

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



**ACTIVIDAD MICOBACTERICIDA DE EXTRACTOS DE ÁRBOLES
POPULARMENTE UTILIZADOS PARA INFECCIONES PULMONARES**

SILVIA PATRICIA QUIÑONEZ RECINOS

QUÍMICA BIÓLOGA

GUATEMALA, FEBRERO DE 2008

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

**ACTIVIDAD MICOBACTERICIDA DE EXTRACTOS DE ÁRBOLES
POPULARMENTE UTILIZADOS PARA INFECCIONES PULMONARES**

INFORME DE TESIS

PRESENTADO POR

SILVIA PATRICIA QUIÑONEZ RECINOS

POR OPTAR EL TÍTULO DE

QUÍMICA BIÓLOGA

GUATEMALA, FEBRERO DE 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. Lilian Vides de Urizar	Vocal II
Licda. Beatriz Eugenia Batres de Jiménez	Vocal III
Br. Mariesmeralda Arriaga Monterroso	Vocal IV
Br. José Juan Vega Pérez	Vocal V

DEDICATORIA

- A Dios
Por haberme permitido hacer de este sueño una realidad y darme salud, sabiduría y fortaleza en todo momento.
- A Mis Padres
Enio Romeo Quiñonez Aranda,
Silvia Esperanza Recinos de Quiñonez.
Por su infinito amor y apoyo incondicional.
- A Mi Hija
Stephanie Johana Quiñonez Recinos.
El ser más querido y el ángel que ilumina mi vida.
- A Mis Hermanos
César Romeo Quiñonez Recinos,
Karla Emperatriz Quiñonez Recinos.
Por formar parte importante de mi vida.
- A Mi sobrina
Katherine Daniela Quiñonez Ramos.
Con cariño sincero.
- A Mis abuelitas
Angélica Raquel Aranda
Josefina Marroquín.
Por su apoyo y confianza.
- A Mis abuelitos
Saúl Salome Recinos (Q.E.P.D.),
José Alfredo Quiñonez Rizo (Q.E.P.D.).
Por que se que donde quieran que estén se sienten orgullosos de este logro en vida.
- Tíos, primos, cuñados, familia y amigos
Con cariño y respeto.
- A Mis compañeros
Con especial cariño a Alejandro, Maritza, Emily, Bernarda y Vinicio.
- A la Universidad de San Carlos de Guatemala
Por la educación que fue inculcada durante mis años de carrera.

AGRADECIMIENTO

A Dios	Por darme la oportunidad de alcanzar mis metas.
A la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia	Por la oportunidad de desarrollo que me brindo.
A Mis Padres	Por su sacrificio y apoyo a lo largo de mi vida.
A Mis Asesores y Revisores	M.Sc. Vivian Matta, Lic. Armando Cáceres, Lic. María Luisa García de López, Lic. Osberth Morales. Personas que me apoyaron en el desarrollo de la tesis.

INDICE

I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCION	3
II. ANTECEDENTES	
A. Género <i>Micobacteria</i>	4
1. Generalidades	4
2. Clasificación	5
3. <i>Micobacterias</i> patógenas al hombre	5
B. Tuberculosis	9
1. Definición	9
2. <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	9
3. Formas de tuberculosis	10
4. Tuberculosis pulmonar	11
5. Tuberculosis pulmonar en Guatemala	22
C. Medicina natural	23
1. Medicina natural para la tuberculosis	24
2. Plantas y estudios a nivel mundial	24
3. Plantas y estudios a nivel nacional	27
4. Plantas utilizadas en el reto	28
III. JUSTIFICACIÓN	35
IV. OBJETIVOS	36
V. HIPÓTESIS	37
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	38
A. Universo de trabajo	38
B. Muestra	38
C. Recursos	38
D. Procedimiento	41
E. Diseño estadístico y validez del método	44
VII. RESULTADOS	46
VIII. DISCUSION	48
IX. CONCLUSIONES	50
X. RECOMENDACIONES	51
IX REFERENCIAS	52

I. RESUMEN

Las plantas medicinales son plantas que en uno o más de sus órganos contiene sustancias que pueden ser utilizadas con finalidad terapéutica para prevenir, atenuar o curar un estado patológico; dando lugar a tratamientos menos agresivos o que son precursores para la semisíntesis químico-farmacéutica. En la población guatemalteca el uso de plantas medicinales es una práctica popular y muy común por lo que su utilización sigue una línea ascendente que ha permitido el uso de los recursos naturales para el tratamiento tradicional de diferentes enfermedades.

La tuberculosis pulmonar es una enfermedad infecciosa, provocada en la mayor parte de casos por *Mycobacterium tuberculosis*, la cual se trasmite principalmente por contacto interpersonal íntimo a través de la inhalación de aire con partículas infectadas, rara vez se adquiere por ingestión o heridas cutáneas. Su comienzo suele ser insidioso, manifestando síntomas inespecíficos como malestar general, pérdida de peso, tos y sudoración nocturna.

El diagnóstico de la tuberculosis se basa en las manifestaciones clínicas, radiológicas, anatomía patológica que son muy inespecíficos y en la confirmación mediante técnicas bacteriológicas y serológicas. Su tratamiento se fundamenta en la asociación de los fármacos para evitar la selección de resistencia y la necesidad de tratamientos prolongados para poder matar a todos los bacilos en sus diferentes fases de crecimiento.

En este estudio se determinó la actividad micobactericida de cinco árboles utilizados popularmente en infecciones pulmonares, los cinco extractos etanólicos utilizados fueron *Cecropia obtusifolia* (guarumo), *Bursera simaruba* (palo de jiote), *Guazuma ulmifolia* (caulote), *Byrsonima crassifolia* (nance) e *Hymenaea courboril* (guapinol).

Esta evaluación se realizó por medio del bioensayo colorimétrico de bromuro 3-(4.5-dimetiltiazol-2-y 1)-2,5-difenil tetrazolio (MTT), en el cual el cambio de coloración de los pozos permite establecer la presencia de la actividad micobactericida de los extractos de los

árboles, así como la concentración en la que se presenta. Se logró determinar que ninguna de las plantas evaluadas presentó actividad contra *M. tuberculosis* ATCC H37Rv en un rango de concentración de 100 a 6.52 µg/ml. Solamente *B. simaruba* presentó actividad contra *M. smegmatis* ATCC 607, a una concentración mínima inhibitoria de 50 µg/ml.

Con este trabajo se logró validar el micrométodo colorimétrico MTT con cepas ATCC, para establecer la actividad micobactericida *in vitro* de extractos de árboles, obteniéndose resultados repetibles y se determinó la actividad bactericida de los extractos de árboles contra *M. smegmatis* y *M. tuberculosis*, encontrando que los resultados obtenidos no se correlacionaron entre sí para ambas micobacterias.

La diversidad biológica de Guatemala ha permitido el uso de los recursos naturales para el tratamiento tradicional de diferentes enfermedades, por lo que es necesario llevar a cabo este tipo de estudios para validar la utilización de tratamientos naturales para la tuberculosis.

II. INTRODUCCION

La tuberculosis es una enfermedad infecciosa, transmisible que es provocada por la bacteria *Mycobacterium tuberculosis*. Este es un bacilo ácido-alcohol resistente, aerobio, no esporulador, de crecimiento lento y resistente al frío, congelación y desecación, muy sensible al calor, luz solar y ultravioleta. La vía principal de infección es la inhalación de aire con partículas infectadas que alcanzan la vía aérea terminal, donde son ingeridos por los macrófagos alveolares, los bacilos comienzan a multiplicarse y destruyen las células fagocíticas. ***El diagnóstico es bacteriológico y se basa principalmente en la baciloscopia, en casos más difíciles es el cultivo. Al igual que en los signos característicos de la tuberculosis que son hemoptisis y dolor torácico. Se complementa con exámenes de gabinete como las radiografías que muestra lesiones en placas, principalmente en zonas apicales posteriores.*** La tuberculosis es una de las principales enfermedades crónicas y oportunistas en Guatemala, según la Organización Mundial de la Salud (OMS). Esta infección, es la segunda causa de morbilidad en la población guatemalteca. El tratamiento de la tuberculosis se fundamenta en dos grandes bases bacteriológicas, la asociación de los fármacos para evitar la selección de resistencia y la necesidad de tratamientos prolongados para poder matar a todos los bacilos en sus diferentes fases de crecimiento. Los fármacos de primera línea para el tratamiento de la tuberculosis son isoniazida, rifampicina, pirazinamida, etambutol y estreptomycin, los cuales se administran durante 6 u 8 meses. Debido a la pobreza y desigualdad económica, es necesario usar los recursos naturales para el tratamiento tradicional de diferentes enfermedades. En este estudio, se determinó la actividad micobactericida de los extractos etanólicos de los árboles *Cecropia obtusifolia* (guarumo), *Bursera simarouba* (palo de jote), *Guazuma ulmifolia* (caulote), *Byrsonima crassifolia* (nance) e *Hymenaea courboril* (guapinol) utilizadas para infecciones pulmonares para así validar la utilización de estos tratamientos naturales. Se validó el micrométodo colorimétrico de MTT empleando cepas ATCC como control para su utilización en posteriores estudios y se comparó la correlación entre *M. tuberculosis* y *M. smegmatis*, con el fin de montar un método capaz de establecer, la actividad mínima inhibitoria *in Vitro* de extractos de plantas frente *M. tuberculosis* de manera más rápida.

III . ANTECEDENTES

A. Género *Mycobacterium*

1. Generalidades

El género *Mycobacterium* está integrado por bacilos largos o curvos de 3 a 5 μm de longitud. Son bacilos ácido-alcohol resistentes, por lo que la tinción de Ziehl-Neelsen es útil para su coloración, los cuales aparecen de color rojo brillante sobre un fondo azul. Estos bacilos son difíciles de teñir con la tinción de Gram y se observan como bacilos Gram positivo con tinción irregular (1,2).

Son aerobios estrictos, no formadores de esporas, sin flagelos ni cápsula. La estructura celular de las micobacterias consta de una gruesa pared, separada de la membrana celular por el espacio periplásmico, con cuatro capas. La más interna es el glicopéptido o peptidoglicano con moléculas de N-acetilglucosamina y ácido-N-glucolilmurámico (en lugar del habitual N-acetilmurámico) con cortas cadenas de alanina, excepto en *M. leprae* donde las cadenas son de glicina. Esta capa es el esqueleto de la bacteria que le da forma y rigidez. Externamente, hay otras tres capas compuestas, la interior por polímeros de arabinosa y galactosa, la intermedia formada por ácidos micólicos y la superficial formada por lípidos como los sulfolípidos. El factor cordón, llamado así por su aparente asociación con la forma acordonada con que se agrupan las micobacterias virulentas y el aspecto morfológico en el cultivo. Las cepas más atenuadas y avirulentas presentan un patrón aleatorio en cúmulos 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. (1,3).

La mayoría de las micobacterias se desarrolla de forma adecuada en medios simples que contienen una fuente de carbono, una de nitrógeno e iones de metales esenciales, entre ellos hierro y magnesio. Para el aislamiento primario de muestras clínicas, se requiere un medio

más complejo que contenga una base de patata-huevo o una base de agar-suero. Los bacilos tuberculosos tienen un crecimiento muy lento incluso en condiciones óptimas y requieren de 10 a 20 días de incubación a 37 grados centígrados. Aunque la proliferación puede tener lugar a un pH que oscile entre 6 a 7.6, el pH óptimo de crecimiento es de 7 (1).

2. Clasificación

El género *Mycobacterium* incluye más de 100 especies que pueden clasificarse, desde el punto de vista bacteriológico en seis grupos en base a 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) como se muestra en la tabla 1. Estas micobacterias se han descrito como patógenas, patógenas oportunistas o saprobias.

3. Micobacterias patógenas al hombre

Según los síndromes clínicos que causan las especies patógenas de micobacterias, éstas pueden clasificarse en:

a) Complejo tuberculosis.

Incluye las especies *M. tuberculosis* (el principal causante de tuberculosis en humanos), *M. bovis* (tuberculosis bovina) y *M. africanum* (tuberculosis humana en África). Esta última tiene características intermedias entre *M. tuberculosis* y *M. bovis*. Se incluye también *M. microti*, productor de tuberculosis en roedores.

Son bacilos ácido alcohol resistente, Gram-positivo, no esporógenos y resistentes a muchos desinfectantes, a la desecación y otros factores adversos del medio, debido a que su pared tiene un alto contenido de lípidos (4).

Tabla 1 Clasificación Modificada de Runyon

CLASIFICACIÓN DE LAS MICOBACTERIAS		
Grupo I Fotocromógenas	Grupo II Escotocromógenas	Grupo III No cromógenas
<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. tuberculosis</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. shimoidéi</i>
	<i>M. simiae</i>	<i>M. celatum</i>
	<i>M. ulcerans</i>	<i>M. interjectum</i>
		<i>M. branderi</i>
		<i>M. genavense</i>
Grupo IV Fotocromógenas	Grupo V Escotocromógenas	Grupo VI No cromógenas
<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>	
	<i>M. rhodesiae</i>	
	<i>M. aichiense</i>	
	<i>M. chubuense</i>	
	<i>M. tokaiense</i>	
	c) Pigmento irregular	
	<i>M. phlei</i>	
	<i>M. vaccae</i>	
	<i>M. thermoresistibile</i>	
	<i>M. parafortuitum</i>	
	<i>M. diernhoferi</i>	
	<i>M. smegmatis</i>	
	<i>M. austroafricanum</i>	

No se incluyen en esta clasificación especies que no suelen aislarse de productos patológicos humanos, sino ambientales como: *M. alvei*, *M.*

Tomado de Casal M, *et al.* Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.(1)

b) Complejo lepra.

Se incluyen las especies *M. leprae* (bacilo de Hansen) productor de la lepra humana, y *M. lepraemurium*, que produce lepra en roedores (5).

M. leprae causa una enfermedad granulomatosa crónica que afecta primariamente la piel y los nervios periféricos y secundariamente algunos órganos internos como los testículos y los ojos, las vísceras raramente son afectadas. Dependiendo de la resistencia del huésped, la lepra puede presentarse como una enfermedad benigna (lepra tuberculoide) o como una enfermedad maligna (lepra lepromatosa), pero también puede presentarse en formas intermedias. *M. leprae* es un microorganismo no cultivable *in vitro* que crece experimentalmente en varios animales incluyendo el armadillo, primates no humanos y roedores (6).

c) Otras micobacterias.

Incluye aquellas no comprendidas en los dos grupos anteriores, algunas de ellas suelen ser patógenas, otras pueden ser patógenas oportunistas y finalmente otras suelen ser saprobias. Producen las denominadas micobacteriosis.

M. smegmatis es una micobacteria saprobia de escaso potencial patógeno. Se clasifican 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 isoniazida, 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 (7)

Para los estudios sobre estructura y la función del genoma micobacteriano y todos los intentos exitosos en transferencia genéticas se ha usado *M. smegmatis*. Esta micobacteria puede producir ocasionalmente pigmentación, siendo la primera especie reconocida después de *M. tuberculosis* (7).

La tabla 2 incluye las micobacterias que con mayor frecuencia se han comportado como patógenas en el hombre y las enfermedades en las que se ha implicado. El resto de micobacterias no se han asociado con enfermedad en el hombre o se ha hecho sólo muy raramente.

Tabla 2 Micobacterias Patógenas al Hombre

Especie de Micobacterias	Patología
<i>M.tuberculosis</i>	Tuberculosis y enfermedad diseminada.
<i>M. avium-intracellulare</i> (MAC)	Enfermedad pulmonar, linfadenitis cervical en niños y enfermedad diseminada (SIDA).
<i>M. celatum</i>	Enfermedad pulmonar similar a tuberculosis y enfermedad diseminada (SIDA).
<i>M. genavense</i>	Enfermedad diseminada similar al complejo <i>M. avium-intracellulare</i> (SIDA).
<i>M. haemophilum</i>	Nódulos cutáneos e infección diseminada (SIDA)
<i>M. kansasii</i>	Enfermedad pulmonar similar a tuberculosis, enfermedad diseminada (SIDA), meningea y osteoarticular.
<i>M. malmoense</i>	Enfermedad pulmonar crónica.
<i>M. marinum</i>	Infección cutánea y articular.
<i>M. scrofulaceum</i>	Linfadenitis cervical en niños, ganglionar y pulmonar.
<i>M. simiae</i>	Enfermedad pulmonar crónica.
<i>M. szulgai</i>	Enfermedad pulmonar similar a tuberculosis.
<i>M. ulcerans</i>	Úlceras cutáneas (úlceras de Buruli en África, úlceras de Baimsdale en Australia).
<i>M. xenopi</i>	Enfermedad pulmonar crónica y cutánea.
<i>M. fortuitum</i> , <i>M. chelonae</i> , <i>M. abscessus</i> (crecimiento rápido)	Infecciones de partes blandas, osteomielitis, enfermedad diseminada e infección de herida quirúrgica.

Tomado de Casal M, et al. Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica y Rodríguez GC. Genero Mycobacteria. Inst Nal Enf Resp. Mexico. 2000;15:120-128.

SIDA (Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida)(1)

B. TUBERCULOSIS

1. Definición

La tuberculosis es la enfermedad más antigua que ha padecido el hombre y la que más lo ha diezclado a lo largo de la historia, continúa siendo en la actualidad la infección humana que mayor número de enfermos y muertes ocasiona anualmente en el mundo (8).

En el año 2001 se informó a la Organización Mundial de la Salud (OMS) de más de 3.8 millones de casos nuevos de tuberculosis que incluyeron todas las formas y el 90 % de ese total provenía de países desarrollados, lo cual se debe a la inmigración de personas de países en los que existe alta prevalencia de la enfermedad, infecciones por VIH lo cual hace que se duplique o triplique el número de casos de tuberculosis registrados, problemas sociales como la pobreza, indigencia, infraestructura asistencial, consumo de drogas y desorganización de los servicios antituberculosos. (9)

Los agentes etiológicos de la tuberculosis en los mamíferos son *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum* y *M. microti*. La distribución de *M. bovis* (tuberculosis bovina) y *M. tuberculosis* (tuberculosis humana) es mundial. *M. africanum* (tuberculosis humana) prevalece en África, pero también se ha aislado en Alemania e Inglaterra. Las cepas de *M. africanum* relacionadas fenotípicamente con *M. tuberculosis* son nitrosa positiva y se encuentran en África occidental (4). La tuberculosis pulmonar es una enfermedad infecciosa regularmente provocada por *M. tuberculosis* (10).

2. *Mycobacterium tuberculosis*

M. tuberculosis es un bacilo ácido alcohol resistente, aerobio estricto, cuyo crecimiento y actividad metabólica es proporcional a las tensiones de oxígeno y el valor de pH circulante, encontrando sus condiciones ideales cuando el pH es de 7.40 y la presión de oxígeno entre 110 y 140 mm Hg (11).

Este microorganismo es resistente al frío, la congelación y desecación. Es sensible al calor, la luz solar y ultravioleta y se divide lentamente, por lo que su crecimiento es lento (12).

3. Formas de la tuberculosis

a) Tuberculosis pulmonar

Es la forma más frecuente de esta enfermedad, observándose en más de un 80% de casos. Es la única forma de tuberculosis que puede ser contagiada y por lo mismo se le da prioridad en su búsqueda y tratamiento.

Los pacientes con tuberculosis pulmonar, en quienes los microorganismos son visualizados en examen microscópico de muestra de esputo (casos bacilos de Koch positivo) son altamente contagiosos, pudiendo transmitir la infección probablemente a 10 ó 15 personas al año, mientras que los pacientes en la cual solamente son positivos por cultivo Löwenstein-Jensen, son aproximadamente 7 a 10 veces menos infecciosos (11).

b) Tuberculosis extra-pulmonar

La tuberculosis puede afectar cualquier parte del organismo, los casos extra-pulmonar son raramente contagiosos y sus dos formas más graves son la tuberculosis miliar y la meningitis tuberculosa (11).

c) Tuberculosis infantil

La tuberculosis infantil suele ser una consecuencia directa por transmisión directa de la tuberculosis del adulto. Los niños menores de 5 años tienen mayor riesgo de enfermarse gravemente, reduciéndose el riesgo hasta la pubertad, para elevarse en los adolescentes y adultos.

4. Tuberculosis pulmonar

a) Patogenia e inmunidad

La transmisión es fundamentalmente aérea (95% de los casos), a través de las secreciones que son expulsadas por la tos de los pacientes que se encuentran infectados. Durante varias semanas, 5 a 8 habitualmente (rango de 4 a 90 días). *M. tuberculosis* crece lentamente y sin impedimentos en el interior de los macrófagos aún inactivos. Por lo general hay un foco único, localizado en los sectores medios o inferiores del pulmón y puede, eventualmente, diseminarse a los vértices y a otras partes del organismo (diseminación linfohematógena prealérgica). Es el período de incubación biológica, que transcurre desde el contagio hasta que sobreviene la reacción inmunológica específica. Una vez alcanzada la carga bacilar suficiente, aparece la reacción inflamatoria y se desencadena la inmunidad celular que frena el crecimiento bacteriano.(13)

En la mayoría de los casos, esta “primoinfección” es controlada por la inmunidad mediada por células, aunque puede quedar un pequeño número de bacilos viables dentro del granuloma. Se la reconoce por la hiperergia cutánea a la tuberculina y si la necrosis lesional fue suficientemente intensa, puede quedar una calcificación radiológicamente visible. No se considera a estos individuos como tuberculosos, pero están en riesgo de enfermar si no realizan quimioprofilaxis.(13)

Alrededor del 10% de los infectados con inmunidad normal desarrollará una tuberculosis activa a lo largo de su vida, la mitad de ellos en los primeros dos años de la infección. Este es el período de incubación clínica que media entre la infección y la enfermedad tuberculosa. Es por ello que todo reactor a la tuberculina es, en potencia, un caso de enfermedad. Cuando la respuesta del huésped frente a la infección resulta inadecuada surge la enfermedad, puesta de manifiesto por la presencia de síntomas y signos clínicos, aunque sólo puede confirmarse por el aislamiento del *M. tuberculosis*. La tuberculosis puede desarrollarse a continuación de la infección cuando fracasan los mecanismos de la inmunidad adquirida (tuberculosis primaria), incluyendo los casos que se producen durante los primeros 5 años postinfección. Aunque puede presentarse como una forma grave

(meningitis, tuberculosis miliar), habitualmente se trata de formas leves neumoganglionares. (13)

b) Transmisión

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 (12).

c) Diagnóstico

El diagnóstico de la tuberculosis se basa en las manifestaciones clínicas, radiológicas, anatomía patológica que son muy inespecíficos y en la confirmación del mismo mediante técnicas bacteriológicas.

d) Síntomas clínicos

La tuberculosis carece de manifestaciones clínicas propias que permiten diferenciarlas de otras enfermedades respiratorias como malestar general, pérdida de peso, tos, astenia, anorexia, sudoración nocturna y fiebre, a menudo ligera e intermitente hasta de 40 grados centígrados. La expectoración es escasa o bien sanguinolenta y purulenta. La expectoración y la hemoptisis suelen asociarse a la tuberculosis cavitada. La diseminación hematogena 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 (5,9,14).

e) Exploración física

Es inespecífica al igual que los síntomas clínicos, se deben buscar signos de valor orientativo como: sonidos crepitantes en espacios infraclavicular o en zona interescapulo-vertebral, estetores bronquiales uni o bilaterales, se existe afección pleural matidez a la percusión y signos extratorácicos (eritema nodos, adenopatías y fistulas) (15).

f) Laboratorio

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 la leucocitosis intensa debe haber sospecha de una complicación por otra infección bacteriana. La velocidad de eritrosedimentación casi siempre se encuentra elevada. La hematuria o la piuria puede dirigir la atención hacia tuberculosis renales coexistentes. 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 (16).

El diagnóstico estándar y la clasificación de tuberculosis en adultos y niños es implementado por la Asociación Americana Torácico, el Centro de Control de Enfermedades y la Sociedad Americana de Enfermedades Infecciosas. El propósito es el diagnóstico definitivo en los pacientes basado en la epidemiología y en la información de nueva tecnología. Esta clasificación de la tuberculosis 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 (17).

El diagnóstico de tuberculosis se hace en el laboratorio, dependiendo de su localización. Si bien el cuadro clínico del padecimiento orienta notablemente el diagnóstico, siempre debe ser confirmado por el laboratorio, pues existen otras enfermedades con las que puede confundirse y deberá hacerse el diagnóstico diferencial. De los resultados del laboratorio dependerá el tratamiento. El estudio de laboratorio tiene como finalidad demostrar la presencia de los bacilos en frotis o líquidos corporales. Para ello existen varios métodos, como la baciloscopia, el cultivo y la histopatología.

El diagnóstico de la tuberculosis pulmonar se realiza a través del estudio bacteriológico (baciloscopia y cultivo) que es el principal método para confirmar estos casos (más del 90%) con especificidad del 100% en laboratorios de buena calidad. Tres muestras de baciloscopia diagnostican el 80% de casos que eliminan bacilos y expectoran; tres muestras más dos cultivos confirman más del 90%. Las muestras pueden obtenerse mediante el hisopado laríngeo, la inducción de esputo por nebulización, el lavado broncoalveolar, la biopsia bronquial o transbronquial. La radiología y la reacción tuberculina son exámenes muy sensibles pero de poca especificidad. El estudio de biopsia se hace en casos especiales (17).

Para que un laboratorio pueda obtener resultados confiables, no solo es necesario ejecutar las técnicas correctas, sino que también se reciba una buena muestra, entendiéndose como tal, la que proviene del sitio de la lesión que se investiga, obtenida en cantidad suficiente, colocada en el envase adecuado, bien identificada, conservada y transportada correctamente.

Para la confirmación bacteriológica de una tuberculosis pulmonar la muestra de esputo es la más representativa, siempre que contenga menos de 10 células epiteliales y más de 25 leucocitos por campo. En caso de tratarse de una muestra salivosa, no es apta para cultivo, pero si debe realizarse la baciloscopia ya que puede ocurrir que esta sea positiva y así adelantar un diagnóstico (18).

La baciloscopia es considerada el examen básico para el diagnóstico bacteriológico, especialmente en su forma broncopulmonar, como así también para los controles de tratamiento. El procedimiento se basa en la capacidad de las micobacterias de incorporar ciertos colorantes y retenerlos ante la acción de ácidos y alcohol, propiedad conocida como ácido alcohol resistencia.

Es una técnica sencilla, de bajo costo y disponible aún en laboratorios de baja complejidad. Para obtener una baciloscopia positiva, la muestra deberá contener una población bacilar del orden de 10,000 bacilos por ml ó más. Desde el punto de vista epidemiológico la baciloscopia del esputo cumple el papel fundamental de detectar los casos bacilíferos, que resultan ser los más peligrosos como focos de infección, así como también permite hacer un seguimiento del paciente que esta bajo tratamiento, para evaluar si disminuye la carga bacilar.

Por lo tanto es recomendable seguir un método estandarizado de informe a partir de la coloración de Zielh- Neelsen (ZN) llamada también ácido alcohol resistente:

(-) No se encuentran BAAR (bacilo ácido alcohol resistente) en 100 campos microscópicos observados.

(+) Menos de 1 BAAR por campo en 100 campos microscópico observado.

(++) Uno a 10 BAAR por campo en 50 campos microscópicos observados.

(+++) Más de 10 BAAR por campo en 20 campos microscópicos observados (18).

Entre sus ventajas se encuentran: es el único método rápido de alta precisión diagnóstica, detecta cerca del 80% de los casos de tuberculosis pulmonar con confirmación bacteriológica, identifica de inmediato un caso altamente infeccioso, permite instaurar rápidamente el tratamiento adecuado, controla a convivientes y la evolución del paciente que está en tratamiento.

Otra forma de poder detectar el bacilo de Koch es por microscopía de fluorescencia, técnica poco difundida en nuestro país, tiene el mismo principio que la coloración de ZN, variando únicamente el colorante a utilizar. Su sensibilidad es similar a la baciloscopía, presentando algunas ventajas sobre esta, pero también desventajas entre ellas equipo de alto costo, mantenimiento y la necesidad de contar con personal altamente entrenado para su interpretación (18).

El cultivo es el método bacteriológico más sensible y específico de los que se conocen en la actualidad para detectar la presencia de micobacterias en una muestra determinada. Permite diagnosticar los casos de tuberculosis pulmonar en los que el número de bacilos eliminados en las secreciones no es suficientemente alto.

Previo al cultivo la muestra debe sufrir un proceso de homogenización (para liberar los bacilos del mucus, material celular o tejido donde se encuentre incluido), descontaminación (para eliminar la microbiota colonizante) y concentración (de los bacilos presentes en la muestra) (18).

Todo este procedimiento tiene como finalidad aumentar la sensibilidad del cultivo, ya que basta que existan más de 10 bacilos/ml de muestra digerida y concentrada para que un cultivo sea positivo.

Existen dos técnicas para el cultivo de las micobacterias, una utiliza el medio de cultivo sólido, como el de Löwenstein-Jensen, que es el más utilizado y considerado el estándar de oro y otro que emplea medios líquidos (7H12 de Middlebrook) en frascos cerrados que incorporan generalmente un ácido graso como el ácido palmítico, marcado con carbón radioactivo (18).

Las muestras son incubadas a 37 grados centígrados durante 8 semanas, en el medio Löwenstein-Jensen, con observaciones diarias las primeras 48 horas y luego con observaciones semanales hasta completar 8 semanas para que se reporte como negativo.

Actualmente se recomienda que todos los aislamientos de micobacterias sean identificados a nivel de especie, debido a la posibilidad de que múltiples especies de micobacterias no tuberculosas se comporten como patógenas para el hombre. La especie de micobacteria se puede determinar según la velocidad de crecimiento (rápido o lento), temperatura de crecimiento, morfología de las colonias, pigmentación y fotoreactividad.

Las pruebas bioquímicas más importantes para la identificación de *M. tuberculosis* son la reducción de nitratos (NO_3), 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. *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, su positividad corresponde a la demostración de la acumulación de una cantidad importante de ácido nicotínico y es casi específica de *M. tuberculosis*. (1).

En la tabla 3 se muestran las características para la identificación de las micobacterias de la tuberculosis y de las micobacterias atípicas, según los test indicados anteriormente.

g) Radiografía

Su diagnóstico no es confiable ya que existen lesiones radiológicas sugestivas de tuberculosis en el cáncer pulmonar y la infección causadas por hongos o bacterias. Es una técnica sensible pero inespecífica. (10).

h) Tratamiento

El tratamiento de la tuberculosis se fundamenta en dos grandes bases bacteriológicas, la asociación de los fármacos para evitar la selección de resistencia y la necesidad de

tratamientos prolongados para poder matar a todos los bacilos en sus diferentes fases de crecimiento.

Los fármacos de primera línea para el tratamiento de la tuberculosis son isoniazida, rifampicina, pirazinamida, etambutol y estreptomina los cuales se administran de 6 u 8 meses. Se les denomina así debido a que son los más eficaces, los mejores tolerados y los que conllevan menor número de reacciones adversas o efectos secundarios. Isoniazida y rifampicina son las drogas más efectivas y previenen la aparición de cepas emergentes resistentes. Estreptomina y etambutol son menos potentes pero efectivas en esquemas alternativos (19).

Tabla 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	+	-	+	S	-	-
Micobacterias atípicas	V	+	+	-	R	V	-

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

Tomado: Boletín unión internacional contra la tuberculosis. Vol 57, 1982(13)

Existen drogas antituberculosas de segunda línea (etionamida, protionamida, terizidona, rifabutina, rifapentina, morfozinamida, capreomicina, cicloserina, kanamicina, viomicina, quinolonas, PAS) las cuales están indicadas en caso de intolerancia grave a alguna de las drogas de primera línea o resistencia comprobada (19).

En la tabla 4 Se detalla el mecanismo de acción, dosis, los efectos secundarios más comunes y las interacciones farmacológicas más frecuentes.

Los factores que pueden reducir el éxito del tratamiento son el abandono del tratamiento por parte del paciente, deficiencia en la referencia y contrarreferencia del paciente, diagnóstico en etapas tardías de la enfermedad, desabastecimiento de los medicamentos, resistencia bacteriana, efectos secundarios y falta de información del paciente.(20)

La emergencia y rapidez de 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 medidas necesarias para curar los casos de tuberculosis y evitar que siga propagándose la variante fármacoresistente 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 (21).

La administración diaria de isoniazida (INH) ha sido recomendada para la profilaxia de TB. Sin embargo niveles elevados de resistencia a INH han llevado a pensar que todos los pacientes con aparente fármacoresistencia a la tuberculosis sean probablemente resistentes a INH, haciendo de la INH como profilaxis una terapia dudosa.

Tabla 4 Fármacos Antituberculosis de Primera Línea

Fármacos	Mecanismo de acción	Efectos secundarios	Interacciones farmacológicas	Dosis/día Adulto
Isoniazida	Bactericida extra e intracelular.	Neuropatías e periféricas, hepatitis e hipersensibilidad	Aumenta niveles de fenitoína, carbamacepina y	300 mg

Rifampicina	Bactericida en todas las fases de crecimiento y esterilizante.	cutánea. Hepatitis, reacción febril, cutánea y gastrointestinal, púrpura trombocitopenia y síndrome gripal.	diazepán. Incrementa el metabolismo de anticonceptivos, analgésicos, corticoides, anticoagulantes, ketoconazol, anticonvulsivos.	600 mg
Pirazinamida	Bactericida intracelular y esterilizante.	Hiperuricemia, hepatitis, hepatotoxicidad, náuseas, exantema, anorexia, artralgia e hipersensibilidad cutánea.		1,500 mg
Etambutol	Bacteriostático intra y extracelular.	Neuritis óptica, hepatitis y artralgia.		1 g
Estreptomina	Bactericida extracelular.	Hipersensibilidad, cutánea, vómitos.	Bloqueantes neuromuscular.	1,200 mg

Tomado de Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social. Manual de Técnicas y Procedimientos de Bacteriología de la Tuberculosis. 3 ed. Guatemala. 2001, Caminero JA, *et al.* Tratamiento de la Tuberculosis. Paris:UICTER, 2002 y Comité Nacional de Neumología. Criterios de Diagnóstico y Tratamiento de la Tuberculosis infantil. 2002 p159-178

Algunos estudios reportan la disminución de los niveles de resistencia a estreptomina (STR) desde la introducción del etambutol (EMB) en los regímenes antiTB a nivel mundial.

En Guatemala en 1998 los fármacos con los niveles más altos de resistencia primaria fueron INH (17.6%) y STR (17.6%), lo que refleja el hecho que hayan sido los fármacos más comúnmente utilizados en la terapia antiTB en Guatemala por un largo periodo de tiempo según datos recolectados por la revista RECCAVIR (22).

i) Pronóstico

Los síntomas se pueden aliviar en 2 ó 3 semanas y el mejoramiento se puede comprobar mediante radiología de tórax, posterior a la recuperación clínica. El pronóstico es excelente si la tuberculosis se diagnostica a tiempo y se inicia el tratamiento (19).

j) Complicaciones

Las complicaciones de la tuberculosis dependen del órgano afectado. En el caso de la tuberculosis pulmonar se puede presentar insuficiencia respiratoria, empiema, fibrotórax, la hemoptisis, entre otras. Lo cual está aunado al estado inmunológico del paciente y a la quimioterapia correcta (20).

k) Impacto del VIH

La infección del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) trae consigo una destrucción extensa de los mecanismos de defensa del organismo. Por ello los individuos infectados por VIH presentan enfermedades secundarias a esta, llamadas oportunistas.

La infección por el VIH es actualmente el factor de más alto riesgo para el desencadenamiento de una tuberculosis en individuos previamente infectados por *M. tuberculosis*. Cuando la protección que confiere normalmente el sistema inmunitario se encuentra disminuida por efecto del VIH, la micobacteria que se encuentra en el organismo infectado comienza a multiplicarse provocando la tuberculosis. La tuberculosis es una de las primeras complicaciones del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA). Se estima que el 50-60% de los enfermos con SIDA e infectados por *M. tuberculosis* terminan padeciendo una tuberculosis activa a lo largo de la vida (10).

5. Tuberculosis pulmonar en Guatemala

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), Guatemala posee una tasa de incidencia de tuberculosos de 28.2/100000 y cuenta con la presencia de un manual nacional de control de la tuberculosis, clasificándolo dentro de los países de categoría de la

OMS que poseen cursos estandarizados de entrenamiento de la OMS en el manejo de los programas de control antiTB dentro los últimos dos años (23).

Desde 1991 se aplica a nivel nacional la estrategia de tratamiento breve bajo observación directa con una cobertura real cercana al 70%. El departamento con mayor incidencia es Escuintla con una tasa de 60.6 por 100,000 habitantes y el de menor incidencia Chimaltenango con una tasa 5.1 por 100,000 habitantes. En 1,999 se registraron 2,820 casos de tuberculosis, 87.1% pulmonares con baciloscopía positiva. El grupo de edad más afectado es el de 25 a 34 años que presentó el 21% del total de los casos de 1,999 en donde el 52% es del sexo masculino (24).

Durante los últimos diez años la tendencia de tuberculosis se ha mantenido con una incidencia promedio de 23 por 100,000 habitantes, con excepción del año 2002 con un incremento de 38.4 por 100,000 habitantes lo cual se debe a un sobre registro de casos ya que, en este año fue modificado el formato de registro.

La mayor carga de casos de tuberculosis pulmonar (50%), están aportados por 5 áreas de salud en Alta Verapaz, Quetzaltenango, Huehuetenango, Escuintla y San Marcos (25).

Guatemala posee varios factores de riesgo que pueden facilitar el desarrollo de la enfermedad, los cuales pueden llegar a incrementar hasta en 1000 veces la posibilidad de adquirir tuberculosis, siendo estos en su mayoría infección por VIH/SIDA, medio ambiente, pobreza, edad, alcoholismo, tabaco, diabetes, anemia severa, leucemia, tratamiento por inmunosupresores, enfermedades renales crónicas y agudas y otras enfermedades debilitantes.

C. MEDICINA NATURAL

La fitoterapia se define como la ciencia que estudia la utilización de productos de origen vegetal con finalidad terapéutica para prevenir, atenuar o curar un estado patológico; dando lugar a tratamientos menos agresivos (26).

La OMS definió en 1978 a una planta medicinal como cualquier planta que en uno o más de sus órganos contiene sustancias que pueden ser utilizadas con finalidad terapéutica o que son precursores para la semisíntesis químico-farmacéutica (23).

En Europa, al igual que en otras áreas del mundo, la utilización de medicamentos a base de plantas sigue una línea ascendente. En Alemania, en particular, entre 1970-1997 el porcentaje de población que utiliza medicamentos fitoterapéuticos experimentó un aumento entre un 4% y un 92% dependiendo de las patologías (27). Según datos del Institute for Domestic and International (IMS) para 2003, Alemania (43%), junto con Francia (23%), constituyen los principales mercados dentro de Europa, seguidos a distancia por Italia, Polonia, Reino Unido y España, que representa un 4% del mercado europeo (28).

Los factores más importantes en evolución de las fitoterapias son el descubrimiento de efectos adversos en fármacos de síntesis, el mejor conocimiento químico, farmacológico y clínico de las drogas vegetales y sus productos derivados; el desarrollo de métodos analíticos que facilitan el control de calidad; el desarrollo de nuevas formas de preparación y de administración de los medicamentos fitoterápicos y el aumento de la automedicación, ya que los productos fitoterapéuticos son menos peligrosos y por tanto más aptos para la automedicación (29).

Existen diferentes parámetros que contribuyen a demostrar la eficacia de un preparado de fitoterapia, pero no todos tienen la misma relevancia. Entre estos parámetros se encuentra el conocimiento de los principios activos que son los compuestos químicos contenidos en la droga responsables de la acción farmacológica, los resultados obtenidos en ensayos farmacológicos experimentales y la experiencia clínica (30).

Los dos últimos se consideran son los elementos clave para la demostración de la eficacia, pero sin que ello signifique renunciar al valor de los demás. Es así como para la

evaluación de la eficacia clínica, se reconocen diversos niveles de evidencia, tal como se muestra en la tabla 5

1. Medicina Natural Para La Tuberculosis

Debido a que la tuberculosis ocupa uno de los primeros lugares en mortalidad y morbilidad en Guatemala y ha mostrado resistencia a diferentes medicamentos se ha buscado tratamientos alternativos como lo es la fitoterapia.

2. Plantas y estudios a nivel mundial

Se han reportado varios estudios buscando nuevas alternativas fitoterapéuticas para el tratamiento de la tuberculosis. Sali, F. y Cols. en 1996, evaluaron a las plantas *Arctotis auriculata* Jacq. y *Helichrysum crispum* L. encontrando actividad contra *M. smegmatis* a una concentración de 0.5 mg/ml (32).

Lall, N. y Cols. en 1999 en el Departamento de Botánica de la Universidad de Pretoria evaluaron a las plantas *Croton pseudopulchellus* Pax., *Ekebergia capensis* L., *Euclea natalensis* A., *Nidorella anomala* Steetz., *Chenopodium ambrosioides* L., *E. natalensis*, *Helichrysum melaname* Mill. y *Polygala myrtifolia* L. encontrando actividad contra *M. tuberculosis* por el método radiométrico a una concentración de 0.5 mg/ml (33).

Tabla 5 Niveles y Grados de Evidencia Para el Reconocimiento de la Eficacia

Nivel	Tipo de evidencia	Grado	Indicaciones
I a	Evidencia obtenida de meta-análisis de ensayos clínicos controlados y aleatorizados.	A	Indicaciones mayores

I b	Evidencia obtenida de como mínimo un ensayo controlado y aleatorizado.	A	Enfermedades severas
II a	Evidencia obtenida de como mínimo un ensayo bien diseñado, controlado, sin aleatorización.	B	Indicaciones intermedias
II B	Evidencia obtenida de como mínimo un estudio de otro tipo, casi-experimental y bien diseñado.	B	Indicaciones intermedias
III	Evidencia obtenida de estudios descriptivos, no experimentales, bien diseñados, como estudios comparativos, estudios de correlación y estudios de casos controlados.	B	Indicaciones intermedias
IV	Evidencia obtenida de informes de comités de expertos o de opiniones y/o experiencia clínica de autoridades respetadas.	C	Indicaciones menores

Basados en tablas originales de la AHCPR (Agency for Health Care Policy and Research, EEUU) y de la OMS; Según la EMEA (31)

Lall, N y cols. en el 2001, realizó un estudio con la planta *E. natalensis* encontrando actividad contra *M. tuberculosis* a una concentración mínima inhibitoria de 100mg/ml (34), luego estudió la planta *Helichrysum caespitatum* Cav. encontrando actividad contra *M. tuberculosis* por medio del método agar plata a una concentración mínima inhibitoria era de 0.5 mg/ml (35).

Newton y cols. en el 2002 en la Escuela de Farmacia, Universidad de Bradford, West Yorkshire y en el Departamento de Microbiología e Inmunología de la Escuela Media de Newcastle realizaron un estudio con las plantas *Psoralea corylifolia* L. y *Sanguinaria canadensis* L. encontrando actividad contra *M. aurum* y *M. smegmatis* con extractos metanólicosa encontrando que la concentración mínima inhibitoria es de 62.5 µg/ml (36).

Jiménez-Arellanes y cols. en el 2002 en México, en la Unidad de investigación Médica en Farmacología de Productos Naturales en el Hospital de Pediatría del Centro Médico Siglo XXI, realizaron un estudio con las plantas *Artemisia ludoviciana* Nutt., *Chamaedora tepejilote* Palmea., *Lantana hispida* Mold., *Juniperus communis* L. y *Malva parviflora* L. encontrando que presentaban actividad contra *M. tuberculosis* a una concentración de 65 µg/ml. Evaluó también si *M. avium* era inhibida por *J. communis* y *L. hispida*, encontrando que *L. hispida* presentó mejor actividad contra las dos micobacterias (37).

Stavri M y Cols. en el 2002 en el Instituto de Farmacognosia, Karl-Franzens-University, Graz, Austria evaluaron la planta *Peucedanum ostruthium* L., encontrando actividad contra *M. abscesus*, *M. aurum*, *M. fortuitum*, *M. phlei* y *M. smegmatis* utilizando el Soxhlet para obtener extractos, los que fueron evaluados en un rango de 3.4 a 107.4 micromoles encontrando la concentración mínima inhibitoria (38). Posteriormente en el 2003 realizaron un estudio con la planta *Ducrosia anethifolia* Boiss., encontrando actividad contra *M. fortuitum*, *M. aurum*, *M. phlei* y *M. smegmatis* utilizando el Soxhlet para obtener extractos de ésta planta la que evaluó en un rango de concentración de 64-128 µg/ml (39).

Woldemichael G. y cols. en el 2004 evaluaron a la planta *Sapium haemosperum* Mull. encontrando actividad contra *M. tuberculosis* a una concentración mínima inhibitoria de 25µg/mL (40).

3. Plantas y estudios a nivel nacional

En Guatemala, Manrique y cols. en 1992 determinaron la acción antimicobacteriana *in vitro* por el método de proporción de seis plantas medicinales concluyendo que ninguna de las seis plantas mostraba una actividad micobactericida *in vitro*, sin embargo

estadísticamente *Sida acuta* Burn f., *Eucalyptus globulus* Labill. y *Achillea millefolium* L. presentaron actividad bacteriostática *in vitro* a una concentración de 400 mg/ml (41).

Figueroa en 2000, determinó la actividad antimicobacteriana de extractos de varias plantas, concluyendo que *Piper auritum* Hbk., *Stachytarpheta cayennensis* Rich. y *Enterolobium cycloscarpum* Jack. son capaces de inhibir el crecimiento de cepas multiresistentes de *M. tuberculosis in vitro* a una concentración de 2 mg/ml (42).

Mazariegos y cols. en 2004 determinaron la actividad micobactericida *in vitro* por el micrometodo MTT de las plantas *Quercus crasifolia* Humb & Bonpl. y *E. cycloscarpum* contra *M. tuberculosis* con concentración mínima inhibitoria de 25 µg/ml y 50 µg/ml respectivamente (43).

4. Plantas utilizadas en el reto

a) *Bursera simaruba* (L.) Sarg.

Familia

Burseraceae

Nombre común

Palo de Jiote, Cohuite, Palo Mulato.

Descripción botánica y hábitat

Árbol de madera suave hasta 30 mt de alto, tronco cilíndrico, corteza verde plateada o bronceada, hojas aromáticas en espiral de 10 a 30 cm de largo, flores amarillo verdoso de 4 mm de ancho y su fruto es oval de 10 a 15 mm de largo.

Nativo de América tropical del sur de México al norte de Sur América y el caribe hasta 1,800 mts sobre el nivel del mar. En Guatemala se ha descrito en Alta Verapaz, Baja Verapaz, Chiquimula, Escuintla, Chimaltenango, Progreso, Huehuetenango, Jalapa, Santa Rosa, Guatemala, Petén, Izabal, Jutiapa, Quetzaltenango, San Marcos, Quiché y Jalapa (44).

Uso medicinales

La decocción de la corteza y las hojas se usa para tratar anemia, afecciones gastrointestinales, respiratorias, fiebre, gota, hernia, presión alta, paludismo, paperas y sarampión. El jugo de hoja se aplica para hinchazón e inflamación de la piel. La decocción de corteza se aplica tópicamente en afecciones dermatomucosas, picaduras de insectos, culebras. También a la corteza se le atribuye propiedades antiinflamatorias, diurética y sudorífica (45).

Química

La corteza contiene taninos, saponinas, esteroides instaurales, polifenoles. La hoja contiene alcaloides, glucósidos saponínicos, flavonoides, taninos y aceites esenciales (46).

Farmacología

La decocción moderada induce una actividad diurética, el extracto hidroalcohólico de hojas tiene actividad espasmolítica en cobayas, vasodilatadora en ratas y estimulante del músculo de ratón.

Estudios antibacterianos demuestran que la tintura de corteza es inactiva contra bacterias causales de infecciones dérmicas como *E. coli* y *P. aeruginosa* y enterobacterias, los extractos acuoso y etanólico de corteza son activos contra *S. aureus* pero inactivos contra *E. coli*.

Estudios antifúngicos demuestran que la decocción de la corteza es activa únicamente contra *E. floccosum*, el extracto etanolico es activo contra *N. crassa*. (45)

b)*Cecropia obtusifolia* Bertol.

Familia

Moraceae

Nombre común

Guarumo, Pacl, Choop. Xobín.

Descripción botánica y hábitat

Árbol de crecimiento rápido de 20 mt de altura, el tronco rara vez mide más de 30 cm de diámetro, que se distingue a primera vista por sus hojas grandes en forma de mano extendida, están en las puntas de las ramas y tiene un jugo lechoso. Las flores están separadas por una masa de pelos blancos, con fruto muy pequeños conteniendo una semilla y sus tallos suelen estar habitados por hormigas (44).

Especie originaria de América tropical. Habita en climas cálidos, semicálidos y templados desde el nivel del mar hasta los 1,500 mt. En Guatemala se encuentra en los departamentos de Petén, Alta Verapaz, Baja Verapaz, Izabal, Santa Rosa, Escuintla, Chimaltenango, Huehuetenango, Retalhuleu, Sacatepéquez, San Marcos, Quetzaltenango y Suchitepéquez (44).

Uso medicinales

Se reportan 30 usos medicinales, es una planta que se conoce principalmente por su aplicación en casos de diabetes en donde el tratamiento consiste en la infusión de las hojas, ramas, corteza o raíz como agua de uso. Para el malestar de presión arterial y para tratar enfermedades renales es recomendable el cocimiento de esta planta para su ingestión en ayudas durante una semana. También recibe amplio uso contra piquetes de alacrán y hormigas para lo cual debe lavarse la parte afectada con el cocimiento de las hojas. En caso

de verrugas también se aplica directo el látex y contra quemaduras se recomienda moler la hoja con aceite de bebe. (45)

A la hoja se les atribuye propiedades antiasmáticas, antisépticas, astringentes, cardiotónicas, diuréticas, sudoríficas y tónicas. (46)

Química

En ensayos preliminares se encontraron esteroides y taninos del grupo pirogalol. Se identificaron azúcares ramnosa, glucosa y xilosa, así como el 5-(etoxil)-metil furfural aislado como productos de hidrólisis de las hojas de la planta. También se aisló e identificó el estigmasterol (46).

Farmacología

El extracto liofilizado de las hojas provocó taquicardia en ratas al administrarse por vía intravenosa a la dosis 10 mg/kg.

El extracto de las hojas, demostró tener actividad antibacterial sobre *Streptococcus pneumoniae* pero no sobre *S. pyogenes* (45). También estudios antimicóticos demuestran que la tintura de estas hojas es activa contra *E. floccosum* y la tintura de corteza es activa contra *M. gypseum*. Los extracto acuoso y etanólico de este árbol son activos contra *E. coli* y *S. aureus* (46).

c) *Hymenaea courbaril* L.

Familia

Nombre común

Jatoba, Copal, Guapinol.

Descripción botánica y hábitat

El árbol de guapinol es hermoso, grande y robusto de 10 a 25 mt de altura con un diámetro de hasta 1.5 mt. Sus hojas son alternas de 5 a 10 cm de largo. La corteza externa ligeramente escamosa a lisa, pardo grisácea. El fruto contiene 3 ó 4 semillas y permanece largo tiempo en el árbol (7 a 10 meses).

Originaria de América tropical. Habita en climas calidos y semicalidos entre los 290 y los 1,300 mt sobre el nivel del mar. En Guatemala se encuentra en Petén, Alta Verapaz, Baja Verapaz, Progreso, Izabal, Jutiapa, Santa Rosa, Escuintla, Guatemala, Suchitepéquez, Quetzaltenango y Huehuetenango (47).

Uso medicinales

El pericarpio del fruto contiene resina con propiedades de purgante. El cocimiento de la corteza se usa para controlar parásitos intestinales, indigestión y curar infecciones urinarias. Un linimento hecho con la corteza y resina en polvo se usa para tratar úlceras o salpullido. La resina se quema y se aspira como remedio para aliviar el asma y catarro. Se ha reportado su uso para combatir el reumatismo, estreñimiento y enfermedades venéreas (48).

Química

Las hojas y corteza del tronco contienen una resina y taninos. El compuesto principal de la resina del tronco es el diterpeno ácido labd-13en8-ol y los principales compuestos de las resinas de las hojas son los diterpenos cariofileno y alfa y beta selineno. En las hojas y el tallo han detectado el flavonoide astilibin y le beta-sitosterol (46).

Farmacología.

Se ha demostrado que las hojas presentan una actividad antitumoral probada en ratones con carcinoma de pulmón de Lewis y la decocción del tallo presenta actividad diurética al evaluarse en ratas por vía nasogástrica (49).

Además de sus características antifúngicas, el guapinol también se ha documentado por tener actividad contra levadura y una amplia gama de organismos incluyendo *Candida*. Otros estudios clínicos las actividades antibacterianas, incluyendo acciones *in vitro* contra los organismos tales como *E. coli*, *Pseudomonas*, *S. aureus* y bacilos (48).

d) *Guazuma ulmifolia* Lam.

Familia

Sterculiaceae

Nombre común

Guacima, mutambo, aquiche, cimarrona, caulote.

Descripción botánica y hábitat

Árbol de 10 a 15 mt de altura, con un grosor total de la corteza de 5 a 10 mm. Hojas alternas, ovadas o lanceoladas, de color verde oscuro en la haz y verde grisáceo o amarillento en el envés.

Se encuentra principalmente en selvas bajas caducifolias, aunque es muy abundante en la vegetación secundaria. Puede presentarse como una especie importante de etapas secundarias muy avanzadas de selvas medianas subperenifolias, dando la impresión de ser primario. Se desarrolla indiferentemente en suelos de origen volcánico o sedimentario, entre los 700 y los 1120 mt sobre el nivel del mar. En Guatemala se encuentra en los departamentos de Petén, Alta Verapaz, Baja Verapaz, Izabal, Chiquimula, Jutiapa, Santa Rosa, Escuintla, Guatemala, Suchitepéquez, San Marco y Huehuetenango (47).

Uso medicinales

La infusión de la cáscara del fruto o del al corteza sirve como remedio para la lepra, elefantiasis, paludismo, afecciones cutáneas y sifilíticas. (2) También a sido utilizada para tratar especialmente la influenza, los resfríos, las quemadas, la disentería y las fracturas de huesos (50-51).

Química

La corteza del caulote es una fuente rica de los taninos y de los productos químicos antioxidantes llamados los proanthocyanidins. La corteza también contiene un producto químico llamado el ácido caurenoico que se ha documentado con las características antibacterianas y antifúngicas. Las hojas cafeína, no obstante no se ha encontrado ninguno en la corteza del árbol (48).

Farmacología

Se ha demostrado que los extractos de la planta carecen de propiedades diuréticas; sin embargo, un extracto etanólico de las hojas suprimió las bacterias *Shigella dysenteria*, *S. aureus* y *B. subtilis in vitro*. (46)

En ocho diversos estudios a partir de 1987 a 2003, los extractos de hojas y corteza han demostrado actividad clínica antibacterial *in vitro* contra *S. aureus*, *S. pyogenes*, *E.coli* y *Neisseria*.(46)

e) *Byrsonima crassifolia* (L.) Kunth

Familia

Malpighiaceae

Nombre común

Chi, Nance, Nanzin, Tapal

Descripción botánica y hábitat

Árbol de 3 a 10 mt de alto, copa redonda, tronco recto, hojas siempre ovaladas de 5 a 20 cm de largo.

Nativo de Sur America y el Caribe en bosques secos y tropicales hasta 1,800 mts sobre el nivel del mar. En Guatemala se ha descrito en Alta Verapaz, Baja Verapaz, Chiquimula, Progreso, Quiché, Escuintla, Huehuetenango, Izabal, Jalapa, Jutiapa, Petén, Quetzaltenango, Santa Rosa, San Marcos, Zacapa y Suchitepéquez (44).

Uso medicinales

El cocimiento de corteza, hojas y flores se usa por vía oral para afecciones respiratorias, dolor de muelas, hemorragias, mordedura de serpiente, parasito. El fruto se utiliza para tratar fiebres y las semillas la disentería (46).

Química

La corteza contiene tanino, ácido oxálico, glucósidos, flavonoides, saponinas y triterpenos. Las hojas contienen saponinas, esteroles insaturados, cardenólidos, bufadienólicos, flavonoides, taninos y polifenoles. La raíz tiene flavonoides, glicosidos, sesquiterpenlactonas, taninos y triterpenos (46).

Farmacología

Estudios han demorstrado que esta planta tienen actividad sobre *K. pneumoniae*, *S. aureus*, *S. epidermis*, *S. pneumoniae*, *M. luteus*, *E. coli*, *S. typhi*, *P. aeruginosa*, *S. flexneri*, *B. subtilis*.(52)

IV. JUSTIFICACION

La tuberculosis es una de las principales enfermedades crónicas y oportunistas en Guatemala, siendo su agente causal *Mycobacterium tuberculosis*. Según la Organización

Mundial de la Salud (OMS), esta infección es la segunda causa de morbilidad en la población guatemalteca presentando una tasa de incidencia de 28.2/100,000 habitantes para el 2002. A nivel de las autoridades de salud ha causado preocupación, especialmente por la aparición de cepas multirresistentes, ya que en 1998 en Guatemala los fármacos con niveles más altos de resistencia fueron isoniazida y la estreptomina (22), además por ser una enfermedad reemergente que afecta a los pacientes inmunocomprometidos. Su virulencia se eleva por factores físicos, ambientales, por el estado inmunológico del paciente, el uso incorrecto de los antibióticos, el fracaso en el tratamiento no supervisado y al manejo inapropiado de los programas de control.

Lo anterior, aunado a la pobreza y desigualdad económica en Guatemala hace que los tratamientos individuales como las campañas de control, sean cada vez más difícil de realizarse y de alto costo. Por otro lado, la diversidad biológica de Guatemala ha permitido el uso de los recursos naturales para el tratamiento tradicional de diferentes enfermedades. Los extractos y productos derivados provenientes de dichas plantas pueden ser utilizados para desarrollar medicamentos destinados a combatir la tuberculosis.

La importancia del presente proyecto se debe a los descrito anteriormente, ya que demuestra la necesidad de validar la utilización de tratamientos naturales para la tuberculosis.

V. OBJETIVOS

A. Objetivo general

Establecer la actividad micobactericida de cinco extractos de árboles usados popularmente por la población guatemalteca contra infecciones respiratorias.

B. Objetivos específicos

1. Determinar la concentración mínima inhibitoria de *M. tuberculosis* y *M. smegmatis* de los extractos etanólicos de los árboles *Cecropia obtusifolia*, *Bursera simaruba*, *Guazuma ulmifolia*, *Byrsonima crassifolia* e *Hymenaea courboril* las cuales han sido utilizadas para el tratamiento de infecciones respiratorias.
2. Establecer la correlación existente entre los resultados del ensayo utilizando *M. tuberculosis* H3Rv con los del ensayo con *M. smegmatis* ATCC 607.

VI. HIPOTESIS

Al menos uno de los extractos de árboles estudiados presenta actividad contra *M. tuberculosis* y *M. smegmatis*.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Universo de trabajo

El universo de la investigación está constituido por los árboles que se utilizan popularmente para el tratamiento de infecciones respiratorias en Guatemala.

B. Muestra

La muestra del estudio la conforman las hojas de las especies de árboles: *Cecropia obtusifolia* (guarumo), *Bursera simaruba* (palo de jote), *Guazuma ulmifolia* (caulote), *Byrsonima crassifolia* (nance) e *Hymenaea courboril* (guapinol).

C. Recursos

1. Recursos Humanos

Investigador: Silvia Patricia Quiñónez Recinos

Asesores: MSc. Vivian Matta
Lic. Armando Cáceres.

2. Recursos Institucionales

Departamento de Citohistología de la Universidad de San Carlos de Guatemala
Laboratorio de Productos Naturales FARMAYA

3. Recursos Materiales

a) Equipo

Incubadora (a 37°C)

Pipeteador automático (5, 10 ml)

Rotavapor

Balanza analítica

Autoclave

Cabina de bioseguridad Clase II

Desecadora

Refrigeradora de 4 – 8 °C y -80°C

Vortex

Microscopio óptico

Mechero Bunsen

b) Cristalería

Balones con boca de borde esmerilado

Probetas graduadas (25 y 100 ml)

Beakers (250, 500 y 1000 ml)

Erlenmeyers (500 y 1000 ml)

Embudos

Pipetas Pasteur

Tubos de vidrio

Cajas de Petri

Tubos de vidrios de fondo plano.

c) Materiales

Soporte universal
Mascarilla de seguridad 3M
Guantes
Colador
Lentes de bioseguridad
Bata de manga larga
Asas bacteriológicas
Gradillas
Papel mayordomo
Tubo con estándar de McFarland No. 1
Algodón
Microplacas de 96 pozos 6.4 mm
Pipetas automáticas de 2 a 1000 μ l
Pipeta multicanales de 5 a 1000 μ l
Tips de 10-200 μ l
Papel filtro
Marcador
Viales o eppendorf

d) Reactivos y medios

Etanol al 70%, 90% y 95%
Fenol 5%
Agua destilada
Solución dimetil sulfoxido (DMSO)
Hidróxido de Sodio 0.5M
Buffer de fosfato (PBS)
Glucosa al 98%

MTT (bromuro de 3-(4.5-dimetiltiazol-2-y 1)-2,5-difenil tetrazolio) 5 mg/ml

Tween 80 al 20%

Caldo de Midlebrook 7H9

Ácido oleico

Agar Lowenstein-Jensen

Enriquecedor OADC

Rifampicina 99% (control negativo)

e) Cepas de *Mycobacterium*

Mycobacterium tuberculosis H37RV

Mycobacterium smegmatis ATCC607

D. Procedimiento

1. Selección de plantas

Por conveniencia se seleccionó los árboles *C. obtusifolia*, *B. simarouba*, *G. ulmifolia*, *B. crassifolia* e *H. courboril* que son utilizados popularmente en el tratamiento de infecciones respiratorias según encuesta existente en el Departamento de Citohistología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

2. Recuperación de los extractos

a) La recolección de las hojas de los árboles seleccionados se realizó durante el periodo seco, las hojas se cortaron desde la base utilizando tijeras manuales de podar o bien haciéndose manualmente.

b) Se tamizó las hojas con un cedazo, pesándolas y colocándolas en un percolador el cual tenía un poco de algodón en la parte inferior, se colocó papel filtro y se agregó etanol al 95%.

c) Se recuperó los extractos por medio de extracción con etanol al 95% posteriormente se realizó un proceso de concentración en el rotavapor y por ultimo desecación.

3. Evaluación *in vitro* de la actividad micobactericida

Se utilizó el micrométodo colorimétrico MTT para visualizar la reacción de susceptibilidad. La evaluación de la actividad micobactericida se determinó según el cambio de color mostrado por la placa.

a) Preparación de reactivos

i) Preparación de los extractos de plantas: se pesó 0.02 gr del extracto disolviéndolo en 2 ml de DMSO obteniendo una concentración final de 10mg/ml.

ii) Suplemento de Ruth: se agregó 1.7 gr de glucosa, 0.42 gr de Cloruro de Sodio más 2.5 ml Acido Oleico con Hidróxido de sodio 0.5 M en 50 ml de agua destilada.

iii) Medio Midlebrook 7H9: se pesó 2.61 gr del medio más 1 ml de glicerol disolviéndolos en 500 ml de agua desmineralizada.

iv) Solución MTT: se pesó 3 mg de reactivo en 5 ml de agua desmineralizada estéril.

v) Tween 80 al 20%: se agregó 20 ml de Tween 80 en 80 ml de agua desmineralizada estéril.

vi) Inóculo de la micobacteria: escala de MacFarland 0.5

Para trabajar con *M. tuberculosis* es necesario medidas de bioseguridad de nivel III, se debe trabajar con doble bata, doble guantes, en una cabina de bioseguridad con flujo laminar vertical, con mascarilla N95 la cual posee una capacidad de filtración igual o superior al 95 % y son las que se recomiendan para el aislamiento de micobacterias. Es importante la descontaminación de las superficies de trabajo al inicio y al final de haber trabajado, la eliminación adecuada de los residuos generados en el laboratorio, el lavado de manos cada vez que maneje material o al abandonar el laboratorio, y la adopción de todas aquellas medidas que minimicen la generación de aerosoles, el acceso al laboratorio estará restringido sólo al personal necesario, debiendo cerrarse las puertas siempre que se trabaje en el mismo. (12)

vii) Solución reveladora: 1800 µl de MTT en 2160 µl de Tween 80. Utilizando un filtro con poro 0.45 µm, se alicuotó y almacenó protegido de la luz en refrigeración.

b) Realización del ensayo

i) Se depositó 200µL de agua destilada estéril en todos los pocillos de la periferia de la placa.

ii) Se depositó 100 µL de medio Middlebrook 7H9 + OADC a los 60 pocillos restantes.

iii) Se colocó 100 µL de la dilución de trabajo de cada extractos de árboles y rifampicina en los pocillos de la fila B.

iv) Se realizó diluciones dobles seriadas hasta la fila G descartando los 100 µL finales.

v) Se colocó 100 µL del inóculo de la micobacteria respectiva 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).

vi) En los pocillos marcados como CM se colocó 100 μ L más el medio Midlebrook 7H9 + OADC.

vii) En los pocillos marcados como C1/100 se colocó 98 μ L más de medio Midlebrook 7H9 + OADC y 2 μ L del inóculo.

viii) Se incubó la placa a 37 °C en cámara húmeda hasta el día 5 o día 7 para *M. smegmatis* y *M. tuberculosis* respectivamente.

c) Revelado de la Placa

Se añadió 10 μ L de MTT 5 mg/mL y 12 μ L de Tween 80 al 20 %, incubando la placa 24 horas. Si ocurrió formación de un precipitado violeta se añadió 50 μ L de la mezcla de SDS 20 % - DMF 50 %. Una vez que se produjo el cambio de color en el pocillo control se realizó el ensayo en los pocillos con extractos.

d) Lectura e interpretación de los resultados

La lectura se realizó de manera visual, definiéndose la concentración mínima inhibitoria (CIM) como la menor concentración del extracto donde el sustrato no cambio de color y cuya intensidad fue igual o menor a la obtenida en el control C1/100.

E. Diseño estadístico y validez del método

El tipo de estudio es experimental. Diseño al azar. La variable a estudiar fue la inhibición del crecimiento de *M. tuberculosis* y *M. smegmatis* producido por los extractos de los árboles *C. obtusifolia*, *B. simaruba*, *G. ulmifolia*, *B. crassifolia* e *H. courboril* a distintas concentraciones (100, 50, 25, 12.5 y 6.25 μ g/ml). De acuerdo a la tabla de la función de distribución acumulada de la probabilidad binomial, el número mínimo de

réplicas realizadas debe ser 5 para un nivel $\alpha = 0.05$ con cada concentración de ambas bacterias, comparando los resultados con un control que no contendrá ningún tipo de extracto y un control positivo de rifampicina.

En el análisis de datos se realizó una prueba de hipótesis binomial donde:

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

Ha: $p \geq 0.5$ (Si tienen efecto)

Se esperaba que para rechazar “Ho” y concluir que el extracto tiene efecto, se deben tener 5 éxitos, al nivel $\alpha=0.05$ seleccionado. Los resultados obtenidos se interpretaron, tabularon y se analizaron de acuerdo a los parámetros anteriormente descritos.

Para validar el micrométodo colorimétrico MTT la actividad micobactericida de las cepas *M. tuberculosis* H37Rv y *M. smegmatis*, se evaluó utilizando como control positivo rifampicina a una concentración de 1 mg/ml con 100 % de inhibición y como control negativo donde hay crecimiento de las cepas *M. tuberculosis* H37Rv y *M. smegmatis*. Realizando el ensayo 5 veces obteniendo los mismo resultados.

VIII. RESULTADOS

Se determinó la concentración mínima inhibitoria para *M. smegmatis* en donde se encontró que *B. simaruba* presentó una CIM de 50 µg/ml, en los demás extractos no se observó ningún cambio de color, por lo que no hay actividad de los extractos con respecto a *M. smegmatis*, como se puede observa en la tabla 6.

Tabla 6. Concentración Mínima Inhibitoria para *M. smegmatis* ATCC 607

Árbol	Concentración					Rifampi -cina	Medio + micobacteria
	100 µg/ ml	50 µg/ml	25 µg/ml	12.5 µg/ml	6.25 µg/ml		
<i>Cecropia obtusifolia</i>	NOA	NOA	NOA	NOA	NOA	+	NOA
<i>Bursera simaruba</i>	+	+	NOA	NOA	NOA	+	NOA
<i>Guazuma ulmifolia</i>	NOA	NOA	NOA	NOA	NOA	+	NOA
<i>Byrsonima crassifolia</i>	NOA	NOA	NOA	NOA	NOA	+	NOA
<i>Hymenaea courbaril</i>	NOA	NOA	NOA	NOA	NOA	+	NOA

Fuente: datos experimentales.

NOA= no se observó actividad (crecimiento bacteriano) += se observó actividad (no crecimiento bacteriano)

Posteriormente, se determinó la concentración mínima inhibitoria para *M. tuberculosis* H37Rv, donde no se observó inhibición en los extractos en ninguna de las concentraciones como se observa en la tabla 7.

Tabla 7. Concentración Mínima Inhibitoria para

M. tuberculosis H37Rv

Árbol	Concentración						
	100 µg/ ml	50 µg/ml	25 µg/ml	12.5 µg/ ml	6.25 µg/ ml	Rifampi -cina	Medio + micobacteria
<i>Cecropia obtusifolia</i>	NOA	NOA	NOA	NOA	NOA	+	NOA
<i>Bursera simaruba</i>	NOA	NOA	NOA	NOA	NOA	+	NOA
<i>Guazuma ulmifolia</i>	NOA	NOA	NOA	NOA	NOA	+	NOA
<i>Byrsonima crassifolia</i>	NOA	NOA	NOA	NOA	NOA	+	NOA
<i>Hymenaea courbaril</i>	NOA	NOA	NOA	NOA	NOA	+	NOA

Fuente: datos experimentales.

NOA= no se observó actividad (crecimiento bacteriano) += se observó actividad (no crecimiento bacteriano)

La validez del método se realizó analizando los resultados a través de un estudio de prueba binomial en donde se determinó que los extractos presentan una $p \leq 0.5$ ($\alpha = 0.05$) dando un resultado confiable de los extractos contra *M. tuberculosis* y *M. smegmatis*. Al mismo tiempo, la rifampicina que fue el control positivo, no presentó crecimiento bacteriano mientras que en el control negativo si presentó crecimiento bacteriano, mostrando el mismo comportamiento en las cinco repeticiones.

Por último, se comparó la actividad bactericida de los extractos de árboles contra *M. smegmatis* y *M. tuberculosis*, encontrando que los resultados obtenidos no se correlacionaron entre si para ambas micobacterias.

IX. DISCUSION

En la población guatemalteca el uso de plantas medicinales es una práctica popular y muy común, por lo que es necesario validar científicamente el uso de estos recursos naturales como tratamientos alternativos para erradicar las enfermedades.

La tuberculosis es una de las principales enfermedades crónicas y oportunistas en Guatemala y su agente causal es *M. tuberculosis*. Es por ello que se realizó el presente estudio, eligiendo cinco árboles que son popularmente utilizados para el tratamiento de las afecciones respiratorias en Guatemala siendo estas: *C. obtusifolia* (decocción de hojas), *B. simaruba* (decocción de hojas), *G. ulmifolia* (decocción de hojas), *B. crassifolia* (cocimiento de corteza, hojas y flores) e *H. courbaril* (resina quemada), con el fin de encontrar tratamientos alternativos contra la tuberculosis y ayudar en un futuro a los pacientes que padecen de esta enfermedad (45-46, 48, 50-51).

Se determinó que *B. simaruba* posee una CMI de 50 ug/ml contra *M. smegmatis* ATCC 607 como se observa en la tabla 6. Esta planta, según estudios etnobotánicos, es utilizada en Cuba para afecciones respiratorias como el catarro lo cual constituye un valioso aporte. En República Dominicana el estudio sobre el análisis fitoquímico sobre algunas plantas mostró que *B. simaruba* posee inhibición solamente sobre algunos bacilos Gram-positivo y en Guatemala la decocción de la corteza y las hojas se usa para tratar afecciones respiratorias. El efecto bactericida mostrado por esta planta posiblemente se debió al principio activo que posee, aunque puede no depender de una estructura en común, ya que hay que considerar que las drogas antituberculosas usadas comercialmente constituyen un grupo heterogéneo por sus principios activos (19, 45, 53-54).

Los cinco extractos de árboles no presentaron actividad inhibitoria contra *M. tuberculosis* H37Rv, por lo que se acepta la hipótesis nula, pudiéndose deber a que es una bacteria con un estructura compleja que contiene ácido micólico que le confiere la formación de barreras impermeables impidiendo el acceso de sustancias hidrofílicas y fármacos y a la resistencia a diferentes drogas debido a las mutaciones al azar (22, 57).

Por ser un estudio binomial, se acepta la hipótesis nula y se concluye que ninguno de los cinco extractos etanólicos de los árboles estudiados evidenció efecto inhibitorio significativo contra *M. tuberculosis*. En *M. smegmatis*, debido a que solamente *B. simaruba* presentó una CIM de 50 µg/ml, por lo que si tiene efecto inhibitorio significativo con un $\alpha = 0.05$ y una confiabilidad del 95% (56).

Se validó el micrométodo colorimétrico de MTT empleando cepas ATCC para su utilización en posteriores estudios, para ello se obtuvo el mismo resultado en las cinco repeticiones. Se utilizó un control positivo de rifampicina a una concentración de 1 mg/ml con 100% de inhibición, debido a que es una de las drogas más efectivas que previene la aparición de cepas emergentes resistentes y tiene una acción bactericida en todas las fases de crecimiento. Al mismo tiempo que es la droga de elección en Guatemala para el tratamiento de la tuberculosis (19).

Al comparar los resultados obtenidos con *M. smegmatis* y *M. tuberculosis* no se correlacionan entre sí, por lo que *M. smegmatis* no podría sustituir a *M. tuberculosis* en posteriores estudios para obtener resultados de manera más rápida.

Debe tomarse en cuenta que la determinación de la CIM se llevó a cabo visualmente, por lo que se recomienda que la inhibición de *B. simaruba* y de otras plantas en posteriores estudios se realice utilizando un lector de ELISA para la determinación de la actividad de los extractos y así obtener una CIM exacta. También es importante identificar el principio activo para utilizar dicha planta en tratamientos alternativos e inhibición de otras bacterias. Además, sería conveniente realizar extractos de los mismos árboles u otros que se utilicen en enfermedades respiratorias, utilizando diferentes solventes y partes de éstos.

X. CONCLUSIONES

- A. Los cinco extractos de los árboles no presentaron actividad inhibitoria contra *M. tuberculosis* H37Rv.
- B. Se demostró que *B. simaruba* presenta una CMI de 50 ug/ml contra *M. smegmatis* ATCC 607.
- C. No existe correlación entre la inhibición de crecimiento entre *M. smegmatis* y *M. tuberculosis*.

XII. RECOMENDACIONES

- A. Utilizar un lector ELISA para la determinación mínima inhibitoria exacta mediante el cambio del color en las placas.

- B. Utilizar extractos con diferentes disolventes y partes de *B. simaruba* en posteriores estudios, para determinar la actividad de dichos extractos contra las micobacterias estudiadas.

XIII. REFERENCIAS

1. Casal M. *et al.* Recomendaciones de la sociedad española de enfermedades infecciosas; género micobacteria. Inst Nal Enf Resp. México. 2000;15:120-128.
2. Rodríguez GC. Género micobacteria. Inst Nal Enf Resp. México. 2000;15:120-128.
3. Gorocica P. Componentes glicosilados de la envoltura de *Mycobacterium tuberculosis* que intervienen en la patogénesis de la tuberculosis. Inst Nal Enf Resp. Mexico. 2005;18:142-153.
4. Ancha P., Szufres B. Zoonoses and communicable diseases common to man and animals. 3 ed. Washington: OPS, 2001. XVII+580p (p 266-273)
5. Arias A. Lepra. Rev Med IMSS 1998; 42 (4): 343-344 MG
6. The committee of the British Thoracic Society, pulmonary disease caused by *M. malmolense* in HIV negative patients: 5-yr Follow-up of patients receivin standardized treatment. 2003;21:470-482
7. Azmar J. *Mycobacterium smegmatis*. Control Calidad SEIMC; servicio de microbiología, hospital universitario Virgen del Rocio. 2000
8. Caminero J, *et al.* Tuberculosis y otras micobacterias. España: EDIMSA, 1998. 1389-1419
9. Arrison P, *et al.* Principios de Medicina Interna. 16 ed. Chile 2006. pp1062-1068
10. Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social. Manual de técnicas y procedimientos de bacteriología de la tuberculosis. 3 ed. Guatemala. 2002
11. Caminero JA, *et al.* Tratamiento de la tuberculosis. Paris: UICTER, 2002. 1250-1258
12. Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social. Manual de técnicas y procedimientos de bacteriología de la tuberculosis. 2ed. Guatemala. 2001
13. Comité Nacional de Neumología. Criterios de diagnóstico y tratamiento de la tuberculosis infantil. 2002 159-178
14. Petersdorf N, *et al.* Principios de medicina interna. México: Médica Panamericana. 6ed. 1982. 1419-1425
15. Caminero JA, *et al.* Tratamiento de la tuberculosis. Paris: UICTER, 2003. 1275-1278

16. Murray P, Drew W, Kobayashi G, Thompson J. Microbiología médica. Editorial Mosby-Doyma libros S.A. Madrid. 1992. 218-225
17. Mendez A. *et al.* Controlling multidrug-resistant tuberculosis and access to expensive drugs: a rational framework 2002. 489-449
18. Manual Para la Vigilancia Epidemiológica de la Tuberculosis. 2004 www.imss.gob.mx/nr/imss/dpm/dties/normatividad/vigilanciaepi/manlottuber/2004
19. Koklik WK, Willey HP y Amos DN. Zinsser Microbiología. 17ª ed. Buenos Aires, Argentina: Editorial Médica Panamericana. 1983 685-717
20. Vademécum de Plantas Medicinales (Fitoterapia 2004). www.fitoterapia.net/vademecum/plantas/423.html<http://www.ecoaldea.com/plmd/plantas.htm>
21. 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
22. Rodríguez. *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
23. Cañigual S, Vila R. La Fitoterapia racional. 4ª Ed. Barcelona 2003:15-27
24. Organización Panamericana de Salud. La salud en las América. Publicación Científica y Técnica. No. 587. 2002;11;20
25. Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social. Boletín epidemiológico nacional No. 20; tuberculosis pulmonar comportamiento. Guatemala. 2002. 47-51
26. Cañigual S. La Fitoterapia: ¿una terapéutica para el tercer milenio? Revista Fitoterapia 2002;2:101-21.
27. WHO. WHO Monographs on selected medicinal plants. Vols. 1 y 2. World Organization (Geneva), 1999 y 2001. www.WHO.com.org
28. Blumenthal M. (Ed.). The complete German comission and monographs. American Botanical Council (Austin, Texas), 1998.
29. Rose Salvador. IMS. Institute for Demoscopy (Allensbach, Alemania). Unidad de Farmacología y Farmacognasia. Universidad de Barcelona

<http://www.fitoterapia.net/vademecum/plantas/423.html><http://www.ecoaldea.com/plmd/plantas.htm>

30. Keller K. Herbal medicinal products in Germany and Europe: experiences with and European assessment. *Drug information Journal* 1996 30:933-48.
31. HMPWG. Draft points to consider on the evidence of safety and efficacy required for well-established herbal medicinal products in bibliographic Applications. Document EMEA/HMPWG/23/99 draft (21.01.1999). Agencia Europea del Medicamento (Londres) 1999.
32. Salie F, Eagles P, Leng H. Preliminary antimicrobial screening of four south African Asteraceae species. *J. Ethnopharmacol.* 1996 521:27-33
33. 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
34. 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
35. Meyer J, Lall N and Mathekgga ADM. *In vitro* inhibition of drug-resistant and drug-sensitive strains of *Mycobacterium tuberculosis* by *Helichrysum caespititium*. *South African J Bot.* 2002; 68: 90-93
36. Newton M, Lau C, Gurcha S, Besra S, Wright C. The evaluation of forty-three plant species for *in vitro* antimycobacterial activities; isolation of active constituents from *Psoralea corylifolia* and *Sanguinaria Canadensis*. *J. Ethnopharmacol.* 2002 79:1;57-67
37. Jiménez-Arellanes A, Meckes M, Ramírez R, Torres J. y Luna-Herrera J. Activity against multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in mexican plants used to treatment respiratory diseases. *Phytotherapy Research.* 2003 17; 903-908
38. Schinkovitz A, Gibbons S, Stavri M, Cocksedge M, Bucar F. Ostruthin: an antimycobacterial coumarin from the roots of *Peucedanum ostruthium*. *Planta Med.* 2003. 69: 369-371.
39. Stavri M, Gibbons S, Bucar F, Mathew K. Pangelin, an antimycobacterial coumarin from *Ducrosia anethifolia*. *Planta Med.* 2003. 69:956-959

40. Woldemichael G, Gutierrez M, Franzblau S, *et al.* *Mycobacterium tuberculosis* growth inhibition by constituents of *Sapium haematospermum*. J Nat. Prod. 2004;67,598-603.
41. Manrique S. Acción antimicobacteriana *in vitro* de seis plantas medicinales usadas en el tratamiento de tuberculosis. Guatemala: Universidad de San Carlos, (Tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 1992 42p. (p.14-20)
42. Figueroa L. Determinación de la actividad contra *Mycobacterium smegmatis* y *Mycobacterium tuberculosis* de extractos de plantas de uso medicinal en Guatemala. Guatemala: Universidad de San Carlos, (Tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 2000 56p. (34-40)
43. Mazariegos A., Quiñónez S., Samayoa M., *et al.* Actividad micobactericida de extractos de plantas popularmente usados para infecciones pulmonares en Guatemala. Guatemala: Universidad de San Carlos, (Informe final de curso de Investigación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 2004 22p.
44. Standley PC, Steyermark JA. Flora of Guatemala. Fieldiana: Botany 1946 24:4:22-23;260-262;476
45. Argueta V, *et al.* Atlas de las plantas de la medicina mexicana tradicional. Instituto Nacional Indigenista México 1994;3:9-10.
46. Cáceres A. Plantas de uso medicinal en Guatemala. Ed. Universitaria. Guatemala 1999 191-193, 280-281.
47. Standley PC, Steyermark JA. Flora of Guatemala. Fieldiana: Botany 1946 24:5;531, 670
48. Flores E.. 1990. Germinación y morfología de la plántula de *Hymenaea courbaril* L. (Caesalpinaceae)(1753). [www.conabio.gob.mx/conocimiento/info_especies/arboles/doctos/20 legum21m.pdf](http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/info_especies/arboles/doctos/20_legum21m.pdf)
49. Verpoorter L. Antimicrobial activity of some medicinal plants. J. ethnophacol. 1987;3:315-318, 125-128
50. Weniger L. Elements for a caribbean pharmacopeia. Cuba. 1998. pp318
51. Núñez E. Plantas medicinales de Puerto Rico. Ed. Universidad de Puerto Rico. 1992. pp 498

52. Sherman Broyles, S.L. and S.B. Broyles. 1992. Geographic distribution of allozyme variation in *Ulmus crassifolia*. Systematic Botany 17(1):33-41. http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/info_especies/arboles/doctos/35-malpi1m.pdf
53. Ramón S. Plantas medicinales de uso tradicional en Pinar del Río. Rev Cubana Farm. 1998 32
54. Bauer C. Velos A. Rodriguez E. A preliminary phytochemical analysis of *Guaiacum officinale*, *Guaiacum sanctum* (Zygophyllaceae), and *Bursera simaruba* (Burseraceae). J. Ethnopharmacol. 2002 129-133
55. Arráiz N. Sigma Factors and stress reactions in micobacterias. Kasma. 2002 65-82.
56. Wayne D. Bioestadística. Base para el análisis de las ciencias de la salud. Editorial Noriega. México 1998: 245-345
57. Gorocica P, *et al.* Componentes glicosilados de la envoltura de *Mycobacterium tuberculosis* que intervienen en la patogénesis de la tuberculosis. Rev. Inst. Nal Resp Mex 2005 18:142-153

Br. Silvia Patricia Quiñonez Recinos
Tesista

Msc. Vivian Matta
Asesora

Lic. Armando Cáceres
Asesor

Lic. María Luisa García de López
Revisora

Lic. Osberth Morales
Revisor

Msc. Vivian Matta
Directora

Dr. Oscar Cobar , Ph.D.
Decano