

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

**INHIBICIÓN DE *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium smegmatis* POR  
EXTRACTOS ETANÓLICOS DE CINCO PLANTAS UTILIZADAS  
POPULARMENTE PARA EL TRATAMIENTO DE INFECCIONES  
RESPIRATORIAS**

Marco Vinicio García Sarán

**QUÍMICO BIÓLOGO**

**Guatemala, Septiembre del 2008**

---

No.	CONTENIDO	Pág.
<b>1</b>	<b>RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>INTRODUCCION</b>	<b>2</b>
<b>3</b>	<b>ANTECEDENTES</b>	<b>4</b>
<b>3.1</b>	<b>Género <i>Mycobacterium</i></b>	<b>4</b>
3.1.1.	Historia del género <i>Mycobacterium</i>	4
3.1.2.	Criterios para definir el género <i>Mycobacterium</i>	5
3.1.2.1	Ácido alcohol resistencia	5
3.1.2.2.	Estructura de los ácidos micólicos	5
3.1.2.3.	Proporción de guanina-citosina del ADN (CG)	5
3.1.3.	Clasificación de las especies de micobacterias	5
3.1.3.1.	Según la velocidad de crecimiento	6
3.1.3.2	Según su importancia medica	6
3.1.3.3.	Según el riesgo de infección	8
<b>3.2.</b>	<b>Enfermedad de la tuberculosis</b>	<b>9</b>
3.2.1	Historia de la tuberculosis	9
3.2.2.	Formas de tuberculosis	10
3.2.2.1.	Tuberculosis pulmonar	11
3.2.2.2.	Tuberculosis extra-pulmonar	11
3.2.2.3.	Tuberculosis miliar	11
3.2.2.4.	Meningitis tuberculosa	11
3.2.2.5.	Tuberculosis infantil	11
3.2.3.	Mecanismos de transmisión	12
3.2.3.1.	Grado de la enfermedad	12
3.2.3.2.	Frecuencia y severidad	12
3.2.3.3.	Volumen y característica del esputo	12
3.2.3.4.	Tratamiento antituberculoso	12
3.2.3.5.	Cuando hay contacto íntimo y prolongado	12
3.2.4.	Factores de riesgo	12
3.2.5.	Presentación clínica de la tuberculosis	12
3.2.5.1.	Sintomatología	13

3.2.5.2.	Exploración física	13
3.2.5.3.	Diagnóstico	14
3.2.6.	Tratamiento	21
3.2.6.1.	Tratamiento antituberculoso en ocasiones especiales	23
3.2.6.4.	Tratamiento ambulatorio u hospitalización	25
3.2.6.	Factores que pueden reducir el éxito del tratamiento	26
3.2.7.1.	Pronóstico	26
3.2.8.	Epidemiología	27
<b>3.3.</b>	<b>MEDICINA TRADICIONAL</b>	<b>29</b>
3.3.1.	Fitoterapia	29
3.3.2.	Etnobotánica	29
3.3.2.1.	Etnobotánica médica	29
3.3.3.	Medicina natural para el tratamiento de la tuberculosis	30
3.3.3.1.	Estudios a nivel mundial	30
3.3.3.2.	Estudios realizados en Guatemala	32
<b>3.4.</b>	<b>Monografía de las plantas a usar en el estudio</b>	<b>32</b>
3.4.1.	<i>Sambucus mexicana</i>	33
3.4.2.	<i>Cecropia obtusifolia</i>	35
3.4.3	<i>Acacia farnesiana</i>	36
3.4.4.	<i>Litsea guatemalensis</i>	38
3.4.5.	<i>Liquidambar styraciflua</i>	40
<b>4.</b>	<b>JUSTIFICACION</b>	<b>44</b>
<b>5.</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>46</b>
<b>6.</b>	<b>HIPOTESIS</b>	<b>47</b>
<b>7.</b>	<b>MATERIALES Y METODOS</b>	<b>48</b>
7.1	Universo de trabajo	48
7.2.	Recursos	48
7.2.1.	Humanos	48
7.2.2.	Institucionales	48
7.2.3.	Físicos	49
7.2.3.1.	Equipo	49
7.2.3.2.	Reactivos	49
7.2.3.3.	Material	50

7.2.4.	Procedimiento	51
7.2.4.1.	Selección de plantas	51
7.2.4.2.	Procedimiento de obtención de extractos etanólicos por extracción continua por percolación	51
7.2.4.3.	Procedimiento de concentración utilizando el rotavapor	52
7.2.4.4.	Ensayo de actividad micobactericida	53
7.2.5.	Diseño estadístico	55
7.2.5.1.	Tipo de estudio	55
7.2.5.2.	Variables	56
7.2.5.3.	Validez del estudio	56
7.2.5.4.	Análisis de datos	56
<b>8</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>57</b>
<b>8.1</b>	<b>Resultados del ensayo</b>	<b>57</b>
8.1.1	Análisis Físico-Químico	57
8.1.2.	Determinación de actividad inhibitoria	57
8.1.3	Comparación de resultados de la actividad inhibitoria	58
8.1.4.	Confirmación de los resultados obtenidos con el método bioquímico colorimétrico de MTT utilizando los extractos <i>S. mexicana</i> , <i>C. obtusifolia</i> , <i>L. guatemalensis</i> , <i>L. styraciflua</i> con respecto a <i>M. tuberculosis</i> H37Rv ATCC 27294	58
<b>9.</b>	<b>DISCUSION DE RESULTADOS</b>	<b>59</b>
<b>10.</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>61</b>
<b>11.</b>	<b>RECOMENDACIONES</b>	<b>62</b>
<b>12.</b>	<b>REFERENCIAS</b>	<b>63</b>
<b>13.</b>	<b>ANEXOS</b>	<b>72</b>

## 1. RESUMEN

La tuberculosis es una enfermedad infecciosa que en la mayoría de casos el agente causal es el bacilo *Mycobacterium tuberculosis*. Si bien comúnmente se presenta como una infección pulmonar, puede afectar muchos tejidos y diseminarse extensamente. *M. tuberculosis* es de forma bacilar, aerobio estricto, de crecimiento lento, resistente al frío, congelación y desecación, sensible al calor, luz solar y luz ultravioleta. Puede permanecer en estado latente durante varios años en condiciones adversas (1, 8, 9).

El resurgimiento de la tuberculosis a nivel mundial es atribuido al número creciente de pacientes inmunosuprimidos, principalmente pacientes viviendo con VIH/SIDA, al abandono de la terapia antimicrobiana y al surgimiento de cepas resistentes a múltiples antibióticos que han circulado a nivel mundial.

El objetivo de este estudio fue determinar la actividad micobactericida de los extractos etanólicos de las hojas de las especies *Sambucus mexicana* (Sauco), *Cecropia obtusifolia* (Guarumo), *Acacia farnesiana* (Subin), *Litsea guatemalensis* (Laurel) y *Liquidambar styraciflua* (Liquidámbar), que son utilizadas por la población guatemalteca contra enfermedades de las vías respiratorias. Para ello se realizó el ensayo con el método bioquímico colorimétrico MTT (bromuro de 3-[4.5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazolio) utilizando las cepas de *M. tuberculosis* H37Rv ATCC 27294 y *Mycobacterium smegmatis* ATCC 607.

Se encontró que los extractos etanólicos *S. mexicana*, *C. obtusifolia*, *L. guatemalensis*, *A. farnesiana* y *L. styraciflua* inhibieron el crecimiento de *M. smegmatis* a una concentración de 25 µg/ml ( $p=0.0312$ ). Por otro lado los extractos etanólicos *S. mexicana*, *C. obtusifolia*, *L. guatemalensis* y *L. styraciflua*, presentaron una actividad de inhibición leve, no significativa, contra *M. tuberculosis* a una concentración de 100 µg/ml ( $p>0.05$ ).

Con los resultados obtenidos en este estudio, se concluye que los extractos evaluados no presentaron actividad inhibitoria contra *M. tuberculosis* y que *M. smegmatis* no es un buen predictor para evaluar la actividad inhibitoria de *M. tuberculosis*.

## 2. INTRODUCCIÓN

La tuberculosis es una enfermedad que se ha convertido en una pandemia. En 1993 la Organización Mundial de la Salud (OMS) declaró emergencia global a esta enfermedad pues se calcula que aparecen 8 millones de casos nuevos por año y mueren 3 millones de personas por esta causa, debido al incremento en los factores de riesgo y de la virulencia del microorganismo (1). Su agente causal es el *Mycobacterium tuberculosis*. El mecanismo de transmisión es aéreo, ya que una persona contagiada al estornudar expulsa microgotas que contienen el bacilo causante de la enfermedad, originando así el contagio. El diagnóstico de la enfermedad puede realizarse a través de una evaluación clínica, radiológica, microbiológica y por el uso de pruebas especiales. El hacinamiento y el poco acceso de la población a los sistemas de salud impiden un tratamiento eficaz.

En Guatemala, la tuberculosis ha mantenido una tendencia estable, con un leve aumento. Para el período 1992 a 1996 la tasa fue de 26 a 31/100,000 habitantes. La distribución de tuberculosis pulmonar ha mantenido el 90 por ciento en promedio de los casos notificados y con un 10 por ciento para formas extrapulmonares. Los fármacos con mayores niveles de resistencia primaria reportados para Guatemala en el año de 1998 por el Ministerio de Salud Pública fueron la isoniacida y la estreptomycinina, ambos con un 18 por ciento. Estos son los fármacos de elección utilizados para el tratamiento de la tuberculosis por períodos prolongados (2).

La erradicación de la tuberculosis a nivel mundial no ha sido posible debido a la aparición de cepas multiresistentes a los fármacos de elección y al limitado acceso de la población a los mismos. Esta situación crea la necesidad de buscar nuevas alternativas de tratamiento en donde no se presenten estos problemas. La biodiversidad de la flora de Guatemala sugiere que los productos naturales podrían ser un recurso más viable y accesible, que pueden ser utilizados como base para el desarrollo de nuevas drogas para el tratamiento de la tuberculosis (3), disminuyendo el riesgo de provocar los efectos secundarios observados al utilizar los tratamientos farmacológicos actuales.

En el presente estudio se evaluó la actividad contra *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv ATCC 27294 y *Mycobacterium smegmatis* ATCC 607 de cinco extractos etanólicos de plantas nativas guatemaltecas utilizadas popularmente para el tratamiento de infecciones respiratorias.

Tomando en cuenta el peligro que involucra para el investigador trabajar con *M. tuberculosis* se incluyó a *M. smegmatis* con el fin de evaluar la posibilidad de utilizarla en lugar de *M. tuberculosis* en este tipo de ensayo, esto debido que *M. smegmatis* no es patógena al hombre, posee muchas características similares a las de *M. tuberculosis* y es de crecimiento rápido, lo que hace que se reduzca el tiempo de realización del ensayo.

Con los resultados obtenidos en este estudio, se concluye que los extractos evaluados no presentaron actividad inhibitoria contra *M. tuberculosis* y que *M. smegmatis* no es un buen predictor para evaluar la actividad inhibitoria de *M. tuberculosis*.

### 3. ANTECEDENTES

#### 3.1 Género *Mycobacterium*

El género *Mycobacterium* lo conforman bacilos aerobios no espuladores e inmóviles, sin cápsula, de forma recta o ligeramente encorvada, de 0.2 a 0.6  $\mu\text{m}$  de ancho y unos 10  $\mu\text{m}$  de longitud. La pared celular es rica en lípidos, por lo que su superficie es hidrofóbica. Quizás sea esta la razón de su resistencia a muchos desinfectantes y tinciones comunes, coloreándose débilmente con la tinción de Gram. Ya teñidos los bacilos se observan refractarios a la decoloración con soluciones ácidas de ahí su nombre ácido resistentes (4, 5).

##### 3.1.1 Historia del género *Mycobacterium*

El género *Mycobacterium* pertenece a la familia *Mycobacteriaceae*, ubicada dentro del orden de los *Actinomycetales*. También se le asocia al género *Corynebacterium* y *Nocardia*. La historia cronológica de la familia de *Mycobacteriaceae* es la siguiente:

- 1897 Chester propuso la creación de una nueva familia *Mycobacteriaceae* y no incluir en género *Mycobacterium* en la familia *Proactinomycetacea*.
- 1898 Lachner y Sandoval agruparon los géneros *Mycobacterium*, *Corynebacterium* y *Nocardia* en la misma familia.
- 1927 Lehmann y Neumann ubicaron estos tres géneros, en base a sus propiedades tintoriales.
- 1971 Tsukamura describe el género *Gordona* como miembro de la familia *Proactinomycetaceae*.
- 1977 Goodfellow y Alderson incorporaron el género *Rhodococcus* en este grupo taxonómico
- 1988 Collins y colaboradores propusieron el nuevo género *Tsukamurella* basándose en el análisis del ARNr 16S.
- 1992 Vincent y colaboradores describieron los tres criterios utilizados para la

descripción del genero *Mycobacterium*.

1998 Goodfellow en colaboración con Magge han descrito que los actinomicetes que contienen ácidos micólicos en su pared y se dividen en tres familias: *Corynebacteriaceae*, *Mycobacteriaceae* *Nocardiaceae*. En la primera de ellas se incluyen los géneros *Corynebacterium* *Dietzia*, en la segunda *Mycobacterium* y *Gordoniae* y en la tercera los géneros *Nocardia*, *Rhodococcus* y *Tsukamurella*.(6)

### 3.1.2 Criterios para definir el género *Mycobacterium*

Los criterios utilizados son:

3.1.2.1 Acido alcohol resistencia La pared celular de las bacterias, es rica en lípidos lo que le confiere su acido-alcohol-resistencia. Esta se manifiesta por la coloración de Ziehl-Neelsen, que es el método de coloración usado en microscopia para realzar el diagnóstico directo en las muestras clínicas obtenidas de los pacientes. Las micobacterias se colorean con la fucsina fenolada en caliente y resisten la decoloración, a pesar de la acción combinada del alcohol-ácido. Los otros géneros, también pueden presentar ácido-alcohol resistencia, aunque más débil (5).

3.1.2.2 Estructura de los ácidos micólicos: Estos son sintetizados por los organismos de todos los géneros de la familia *Proactinomycetaceae* (*Mycobacteriaceae*). Las micobacterias se caracterizan por contener micolatos de cadena larga, de 60 aminoácidos 90 átomos de carbono (5).

3.1.2.3 Proporción de guanina-citosina del ADN (GC): Para el género *Mycobacterium* los porcentajes en GC están comprendidos entre 61 y 71 % (Anexo 1 tabla 1), salvo en la especie *M. leprae* donde el porcentaje en CG es 54-57 % (5).

### 3.1.3 Clasificación de las especies de Micobacterias

A la fecha se han identificados mas de 60 especies, algunas de ellas parásitos estrictos del hombre y de los animales. *Mycobacterium tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. ulcerans*, *M. leprae*, *M. lepraemurium*, *M. paratuberculosis*, *M. microti*. Otras especies, más numerosas, son saprofitas o patógenos oportunistas del hombre y los

animales. Se clasifican en base a la velocidad de crecimiento, su importancia médica y el riesgo de infección.

#### 3.1.3.1 Según la velocidad de crecimiento:

Las micobacterias se dividen en especies de crecimiento rápido o de crecimiento lento. Son de crecimiento rápido cuando la formación de la colonia visible se produce antes de los 7 días de incubación. La división celular de una especie de crecimiento lento varía entre 13 y 20 horas, mientras que las de crecimiento rápido son de 2 a 5 horas.

Los requisitos de crecimiento de los dos tipos de especies son también diferentes. Todas las micobacterias cultivables, patógenos para el hombre se desarrollan en el medio de Löwenstein-Jensen el cual contienen huevo, glicerina y asparagina como fuentes de carbono y nitrógeno. En los medios que utilizan piruvato como fuente de carbono y nitrógeno, se desarrollan mejor *M. bovis* y algunas cepas de *M. tuberculosis* (6).

#### 3.1.3.2 Según su importancia médica:

3.1.3.2.1 Las principales micobacterias responsables de la tuberculosis en el hombre y en los animales se encuentra constituido por el complejo *M. tuberculosis*: *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti* y *M. tuberculosis*, siendo este último el agente causal de la mayoría de casos de tuberculosis humana. Sin embargo, cualquier especie de este complejo puede causar infección tuberculosa. Por análisis de ADN se ha determinado que las cuatro especies forman parte de un mismo grupo genómico. Pueden diferenciarse con la ayuda de varias pruebas bioquímicas y fisiológicas, así como por su patogenicidad en algunas especies animales (cobayos y conejos), siendo estas las que se describen a continuación (7):

*M. tuberculosis* Es la especie responsable de la tuberculosis humana

*M. bovis* Se diferencia de *M. tuberculosis* por la velocidad de crecimiento y por la patogenicidad en el conejo. Es la responsable de la tuberculosis en los

bovinos y es además patógena para la mayoría de los mamíferos, incluyendo al hombre. Otras especies más afectadas, además de los bovinos, son los caprinos, camélidos, porcinos, felinos y primates no humanos.

*M. africanum* Posee propiedades intermedias entre *M. tuberculosis* y *M. bovis*. Es responsable de tuberculosis tanto en humanos como en bovinos en varias regiones de África.

*M. microti* No es patógeno para el hombre. Es responsable de la tuberculosis en roedores (7).

3.1.3.2.2 Las micobacterias atípicas. Están basadas en caracteres sencillos de observar; tiempo de crecimiento y cromogenicidad. Esta primera clasificación, aunque superada en profundidad y detalle, tienen gran utilidad como guía, en especial para el bacteriólogo clínico y el médico (7).

Las micobacterias atípicas constan de cuatro grupos y no incluyen las especies típicas y las no cultivables, siendo estas características de *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. leprae*, *M. lepraemurium*, *M. microti* y *M. paratuberculosis* (anexo 1 tabla 2)(7).

3.1.3.2.3 Las micobacterias responsables de la lepra en el hombre, en ratas y ratones siendo estas: *M. leprae* y *M. lepraemurium*, respectivamente (7).

3.1.3.2.4 Otra especie de importancia medica es el complejo del *Mycobacterium avium* (conocido comúnmente como MAC, por sus siglas en inglés), que produce una de las infecciones bacterianas más frecuentes en las personas con VIH. El MAC es más frecuente en personas con un recuento de células CD4+ inferior a 50 que tengan también al menos otra infección oportunista (8). En un estudio realizado por Murcia en Colombia, se detectó la presencia del MAC en la sangre del 43% de los participantes dentro de un plazo de dos años a partir de la fecha en que se les había diagnosticado el SIDA (9).

Los microorganismos pertenecientes al complejo MAC, están ampliamente distribuidos en el ambiente, y la exposición a dichos microorganismos es común. Aunque muchas personas son colonizadas de manera temporal por el MAC, la enfermedad por éste es rara. El MAC se adquiere del ambiente y no por transmisión

persona-persona. No se ha definido un reservorio ambiental, pero la enfermedad puede ser adquirida por inhalación o ingestión de los microorganismos, vías que determinan la aparición de enfermedad respiratoria o gastro-intestinal respectivamente, siendo estas entidades previas a la diseminación. En los pacientes con SIDA hay evidencias que indican una adquisición reciente de la infección en los casos de MAC diseminado. Estudios recientes muestran que en algunos casos la colonización del tracto gastrointestinal por *Mycobacterium avium* precede de semanas a meses a su aislamiento en sangre y tejidos. Esta aseveración se ha hecho con base en estudios histopatológicos intestinales que demuestran la presencia de MAC en la mucosa y la submucosa. Como algunos organismos entéricos pueden ser transmitidos mediante relaciones homosexuales, no se descarta este mecanismo en la transmisión de micobacterias no tuberculosas (10).

Los factores de virulencia del MAC no se han determinado por completo, pero se ha demostrado una relación entre la inmunodeficiencia del huésped con la capacidad de desarrollar factores de virulencia, esto se evidencia por la alta capacidad de crecimiento de cepas de MAC aisladas de pacientes con SIDA con respecto a las aisladas en pacientes sanos. La entrada del MAC al torrente sanguíneo posiblemente es la responsable de la fiebre y la sudoración nocturna, principales síntomas de la infección diseminada. El complejo MAC también se ha aislado de materia fecal en casos de diarrea en pacientes VIH positivos (10).

### 3.1.3.3 Según el riesgo de infección:

La Sociedad Europea de Micobacteriología (ESM) ha clasificado a las micobacterias en tres grupos, siendo estas especies nombradas según su grupo de riesgo (anexo 2, tabla 3).

3.1.3.3.1 Grupo I de riesgo: El riesgo de infección es bajo, o raramente son responsables de enfermedad en el adulto, generalmente son clasificadas entre los patógenos raros.

3.1.3.3.2 Grupo II de riesgo: Riesgo moderado, son clasificadas entre los gérmenes patógenos potenciales u oportunistas.

3.1.3.3.3 Grupo III de riesgo: Riesgo de transmisión por vía aérea, la infección puede ser severa y aún causa de muerte. Es de riesgo elevado para el individuo pero moderado para la población.

Estas especies son generalmente clasificadas entre los patógenos estrictos (6).

## 3.2 Enfermedad de la tuberculosis

La tuberculosis es una enfermedad infecciosa siendo el agente causal, en la mayoría de casos el bacilo *Mycobacterium tuberculosis*, perteneciente al género *Mycobacterium*. Dicha micobacteria integra el complejo tuberculosis junto a *M. bovis*, *M. africanum* y *M. microti*, aunque existen otras especies de micobacterias que infectan al hombre las cuales han sido clasificadas en grupos según su riesgo (anexo 2 tabla 3). Si bien comúnmente se presenta como una infección pulmonar, puede afectar muchos tejidos y diseminarse extensamente.

*M. tuberculosis* es de forma bacilar, aerobio estricto, crecimiento lento, resistente al frío, congelación y desecación, sensible al calor, luz solar y luz ultravioleta. Puede permanecer en estado latente durante varios años en condiciones adversas.

Los bacilos se diseminan de la infección primaria pulmonar a otras partes del organismo por medio del flujo sanguíneo y sistema linfático, afectando a otros órganos. La aparición de focos de tuberculosis puede ser atribuida al número creciente de pacientes inmunosuprimidos, principalmente los individuos con SIDA. El reciente resurgimiento a nivel mundial de la tuberculosis, se atribuye a varias causas, que incluyen el abandono de la terapia antimicrobiana, el surgimiento de cepas resistentes a múltiples antibióticos y las limitaciones y dificultades de los métodos diagnósticos (11, 12, 1)

### 3.2.1 Historia de la tuberculosis

La tuberculosis es una enfermedad que ha través de los siglos ha preocupado a la comunidad científica tal como se describe en su orden cronológico:

- 1865 Villemain demuestra que la tuberculosis humana es transmisible por la inoculación a un conejo o a un cobayo.
- 1882 Robert Koch descubre el agente etiológico de la tuberculosis, conocido desde entonces como "bacilo de Koch" y actualmente denominado *M. tuberculosis*.
- 1884 Robert Koch obtiene desarrollo del bacilo sobre suero coagulado.
- 1887 Nocard y Roux muestran que la adición de glicerina al medio de cultivo estimula el crecimiento del bacilo.
- 1889 a 1890 Rivolta y Maffucci con sus estudios condujeron a la identificación del bacilo tuberculoso aviar (actualmente denominado *M. avium*).
- 1891 Robert Koch describe el fenómeno de la respuesta inmune y prepara la primera tuberculina.
- 1902 Dorset pone a punto un medio de cultivo a base de huevo que será mejorado por diversos autores (Lowenstein Jensen, Coletso, Petragani).
- 1902 Theobald Smith descubre el *M. bovis*, agente etiológico de la tuberculosis bovina.
- 1921 Calmette y Guérin obtienen una vacuna antituberculosa: BCG (bacilo de Calmette y Guérin) a partir de una cepa atenuada de *M. bovis*, por sucesivos subcultivos.
- 1944 Waksman descubre la estreptomina, el primer antibiótico activo contra el bacilo de Koch. Otras drogas antituberculosas.
- 1949 Se descubre el ácido para-amino-salicílico o PAS
- 1950 Se descubre el rol patógeno de otras micobacterias "no tuberculosas", mal llamadas atípicas.
- 1952 Se descubre la isoniacida (INH).
- 1967 Se descubre la rifampicina (RPM).
- 1968 Castets y colaboradores descubren y describen el *M. africanum* (6).

### 3.2.2 Formas de tuberculosis

Se han descrito por lo menos 41 especies de micobacterias, pero el 95% de las infecciones humanas son causadas por las seis especies: *M. tuberculosis*, *M. kansasii*, *M. avium-intracellulare*, *M. fortuitum*, *M. chelonae* y *M. leprae*. Entre ellas, la más

importante es la tuberculosis, infección que puede afectar cualquier órgano, aunque generalmente se limita a los pulmones (1, 5, 12).

#### 3.2.2.1 Tuberculosis pulmonar

Se le atribuye el 80% de los casos y se le da mas importancia por ser la única forma de tuberculosis contagiosa. Sus síntomas pueden ser inespecíficos, malestar general, fatiga, pérdida de peso y apetito, tos con una evolución de más de 2 semanas, sudoración nocturna, expectoración productiva a veces sanguinolenta siendo este un síntoma asociado a la tuberculosis cavitada. Un paciente en estas condiciones puede llegar a transmitir la infección de 10-15 personas si no es tratado pero si ha recibido tratamiento en un periodo mayor a las 2 semanas dejan de contagiar a las personas que se encuentran a su alrededor (1, 12).

#### 3.2.2.2 Tuberculosis extra-pulmonar

Los órganos afectados son la pleura, ganglios linfáticos, columna vertebral, articulaciones, tracto genitourinario, sistema nervioso y abdomen. Dichos casos de tuberculosis extra pulmonar rara vez son contagiosos, siendo la forma más grave de tuberculosis (12).

#### 3.2.2.3 Tuberculosis miliar

Sus síntomas son: pérdida de peso, fiebre, tos, linfadenopatía, esplenomegalia, lo que son similares a la fiebre tifoidea o malaria. Las personas desnutridas no suelen presentar síntomas sugestivos. La prueba de tuberculina es negativa en la mayoría de los casos. El diagnóstico suele basarse en la clínica, exámenes radiológicos y lesiones características del ojo (12).

#### 3.2.2.4 Meningitis tuberculosa

Se presentan los siguientes síntomas: fiebre, tos, vómito, cambios de conducta, rigidez de nuca y convulsiones. El diagnóstico se realiza mediante el examen de líquido cefalorraquídeo, pruebas bioquímicas (proteína alta y glucosa baja) y se confirma con un cultivo del líquido cefalorraquídeo (12).

### 3.2.2.5 Tuberculosis infantil

La mayoría de los casos pediátricos suelen ser BK negativos. La infección suele ser consecuencia directa del contacto con un adulto infectado. Los niños mayores de 5 años son los que tienen mayor posibilidad de contraer la enfermedad, la cual se reduce en la pubertad, para luego elevarse en adultos jóvenes y adolescentes (1).

### 3.2.3 Mecanismos de transmisión

El más importante de todos y el que causa los mayores contagios es el aerógeno. Un paciente con tuberculosis al hablar, toser, reír y estornudar elimina en formas de aerosol pequeñas micro gotas cargadas de micobacterias. Dichas micro gotas por su pequeño tamaño pueden progresar a los alvéolos que es el sitio donde la *M. tuberculosis* encuentra condiciones ideales para multiplicarse. El potencial de infectividad depende de varios factores:

3.2.3.1 Grado de la enfermedad, considerándose de alto contagio los enfermos con baciloscopia positiva y portadores de radiografía cavitaria.

3.2.3.2 Frecuencia y severidad con que el paciente tose sin protección.

3.2.3.3 Volumen y característica del esputo, ya que un esputo poco viscoso puede ser un vehículo ideal como aerosol.

3.2.3.4 Tratamiento antituberculoso, siendo menos contagioso cuando los pacientes tienen más de dos semanas recibiendo tratamiento.

3.2.3.5 Cuando hay contacto íntimo y prolongado el riesgo de una infección aumenta (hacinamiento familiar).

### 3.2.4 Factores de riesgo

Hay muchos factores de riesgo que pueden facilitar el desarrollo de la enfermedad e incrementar hasta en 1000 veces la posibilidad de adquirir tuberculosis los

cuales hacen que esta enfermedad sea aun más virulenta de lo que ya es (Anexo 3, tabla 4) (11).

### 3.2.5 Presentación clínica de la tuberculosis

Mientras más temprano se detecte la tuberculosis, mejor serán los resultados para el paciente. Es por ello que el diagnóstico temprano y certero juega un papel principal en el combate de la tuberculosis. Los métodos accesorios al diagnóstico son todos inespecíficos e incluyen manifestaciones clínicas, radiológicas, anatómicas y patológicas. Por lo que se debe realizar un diagnóstico más certero en base a una baciloscopia y/o cultivo, la confirmación del mismo mediante técnicas microbiológicas (13).

#### 3.2.5.1 Sintomatología

En la primera fase de la infección se forman nódulos linfáticos los cuales forman complejos primarios, ocurriendo en cualquier parte del pulmón. La lesión cavitatoria es la característica más relevante de la tuberculosis pulmonar, en esta fase el enfermo de tuberculosis es asintomático. El paciente con tuberculosis presenta síntomas vagos e inespecíficos tales como dolor de cabeza, tos seca ocasional o tos persistente durante 2 semanas o más, expectoración productiva, a veces sanguinolenta, elevación de la temperatura, pérdida de peso, sudor nocturno, anorexia, fatiga, astenia y hemoptisis, posee un síndrome clínico-radiológico similar al de la neumonía bacteriana. Los síntomas de las infecciones pulmonares diseminadas son dolor torácico en pacientes con derrame pleural tuberculoso, ganglios linfáticos aumentados, deformación angular de la columna vertebral en caso de Mal de Pott, disnea progresiva e insuficiencia respiratoria que en casos graves puede llegar a distress respiratorio (4, 13).

Las formas más graves son la tuberculosis miliar cuyos síntomas van desde fiebre, pérdida de peso, tos, linfadenopatía y esplenomegalia, muy similar a la fiebre tifoidea o malaria, hasta meningitis tuberculosa cuyos síntomas son fiebre, tos, vómitos y cambios de conducta, rigidez de nuca y convulsiones.

### 3.2.5.2 Exploración física

Es inespecífica y su aportación al diagnóstico es tal que siempre debe buscarse signos de valor orientativo, los cuales serán:

Sonidos crepitantes en el espacio infraclavicular o en la zona interescápulo-vertebral, en relación con lesiones exudativas y cavitarias.

3.2.5.2.1 Estertores bronquiales uni o bilaterales en las diseminaciones broncogénas.

3.2.5.2.2 Si existe afectación pleural: matidez a la percusión, ausencia o disminución del murmullo vesicular, etc.

3.2.5.2.3 Signos de localización extratorácicas: eritema nodoso, adenopatías y fistulas cervicales y submaxilares, fistulas de ano, afectación osteo-articular, si el enfermo presenta diafonía, practicar laringoscopia.

3.2.5.2.4 En caso de diseminación hematogena, explorar el sistema nervioso central y el fondo del ojo (13).

### 3.2.5.3. Diagnóstico

La prueba de la tuberculina en la mayoría de casos es negativa ya que el diagnóstico se basa en clínica y radiología.

El diagnóstico de meningitis tuberculosa se basa en el examen de líquido cefalorraquídeo, el cual debe cultivarse para confirmar el diagnóstico, la prueba de tuberculina en la mayoría de los casos es positiva y negativa en etapa aguda, la radiografía de tórax puede mostrar ciertas alteraciones (1).

#### 3.2.5.3.1 Microbiológico

##### 3.2.5.3.1.1 Examen microscópico directo y pruebas bioquímicas

Dicha técnica se basa en el alcohol-ácido resistencia de las micobacterias, debido a la capacidad de conservar la coloración por medio de la combinación del

ácido y el alcohol. Esta propiedad caracteriza a todas las micobacterias las cuales denominaremos BAAR (Bacilo Alcohol-Ácido Resistente), por lo que no se puede precisar con certeza si se trata de *Mycobacterium tuberculosis* o de otra micobacteria atípica, pero ante la extrema rareza ocasionada por otras micobacterias atípicas el examen directo es generalmente sinónimo de tuberculosis. Las tinciones de ácido resistencia pueden ser realizadas utilizando carbolfucsina (coloración Ziehl-Neelsen o Kinyoun) o fluorocromos (la auramina O o auramina-rodamina), en la coloración Ziehl-Neelsen la micobacteria se observa de un color rojo-rosado fuerte en el microscopio a un aumento de 100x10, mientras que en la coloración con fluorocromos se observan amarillo o naranja si se utiliza auramina O y si se utiliza rodamina amarillo-rojizos, si se combinan los fluorocromos auramina-rodamina se observan de color negro-verdosos al utilizar permanganato de potasio como colorante de contraste, pudiéndose observar en objetivos de bajo aumento (20, 25 o 40X) (14). Los resultados se informan en una proporción estimada de acuerdo al número de BAAR detectado (Anexo 3, Tabla 5.).

El observar más de 3 muestras no cambia los resultados expuestos. Con la primera muestra se descubre la micobacteria en un 70-80 por ciento, una segunda muestra del mismo paciente le agrega un 15 por ciento más y una tercera un 5 por ciento.

La búsqueda del bacilo de la tuberculosis en el esputo es el recurso central de la pesquisa. Este procedimiento es sencillo, rápido y de bajo costo pero su importancia es tal que debe ser minucioso debido a su importancia diagnóstica y epidemiológica.

La identificación de micobacterias se puede realizar fácilmente empleando métodos bioquímicas (anexo 3, tabla 6), aunque existen otras técnicas cromatograficas pero su costo es más elevado que las pruebas bioquímicas. La identificación de micobacterias solo está indicada en pacientes con mala evolución bacteriológica a pesar de recibir tratamiento inicial, sin embargo el impacto considerable del SIDA hace que otras micobacterias aumente ligeramente por lo que la identificación puede ser justificada en aquellos enfermos considerados tuberculosis con cultivo positivo.

### 3.2.5.3.1.2 Cultivo de *Mycobacterium tuberculosis*

El cultivo sigue siendo el método de referencia para el diagnóstico de la tuberculosis, puesto que la recuperación del microorganismo a través del cultivo es esencial estableciendo así un diagnóstico definitivo de la enfermedad (15). Dicha técnica es mucho más sensible que los métodos tradicionales de diagnóstico (tinción de acido resistencia directa de la muestra, radioscopia y serología) sin embargo, la sensibilidad del cultivo no es total, puesto que muchas micobacterias pueden no ser liberadas del material proteico por el agente mucolítico y otras pueden morir debido a la acción del agente decontaminante por lo que estos factores no favorecen este método como diagnóstico (16). Con el cultivo se puede detectar una cantidad tan pequeña de 10 bacilos/ml de material digerido y concentrado, siendo valido para la evaluación de un enfermo y su respectivo tratamiento. A pesar de sus limitaciones se considera este método como el estándar de oro del diagnostico y seguimiento de la tuberculosis para su posterior tratamiento aunque como todo método tienen sus ventajas y desventajas siendo éstas:

#### - Ventajas:

- Los cultivos son mucho más sensibles que la baciloscopia, examen clínico, radiológico.
- Permite asegurar con certeza la negativización y curación del paciente.
- Permite una identificación exacta de la bacteria así como medir pruebas de susceptibilidad a drogas (17, 18).

#### - Desventajas:

- La lenta capacidad de crecimiento de *M. tuberculosis*, pues se tienen resultados en un aproximado de 4-6 semanas en medios sólidos, lo que no favorece al diagnóstico temprano del paciente.
- Su costo es muy elevado y se necesitan medios específicos para realizarlos, además de personal capacitado.

- Solo un 50 % de las muestras clínicas presentan crecimiento debido a la acción del agente decontaminante por lo que se necesitan por lo menos 3 cultivos por paciente y lograr así un mejor resultado.

Los métodos de cultivos efectuados en medio sólido a base de huevo coagulado (Löwenstein-Jensen, Coletsos, etc.) o el agar 7H10 y 7H11 de Middlebrok siendo el agar Löwenstein-Jensen el indicado como rutina ya que es muy económico a comparación de los demás.

Antes de proceder al cultivo es necesaria la homogenización-decontaminación de las muestras que no fueron colectadas estérilmente por que existen muchas bacterias que no son de interés en el estudio que puedan interferir con el mismo, por lo tanto este procedimiento es muy importante para poder obtener un buen resultado. Se tienen que tener en cuenta dos criterios importantes, el decontaminar demasiado y el decontaminar en forma insuficiente en ambos casos ocasionarían resultados no deseados y se perdería el valor de la muestra, la cual es de sumo interés.

Es necesario poder cultivar la mayor cantidad de muestra posible. Los medios de cultivo sólidos son muy adecuados en especial aquellos que contiene huevo, glicerina y aspargina o medios gelatinosos que contienen suero o albúmina lo cual permite un buen cultivo. El medio Löwenstein-Jensen, es sensible, costo bajo, conservación a +4°C y de corta duración. El crecimiento de las colonias de *M. tuberculosis* tienen un crecimiento en forma minúscula, redondeadas, con superficie lisa y tinte blanquecino, tomando un aspecto seco, verrugoso, y el color del medio vira de verde a crema-beige, pudiendo alcanzar de 5-10 mm de diámetro. Un buen desarrollo de las colonias no se produce sino hasta que la hidratación y la aireación de los cultivos son satisfactorias. En medios secos las colonias no se desarrollan o pierden su morfología característica, en medios mal aireados se desarrollan en forma pequeña, aplanadas, superficie lisa y pueden parecerse a *M. africanum* *M. bovis*. La temperatura adecuada de crecimiento es a 37°C y la temperatura es mayor la micobacteria muere. Un cultivo puede considerarse negativo cuando han transcurrido más de 3 meses en incubación y no hay crecimiento alguno. Algunas micobacterias, relacionadas con el SIDA como lo son: *M. hamophilum*, *M. malmoense*, *M. genavense*, y *M. avium subs. paratuberculosis*, se les enriquece el cultivo con factores especiales como la hemina sangre, micobactina o citrato amoniaco

férrico y la incubación debe tener una atmósfera enriquecida con 5-10 por ciento de CO<sub>2</sub> esto también favorece al crecimiento de *M. tuberculosis* (1, 13, 17).

#### 3.2.5.3.1.3 El método radiométrico (sistema BACTEC)

Los medios de cultivos bifásicos (MB-Septi-Check) y hemocultivos (técnica de aislamiento de micobacteria en sangre), son en la actualidad métodos más sensibles y de corta duración. En el caso del Bactec permite la realización de un Antibiograma de 5-8 días y el crecimiento de cultivo de 12-21 días, por lo que una prueba de sensibilidad por este método se tienen el resultado en menos de un mes mientras que los medios sólidos solo el crecimiento es de 3 meses y con antibiograma será de 4-5 meses que se obtendrán resultados (13).

#### 3.2.5.3.1.4 El método de proporción o dilución

La actual metodología de referencia o estándar de oro para la detección de susceptibilidad a los medicamentos es el método de las proporciones múltiples diseñado en 1961. 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 creciendo en el control con diluciones adecuadas del inóculo y también en el medio conteniendo droga y la micobacteria. Como este método no utiliza una cepa estándar de comparación se establece el porcentaje de colonias que se desarrollan en presencia de una concentración estándar establecida para cada droga en comparación con un cultivo de microorganismo del paciente que no contiene la droga en cuestión y que se considera el 100 por ciento. Se estima que existe resistencia bacteriana si el desarrollo de colonias es mayor de 1 por ciento o del 10 por ciento con respecto al cultivo sin la droga (18, 19).

#### 3.2.5.3.1.5 El método colorimétrico MTT (bromuro de 3-[4.5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazolio)

Fue introducido por Mosmann en 1983, el cual es un bioensayo que es utilizado en una variedad de experimentos determinando la viabilidad del estado de los metabolitos en la célula. Está basado en el cambio de color en la reducción amarilla de la sal de tetrazolio (MTT) en un color azul formado por las enzimas mitocondriales en

las células de la micobacteria. Este método posee una gran sensibilidad con un límite de detección de  $7 \times 10^4$  unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/ml). Este método es fácil de reproducir obteniéndose resultados en 48 horas comparadas con el método tradicional los cuales dan resultados en 3 semanas. La viabilidad de la micobacteria es detectada con un detector de ELISA una absorbancia de 570 nm. Los resultados obtenidos en varios experimentos indican una gran aplicación de este método para detectar sensibilidad de drogas utilizando micobacterias con un alto nivel de reproducibilidad (20-23).

#### 3.2.5.3.1.6 Prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La técnica de PCR ha sido una de las mas estudiadas para el diagnóstico rápido y efectivo en la detección de *M. tuberculosis* lo cual representa una gran ventaja con respecto a todos los métodos tradicionales para la detección de la enfermedad de la tuberculosis.

En la técnica de PCR el ácido desoxirribonucleico (ADN) o el ácido ribonucleico (ARN) del microorganismo es extraído a partir de una muestra clínica, amplificado e identificado por distintos métodos. La sensibilidad de la técnica por PCR puede ser afectada por varios factores tales como: el proceso de extracción de ADN, los parámetros de amplificación (temperatura, tiempo y número de ciclos) y el método empleado para detectar e identificar el producto de la amplificación. De la misma forma, la especificidad del PCR es determinada por los cebadores utilizados.

Algunos estudios han demostrado que la especificidad y sensibilidad de la PCR en muestras respiratorias es altamente sensible, encontrándose en una sensibilidad de 90 a 100% en muestras con baciloscopía positiva y cultivo negativo, resultado de gran utilidad para el diagnóstico temprano de tuberculosis en muestras respiratorias con baciloscopía negativa y cultivo positivo con una sensibilidad del 61 a 77%. La especificidad en muestra de esputo es de 94.0% y la sensibilidad es de 90.4%. La PCR es negativa para micobacterias no tuberculosas, por lo que es sumamente específico para el complejo *M. tuberculosis* (15, 24-29).

### 3.2.5.3.2. Radiografía

El diagnóstico por medio de radiografía no es fiable, ya que es sensible pero no es específica, así pues aun cuando existan lesiones radiológicas sugestivas de tuberculosis y una clínica compatible además de una epidemiología favorable, nunca se debe admitir el diagnóstico de esta enfermedad con un simple examen radiológico, pues dichas imágenes no permiten afirmar el diagnóstico y sólo es un indicativo de un examen microscópico diferencial. Así pues son en múltiples ocasiones que el diagnóstico con un simple examen radiológico da como resultados enfermos de tuberculosis que no lo son y otros que si padecen de la enfermedad no se les diagnostica. Sin embargo, hay que reconocer que la tuberculosis pulmonar la principal sospecha diagnostica se fundamenta en un examen radiológico (13)

### 3.2.5.3.3 Serología

Las pruebas basadas en la reacción antígeno-anticuerpo se han evaluado para el serodiagnóstico de tuberculosis, ya sea ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA) o inmunocromatográficos. Varios ensayos detectan anticuerpos (IgG, IgM o IgA) contra antígenos purificados o recombinantes de *M. tuberculosis*. Estas pruebas son fáciles de utilizar, brindando resultado en poco tiempo, no suelen ser específicos pues presentan reactividad con micobacterias no tuberculosas, pero pueden ayudar a establecer el diagnóstico general del paciente y sus condiciones físicas para recibir un buen tratamiento (30). En una infección crónica suele haber anemia normocítica normocrómica intensa. El conteo de glóbulos blancos suele ser normal, observándose una leucocitosis intensa en caso de una infección bacteriana diseminada. La velocidad de eritrosedimentación en la mayoría de los casos se encuentra elevada, una hematuria o piuria son indicios de una tuberculosis renal o algún tipo de daño renal por lo que es importante prestar atención a este síntoma por la administración de quimioterapia.

En la tuberculosis crónica el valor de sodio sérico se encuentran bajos por la retención de líquidos y la secreción inadecuada de hormona antidiurética (4)

#### 3.2.5.3.4 Prueba de tuberculina

La prueba de tuberculina puede ser de gran ayuda sobre todo en el diagnóstico de tuberculosis activa en niños, donde la prevalencia de infectados es baja y el paciente con prueba de tuberculina positiva y clínica con sospecha de tuberculosis es muy probable de padecer dicha enfermedad y en pacientes infectados que pertenecen a los colectivos de alto riesgo de contraer tuberculosis (guarderías, cárceles, internados, paciente inmunodeprimidos, etc.), aunque existen ocasiones en que dicha prueba puede dar falsos negativos tal como lo describe la tabla 7 (1, 12)

La prueba de tuberculina se hace por la técnica de Mantoux, la cual consiste en la inyección intradérmica de 0.1 ml de tuberculina PPD RT-23 (2 UT), en la cara anterior del antebrazo, lejos de venas y piel con lesiones. La lectura debe hacerse a las 72 horas. La prueba es positiva cuando se forma una induración cuyo diámetro es mayor a 5 mm o más, si dicha induración excede los 15 mm de diámetro hay probabilidad de que se deba a una infección por tuberculosis. Las posibles causas de falsos negativos (anexo 4, tabla 7), tomándose dos opciones si la prueba de tuberculina es negativa, siendo éstas:

3.2.5.3.4.1 Con antecedentes de BCG en menores de 55 años se aceptará el resultado como negativo, como sujeto no infectado; y en mayores 55-65 años se repetirá la prueba dentro de 7-10 días y se aceptará el resultado.

3.2.5.3.4.2 Con antecedentes de vacunación con BCG sin tener en cuenta la edad se repetirá la prueba dentro de 7-10 días aceptando el resultado de esta segunda prueba.

3.2.5.3.5. La clasificación y diagnóstico de tuberculosis en adultos y niños

Dicha clasificación es implementada por la Asociación Torácico Americana, el Centro de Control de Enfermedades y la Sociedad de Enfermedades Infecciosas, esta se realiza en diferentes grados:

0. No tuberculosis, expectoración, no infectado.
1. Tuberculosis con expectoración, no evidente de infección.

2. Tuberculosis latente de infección, no enfermedad.
3. Tuberculosis clínica activa.
4. Tuberculosis, no clínica activa.
5. Tuberculosis (31).

### 3.2.6 Tratamiento

El objetivo primordial del tratamiento es lograr la curación de los enfermos, disminuir la transmisión de la tuberculosis y evitar la selección de bacilos resistentes a los medicamentos (1).

El tratamiento se fundamenta en dos bases bacteriológicas, la asociación de fármacos para evitar la selección de resistencias y la necesidad de tratamiento prolongado para poder matar a todos los bacilos en sus diferentes fases de crecimiento.

Dichas bases fueron razonadas en la década de los 70, y se han ampliado en la asociación de fármacos para prevenir la aparición de resistencia y la necesidad de mantener la quimioterapia durante largo tiempo para evitar un nuevo contagio o un nuevo repunte en la enfermedad (29).

3.2.6.1 De acuerdo a criterios epidemiológicos, se ha definido los enfermos que deben ser tratados con prioridad:

3.2.6.1.1 Casos con esputo positivo, que son las fuentes de infección.

3.2.6.1.2. Casos con esputo negativo pero con cultivo positivo por ser fuentes potenciales de infección.

3.2.6.1.3 Formas agudas, diseminadas y meningitis

3.2.6.1.4 Tuberculosis infantil.

3.2.6.1.5 Casos de tuberculosis en personas con SIDA

3.2.6.2 El tratamiento de la tuberculosis esta basado en la quimioterapia de corta duración, y las condiciones de aplicación son las siguientes:

3.2.6.2.1 Utilizar una asociación apropiada de 3 o 4 medicamentos antituberculosos potentes para prevenir la aparición de resistencia de estos fármacos.

3.2.6.2.2 Prescribir la dosis adecuada al paciente.

3.2.6.2.3 Tomar regularmente los medicamentos por parte de los pacientes, durante un período prudente de manera que se prevenga una recaída.

3.2.6.2.4 Administrar el medicamento bajo estricta supervisión del personal sanitario (1)

Los fármacos antituberculosos de primera elección a pesar de ser bien tolerados pueden presentar efectos secundarios o reacciones adversas, las que pueden ser graves e incluso, en casos muy excepcionales pueden producir la muerte.

Todos los fármacos deben ser administrados en una dosis única y simultánea, para facilitar la adherencia, mejorar su eficacia y proporcionar una mejor tolerancia, debiendo tomar muy en cuenta los efectos secundarios que estos pueden provocar al paciente (anexo 5, tabla 8). La única excepción a esta regla lo constituye la asociación del R y PAS, los cuales se administran a un intervalo de 8-11 horas (32).

Después de muchos estudios realizados se llegó a la conclusión que la duración ideal de tratamiento a un paciente con frote positivo es de 6 meses. En el caso de pacientes con frotis negativo pero cultivo positivo, son necesarios 5-6 meses y para pacientes con frote negativo y cultivo negativo 4-5 meses (33). Se debe tomar en cuenta los efectos secundarios que tiene este tipo de tratamiento.

Ningún paciente debe pasar a otra fase si no ha negativizado su esputo, en cuyo caso la fase inicial deberá prolongarse por un mes más.

Los medicamentos orales deben ser administrados en una sola toma, deben ser tomados bajo supervisión directa del personal de salud. La rifampicina nunca se debe

entregar al paciente para tomarla en su casa. Se ha recomendado un régimen de quimioterapia para tratamientos (anexo 6, tabla 9) (1).

### 3.2.6.3 Tratamiento antituberculoso en ocasiones especiales

3.2.6.3.1 En mujeres embarazadas. Todos los medicamentos antituberculosos se pueden usar con seguridad a excepción de la estreptomicina, por su toxicidad y por su capacidad de atravesar la placenta. En caso la paciente necesite tratamiento debe ser enviada a un centro de referencia.

3.2.6.3.2 Lactancia materna. Los fármacos utilizados en el tratamiento de tuberculosis tienen la característica de encontrarse a bajas concentraciones en la leche materna sin producir toxicidad al lactante. Estos fármacos presentes en la leche materna no sirven de tratamiento preventivo contra la tuberculosis. La estreptomicina no es recomendada en periodos de lactancia ya que es muy tóxica por lo que se debe evitar su uso, en aquellos casos donde no es posible evitar su administración deben usarse dosis menores (1, 34).

3.2.6.3.3 Las mujeres que toman anticonceptivos orales. La rifampicina reduce el efecto de los anticonceptivos orales, por lo que debe seguirse otro método para control de la natalidad, en caso debiera utilizar la píldora la dosis de estrógenos debe ser inferior a los 50 mg. (1).

3.2.6.3.4 Los pacientes con función renal dañada pueden ser tratados con seguridad, administrando isoniacida, rifampicina y pirazinamida, en dosis normal. La estreptomicina debe evitarse ya que puede ser nefrotóxica, el esquema mas seguro es 2HRZ/6HR (34).

3.2.6.3.5 Paciente con problemas hepáticos. Las principales drogas antituberculosas pueden ser hepatotóxicas, por lo que es importante controlar la función hepática. En situaciones de insuficiencia hepática severa no debe administrarse isoniacida y pirazinamida y se recomienda seguir con el régimen 2RSE/10R<sub>2</sub>E<sub>2</sub>. En pacientes alcohólicos se puede seguir el esquema básico HRZE y debe evitar el consumo de alcohol (1,34).

3.2.6.3.6 Pacientes con diabetes. La rifampicina puede interactuar con las drogas antidiabéticas orales, por lo que hay que realizar pruebas periódicas de glucosa en sangre.

3.2.6.3.7 Pacientes con VIH. Se recomienda estudiar la serología para el VIH cuando sea posible y el enfermo lo acepte. Cuando un paciente es VIH (+) y BK (+), deben realizarse cultivos para la identificación de posibles micobacterias atípicas. Un enfermo con VIH positivo puede presentar mala absorción por enfermedad de la mucosa gastrointestinal, diarrea infecciosa, hipo o aclorhidria, intolerancia a la lactosa, insuficiencia pancreática y atrofia de la mucosa secundaria a malnutrición calórico-proteica, por lo que es recomendable administrar el tratamiento antituberculoso una hora antes que los antiácidos. Dicha mala absorción puede afectar a algunos medicamentos antituberculosos como lo son la rifampicina y etambutol pero la pirazinamida y la isoniacina se absorben bien en este tipo de pacientes, aunque su absorción se reduce en presencia de diarrea (1, 32,34)

#### 3.2.6.4 Tratamiento ambulatorio u hospitalización

El hogar, es el lugar ideal para el tratamiento, aunque este no reúne las condiciones ambientales adecuadas debido a la relación familiar con el enfermo. El aislamiento del enfermo no garantiza un contagio familiar, porque este pudo ocurrir antes del descubrimiento de la enfermedad. El éxito del tratamiento no depende del ambiente ni el reposo o dieta, sino la calidad de la quimioterapia.

Las indicaciones de hospitalización son:

3.2.6.4.1 Enfermos en estado general de salud crítico, considerados como pacientes en enfermedad terminal.

3.2.6.4.2 Complicaciones: Hemoptisis severas, neumotórax espontáneo.

3.2.6.4.3 Asociaciones patológicas: Insuficiencia cardíaca y hepato-renal.

3.2.6.4.4 Tuberculosis diseminada.

- 3.2.6.4.5 Fracaso de tratamiento ambulatorio.
  
- 3.2.6.4.6 Tuberculosis multiresistente: Especialmente aquellos a rifampicina y la isoniacida, pueden requerir el empleo de medicamentos de reserva o segunda línea, los cuales son muy caros. En Guatemala, solo se tienen acceso en el Sanatorio antituberculoso San Vicente en la ciudad de Guatemala y el Hospital Rodolfo Robles de Quetzaltenango.
  
- 3.2.6.4.7 Pacientes con reacciones tóxicas mayores.
  
- 3.2.6.4.8 Indicaciones sociales: pacientes sin condiciones de hogar o supervisión de tratamiento.
  
- 3.2.6.5. Factores que pueden reducir el éxito del tratamiento.
  - 3.2.6.5.1 Abandono del tratamiento por parte del paciente.
  - 3.2.6.5.2 Deficiencia en la referencia y contrarreferencia del paciente
  - 3.2.6.5.3 Diagnóstico en etapas tardías.
  - 3.2.6.5.4 Errores por parte del personal de salud, en cuanto a dosificación, supervisión de tratamiento y esquemas médicos.
  - 3.2.6.5.5 Resistencia bacteriana a los medicamentos antituberculosos.
  - 3.2.6.5.6 Desabastecimiento de los medicamentos antituberculosos.
  - 3.2.6.5.7 Efectos secundarios.
  - 3.2.6.5.8 Falla de información y orientación al paciente.

3.2.6.5.9 Paciente tuberculoso que contrajo alguna enfermedad nosocomial o es acompañado de otro tipo de enfermedades (diabetes, VIH, etc.), que no han sido tratadas (1).

### 3.2.7 Pronóstico

Se pueden observar los resultados del tratamiento después de 2 a 3 semanas mediante una radiografía de tórax, frote de esputo y cultivo, posterior a la recuperación clínica. El pronóstico es bueno si la tuberculosis se diagnostica a tiempo y si se sigue el tratamiento (32). En el pronóstico se pueden observar las siguientes situaciones:

3.2.7.1 Curación: paciente Con baciloscopía positiva al inicio y que completa el tratamiento. Baciloscopías de esputo negativas en por lo menos dos ocasiones, una de ellas al concluir el tratamiento.

3.2.7.2 Tratamiento completo: Baciloscopía positiva con tratamiento concluido, baciloscopía negativa al final del tratamiento inicial sin examen de esputo al final del tratamiento o una baciloscopía negativa en la fase de continuación y ninguna al final del tratamiento, paciente con baciloscopía negativa que recibió un ciclo completo de tratamiento.

3.2.7.3 Fallecido: Paciente que falleció durante el tratamiento independientemente de la causa.

3.2.7.4 Fracaso terapéutico: Paciente que continúa con baciloscopía positiva cuatro meses o más después de haber comenzado el tratamiento y que es confirmado con cultivo positivo.

3.2.7.5 Abandono: Paciente que a dejado de tratarse durante un mes o más.

3.2.7.6 Transferido del programa: Paciente que ha sido transferido a otra unidad y cuyos resultados se desconocen.

### 3.2.8 Epidemiología

Según la OMS, la tuberculosis ha sido en el año 2000 la octava causa de muerte a escala mundial. Lejos de controlarse, se estima que entre 2002 y 2020 aproximadamente 1,000 millones de personas se infectarán, alrededor de 150 millones enfermarán y 36 millones morirán por esta causa (35). Se estima que en el año 2000 se diagnosticaron 8,3 millones de nuevos casos de tuberculosis en el mundo, 137 nuevos casos por cada 100 mil habitantes. La incidencia de tuberculosis fue especialmente alta en los países del África subsahariana (más de 290 por 100 mil habitantes) con un incremento anual del 6 por ciento. Un 9 por ciento de todos los casos de tuberculosis en adultos se pueden atribuir directamente a la infección por VIH, aunque este porcentaje varía en los diferentes países, siendo mucho mayor en África subsahariana, donde se supone que el 31 por ciento de los casos de tuberculosis se relaciona directamente con la infección VIH y en países como EE.UU., donde un 26 por ciento de las tuberculosis son por el VIH. En el año 2000 fallecieron 1,8 millones de personas a causa de la tuberculosis, de las cuales el 12 por ciento se pueden atribuir al VIH. La tuberculosis fue la causa de la muerte en un 11 por ciento de todos los pacientes con SIDA (36)

La tuberculosis pulmonar representa un promedio del 90 por ciento de los casos notificados y para otras formas extrapulmonares el 10 por ciento. El porcentaje de tuberculosis pulmonar en menores de 10 años ha aumentado de un 6 por ciento a un 17 por ciento en el periodo 1992-96, lo que indica un alto grado de transmisión entre la población. La distribución de acuerdo al sexo no ha variado y se mantienen en 52 por ciento en hombres y 48 por ciento en mujeres (1)

En Guatemala, la tuberculosis ha presentado un leve aumento. Para el periodo 1992-96 la tasa fue de 26-32/100,000 habitantes. En 1998 en el departamento de Zacapa se realizó un estudio cuyo resultado indica que los 1,100 pacientes con tuberculosis viven en hacinamiento. En la población estudiada existe relación entre el padecimiento de tuberculosis pulmonar y la existencia de anticuerpos anti-VIH (37). Todos estos datos nos indican que en Guatemala la situación con respecto a la tuberculosis es grave y se ha observado un aumento en casos infantiles y adultos jóvenes. En el año 2001 el Ministerio de Salud Pública y Asistencia social reportó una disminución de la incidencia de tuberculosis del 39 por ciento con relación al año anterior, determinando

como zonas de mayor riesgo los departamentos de Escuintla, Retalhuleu, Suchitepéquez, Petén, Izabal y Quetzaltenango. La mayor parte de los casos de tuberculosis pulmonar se reporto en personas comprendidas entre los 20 a 39 años de edad y mayores de 60 años (38).

En 1998 se observó una tendencia elevada de resistencia a los fármacos Isoniacida y Estreptomicina ambos con un 18 por ciento, siendo estos los fármacos de elección primaria para el tratamiento de la tuberculosis (2).

La detección de casos y por lo tanto el diagnóstico mas precoz, constituye, potencialmente, un medio eficaz para lograr disminuir el riesgo de infección.

Al parecer la clave de la lucha contra la tuberculosis no es, como se había pensado, el intentar reducir la incidencia de esta enfermedad, sino disminuir el riesgo de infección y que, para este fin la quimioterapia es mucho más eficaz que la vacunación. En pocas palabras la curación de un individuo equivale a la prevención de varios. Los tratamientos eficaces disponibles brindan un medio más rápido de eliminar la tuberculosis (39).

### **3.3 MEDICINA TRADICIONAL**

#### **3.3.1 Fitoterapia**

Fitoterapia es el uso de diferentes partes de una planta para el tratamiento de enfermedades. Pueden utilizarse diferentes partes de una planta por que sus componentes actúan de forma sinérgica (40).

#### **3.3.2 Etnobotánica**

Es la ciencia que estudia el uso popular de la flora de una región particular (41). Seis disciplinas contribuyen a este estudio siendo estas: botánica, etnofarmacología, antropología, ecología, economía y lingüística (42).

### 3.3.2.1 Etnobotánica médica

Es el estudio del uso medicinal de la flora de una región, ecosistema o de un grupo botánico determinado (41). Comprende la colecta y documentación del uso de las plantas que curan así como de las prácticas medicinales, agrícolas y holísticas involucradas, se basa en varias disciplinas tales como la antropología, agronomía, ecología y medicina (43).

Los datos antropológicos son los que se refieren a prácticas culturales, mágico-religiosas, mitos y leyendas relacionadas con las plantas. Incluye propiedades medicinales atribuidas, método de preparación, dosificación, eficacia, contraindicaciones y las características geográficas e históricas de la región. Los datos botánicos se refieren a su clasificación, cuando sea necesaria, estudio y determinación de las partes de la planta utilizados en la curación de enfermedades y la recopilación de información bibliográfica e *in situ* sobre las plantas medicinales utilizadas por un grupo humano dado. Los datos ecológicos se refieren a aspectos como el registro, ordenamiento e interpretación de datos sobre el comportamiento de factores bióticos (flora, fauna) y abióticos (suelo, clima) del área donde una determinada planta crece. Los datos agronómicos, dentro de los que se mencionan: recopilación de la información, métodos de selección de material de propagación, cultivo, cosecha, preparación de la post-cosecha, almacenamiento y comercialización (43).

### 3.3.3 Medicina natural para el tratamiento de la tuberculosis

El apareamiento de cepas multiresistentes al tratamiento que actualmente se utiliza, así como la infección del VIH como un potente factor de riesgo, la pobreza, el mal uso de los antibióticos y sus efectos secundarios, han obligado a la comunidad científica a buscar otras alternativas de tratamiento. Entre ellas la medicina natural, tal como los demuestran los siguientes estudios.

#### 3.3.3.1 Estudios realizados a nivel mundial

Sall y cols. 1996, evaluaron los extractos etanólicos *Arctotis auriculata* Jacq. y *Helichrysum crispum* por el método radiométrico a una concentración mínima de 0.5 mg/ml encontrando actividad contra *M. smegmatis* en ambos extractos (44).

Lall y cols. 1999 en el departamento de Botánica de la Universidad de Pretoria evaluaron a los extractos etanólicos de las plantas *Corton pseudopulchellus*, *Ekebergia capensis*, *Euclea natalensis*, *Nidorella anomala*, *Chenopidium ambrosoides*, *Helichrysum melanacme* *Polygala myrtifolia* encontrándose actividad contra *M. tuberculosis* por el método radiométrico a una concentración mínima de 0.5 mg/ml contra la cepa H37Rv en los ocho extractos a la misma concentración (45)

Newton Sandra y cols. 2000 realizaron en Hong Kong un estudio bibliográfico recopilando literatura por más de 20 años de especies de plantas con un gran potencial como agentes antituberculosos, utilizando varias combinaciones desde la medicina tradicional china a la medicina tradicional de la India donde se destacan la importancia de los productos naturales al servicio de la medicina como una alternativa para el tratamiento contra la tuberculosis. Ejemplo de estas especies con actividad antituberculosa se incluyen *Allium sativum*, *Borrchia frutescens*, *Férula communis*, *Heracleum maximum* (46).

En 2001, Lall y cols estudiaron el extracto etanólico de la planta *Helichrysum caespititium* encontrándose actividad contra *M. tuberculosis* por medio del método de agar planta presentando actividad a una concentración mínima inhibitoria de 0.5 mg/ml (47).

Posteriormente en el mismo año Lall y cols estudiaron el extracto etanólico de la planta *Euclea natalensis* encontrándole actividad inhibitoria contra *M. tuberculosis* a una concentración mínima inhibitoria de 100 mg/ml (48).

Jiménez A. y cols 2002 realizaron un estudio en el hospital Pediatrico de México con extractos etanólicos, acuosos, diclometano de plantas propias de la región siendo estas: *Artemisia ludoviciana*, *Chamaedora tepejilote*, *Lantana hispida*, *Juniperus communis* y *Malva parviflora* encontrándose actividad contra *M. tuberculosis* siendo *Lantana hispida* que presentó mejor actividad a una concentración de 0.65 mg/ml (49).

En 2002 Stavri y cols realizaron un estudio en el Instituto de Farmacognosia en Austria evaluando la planta *Peucedanum ostruthium*. Utilizaron el método de Soxhlet para obtener el extracto, el cual fue evaluado a una concentración de 3.4 a 107.4 µg/ml, en cuyo rango establecieron la concentración mínima inhibitoria sin especificar con exactitud (50).

Stavri M. y cols 2003 en el Centro de Farmacognosia y Fitoterapia de Londres, evaluaron el extracto de la planta *Ducrosia anethifolia*, por medio del método de Soxhlet encontrando actividad contra *M. smegmatis* a un rango de concentración mínima inhibitoria de 64-128 µg/ml (51).

Okunade y cols. en el año 2004 realizaron un estudio en la Universidad de Washington con extractos etanólicos y acuosos de las plantas: *Clausena excavata*, *Psoralea corylifolia*, *Cryptolepis sanguinolenta*, *Sanguinaria canadensis*, *Cleistopholis patens*, *Cananga odorata*, *Haplopappus sonoriensis*, *Lysirotus pauciflorus*, *Peucedanum ostrethium*, *Glycyrrhiza inflata*, *Xanthocyparis nootkatensis*, *Cortón kongensis*, *Sapium indicum*, *Morinda citrifolia*, *Colubrina retusa*, *Physalis angulata*, *Ardisia japónica*, *Combretum molle* demostrando *in vitro* su actividad en todos los extractos contra *M. tuberculosis* a un rango de concentración de 54 a 124 µg/ml (52).

### 3.3.3.2 Estudios realizados en Guatemala

En 1992 Manrique realizó el primer estudio en Guatemala, evaluando los extractos etanólicos de las plantas: *Eucalyptus globulus*, *Archillea millefolium*, *Nasturtium officinale*, *Rumex crispus*, *Acacia farnesiana* y *Sida acuta* en muestras de *M. tuberculosis* aisladas de muestras de pacientes del Hospital nacional San Juan de Dios utilizando el método de proporción o dilución a una concentración de 400 mg/ml de los 6 extractos etanólicos con resultados no específicos, recomendándose validar dicho estudio con otros métodos (18, 19, 53).

Figuerola L., 2000 realizó un estudio en el Departamento de Citohistología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia donde se descubrió que los extractos etanólicos de las plantas *Sida acuta*, *Piper auritum*, *Ocimum micranthum*, *Enterolobium cyclocarpum*, *Stachytarpheta cayennensis* presentaron actividad contra *M. tuberculosis*

y *M. smegmatis* por el método de proporción o dilución a una concentración de 2mg/ml (18, 19, 54).

Mazariegos A. y cols 2004 determinaron en el Departamento de Citohistología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia la actividad antimicobacteriana de 6 extractos etanólicos contra *M. smegmatis* y *M. tuberculosis* produciendo inhibición las plantas *Quercus crispifolia* y *Enterolobium cyclocarpum* a una concentración de 25 y 50 µg/ml. (55).

### **3.4. Monografía de las plantas a usar en el estudio**

Guatemala posee una gran variedad de plantas utilizadas como un tratamiento alternativo a las enfermedades que comúnmente afectan a la población, por lo que se seleccionaron cinco plantas en base a reportes de uso medicinal para el tratamiento de afecciones respiratorias por la población guatemalteca y de reportes de uso antibactericida, siendo estas las que a continuación describiremos en la siguiente monografía.

#### 3.4.1. *Sambucus mexicana* Presl. Familia: *Caprifoliaceae*

##### 3.4.1.1. Otros nombres científicos

*Sambucus bipinnata* Schlechetendal & Cham; *Sambucus simpsonii* Rehocr

##### 3.4.1.2. Nombres comunes

Sáuco, alcanfor, flor de saúco, guanco, sauce, saúco chico, saúco grande, cauzo, tapiro. Chiapas: *Chilté, chiki té, chijil té ( tzeltal/tzotzil), sikil anjel (tzotzil), anshiomel, chihilté, chijilte, coyapa, ocoquihui*. En Quezaltenango: *Sauco extranjero*; Alta Verapaz: *sacatsun*; Huehuetenango: *bahmán*; Suchitepequez *Izolokquen*; Quiche: *Tzoloj, tzolojche, tzolojque* (56).

#### 3.4.1.3. Descripción botánica y ecológica

Árbol pequeño, arbolito o arbusto de 2-6 m. de altura, tronco de 30 cm. de ancho o grosor, tallos grises con medula blanca y suave, hojas divididas en 5-7 hojitas con borde en forma de diente, de 30 cm. de largo, las terminales el doble de largo que las laterales, folículos sin pedúnculo, lanceolado, elípticos, 3-10 cm. inflorescencia corimbiforme, ancho 6-20 cm., fruto púrpura o negro, redondos, jugosos, de 5-8 mm. de diámetro, flores blancas, fragantes, agrupadas en la parte terminal de la planta.

Nativo de México y Centro América, habita en clima cálido, semiárido y templado, nivel del mar 800 m. de 1800-3000 msnm., se cultiva ampliamente en varias partes de Sur América y el Caribe, asociada a bosques tropicales caducifolio, subcaducifolio, subperennifolio y perennifolio, bosques espinosos, matorral serófilo, así con bosque mesófilo de montaña, de encino, de pino y mixto encino-pino. En Guatemala es cultivada como cerco vivo en casi todas las altitudes (57, 58).

#### 3.4.1.4. Historia

Según los registros, Francisco Hernández en el siglo XVI utilizó el saúco para uso medicinal. Posteriormente se utilizó en el siglo XVII por Francisco Ximenes donde menciona que quita el dolor por causa del clima cálido y otras propiedades medicinales. En el siglo XVIII Juan de Esteyneffer relata su uso para “el tullimiento, muelas picadas, campanilla caída, hidropesía, hinchazón de testículos y caspa”. Posteriormente en el siglo XX, Alfonso Herrera refiere que “tiene ligeras virtudes medicinales, por lo que es usada poco en prácticas domésticas”. Paúl Stanley reconoce botánicamente su uso medicinal para el dolor de cabeza. Maximino Martínez, reconoce su utilidad como antiinflamatorio, antitusígeno, diaforético. Luís Cabrera, la refiere como catártica, diurética, para el fortalecimiento físico en el embarazo, gástrico febril e intoxicación alimenticia. La Sociedad Farmacéutica de México la describe como diaforética y estimulante (57).

#### 3.4.1.5 Composición química

Su fruto es rico en taninos, las hojas, flores y raíces en glucósidos cianogenéticos (sambunigrina) (59, 60). Las hojas contienen alcaloides, ácidos orgánicos, proteínas, azúcares, resinas, taninos, ceras, mucílago y aceite esencial. El fruto contiene ácido vibúrnico, aceite volátil, tiroxina; las flores contienen 0.23 % de aceite esencial y glucósidos (60).

#### 3.4.1.6 Usos populares y propiedades

Utilizado como diurético, estimulante y sudorífico, recomendado para catarro y resfrío, utilizado como laxante, para bajar la presión, bajar la calentura, tos, gripe y problemas visuales (61, 62).

#### 3.4.1.7 Farmacología

La actividad antibacteriana *in vitro* demuestra que las hojas tienen cierta actividad contra enterobacterias, pero no contra bacterias causales de infecciones de la piel y vías respiratorias, inhibe en un 70 % *Salmonella typhi* y en un 10 % *S. aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*.

La decocción de la corteza tiene actividad diurética en ratas sin elevar la excreción de sodio ni potasio, aumentando la excreción de ácido úrico y disminuyendo los niveles sanguíneos (63).

#### 3.4.1.8. Toxicología

Se considera tóxica para el ganado vacuno pero no para las cabras.

### 3.4.2. *Cecropia obtusifolia* Bertol. Familia *Moracea*

#### 3.4.2.1. Otros nombre científicos

*Cecropia schiedeana* Klotzsch; *Cecropia mexicana* Hemsley.

#### 3.4.2.2. Nombres comunes

En Costa Rica, *Guarumo*; En Guatemala, Cobán, *Guarumbo*, *Pacl*, *Choop*; En Baja Verapaz, *Xobín* (64).

#### 3.4.2.3. Descripción botánica y ecológica

Árbol de rápido crecimiento, de 20-22 m. de altura, mide 30 cm. de diámetro, ramas gruesas y resistentes alargadas, blanquecinas o glabras. Hojas en forma de mano grandes, con jugo lechoso. Flores separadas por una masa de pelos blancos. Fruto carnoso.

Especie originaria de América tropical, habita en climas cálido, semiárido y templado, nivel del mar 1300-1500 m. Se encuentra en Petén, Alta Verapaz, Baja Verapaz, Quetzaltenango, San Marcos, Izabal, Santa Rosa, Escuintla, Suchitepéquez, Chimaltenango Huehuetenango, sur de México y Honduras hasta Panamá (62, 63).

#### 3.4.2.4. Historia

Maximino Martínez, en el siglo XX, lo describe para uso antidiabético y otros padecimientos.

#### 3.4.2.5 Composición Química

Contiene esteroides y taninos del grupo pirogalol. Saponinas, ambaina, soluble en agua y etanol insoluble en éter y cloroformo. Azúcares como ramnosa, glucosa, xilosa, 5-(etxi)-metil furfural como producto de hidrólisis de las hojas. Se aisló estigmasterol, 4-etil-5-(n-3-valeroil)-6-hexahidrocumarina, 1-(2-metil-1-nonen-8-il)-aziridina y beta-sitosterol (58).

#### 3.4.2.6. Usos populares y propiedades

Como antitusivo, antidiabético, afecciones nerviosas, antipirético, afecciones cardiacas, hepáticas y pulmonares, asma resfriado común, diurético, para heridas,

fracturas de hueso, mal de orín, riñones, mal de sambito, elimina verrugas, presión arterial, como cataplasma, para pérdida de peso, efecto hipotenso, para uso de dolor de estómago y cólicos (66).

#### 3.4.2.7. Farmacología

El extracto acuoso de hojas, produce disminución del nivel de azúcar sanguíneo e incrementa la concentración de triglicéridos. El extracto tiene actividad antibacterial sobre *S. pneumoniae* pero no *S. pyogenes*.

#### 3.4.2.8. Toxicidad

En experimentación con ratas provocó taquicardia a razón de 10 mg/Kg vía intravenosa (58).

### 3.4.3. *Acacia farnesiana* L. Willd. Familia *Leguminosa*.

#### 3.4.3.1. Otros nombres científicos

*Mimosa farnesiana* L; *Vachellia farnesiana* Wright; *Acacia acicularis* Willd.

#### 3.4.3.2. Nombres comunes

Espino blanco, espino, espino ruco, subín, aramo, clavito, cachito de aramo, comezuela, cuntich, cashaw, espinal, hiuzache (67).

#### 3.4.3.3. Descripción botánica y ecológica

Árbol de 5-8 m. de altura, tallo liso, ramificado con espinas blancas o blanquecinas de 1-5 cm. de largo. Hojas pequeñas pinnadas de 2-6 pares dando la apariencia de plumas. Flores amarillas fragantes en pequeñas cabezas. Fruto con vainas, pueden estar solos o agrupados, puntas alargadas y redondas, semillas en forma de riñón de color pardo-amarillo.

Se extiende desde México, América Central hasta Chile y Argentina. Originaria de los trópicos y subtrópicos de América. Habita en clima cálido, semicalido y templado, hasta 2000 m sobre el nivel del mar. Crece silvestre a orillas del camino, ríos o riachuelos.

#### 3.4.3.4. Historia

En el siglo XVI el Códice Florentino, relata su uso para enfermedades de la cabeza. En el siglo XX, Maximino Martínez lo registra como antidisentérico, antihistamínico, astringente y para tratar la dispepsia.

#### 3.4.3.5. Composición química

En sus hojas se detectó, esteroides, colesterol, estigmasterol y beta- sitosterol, isoquinolinico tiramina camferol. En sus flores se detectó componentes fenilicos anizaldehido, alcohol y aldehído benzoico, p-cresol, ester metilico del ácido salicílico y eugenol. En el fruto, flavonoides, glucosido y galoil-glucósido de camferol. La semilla, aminoácidos raros, ácido djenkílico, acetilglutamil y acetilsulfoxido, ácido piperónico y su derivado 4-hidroxilado (68)

#### 3.4.3.6. Usos populares y propiedades

Contra jaqueca, antidisentérico, antiespasmódico, astringente y contra la dispepsia, dolor de cabeza, antiinflamatorio, tifoidea, bazo crecido, inflamación de la garganta, nubes de los ojos, empacho, fuego de la boca, contra la tuberculosis, abre el apetito, cura el dolor de estomago, hemorragias vaginales (69).

#### 3.4.3.7. Farmacología

Presenta actividad antiinflamatoria en edema de la pata en roedores, inducida por carragenina e histamina, actividad vasodilatadora. Actividad relajante de músculo liso y potenciadora de barbitúricos. Actividad cardiotonica, potenciadora de barbitúricos. Las semillas presentaron actividad inhibidora de tripsina (58).

#### 3.4.3.8. Toxicidad

Se manifiesta solamente a concentraciones de 500 ppm, pudiendo producir delirio y llegar a la muerte. Es un temible veneno a altas dosis (68).

3.4.4. *Litsea guatemalensis* Mez. *Litsea glaucescens* HBK. Familia *Lauraceae* muestra voucher # 298, Herbario CEMAT-FARMAYA.

#### 3.4.4.1. Otros nombres científicos

*L. acuminatissima lundell*, *L. matudai Lunell*, *Tetranthera glaucescens* var. *subsolitaria* Meisen.

#### 3.4.4.2. Nombres comunes

Laurel, aguarel, laurelillo, sufricalla, Zit-zuch.

#### 3.4.4.3. Descripción botánica y ecológica

Árbol de 3-12 m de alto, densamente ramoso, hojas coriáceas, pecíolos de 18 mm. de largo, lanceoladas, de 5-9 flores unisexuales, amarillas, fruto en drupa de color negro, 7-9 mm. de diámetro, rodeado por una cúpula.

Es endémico de Guatemala, crece en terrenos húmedos o secos, laderas y bosques de pino-encino, de 1500-3500 msnm. Se ha descrito en Chimaltenango, Jalapa, Baja y Alta Verapaz, Chiquimula, Huehuetenango, Jutiapa, Quetzaltenango, San Marcos y Zacapa (69, 70).

#### 3.4.4.4. Historia

Este es un género del cual se han descrito más de 100 especies de las cuales 12 se han reportado en América. En Guatemala se han descrito tres especies nativas las cuales se denominaran indistintamente como Laurel (*L. glaucescens*, *L. neesiana* (Schauer) Hemsl. y *L. guatemalensis*) (69, 70). Sus hojas despiden un olor parecido al

del Laurel europeo (*Laurus nobilis* L.), atribuyéndoseles propiedades medicinales y culinarios similares.

El Laurel europeo es utilizado como planta medicinal, como especie culinaria y en justas olímpicas utilizadas como coronas dadas a los ganadores de dichas justas, por los griegos y romas.

En 1790 Hernández la menciona con el nombre de náhuatl Ecapátli o medicina del viento describiendo sus propiedades medicinales

#### 3.4.4.5. Composición química

En el tamizaje se logró determinar alcaloides no cuaternarios, alcaloides cuaternarios, saponinas, esteroides insaturados, cardenolidos, bufadienólicos, flavonoides, leucoantocianinas, taninos y polifenoles, quercitina, estilbina, taraxon, aceite esencial el cual contiene limoneno y citral (71).

100 g de hojas frescas contienen: 39 calorías, 8 g de agua, 13.7 g de proteínas, 7 g de grasa, 66.4 g carbohidratos, 23.7 g de fibra, 4.9 g ceniza, 803 mg. de calcio, 114 mg de fósforo, 15 mg de hierro, 8300 mg de carotenos, 0.1 mg de tiamina, 0.65 mg de riboflavina y 2.5 mg de niacina (72).

#### 3.4.4.6. Uso popular y propiedades

Se utiliza como condimento en sopas, guisos y repostería. En la industria se utiliza en aceite etéreo en cerveza y salchichas. En medicina para el tratamiento de infecciones respiratorias, para desinflamar, carencia de leche en las madres, enfermedades gastrointestinales, recuperación post-parto, se utiliza en baños para cansancio, úlceras, piernas hinchadas y epilepsia, como diurético, emoliente, febrífuga antiséptico (70).

#### 3.4.4.7. Farmacología

Posee actividad moderada antifúngica, actividad insecticida contra hormigas, la presencia del aceite limoneno inhibe la biosíntesis de la prostaglandina.

#### 3.4.4.8. Toxicidad

No es tóxica para los humanos, pero por sus propiedades como insecticida pueden causar ciertos daños leves.

#### 3.4.5 *Liquindambar styraciflua* L.

##### 3.4.5.1. Otros nombre científicos

*Lantana alba* Mill; *Lantana geminata* (HBK) Spreng; *Lantana lavandulacea* Willd; *Lantana lippoides* Hook & Arn; *Lantana mollissima* Desf; *Lippia asperifolia* A.Rich; *Lippia citrata* Cham; *Lippia crenata* Sessé & Moc; *Lippia geminata* HBK; *Lippia havannensis* Turcz; *Lippia panamensis* Turcz; *Verbena globiflora* L'Her; *Verbena odorata* (Pers.) Steud; *Zapania Globiflora* (L'Her) Willd; *Zapania lantanoides* Lam; *Zapania odorata* Pers.; *Zapania odoratissima* Scop (72).

##### 3.4.5.2. Nombres comunes

Salvia sija, Juanilama, Mastranto, Salvia Santa, Aguardiente de España, anís de España, contradolor, flor de España, hierba tapón, hinojo de anís, menta americana, menta criolla, menta haitiana, poleo, quita dolor, salvia americana, toronjil americano, toronjil de España, toronjil isleño, hierbabuena americana (73, 74)

##### 3.4.5.3. Descripción botánica y ecológica

Arbusto aromático 1-2 m. de altura, ramas largas, densas, hojas opuestas, oblongas de 2-8 cm. de largo, flores tubulares, 4-5 mm. de largo, ovadas, con pequeños tallitos, con espinas con corola lila pálido, púrpura o blanco con púrpura.

Nativa de América, Se encuentra de México hasta Sur de América y el Caribe en laderas, a orillas del camino y rivera de ríos, a una altura de 1800 msnm. Se adapta a diferentes climas encontrándose en clima cálido seco, húmedo y templado. Crece en bosques húmedos subtropical, templado, seco subtropical, bosque húmedo montano bajo subtropical y bosque húmedo subtropical cálido (75). En Guatemala se describe en Alta Verapaz, Chimaltenango, Chiquimula, Escuintla, Guatemala, Huehuetenango, Sacatepéquez y Sololá (76).

#### 3.4.5.4. Historia

Se le cultiva desde tiempos de la colonia como planta ornamental, esto debido a su forma y su aroma. A principios de siglo XX se le conocen sus propiedades culinarias y medicinales (76).

#### 3.4.5.5. Composición química

El tamizaje físico químico describe alcaloides, derivados diterpenicos, taninos, aceite esencial, resinas, aceite volátil (1.2%) compuesto de geraniol (34.1%), neral (23%),  $\beta$ -cariofileno (6%), metilheptenona (5.8%), citronetal (5.2%), borneol (2.6%), oxido de ceriofileno (2.5%), allo-aromadendreno (2.4%), germacreno D (2%), nerol (1.6%), linalool (1.1%), citronelal (0.7%), limoneno (0.4%), isobutirato de granilo (0.4%), cubeol (0.3%), trans-ocimeno (0.2%), butirato de geranilo (0.2%), eugenol (0.2%), y copaeno (.1%) (76).

#### 3.4.5.6. Uso popular y propiedades

Afecciones gastrointestinales (cólico, diarrea, dispepsia, estomatitis, flatulencia, nausea, vómitos), enfermedades hepáticas y respiratorias (congestión respiratoria, asma, catarro, laringitis, resfrío, tos) insomnio, enfermedades venéreas, dermatomucosas, flujo vaginal, artritis, dolores musculares, dolor de dientes, hipertensión, atención al parto, inducir el sueño, antiséptica, emenagogo, espasmolítica, estomacica, expectorante, febrífuga, pectoral, sudorífica, promueve la concepción, mareos y mal de aire (55, 60).

#### 3.4.5.7. Farmacología

La decocción de la planta ejerce una actividad relajante, también se comprobó actividad hipotensora a una dosis vía intravenosa de 50 mg/Kg, no presenta actividad citotóxica en cultivo de células humanas de carcinoma 9KB, actividad antibiótica contra el hongo *Candida albicans* y *Drechstera oryzae*, *Fusarium moniliforme*, y contra las bacterias *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumonie*, *Streptococcus pyogenes* y *Salmonella typhi*. El tratamiento oral de 12.5 g de planta desecada por Kg. de infusión fue efectiva en la prevención de ulcera inducida por etanol (55, 73, 76).

#### 3.4.5.8. Toxicidad

La infusión de hojas y flores a razón de 67 g/kg no produjo mortalidad en ratones (77).

#### 4. JUSTIFICACIÓN

En Guatemala como en otros países en desarrollo, existe un alto índice de morbilidad por tuberculosis. La mayoría de la población enferma es de escasos recursos económicos por lo que la adquisición de medicamentos resulta casi imposible. Esta condición asociada a una deficiente alimentación, un sistema de salud cada vez más deteriorado y al incremento de pacientes con VIH/SIDA, ha hecho que la tuberculosis adquiera carácter reemergente y que el tratamiento sea de importancia vital. Muchas de las cepas de *M. tuberculosis* circulantes en la población presentan multirresistencia a los medicamentos de elección, lo que se atribuye a muchos factores, principalmente al uso incorrecto de los antibióticos, el tratamiento no supervisado así como los escasos resultados de programas de control con esquemas de quimioterapia estándares (57). Por otro lado, el hacinamiento y el poco acceso de la población al sistema de salud impiden un tratamiento eficaz, situación que nos obliga a buscar alternativas de tratamiento o prevención para controlar la expansión de dicha enfermedad.

Las especies vegetales son consideradas fuente de fármacos o precursores, reportándose algunos medicamentos a base de hierbas que han sido reconocidos por sus propiedades contra enfermedades respiratorias. Desde cualquier punto de vista las plantas medicinales y su estudio representan un aspecto importante a nivel nacional, valorándose la importancia de la medicina indígena y tradicional, la cual es una opción y el tratamiento para la población de escasos recursos económicos.

En Guatemala se han realizado muy pocos estudios sobre la actividad micobactericida de especies vegetales reportadas por su uso tradicional en enfermedades respiratorias. Estos estudios se realizaron utilizando el método de proporciones o diluciones (18, 19) así como aislamientos clínicos de *M. tuberculosis* no caracterizados, lo cual ha sido una desventaja para su evaluación, además que el método de proporciones o diluciones requiere de bastante tiempo para su medir su efecto. Por lo anterior se consideró necesario establecer en el Departamento de Citohistología el uso de un método mas rápido, cuyos resultados pudiesen ser reproducidos con facilidad y confiabilidad tal como sucede con el método bioquímico colorimétrico MTT (bromuro de 3-[4.5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazolio) y utilizando cepas estándar (ATCC).

Se utilizó *Mycobacterium smegmatis*, con el fin de evaluar la posibilidad de utilizarla como un sustituto de *M. tuberculosis* en los ensayos, lo cual será de mucha utilidad en futuras investigaciones, ya que reduce el tiempo de realización del ensayo, es una bacteria no patógena al hombre, es de crecimiento rápido y presenta la ventaja de poseer muchas características similares a las de *Mycobacterium tuberculosis*.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo general

Establecer la actividad inhibitoria de los extractos de cinco plantas nativas de Guatemala que son popularmente usadas para el tratamiento de infecciones respiratorias.

### 5.2 Objetivos específicos

5.2.1. Determinar la concentración inhibitoria mínima contra *M. smegmatis* y *M. tuberculosis* de los extractos etanólicos de las plantas *Sambucus mexicana*, *Cecropia obtusifolia*, *Acacia farnesiana*, *Litsea guatemalensis*, *Liquidambar styraciflua*, las cuales han sido utilizadas tradicionalmente por la población guatemalteca contra enfermedades respiratorias

5.2.2 Comparar la actividad inhibitoria de *M. smegmatis* como patrón en la evaluación de la actividad inhibitoria de *M. tuberculosis* mediante la evaluación de los extractos etanólicos de las plantas *Sambucus mexicana*, *Cecropia obtusifolia*, *Acacia farnesiana*, *Litsea guatemalensis*, *Liquidambar styraciflua*.

5.2.3. Establecer el uso del método de MTT utilizando cepas ATCC de *M. tuberculosis* y *M. smegmatis* en el Departamento de Citohistología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.

## 6. HIPÓTESIS

Por lo menos uno de los extractos etanólicos de las cinco plantas a evaluar posee actividad inhibitoria contra *Mycobacterium smegmatis* y *Mycobacterium tuberculosis*.

## **7. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **7.1 Universo de trabajo**

Plantas nativas de Guatemala utilizadas por la población guatemalteca para el tratamiento de enfermedades respiratorias.

#### 7.1.1 Muestra

Cinco especies vegetales nativas de Guatemala las cuales son: *Sambucus mexicana* (Sauco), *Cecropia obtusifolia* (Guarumo), *Acacia farnesiana* (Subin), *Litsea guatemalensis* (Laurel), *Liquidambar styraciflua* (Liquidambar).

### **7.2 Recursos**

#### 7.2.1 Humanos

Investigador:

Br. Marco Vinicio García Sarán

Asesores:

MSc. Vivian Matta

Lic. Armando Cáceres

#### 7.2.2 Institucionales

Departamento de Citohistología.

Laboratorio de Productos Farmacéuticos FARMAYA.

Laboratorio Nacional, Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social, Guatemala

Laboratorio de tuberculosis, Hospital General San Juan de Dios.

Centro de Investigación Biomédica del Noreste del Instituto Mexicano del Seguro Social (CIBIN-IMSS) Monterrey Nuevo León (NL) México.

Universidad de Salamanca España.

### **7.3 Físicos**

### 7.3.1 Equipo

- Balanza analítica Mettler AE 200 y Mettler PM 600
- Autoclave OMRON Miny Manual Timer STMW Y222
- Campana de flujo laminar bacteriológica Labconco Purifies Class II Biosafety Cabinet
- Incubadora Fisher Scientific Isotemp Incubador 37 °C
- Refrigeradora de 4-8°C ADMIRAL dualtemp y Fisher Scientific isotemp, de
- -80 °C
- Vortex Thermolyne Maxi Mix II 27600
- Microscopio Olympus MAX B 201
- Mechero Buncen
- Equipo de Rotavapor BÜCHI Flawil 461 Brinkmann Precision
- Desecadora Nugerite Nalgel Sibron corporation

### 7.3.2. Reactivos

- Etanol 70 %
- Etanol 90 %
- Fenol 5 %
- NaOH 0.5 M y 0.3 M
- Silica gel
- Hipoclorito de sodio 10 mg/l
- Amortiguador de Fosfato (PBS)
- MTT (bromuro de 3-[4.5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazolio) 5 mg/ml
- Glucosa 98.0 % Merck K 1.08337.0250
- NaCl 98.= %
- Medio Middlebrok 7H9 + OADC. Marca DIFCO
- Glicerol 92.09 % marca Sigma lote 122H0173
- Tween 80 al 20 %

- H<sub>2</sub>O desmineralizada estéril
- Ácido Oleico
- Dimetil Sulfoxido (DMSO)
- Medio Löwenstein-Jensen Agar

### 7.3.3 Materiales

- Asa de nicromo en argolla
- Mascarilla de seguridad 3M
- Guantes de látex
- Bata blanca de manga larga
- Lentes de seguridad
- Jabón desinfectante
- Papel mayordomo
- Pipetas de vidrio de 5 ml, 1 ml y 10 ml
- Bulbos pequeños
- Placa de 96 pozos Cell Wells de 6.4 mm polystyrene
- Microfiltro Minisart sortorius de 25 µm
- Probetas de 25 ml y 100 ml
- Pipetas automáticas de 2-1000 µl
- Pipetas multicanales automáticas 2-1000 µl
- Tips amarillos de 10-200 µl
- Espátula pequeña
- Erlenmeyer de 1000 ml
- Beakers de 250 y 1000 ml
- Fósforos
- Tubos de vidrio de fondo plano y con tapadera de rosca de 15 ml
- Percolador de vidrio o acero inoxidable
- Algodón
- Papel filtro
- Vaso de precipitar
- Cedazo de 3 mm 0 5 mm
- Tijeras

- Bandejas de recolección
- Balón de 1000 ml
- Caja de Petri de vidrio
- Marcador permanentes punta mediana color negro
- Cinta adhesiva
- Viales o frascos pequeños para almacenar el extracto
- cinta testigo

## **7.4. Procedimiento**

### 7.4.1. Selección de plantas

Se seleccionaron 5 plantas nativas de Guatemala, cuya actividad micobactericida contra *M. tuberculosis* *M. smegmatis* no había sido estudiada en cepas ATCC, las cuales se escogieron bajo el siguiente criterio:

- Tener reportes de uso medicinal para el tratamiento de afecciones respiratorias por la población guatemalteca.
- Tener reportes de actividad y de uso popular como antibacterianas.

### 7.4.2. Procedimiento de obtención de extractos etanólicos por extracción continúa por percolación:

- Se tamizaron las hojas con cedazo para tener un material más pequeño y se molió el material ya seco. En caso de tamizar la corteza o raíz se utilizó las tijeras para hacer pedazos pequeños, esto con el fin de tener una mejor extracción.
- En un percolador previamente limpio y seco, se colocó un poco de algodón no muy grande de manera que sirviera de filtro en la parte inferior y papel filtro cortado en forma de embudo de acuerdo al diámetro del percolador.
- Se pesó la cantidad de material vegetal a utilizar y de acuerdo al tamaño del percolador.
- Se rotuló el percolador con el nombre científico de la planta, nombre común, fecha, peso, parte utilizada de la planta y disolvente utilizado.
- Se humedeció el material vegetal con el disolvente adecuado para la extracción, utilizando un vaso de precipitar.

- Se transfirió todo el material al percolador y se agregó etanol al 95%, siendo este el disolvente adecuado para la extracción del material vegetal, hasta cubrir el material vegetal. Se chequeó que no quedaran burbujas y si las hubiera, se hizo presión con una espátula para destruirlas.
- Se dejó reposar el tiempo necesario para llevar a cabo la extracción, esto dependió del material vegetal (18-48 horas).
- Se abrió la llave de la parte inferior y se dejó gotear el líquido a una velocidad adecuada.
- Se recogió el líquido en un erlenmeyer, luego se añadió suficiente disolvente extra, según se requiriera, hasta obtener el volumen de disolvente agregado al inicio.
- Se presionó fuertemente el material sólido que quedó y se añadió el líquido obtenido al percolador. (1:5, 1:8 o 1:10) (78-82, 84)

#### 7.4.3. Procedimiento de concentración utilizando el rotavapor:

- Se colocó el balón colector y se fijó con la llave respectiva.
- Se revisó el nivel del agua del baño de calentamiento.
- Se engrasaron todas las bocas esmeriladas y se armó el rotavapor según instructivo específico.
- Se verificó que todas las conexiones eléctricas y mangueras se conectaran.
- Se encendió el baño y se mantuvo a la temperatura de 40 a 50 °C, dependiendo del equipo, puede haber pérdida de 10-20 °C entre el baño de calentamiento y el interior del balón de evaporación, en todo caso el balón de evaporación no debe tener una temperatura mayor de 40 °C.
- Se revisó que la llave de alimentación del refrigerante estuviese cerrada.
- Se colocó el balón con la muestra y se sujetó el vástago con la llave correspondiente.
- Se encendió el botón que permite girar el balón que contiene la muestra a una revolución adecuada.
- Se conectó el sistema de enfriamiento o por lo menos de circulación de agua del chorro fría.
- Se encendió la bomba de vacío durante el tiempo necesario para iniciar la destilación.

- Luego se apagó la bomba de vacío ya iniciada la destilación,
- Se encendió la bomba de vacío cuantas veces fuera necesario y se hubiera agotado el disolvente del balón de evaporación o ya no destilara ningún líquido, lo que querrá decir que el vacío de la bomba no es suficiente para evaporar la mezcla de disolventes contenida en el balón de evaporación.
- Se inició la destilación del extracto con recuperación del disolvente hasta obtener una consistencia semisólida.
- Se vertió el extracto concentrado en una caja de Petri de vidrio debidamente tarada y rotulada.
- Se colocó en una desecadora durante 7-15 días y se movió cada 2 días para lograr una desecación homogénea.
- El extracto se trasvasó a viales tarados y rotulados, teniendo una consistencia sólida.
- Se calculó el rendimiento del extracto y se guardó en viales o recipientes herméticos a 4 °C (78-84)

#### 7.4.4 Ensayo de actividad micobactericida

##### 7.4.4.1 Preparación de reactivos

- Se preparó el extracto de la planta disolviendo 0.04 g del extracto en 4 ml de DMSO obteniendo así una concentración final 10 mg/ml.
- Se preparó el suplemento de Ruth: 1.70 g de glucosa + 0.42 g de NaCl + 2.5 ml (Ac. oleico + NaOH 0.5 M.) + 50 ml H<sub>2</sub>O destilada estéril.
- Se preparó el Medio Middlebrok 7H9 + OADC con 500 ml H<sub>2</sub>O desmineralizada estéril + 2.61 g del Medio + 1 ml de glicerol.
- Rifampicina: se realizó a una concentración de 10 mg/ml con DMSO. Siendo este el control positivo para nuestro estudio.
- Solución de MTT: 3 mg de reactivo + 5 ml de H<sub>2</sub>O desmineralizada estéril.
- Tween 80: Se preparó a una solución de Tween 80 al 20% en agua destilada.
- Solución reveladora: 1800 µl de MTT + 2160 µl de Tween 80. (85)

#### 7.4.4.2 Realización del reto:

- ▣ Se depositaron
  - 200 µl de H<sub>2</sub>O destilada estéril en todos los pocillos de la periférica de la placa.
  - 100 µl del medio Middlebrok 7H9 + OADC a los 60 pocillos restantes.
  - 100 µl de la dilución de trabajo de cada extracto y la droga en los pocillos de la fila B.
- ▣ Se realizaron diluciones dobles seriadas hasta la fila G descartando los 100 µl finales.
- ▣ Se colocaron 100 µl del inóculo en todos los pocillos con excepción de los pocillos marcados como CM (control de esterilidad del medio) y C1/100 (dilución 1:100 del inóculo).
- ▣ En los pocillos marcados como CM se colocaron 100 µl mas de medio Middlebrok 7H9 + OADC.
- ▣ En los pocillos marcados como C1/100 se colocaron 98 µl mas de medio Middlebrok 7H9 + OADC y 2 µl del inóculo.
- ▣ Se incubó la placa a 37 °C en cámara húmeda hasta 5 días para *M. smegmatis* y 7 días para *M. tuberculosis* (anexo 7) (85).

#### 7.4.4.3 Modificación a la metodología:

Para cada micobacteria en estudio, se realizaron cinco repeticiones del ensayo con el objeto de disminuir los errores sistemáticos ( $p \geq 0.5$ ). Las plantas en estudio se numeraron de la siguiente forma: 1-*S. mexicana*, 2-*C. obtusifolia*, 3-*A. farnesiana*, 4-*L. guatemalensis*, 5-*L. styraciflua*. Se numeraron las placas de 1 a 5 colocándose en la placa 1 la planta 1 en el pozo 2B, planta 2 en el pozo 2C, etc. En la placa 2 se colocó la planta 5 en el pozo 2B, la planta 1 en el pozo 2C, planta 2 en el pozo 2D, etc. Con ello se evitó la introducción de un error aleatorio y se dió mayor validez al ensayo. En la misma placa se determinó la concentración mínima inhibitoria para ambas micobacterias.

Los extractos que mostraron actividad inhibitoria contra *M. tuberculosis* en este estudio, fueron enviados para su confirmación al Centro de Investigación Biomédica

del Noreste del Instituto Mexicano del Seguro Social (CIBIN-IMSS) de Monterrey NL México, institución que utiliza de rutina el método colorimétrico, el que fue utilizado para la comparación de la presente investigación y además coordina el Programa Iberoamericano Antituberculosis bajo la Cooperación Iberoamericana Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (PIBATUB-CYTED), dicho instituto ha realizado estudios sobre 620 productos naturales y 170 productos sintéticos con el fin de encontrar un medicamento contra la tuberculosis, mismos que han sido publicados en la revista de la Facultad de Salud Pública y Nutrición de la Universidad Autónoma de Nuevo León México (Respyn) (84).

#### 7.4.4.4 Revelado de la Placa:

Después de los días de incubación se añadió 10 µl de MTT 5 mg/ml + 12 µl de Tween 80 al 20 % a cada pozo y se incubó la placa 24 horas más. Al formar precipitado violeta, se añadió 50 µl de la mezcla de SDS 20 % -DMF 50 %. Una vez que se produjo el cambio de color en el pocillo control, se leyeron los resultados en los pocillos con los extractos (85).

#### 7.4.4.5. Lectura e interpretación de resultados:

Se realizó de manera visual, definiéndose la concentración mínima inhibitoria (CMI) como la menor concentración del extracto donde ocurrió el cambio de color. Se tomó como control positivo la rifampicina la cual dio un color rojizo-ladrillo y como control negativo, el medio sin inocular, donde no hubo acción inhibitoria y el inóculo de la bacteria tubo crecimiento sin ningún antibiótico cuya intensidad fue igual o menor a un color azul siendo este el control negativo (86).

### 7.5. Diseño estadístico

#### 7.5.1 Tipo de estudio

Experimental. Diseño a conveniencia. La determinación y detección de concentración de los extractos de las plantas que presentaron actividad micobactericida se basó en el cambio de color a partir de una concentración de 1 mg/ml. Se realizaron

diluciones de 0.5-0.125 mg/ml. Cuando se obtuvo un resultado positivo se realizaron diluciones a partir de 0.5 a 0.125  $\mu\text{g/ml}$  y se determinó la CMI. De acuerdo a la tabla de la función de distribución acumulada de la probabilidad binomial, el número mínimo de réplicas para cada caso debe ser 5 para un nivel  $\alpha = 0.05$ .

#### 7.5.2 Variables

- Variable independiente. Plantas nativas de Guatemala
- Variable dependiente. Actividad micobactericida de los extractos etanólicos de las plantas seleccionadas.

#### 7.5.3 Validez del estudio.

El ensayo se realizó con cepas *M. tuberculosis* H37Rv ATCC 27294 y *M. smegmatis* ATCC 607.

Se utilizó como control positivo el medio de cultivo con Rifampicina (medicamento de elección contra la enfermedad de la tuberculosis) a una concentración de 1 mg/ml, el cual presenta un 100 % de inhibición del crecimiento de las cepas y como control negativo medio de cultivo sin ningún aditivo, donde habrá un crecimiento normal de las micobacterias. Se realizaron cinco repeticiones de cada ensayo.

El método bioquímico colorimétrico de MTT utiliza indicadores de oxidoreducción con una sensibilidad del 100 % y una especificidad de 95 % y una correlación del 93.7 % (87-92).

#### 7.5.4 Análisis de datos

Se realizó una prueba de hipótesis binomial donde:

$H_0: p \leq 0.5$  (No tiene efecto)

$H_a: p \geq 0.5$  (Si tiene efecto)

Para disminuir el porcentaje de error se realizaron cinco repeticiones y para concluir que el extracto tiene efecto debieron presentar los mismos resultados positivos

o negativos en la totalidad de las repeticiones de los ensayos para obtener el nivel  $\alpha=0.05$  seleccionado. Los resultados obtenidos fueron interpretados, tabulados y analizados de acuerdo a los parámetros anteriormente descritos.

## 8. RESULTADOS

### 8.1. Resultados del ensayo.

#### 8.1.1 Análisis físico-químico

El análisis físico-químico de los extractos etanólicos (*S. mexicana*, *C. obtusifolia*, *A. farnesiana*, *L. guatemalensis*, *L. styraciflua*) de las plantas en estudio, su procedencia y rendimiento de extracción, se incluyen como parte de la contribución a la base de datos sobre plantas utilizadas popularmente para el tratamiento de infecciones pulmonares (anexo 8, tabla 10). Con este estudio se contribuyó a la ampliación de la base de datos existente en el Departamento de Citohistología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.

El análisis fue realizado en la Universidad de Salamanca, España, utilizando el método de barrido espectrales  $^1\text{H}$  RMN. Con este análisis se dictaminó que el aspecto físico-químico de *L. styraciflua* era el adecuado para posteriores estudios farmacéuticos en base a la presencia de esteres etílicos en la extracción con etanol al igual que ácidos lineales esterificados, monoterpenos, esteroides, flavonoides y algún azúcar (93).

#### 8.1.2 Determinación de actividad inhibitoria:

Para realizar este estudio, se utilizó el método bioquímico colorimétrico de MTT así como las cepas de *M. tuberculosis* y *M. smegmatis* para determinar la actividad inhibitoria. Como control negativo se utilizaron los pozos con el cultivo de las micobacterias y como control positivo se incluyó la Rifampicina que inhibió el crecimiento de las mismas.

Los resultados tuvieron buena correlación entre si, obteniéndose los mismos resultados en cada una de las placas donde se colocaron las plantas a estudiar, lo que indica que el ensayo tuvo 5 éxitos, nivel  $\alpha=0.05$  seleccionado.

Los extractos de las plantas se prepararon a una concentración inicial de 10 mg y se utilizaron en el ensayo concentraciones de 100, 50, 25, 12.5 y 6.25  $\mu\text{g/ml}$ . Siendo el

punto de corte 100 µg/ml ya que si la dosis es mayor puede presentar efectos adversos al realizar ensayos *in vivo*. Se observó que la concentración mínima inhibitoria de los extractos en contra de *M. smegmatis* fue de 25 µg/ml en los extractos *S. mexicana*, *C. obtusifolia*, *L. guatemalensis*, *L. styraciflua* (anexo 8, tabla 11) mientras que con *M. tuberculosis* se observó actividad leve no significativa de inhibición a una concentración de 100 µg/ml (anexo 9, tabla 12), concentración mayor al compararla con la de la Rifampicina que inhibe a una concentración de 25 µg/ml.

#### 8.1.3. Comparación de resultados de la actividad inhibitoria.

Se compararon los resultados obtenidos de la actividad inhibitoria de las plantas en estudio con respecto a las micobacterias utilizadas en el estudio (*M. smegmatis* y *M. tuberculosis*) (anexo 9, tabla 14). Encontrándose que si hay inhibición por parte de los extractos de plantas utilizados en el estudio contra *M. smegmatis* pero no hay actividad de inhibición con respecto a *M. tuberculosis* por parte de los extractos de plantas utilizados en el estudio.

#### 8.1.4. Confirmación de los resultados obtenidos con el método bioquímico colorimétrico de MTT utilizando los extractos *S. mexicana*, *C. obtusifolia*, *L. guatemalensis*, *L. styraciflua* con respecto a *M. tuberculosis*.

Se observó una actividad inhibitoria leve contra *M. tuberculosis* a una concentración de 100 µg/ml de los extractos *S. mexicana*, *C. obtusifolia*, *L. guatemalensis*, *L. styraciflua* por lo que se enviaron los extractos a confirmación al Centro de Investigación Biomédica del Noreste del Instituto Mexicano del Seguro Social (CIBIN-IMSS) Monterrey NL México. Este centro, debido a sus múltiples investigaciones sobre productos naturales y sintéticos contra *M. tuberculosis* se tomó como laboratorio de referencia para su comprobación. En este Instituto se utilizó el método de Azul de Alamar y su lectura se realizó por medio de un lector de ELISA a 570 nm. (anexo 9, tabla 13).

## 9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Para la realización del presente estudio se eligieron cinco plantas: *S. mexicana*, *C. obtusifolia*, *A. farnesiana*, *L. guatemalensis*, *L. styraciflua*, las cuales son utilizadas por la población guatemalteca para el tratamiento de infecciones respiratorias. Se analizó la hoja por ser la parte de la planta utilizada para infusión por la población.

El uso del etanol en la extracción crea la facilidad de arrastrar mayor cantidad de metabolitos, además de ser el disolvente universalmente reconocido para la extracción de componentes con fines medicinales, pues no es tóxico para el humano, es de origen biológico y es más accesible para la formulación de medicamentos que otros disolventes orgánicos que puedan ser tóxicos. Según el análisis físico-químico, el extracto etanólico con mejores características físico químicas fue el extracto de *L. styraciflua* (88). Sin embargo, su porcentaje de rendimiento fue el mas bajo en el proceso de extracción etanólica debido a la poca cantidad de metabolitos que se recolectaron en la extracción. Por otro lado, el extracto de *C. obtusifolia* fue el que presentó el mejor rendimiento en el proceso de extracción etanólica, probablemente por la cantidad de metabolitos que posee (anexo 8 tabla 10). Estos datos se incluyeron como parte de la contribución de este estudio a la base de datos existente en el Departamento de Citohistología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala sobre plantas utilizadas popularmente, para el tratamiento de infecciones pulmonares

La rifampicina es utilizada como tratamiento de elección contra *M. tuberculosis* y *M. smegmatis*, teniendo una acción micobactericida a una concentración de 25 µg/ml. Actúa sobre todas las fases de crecimiento además de ser esterilizante, por lo que su utilización como control positivo permitió la estandarización del procedimiento realizado en este estudio (94-96).

Los resultados obtenidos (anexo 9 tabla 14) demostraron que *M. smegmatis* y *M. tuberculosis* tienen diferente susceptibilidad ante las concentraciones utilizadas de las plantas en este estudio.

Al evaluar *M. smegmatis* frente a los extractos estudiados, se determinó que la micobacteria presentaba un CIM a una concentración de 25 µg/ml en los cinco extractos analizados en este estudio.

En el ensayo con los extractos de *S. mexicana*, *C. obtusifolia*, *L. guatemalensis*, *L. styraciflua*, a una concentración 100 µg/ml, se encontró que la reacción con *M. tuberculosis* es de actividad inhibitoria leve por lo que fue necesario enviar las muestras al CIBIN-IMSS para su confirmación.

El análisis realizado en CIBIN-IMSS confirmó la ausencia de actividad en las muestras de los extractos etanólicos de las plantas *S. mexicana*, *C. obtusifolia*, *L. guatemalensis* y *L. styraciflua* a una concentración de 100 µg/ml contra *M. tuberculosis*. La diferencia de los resultados obtenidos entre CIBIN-IMSS y el Laboratorio de Bioensayos del Departamento de Citohistología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala, podrían deberse a que en el primero utilizó como indicador de la reacción Azul de Alamar y en el segundo la reacción de resazurin (MTT); ambos métodos con principio similar pero distinto indicador de oxido-reducción. Por otro lado en el CIBIN-IMSS la lectura de la reacción (cambio de color) fue realizado en un lector de ELISA a una longitud de onda de 570 nm, y en Departamento de Citohistología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala se realizó en forma visual. Además, los extractos en solución presentaban coloración verde claro, factor que pudo influir en la lectura de los resultados en forma visual.

Lo anterior indica que en el ensayo con los extractos de *S. mexicana*, *C. obtusifolia*, *L. guatemalensis*, *L. styraciflua*, a una concentración 100 µg/ml, no demostró actividad inhibitoria contra *M. tuberculosis*, es decir que los extractos no contienen ninguna sustancia que pueda inhibir a *M. tuberculosis*, aunque si a *M. smegmatis*.

En base a este hallazgo se infiere que no es posible aseverar que *M. smegmatis* es un buen patrón comparativo de la actividad inhibitoria de *M. tuberculosis*, ya que para poderlo comparar faltaría demostrar los efectos que tienen los extractos que inhiben a *M. tuberculosis* sobre *M. smegmatis* lo que confirmaría si es o no un buen método de tamizaje.

## 10. CONCLUSIONES

- 10.1 Los extractos de *S. mexicana*, *C. obtusifolia*, *L. guatemalensis*, *L. styraciflua*, *A. farnesiana* inhibieron a *M. smegmatis* a una concentración de 25 µg/ml.
- 10.2 Los extractos de *S. mexicana*, *C. obtusifolia*, *L. guatemalensis*, *L. styraciflua*, *A. farnesiana* no presentaron actividad inhibitoria contra *M. tuberculosis*.
- 10.3 *M. smegmatis* no es un buen preeditor para evaluar la actividad inhibitoria de *M. tuberculosis*.
- 10.4 El método colorimétrico de MTT en este proyecto preliminar demostró que su implementación es factible, pero que requiere de un sistema cuantitativo de detección.

## **11. RECOMENDACION**

- 11.1 Utilizar un espectrofotómetro para microplacas con un filtro a 570 nm para la cuantificación de la reacción obtenida al utilizar el método colorimétrico de MTT con el fin de evitar el error que se introduce con la lectura visual.

## 12. REFERENCIAS

1. Fundación Damián Bélgica, Tuberculosis: Manual de Referencia para la Aplicación de las Normas de Atención, Sistema integral de atención en salud Ministerio de Salud Publica y Asistencia Social, Guatemala, Doc. Tec. 1998; 5-22.
2. Rodríguez M *et al.* Resistencia primaria a fármacos en la tuberculosis y comparación de pacientes con un tratamiento previo en dos centros mayores de referencia y una clínica privada en la ciudad de Guatemala. Rev. RECCAVIR.2002; 14-20.
3. Figueroa A. Determinación de la actividad contra *Mycobacterium smegmatis* y *Mycobacterium tuberculosis* de extractos de plantas de uso medicinal en Guatemala (tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia). 2000: 86: 24-69.
4. Koklik. WK, Willey Hp y Amos DN. Zinsser Microbiología. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires. Argentina Doc. Tec. 1983; 17: 685-717.
5. Pérez I. *et al.* Identificación molecular de micobacterias del complejo tuberculoso: estandarización de un método de PCR basado en secuencias conservadas de la región espaciadora 16S-23S del operón de ADN ribosomal. Rev. Soc. Ven. Microbiol. Caracas 2003; 23: 1.
6. Reniero A. Las Micobacterias. *Mycobacterium tuberculosis*. Universidad de Buenos Aires Argentina 2005. Fecha de consulta 10 de Julio 2008, 13:16 hr disponible en:  
[http://www.rutasalud.com.ar/para\\_profesionales/profesionales/paginas/5.htm](http://www.rutasalud.com.ar/para_profesionales/profesionales/paginas/5.htm)
7. Crespo M. *et al* Micobacterias no tuberculosas en personas VIH positivo y en personas sin factores de riesgo a la infección. Rev. Colombia Med. Colombia 1997; 28: 136-144.
8. Complejo del *Mycobacterium avium* (MAC). New Mexico AIDS education and training center University of New Mexico Heath Sciences Center. Consulta 6 de agosto 2008.  
[http://74.125.45.104/search?q=cache:qHQzPA6uoWkJ:www.aidsinonet.org/factsheet\\_detail.php%3Ffsnumber%3D514%26newLang%3Des+complejo+mac&hl=es&ct=clnk&cd=3&gl=gt](http://74.125.45.104/search?q=cache:qHQzPA6uoWkJ:www.aidsinonet.org/factsheet_detail.php%3Ffsnumber%3D514%26newLang%3Des+complejo+mac&hl=es&ct=clnk&cd=3&gl=gt)

9. Murcia M. *et al* Prevalencia de micobacterias en pacientes VIH/SIDA positivos en Bogotá D.C. Rev. Neumol. Colombia 2001; 13: 249-261
10. MAC (Complejo *Mycobacterium avium*). Delta region aids education and training center infored sida hoja 514E Centers for Disease Control & Prevention National Center for HIV/AIDS, Viral Hepatitis, STD, and TB Prevention Division of Tuberculosis Elimination. Fecha de consulta 6 de agosto 2008 10:30 hr. En [http://www.projectinform.org/info/mac/index\\_sp.shtml](http://www.projectinform.org/info/mac/index_sp.shtml).
11. Transmisión, evitar el contacto y lograr la curación de la tuberculosis. Confederación Médica Argentina. Fecha de consulta 10 de julio 2008, 13:20 hr Disponible en: [http://www.geocities.com/tuberculosis\\_2000/transmision.html](http://www.geocities.com/tuberculosis_2000/transmision.html)
12. Caminero J. y Fernández F. Manual de Neumología y Cirugía torácica; Tuberculosis y otros micobacteriosis. Madrid, España Doc. Tec. 1998; 1389-1419.
13. Caminero J. Guía de la tuberculosis para médicos especialistas; Diagnostico de la tuberculosis. Bol. UICTER Paris 2002; 7.
14. Truant Jp, Brett WA, Thomas W Jr. Fluorescence Microscopy of tubercle bacilli stained with auramine and rhodamine. Henry Ford Hosp Med Bull. 1962; 10: 287-296.
15. Sepkowitz K, *et al*. Tuberculosis in the AIDS Era. Clin Microbiol Rev. 1995; 5:180-199.
16. Schluger NW. Changing Approaches to the Diagnosis of Tuberculosis. Am J Respir Crit Care Med. 2001; 164:2020-2024.
17. Grosset J. El laboratorio: su rol en el diagnóstico y tratamiento de la tuberculosis. Bol. UICTER 1982; 57: 3-4- 234-240.
18. Grange M. Diagnosis Mycobacteria. Scientific Londres Doc. Tec. 1985; 152: 45-89.
19. Canetti G. Mycobacteria; Laboratory methods for testing drug sensitivity and resistance. Bull Org Mond Sante 1963; 29: 565-578.
20. De Logu A. *et al*. Comparison of the susceptibility testing of clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* by the MTT colorimetric method and the NCCLS Standard method. Inter. J. Antimicrobial Agent 2003; 21: 244-250.
21. Satnam K. *et al*. Development of a tetrazolium salt assay for rapid determination of viability of BCG vaccines. Rev. Vaccine Elsevier 1999; 17; 2423-2428.

22. Mshana R. *et al.* Use of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide for rapid detection of Rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin. Microbiol. 1998; 36:1214-1219.
23. Bedwell J. *et al.* Evaluation of a tetrazolium salt test to determine absence of live mycobacteria in tuberculin purified protein derivative. Rev. Ibeal Biol. 2001; 29: 3-6.
24. Caws M. *et al.* Role of IS6110-targeted PCR, culture, biochemical, clinical and immunological criteria for diagnosis of tuberculosis meningitis. J Clin Microbiol. 2000; 38: 3150-3155.
25. Dalovisio J. *et al.* Comparison of the amplified *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) direct test, amplicor MTB PCR and IS6110-PCR for detection of MTB in respiratory specimens. Clin Infect Dis. 1996; 23: 1099-1106.
26. Bennedsen J. *et al.* Utility of PCR in diagnosing pulmonary tuberculosis. J clin Microbiol. 1996; 34: 1407-1411.
27. Nagesh BS. *et al.* Evaluation of polymerase chain reaction for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in pleural fluid. Chest. 2001; 119: 1737-1741.
28. Morán MC. *et al.* Detección de *Mycobacterium tuberculosis* mediante la reacción en cadena de la polimerasa en una población seleccionada del noroccidente de México. Rev Panam Salud Pública. 2000; 7: 389-393.
29. Castellanos MA. Evaluación de dos técnicas alternativas (Tinción auramina O y PCR Hemianidada *IS 6110*) para el diagnóstico de tuberculosis. Universidad de San Carlos de Guatemala (Tesis de graduación Facultad de ciencias Químicas y Farmacia) 2005. 97p
30. Pereira L. *et al.* Development of antigen detection assay for diagnosis of tuberculosis using sputum samples. J. Clin. Microbiol. 2000; 38: 2278-2283.
31. Mendez A. *et al.* Controlling multidrug-resistant tuberculosis and access to expensive drug: a rational framework. Boletín de la OMS 2002; 489-490.
32. Caminero L. Tratamiento de la tuberculosis, Guía de la tuberculosis para médicos especialistas. UICTER Paris Doc. Tec 2002; 9.
33. Fox W. A donde va la Quimioterapia de corta duración. Bol. UICTER 1981; 55: 3-4-147-170.
34. Fox W. Regímenes de Quimioterapia Bol. UICTER 1981; 54: 3-4-125.
35. Organización Mundial de la Salud. WHO report 2003: Global Tuberculosis Control. 2003

36. Organización Mundial de la Salud. The WHO Global Surveillance and Monitoring Project. Global burden of tuberculosis report 2001: HIV causing tuberculosis cases to double in Africa. 23 de April 2001.
37. Trejo S. Determinación de anticuerpos anti-virus de inmunodeficiencia humana en pacientes con tuberculosis pulmonar. Facultad de Ciencias Médicas, USAC mayo 1998. Fecha de consulta 10 de julio 2008. 13:25 hr. Disponible en: <http://www.metabase.net/docs/fm-usac/05522.html>
38. Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social. Semana epidemiológica. No. 1-2002, comprendida del 30 de diciembre al 5 de enero del 2002. 14 de enero del 2002. Fecha de consulta 10 de julio 2008, 12:15 hr. Disponible en: <http://www.mspas.gob.gt/epi/2002/01-02.html>
39. Sutherland Epidemiología de la tuberculosis ¿Vale mas prevenir que curar? Bol. UICTER 1981; 56: 3-4-138-146.
40. Mizzau D. El arte de curar con plantas en el Hombre. Fecha de consulta 10 de julio 2008, 14:20 hr. Disponible en: [www.fundacer.com.arg](http://www.fundacer.com.arg)
41. Cáceres A. Plantas de uso medicinal en Guatemala. Guatemala: USAC, 1996. p. 402
42. Martín, G. Ethnobotany; a methods manual. WWF international/UNESCO, Royal Botanic Gardens, Kew, UK. Chapman & Hall Great Britain. 2000; 268.
43. Universidad de San Carlos de Guatemala. Etnobotanica y conservación de los recursos fitogenéticos de uso medicinal presentes en Guatemala. Proyecto Piloto. DIGI, 1988; 29.
44. Salle F., Eagles P., Leng H. Preliminary ant microbial screening of four South African *Asteraceae* species. J. Ethnopharmacology, 1996;52:1-27-33
45. Lall N, Meyer J. *In vitro* Inhibition of drug-resistant and drug-sensitive strains of *Mycobacterium tuberculosis* by ethnobotanically selected South African plants. J. Ethnopharmacol, 1999; 66:3-347-354.
46. Newton Sandra *et al* A review of antimycobacterial natural products. Rev. Phytother Res. 2000; 14: 303-302.
47. Lall, N., Meyer, J. Inhibition of drug-sensitive and drug-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* by diospyrin, isolated from *Euclea natalensis*. J. Ethnopharmacol, 2001; 78: 213-216.

48. Meyer J, Lall N., and Mathekga ADM. *In vitro* inhibition of drug-resistant and drug-sensitive strains of *Mycobacterium tuberculosis* by *Helichrysum caespitium*. South. Af. Bot. 2002; 68: 90-93.
49. Jiménez-Arellanes A, Meckes M., Ramirez R., Torres J. y Luna-Herrera, J. Activity against multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Mexican plants used to treatment respiratory diseases. Rev. Phytother Res. 2003; 17: 903-908.
50. Stavri M, et al. *Ostruthin*; An antimycobacterial coumarin from the roots of *Peucedanum ostruthium*. Rev. Plant Med. 2003; 69:369-371.
51. Gibbons S., Stavri M., Bucar F., Mathew K. Pangelin, an antimycobacterial coumarin from *Ducrosia anethifolia*. Rev. Plant Med 2003; 69: 956-959.
52. Okunade K. et al. Flora of the British West Indian Islands. Rev. Plant Med 2004; 526: 165-167.
53. Manrique S., Acción antimicobacteriana *in vitro* de seis plantas medicinales usadas en el tratamiento de tuberculosis. (tesis de graduación Facultad de ciencias Químicas y Farmacia) 1992.
54. Figueroa L. Determinación de la actividad contra *Mycobacterium smegmatis* y *Mycobacterium tuberculosis* de extractos de plantas de uso medicinal en Guatemala. Universidad de San Carlos de Guatemala (tesis de graduación Facultad de ciencias Químicas y Farmacia) 2000.
55. Mazariegos A. et al. Actividad micobactericida de extractos de plantas utilizadas popularmente para infecciones pulmonares en Guatemala. Universidad de San Carlos de Guatemala (tesis de graduación Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 2004. 57p.
56. Nash. Flora of Guatemala. Fieldiana Botany 1976; 24: 280-281.
57. Argueta V. et al. Atlas de las plantas de la medicina mexicana tradicional. Instituto Nacional Indigenista México 1994; 1: 1-3: 2600.
58. Morton J. Atlas of Medicinal Plants of Middle América. Springfield, Publisher Charles C. Tomas 1981; 880-881.
59. Orellana S. Indian Medicine in Highland Guatemala. Albuquerque, University of New Mexico Press. 1992: 124-125.
60. Ocampo S. et al. El uso de algunas plantas medicinales en Costa Rica. San José Costa Rica Doc. Tec. 1987; 1: 2: 74-75.

61. House Paúl, *et al.* Manual popular de 50 Plantas Medicinales de Honduras. Tegucigalpa Honduras Doc. Tec. 1989; 114-115.
62. Cáceres A. Diuretic activity of plants used for treatment of urinary ailments in Guatemala. *J. Ethnopharmacol.* 1987; 19: 233-245.
63. Martínez M. Catalogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas. Fondo económico-cultural. México Doc. Tec. 1979; 1220.
64. Standley, P. Steyermark, J. Flora of Guatemala. *Fieldiana: Botany* 1946: 24: 4: 22-28,140-154,211-280,316-333,444-446.
65. Martínez M. Las plantas medicinales de México. 6ª edición Editorial Azteca México 1992; 656.
66. Williams Louis O. The useful plants of Central America. Tegucigalpa Honduras Doc. Tec. 1981; 24:1-2: 158.
67. Márquez Carmen Alonso *et al.* Plantas Medicinales de México II composición, uso y actividad biológica. México Doc. Tec. 1990; 101-104.
68. Planter C. Obtención y aprovechamiento de extractos vegetales de la flora salvadoreña, El Salvador 1989; 1: 319-320.
69. Escobar N. Flor atóxica Panamá. EUPAN Panamá 1972:131.
70. Naranjo P. Medicina Indígena y Popular de América Latina y Medicina Contemporánea Guatemala: Instituto indigenista Nacional, Doc. Tec. 1978, 13: 678.
71. Williams LO Flora of Guatemala: Ceiba. Chicago: Fieldiana Botany 1981; 24:15.
72. Convio A. 270 Plantas Medicinales Iberoamericanas. Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo. Ed. Gupta Colombia 1995; 550-560.
73. Cáceres A., Samayoa B. Tamizaje de la actividad antibacteriana de plantas usadas en Guatemala para el tratamiento de afecciones gastrointestinales. Cuaderno de investigación DIGI/USAC Guatemala Doc. Tec. 1989; 6-89.
74. Ministerio de Agricultura, Cultivo de plantas medicinales, WIFAT/MINSAP/UAG/TRAMIL/enda Cuba Doc. Tec. 1993; 2: 76-79.
75. Proyecto IBEROEKA Cuarto Informe Semestral, Doc. Tec. 2003; 45-47.
76. De la Cruz J. Clasificación de zonas de vida de Guatemala a nivel de reconocimiento. Instituto Nacional Forestal. Guatemala mimeografiado Doc. Tec. 1982; 10-40.
77. Gibson D N Flora de Guatemala. *Fieldiana: Botany* 1970; 24: 9: 208.

78. Murray J. Investigación económica, social y operacional sobre la tuberculosis. Bol. Unión Int. Tuberc. Enf. Resp. 1995:168-171.
79. Medilla P. Manual de laboratorio de farmacognosia Guatemala USAC Doc. Tec. 1996; 38.
80. Real Farmacopea Española 2da edición Madrid Ministerio de Sanidad y Consumo España Doc. Tec. 2002; 2801.
81. Sherapin N. Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos. Santa Fe de Bogota. convenio Andrés Bello y CYTED Doc. Tec. 2002; 247.
82. Manual del Fabricante BUCHI Flawil: Buche laboratorio Doc. Tec. 2002; 44.
83. Manual de procedimientos del proyecto biodiversidad OEA Doc. Tec. 1993; 2-3.
84. Cruz D *et al.* Actividad antimicrobiana de extractos crudos de *juglans regia*, *juglans mollis* y *carya illinoensis* sobre *mycobacterium tuberculosis* Rev. Respyn UNAM, México Nov. Ed. Esp. 2007; 8.
85. Porras T. *et al.* Evaluación de métodos fenotípicos y genotípicos para la detección de fármaco resistencia de *Mycobacterium tuberculosis*. Rev. Biomédica Bogota Colombia 2005; 25: 1: 120-137.
86. Morcillo N. A microplate indicator-based method for determining drug-susceptibility of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* to antimicrobial agents. Int. J. of Tuberc. 2004; 8: 253-259.
87. Scott F. *et al.* Rapid, low technology MIC determination with clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates by using the Microplate Alamar Blue Assay. J. of Lin. Microbiology 1998; 36: 2: 362-366.
88. Ribeiro M. *et al.* Avaliação de testes rápidos em microplacas usando indicadores de viabilidade celular para determinação da susceptibilidade de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* à isoniazida e rifampicina. J. Bras. Pneumol 2004; 30: 4: 455-460.
89. Telles M. Mosca A. Avaliação da técnica de microdiluição em placa para determinação de concentração inibitória mínima da isoniazida em cepas de *Mycobacterium tuberculosis*. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 2000; 59: 16-19.
90. Foongladda S. *et al.* Rapid and simple MTT method for rifampicin and isoniazid susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. Int. J. Tuberc. Lung. Dis. 2002; 12: 6: 1118-1122,
91. Pascual M, Slowing K, Carretero M, Villar A. Efectos farmacológicos de la infusión de *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown (*Verbenaceae*), II congreso de

Fitoterapia, Fecha de consulta 10 de julio 2008, 10:15 hr. Disponible en [www.medicina-naturista.net](http://www.medicina-naturista.net)

92. Aguilar A. Contribución al estudio farmacológico de la *Lippia alba* como hipnótico y tranquilizante. Universidad de San Carlos de Guatemala (tesis de graduación Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 1981 p 43.
93. Lorenzo p. *et al.* Velázquez farmacología básica y clínica. 17ª Ed. Edit. Medica Panamericana España 2005; 780, 861.
94. Graham F. El evitar los biofilms podría ayudar a combatir la tuberculosis. Hughes Medical Institute Research News. 2005: 46-52.
95. Smith I. Factores sigma alternativos en micobacteria. Estudio de factores Sigma E. Public Health Research Inst., N.Y. 2005. Fecha de consulta 10 de julio 2008, 10:45 hr. Disponible en <http://www.ivic.ve/infanu97/cmlgm.html>
96. Cáceres A. Vademécum Nacional de Plantas Medicinales. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia USAC, Departamento de regulación y control de productos farmacéuticos y afines MSPAS Guatemala Doc. Tec. 2006; 61-62, 77-78, 217-218, 221-222.

# 13. ANEXOS

## ANEXO 1

**Tabla 1. Características moleculares del género *Mycobacterium* y los géneros relacionados**

Género	No. de átomos de Carbono	Porcentaje de contenido de Guanina-Citocina del ADN
<i>Corynebacterium</i>	22-38	51-67
<i>Rhodococcus</i>	34-52	63-73
<i>Nocardia</i>	46-60	64-72
<i>Gordona</i>	48-66	63-73
<i>Tzukamurella</i>	64-78	63-73
<i>Mycobacterium</i>	60-90	61-71

Tomado de Pérez I. *et al.* Identificación molecular de micobacterias del complejo tuberculoso: estandarización de un método de PCR basado en secuencias conservadas de la región espaciadora 16S-23S del operón de ADN ribosomal. Rev. Soc. Ven. Microbiol. Caracas 2003; 23.

**Tabla 2. Clasificación de las micobacterias según Runyon**

Grupo	Características
I	Fotocromógenos: producen pigmento amarillo en presencia de la luz, crecimiento lento, colonias no pigmentadas en la oscuridad P.e., <i>M. kansasii</i> , <i>M. marinum</i> .
II	Escotocromógenos: producen pigmento amarillo a naranja en la oscuridad, crecimiento lento. P.e., <i>M. scrofulaceum</i> , <i>M. gordonae</i> .
III	No fotocromógenos: crecimiento lento, no producen pigmento, en algunos casos los cultivos viejos adquieren un color amarillento. P.e., Especies tipo complejo <i>M. avium</i> .
IV	Crecimiento rápido: crecen en menos de una semana, la pigmentación es variable según la especie. P.e., <i>M. fortuitum</i> .

Tomado de: Dr. Ana Reiniero Las micobacterias *Mycobacterium tuberculosis* Departamento de Bioquímica Universidad de Buenos Aires [http://www.rutasalud.com.ar/para\\_profesionales/profesionales/paginas/5.htm](http://www.rutasalud.com.ar/para_profesionales/profesionales/paginas/5.htm)

## ANEXO 2

**Tabla 3. Clasificación de especies de micobacterias según el riesgo de infección al hombre (ESM, 1991)**

Grupo de Riesgo I		Grupo de Riesgo II	Grupo de Riesgo III
<i>M. smegmatis</i>	<i>M. aurum</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. tuberculosis</i>
<i>M. phlei</i>	<i>M. chitae</i>	<i>M. intracellulare</i>	<i>M. bovis</i>
<i>M. fallax</i>	<i>M. duvalii</i>	<i>M. chelonae</i>	<i>M. africanum</i>
<i>M. thermoresistibile</i>	<i>M. gadium</i>	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. ulcerans</i>
<i>M. parafortuitum</i>	<i>M. gilvum</i>	<i>M. kansasii</i>	<i>M. microti*</i>
<i>M. gastri</i>	<i>M. komossense</i>	<i>M. malmoense</i>	<i>M. leprae</i>
<i>M. triviale</i>	<i>M. lepraemurium</i>	<i>M. marinum</i>	
<i>M. sphagni</i>	<i>M. neoaurum</i>	<i>M. paratuberculosis</i>	
<i>M. gordonae</i>	<i>M. vaccae</i>	<i>M. scrofulaceum</i>	
<i>M. flavescens</i>	<i>M. agri</i>	<i>M. szulgai</i>	
<i>M. farcinogenes</i>	<i>M. aichiense</i>	<i>M. xenopi</i>	
<i>M. senegalense</i>	<i>M. austroafricanum</i>	<i>M. asiaticum</i>	
<i>M. terrae</i>	<i>M. chubuense</i>	<i>M. haemophilum</i>	
<i>M. porcinum</i>	<i>M. obuense</i>	<i>M. shimodei</i>	
<i>M. diernhoferi</i>	<i>M. rhodosiae</i>	<i>M. simiae</i>	
<i>M. pulveris</i>	<i>M. moriokaense</i>		
<i>M. tokaiense</i>	<i>M. poriferae</i>		
<i>M. nonchromogenicum</i>			

Tomado de: Dr. Ana Reinero Las micobacterias *Mycobacterium tuberculosis* departamento de bioquímica Universidad de Buenos Aires [http://www.rutasalud.com.ar/para\\_profesionales/profesionales/paginas/5.htm](http://www.rutasalud.com.ar/para_profesionales/profesionales/paginas/5.htm)

\* No es patógeno para el hombre, pero es considerado como una variante de *M. bovis*.

### ANEXO 3

**Tabla 4. Factores de riesgo en la adquisición de la enfermedad de la tuberculosis.**

Predisposición genética	Tabaco	Leucemia
Pobreza	Diabetes	Tratamientos inmunosupresores
Edad	Infección por VIH/SIDA	Sarampión, tos ferina
Alcoholismo	Enfermedad Renal	Otras enfermedades inmunosupresoras

Tomado de: Transmisión, evitar el contacto y lograr la curación de la Tuberculosis. Confederación medica Argentina [http://www.geocities.com/tuberculosis\\_2000/transmision.html](http://www.geocities.com/tuberculosis_2000/transmision.html)

**Tabla 5. Forma de entregar los resultados de acuerdo a la Comisión Nacional de Tuberculosis**

No. de bacilos alcohol ácidos resistentes (BAAR)	Forma de reportar
0-1/campo de lectura 100 campos (total 10-100 bacilos)	+
1-10/campo de lectura de 50 campos (total 10-500 bacilos)	++
10 o mas/ campos de lectura de 20 campos (total $\leq$ 200 bacilos)	+++
No se encontraron bacilos en 100 capos contados	Neg.

Tomado de: Fundación Damián Bélgica, Tuberculosis Manual de Referencia para la Aplicación de las Normas de Atención, Sistema integral de atención en salud Ministerio de Salud Publica y Asistencia Guatemala, Doc. Tec. 1998. p. 5-22.

**Tabla 6. Característica de identificación bioquímica de micobacterias**

Especie	Aspecto de la colonia	Catalasa 22°C 68°C	Piruvato crecimiento	TCH 2mg/l	NO3	Test de Niacina
<i>M. tuberculosis</i>	Er	+ -	-	R	+	+
<i>M. africanum</i>	Dr	+ -	+	S	-	-
<i>M. bovis</i>	Ds	+ -	+	S	-	-
M. atípicas	V	+ -	-	R	V	-

Fuente: Boletín Unión Internacional Contra la Tuberculosis Vol. 57 1982.

E: eugonica; D: disgonica; r: rugosa; Ds; disgonica lisa; V: variable; S: susceptible;

R: resistente. TCH (el test de Niacina el cual debe realizarse en un cultivo de 42 días).

## ANEXO 4

**Tabla 7. Posibles causas de falsos negativos en la prueba de tuberculina.**

<b>Causas relacionadas con la persona a quien se le practica la prueba</b>	<b>Causas relacionadas con la técnica de la prueba</b>
Infecciones víricas, bacterianas y fúngicas	Tuberculina empleada
Vacunación con virus vivos	Método de administración
Alteraciones metabólicas	Lectura del resultado
Enfermedades linfáticas	
Sarcoidosis	
Corticoesteroideoterapia y otros fármacos inmunosupresores	
Edad (recién nacidos y ancianos)	
Situaciones de estrés	
Desnutrición	
Periodo de ventana de la infección	

Tomado de: Fundación Damián Bélgica, Tuberculosis Manual de Referencia para la Aplicación de las Normas de Atención, Sistema integral de atención en salud Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social, Guatemala, Doc. Tec. 1998. p. 5-22

**ANEXO 5.** Tabla 8. Fármacos antituberculosos de primera línea. Mecanismo de acción, reacciones adversas y conducta a seguir e interacción farmacológica frecuente.

Fármaco y dosis	Efectos secundarios	Control	Interacción	Acción
<b>Isoniacida (H)</b> Dosis diaria 5-300 mg/Kg, 2/semana 15 mg/Kg	Neuritis, Hepatitis, Hipersensibilidad, Neuropatía, hipersensibilidad cutánea, pelagra,	Evaluación por transaminasas y bilirrubinas, suspensión del tratamiento antituberculoso.	Fenitoína	Bactericida Extra o Intracelular
<b>Rifampicina (R)</b> Dosis diaria 10-600 mg/Kg, 2/semana misma dosis.	Hepatitis, reacción febril, púrpura trombocitopenia, anemia hemolítica, hipersensibilidad cutánea y fotosensibilidad, trastornos gastrointestinales, reducción de la eficacia de anticonceptivos orales, anticoagulante se hipoglicemiantes orales, Síndrome FLU semejante a la gripe presente en el 3-6 mes, disnea.	Suspensión del medicamento, Evaluación por transaminasas	Inhibe anti Conceptivos orales, quinidina	Bactericida todas poblaciones Esterilizante
<b>Pirazinamida (Z)</b> 15-30 mg/Kg hasta 2 g., 2/semana 50 mg/Kg	Hiperuricemia, hepatitis, artralgia, gota, nauseas, anorexia, hipersensibilidad reacción cutánea y generalizada.	Suspender si la artralgia es intensa, Evaluación por transaminasas y ácido úrico.	Bloque antineuro muscular	Bactericida intracelular, esterilizante.
<b>Etambutol (E)</b> Dosis diaria 15-20 mg/Kg, 2/semana 50 mg/Kg.	Neuritis óptica, nauseas, rara vez neuropatías periféricas, hipersensibilidad.	Debe evitarse en pacientes con enfermedad renal, grave durante el embarazo, tratamiento sintomático, agudeza visual suspensión de la droga si es permanente.		Bacteriostático extra e intracelular
<b>Estreptomina (S)</b> Dosis diaria 15-20 mg/Kg hasta 1 g., 2/semana 25-30 mg/Kg hasta 1 g.	Sordera, trastornos vestibulares, vértigos, rara vez anemia aplásica, agranulocitosis, hipersensibilidad	Evaluación por medio de audiograma, Creatinina, función vestibular, suspensión total y definitiva de la droga.		Bactericida extracelular

Tomado de: Dr. José Caminero Luna. Tratamiento de la tuberculosis, Guía de la tuberculosis para médicos especialistas. Cap. 9 UICTER Paris 2002

## ANEXO 6

Tabla 9. Esquemas recomendados de quimioterapia

Estándares	Esquemas
Esquema recomendado de rutina durante 6 meses	2HRZ/ 4 HR
Cuando la quimioterapia intermitente supervisada puede organizarse	2 HRZ / 4 H <sub>3</sub> R <sub>3</sub> , 2 HRZ / 4 H <sub>3</sub> R <sub>3</sub> , 2 E <sub>3</sub> H <sub>3</sub> R <sub>3</sub> Z <sub>3</sub> / 4 H <sub>3</sub> R <sub>3</sub> , 2 S <sub>3</sub> H <sub>3</sub> R <sub>3</sub> Z <sub>3</sub> / 4 H <sub>3</sub> R <sub>3</sub>
Cuando el nivel de resistencia primario es alto	2 EHRZ / 4 HR 2 SHRZ / 4 HR
Con una fase inicial potentes de cuatro drogas	2 SHRZ / 6 HT 2 SHRZ / 6 S <sub>2</sub> H <sub>2</sub> Z <sub>3</sub>
Con una fase inicial menos potente o nula	2 SHR / 7 HR 2 EHR / 7 HR 9 HR 2 SHT / 10 HT 2 SHE / 10 HE 2 SHP / 10 HP 2 SHT / 10 S <sub>3</sub> H <sub>3</sub>

Tomado de: Tomado de: Fox W. Regímenes de Quimioterapia Unión internacional contra la tuberculosis y enfermedades respiratorias Bol. UICTER 1981; 54: 3-4-125

S: Estreptomina; H: Isoniacida; R: Rifampicina; Z: Pirazinamida; E: Etambutol; T: Tiacetazona; P: PAS; los números 2, 4, 9, 10, 6 y 7 delante de las letras son los meses que se debe llevar dicho régimen de quimioterapia; Los numero pequeños son la dosis del medicamento.

**ANEXO 7.** Forma de preparar la placa para la realización del reto.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O						
<b>B</b>	H <sub>2</sub> O	Extracto 1	•	•	•	•	Rifampicina (+)	•	•	•	•	H <sub>2</sub> O
<b>C</b>	H <sub>2</sub> O	Extracto 2	•	•	•	•	Medio de cultivo (Blanco)	•	•	•	•	H <sub>2</sub> O
<b>D</b>	H <sub>2</sub> O	Extracto 3	•	•	•	•	Micobacteria (-)	•	•	•	•	H <sub>2</sub> O
<b>E</b>	H <sub>2</sub> O	Extracto 4	•	•	•	•	V	V	V	V	V	H <sub>2</sub> O
<b>F</b>	H <sub>2</sub> O	Extracto 5	•	•	•	•	Medio de cultivo (Blanco)	•	•	•	•	H <sub>2</sub> O
<b>G</b>	H <sub>2</sub> O	V	V	V	V	V	Micobacteria (-)	•	•	•	•	H <sub>2</sub> O
<b>H</b>	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O						

Fuente: experimental: (•) Diluciones de 100, 50, 25 y 12.5 µg/ml. (V) pozo sin medio de cultivo

## TABLAS DE RESULTADOS DEL ESTUDIO

### ANEXO 8

**Tabla 10. Descripción de las plantas en estudio**

Familia	Nombre científico	Nombre común	Herbario	Estructura	Localización	Porcentaje de rendimiento
Lauraceae	<i>Litsea guatemalensis</i> . Mez.	Laurel	L <sub>1</sub> - 2	Hoja	Tecpán	11.28
Caprifoliaceae	<i>Sambucus mexicana</i> Presl.	Sauco	C <sub>1</sub> - 5	Hoja	Totonicapán	13.08
Moraceae	<i>Cecropia obtusifolia</i> Bartolini	Guarumo	IB <sub>2</sub> - 5	Hoja	Suchitepéquez	22.08
Hamameidaceae	<i>Liquidambar styraciflua</i> L.	Salvia sija		Hoja	Táctic A.V.	8.01
Leguminosae	<i>Acacia farnesiana</i> Willd.	Subin	M <sub>1</sub> - 9	Hoja	Suchitepéquez	13.3

Fuente: Experimental Banco de datos listado de extractos proyecto Chicago Lipronat, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia Depto. de Citohistología USAC, Caceres et al 1990 Plantas usadas en mesoamerica para el tratamiento de afecciones comunes, con énfasis en infecciones.

**Tabla 11. Resultados del ensayo de Concentración Mínima Inhibitoria para *Mycobacterium smegmatis* ATCC 607**

Ensayo	NOMBRE	CONCENTRACION				
		100µg/mL	50 µg/mL	25 µg/mL	12.5 µg/mL	6.25 µg/mL
Orden						
4	<i>L. guatemalensis</i>	++	++	+	Neg.	Neg.
1	<i>S. mexicana</i>	++	++	+	Neg.	Neg.
2	<i>C. obtusifolia</i>	++	++	+	Neg.	Neg.
5	<i>L. styraciflua</i>	++	++	+	Neg.	Neg.
3	<i>A. farnesiana</i>	++	++	+	Neg.	Neg.
P	Rifampicina	+++	+++	++	+	Neg.
N	Medio con <i>M. smegmatis</i>	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.

Fuente: Experimental Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia Depto. de Citohistología USAC.

Rifampicina: control positivo (POS.: no hubo crecimiento. +++: Fuerte. ++: Moderado. +: Leve (No significativa de inhibición)). Medio con *Mycobacterium smegmatis*: control negativo (Neg.: No crecimiento)

## ANEXO 9

**Tabla 12. Resultados del ensayo de Concentración Mínima Inhibitoria para *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv ATCC 27294**

Ensayo Orden	NOMBRE	CONCENTRACION				
		100µg/mL	50 µg/mL	25 µg/mL	12.5 µg/mL	6.25 µg/mL
4	<i>L. guatemalensis</i>	+	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
1	<i>S. mexicana</i>	+	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
2	<i>C. obtusifolia</i>	+	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
5	<i>L. styraciflua</i>	+	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
3	<i>A. farnesiana</i>	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
P	Rifampicina	+++	++	+	Neg.	Neg.
N	Medio con <i>M. tuberculosis</i>	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.

Fuente: Experimental Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia Depto. de Citohistología USAC.

Rifampicina: control positivo (POS.: no hubo crecimiento, +++: Fuerte, ++: Moderado, +: Leve (No significativa de inhibición)). Medio con *Mycobacterium tuberculosis*: control negativo (Neg.: crecimiento).

**Tabla 13. Confirmación de Resultados *M. tuberculosis* H37Rv obtenida por CIBIN-IMSS (Centro De Investigación Biomédica del Noroeste Instituto Mexicano del Seguro Social).**

No.	Nombre	Disolvente recomendado	Comentario sobre solubilidad	MIC (µg/mL) <i>M. tuberculosis</i> H37Rv
1	<i>C. obtusifolia</i>	DMSO	-----	>100
2	<i>L. styraciflua</i>	DMSO	-----	>100
3	<i>L. guatemalensis</i>	DMSO	-----	>100
4	<i>S. mexicana</i>	DMSO	Parcialmente soluble	>100

Fuente: Experimental CIBIN-IM

**Tabla 14. Comparación del ensayo de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv ATCC 27294 con respecto al ensayo de *Mycobacterium smegmatis* ATCC 607**

No	Nombre de las plantas	Concentraciones mínimas inhibitorias de los extractos etanólicos para cada una de las micobacterias en estudio.	
		<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv ATCC 27294 (<100 µg/ml)	<i>Mycobacterium smegmatis</i> ATCC 607 (25 µg/ml)
1	<i>L. guatemalensis</i>	Neg.	Positivo
2	<i>S. mexicana</i>	Neg.	Positivo
3	<i>C. obtusifolia</i>	Neg.	Positivo
4	<i>L. styraciflua</i>	Neg.	Positivo
5	<i>A. farnesiana</i>	Neg.	Positivo
p	Rifampicina (25 µg/mL y 12.5 µg/mL)	Pos.	Positivo

Fuente: Experimental. Depto de citohistología Facultad de ciencias Químicas y Farmacia USAC.