parte de los extractos de las 5 plantas en estudio.

VII. MATERIALES Y METODOS

7.1 Universo de trabajo

El universo estuvo constituido por 234 plantas usadas tradicionalmente para tratar enfermedades respiratorias en Guatemala.

7.2 Muestra

24 extractos hexánicos, clorofórmicos, etanólicos y acuosos de cinco plantas: *Sida acuta*, *Enterolobium cyclocarpum*, *Stachytarpheta cayennensis*, *Piper auritum* y *Ocimum micranthum*, en estudio por su uso tradicional en el tratamiento de enfermedades respiratorias en Guatemala, y cepas de *Mycobacterium smegmatis* y *Mycobacterium tuberculosis*.

7.3 Recursos

7.3.1 Recursos humanos

7.3.1.1 Tesista: Luis Alberto Figueroa Reyes.

7.3.1.2 Asesores de tesis:

Lics. Armando Cáceres y Eyda Mendía de Campollo.

7.3.2 Recursos institucionales

7.3.2.1 Departamento de Citohistología de la Universidad de San Carlos de Guatemala donde se determinó la susceptibilidad de los extractos de plantas contra *Mycobacterium smegmatis*.

7.3.2.2 Laboratorio Nacional de Salud donde se determinó la susceptibilidad de los extractos de plantas contra las cepas de *Mycobacterium tuberculosis*.

7.3.2.3 Laboratorio Microbiológico de Referencia (LAMIR), quien prestó equipo: liofilizadora, para obtención de extractos acuosos.

7.3.2.4 FARMAYA aportó información bibliográfica e insumos para el estudio.

7.3.3 Recursos materiales

7.3.3.1 Equipo

- balanza analítica
- autoclave (calor húmedo)
- estufa
- refrigerador
- cabina de seguridad tipo II
- incinerador eléctrico
- incubadora

- pipeteador automático
- desecadora
- liofilizadora
- rotavapor

7.3.3.2 Cristalería

- tubos de vidrio de 20 X 150
- pipetas Pasteur
- embudos
- beakers de 50 ml, 250 ml y 500 ml
- erlenmeyers de 125 ml, 500 ml y 2000 ml
- probetas graduadas de 10 ml, 50 ml y 1000 ml
- cajas de petri
- pipetas volumétricas de 1 ml, 5 ml y 10 ml
- balones con boca de bordé esmerilado

7.3.3.3 Materiales

- gradillas para tubos
- colador
- anillos de metal
- asas bacteriológicas
- soporte universal

- mechero Bunsen
- cajas de petri descartables
- tubo con estándar de McFarland No. 1
- bolsas herméticas
- papel bond
- papel de envolver
- papel parafilm
- gasa
- algodón
- marcadores indelebles
- cinta testigo
- pita para envolver

7.3.3.4. Reactivos

- hexano industrial
- metanol a 95 °
- cloroformo industrial
- agua destilada estéril
- solución salina estéril
- alcohol a 70 °
- fenol al cinco por ciento

7.3.3.5. Medios de cultivo

- agar Müeller-Hinton

- agar Middlebrook 7H10 enriquecido
- enriquecedor OADC
- medio de Lowenstein-Jensen

7.3.3.6. Cepas de micobacterias

7.3.3.6.1 Cepas de *Mycobacterium tuberculosis*

Estas cepas se seleccionaron en base a:

La susceptibilidad a drogas antituberculosas.

- Cepa número 425 a nivel del Laboratorio Nacional de Salud de Guatemala, con susceptibilidad conocida a: izoniacida, estreptomycin, rifampicina y etambutol.
- Cepa número 38531 procedente del Laboratorio Nacional de la Universidad de Wisconsin U.S.A., resistente a la rifampicina.
- Cepa número 38529 ATCC, resistente a la izoniacida.
- Cepa número 384 del Laboratorio Nacional de Salud de Guatemala, resistente a la izoniacida y estreptomycin.

7.3.3.6.2 Cepa de *Mycobacterium smegmatis*

Se utilizó una cepa ATCC de *Mycobacterium smegmatis*.

- cepa número 607 ATCC.

7.3.3.6.3. Controles

7.3.3.6.3.1. *Mycobacterium smegmatis*

- En el caso de *Mycobacterium smegmatis* se utilizó como control positivo, cajas de petri con Trimetropim-sulfametoxazole que inhibieron su crecimiento y como control negativo, cajas sin antibiótico que dejaron crecer la micobacteria.

7.3.3.6.3.2. *Mycobacterium tuberculosis*

En el caso de *Mycobacterium tuberculosis* se utilizaron dos cepas como controles, tanto para la calidad de crecimiento de la micobacteria como para la evaluación del procedimiento correcto de la técnica y fueron las siguientes:

- Cepa control de *Mycobacterium tuberculosis* número H37RV ATCC, sensible a rifampicina, estreptomina, isoniacida y etambutol. Esta cepa es utilizada por los laboratorios que trabajan con *Mycobacterium tuberculosis* como control de calidad.
- Cepa número 276 del Laboratorio Nacional de Salud de Guatemala, resistente a isoniazida, estreptomina, etambutol y rifampicina.

Además estas cepas se utilizaron como cualquier otra cepa del presente estudio.

Para los controles del método de proporción, se utilizaron las mismas cepas de *Mycobacterium tuberculosis* en estudio, sembradas en agar Middlebrook 7H10 enriquecido sin extractos de planta, para permitir su crecimiento sin ninguna interferencia.

7.4 Procedimiento

7.4.1 Selección de Plantas

Se seleccionaron 5 plantas provenientes de una base de datos que agrupa 234 plantas; el criterio de selección fue el que estas plantas son usadas tradicionalmente para tratar enfermedades respiratorias en Guatemala según reporta la literatura de la flora de Guatemala (54-61, 63, 64, 66).

7.4.2 Recolección y clasificación

Las plantas se recolectaron en el campo, según su lugar de crecimiento y se identificaron hasta especie con ayuda del personal de la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

7.4.3 Extracción

El procedimiento para la obtención de extractos fue la

siguiente:

- Obtención de los extractos por extracción en un percolador, con los siguientes solventes; hexano industrial, cloroformo industrial, metanol a 95 ° y agua.
- Concentrar en el rotavapor.
- Desecar los extractos.
- Los extractos acuosos se obtuvieron por liofilización.

Se utilizaron cuatro solventes de diferentes polaridades para tener mayor oportunidad de aislar la molécula activa que fuera capaz de inhibir las micobacterias en estudio.

7.4.4 Preparación de medios

7.4.4.1 Müeller-Hinton

- Se preparó el medio Müeller-Hinton para hacer la prueba de susceptibilidad con *Mycobacterium smegmatis*.
- Se procedió a la preparación del agar así:
- Se prepararon tubos con 9 ml. de agar Müeller-Hinton
- Se esterilizó y se dejó enfriar a 50 °C.
- Se preparó el agar planta, para lo cual se agregó 1 ml del extracto de planta a ensayar, con una concentración de 20 mg/ml, dando una concentración final del extracto de 2 mg/ml.

- Se preparó el agar planta con los 4 extractos: el hexánico, clorofórmico, metanólico y acuoso.
- Se vertió en cajas de petri estériles, luego se dejó solidificar y se incubó a 36 °C para comprobar esterilidad por 24-48 hrs.
- Las cajas se guardaron en refrigeración hasta el momento de usarlas.
- Como control positivo se utilizaron cajas con agar Müeller-Hinton con Trimetoprim-sulfametoxazol y cajas sin antibiótico como control negativo.

7.4.4.2 Middlebrook 7H10

Se preparó el medio Middlebrook 7H10 de la siguiente forma:

- Se esterilizó el medio y se esperó a que estuviera a una temperatura aproximada de 45 °C.
- Se agregó enriquecedores OADC (ácido oléico, albúmina bovina fracción V, dextrosa y catalasa) para hacer la prueba de susceptibilidad con *Mycobacterium tuberculosis*.
- Se prepararon tubos esteriles con 9 ml. de agar Middlebrook 7H10 enriquecido.
- Se agregó 1 ml del extracto de planta a ensayar, con una concentración de 20 mg/ml. La concentración final que fue de 2 mg/ml.
- Se preparó el agar planta con los 4 extractos; el hexánico,

clorofórmico, metanólico y acuoso.

- Se utilizaron cajas con Middlebrook 7H10 enriquecido sin extracto como control de crecimiento y cajas con agar más extracto, para determinar inhibición o resistencia, para ello se utilizó el método de proporción.

7.4.5 Inoculación

7.4.5.1 *Mycobacterium smegmatis*

La inoculación se hizo de la siguiente manera:

- Se purificó el microorganismo a ensayar inoculándolo en un tubo con 8 ml de agar trípticasa de soya inclinado y fue incubado a 36 °C durante 24 hrs.
- Se inoculó una asada del cultivo microbiano puro en un tubo con 5 ml de caldo trípticasa de soya, y fue incubado durante 24 hrs. a 36 °C.
- Se diluyó 0.1 ml de la suspensión anterior en 10 ml de agua destilada estéril (dilución 1:100) y se comparó con el estándar de McFarland No.1.
- Se sembró una asada con *Mycobacterium smegmatis* en las cajas con agar Müeller-Hinton y los extractos de plantas en estudio, por triplicado.
- Se dejó reposar durante 5 a 10 minutos y se incubó a 36 °C por 24 hrs.

7.4.5.2 *Mycobacterium tuberculosis*

- Se resembraron las cepas en estudio en Lowenstein-Jensen.
- Se incubaron a 37 °C durante cuatro semanas
- Se homogenizaron las colonias de *Mycobacterium tuberculosis* mediante agitación mecánica en un tubo con 0.5 ml de agua destilada estéril, con perlas de vidrio estériles por 5 minutos con el fin de obtener una suspensión.
- Se comparó la turbidez de la suspensión obtenida con el estándar de McFarland No. 1
- Se hicieron diluciones 1:10 y 1:1000
- Se sembraron 3 gotas de cada dilución sobre el agar Middlebrook 7H10 enriquecido, mezclado con los extractos de plantas en estudio, por goteo, sin estriar con asa por duplicado.
- Se dejaron reposar por 15 minutos a temperatura ambiente.
- Se guardaron individualmente las cajas de petri en bolsas herméticas para evitar desecación.

7.4.6 Interpretación de resultados

7.4.6.1 *Mycobacterium smegmatis*

La interpretación de resultados se realizó de la siguiente manera:

- Si hubo crecimiento homogéneo a lo largo del inóculo entonces la actividad antimicobacteriana del extracto fue negativa.

- Si hubo alteraciones morfológicas en las colonias entonces la actividad inhibitoria fue parcial.
- Si hubo presencia de colonias fuera del inóculo, fue contaminación.
- Si no hubo crecimiento, fue porque el extracto tuvo actividad antimicobacteriana positiva.

7.4.6.2. *Mycobacterium tuberculosis*

La interpretación de resultados se realizó de la siguiente manera: se comparó el crecimiento de las cepas en estudio en agar con extractos de plantas, con el crecimiento de las cepas en estudio en agar sin extractos de plantas.

Se utilizó el método de proporción para determinar si hubo inhibición o no. Este método consiste en la división del número de colonias que crecieron en el agar con extracto, dentro del número de colonias que crecieron en el agar sin extracto por cien. Si se obtiene un resultado con un porcentaje menor que diez se dice que hay susceptibilidad y si es mayor se dice que hay resistencia (33).

7.4.7 Determinación de la concentración mínima inhibitoria

- Se ensayaron cantidades decrecientes del extracto vegetal con actividad positiva antimicobacteriana.

7.5 Diseño estadístico

Se trabajó con un diseño de investigación de tipo experimental, donde el muestreo fue la recolección por conveniencia de las plantas a estudiar. Los tipos de variables fueron: variable independiente: extractos de plantas de una misma concentración. Variable dependiente: fue el resultado de la inoculación; inhibición o no del crecimiento de las micobacterias. Se trabajó con una escala nominal no paramétrica de inhibición o no inhibición.

7.6 Comparación de resultados de inhibición

Al final de la fase experimental se compararon los resultados de inhibición antimicobacteriana de los extractos de las plantas tanto las 5 cepas de *Mycobacterium tuberculosis*, la sensible, 3 de mediana resistencia y la multiresistente con la cepa de *Mycobacterium smegmatis*. Cada micobacteria se trabajó por separado, *Mycobacterium smegmatis* se trabajó en el Departamento de Citohistología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala. Se trabajó primero por ser una micobacteria de crecimiento rápido y por no necesitar cuidados estrictos como los que hay que tomar con las cepas patógenas resistentes y multiresistentes de

Mycobacterium tuberculosis. Las pruebas de susceptibilidad con *Mycobacterium tuberculosis* se trabajaron después, por necesitar más tiempo para que las micobacterias se desarrollen, utilizando cepas jóvenes. Estas pruebas se realizaron en el Laboratorio Nacional de Salud por contar con el área de trabajo y normas de bioseguridad adecuadas. Al finalizar las pruebas de susceptibilidad obtenidas por separado con los extractos de plantas se compararon los resultados de inhibición de las dos micobacterias y se determinó la correlación.

VIII. RESULTADOS

El desarrollo del presente estudio se llevó a cabo en dos partes, la primera consistió en demostrar la actividad inhibitoria *in vitro* de los extractos hexánicos, clorofórmicos, metanólicos y acuosos de las plantas: *Sida acuta*, *Piper auritum*, *Ocimum micranthum*, *Stachytarpheta cayennensis* y *Enterolobium cyclocarpum* contra *Mycobacterium smegmatis* y la segunda en demostrar la actividad inhibitoria contra *Mycobacterium tuberculosis*. Los resultados obtenidos en la primera parte son los siguientes:

Tabla 1.

Determinación de la actividad antimicobacteriana de extractos de plantas contra *Mycobacterium smegmatis* a una concentración de 2 mg/ml.

planta	parte usada	Extractos	E-1	E-2	E-3	E-4
2 mg/ml (concentración)						
<i>Sida acuta</i>	hoja	-	-	-	-	+
<i>Piper auritum</i>	hoja	-	-	-	-	-
<i>Ocimum micranthum</i>	hoja	-	-	-	-	-
<i>Stachytarpheta cayennensis</i>	hoja	-	-	-	-	-
<i>Enterolobium cyclocarpum</i>	hoja	+	+	+	+	+
<i>Enterolobium cyclocarpum</i>	corteza	+	+	+	+	+

Extractos: E-1= hexánico, E-2= clorofórmico, E-3= metanólico, E-4= acuoso. + = inhibición, - = no inhibición.

Los extractos que mostraron actividad inhibitoria a una concentración de 2 mg/ml fueron el extracto acuoso de las hojas de *Sida acuta* y los hexánicos, clorofórmicos, metanólicos y acuosos de *Enterolobium cyclocarpum* de hojas y corteza.

Posteriormente se determinó la concentración mínima inhibitoria de los extractos que presentaron actividad contra *Mycobacterium smegmatis* a una concentración de 2 mg/ml, como se observa en la tabla 2.

Tabla 2.

Determinación de la concentración mínima inhibitoria de extractos que presentaron actividad contra *Mycobacterium smegmatis* con una concentración de 2mg/ml.

Planta	parte usada	extracto	concentración (mg/ml)		
			2	1	0.5
<i>Sida acuta</i>	hoja	E-4	+	-	-
<i>Enterolobium cyclocarpum</i>	hoja	E-1	+	-	-
<i>Enterolobium cyclocarpum</i>	hoja	E-2	+	-	-
<i>Enterolobium cyclocarpum</i>	hoja	E-3	+	-	-
<i>Enterolobium cyclocarpum</i>	hoja	E-4	+	-	-
<i>Enterolobium cyclocarpum</i>	corteza	E-1	+	-	-
<i>Enterolobium cyclocarpum</i>	corteza	E-2	+	-	-
<i>Enterolobium cyclocarpum</i>	corteza	E-3	+	-	-
<i>Enterolobium cyclocarpum</i>	corteza	E-4	+	-	-

Extractos: E-1= hexánico, E-2= clorofórmico, E-3= metanólico, E-4= acuoso. + = inhibición, - = no inhibición.

Ningún extracto de planta mostró actividad contra *Mycobacterium smegmatis* por debajo de 2 mg/ml.

La segunda parte consistió en la determinación de la actividad inhibitoria de los extractos de plantas contra cepas de *Mycobacterium tuberculosis*. Los resultados se muestran en la tabla 3.

Tabla 3.

Demostración de la actividad antituberculosa de extractos de hojas de las plantas en estudio a una concentración de 2 mg/ml, contra cepas de *Mycobacterium tuberculosis*.

Planta	Extracto	Cepas				
		A	B	C	D	E
<i>Sida acuta</i>	E-1	+	+	+	+	-
	E-2	+	+	+	+	-
	E-3	+	+	+	+	-
	E-4	-	-	-	-	-
<i>Piper auritum</i>	E-1	+	+	+	+	-
	E-2	-	-	-	-	-
	E-3	+	+	+	+	+
	E-4	-	-	-	-	-
<i>Ocimum micranthum</i>	E-1	+	+	+	+	-
	E-2	+	+	+	+	-
	E-3	+	+	+	+	-
	E-4	-	-	-	-	-
<i>Stachytarpheta cayennensis</i>	E-1	+	-	-	+	-
	E-2	-	-	-	-	-
	E-3	+	+	+	+	+
	E-4	-	-	-	-	-

Extractos: E-1= hexánico, E-2= clorofórmico, E-3= metanólico, E-4= acuoso. + = inhibición, - = no inhibición.
 Cepas: A= multisensible, B= resistente a rifampicina, C= resistente a izoniacida, D= resistente a izoniacida y estreptomycin, E= multiresistente.

Durante la segunda parte del estudio, los extractos que mostraron actividad inhibitoria *in vitro* contra las cepas de *Mycobacterium tuberculosis* a una concentración de 2 mg/ml fueron los siguientes: los extractos hexánico, clorofórmico y metanólico de la planta *Sida acuta* mostraron actividad inhibitoria contra todas las cepas en estudio excepto la multiresistente.

De la planta *Piper auritum* los extractos que mostraron actividad inhibitoria fueron el hexánico, que inhibió a todas las cepas en estudio a excepción de la multiresistente y el metanólico que inhibió el crecimiento de todas las cepas.

Con la planta *Ocimum micranthum* los extractos que mostraron actividad inhibitoria fueron el hexánico, clorofórmico y metanólico que inhibieron todas las cepas en estudio excepto la multiresistente.

El extracto hexánico de la planta *Stachytarpheta cayennensis* mostró actividad inhibitoria contra dos cepas: la multisensible y la resistente a la izoniacida y estreptomicina.

Por último los extractos del árbol *Enterolobium cyclocarpum* que mostraron actividad inhibitoria contra cepas de *Mycobacterium tuberculosis* se presentan en la tabla 4.

Tabla 4.

Demostración de la actividad inhibitoria contra *Mycobacterium tuberculosis* que presentaron los extractos de *Enterolobium cyclocarpum* con una concentración de 2 mg/ml.

Parte usada	Extracto	Cepas				
		A	B	C	D	E
hoja	E-1	+	-	-	+	-
	E-2	-	-	-	-	-
	E-3	+	+	+	+	+
	E-4	-	-	-	-	-
corteza	E-1	-	-	-	-	-
	E-2	+	+	+	+	+
	E-3	-	-	-	-	-
	E-4	-	-	-	-	-

Extractos: E-1= hexánico, E-2= clorofórmico, E-3= metanólico, E-4= acuoso. + = inhibición, - = no inhibición.
 Cepas: A= multisensible, B= resistente a rifampicina, C= resistente a izoniacida, D= resistente a izoniacida y estreptomocina, E= multiresistente.

De los extractos de hoja de *Enterolobium cyclocarpum*, el hexánico inhibió únicamente la cepa multisensible y la resistente a izoniacida y estreptomocina, mientras que el metanólico mostró inhibición contra todas las cepas. Con respecto a los extractos de la corteza únicamente el clorofórmico mostró actividad inhibitoria contra todas las cepas.

Por último se determinó la concentración mínima inhibitoria de los extractos que mostraron actividad inhibitoria contra las cepas de *Mycobacterium tuberculosis* a una concentración de 2 mg/ml.

Tabla 5.

Determinación de la concentración mínima inhibitoria de los extractos que mostraron actividad inhibitoria contra las cepas de *Mycobacterium tuberculosis*

Planta	Extracto	Cepa											
		A			B			C			D		
		x	y	z	x	y	z	x	y	z	x	y	z
<i>Sida acuta</i>	E-1	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-
	E-2	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-
	E-3	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-
<i>Piper auritum</i>	E-1	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-
	E-3	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-
<i>Ocimum micranthum</i>	E-1	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-
	E-2	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-
	E-3	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-
<i>Stachytarpheta cayennensis</i>	E-3	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-
<i>Enterolobium cyclocarpum</i> (hoja)	E-3	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-
<i>Enterolobium cyclocarpum</i> (corteza)	E-2	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-

Extractos: E-1= hexánico, E-2= clorofórmico, E-3= metanólico, + = inhibición, - = no inhibición.
 Cepas: A= multisensible, B= resistente a la rifampicina, C= resistente a la izoniacida, D = multiresistente.
 Concentración (mg/ml.): x= 2, y= 1. z= 0.5.

Unicamente el extracto clorofórmico de *Sida acuta* mostró inhibición a una concentración de 1 mg/ml contra la cepa multisensible de *Mycobacterium tuberculosis*. Se utilizó el método de Proporción para determinar si existió susceptibilidad o resistencia de *Mycobacterium tuberculosis* con los extractos de plantas, encontrándose que hubo susceptibilidad a los extractos de las cepas de *Mycobacterium tuberculosis* a una concentración de 2 mg/ml (Anexo 2, tablas 6-10).

IX. DISCUSION DE RESULTADOS

En la población guatemalteca el uso de las plantas medicinales es una práctica popular, sin embargo existe poca investigación científica que demuestre las propiedades curativas que se le atribuyen.

Recientemente han despertado interés los resultados positivos obtenidos con extractos vegetales, estimulando la investigación farmacológica y clínica (1, 58, 60).

En base a estos antecedentes se realizó el presente estudio eligiéndose 5 plantas que tradicionalmente se usan para el tratamiento de enfermedades respiratorias en Guatemala y cepas de *Mycobacterium smegmatis* y *Mycobacterium tuberculosis*.

El objetivo principal del estudio fué demostrar la actividad inhibitoria *in vitro* de los extractos de estas cinco plantas elegidas contra *Mycobacterium tuberculosis* con el fin de encontrar tratamientos alternativos contra la tuberculosis y ayudar en un futuro a los pacientes que padecen de ésta enfermedad, con cepas multiresistentes a antimicobacterianos de elección. En el desarrollo del estudio se encontró que 11 de los 24 extractos demostraron actividad

inhibitoria contra al menos una cepa de *Mycobacterium tuberculosis* a una concentración de 2 mg/ml, lo cual es alentador y sugiere una confirmación posterior de los mismos, para poder así aislar las moléculas activas presentes en los extractos, que puedan llegar a ser en el futuro un tratamiento natural alternativo para los pacientes infectados con cepas de *Mycobacterium tuberculosis* multiresistentes. Con lo anteriormente mencionado se valida la primera de las dos hipótesis planteadas en este estudio.

Se encontró que el extracto clorofórmico de la planta *Sida acuta* inhibió el crecimiento de una cepa de *Mycobacterium tuberculosis* con una concentración de 1 mg/ml (tabla 5), lamentablemente esta cepa fué la multisensible, por lo que no se le puede dar la misma importancia si la inhibición se hubiera encontrado en cepas que son resistentes a por lo menos una droga antituberculosa.

No se pudo encontrar la proporción crítica de los extractos que mostraron actividad inhibitoria contra las cepas de *Mycobacterium tuberculosis*, porque lamentablemente con los extractos de plantas por ser de carácter experimental, no tienen ninguna tabla de proporciones críticas de extractos usados como drogas antituberculosas comprobadas y efectivas (Anexo 1) (72). Por ello no se puede comparar los resultados de proporción obtenidos con ningún

patrón de resistencia conocido de extractos de plantas, simplemente proporcionan resultados concretos de inhibición o resistencia a determinada concentración. Con la información proporcionada se contribuye a establecer las bases para abrir paso a posteriores estudios que incrementen la información sobre actividad inhibitoria *in vitro* de extractos de plantas contra *Mycobacterium tuberculosis*.

Otro objetivo del estudio fue el de demostrar la posible correlación existente entre *Mycobacterium smegmatis* y *Mycobacterium tuberculosis*, con el fin de montar un método capaz de establecer, la actividad inhibitoria *in vitro* de extractos de plantas frente a *Mycobacterium tuberculosis* de manera más rápida.

De las cinco plantas *Enterolobium cyclocarpum* presentó la misma actividad inhibitoria contra las dos micobacterias a una concentración de 2 mg/ml, sin embargo esta relación sólo se manifestó en el extracto metanólico, extraído de la hoja y el extracto clorofórmico extraído de la corteza de la misma. El resto de extractos no mostraron correlación alguna en lo que respecta a inhibición antimicobacteriana entre las dos especies de micobacterias.

Con estos resultados obtenidos en la parte experimental, se demostró que la correlación esperada entre *Mycobacterium*

smegmatis y *Mycobacterium tuberculosis* no es exacta y no proporciona resultados similares o reproducibles entre las dos micobacterias, lo que invalida la segunda hipótesis planteada en este estudio.

X. CONCLUSIONES

- 1.- De los 24 extractos del estudio, 11 provocaron inhibición por lo menos de una cepa de *Mycobacterium tuberculosis* con una concentración de 2 mg/ml.

- 2.- No existe correlación en la inhibición de crecimiento entre ambas micobacterias.

- 3.- Se demostró que los extractos metanólicos de las plantas *Piper auritum*, *Stachytarpheta cayennensis*, *Enterolobium cyclocarpum* y el clorofórmico de la corteza de esta última, son capaces de inhibir el crecimiento de cepas multiresistentes de *Mycobacterium tuberculosis in vitro* a una concentración de 2 mg/ml.

XI. RECOMENDACIONES

- 1.- Continuar con el estudio para aislar las moléculas activas presentes en los extractos de plantas capaces de inhibir el crecimiento micobacteriano, principalmente de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* multiresistentes.
- 2.- Seguir con la demostración del efecto inhibitorio de los extractos estudiados contra otros microorganismos causantes de enfermedades respiratorias.
- 3.- Evaluar la toxicidad aguda y crónica de los extractos y las moléculas activas, que muestran actividad inhibitoria de crecimiento de cepas de *Mycobacterium tuberculosis*, en animales de laboratorio.
- 4.- Realizar estudios con cepas de *Mycobacterium tuberculosis* para determinar las proporciones críticas de los extractos de plantas que muestren inhibición de crecimiento de la micobacteria.

XII. REFERENCIAS

- 1.- Manrique S. Acción antimicobacteriana *in vitro* de seis plantas medicinales usadas en el tratamiento de tuberculosis; Universidad de San Carlos de Guatemala. (tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia). 1992: 46p. (p. 3-15).
- 2.- Joklik WK, Willett HP, Amos DB. Zinser Microbiología, 18 ed. Neerof NG, trad. Argentina: Médica Panamericana, 1987. 1554p. (p. 649-54).
- 3.- Oficina Sanitaria Panamericana. Bases para el programa de la OMS de infecciones respiratorias agudas en la infancia. Washington. OPS. 1985. 120p (p. 1-20; 61-73).
- 4.- Koneman EW, et al. Diagnostic Microbiology. 3 ed. Philadelphia: Lippincott Company, 1988. XVIII + 840 p. (p. 530-44).
- 5.- Jones B.E. et al. Una evaluación prospectiva de la terapia antituberculosa en pacientes con infección por el virus de inmunodeficiencia humana. Rev. Argen. Tórax 1995; Vol. 56: No.1: (p. 169-170).
- 6.- Menzies D. et al. Tuberculosis entre los trabajadores del cuidado de la salud. Rev. Argen. Tórax. 1995; vol. 56: No.2: (p. 56-57).
- 7.- Schneider C. et al. Ha aumentado la incidencia y la resistencia de la tuberculosis. Observaciones

- epidemiológicas sobre la base de enfermedad confirmada en cultivo. Rev. Argen. Tórax 1995; vol. 56: No.2 (p. 57).
- 8.- de Lourdes M. *et al.* Epidemiología del SIDA y la Tuberculosis. Rev. Argen. Tórax 1995; vol. 56: No.2: (p. 60).
- 9.- Broderick A. Tuberculosis y SIDA (TB y VIH en América del Sur). Rev. Argen. Tórax. 1995; vol. 56:No.2: (p. 60).
- 10.- Berkow R. *et al.* El Manual Merck. 8 ed. España 1989. 2944 p. (p. 123-127)
- 11.- Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social. Dirección General de Servicios de Salud. División de Tuberculosis. Guatemala: Memoria anual. 1995.
- 12.- Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Escuela de Química Biológica. III Congreso Nacional de Microbiología, Memorias. Guatemala:USAC. 1986; 281p.
- 13.- Ballows A. *et al.* Manual of Clinical Microbiology. 5 ed. American Society for Microbiology. Washington D.C. 1991; XVIII+229p. (p. 203-220).
- 14.- Torres M. Manual Práctico de Bacteriología Médica. Guatemala, 1996; 1:739p. (p. 394-402).
- 15.- Krugman W. Enfermedades Infecciosas. 6 ed. Interamericana ed. 1979. (p. 356-409).
- 16.- Baldizón Pernillo M. *et al.* Implementación de la determinación de ácidos grasos de micobacterias por

- cromatografía líquida de alta resolución. XI Congreso Centroamericano y V Nacional de Microbiología y III del Colegio de Farmacéuticos y Químicos de Guatemala. Memorias, Guatemala VII-4 (p. VI-3).
- 17.- Washington JA. Laboratory Procedures in Clinical Microbiology. 2 ed. Massachusetts: Halliday Lithograph 1985. 885p. (p. 408-412).
- 18.- Grange M. Enfermedades Micobacterianas. Londres, científica 1985. V+152p. (p. 45-89).
- 19.- Robins SL. *et al.* Patología Estructural y Funcional. 4 ed. México: Interamericana, 1990; 1:739p. (p.395-404).
- 20.- Chapman JS. The Atypical Mycobacteria and Human Mycobacteriosis: Topic in infectius Disease, 2 ed. NY. Plenum Medical Book Company. 1977; XVI+200p. (p. 5-7, 13-27).
- 21.- Ramirez MJ. Identificación de especies de micobacterias aisladas de muestras clínicas de pacientes que acudieron al HGSJDD de 1988-1989. Guatemala: USAC. Doc. Tec. 1992. 85p. (p. 1-14, 21-26).
- 22.- Goren MB. Some observations of Mycobacterial Acid-Fatness. Am. Rev. Resp. Dis. 1976. 118p. (p.151-154).
- 23.- Remington's Pharmaceutical Sciences. 16 ed. Pensilvania Mack Publishing. 1980. 1928 p. (p.1724).
- 24.- Davis CE, *et al.* Socioeconomic factors in tuberculosis. Chest. 1986: 5:526-9.

- 25.- Melnick VP. Immune reactivity of patients with pulmonary tuberculosis suffering from chronic alcoholism. *Vrach Delo*. 1989; 4:82-5.
- 26.- Wayde LG. Díaz GA. Intrinsic Catalase Dot Blot Immunoassay for identification of *Mycobacterium tuberculosis*, *M. avium* and *M. intracelulare*. *J. Clin. Micro.* 1987;25:1687-90.
- 27.- Robins SL, Cotran RS. *Patología Funcional y Estructural*. 3 ed. México: Interamericana, 1987. 1434 p. (p. 340-6).
- 28.- Stites DP. *et al.* *Inmunología Básica y Clínica*. 7 ed. De la Darza. V. trad. México: El manual moderno, 1993. 1055 p. (p. 434-435).
- 29.- Eng RH. *et al.* Diagnostics of *Mycobacterium* Bacteremia in patients with Acquired Immunodeficiency Syndrome by direct examination of blood films. *J. Clin. Micro.* 1989; 27:768-9.
- 30.- Coates SR. *et al.* Identification of *Mycobacterium tuberculosis* antigens in Siebert fractions by immunoblotting. *J. Gen. Micro.* 1986; 24:126-30.
- 31.- Cohen ML. Expression of proteins of *Mycobacterium tuberculosis* in *Escherichia coli* and potential of recombinant genes and proteins for development of diagnostics reagents. *J. Gen. Micro.* 1987; 25:1175-80.
- 32.- Organización Panamericana de la Salud "Bacteriología de la Tuberculosis". 1986, 42p. (p.9-10).

- 33.- Canetti G. Mycobacteria: Laboratory methods for testing drug sensitivity and resistance. Bull Org Mond State. 1963; 29:565-78.
- 34.- Gini GA. Manual de procedimientos para la identificación de las bacterias con importancia clínica. 2 ed. Guatemala, 1995, 140p. (p.101-109).
- 35.- Christopher FJ. The Acquired Immunodeficiency Syndrome: a tuberculosis treat? Med. J. Aust. 1988; 148:609-15.
- 36.- Pitchenick AE. tuberculosis control and the AIDS Epidemic in developping countries. Ann Inter, Med. 1990; 113:89-91.
- 37.- Hirano K. et al. Resistencia a las drogas antituberculosas en Japón. Rev. Arg. Tórax. 1996; vol. 56. No.:3/4 (p. 284).
- 38.- Scaberg T. et al. Tuberculosis pulmonar resistente a las drogas en Berlín, Alemania, 1987-1993. Rev. Arg. Tórax. 1996; vol 56. No.3/4 (p. 289).
- 39.- Di Leonardo M. et al. Micobacterias en pacientes infectados por VIH en Buenos Aires. Rev. Arg. Tórax. 1995; vol 56. No.1 (p. 62).
- 40.- Galeno Jimenez A. Tuberculosis y SIDA en el Paraguay. Rev. Arg, Tórax. 1996; vol 56. No.3/4 (p. 62).
- 41.- Smith RL. et al. Factores que afectan el rendimiento de la baciloscopía del esputo en pacientes con VIH y tuberculosos. Rev. Arg. Tórax. 1996; vol 56. (p. 63).

- 42.- Cao Y. *et al.* Caracterización virológica e inmunológica de sobrevivientes de un largo periodo infectados por el virus de inmunodeficiencia humana tipo I. *Rev. Arg. Tórax.* 1996; vol 56. (p. 63-64).
- 43.- Solomon S. *et al.* La tendencia de la infección VIH en pacientes con tuberculosis pulmonar en el sur de la India. *Rev. Arg. Tórax.* 1996; vol 56. (p. 64).
- 44.- Perriens JH. *et al.* Tuberculosis pulmonar en pacientes infectados por VIH en el Zaire. Un ensayo controlado de tratamiento por 6 o 12 meses. *Rev Arg. Tórax.* 1996; vol 56. (p. 64-65).
- 45.- Hyppoliter PR. *et al.* Infección por VIH y tuberculosis en Haití. *Rev. Arg. Tórax.* 1994; vol 55. (p. 296).
- 46.- Fujiwara PI. *et al.* Relación entre el virus de inmunodeficiencia humana, SIDA y tuberculosis en la ciudad de Nueva York. *Rev. Arg. Tórax.* 1994; vol 55. (p. 96-97).
- 47.- Girardi E. *et al.* Tuberculosis y SIDA: Un estudio retrospectivo, longitudinal, multicéntrico de pacientes italianos con SIDA. *Rev. Arg. Tórax.* 1994; vol 55. (p. 298).
- 48.- Burwen DR. *et al.* Personas con tuberculosis y SIDA: Un estudio multiestatal. *Rev. Arg. Tórax.* 1995; vol 56. (p. 170).
- 49.- Taylor JK. *et al.* Infección micobacteriana en las

- poblaciones VIH seropositivas y seronegativas, 1987-93.
Rev. Arg. Tórax. 1995; vol 56. (p. 170-171).
- 50.- Christopher C. *et al.* A trial of three regimens to prevent tuberculosis in Ugandan adults infected with the Human Immunodeficiency Virus. The New England, J. Of. Med. 1997; vol 337. (p. 801-808).
- 51.- Directrices para el Tratamiento de la Tuberculosis Farmacoresistente. Organización Mundial de la Salud, 1997, 47 p. (p. 8).
- 52.- Uso de las Plantas Medicinales. México D.F. Arbol, S.A. de C.V. 1989; 179 p.
- 53.- Instituto Indigenista Natural. Aspecto de la medicina popular rural en el área rural de Guatemala. Guatemala. 1974; 9:104-115.
- 54.- Muñoz F. Plantas Medicinales y Aromáticas. Madrid: Mundi-Prensa, 1987. 365 p. (p. 15-32).
- 55.- Thomson AR. Las Plantas Medicinales. Barcelona: Blume, 1981. 220 p. (p. 8-17).
- 56.- Nickel L. Antimicrobial Activity of Vascular plants. Connecticut: Economic Botany, 1959; (p. 281-317).
- 57.- Mitcher LA. *et al.* A Modern Look of Folkloric Use of Antinfective Agent J Nat Prod, 1987;50:(p.281-317).
- 58.- Cáceres A. *et al.* Plants Used in Guatemala for the Treatments of Respiratory Disease. Screening of 68 Plants against Gram-positive bacteria. J. Ethnopharmacol. 1991; 33:(p. 193-208).

- 59.- Cáceres A. *et al.* Plantas De Uso Medicinal En Guatemala, Detección Etnobotánica y bibliográfica. Rev. USAC 1990:9:(p. 55-77).
- 60.- Cáceres A. *et al.* Tamizaje De La Inhibición De *Mycobacterium tuberculosis* Por Maceraciones Vegetales. Revista Científica, Vol 10.1 Instituto de Investigaciones Químicas y Biológicas. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Guatemala. USAC, 1994, 49p. (p. 24-26).
- 61.- Martínez M. Las Plantas Medicinales de México. 6 ed. México: Azteca, 1992, 656p. (p. 335-342).
- 62.- de Mena M. Obtención y Aprovechamiento de Extractos Vegetales De La Flora Salvadoreña. 2 ed. San Salvador. ed. universitaria. 1994. 580p. (p. 341-350).
- 63.- Morton JF. Atlas plant medicinals of middle America; Bahamas to Yucatan, Illinois: Charles C. Thomas. 1981. 1420p.
- 64.- Standley PC. Flora of Guatemala. Fieldman Botany. 1946; 24(5):8-9.
- 65.- Sula L. Langerova M. Drug sensitivity/resistance determination and simple enzymatic test for the differentiation of *Mycobacterium*. Bull Org Sante. 1963; 29:579-88.
- 66.- Mesia VS. *et al.* Inhibition Of Gastric Acid Secretion By The Aqueous Extract And Purified Extracts Of

- Stachytarpheta cayennensis*. 1996; Nat prod cen. Depart. Pharmacolo. Escol. Paulist. Medicin. (p. 36-39).
- 67.- Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social. Dirección General de Servicios de Salud. División de Tuberculosis. Guatemala: Memoria anual. 1997.
- 68.- Parish T. *Micobacteria Protocols. Methods in Molecular Biology*. U.S.A; ed. Humana Press. 1998; XIV+101 p. (p. 187-205).
- 69.- Ballows A. *et al.* *Manual Clinical Microbiology*. 5 ed. 1991; XVII+2631 p. (p. 1148-1150).
- 70.- Guilhot C. *et al.* Isolation and Analysis of IS6120, a new insertion sequence from *Mycobacterium smegmatis*. *Mol. Microbiol.* vol 6. (p. 107-113).
- 71.- Roman M. *Microbiología Clínica de las Enfermedades por Micobacterias*. España 1990. XXX+230 p. (p. 133-155).
- 72.- *Manual de Normas y Procedimientos Técnicos para la Bacteriología de la Tuberculosis. Parte IV de la Organización de los laboratorios; "Medidas de Seguridad"*, Organización Panamericana de la Salud. 1987. (p. 31-37).

XIII. ANEXOS

ANEXO 1

La proporción crítica o criterio de resistencia, es la proporción de mutantes resistentes de una población bacilar por encima de la cual la cepa es considerada resistente.

CUADRO 1

Criterios de resistencia del *Mycobacterium tuberculosis* a las drogas antituberculosas.

Químioterápicos y antibióticos	Concentración ug/ml	Proporción crítica (%)
Isoniacida	0.2	1
Estreptomina	4.0	1
Acido para aminosalicílico sal sódica	0.5	1
Rifampicina	40.0	1
Etambutol	2.0	1
Ethionamida	20.0	10
Kanamicina sulfato	20.0	10
Tioacetazona	2.0	10

ANEXO 2

El método de proporción se utilizó para determinar si hubo inhibición o no y consiste en lo siguiente: La división del número de colonias que crecieron en el agar con extracto, dentro del número de colonias que crecieron en el agar sin extracto por cien. Si se obtiene un resultado con un porcentaje menor de diez se dice que hay susceptibilidad y si es mayor se dice que hay resistencia (33).

fórmula:

número de colonias que crecieron
en el agar con extracto

----- X cien = porcentaje de
número de colonias que crecieron resistencia.
en el agar sin extracto
(control)

Tabla 6.

Demostración de la actividad antituberculosa de extractos de hojas las plantas *Sida acuta* y *Piper auritum* a una concentración de 2 mg/ml, contra cepas de *Mycobacterium tuberculosis*.

Extractos	Cepas									
	A		B		C		D		E	
	1 nc	3 nc	1 nc	3 nc	1 nc	3 nc	1 nc	3 nc	1 nc	3 nc
<i>Sida acuta</i>										
E-1	0	0	0	0	0	0	0	0	200	80
	0	0	0	0	0	0	0	0	198	76
E-2	2	0	4	0	0	0	6	0	INC	189
	1	0	1	0	0	0	0	0	INC	184
E-3	0	0	0	0	0	0	0	0	INC	60
	0	0	0	0	0	0	0	0	INC	54
E-4	INC	33	INC	100	INC	44	INC	56	INC	142
	INC	29	INC	94	INC	40	INC	58	INC	131
<i>Piper auritum</i>										
E-1	0	0	0	0	0	0	0	0	INC	184
	0	0	0	0	0	0	0	0	INC	176
E-2	98	19	94	23	130	34	128	30	INC	200
	102	15	90	20	131	30	129	28	INC	195
E-3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
E-4	INC	50	INC	76	INC	56	INC	90	INC	202
	INC	48	INC	74	INC	60	INC	90	INC	201
control	INC	89	INC	140	INC	120	INC	98	INC	200
	INC	85	INC	136	INC	125	INC	102	INC	209

Extractos: E-1= hexánico, E-2= clorofórmico, E-3= metanólico, E-4= acuoso.

Cepas: A= multisensible, B= resistente a rifampicina, C= resistente a izoniacida, D= resistente a izoniacida y estreptomycin, E= multiresistente.

dilución de micobacterias: 1= 1:10, 3= 1:1000.

nc: número de colonias que crecieron.

INC: incontable número de colonias que crecieron.

Tabla 7.

Demostración de la actividad antituberculosa de extractos de hojas de las plantas *Ocimum micranthum* y *Stachytarpheta cayennensis* a una concentración de 2 mg/ml contra cepas de *Mycobacterium tuberculosis*.

Extractos	Cepas										
	A		B		C		D		E		
	1 nc	3 nc	1 nc	3 nc	1 nc	3 nc	1 nc	3 nc	1 nc	3 nc	
<i>Ocimum micranthum</i>											
E-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	INC	76
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	INC	81
E-2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	INC	44
	0	0	1	0	1	0	0	0	0	INC	40
E-3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	INC	67
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	INC	70
E-4	INC	68	INC	66	INC	81	INC	39	INC	180	
	INC	65	INC	60	INC	78	INC	42	INC	184	
<i>Stachytarpheta cayennensis</i>											
E-1	0	0	INC	75	240	38	0	0	INC	146	
	0	0	INC	72	422	32	0	0	INC	140	
E-2	INC	44	INC	57	INC	22	INC	24	INC	172	
	INC	40	INC	53	INC	19	INC	20	INC	176	
E-3	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
E-4	INC	49	INC	33	INC	26	INC	31	INC	168	
	INC	44	INC	30	INC	23	INC	29	INC	162	
Control	INC	89	INC	140	INC	120	INC	98	INC	200	
	INC	85	INC	136	INC	125	INC	102	INC	209	

Extractos: E-1= hexánico, E-2= clorofórmico, E-3= metanólico, E-4= acuoso.

Cepas: A= multisensible, B= resistente a rifampicina, C= resistente a izoniacida, D= resistente a izoniacida y estreptomycin, E= multiresistente.

dilución de micobacterias: 1= 1:10 y 3= 1:1000.

nc: número de colonias que crecieron.

INC: incontable número de colonias que crecieron.

Tabla 8.

Demostración de la actividad inhibitoria contra *Mycobacterium tuberculosis* que presentaron los extractos de *Enterolobium cyclocarpum* con una concentración de 2 mg/ml.

Extracto	Cepas									
	A		B		C		D		E	
	1 nc	3 nc	1 nc	3 nc	1 nc	3 nc	1 nc	3 nc	1 nc	3 nc
hoja										
E-1	0	0	220	33	248	40	0	0	INC	62
	0	0	217	29	253	44	0	0	INC	60
E-2	122	19	168	24	189	33	221	55	INC	45
	126	22	166	27	192	31	215	60	INC	41
E-3	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
E-4	247	44	190	35	155	24	201	28	INC	86
	240	40	186	32	152	20	197	24	INC	89
Corteza										
E-1	136	29	178	44	190	31	120	21	INC	77
	132	32	176	41	194	35	125	23	INC	81
E-2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
E-3	166	29	180	24	221	55	200	35	INC	98
	162	27	177	22	225	53	204	38	INC	95
E-4	80	24	94	22	77	20	122	30	INC	135
	84	22	96	25	74	17	121	28	INC	130
Control	INC	89	INC	140	INC	120	INC	98	INC	200
	INC	85	INC	136	INC	125	INC	102	INC	209

Extractos: E-1= hexánico, E-2= clorofórmico, E-3= metanólico, E-4= acuoso.

Cepas: A= multisensible, B= resistente a rifampicina, C= resistente a izoniacida, D= resistente a izoniacida y estreptomycin, E= multiresistente.

dilución de micobacterias: 1= 1:10, 3= 1:1000

nc: número de colonias que crecieron.

INC: incontable número de colonias que crecieron.

Tabla 9.

Demostración de la actividad inhibitoria de crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis*, que presentaron los extractos de hojas de las plantas; *Sida acuta*, *Piper auritum*, *Ocimum micranthum* y *Stachytarpheta cayennensis* a una concentración de 2 mg/ml, por el método de proporción.

Extractos	A		B		C		D		E	
	p	%	p	%	p	%	p	%	p	%
<i>Sida acuta</i>										
E-1	0	0	0	0	0	0	0	0	78	38
E-2	0	0	0	0	0	0	0	0	187	91
E-3	0	0	0	0	0	0	0	0	57	30
E-4	31	36	97	70	42	34	57	57	137	67
<i>Piper auritum</i>										
E-1	0	0	0	0	0	0	0	0	180	88
E-2	100	15	22	16	32	26	29	29	198	97
E-3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
E-4	49	56	58	54	58	47	90	90	201	98
<i>Ocimum micranthum</i>										
E-1	0	0	0	0	0	0	0	0	79	39
E-2	0	0	0	0	0	0	0	0	42	24
E-3	0	0	0	0	0	0	0	0	69	34
E-4	67	77	63	46	80	65	41	41	182	89
<i>Stachytarpheta cayennensis</i>										
E-1	0	0	74	53	35	28	0	0	143	70
E-2	42	48	55	40	21	17	22	22	174	85
E-3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
E-4	47	54	32	23	25	20	30	30	165	80

Extractos: E-1= hexánico, E-2= clorofórmico, E-3= metanólico, E-4= acuoso.

Cepas: A= multisensible, B= resistente a rifampicina, C= resistente a izoniacida, D= resistente a izoniacida y estreptomycin, E= multiresistente.

p: número de colonias promedio que crecieron a una dilución de 1:1000.

%: porcentaje obtenido por el método de proporción.

Tabla 10.

Demostración de de la actividad inhibitoria de crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis* que presentaron los extractos de las hojas y corteza de *Enterolobium cyclocarpum* a una concentración de 2 mg/ml, por el método de proporción.

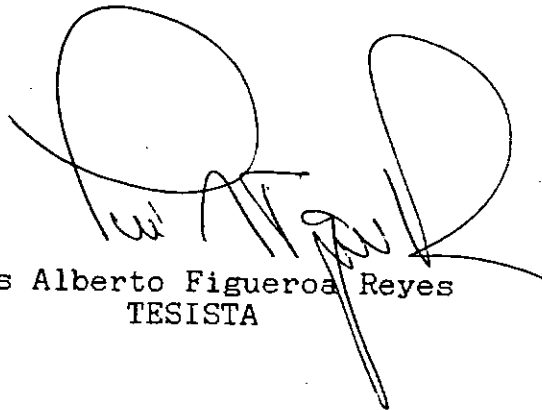
Extractos	A		B		Cepas C		D		E	
	p	%	p	%	p	%	p	%	p	%
hojas										
E-1	0	0	31	22	42	34	0	0	61	30
E-2	21	24	26	19	32	26	58	58	43	21
E-3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
E-4	42	48	34	25	22	18	26	26	88	43
Corteza										
E-1	31	36	43	31	33	27	22	22	79	39
E-2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
E-3	28	32	23	17	57	46	37	37	97	48
E-4	23	26	24	17	19	15	29	29	133	65

Extractos: E-1= hexánico, E-2= clorofórmico, E-3= metanólico, E-4= acuoso.

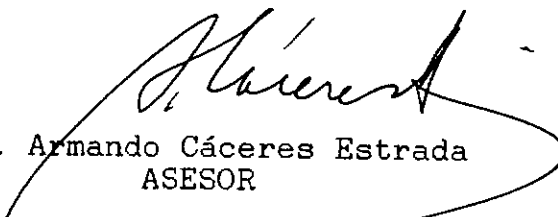
Cepas: A= multisensible, B= resistente a rifampicina, C= resistente a izoniacida, D= resistente a izoniacida y estreptomycinina, E= nultiresistente.

p: número de colonias promedio que crecieron a una dilución de 1:1000.

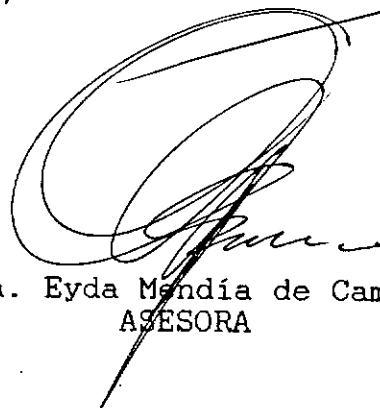
%: porcentaje obtenido por el método de proporción.



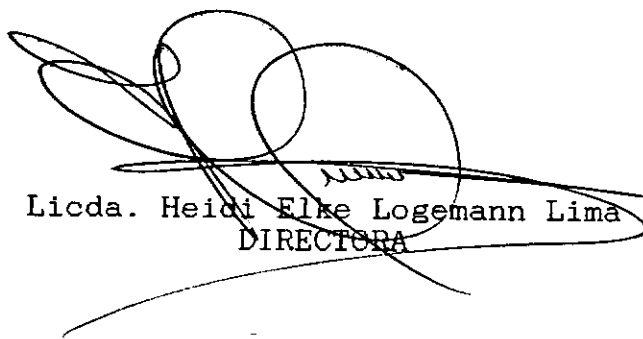
Luis Alberto Figueroa Reyes
TESISTA



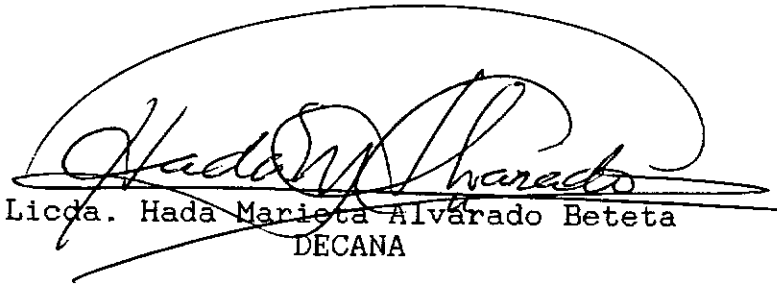
Lic. Armando Cáceres Estrada
ASESOR



Licda. Eyda Mandía de Campollo
ASESORA



Licda. Heidi Elke Logemann Lima
DIRECTORA



Licda. Hada Marieta Alvarado Beteta
DECANA