

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

**ACTIVIDAD INHIBITORIA DE CINCO EXTRACTOS DE ARBUSTOS CONTRA
M. tuberculosis y *M. smegmatis***

Informe de Tesis

Presentado por

MARITZA SAMAYOA PELÁEZ

Para optar el título de

QUÍMICA BIÓLOGA

Guatemala, enero 2008

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

**ACTIVIDAD INHIBITORIA DE CINCO EXTRACTOS DE ARBUSTOS CONTRA
M. tuberculosis y *M. smegmatis***

MARITZA SAMAYOA PELÁEZ

QUÍMICA BIÓLOGA

Guatemala, enero 2008

JUNTA DIRECTIVA

Oscar Cóbar Pinto, Ph.D.	Decano
Lic. Pablo Ernesto Oliva Soto	Secretario
Licda. Lillian Raquel Irving Antillón, M.A.	Vocal I
Licda. Liliana Vides de Urízar	Vocal II
Licda. Beatriz Eugenia Batres de Jiménez	Vocal III
Br. Mariesmeralda Arriaga Monterroso	Vocal IV
Br. José Juan Vega Pérez	Vocal V

DEDICATORIA

Acto que dedico:

Principalmente a Dios por darme el entendimiento, paciencia y sabiduría para completar mi etapa universitaria.

A la Virgen María por interceder ante su hijo Jesucristo por darme la fuerza y el valor para completar la carrera.

A mi familia por apoyarme incondicionalmente.

AGRADECIMIENTO

A Dios por permitirme finalizar mi etapa de estudio y empezar un nuevo ciclo profesional.

A mi madre por su comprensión y amor brindado. GRACIAS

A mi padre por su apoyo.

A mi hermana por su ayuda incondicional.

A mi abuelita Bertha por sus enseñanzas.

A Juan Fernando por su apoyo y ayuda en la finalización de la tesis.

A la Universidad de San Carlos de Guatemala, por acogerme durante estos cinco años de estudio y darme la oportunidad de egresar de sus gloriosas instalaciones.

A los catedráticos de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, por su paciencia, enseñanza; especialmente a la Licda. Vivian Matta de García y al Lic. Armando Cáceres por asesorarme; Licda. Margarita Paz de Ramírez, Licda. María Luisa García de López y Licda. María del Carmen Bran.

A mis compañeros de promoción, con especial cariño: Emily, Silvia, Leslie, Carol, Irsia, Amalia y Alejandro.

ÍNDICE

	Pàgina
I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCIÓN	2
III. ANTECEDENTES	3
A. Género <i>Mycobacterium</i>	3
B. <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	6
C. Medicina Natural para el tratamiento de tuberculosis	17
D. Plantas de Estudio	20
IV. JUSTIFICACIÓN	25
V. OBJETIVOS	26
VI. HIPÓTESIS	27
VII. MATERIALES Y MÉTODOS	28
A. Universo	28
B. Muestra	28
C. Recursos Humanos e Institucionales	28
D. Materiales y Equipo	28
E. Procedimiento	30
F. Diseño de Investigación	34
VIII. RESULTADOS	36
IX. DISCUSIÓN	38
X. CONCLUSIONES	42
XI. RECOMENDACIONES	43
XII. REFERENCIAS	44

I. RESUMEN

La tuberculosis pulmonar es una enfermedad infectocontagiosa, que es transmitida casi exclusivamente por vía aérea por las secreciones respiratorias contaminadas con el bacilo ácido-alcohol resistente *Mycobacterium tuberculosis*. Es un problema a nivel mundial principalmente por el surgimiento de cepas resistentes a los antibióticos de primera elección, lo cual es causado por el uso incorrecto de éstos, el fracaso del tratamiento no supervisado y el manejo inapropiado de los programas de control. Esto ha hecho necesario investigar los recursos botánicos que Guatemala posee para obtener y validar otras alternativas terapéuticas que permitan a la población guatemalteca combatir las infecciones respiratorias y contar con una medicina eficaz y segura para la población afectada.

En este trabajo se evaluaron cinco extractos de arbustos contra *M. tuberculosis* y *M. smegmatis* siendo ellas *Sida rhombifolia* (escobillo), *Senecio salignus* (chilca), *Solanum torvum* (lavaplatos), *Dorstenia contrajerva* (contrahierba) y *Bougainvillea glabra* (bougainvillea).

La evaluación se realizó por medio de un bioensayo, determinándose *in vitro* la actividad contra *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium smegmatis*, en base a la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) utilizando el cromóforo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil bromuro de tetrazolio (MTT) como indicador de la actividad.

Los retos se llevaron a cabo en microplacas con fondo redondo, utilizando como control positivo la rifampicina a una concentración de 1mg/ml. Los extractos etanólicos de las plantas se evaluaron en diluciones seriadas de 6.25, 12.5, 25, 50, 100 µg/ml.

Los extractos estudiados contra *M. tuberculosis*, no mostraron efecto inhibitorio ($p \leq 0.5$), sin embargo el extracto etanólico de *Sida rhombifolia* sí tuvo efecto inhibitorio contra *M. smegmatis*, a una CIM de 25 µg/ml con una $p > 0.5$, de cinco repeticiones y un $\alpha = 0.05$.

Se recomienda seguir realizando estudios de diferentes extractos de uso popular contra infecciones pulmonares, con diferentes disolventes y a diferentes concentraciones a fin de determinar si existe actividad micobactericida *in vitro* contra *M. tuberculosis* y *M. smegmatis*. Así mismo realizar estudios simultáneos *in vitro* para encontrar la similitud entre estas dos micobacterias disminuyendo el porcentaje de contagio por *M. tuberculosis*.

I. INTRODUCCIÓN

La tuberculosis pulmonar es una enfermedad infectocontagiosa, causada por la bacteria ácido-alcohol resistente *Mycobacterium tuberculosis*. Es transmitida casi exclusivamente por aerosolización de las secreciones respiratorias contaminadas y, por ser de comienzo insidioso, causar sintomatología inespecífica y no permitir tomar las medidas necesarias para su tratamiento. Esta situación ha provocado mal uso de los antibióticos específicos para esta enfermedad, aumentando el número de cepas multirresistentes. Por ello se hace necesario obtener nuevas alternativas terapéuticas que permitan a la población mejorar su calidad de vida.

Es importante mencionar que Guatemala tiene una gran diversidad botánica, por lo que es de suma importancia aplicar alternativas médicas mediante las plantas de uso popular medicinal. Sin embargo es necesario validarlas científicamente, para que el pueblo guatemalteco cuente con fuentes de fármacos eficaces y seguros.

En esta investigación se evaluó la inhibición de cinco extractos de arbustos contra *M. tuberculosis* y *M. smegmatis*, estos arbustos son: *Sida rhombifolia*, *Senecio salignus*, *Solanum torvum*, *Dorstenia contrajerva* y *Bougainvillea glabra*. Esta evaluación se realizó por medio de un bioensayo para determinar su actividad *in vitro*, con base en la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM), para lo cual se utilizó el reactivo cromóforo 3-(4,5dimetil-tiazol-2-y1)-2,5-difenil bromuro de tetrazolio (MTT) como indicador de actividad contra estas bacterias.

Los extractos de arbustos que presenten menor Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) podrán ser de interés para realizar futuros estudios químicos a fin de dilucidar los compuestos responsables de la actividad contra éstas micobacterias.

II. ANTECEDENTES

A. Género *Mycobacterium*

1. Generalidades

Las micobacterias son bacilos aerobios no esporuladores; inmóviles y de 0.2 a 0.6 μm de longitud por 1 a 10 μm de ancho. Contienen una pared celular compleja, rica en lípidos por lo que su superficie es hidrofóbica; siendo esta la razón de su resistencia a muchos desinfectantes y a las tinciones comunes de laboratorio; su esqueleto es peptidoglucano y moléculas de arabinogalactanomicolato unidas por enlaces covalentes y cubiertas por lípidos libres y polipéptidos. Este esqueleto es relativamente uniforme en todas las especies de micobacterias y representa el elemento fundamental de la pared celular, que en el momento de su crecimiento poseen la propiedad distintiva de ácido-alcohol resistencia, atribuida a la presencia, de un lípido llamado ácido micólico; propiedad descubierta por Rober Koch (1,2).

Los lípidos tienen ceras, micósidos específicos de especies y el factor de cordón que se asocia al alineamiento en paralelo de las filas de bacilos, que es una de las características de las cepas virulentas. Las cadenas peptídicas de la capa externa comprenden un 15% del peso de la pared celular y tienen antígenos biológicos de importancia, los que estimulan la respuesta inmune celular del paciente ante esta infección (1).

2. Clasificación

El género contiene una amplia gama de tipos ecológicos, que incluyen especies saprofitas presentes en el suelo y también microorganismos parasíticos que han sido cultivados *in vitro* (3).

Las micobacterias se clasifican en seis grupos desde el punto de vista bacteriológico, basados en su velocidad de crecimiento (rápido o lento, según sea inferior o superior a una semana en medio sólido) y producción de pigmento en presencia o ausencia de luz (fotocromógeno o escotocromógeno) pudiendo observar esta división en la tabla No.1. Algunas de estas micobacterias se han descrito como patógenas, otras pueden ser patógenas oportunistas y finalmente otras que, aunque pueden encontrarse en productos patológicos humanos, hasta el momento son saprófitas (4).

TABLA 1.- CLASIFICACIÓN DE LAS MICOBACTERIAS

<u>Grupos de crecimiento lento</u>	Grupo I Fotocromógenas	Grupo Escotocromógenas	II Grupo cromógenas	III	No
	<i>M. kansasii</i>	a) Pigmento rosa-rojo:	<i>M. avium</i>		
	<i>M. asiaticum</i>	<i>M. lactis</i>	<i>M. intracellulare</i>		
	<i>M. intermedium</i>	b) Pigmento amarillo-naranja:	<i>M. gastri</i>		
		<i>M. gordonae</i>	<i>M. terrae</i>		
		<i>M. scrofulaceum</i>	<i>M. triviale</i>		
		<i>M. flavescens</i>	<i>M. nonchromogenicum</i>		
		<i>M. szulgai</i>	<i>M. malmoense</i>		
		c) Pigmento irregular	<i>M. haemophilum</i>		
		<i>M. xenopi</i>	<i>M. shimoidei</i>		
		<i>M. simiae</i>	<i>M. celatum</i>		
		<i>M. ulcerans</i>	<i>M. interjectum</i>		

<u>Grupos de crecimiento rápido</u>	Grupo Fotocromógenas	IV Grupo Escotocromógenas	V Grupo cromógenas	VI	No
	<i>M. marinum</i>	a) Pigmento rosa-rojo:	<i>M. fallax</i>		
		<i>M. engbaeckii</i>	<i>M. fortuitum</i>		
		b) Pigmento amarillo-naranja:	<i>M. chelonae</i>		
		<i>M. acapulcense</i>	<i>M. abscessus</i>		
		<i>M. aurum</i>	<i>M. agri</i>		
		<i>M. duvalii</i>	<i>M. chitae</i>		
		<i>M. gadium</i>	<i>M. moriokaiense</i>		
		<i>M. neoaurum</i>	<i>M. confluentis</i>		
		<i>M. gilvum</i>	<i>M. mucogenicum</i>		
		<i>M. obuense</i>			
		c) Pigmento irregular			
		<i>M. thermoresistibile</i>			
		<i>M. parafortuitum</i>			
		<i>M. diernhoferi</i>			
		<i>M. smegmatis</i>			
		<i>M. austroafricanum</i>			

Tomado de: Cassal Manuel. Diagnóstico microbiológico de las infecciones por *Mycobacterium*. Procedimientos en Microbiología Clínica. España. 1999:123

Según los síndromes clínicos que causan las especies patógenas de micobacterias pueden clasificarse en forma general, de la manera siguiente:

a) Complejo tuberculosis

Incluye las especies *M. tuberculosis* (descubierta en 1882), *M. bovis* (incluida la cepa BCG, cepa utilizada en la vacuna contra la tuberculosis) y *M. africanum*, productoras todas ellas de tuberculosis. Se incluye también *M. microti*, productor de la tuberculosis en rata (4,5).

M. africanum ha sido aislado únicamente en ciertas partes de África, mientras que *M. bovis* todavía está presente en muchos países por el consumo de leche cruda. Ambas especies se presentan como microorganismos más cortos y rollizos que el bacilo tuberculoso humano y su aislamiento primario suele ser más difícil. *M. bovis* es menos aerotolerante que *M. tuberculosis* pero es más patógeno para los animales experimentales (1).

b) Otras micobacterias

Se incluyen aquí a las micobacterias no comprendidas dentro de los complejos tuberculosis y leprae. Deben de individualizarse y denominarse cada una según su nombre binomial aceptado científicamente. Microscópicamente en una baciloscopia pueden parecer idénticas a *M. tuberculosis* y confundirse con ella (4).

i) *Mycobacterium smegmatis*

Especie de micobacteria que fue la primera reconocida después de *M. tuberculosis*, es una micobacteria sapróbica de escaso potencial patógeno. Se clasifica dentro del grupo IV de Runyon, como micobacteria de desarrollo rápido, aunque Casal la incluye en el grupo V de micobacterias escotocromógenas de crecimiento rápido. Habitualmente es resistente a la isoniacida, rifampicina y macrólidos, siendo sensible al etambutol, aminoglucósidos, tetraciclinas, cotrimoxazol e imipenem; algunas cepas presentan mutación en el gen *gyrA* que confieren resistencia a las 4-fluorquinolonas. Esta micobacteria puede producir ocasionalmente pigmentación (6).

Para los estudios sobre estructura y función del genoma micobacteriano para la transferencia genética se ha usado *M. smegmatis* (4).

Su papel en la patología humana se reconoció en 1988, se ha asociado con infecciones en el paciente con enfermedad broncopulmonar obstructiva, con infecciones de la piel y partes blandas después de un traumatismo, cirugía e inyecciones de esteroides y otros medicamentos, así como en infecciones articulares. Las cepas aisladas de muestras de herida son casi siempre clínicamente significativas mientras que, en las secreciones respiratorias, su significado es más dudosa, siendo necesario para ser considerada como tales, que se aislen repetidamente y en pacientes con enfermedad crónica respiratoria.

Dicha micobacteria es de crecimiento rápido, cuya temperatura óptima de cultivo es de 28°C. El 50% de las cepas clínicas producen una pigmentación amarillo-naranja tardía (2 semanas), por lo que Murria la considera como una micobacteria no cromógena. La colonia es habitualmente elevada, rugosa y de bordes festoneados (6).

B. *Mycobacterium tuberculosis*

Es la micobacteria de mayor importancia relacionada con infecciones respiratorias. Los detalles de su crecimiento, patogenicidad, contagio, tratamiento y otras características de importancia se enumeran a continuación.

1. Descripción

Bacilo ácido-alcohol resistente, de crecimiento lento que forma colonias no pigmentadas y requiere de 3 a 8 semanas para su crecimiento. Es un patógeno estricto y parásito intracelular, siendo su reservorio el hombre. Su pared celular es compleja, con un esqueleto de peptidoglucano y moléculas de arabinogalactanomicolato unidas por enlaces covalentes y cubiertas por lípidos libres y polipéptidos. Aproximadamente el 25% de su peso seco está constituido por los lípidos libres de las capas exteriores de la célula. Estos lípidos contienen ceras, micósidos específicos y el factor de cordón (6,6"-dimicolato de trehalosa). El factor de cordón se asocia con el alineamiento paralelo de las filas de bacilos. Las cadenas peptídicas de la capa externa comprenden un 15% del peso de la pared celular y tienen antígenos biológicos de importancia, los que estimulan la respuesta inmune celular del paciente ante la infección. Los preparados extraídos y parcialmente purificados de estos derivados proteicos se utilizan como reactivos para la prueba cutánea en la que se mide la exposición a *M. tuberculosis* (2,4).

2. Patogenia e Inmunidad

Entre algunos de los determinantes de la patogenicidad de *M. tuberculosis* se encuentran:

- a) Factor cordón: existe correlación entre la virulencia y el aspecto morfológico en el cultivo. Las cepas más atenuadas y avirulentas presentan un patrón aleatorio en acúmulos amontonados en penachos sin orientación característica, mientras que las cepas más virulentas adoptan forma de cordones serpenteantes constituidos por bacilos que se disponen en forma paralela y compacta.
- b) Sulfátidos: son glicolípidos localizados de forma periférica y responsables de la reactividad al rojo neutro asociada con las cepas virulentas. Se ha demostrado correlación entre la elaboración

de sulfátidos en cultivo y el grado de virulencia para el cobayo en una serie de cepas de tipo salvaje, las que están distribuidas dentro de un amplio espectro de virulencia.

La tuberculosis (TB) se transmite casi exclusivamente mediante aerosolización de las secreciones respiratorias contaminadas que alcanzan la vía aérea terminal; una vez deglutidos por los macrófagos alveolares, los bacilos comienzan a multiplicarse libremente y acaban destruyendo las células fagocitarias. La respuesta de una persona después de la exposición a bacilos tuberculosos virulentos depende de la acción recíproca de dos respuestas inmunológicas principales: la inmunidad celular adquirida y la hipersensibilidad retardada. La aparición de la hipersensibilidad a las proteínas del bacilo tuberculoso es responsable de la destrucción tisular de la enfermedad. La sensibilización se desarrolla 3 a 4 semanas después de la infección y se detecta por la prueba de la tuberculina (4,7).

3. Tuberculosis pulmonar

a) Definición

La tuberculosis pulmonar es una enfermedad causada por *M. tuberculosis*. Su comienzo suele ser insidioso y manifiesta síntomas inespecíficos como malestar general, pérdida de peso, tos y sudoración nocturna. La expectoración es escasa o bien sanguinolenta y purulenta. La expectoración y la hemoptisis suelen asociarse a la tuberculosis cavitada. La diseminación hematógena de los bacilos durante la fase inicial de la multiplicación en el pulmón da como resultado la tuberculosis extrapulmonar. Los focos más frecuentes de infección son los ganglios linfáticos, la pleura y el tracto genitourinario (7).

Se estima que de 3-4% de los individuos infectados desarrollan tuberculosis activa durante el primer año tras la conversión de tuberculina y un total de un 5-15% lo harán más tarde. El riesgo de progresión de la enfermedad es mayor en individuos inmunodeprimidos, en la infancia, en el grupo de edad de 15 a 25 años y en los ancianos. En el momento actual, el principal factor de riesgo es la infección por VIH, como un desencadenante poderoso de la epidemia de tuberculosis, siendo probable que los individuos infectados por VIH y *M. tuberculosis* desarrollen una TB activa, salvo que se adopte una terapia profiláctica o sobrevenga una complicación fatal (7,8).

La tuberculosis ha resurgido como un problema de salud mundial por la aparición de fuentes infectantes con cepas bacterianas resistentes, lo que se atribuye al uso incorrecto de los

antibióticos, al fracaso del tratamiento no supervisado y al manejo inapropiado de los programas de control (8).

b) Contagio

Los determinantes más importantes para el contagio son la proximidad del contacto y la infectividad de la fuente de infección (9).

La forma de contagio principal es por contacto interpersonal íntimo a través de la inhalación de aire con partículas infectadas. Rara vez se adquiere por ingestión o heridas cutáneas. El foco pulmonar inicial se sitúa en los campos pulmonares medio o inferior a cuyo nivel el bacilo se multiplica libremente (4).

Dentro de los grupos de personas que se estima tienen un alto riesgo de contagio se encuentran:

- Contactos cercanos (aquellos que comparten el mismo hogar u otros ambientes cerrados) de personas que se sospecha o conoce que padecen tuberculosis.
- Infectados por el VIH (portadores de lesiones fibróticas pulmonares residuales)
- Adictos a drogas inyectadas u otras: crack, cocaína, alcohol.
- Poblaciones marginales: inmigrantes, personas sin hogar, etc.
- Residentes y empleados de centros donde se congregan personas de alto riesgo (prisiones, instituciones de salud mental, albergues, etc.)
- Inmigrantes recientes (menos de 5 años) de regiones donde la tuberculosis es prevalente (África, Asia, América Latina)
- Personas que presentan situaciones clínicas que aumentan el riesgo de tuberculosis activa como:
 - Diabetes mellitus insulino dependiente o con mal control metabólico
 - Peso corporal inferior en un 10% al ideal
 - Insuficiencia renal crónica avanzada
 - Tratamientos prolongados con corticoesteroides u otros inmunosupresores.
 - Gastrectomía, derivación yeyunoileal
 - Alteraciones hematológicas (leucemia, linfoma)
 - Lesiones malignas (cáncer de cabeza o cuello)
- Profesionales sanitarios que están en contacto con pacientes de alto riesgo (7).

c) Diagnóstico

La contribución del laboratorio microbiológico permite realizar el diagnóstico, detectar la infección e iniciar el aislamiento de micobacterias, el cual necesita especial precaución (10).

La infección al principio suele ser asintomática. Cuando la lesión ha alcanzado un volumen suficiente, la absorción de la proteína tuberculínica y otras sustancias antigénicas originan la aparición de síntomas generales como anorexia, pérdida de peso, astenia, lasitud, fatiga, fiebre, escalofríos, sudores nocturnos y adelgazamiento.

Los síntomas relacionados específicamente con la reacción inflamatoria local en el pulmón son de grado variable así como el tiempo de inicio; aunque tiende a aparecer algo más tarde. La tos y el esputo son los síntomas más constantes locales y previsibles. Al igual que la hemoptisis y el dolor torácico que son fortuitos e imprevisibles. La hemoptisis puede depender de lo rápido que la lesión caseosa o de ulceración está drenando en un bronquio.

Se necesita realizar una radiografía de los pulmones para observar las lesiones en placas que se localizan primariamente en las zonas apicales posteriores (9).

Entre los datos de laboratorio se encuentran que en la infección crónica suele haber anemia normocítica normocrómica intensa. El número de glóbulos blancos suelen hallarse dentro de límites normales. Cuando se observe leucocitosis intensa debe sospecharse de una complicación por otra infección bacteriana. La velocidad de eritrosedimentación casi siempre se encuentra elevada. La hematuria o la piuria pueden dirigir la atención hacia tuberculosis renales coexistentes (10).

Algunas veces en la tuberculosis crónica se encuentra un valor bajo de sodio sérico debido a retención anormal de agua, la que se atribuye a la secreción inadecuada de hormona antidiurética.

El hallazgo de bacilos ácido alcohol resistentes (BAAR) en extensiones teñidas con Ziehl-Neelsen o Kinyoun, que presentan un color rojo brillante, es la primera evidencia de la presencia de micobacterias en una muestra clínica (1). Es el procedimiento más fácil y rápido que se puede efectuar y que aporta al clínico una orientación preliminar del diagnóstico (9).

La visualización de BAAR en esputo no es afirmativa de *M. tuberculosis* porque otras micobacterias pueden también causar enfermedad pulmonar. Sin embargo, una baciloscopia positiva en conjunción con la clínica y hallazgos radiológicos puede utilizarse para un diagnóstico presuntivo de micobacteriosis (4,8).

El reporte de resultados debe realizarse según el número de bacilos observados en 100 campos. En la tabla No.2 se da una guía del reporte de resultados estandarizado por la Organización Panamericana de la Salud (OPS).

TABLA No. 2

Método estandarizado para el informe de las baciloscopias (OPS)

Informe de baciloscopia	
No se encuentran BAAR en 100 campos observados	(-)
Menos de 1 BAAR por campo, en promedio, en 100 campos observados	(+)
Entre 1 a 10 BAAR por campo en promedio, en 50 campos,	(++)
Más de 10 BAAR por campo, en 20 campos observados	(+++)

(BAAR: bacilos ácido-alcohol resistentes)

Tomado de: Broglia. *et, al.* Criterios de diagnóstico y tratamiento de la tuberculosis infantil. *Pediatría*. 2002; 100(2):159-178.

Se ha demostrado que son necesarios de 5,000 a 10,000 bacilos por ml de esputo para el reconocimiento en el microscopio directo, en estos casos el cultivo detecta de 10 a 100 colonias de micobacterias viables (4).

La forma de diagnóstico a largo plazo es el cultivo de *M. tuberculosis* por tres razones:

- Los cultivos son mucho más sensibles que los exámenes microscópicos, pudiendo detectar una cantidad tan pequeña como 10 bacterias por ml. de muestra clínica digerida y concentrada.
- El aislamiento en cultivo puro es necesario normalmente para poder identificar la especie de la cepa aislada.
- Si la baciloscopia es un índice de la eficacia del tratamiento, el cultivo permite asegurar la negativización y curación del paciente (4).

Para llevar a cabo el cultivo es necesario el medio Lowenstein-Jensen, medio con huevo que es el más empleado. Es un medio muy sensible, de costo relativamente bajo, pero de conservación delicada (+4°C) y de corta duración. Además, las colonias de *M. tuberculosis* tienen un aspecto típico sobre este medio. Después de 15-50 días de estar en la incubadora a 37°C las colonias aparecen primero en forma minúscula, redondeadas con superficie lisa y tinte blanquecino, luego toman un aspecto seco, verrugoso de coliflor, mientras que su tinte vira al crema-beige y puede alcanzar 5-10 mm de diámetro. El buen desarrollo de las colonias se

produce únicamente cuando la hidratación y la aireación de los cultivos son satisfactorias. En los medios secos las colonias se desarrollan mal o no se desarrollan. En los medios mal aireados son colonias pequeñas, aplanadas de superficie lisa y pueden pasar por *M. africanum* o *M. bovis* (10).

La identificación de la especie en estudio se basa en una serie de pruebas bioquímicas, de las cuales las más importantes para la identificación de *M. tuberculosis* son: la reducción de nitratos (NO₃), la resistencia a la hidracida del ácido tiofeno carboxílico (TCH) y de la producción de niacina (test de la niacina). La prueba de nitrato reductasa debe realizarse en un cultivo de 28 días, recomendándose el método de Vietanen. *M. tuberculosis* reduce los nitratos a nitritos mientras que *M. africanum* y *M. bovis* no los reducen; al mismo tiempo *M. tuberculosis* es naturalmente resistente a 2 mg/l de TCH mientras que *M. bovis* y algunas variedades de *M. africanum* son naturalmente sensibles. El test de niacina debe realizarse en un cultivo de 42 días y su positividad corresponde a la demostración de la acumulación de una cantidad importante de ácido nicotínico, lo cual es casi específica de *M. tuberculosis* (10).

En la tabla No.3 se muestran las características para la identificación de las micobacterias de la tuberculosis y de las micobacterias atípicas, según su respuesta a varios test.

Tabla No. 3

Caracteres de identificación de las micobacterias de la tuberculosis y de las micobacterias atípicas

	Aspecto de la colonia	Catalasa 22°C	68°C	Crecimiento favorecido por el piruvato	TCH 2mg/l	NO ₃	Test de la niacina
<i>M. tuberculosis</i>	er	+	-	-	R	+	+
<i>M. africanum</i>	dr	+	-	+	S	-	-
<i>M. bovis</i>	ds						
	v	+	-	+	S	-	-
Micobacterias atípicas		+	+	-	R	v	-

e: eugónica; d: disgónica; r: rugosa; s: lisa; v: variable; S: susceptible; R: resistente.

Tomado: Boletín Unión Internacional contra la tuberculosis. 1982, 57:25

d) Tratamiento

El objetivo del tratamiento es curar la infección, para lo cual se prescriben dosis orales diarias de drogas múltiples, ya que el uso de droga única es de baja prescripción debido al crecimiento de varios microorganismos, aumentando así el apareamiento de cepas mutantes multiresistentes a drogas (3).

Entre las drogas de uso múltiple se pueden incluir las combinaciones de rifampicina, isoniazida, pirazinamida y etambutol, hasta que los resultados de los cultivos y las pruebas de susceptibilidad drogas ayuden a orientar la selección de las drogas a utilizar. El tratamiento se suele administrar durante seis meses, aunque es posible que se requieran cursos más prolongados de la droga en pacientes con SIDA o aquellos en quienes la enfermedad responde lentamente. Para la tuberculosis atípica o para las variedades resistentes a la droga, existen otros tipos de medicamentos y duración diferente de la terapia para tratar la infección.

Se puede solicitar la hospitalización del paciente para prevenir la propagación de la enfermedad a otras personas hasta que se supere el período de contagio (2 semanas) con la terapia de medicamentos. La actividad normal se reanuda después de superar la crisis inicial (11).

Respecto a los mecanismos de persistencia bacteriana y de la naturaleza persistente se sabe muy poco, en el intento de explicar esto Mitchinson sugirió que la lesión tuberculosa puede ser considerada como la agrupación de varios compartimentos. El primer compartimento contiene bacilos en la replicación activa, localizados en la pared cavitaria que es levemente alcalina; el segundo compartimento contiene bacilos que no están en replicación tan activa, presentes en un ambiente ácido, ya sea en el interior del macrófago o en un tejido inflamado. El tercer compartimento contiene bacilos, interiores en la célula, así como del caseum anóxico y denso, que ocasionalmente presenta una activación metabólica. El cuarto comportamiento presenta bacilos durmientes (11).

Como resultado de estos cuatro compartimentos fisiológicos, algunos medicamentos son bactericidas *in vitro*, pero son incapaces de penetrar a todos estos comportamientos y con los cuales no se puede contar para curar al paciente. El tratamiento se divide en tres fases, la primera fase que dura 1 ó 2 semanas, existe una destrucción rápida de las bacterias que se dividen libremente en las paredes de la cavidad, lo cual provoca una significativa disminución de la contagiosidad del paciente, incluso si todavía no hay curación. En la segunda fase, que dura 1 ó 2 meses, se destruye la gran mayoría de las bacterias que se replican lentamente en el interior del macrófagos y en el tejido caseoso. En la fase final se destruyen los escasos bacilos resistentes. La importancia relativa de los principales medicamentos antituberculosos varía según la fase, isoniazida y rifampicina son particularmente activas contra los bacilos que se multiplican activamente en la pared cavitaria, pirazinamida destruye los bacilos presentes en ambientes

ácidos, mientras que la rifampicina es el único agente activo contra los bacilos que ocasionalmente presentan una reactivación de su metabolismo (12).

Es de considerar que no sólo la capacidad de los medicamentos es efectivo sino así también las dosis de cada una de ellas, por ello en la tabla No.4 se describe cada una de las dosis que se deben de dar de los medicamentos antituberculosos.

Tabla No. 4
Dosis en adultos de los medicamentos antituberculosos

Medicamento	Diaria	2 veces/semana	3 veces/semana
Isoniazida	5 mg/kg max 300 mg	15 mg/kg max 900 mg	15 mg/kg max.900 mg
Rifampicina	10 mg/kg max 600 mg	10 mg/kg max 600 mg	10 mg/kg max 600 mg
Pirazinamida	15-30 mg/kg max 2 g	50-70 mg/kg max 4 g	50-70 mg/kg max 3g
Etambutol	15-25 mg/kg max 2,5g	50 mg/kg max 2,5 g	25-30 mg/kg max 2,5 g
Estreptomina	15 mg/kg max 1g	20-30 mg/kg max 1,5g	25-30 mg/kg max 1g

Tomado de: Roman. M. Tratamiento de la tuberculosis en la atención primaria. Facultad de Medicina de la Universidad de Córdoba

La resistencia bacteriana a uno o más de los medicamentos antituberculosos constituye un factor limitante para obtener la curación de cada paciente individualmente y por ende para erradicar la enfermedad de la comunidad; en términos prácticos, este factor debe ser considerado en relación con otros, que intervengan en la erradicación de la enfermedad con el objetivo de determinar su importancia relativa y la magnitud de recursos necesarios para resolver el problema (12).

Clínicamente la resistencia se divide en dos tipos: la resistencia adquirida implica la aparición de resistencia durante el tratamiento; mientras que la resistencia primaria significa que un paciente fue infectado inicialmente con una cepa resistente (12).

La incidencia y rapidez del surgimiento de cepas multirresistentes a drogas especialmente a la isoniazida y rifampicina ha creado una emergencia contra la tuberculosis a nivel mundial y urge tomar las medidas necesarias para curar los casos de tuberculosis y evitar que siga propagándose la variante fármacorresistente de esta enfermedad. La más importante de esas medidas consiste en asegurar que el tratamiento sea el adecuado, en particular en los casos con esputo positivo, comprobando el seguimiento de la medicación mediante la observación directa y supervisada de la toma de los fármacos por el paciente de acuerdo con lo previsto en los regímenes normalizados (13).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Unión Internacional contra la Tuberculosis y las Enfermedades Pulmonares (IUATLD) recomienda el uso de combinaciones de dosis fija (CDF) contra la tuberculosis como medida adicional para garantizar un tratamiento idóneo (11).

La mayoría de los pacientes que presentan tuberculosis no tienen una historia de tratamiento previo; por lo que el grado de resistencia en un paciente con historia de tratamiento previo es proporcional a la cantidad de tratamiento antiTB que haya tenido anteriormente.

Entre las nuevas drogas para utilizar contra las micobacterias encontramos las que presentan una actividad de larga duración como las fluoroquinolonas, oxazolidinonas y nitroimidazopirinas en las cuales hay una disminución en el crecimiento de *M. tuberculosis* pero no la elimina completamente (8).

La administración diaria de isoniacida (INH) ha sido recomendada para la profilaxis de TB; sin embargo niveles elevados de esta droga han llevado a los pacientes a presentar farmacoresistencia, haciendo de la INH una terapia dudosa.

Se reporta la disminución de los niveles de resistencia a estreptomycin (STR) desde la introducción del etambutol (EMB) en los regímenes antiTB a nivel mundial (14).

El tratamiento incompleto para las infecciones de tuberculosis crónica, por ser éste prolongado y caro, puede contribuir a la proliferación de cepas de bacterias resistentes a la droga (3).

De acuerdo con la OMS, Guatemala posee una tasa de incidencia de tuberculosis de 28.2/100000, en donde los fármacos con niveles más altos de resistencia primaria en el año de 1998 fueron INH (17.6%) y STR (17.6%) (Tabla No.5) y probablemente reflejan el hecho que estos hayan sido los fármacos más comúnmente utilizados en la terapia antiTB en Guatemala por un largo período (14).

Tabla No. 5
Patrones de fármaco-resistencia en tuberculosis, Guatemala enero-octubre 1998

	Resistencia Primaria Previo		Resistencia a Tratamiento	
	Número	Porcentaje	Número	Porcentaje
Numero total cepas estudiadas	148	100 %	18	100 %
Sensible 5 fármacos	109	73.6 %	13	72.2 %
Cualquier resistencia	39	26.4 %	5	28.8 %
INH (0.2 ug/ml)	26	17.6 %	4	22.2 %
INH (10.0 ug/ml)	16	10.8 %	3	16.7 %
RIF (1.0 ug/ml)	7	4.7 %	3	16.7 %
EMB (7.5 ug/ml)	3	2.0 %	1	5.6 %
STR (2.0 ug/ml)	26	17.6 %	4	22.2 %
STR (10.0 ug/ml)	11	7.4 %	1	5.6 %
PZA	3	2.0 %	2	11.1 %
Monoresistencia	22	14.9 %	1	5.6 %
INH (0.2 ug/ml)	9	6.1 %	1	5.6 %
STR (2.0 ug/ml)	13	8.8 %	0	0.0 %
Multiresistencia MDR	7	4.7 %	3	16.7 %
INH+RIF	2	1.4 %	0	0.0 %
INH+RIF+STR	2	1.4 %	1	5.6 %
INH+RIF+STR+PZA	3	2.0 %	2	11.1 %
Otros patrones	10	6.8 %	1	5.6 %
INH+EMB	2	1.4 %	0	0.0 %
INH+STR	7	4.7 %	0	0.0 %
INH+EMB+STR	1	0.7 %	0	0.0 %

Tomado: Rodríguez, A *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, 1998. Revista de RECCAVIR.2002; 14-20

e) Pronóstico

Los síntomas se pueden aliviar en 2 ó 3 semanas y el mejoramiento se puede comprobar mediante radiografías de tórax, posterior a la recuperación clínica. El pronóstico es excelente si la tuberculosis se diagnostica a tiempo y se inicia el tratamiento (8).

f) Complicaciones

Todos los medicamentos utilizados para tratar la tuberculosis tienen algún grado de toxicidad. La rifampicina y la isoniazida pueden producir hepatitis no infecciosa. La rifampicina produce, además, una coloración café o anaranjada en las lágrimas y en la orina. Las personas que toman etambutol deben hacerse exámenes de los ojos ya que esta droga puede afectar la

visión. Cualquier erupción, dolor abdominal, ictericia, hormigueo en los dedos de las manos y de los pies pueden ser signos de la toxicidad de una droga y deben ser reportar de inmediato.

Otras complicaciones son la resistencia a la droga para cepas particulares de tuberculosis crónica y la recurrencia de la enfermedad en algunos pacientes (11).

g) Prevención

En los programas de control de la tuberculosis existen tres estrategias principales prevención:

1. Búsqueda activa de casos y su tratamiento oportuno para reducir fuentes de infección.
2. Vacunación con Bacilo de Calmette y Guérin (BCG) para disminuir la susceptibilidad a la infección.
3. Quimiopprofilaxis a todo paciente infectado con riesgo de enfermar (15,16).

h) Vacuna BCG

Es una vacuna que se desarrolla en base a cepas atenuadas de *M. bovis*, produciendo una reacción tipo celular, fue incorporada al Programa Ampliado de Inmunización (PAI) desde 1974 (15,16).

La OMS, recomienda la vacunación de rutina con BCG en aquellos países donde la incidencia de la infección por *M. tuberculosis* es $>$ al 1%, o la prevalencia $>$ al 10%, la duración del efecto protector no se conoce con certeza, aunque se estima que es de alrededor de 8 a 10 años (9,16).

El efecto de la vacuna es limitar la multiplicación de bacilos tuberculosos y su diseminación hematogena tras la infección primaria. No actúa sobre la preinfección exógena y no está comprobado su papel en la reactivación endógena.

La eficacia clínica de la vacunación BCG (casos de tuberculosis evitados) es muy variable y se expresa como su efecto protector en individuos tuberculino negativos en el momento de la vacunación (16).

i) Características de la vacuna

La vacuna BCG es una preparación liofilizada, constituida por bacterias vivas obtenidas de un cultivo de bacilos bovinos atenuados (9,16).

Esta cepa tiene disminuida la virulencia pero conserva la capacidad para proteger contra la tuberculosis, crear sensibilidad a la tuberculina y dejar cicatriz en la mayoría de los vacunados. Se presenta liofilizada en frasco ampolla de 10, 20 o más dosis, debiéndose reconstituir con la

cantidad de diluyente indicada por el laboratorio productor. Una vez reconstituida debe ser utilizada dentro de las 8 horas, es decir en la jornada de trabajo.

La potencia de la vacuna depende de la cepa utilizada, de la dosis y de la correcta conservación y manejo. Se requiere de un sistema de refrigeración y vigilancia permanente de la temperatura hasta su uso, antes de que expire. No se debe exponer la vacuna a la acción de la luz solar ni a otra fuente de rayos ultravioleta. Actualmente, el método de preparación está estandarizado, siendo la OMS la responsable del control de la calidad de la vacuna, Es así que desde el año 1987 la OMS recomienda administrar la vacuna BCG a los hijos de madres HIV positivas, siempre que sean asintomáticos, en zonas de alta incidencia de TBC, y donde el riesgo de contraer la enfermedad supera los riesgos potenciales de la vacuna (16,9).

C. Medicina natural para el tratamiento de tuberculosis

Al surgir cepas multiresistentes de *M. tuberculosis* es necesario buscar otras alternativas para su tratamiento, por lo que es importante conocer medicina natural que es utilizada popularmente para combatir esta enfermedad.

1. Estudios a nivel mundial

Se han realizado varios estudios con el fin de buscar nuevas alternativas para el tratamiento para tuberculosis, entre éstas está el uso de diferentes plantas utilizadas tradicionalmente. En estos estudios se ha demostrado la actividad contra *M. smegmatis* y *M. tuberculosis* de diversas plantas.

Salle y cols en 1996, evaluaron a los extractos *Arctotis auriculata* y *Helichrysum crispum* encontrando actividad contra *M. smegmatis* (17).

Lall y Meyer en 1999 evaluaron las plantas *Croton pseudopulchellus*, *Ekebergia capensis*, *Euclea natalensis*, *Nidorella anomala*, *Chenopodium ambrosioides*, *Helichrysum melanacme* y *Polygala myrtifolia* encontrando actividad contra *M. tuberculosis* por método radiométrico, presentando actividad contra cepas resistentes a una concentración mínima de 0.5 mg/ml contra la cepa H37Rv (18).

Crofton, en 2000 encontró que un extracto de la planta *Morinda citrifolia* posee actividad contra *M. tuberculosis* (19).

Lall y cols en 2001, estudiaron la planta *Helichrysum caespititium* encontrando actividad contra *M. tuberculosis* por medio del método agar planta donde se encontró que la concentración inhibitoria mínima es de 0.5 mg/ml (20). Posteriormente en el mismo año Meyer realizó un estudio con *Euclea natalensis* encontrando actividad contra *M. tuberculosis* a una concentración inhibitoria mínima de 100 mg/ml (21).

Jiménez-Arellanes y cols en 2002 realizaron un estudio con las plantas *Artemisia ludoviciana*, *Chamaedora tepejilote*, *Lantana hispida*, *Juniperus communis* y *Malva parviflora* las que presentaron actividad contra *M. tuberculosis*. Evaluaron también si *M. avium* era inhibida por *Juniperus communis* y *Lantana hispida*, encontrando que *Lantana hispida* fue la más activa contra las dos micobacterias (22).

Stavri y cols en 2002 evaluaron la raíz de la planta *Peucedanum ostruthium*, encontrando actividad contra *M. abscesus*, *M. aurum*, *M. fortuitum*, *M. phlei* y *M. smegmatis*, los extractos que fueron evaluados en un rango de 3.4 a 107.4 μmol encontrando la concentración inhibitoria mínima de 5 $\mu\text{mol/ml}$ (23).

Newton y cols en 2002 estudiaron las plantas *Psoralea corylifolia* y *Sanguinaria canadensis* y evaluaron la actividad contra *M. aurum* y *M. smegmatis*, por medio de extractos metanólicos, encontrando que la concentración inhibitoria mínima fue de 62.5 $\mu\text{mol/ml}$ para *M. aurum* para las dos plantas (24).

Stavri y cols en 2003 realizaron otro estudio con la planta *Ducrosia anethifolia*, encontrando actividad contra *M. fortuitum*, *M. aurum*, *M. phlei* y *M. smegmatis* utilizando el Soxhlet para obtener extractos, evaluando un rango de concentración de 64-128 $\mu\text{mol/ml}$ (25).

Woldemichael y cols en 2003 analizaron los componentes de *Sapium haemospermum* contra *M. tuberculosis* en la Universidad de Arizona se determinó que el compuesto extraído con cloroformo y metanol tiene una inhibición en el crecimiento de esta bacteria con un CIM de 25 $\mu\text{g/ml}$ (26).

Okunade y cols en 2004 estudiaron las plantas *Cryptolepis sanguinolenta*, *Sanguinaria canadensis*, *Cleistopholis patens*, *Lysiorotus pauciflorus*, *Peudedanum ostrethium*, *Glycyrrhiza inflata*, *Physalis angulata*, *Combretum molle* demostrando en bioensayos *in vitro* que presentaban actividad contra *M. tuberculosis* (27).

Schinkourtz y cols, en 2003 realizaron estudios *in vitro* con la fracción 6,7-hidróxicumarina de la planta *Peucedanum ostruthim* Koch, observando inhibición del crecimiento de las bacterias *M. abscesus*, *M. aurum*, *M. fortuitum*, *M. plelei* y *M. smegmatis*, entre el rango 3.4 a 107.4 $\mu\text{m/ml}$ en comparación con el etambutol e isoniazida, mientras que el compuesto 7 hidróxicumarina solo fue activa con un CIM de 0.79 $\mu\text{m/ml}$ (28).

2. Plantas y estudios en Guatemala

Teniendo en cuenta que son varias las bacterias que causan enfermedades a nivel respiratorio; especialmente en personas con el sistema inmune comprometido por diferentes enfermedades de tipo crónico como es el cáncer, VIH, leucemias, etc. Es importante evaluar los diferentes microorganismos que afectan el tracto respiratorio superior como el inferior ya que hay bacterias que solo afectan el tracto superior, pero en el momento que la persona sufra de una enfermedad crónica estos microorganismos pueden desplazarse y afectar el sistema respiratorio inferior.

En Guatemala se han realizado varios estudios *in vitro* con extractos de diferentes plantas utilizadas popularmente en el tratamiento de infecciones respiratorias para determinar y establecer medidas alternativas en infecciones pulmonares.

Álvarez en 1987 determinó la actividad de 16 extractos contra *Streptococcus pyogenes* y *Staphylococcus aureus* produciendo inhibición *Eucalyptus globulus* a una concentración de 1.25 mg/ml contra *S. pyogenes* y *Thymus vulgaris* a una concentración de 0.31 mg/ml contra *S. aureus* (29).

Ovando en 1989 determinó la actividad de 15 extractos contra *Streptococcus pneumoniae*, *S. pyogenes* y *S. aureus* produciendo inhibición las flores de *Gnaphalium stramineum* con una concentración de 2.9 mg/ml y *Theobroma cacao* con 3.6 mg/ml, contra *S. aureus*, mientras que *Physalis philadelphica* inhibió a una concentración de 1.2 mg/ml a *S. pyogenes*, de 1.6 mg/ml a *S. aureus* y 2.3 mg/ml a *S. pneumoniae* (30).

Madariaga en 1992 evaluó los extractos de las plantas *Bougainvillea glabra*, *Byrsonima crassifolia*, *Caparia biflora*, *Punica granatum*, *Ruta chalepanensis*, *Sida acuta*, *Sida rhombifolia* y *Solanum torvum*, contra las cepas de *S. pneumoniae* y *S. pyogenes* causante de infecciones en el sistema respiratorio, en donde se determinó que *P. granatum* y *R. chalepanensis* tiene una concentración inhibitoria mínima (CIM) de 4 mg/ml contra *S. pneumoniae*, los extractos de *S.*

torvum con una CIM de 5 mg/ml así mismo que *B. crassifolia* y *P. granatum* contra la cepa de *S. pyogenes* (31).

En el mismo año Zavala realizó un estudio de 10 plantas *Bombax ellipticum*, *Solanum mammosum*, *Bougainvillea glabra*, *Adiantum capillus-veneria*, *Sida rhombifolia*, *Plantago major*, *Pluchea odorata* y *Physalis pubescens* contra *S. pyogenes* en donde solamente *P. pubescens* presentó halos de inhibición de poca significancia (32).

Manrique en 1992 realizó el primer trabajo de tesis en Guatemala contra *M. tuberculosis*, en donde evaluó las especies *Eucalyptus globulus*, *Achillea millefolium*, *Nasturtium officinale*, *Rumex crispus*, *Acacia farnesiana* y *Sida acuta* contra micobacterias, encontrando que no poseían actividad contra *Mycobacterium tuberculosis* por el método de proporción a una concentración de 1×10^3 micobacterias/ml y 400 mg/ml de extracto (33).

Figueroa realizó el segundo estudio en 2000, encontrando que las especies *Sida acuta*, *Piper auritum*, *Ocimum micranthum*, *Enterolobium cyclocarpum*, *Stachytarpheta cayennensis* presentan actividad contra *M. smegmatis* y *M. tuberculosis* por el método de proporción a una concentración de 2 mg/ml (34).

Mazariegos y cols en 2004 determinaron la actividad antimicobacteriana de 6 plantas contra *M. smegmatis* y *M. tuberculosis* produciendo inhibición las plantas *Quercus crispifolia* y *Enterolobium cyclocarpum* a una concentración de 25 y 50 $\mu\text{g/ml}$ (35).

D. Plantas de Estudio

Las plantas *Sida rhombifolia* (escobillo), *Senecio salignus* (chilca), *Solanum torvum* (lavaplatos), *Dorstenia contrajerva* (contrahierba) y *Bougainvillea glabra* (bouganvilia) serán utilizadas en este estudio, por su uso tradicional para el tratamiento de enfermedades respiratorias (36, 37).

Estos arbustos, exceptuando *Bougainvillea glabra* que es una enredadera, fueron seleccionados por conveniencia de la base de datos del Departamento de Citohistología. Así mismo como su presencia o ausencia en el departamento y su fácil obtención en época de verano.

1. *Sida rhombifolia* L.

a) Nombres comunes

Escoba, Escoba babosa, Escobilla, Escobillo, Escobita, Malva amarilla, Malva blanca (38,39).

b) Descripción

Herbácea de 50 a 150 cm de altura.

c) Hábitat

Especie de hábito terrestre, crece en bosques de encino, pino, pino-encino y otras latifolias, entre los 1960 y 2450 msnm.

d) Usos Medicinal

La planta completa se usa para curar heridas. El follaje es utilizado para las molestias de los riñones. También se utiliza para enfermedades de la piel, en forma de cocimiento en lavados o emplastos.

Los frutos se usan para aliviar úlceras estomacales y gastritis. Para el empacho los frutos se combinan con flor de nopal, clavo, comino, violeta.

El cocimiento de las hojas se usa para curar las siguientes afecciones: hemorragias, dolor de dientes, diarrea, gastritis, problemas biliares, dolores y para lavar granos enterrados. Para controlar la fiebre; se usa como baños o lavados rectales. No se tiene definida la parte de la planta que se usa para curar amigdalitis, asma, gripe, tos, catarro, epilepsia, hemorroides, para acelerar el parto, aperitivo, mal aire, susto, blenorragia, nervios, disentería, se considera pectoral y antiflogístico.

La raíz se utiliza contra el apetito, se cuece la raíz con agua y se toma una taza todas las mañanas (37, 39, 40,41).

2. *Senecio salignus* DC.

a) Nombres comunes

Camiso macho, chilca, flor de dolores, higuera, jaral, jaralillo, jarilla, jarilla amarilla, jarilla blanca, jarilla verde, pajarilla.

b) Descripción

Arbusto de 1 a 2 m de altura, glabro a ligeramente tomentoso; hojas sésiles o subpecioladas, angostamente lanceoladas, de 1.5 a 9 cm de largo y de 2 a 10 (-15) mm de ancho, agudas o acuminadas en el ápice, márgenes con el borde entero o aserrado, atenuadas en la base, glabras en

ambas superficies; inflorescencia paniculada racemosa; cabezuelas radiadas, muy numerosas de 7 a 10 mm de largo, receptáculo plano; flores liguladas y del disco, amarillas, de 5 a 6 mm de largo; el fruto es un aquenio claviforme o subcilíndrico de 1 a 1.5 mm de largo, estriado y pubescente, de color café-verdoso a negruzco, cerdas del vilano de color blanco (38).

c) Hábitat

Planta terrestre, ruderal y arvense, creciendo en bosques de encino a altitudes que oscilan alrededor de 2450 msnm. En bosques de pino-encino es común en altitudes alrededor de 2500 msnm. Se encuentra en climas cálido, semicálido y templado, desde el nivel del mar hasta los 2870 msnm. Crece a la orilla de caminos, campos de cultivo y áreas alteradas (38).

d) Usos Medicinal

El follaje es usado cuando hay cólico. Para el dolor de cintura, pies o reumas; asadas con o sin alcohol y fermentadas. Con el cocimiento se lavan golpes. Para la inapetencia se toma en té. Se hacen enjuagues para el ojo. El follaje es usado también contra la rabia y piquetes de animales ponzoñosos. Los "cogoyos" se colocan y frotan sobre huesos quebrados para que sanen. La parte aérea combinada con otras plantas y vinagre, sirve contra la diarrea, con ajonjolí y alcohol se masajean la espalda contra la inflamación. Con vinagre se pone en el pulmón y se frota (caliente) para aliviar las molestias de la tos y de la gripe; mezclada con hierba santa y manteca cura la esterilidad e inflamación de ovarios. Las flores son utilizadas para aliviar el dolor de hígado, de corazón y el reumatismo.

Las hojas son utilizada para golpes, para tratar la bilis, para fiebres intermitentes y en combinación con otros productos u otras especies como: rosa de castilla, se utiliza contra fiebre y dolor de espalda.

Se usa para padecimientos del riñón, cálculos urinarios, mal de orín, contra el resfriado, la inflamación del oído externo, para la tos y el empacho; considerando que es una especie que favorece la circulación sanguínea, tiene efecto emenagogo y sedante uterino (40,41).

3. *Solanum torvum* Swartz.

a) Nombres comunes

Berenjena, lampazo, lavaplatos, sosa (38,40).

b) Descripción

Arbusto espinoso de hasta 4 m de altura.

c) Hábitat

Presente en forma terrestre, crecen sobre el suelo.

d) Usos Medicinal

Las hojas alivian el dolor de cabeza y fiebre provocadas por tos, gripa; para lavar heridas y quemaduras.

No se tiene definida la parte de la planta que se utiliza para curar enfermedades definidas culturalmente, problemas de la piel y dolores (38).

4. *Dorstenia contrajerva* L.

a) Nombres comunes

Contrahierba; mano de león, hierba de sapo, cambaham, contaúl.

b) Descripción

Plantas acaulescentes o ligeramente, los tallos muy cortos; hojas muy numerosas, largamente pecioladas, pinnadas o al menos palmati-lobados, esparcidamente escabrosas a puberulentas, usualmente rugosas al tacto, los lóbulos agudos y acuminados, ligeramente anchos; receptáculos con largos y delgados pedúnculos, cuadrangulares o débilmente lobado irregulares, acrescentes con la edad y de 2 a 5 cm de ancho, escabrosos por debajo (38,42).

c) Hábitat

En bosque tropical subcaducifolio, caducifolio, subperennifolio y perennifolio. En lugares húmedos sombreados, terreno ondulado. En selva alta perennifolia y bosque mesófilo de montaña. Se encuentra entre los 40 y los 1,800 msnm.

d) Usos Medicinal

Se utiliza la raíz como antídoto para las mordeduras de víbora, la rabia y la intoxicación por alimentos. El tratamiento consiste en ingerir el rizoma seco o pulverizado o bien, elaborar un té con las hojas y el tallo; otros usos comunes son para malestares relacionados con el aparato digestivo tales como bilis, disentería, vómito, dolor de estómago y mala digestión; así como para tratar las caries. La raíz en cocimiento es utilizada en padecimientos ginecológicos o venéreos. El látex se aplica de manera externa para la cicatrización de las heridas, además de emplearse contra la disípela, erisipela y paperas; mientras que por vía oral se utiliza en casos de tos crónica, diabetes, inapetencia y paludismo. Estimulante, tónica diaforética, recomendada en las fiebres pútricas y adinámicas (43).

5. *Bougainvillea glabra* Choisy

a) Nombres comunes

Buganvilia, bouganvilla, boganvilla, trinitaria, bugenvíl, dania, flor de papel, santa rita, veranillo (44,45).

b) Definición

Planta trepadora, de 7 m de alto, perenne, leñosa y arbustiva procedente de Brasil. Las hojas son verde oscuro redondeadas y de consistencia semicarnosa, poseen también hojas modificadas que acompañan a las flores con textura de aspecto similar al papel y de color variable, blancas, violetas, amarillas, naranjas, rojas o moradas (44).

c) Hábitat

Crece en muros, paredes, celosías o pérgolas en zonas cálidas, orientadas preferentemente al sur. Crece bien en las zonas costeras, requieren suelos bien abonados, sueltos y que no retenga mucha agua. Planta nativa del Brasil y posiblemente de Colombia. Son plantas ornamentales que se cultiva en la mayoría de países tropicales y subtropicales de América. En Guatemala se cultiva en todo el país.

d) Usos Medicinales

La infusión de las hojas tiernas y de flores se utiliza para el tratamiento de afecciones gastrointestinales y respiratorias como tos, asma, bronquitis, gripa y tos ferina. La decocción de las raíces se usa para tratar fiebres y efectos de purgante. Se le atribuyen propiedades antitusígena, expectorante, febrífuga y purgante.

e) Farmacología: Estudios antibacterianos demuestra que los extractos acuosos y etanólicos de hojas y flores son inactivos contra *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*; la tintura de brácteas es inactiva contra *Streptococcus pyogenes* y *S. pneumoniae* (45).

III. JUSTIFICACIÓN

La tuberculosis pulmonar es un problema a nivel mundial, que ha resurgido debido a la aparición de fuentes infectantes con cepas bacterianas resistentes, lo que es atribuido al uso incorrecto de los antibióticos, al fracaso de tratamiento no supervisado y al manejo inapropiado de los programas de control. La incidencia en Guatemala se ha aumentado en 28.2%, así como la mortalidad y morbilidad en la población guatemalteca, por lo que es de suma importancia obtener alternativas terapéuticas que permitan a la población mejorar su calidad de vida y reducir el riesgo de contagio entre la demás población.

En Guatemala se han realizado algunos estudios con extractos de plantas que se usan popularmente para el tratamiento de infecciones pulmonares, con el fin de validar su utilidad para el tratamiento de tuberculosis. Los primeros ensayos se realizaron en 1992 con el estudio de seis extractos, en donde se concluyó que tres extractos presentan actividad bacteriostática contra *M. tuberculosis* a una concentración de 400 µg/ml. Así mismo en el año 2000 se determinó que tres extractos etanólicos inhiben el crecimiento de *M. tuberculosis* a concentración de 2 mg/ml.

Teniendo en cuenta lo anterior y que las estadísticas indican que cada día aumenta más la población que padece de tuberculosis pulmonar, es necesario disponer de otras opciones terapéuticas; por lo que en este estudio se determinó la actividad *in vitro* de algunos extractos obtenidos de arbustos contra las cepas de *M. tuberculosis* y *M. smegmatis*, que según estudios etnobotánicos son utilizados para el tratamiento de infecciones respiratorias, para en un futuro proponer medicinas naturales que coadyuven a controlar esta grave enfermedad.

IV. OBJETIVOS

A. Objetivo general

Determinar la actividad *in vitro* de los extractos de cinco arbustos popularmente utilizados para infecciones pulmonares, sobre *Mycobacterium tuberculosis*.

B. Objetivo específicos

1. Establecer la actividad inhibitoria *in vitro* de los cinco extractos de arbustos *Sida rhombifolia*, *Senecio salignus*, *Solanum torvum*, *Dorstenia contrajerva* y *Bougainvillea glabra*, contra las cepas ATCC de *M. tuberculosis* y *M. smegmatis*.
2. Determinar la Concentración Inhibitoria Mínima *in vitro* de los extractos con actividad micobactericida.

V. HIPÓTESIS

Al menos uno de los cinco extractos de arbustos usados para el tratamiento de infecciones respiratorias presenta actividad *in vitro* contra *M. tuberculosis*.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

Universo de trabajo

Plantas popularmente utilizadas para el tratamiento de las infecciones respiratorias; que se encuentran en la base de datos del departamento de Citohistología Humana de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

Muestra

Extractos etanólicos de cinco plantas nativas de Guatemala, estas son: *Sida rhombifolia* (escobillo, corteza), *Senecio salignus* (chilca, hoja), *Solanum torvum* (lavaplatos, hoja), *Dorstenia contrajerva* (contrahierba, hoja) y *Bougainvillea glabra* (Bouganvilia, flor)

Recursos Humanos

- Asesora: MSc. Vivian Matta
- Asesor: Lic. Armando Cáceres
- Investigador: Profa. Maritza Samayoa Peláez

Recursos Institucionales

- Departamento de Citohistología, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Laboratorio de Productos Naturales FARMAYA.
- Proyecto Flora Regional de la Organización de Estados Americanos (OEA).
- Laboratorio Nacional, Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social, Guatemala

Material y equipo

1. Equipo
 - Balanza analítica
 - Autoclave
 - Cabina de Bioseguridad nivel tipo 2
 - Incubadora
 - Refrigeradora
 - Vortex
 - Microscopio
 - Mechero
 - Equipo de Rotavapor Buchi Flawil

- Desecadora
2. Reactivos
- Etanol 70%
 - Etanol 90%
 - Fenol 5%
 - NaOH 0.5 M
 - Silica gel
 - Hipoclorito de sodio 10 mg/l
 - MTT 5 mg/ml
 - Glucosa
 - NaCl
 - Medio Midlebrook 7H9 + OADC.
 - Glicerol
 - Tween 80 al 20%
 - H₂O desmineralizada estéril
 - Ácido Oleico
 - DMSO
 - Medio Löwenstein-Jensen Agar
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
 - Probetas de 25 ml y 100 ml
 - Pipetas automáticas de 2-1000 μ l
 - Pipetas multicanales automáticas 2-1000 μ l

- Tips amarillos de 10-200 μ l
- 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
- Vasos de precipitar
- Cedazo de 3 mm ó 5 mm.
- Tijeras
- Bandejas de recolección
- Balón de 1000 ml
- Caja de Petri de vidrio.
- Marcador
- Cinta adhesiva
- Viales o frascos pequeños para guardar el extracto.

4. Cepas

- *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv obtenida del Laboratorio Nacional
- *Mycobacterium smegmatis* ATCC607 obtenida en el Departamento de Citohistología

Procedimiento

1. Cosecha de la flor *Bougainvillea glabra*

- Se seleccionó y cosechó el material sano, en época de verano, en horas de la mañana, utilizando utensilios, previamente lavados y desinfectados.

2. Forma de colecta

- Flor de *Bougainvillea*: se realizó la colecta de botones, antes de la fructificación para no perder el fruto; de forma manual y antes de la formación de sus semillas de acuerdo con la época de floración, por la mañana cuando no hay rocío.

3. Post-cosecha

Se seleccionó cuidadosamente la planta, desechando las partes decoloradas, manchadas, enfermas o deterioradas por insectos, parásitos o microorganismos, lavando con agua potable de modo que el agua penetre, se escurrió el exceso, se realizó por duplicado y luego se desinfectó con 10 mg/L de hipoclorito de calcio o sodio. El proceso de secado se llevó a cabo a 30-35 °C, extendiendo la planta en capas finas, en una superficie limpia únicamente durante el día (46,47).

4. Procedimiento de extracción continua por percolación:

- a) Se tamizaron las flores para obtener un material más pequeño.
- b) En un percolador previamente limpio y seco, se colocó algodón, de manera que sirviera de filtro en la parte inferior y papel filtro cortado en forma de embudo de acuerdo al diámetro del percolador.
- c) Se colocó la cantidad de material vegetal a utilizar, previamente pesado, en el percolador, rotulándose con el nombre científico de la planta, nombre común, fecha, peso, parte a utilizar de la planta; humedeciendo el material vegetal con etanol al 95% hasta cubrir el material vegetal, chequeando que no quedarán burbujas a través de presión con una espátula para destruirlas, dejándose reposar por 48 horas para llevar a cabo la extracción.
- d) Al completar la incubación se abrió la llave de la parte inferior y se dejó gotear el líquido a una velocidad adecuada, recogiendo el líquido en un erlenmeyer y añadiendo suficiente disolvente extra, hasta obtener el volumen de disolvente agregado al inicio.
- e) Para preparar el líquido se concentró en un rotavapor y se repitió la operación hasta que se agotó la droga con el disolvente recuperado (48,49,50,51).

5. Procedimiento de concentración utilizando el rotavapor:

- a) Se colocó el balón colector y se fijó con la llave respectiva, revisando el nivel del agua del baño de calentamiento, engrasando todas las bocas esmeriladas, verificando que estén conectadas todas las conexiones eléctricas y mangueras, encendiendo el baño de maría y manteniéndolo entre 40-50°C.
- b) La llave de alimentación del refrigerante debe estar cerrada y colocando el balón con la muestra, se sujetó el vástago con la llave correspondiente, conectando un sistema de enfriamiento de agua fría y encendiendo la bomba de vacío durante el tiempo necesario para iniciar la destilación.
- c) Al iniciar la destilación, se apagó la bomba de vacío, esta debe ser encendida hasta que se agote el disolvente del balón de evaporación o ya no destile ningún líquido,

d) La recuperación del extracto hasta que llegue a una consistencia semisólida, este es vertido en una caja de Petri de vidrio debidamente tarada y rotulada, colocándola en una desecadora durante 7-15 días. Moviéndolo cada 2 días para que se tenga una desecación homogénea, al tener el extracto una consistencia sólida, se pasó a viales debidamente tarados y rotulados, guardándose a 4 °C (48,50,51,52).

6. Procedimiento de preparación de reactivos:

- a) Preparación del extracto de la planta: 0.04 g del extracto disolver en 4 ml de DMSO dando una concentración 10 mg/ml.
- b) Preparación suplemento de Ruth: 1.70 g de glucosa + 0.42 g de NaCl + 2.5 ml (Ac. oleico + NaOH 0.5 M.) + 50 ml H₂O destilada estéril.
- c) Preparación Medio Midlebrook 7H9 + OADC: se prepararon 500 ml H₂O desmineralizada estéril + 2.61 g del Medio + 1 ml de glicerol.
- d) Preparación de Rifampicina: se debe realizar una concentración de 10 mg/ml con DMSO. Siendo este el control positivo para el estudio.
- e) Preparación de solución de MTT: 3 mg de reactivo + 5 ml de H₂O desmineralizada estéril.
- f) Preparación del Tween 80: Preparar una solución de Tween 80 al 20% en agua destilada.
- g) Preparación de solución reveladora: 1800 µl de MTT + 2160 µl de Tween 80.
- h) Preparación de la solución de micobacterias: para tener activas las cepas de *M. tuberculosis* y *M. smegmatis*, se mantuvieron en medio sólido de Löwenstein-Jensen; al momento de realizar el reto *in vitro*, fueron diluidas en medio Midlebrook hasta obtener una concentración 0.1 del estándar de MacFarland.

7. Normas de Bioseguridad

Para trabajar con *M. tuberculosis* fue necesario utilizar doble bata, doble guantes, en una cabina de bioseguridad con flujo laminar vertical, con mascarilla especial N95 para evitar que las partículas aéreas producidas por esta bacteria afecten a la persona que se encuentran trabajando. Después de realizar el trabajo fue necesario limpiar el lugar la campana de flujo y las superficies con fenol al 5% y alcohol al 70% dejando la luz UV por 15 minutos para no contaminar a las personas que trabajaran después (55).

8. Montaje de la placa:

- a) Se depositaron 200 µl de H₂O destilada estéril en todos los pocillos de la periférica de la placa.
- b) Se depositaron 100 µl del medio Midlebrook 7H9 + OADC a los 60 pocillos restantes.
- c) Se colocaron 100 µl de la dilución de trabajo de cada extracto y la droga.
- d) Se realizaron diluciones dobles seriadas hasta la fila G descartando los 100 µl finales.
- e) Se colocaron 100 µl del inóculo en todos los pocillos con excepción de los pocillos marcados como CM (control de esterilidad del medio)
- f) En los pocillos marcados como CM se colocaron 100 µl más de medio Midlebrook 7H9
- g) Se incubó la placa a 37 °C en cámara húmeda hasta 5 días para *M. smegmatis* y 7 días para *M. tuberculosis*. Cada una de las placas fueron selladas con parafilm y se cubrieron con papel aluminio (53).

En la figura No. 1 se presenta el esquema de distribución de los reactivos utilizados en las microplacas, variando en cada una de ellas el orden de los extractos. Se colocó el control positivo, rifampicina, al mismo tiempo se colocó un control de esterilidad que consistió en el medio de cultivo y el estándar de MacFarland para determinar que el crecimiento bacteriano observado fuera de la micobacteria y no presentara alguna contaminación.

Figura No. 1
Distribución de los reactivos dentro de las microplacas

FILAS	COLUMNAS											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Clave de la Figura No. 1

	Celdas con 200µg/ml de agua
	100µg/ml de extracto + 100µg/ml de medio + 100µg/ml de estándar
	Celdas con control positivo, medio de cultivo y Estándar de MacFarland

En la Tabla No.6 se indica la distribución al azar de los extractos etanólicos estudiados en cada una de las cinco microplacas. Para su interpretación los extractos fueron codificados, quedando así: Extracto 1 *Bouganvillea glabra*, Extracto 2 *Senecio salignus*, Extracto 3 *Solanum torvum*, Extracto 4 *Dortenia contrajerva*, Extracto 5 *Sida rhombifolia*.

Tabla No. 6
Distribución de los extractos en las cinco microplacas

Filas	Número de Repetición				
	1	2	3	4	5
B	Ext. 1	Ext. 5	Ext. 4	Ext. 4	Ext. 3
C	Ext. 2	Ext. 4	Ext. 1	Ext. 3	Ext. 5
D	Ext. 3	Ext. 3	Ext. 5	Ext. 1	Ext. 2
E	Ext. 4	Ext. 2	Ext. 3	Ext. 5	Ext. 1
F	Ext. 5	Ext. 1	Ext. 2	Ext. 2	Ext. 4

9. Revelado de la Placa:

Se le añadieron 10 μ l de MTT 5 mg/ml + 12 μ l de Tween 80 al 20%, incubando la placa 24 horas. Si ocurre formación de un precipitado violeta, se le debe añadir 50 μ l de la mezcla de SDS 20% -DMF 50%. Al producirse un cambio de color en el pocillo control se realizó el ensayo en los pocillos con los extractos (54).

10. Lectura e interpretación de resultados:

Se realizó de manera visual y se definió la CIM como la menor concentración del extracto donde no ocurrió cambio de color y cuya intensidad fue igual o menor a la obtenida en el control (54). Al finalizar el análisis de datos se realizó un consolidado de los resultados obtenidos con cada una de las microplacas para dar un resultado único y sin variantes en las placas incubadas.

F. Diseño de Investigación

1. Experimental. Diseño completamente al azar. Se estudiaron cinco extractos de arbustos de especies popularmente utilizadas para infecciones pulmonares tomando a *M. tuberculosis*; bacteria más patógena que afecta el sistema respiratorio; comparándolo contra *M. smegmatis*, teniendo como base una concentración de 1mg/ml realizando diluciones de 6.25, 12.5, 25, 50, 100 μ g/ml. 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 cinco para un nivel $\alpha = 0.05$.

2. Validez del estudio

Actividad micobactericida de las cepas *M. tuberculosis* H37Rv ATCC 27294 y *M. smegmatis* ATCC 607, para lo cual se utilizó como control positivo rifampicina a una concentración de 1 mg/ml; la cual presenta un 100% de inhibición de dichas cepas y como

control negativo, donde se observó crecimiento de las cepas *M. tuberculosis* H37Rv ATCC 27294 y *M. smegmatis* ATCC 607.

3. Análisis de datos

Se realizó una prueba de hipótesis binomial, donde:

Ho: $p \leq 0.5$ (no tiene efecto)

Ha: $p > 0.5$ (sí tiene efecto)

Se realizaron cinco (5) réplicas, las cuales se clasificaron como “inhibición” o “no inhibición”. Al tener cinco éxitos, se rechaza la Ho, concluyéndose que el extracto presenta efecto significativo ($\alpha = 0.05$)

VIII. RESULTADOS

Se realizó la evaluación *in vitro* de la actividad de cinco extractos etanólicos de arbustos usados para el tratamiento de infecciones pulmonares: *Sida rhombifolia*, *Senecio salignus*, *Solanum torvum*, *Dorstenia contrajerva* y la enredadera *Bougainvillea glabra*, contra las cepas de *M. tuberculosis* H37Rv y *M. smegmatis* ATCC 607.

Los extractos etanólicos de *Sida rhombifolia*, *Senecio salignus*, *Solanum torvum*, *Dorstenia contrajerva*, pertenecen al banco de extractos del Laboratorio de Bioensayos del Departamento de Citohistología de la Universidad San Carlos de Guatemala.

En el caso del extracto de *Bougainvillea glabra*, se obtuvo el extracto etanólico a través de 100.69 g de flor seca, obteniéndose un rendimiento de 123.19 g de extracto.

La tabla No.7 presenta los resultados obtenidos con dichos extractos, contra *M. tuberculosis*, en las que se observó crecimiento en cada uno de ellos y en las cinco repeticiones, por lo que no tiene efecto inhibitorio ($p \leq 0.5$).

Tabla No. 7
CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MINIMA PARA *Mycobacterium tuberculosis*

Plantas	Concentración Plantas µg/ml				
	100	50	25	12.5	6.25
<i>Bougainvillea glabra</i>	+++	+++	+++	+++	+++
<i>Senecio salignus</i>	+++	+++	+++	+++	+++
<i>Solanum torvum</i>	+++	+++	+++	+++	+++
<i>Dorstenia contrajerva</i>	+++	+++	+++	+++	+++
<i>Sida rhombifolia</i>	+++	+++	+++	+++	+++

Fuente: datos experimentales
+++ crecimiento bacteriano.

En la tabla No. 8 se observan los resultados obtenidos en las cinco repeticiones realizadas contra *M. smegmatis* observándose que el extracto etanólico *Sida rhombifolia* si tiene efecto inhibitorio a una CIM de 25 µg/ml ($p > 0.5$ con un $\alpha = 0.05$).

Tabla No. 8
CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MINIMA PARA *Mycobacterium smegmatis*

Plantas	Concentración Plantas μg/ml				
	100	50	25	12.5	6.25
<i>Bougainvillea glabra</i>	+++	+++	+++	+++	+++
<i>Senecio salignus</i>	+++	+++	+++	+++	+++
<i>Solanum torvum</i>	+++	+++	+++	+++	+++
<i>Dorstenia contrajerva</i>	+++	+++	+++	+++	+++
<i>Sida rhombifolia</i>	---	---	+++	+++	+++

Fuente: datos experimentales

+++ crecimiento bacteriano

---- no crecimiento bacteriano

IX. DISCUSIÓN

Existen factores que han favorecido el incremento de la prevalencia de tuberculosis en el mundo; como el aumento de la pobreza en países en vía de desarrollo, crecimiento de los niveles de desnutrición, la falta de apego al tratamiento, el descuido de la vigilancia epidemiológica, la escasez de recursos humanos y económicos para su control, el surgimiento del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) y cepas multiresistentes, por lo que es clara la necesidad de contar con metodologías que permitan realizar estudios que logren determinar la sensibilidad o resistencia a las drogas antituberculosas, para evitar la instauración de tratamientos empíricos que quizás no sólo resulten inefectivos sino que, tal vez, favorezcan la propagación de cepas resistentes a drogas.

El género *Mycobacterium* tiene una pared celular compleja, rica en lípidos y un esqueleto de peptidoglucano con moléculas de arabinogalactanimicolato, dándole una gran resistencia a muchos de los antibióticos, por lo que es necesario utilizar un régimen óptimo de tratamiento de cepas no resistentes, el cual consiste en un coctel de tres, cuatro o cinco agentes de primera línea, según la categoría clínica, radiológica y bacteriológica del paciente. Entre las que se encuentran rifampicina (RIF), isoniazida (INH), pirazinamida (PZA), etambutol (ETB) y estreptomina (SM), administradas diariamente por seis meses hasta un año o más, dependiendo de la gravedad del paciente, combinación generalmente efectiva, aún si la micobacteria es resistente a una de las drogas usadas.

Dichas drogas producen diversas manifestaciones clínicas adversas, por mencionar algunos: daño hepatocelular (INH,RIF), neuropatías periféricas (SM,ETB,INH), neuropatías (INH,SM); por lo que los enfermos de tuberculosis no logran terminar el tratamiento, creando cepas multiresistentes que no reaccionarán después al cóctel farmacológico (3,11,12).

Es importante mencionar que a excepción de la RIF, inhibidor de la ARN polimerasa procariótica, y SM, inhibidor de la síntesis de proteínas, los demás quimioterapéuticos usados actúan sobre la síntesis de los ácidos grasos complejos de las micobacterias. Los mecanismos de resistencia a estas drogas involucran genes cromosomales, por lo que su determinación no es tan fácil, ya que se realiza por métodos moleculares y depende de la cantidad de genes cromosomales implicados y de la comprensión del rol celular de los mismos (56).

El diagnóstico genético, de la resistencia antibiótica de *M. tuberculosis*, permite abreviar el tiempo requerido por los métodos convencionales (antibiogramas), sin embargo a pesar del enorme progreso realizado en los últimos años, todavía existen problemas que limitan su uso cotidiano en el laboratorio. Las técnicas de manipulación genética estudiadas hasta la fecha, han permitido identificar una serie de blancos moleculares que son esenciales para la viabilidad y la virulencia de *M. tuberculosis* y los programas realizados con técnicas de química combinatoria, brindan la probabilidad de producir varios compuestos que luego se prueban en el crecimiento de cultivos contra esta micobacteria.

Lo anterior, en conjunto con el desarrollo de programas interdisciplinarios involucrados en la búsqueda e identificación de principios antituberculosos de origen natural presentes en plantas, constituye la herramienta más promisoría para la obtención de nuevas drogas que puedan utilizarse en el tratamiento de la tuberculosis. Se ha observado en estudios anteriores, que algunos de los extractos estudiados más efectivos que han presentado actividad contra micobacterias son los obtenidos con el diluyente metanol, sin dejar atrás a los clorofórmicos, hexánicos y etanólicos, para extraer los componentes químicos presentes en las plantas, siendo estos principalmente alcaloides, cumarinas, flavonoides (26,57), los cuales se encuentran presentes en las plantas estudiadas, al no utilizar en esta investigación, otros solventes, solamente etanol, limita la extracción completa de estos compuestos químicos, presentes en baja cantidad en algunas plantas estudiadas, *Solanum torvum*, *Bougainvillea glabra*, *Sida rhombifolia*, *Senecio salignus* así mismo como el estudio de otras de las partes de las plantas, las cuales son más ricas en estas sustancias, como las raíces y los tallos de los mismos, y no solamente las hojas que fue lo que se estudio en la mayoría de las planta.

Los laboratorios de investigación microbiológica, deben usar con más frecuencia el método de microplacas para tamizar extractos crudos de plantas y otros productos naturales con probable actividad antituberculosa y como instrumento indispensable para el aislamiento de los compuestos activos mediante purificación biodirigida.

Es importante fomentar y apoyar la investigación clínica y epidemiológica de la tuberculosis pulmonar, desarrollando y perfeccionando métodos de diagnóstico más rápidos y confiables, así como nuevos medicamentos antituberculosos que sean efectivos contra cepas resistentes y de baja toxicidad para el ser humano, por lo que en esta investigación se utilizaron cinco extractos etanólicos de arbustos utilizados popularmente para el tratamiento de infecciones

pulmonares: *Bougainvillea glabra* que es utilizada en infusiones para el tratamiento de afecciones respiratorias como tos, asma y gripe (44,45), *Senecio salignus*, que se frota sobre el tórax, aliviando las molestias de tos y gripe (40,41); *Solanum torvum* hojas utilizadas en infusión para el alivio de tos y gripe (38); *Dorstenia contrajerva*, utilizada para tos crónica en forma de infusión (42,43) y *Sida rhombifolia* en infusión se usa para aliviar amigdalitis, gripe, tos y catarro (38,39).

Para encontrar semejanzas en el tratamiento empírico contra *M. tuberculosis* y disminuir el riesgo de infección al trabajar con esta bacteria patógena, se realizó una comparaciones entre *M. tuberculosis* y *M. smegmatis*, ya que es la segunda micobacteria más conocida, tienen escaso potencial patógeno y es utilizada en el estudio del genoma micobacteriano (4,6), por lo que ha sido seleccionada para encontrar similitudes entre la actividad inhibitoria *in vitro* de los extractos estudiados sobre dicha bacteria, todavía no encontrando similitud, por lo que aún no se puede determinar la utilización de *M. smegmatis* para identificar una actividad *in vitro* de los extractos de plantas para el uso de la infecciones pulmonares.

En esta investigación se realizaron cinco microplacas de cada una de las micobacterias estudiadas; los extractos se colocaron al azar para disminuir el error humano y tener resultados confiables, observándose el cambio de color en los pocillos para determinar la inhibición o crecimiento de las micobacterias, comparándolo con en el control positivo, rifampicina, droga a la cual es susceptible la micobacteria (11,12).

Se concluyó que ninguno de los cinco extractos de arbustos estudiados tiene efecto inhibitorio significativo contra *M. tuberculosis* ($p \leq 0.5$). Mientras que con la cepa de *M. smegmatis*, cuatro de los cinco extractos ensayados no presentaron un efecto inhibitorio ($p \leq 0.5$) y solamente el extracto etanólico de la corteza de *Sida rhombifolia* presentó efecto inhibitorio en las cinco repeticiones a una CIM de 25 $\mu\text{g/ml}$ ($p > 0.5$).

En Guatemala en los años 1992 y 2000 se realizaron los primeros bioensayos con diferentes extractos de arbustos de uso popular para el tratamiento de infecciones pulmonares, en donde se utilizó el método de proporción, observándose que ninguno de ellos, hasta el momento, presentó actividad inhibitoria contra *M. tuberculosis* (33,34), por lo que es necesario seguir realizando estudios *in vitro* para determinar actividad inhibitoria de extractos utilizados por la población guatemalteca para tratar infecciones respiratorias.

Es importante mencionar que al realizar la lectura en forma visual de las microplacas se dificulta la determinación de la CIM, en cada uno de los pocillos, por lo que se recomienda la

ayuda de un espectrofotómetro de ELISA, para establecer si los extractos estudiados tienen efecto inhibitorio, en comparación con el control positivo y así mismo se recomienda realizar diluciones con diferentes disolventes y otras partes de las plantas para lograr extraer algún componente inhibitorio contra estas micobacterias.

X. CONCLUSIONES

1. Ninguno de los cinco extractos etanólicos de arbustos utilizados popularmente para infecciones respiratorias presentó actividad inhibitoria *in vitro* contra *M. tuberculosis* y cuatro no presentaron actividad contra *M. smegmatis*
2. El extracto etanólico de *Sida rhombifolia* inhibió el crecimiento de *M. smegmatis* a una Concentración Inhibitoria Mínima de 25 µg/ml, con una $\alpha = 0.05$
3. No se encontró similitud en la inhibición *in vitro* de las cepas de *M. tuberculosis* y *M. smegmatis*, hasta el momento.

XI. RECOMENDACIONES

1. Realizar estudios de los extractos obtenidos con diferentes disolventes y a diferentes concentraciones a fin de determinar si existe actividad micobactericida *in vitro* contra *M. tuberculosis* y *M. smegmatis*.
2. Se recomienda realizar la lectura final de las microplacas con un espectrofotómetro para ELISA, para disminuir el error humano.
3. Realizar nuevos estudios simultáneos *in vitro*, con diferentes extractos de plantas, para encontrar similitudes entre *M. tuberculosis* y *M. smegmatis*, para disminuir así el número de contagio por esta micobacteria.

IX. REFERENCIAS

1. Koklik *et al.* Microbiología. 17ª. Edición. Editorial Médica Panamericana. Argentina 1993, 685-717
2. Brock. Biología de los microorganismos. 8va. Edición. Editorial Prentice Hall. 2001, 986
3. Murray P, Drew W, Kobayashi G, Thompson J. Microbiología Médica. Editorial Mosby-Doyma S.A. España. 1992, 218-225
4. Casal M *et al.* Procedimientos en Microbiología Clínica: Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. España. 1999.
5. Koneman *et al.* Diagnostico Microbiológico. 5ta edición. Editorial Médica Panamericana. Argentina. 1999: 860-926
6. Azmar J. *Mycobacterium smegmatis*. Control Calidad SEIMC. Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Virgen del Rocío. España. 2000
7. Roman M. Tratamiento de la tuberculosis en la atención primaria. Facultad de Medicina de la Universidad de Córdoba. 1996, 37 (Monografía)
8. Mendez A. *et al.* Controlling multidrug-resistant tuberculosis and access to expensive drugs: a rational framework. Boletín de la Organización de Salud Mundial 2002, 80:489-49
9. Broglia B. *et al.* Criterios de diagnóstico y tratamiento de la tuberculosis infantil. Pediatría. 2002, 100(2):159-178
10. Grosset J. *et al.* El laboratorio: su rol en el diagnóstico y el tratamiento de la tuberculosis. Boletín de la Unión Internacional Contra la Tuberculosis. 1982, 57:234-240
11. Clancy E. Transmisibilidad de la tuberculosis. Boletín de la Unión Internacional contra la Tuberculosis y Enfermedades Respiratorias. Col. 65. No. 2, 1990:77-78
12. Grange J.M Resistencia a drogas y eliminación de la tuberculosis. Boletín de la Unión Internacional contra la tuberculosis y Enfermedades respiratorias. 1990 (65), 63-66
13. Blomberg B. *et al.* The rationale for recommending fixed-dose combination tablets for treatment of tuberculosis. Bulletin of the World Health Organization, 2001, 79(1);61-67
14. Rodríguez A. *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, 1998. Revista de RECCAVIR.2002;14-20

15. Comstock G.W Prevención de la tuberculosis. Boletín de la Unión Internacional contra la tuberculosis y Enfermedades respiratorias. 1990/1991(66) 9-12
16. Nelson *et al.* Tratado de pediatría. 6ta edición. Salvat Editores. Barcelona, 1974 (I) 616-617.
17. Salle F. *et al.* Preliminary antimicrobial screening of four South African *Asteraceae* species. Journal of Ethnopharmacology, 1996:52(1) 27-33
18. Lall N, Meyer J. *In vitro* Inhibition of drug-resistant and drug-sensitive strains of *Mycobacterium tuberculosis* by Ethnobotanically selected South African plants. Journal of Ethnopharmacology, 2003, 347-354p
19. Crofton J. Planta Noni contra tuberculosis. Agencia EFE. Diciembre, 2000 1009-15
20. Lall N. *et al.* Inhibition of drug-sensitive and drug-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* by diospyrin, isolated from *Euclea natalensis*. Journal of Ethnopharmacology, 2001, 78: 213-216
21. Meyer J. *et al.* *In vitro* inhibition of drug-resistant and drug-sensitive strains of *Mycobacterium tuberculosis* by *Helichrysum caespititium*. South African Journal of Botany 2002, 68: 90-93
22. Jiménez-Arellanes A. *et al.* Activity against Multidrug-resistant *M. tuberculosis* in Mexican Plants used to Treat Respiratory Diseases. Phytotherapy Research. 2003, 17:903-908
23. Stavri M, *et al.* Ostruthin; An Antimycobacterial Coumarin from the roots of *Peucedanum ostruthium*. Plant Med. 2003, 69: 369-371p.
24. Newton M *et al.* The evaluation of forty-three plant species for in vitro antimycobacterial activities; isolation of active constituents from *Psoralea corylifolia* and Sanguinary Canadensis. Journal of Ethnopharmacology. 2002, 79:57-67
25. Gibbons S *et al.* Pangelin. Antimycobacterial Coumarin from *Ducrosia anethifolia*. Planta Medica 2003, 69:956-959
26. Woldemichael G.M *et al.* *Mycobacterium tuberculosis* growth inhibition by constituents of *Sapium haemospermum*. Journal of Natural Products, 2004(67), No. 4: 598-603
27. Okunade *et al.* Flora of the British West Indian Islands 2004, 526: 165-167
28. Schinkourtz A *et. al* Ostruthin: An Antimycobacterial coumarim from the Proots of *Peucedanum ostruthium* Plant Med 2003 69: 369-361

29. Álvarez A. Inhibición de *Sreptococcus pyogenes* y *Staphylococcus aureus* por extractos usados en el tratamiento de afecciones respiratorias. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia Universidad de San Carlos de Guatemala, 1987: 47 (tesis de graduación)
30. Ovando A. Acción antibacteriana *in vitro* en plantas comúnmente usadas para el tratamiento de afecciones respiratorias. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia Universidad de San Carlos de Guatemala, 1989: 57 (tesis de graduación)
31. Madariaga A. Inhibición *in vitro* de *S. pogenes* y *S. pneumoniae* por extractos etanólicos de las plantas: *Boungavillea glabra* Choisy, *Byrsoonima crassifolia* L. *Caprania biflora* L. *Punica granatum* L. *Ruta chalapensis*, *Sida acuta*, *Sida rhmbifolia* y *Solanum torvum* popularmente utilizadas en el tratamiento de infecciones respiratorias. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia Universidad de San Carlos de Guatemala, Abril 1992: 53 (tesis de graduación)
32. Zavala C. Inhibición *in vitro* de *S. pyognes* por extractos vegetales de *Bombax ellipticum*, *Solanum mammosun*, *Bouganvillea glabra*, *Adiantun capillus-veneris*, *Sida rhombifolia*, *Plantago major*, *Solanum americanum*, *Tagetes lucida*, *Pluchea adorata* y *Physalis pubescens* usados en el tratamiento de afecciones respiratorias. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia Universidad de San Carlos de Guatemala, Enero 1992: 33 (tesis de graduación)
33. Manrique S. Acción Antimicobacteriana *in vitro* de seis plantas medicinales usadas en el tratamiento de Tuberculosis. USAC 1992: QB 0414: 14-20 (tesis de graduación)
34. Figueroa L. Determinación de la actividad contra *Mycobacterium smegmatis* y *Mycobacterium tuberculosis* de extractos de plantas de uso medicinal en Guatemala. USAC 2000: QB0635: 34-40 (tesis de graduación)
35. Mazariegos A *et al*, Actividad micobactericida de extractos de plantas utilizadas popularmente para infecciones pulmonares en Guatemala, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia Universidad de San Carlos de Guatemala, 2004: 50 (proyecto de Investigación CYTED)
36. Martínez M. Las plantas Medicinales de México. 6ta edición. México. Azteca 1992: 656
37. Mena M. Obtención y Aprovechamiento de Extractos Vegetales de la Flora Salvadoreña. 2da edición. San Salvador. Editorial Universitaria. 1994: 580

38. Especies con Usos No Maderables en Bosques de Encino, Pino y Pino-Encino
<http://www.semarnat.gob.mx/pfnm>
39. Villamara, A *et al*, Atlas de las plantas de la Medicina Mexicana Tradicional III, 1994, México, Instituto Nacional Indigenista.
40. Institute of Pacific Islands Forestry Pacific Island Ecosystems at Risk (PIER).
<http://www.hear.org/pier/index.html>
41. Ray M. Healing with plants in the America and Mexicans West. Editorial Universidad Arizona. Estados Unidos. 1996: 248-249
42. Plant of the Week: *Dorstenia contrajerva* Contra Heirba Moraceae.
<http://www.plantoftheweek.org/>
43. Ayensu E. Medical Plants of the West India. Reference's Publications 1981.
44. Baganvilla (*Bougainvillea glabra* Choisy)
http://www.consumer.es/web/es/alimentacion/salud_y_alimentacion/plantas_medicinales/2003/03/04/58580.php
45. Cáceres A. Plantas de Uso Medicinal en Guatemala. Editorial Universitaria. Guatemala 1996: 376
46. Nikolai E. CYTED. Fundamentos de Tecnología de productos Fitoterapéuticos: Materias Primas Vegetales para la Industria de Productos Fitoterapéuticos 1° Edición Bogotá Colombia 2000.
47. Martínez *et al*. Fundamentos de Agrotecnología de Cultivo de Plantas Medicinales Iberoamericanas: Tecnologías Agrícolas para la Producción de Plantas Medicinales. Santa Fe Bogotá Colombia 2000.
48. Kuklinski C. Farmacognosia. Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural. Omega. Barcelona 2000: 515
49. Medilla B. Manual de laboratorio de Farmacognosia Guatemala. USAC 1996: 38
50. Real Farmacopea Española 2da edición Madrid Ministerio de Sanidad y Consumo España 2002: 2801
51. Sharapin N. Fundamentos de Tecnología de productos Fitoterapéuticos. Santa Fe de Bogotá. Convenio Andrés Bello y CYTED 2002: 247
52. Manual del Fabricante Buchi Flawil: Buchi laboratorio : 44
53. Manual de procedimientos del Proyecto biodiversidad OEA 1993: 2-3

54. Protocolo Alamar Azul/MTT. Departamento de Citohistología. Universidad San Carlos de Guatemala, 1998: 10
55. Treatment of tuberculosis: American Thoracic Society, CDC, and Infectious Diseases Society of America. MMWR 2003; 52(No. RR-11).
56. Quiros. E. Bases moleculares de resistencia de *Mycobacterium tuberculosis*. Temas de Actualidad. Madrid. Revista Diagnóstico Biológico. 2001,50:4
57. Dulger. B. *et al.* Antimicrobial studies on three *Hypericum* species from Turkey. South African Journal of Botany 2002,68:90-93
58. Wayne D. Bioestadística. Base para el análisis de las ciencias de la salud. Editorial Noriega. México 1998: 245-345