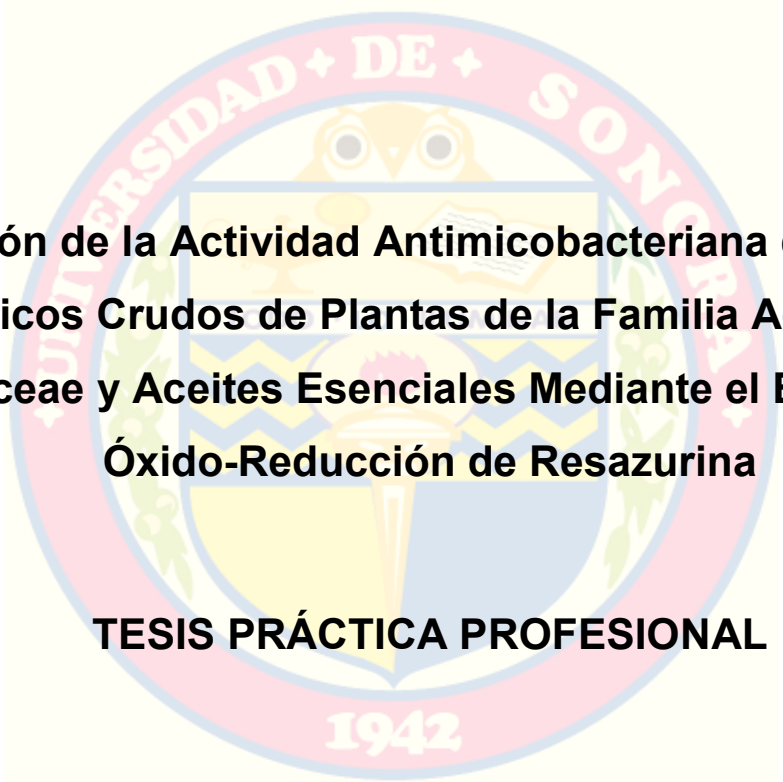


UNIVERSIDAD DE SONORA

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS**

The seal of the University of Sonora is a circular emblem. It features a central shield with a yellow and blue design, topped by a crown and flanked by two figures. The shield is set against a background of green and blue. The entire seal is enclosed in a pink circular border with the text 'UNIVERSIDAD DE SONORA' in white. The year '1942' is written in white at the bottom of the seal.

**Evaluación de la Actividad Antimicobacteriana de Extractos
Orgánicos Crudos de Plantas de la Familia Agavaceae,
Cactaceae y Aceites Esenciales Mediante el Ensayo de
Óxido-Reducción de Resazurina**

TESIS PRÁCTICA PROFESIONAL

Que para obtener el título de:

QUÍMICO BIÓLOGO CLÍNICO

Presenta:

Martín Samuel Hernández Zazueta

Hermosillo, Sonora

Abril de 2016

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

FORMA DE APROBACIÓN

Los miembros del jurado calificador designado para revisar el trabajo de tesis de Martín Samuel Hernández Zazueta, lo han encontrado satisfactorio y recomiendan que sea aceptado como requisito parcial para obtener el grado de Químico Biólogo Clínico.

M. en C. Enrique Wenceslao Coronado Aceves

Presidente

Dra. Adriana Garibay Escobar

Secretaria

Dr. Jesús Borboa Flores

Vocal

M. en C. Paola del Carmen Gastélum Aviña

Suplente

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad de Sonora por brindarme mis estudios.

A mi director de tesis, M. en C. Enrique Wenceslao Coronado Aceves por toda su paciencia, gran apoyo y su amistad inigualable durante mi formación académica.

A la Dra. Adriana Garibay Escobar, por abrirme las puertas del laboratorio de investigación, proporcionarme los medios y las herramientas necesarias para la realización de esta tesis.

Al Dr. Jesús Borboa Flores por su apoyo y colaboración en el desarrollo del proyecto.

Al Ing. José Jesús Sánchez Escalante por su valiosa contribución en la validación taxonómica de las plantas aquí estudiadas así como por su constante apoyo en nuestros proyectos de investigación.

A cada uno mis maestros que con paciencia y entrega me impartieron sus conocimientos.

Al personal del Laboratorio Estatal de Salud Pública del Estado de Sonora por el gran apoyo que mostraron hacia nosotros.

Al Cuerpo Académico de Biología y Bioquímica de la Universidad de Sonora.

A todos los compañeros de los laboratorios de la Universidad de Sonora por sus valiosas aportaciones.

DEDICATORIAS

Primeramente a Dios, porque todo lo que tengo y lo que soy es por gracia, y a mi familia por apoyarme y guiarme por el buen camino.

CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	3
DEDICATORIAS	4
CONTENIDO	5
RESUMEN	10
INTRODUCCIÓN	11
ANTECEDENTES	12
Tuberculosis.....	12
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> y <i>Mycobacterium smegmatis</i>	12
Tratamiento de la Tuberculosis.....	12
Tuberculosis Resistente a Fármacos.....	13
Las Plantas Medicinales y sus Propiedades Biológicas.....	13
Agavaceae: Uso Étnico y Propiedades Medicinales.....	14
Cactáceas: Uso Étnico y Propiedades Medicinales.....	14
Aceites Esenciales.....	16
JUSTIFICACIÓN	21
OBJETIVO GENERAL	22
OBJETIVOS PARTICULARES	22
MATERIALES Y MÉTODOS	23
Obtención de las Muestras Vegetales.....	23
Generación de los Extractos Orgánicos Crudos de Plantas de las familias Agavaceae y Cactaceae.....	23
Cepas Micobacterianas.....	24
Evaluación de la Actividad Antimicobacteriana.....	24
Elaboración de Stocks y Soluciones de Trabajo.....	24
Preparación de Inóculos.....	25
Ensayo de Azul Alamar en Microplaca (MABA) para Evaluar la Actividad contra <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv.....	25
Determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC).....	25
Determinación de la concentración mínima bactericida (MBC).....	26
Ensayo Fluorométrico de Resazurina en Microplaca (fREMA) para	

Evaluar la Actividad contra <i>Mycobacterium smegmatis</i>	27
Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC).....	27
RESULTADOS	28
Material vegetal.....	28
Obtención de los Aceites Esenciales.....	28
Recolección y Validación Taxonómica de las Plantas.....	28
Obtención de los Extractos Orgánicos.....	28
Evaluación de los Extractos Orgánicos y de los Aceites Esenciales.....	28
DISCUSIÓN	33
CONCLUSIONES	46
RECOMENDACIONES	47
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48
ANEXOS	56

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Plantas de la familia Agavaceae utilizadas para el tratamiento de la tuberculosis y síntomas relacionados.....	15
Tabla 2. Cactáceas y sus usos medicinales por etnias sonorenses.....	17
Tabla 3. Uso tradicional de los aceites esenciales evaluados para su actividad antimicobacteriana.....	18
Tabla 4. Actividad antimicobacteriana de los aceites esenciales de plantas medicinales.....	29
Tabla 5. Actividad antimicobacteriana de extractos orgánicos crudos de plantas de la familia Agavaceae.....	30
Tabla 6. Actividad antimicobacteriana de extractos orgánicos crudos de plantas de la familia Cactaceae.....	31
Tabla 7. Compuestos mayoritarios en aceites esenciales.....	40
Tabla 8. Actividad antimicobacteriana previamente reportada de aceites esenciales.....	42
Tabla 9. Compuestos de aceites esenciales con actividad antimicobacteriana reportada	43

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructuras de la resazurina y resorufina.....	34
Figura 2. Estructura química de jujubogenin 3-O-R-L-arabinofuranosil (1→2)- [3-O-(trans)-p-coumaroil-α-D-glucopiranosil (1→3)]-R-L- arabinopiranosido.....	36
Figura 3. Estructuras químicas del fitol, β-sitosterol, 2,4-di-tert-butilfenol y vitamina E.....	38
Figura 4. Estructuras químicas del carvacrol, timol y p-cimeno.....	39

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv.....	56
Anexo 2. Preparación de medio Middlebrook 7H9 suplementado con ácido oleico, albúmina, dextrosa y catalasa (OADC) al 10%.....	57

RESUMEN

La tuberculosis (TB) es producida principalmente por *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) y es la segunda causa de mortalidad a nivel mundial producida por un agente infeccioso, después del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA). La TB es un importante problema de salud global que afecta a millones de personas cada año. Según la Organización Mundial de la Salud, solamente en el 2014, hubo un estimado de 9.6 millones de nuevos casos de TB donde se registraron aproximadamente 1.5 millones de muertes, de los cuales 0.4 millones fueron Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH)-positivas. La TB está catalogada como una enfermedad sistémica, crónica, que afecta principalmente al sistema respiratorio, adquiriéndose por vía aérea. Actualmente, se considera un severo problema de salud pública la presencia de cepas farmacorresistentes. Los productos naturales tienen un gran potencial en el descubrimiento de nuevos fármacos y su desarrollo, por lo que es de gran importancia utilizarlos en la búsqueda de compuestos antimicobacterianos y así contribuir en el tratamiento de la TB. En el presente trabajo se evaluó la actividad antimicobacteriana de plantas de la familia Agavaceae (=Asparagaceae), Cactaceae y aceites esenciales (AE) de plantas medicinales mediante el método de Óxido-Reducción de Resazurina contra *Mtb* H37Rv y *Mycobacterium smegmatis* (*Msm*) mc² 155 ATCC 700084. Los AE mostraron una notable actividad antimicobacteriana: *Lippia graveolens* Kunth y *Lippia palmeri* S. Watson presentaron actividad contra *Mtb* (Concentración Mínima Inhibitoria [MIC]= 125 µg/mL y Concentración Mínima Bactericida [MBC]= 250 µg/mL) y *Msm* (MIC= 125 µg/mL), mientras que los AE de *Eugenia caryophyllata* Thumb., *Thymus vulgaris* L. y *Origanum vulgare* L. presentaron una MIC de ≤62.5 µg/mL sobre *Msm*. Los extractos de agaves y cactáceas evaluadas no presentaron actividad antimicobacteriana importante (MIC >250 µg/mL).

INTRODUCCIÓN

La tuberculosis (TB) es producida principalmente por *Mycobacterium tuberculosis (Mtb)*, y es la segunda causa de mortalidad a nivel mundial producida por un agente infeccioso, después del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA). En el 2014, hubo un estimado de 9.6 millones de nuevos casos de TB de los cuales 5.4 millones fueron hombres, 3.2 millones fueron mujeres y un millón fueron niños. También se registraron 1.5 millones de muertes por TB de los cuales 1.1 millones fueron Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH)-negativas y 0.4 millones fueron VIH-positivas donde aproximadamente 890,000 eran hombres, 480,000 eran mujeres y 140,000 eran niños (Organización Mundial de la Salud [OMS], 2015).

La TB es una enfermedad sistémica, crónica, que afecta principalmente al sistema respiratorio y se adquiere principalmente por vía aérea. Aunque es catalogada como una enfermedad pulmonar (85% de los casos), también afecta a otros órganos y tejidos, siendo mortal si el paciente no recibe el tratamiento adecuado. Actualmente, se considera un severo problema de salud pública la presencia de cepas farmacorresistentes (Müller y col., 2013). Esfuerzos intensos aún son necesarios para hacer que la atención de calidad esté al alcance de todos, sin importar el género, la edad, el tipo de enfermedad, el entorno social y económico (OMS, 2014).

La OMS recomienda un tratamiento contra nuevos casos de TB, que consiste en un régimen de 6 meses con fármacos de primera línea (como isoniazida [INH] y rifampicina [RIF]), el cual tiene una tasa de éxito del 85% o más, sin embargo, cepas drogorresistentes de *Mtb* amenazan el control de la TB globalmente (OMS, 2014).

Las plantas medicinales ofrecen una gran alternativa para cumplir con estas necesidades. En varios países son utilizadas como extractos alcohólicos y acuosos para curar enfermedades (Bañuelos, 1999; Yetman y Van Devender, 2002), pero solo algunas especies de plantas han sido totalmente investigadas en sus propiedades medicinales (Heinrich y Gibbons, 2001). Definitivamente los productos naturales tienen un gran potencial en el descubrimiento de nuevos fármacos y su desarrollo, por lo que es de gran importancia utilizarlos en la búsqueda de compuestos antimicobacterianos y así contribuir en el tratamiento de la esta enfermedad (Newman y Cragg, 2012).

ANTECEDENTES

Tuberculosis

Mtb es también conocido con el nombre de bacilo de Koch y pertenece al complejo de *Mtb*, los cuales son los agentes etiológicos de la TB en humanos. Se transmiten a través del aire cuando personas enfermas de TB pulmonar expelen bacterias al toser, estornudar o escupir, y posteriormente son inhaladas por una persona sana, no obstante solo del 5 al 15% de las personas infectadas con el bacilo se enferman (OMS, 2014; OMS, 2015). En el resto de las personas infectadas, su sistema inmunitario elimina o aísla los bacilos de *Mtb*, pudiendo estos mantenerse en estado latente durante años (Kaufmann, 2001).

Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium smegmatis

Mtb es un bacilo ácido-alcohol resistente de lento crecimiento que posee una rica pared lipídica compuesta de ácidos grasos de cadena larga, glucolípidos y otros componentes, los cuales contribuyen a la capacidad de *Mtb* de sobrevivir dentro de los fagocitos (Kaufmann, 2001). Otro de los microorganismos biológicos que ha sido utilizado en la búsqueda de compuestos antimicobacterianos es *Mycobacterium smegmatis* (*Msm*), la cual es una de las 120 especies de micobacterias no tuberculosas (NTM) existentes, donde alrededor del 90% de las infecciones causadas por ellas involucran al sistema pulmonar (Piersimoni y Scarparo, 2009). Particularmente, *Msm* ha sido asociada a infección pleuropulmonar (Vonmoos y col., 1986), así como a neumonía (Schreiber y col., 2001; Driks y col., 2011). También *Msm* es agente causal de bacteremia por catéter, endocarditis, artritis, osteomielitis, linfadenitis, infecciones de piel y tejidos blandos e infección diseminada (Skiest y Levi, 1998; Ergon y col., 2004).

Tratamiento de la Tuberculosis

El tratamiento de la TB consiste en una asociación de cinco fármacos de primera línea, los cuales se conocen sus mecanismos de acción, donde se asegura en algunos casos no complicados, una tasa de curación superior al 95%, siempre que se complete. El esquema terapéutico recomendado por la OMS (TAES [tratamiento acortado estrictamente supervisado]) incluye a la INH (inhibe la síntesis de pared celular), a la RIF (inhibe la síntesis del ácido

ribonucleico [ARN]), el etambutol (ETB) (inhibe la biosíntesis de la pared micobacteriana), y la pirazinamida (PZA) (efecto esterilizante sobre los bacilos tuberculosos latentes) los primeros dos meses, e INH y RIF hasta completar los seis meses de tratamiento. En niños, se sustituye el ETB por estreptomina (STR) (bloqueando la traducción del ARN mensajero), ya que no es posible monitorizar la agudeza visual (Coll P., 2002).

Tuberculosis Resistente a Fármacos

La TB multidrogorresistente (TB-MDR) se manifiesta cuando las bacterias causantes de la TB son resistentes a la INH y a la RIF (fármacos de primera línea), los dos medicamentos antituberculosos más potentes. La TB de resistencia extendida (TB-XDR) presenta resistencia a dichos medicamentos, a todos los tipos de fluoroquinolonas y a por lo menos uno de los tres medicamentos inyectables de segunda línea (capreomicina, kanamicina y amikacina). Por ello, la resistencia a los medicamentos antituberculosos constituye un problema de salud pública de primera magnitud, que amenaza el éxito de la estrategia establecida por la OMS para detectar y curar la TB poniendo en peligro la lucha contra la enfermedad a escala mundial.

Las Plantas Medicinales y sus Propiedades Biológicas

Los productos naturales son una interesante propuesta en la búsqueda de nuevos agentes antituberculosos (Copp, 2003). Se conocen en el mundo 260 mil especies vegetales, de las cuales solo el 10% se encuentran documentadas en tratados médicos de fitoterapia por sus usos medicinales (Ozuna y col., 2005). En México, alrededor de 4,000 especies de plantas con flores (aproximadamente 15% de la flora total) tienen atributos medicinales, es decir que más o menos una de cada siete especies posee alguna propiedad curativa. Sin embargo, se estima que la validación química, farmacológica y biomédica de los principios activos que contienen se ha llevado a cabo sólo en 5% de estas especies. Los antiguos pobladores de nuestro territorio desarrollaron una de las herbolarias más complejas del mundo, debido a la riqueza cultural y étnica que alcanzaron; así pues, desde tiempos prehispánicos diferentes grupos étnicos han usado plantas con fines medicinales (Ocegueda y col., 2005).

Solamente en el Estado de Sonora, se han caracterizado más de 3000 especies de plantas ampliamente conocidas y utilizadas por los grupos étnicos locales: Yaquis, Mayos, Seris, Guarijíos, Pimas, Kikapúes, y Papágos. Dichos grupos utilizan las hierbas medicinales en su medicina tradicional por razones culturales, así como por la falta de acceso a servicios

médicos y/o su expectativa de resolver patologías consideradas incurables o inoperables por la medicina (Robles-Zepeda y col., 2013).

Las plantas así como los organismos autótrofos, además del metabolismo primario poseen un metabolismo secundario mediante el cual producen compuestos químicos de distinta naturaleza conocidos como metabolitos secundarios. Esta serie de compuestos son producidos a partir de la fotosíntesis y son característicos entre especies o grupos de especies relacionadas entre sí (Taiz y Zeiger, 2006). Poseen una gran variedad de propiedades biológicas y se caracterizan por sus diferentes usos y aplicaciones como medicamentos, insecticidas, herbicidas, perfumes o colorantes etc. (Ávalos y Pérez-Urria, 2009).

Agavaceae: Uso Étnico y Propiedades Medicinales

Agave sisalana comúnmente conocida como sisal o henequén, es una planta perteneciente a la familia Agavaceae (=Asparagaceae), es originaria de Yucatán, México, donde es utilizada para fines comerciales, en los que se usa principalmente la fibra de las hojas, que se procesan especialmente para fabricar cuerdas, cordeles, sacos, telas y tapetes.

Esta es una especie monocárpica con tallos de 40 a 100 cm, posee rosetas de 1.5 a 2 m de diámetro, con vástagos y flores amarillo-verdosas de 4 a 6.5 cm, sus hojas son de 60 a 150 cm, y su jugo se utiliza en la medicina popular como un remedio para la TB pulmonar, lavado de enfermedades de la piel, sífilis y enfermedades hepáticas (El-Hilaly y col., 2003; Naturalista, 2016). Particularmente, el 'Compendio Fitoquímico de la Medicina Tradicional Herbolaria del Estado de Sonora' describe el uso étnico de las plantas de la familia Agavaceae con potencial uso medicinal ante las enfermedades respiratorias, en específico contra la TB (Johnson y col., 1996) (**Tabla 1**).

Cactáceas: Uso Étnico y Propiedades Medicinales

La familia Cactaceae consta de 2000 especies vegetales. Las zonas desérticas y semidesérticas representadas por los desiertos de Sonora y Chihuahua, las Selvas Bajas Caducifolias y la zona de depresión del Balsas, contienen gran diversidad de cactáceas (Jiménez-Sierra, 2011).

Algunas especies de esta familia son utilizadas en el tratamiento de la TB, entre ellas *Lophocereus schottii* (Engelm) Britton & Rose, el cual es un cactus endémico de México

Tabla 1. Plantas de la familia Agavaceae utilizadas para el tratamiento de la tuberculosis y síntomas relacionados

Nombre científico (familia)	Nombre común	Parte utilizada de la planta	Uso tradicional	Etnia	Referencia
<i>Agave angustifolia</i> Haw. (Agavaceae)	Marginata	Hojas Vino	Tos , reumas, picadura de alacrán y viuda negra	Mayo	Bañuelos y Salido, 2012
<i>Agave schottii</i> Engelm. (Agavaceae)	Maguey amole	Savia, goma, raíz, hojas	Tuberculosis , úlceras, llagas, estreñimiento, hidropesía, dolor de muela, sífilis	Seri	López e Hinojosa, 1988
<i>Agave shrevei</i> Gentry (Agavaceae)	Mezcal del monte, kuwo (m), kok mag may (p) totosali (g)	Hojas (pencas)	Dolor de pecho , estreñimiento, y dolor de corazón	Guarijío	Johnson y col., 1996

(m): nombre en lengua Mayo; (p): nombre en lengua Pápago; (g): nombre en lengua Guarijío.

conocido como cardón, muso, sina, sinita, y garambullo, que es empleado en el tratamiento de cáncer, diabetes, úlceras, llagas y desórdenes estomacales (Orozco-Barocio y col., 2013).

En la **Tabla 2** se muestra algunas cactáceas, la parte utilizada, su uso tradicional y las etnias sonorenses que las utilizan.

Aceites Esenciales

Los aceites esenciales (AE) son las fracciones líquidas volátiles, generalmente destilables por arrastre con vapor de agua, que contienen las sustancias responsables del aroma de las plantas y que son importantes en la industria cosmética, de alimentos y farmacéutica (Martínez-Tomé y col., 2001).

En un estudio, AE de diferentes plantas fueron evaluados contra varios microorganismos como *Bacillus subtilis*, *Msm*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, y *Salmonella typhi* donde el AE de *Piper oradendron* Trel. & Standl. tuvo actividad intermedia sobre *Msm* presentando un halo de inhibición de 8 mm (Cruz y col., 2006).

Otro estudio evaluó la actividad antioxidante y antimicobacteriana del AE del arbusto *Croton cajucara* (Benth.) conocido como “sacaca” en la región del Amazonas, donde se obtuvo una concentración inhibitoria mínima (MIC) de 4.88×10^{-3} µg/mL contra *Mtb* y contra *Msm* una MIC de 39.06 µg/mL, la cual fue atribuida al compuesto mayoritario 7-hydroxycalameneno (Azevedo y col., 2013).

En la **tabla 3** se muestran los usos tradicionales de los AE que se estudiaron en la presente investigación. Los materiales vegetales que los originaron pertenecen a los géneros de *Citrus*, *Pinus*, *Eucalyptus*, *Lippia*, entre otros. Especies del género *Pinus* son utilizadas para tratar enfermedades del pecho, fiebres, reumas, llagas y heridas (López e Hinojosa, 1988).

En un estudio un grupo de investigadores evaluó el extracto hexánico de *Citrus aurantifolia* Christm. demostrando actividad antimicobacteriana, destacando los compuestos 5,8-dimetoxipsoraleno y el ácido palmítico que mostraron una MIC de 25-50 µg/mL (Sandoval-Montemayor y col., 2012).

Otro estudio reportó la actividad antimicobacteriana de *Eucalyptus torelliana* F. Muell. y *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh., donde a los compuestos del extracto metanólico les adjudicaron la capacidad de permear la pared cerosa de la micobacteria e interactuar con los componentes de la célula inhibiendo su crecimiento y multiplicación, respaldando el uso

Tabla 2. Cactáceas y sus usos medicinales por etnias sonorenses

Nombre científico (familia)	Nombre común	Parte utilizada de la planta	Uso tradicional	Etnia	Referencia
<i>Carnegiea gigantea</i> Britton and Rose (Cactaceae)	Sahuaro, mojepe (s), Sahu'ó (m)	Tallo	Llagas, picadura de animales (m), reuma, dolores del cuerpo (s)	Seri Mayo	Johnson y col., 1996; Felger y Moser, 1973
<i>Stenocereus thurberi</i> Buxb. (Cactaceae)	Pitahaya, pitahaya dulce, akim (m), un aaki (y), hóol (s)	Corteza	Diabetes, picadura de animales, llagas y heridas (m), picadura de víbora (y), dolor muscular, reumatismo (s)	Seri Mayo Yaqui	Johnson y col., 1996; Felger y Moser, 1973
<i>Lophocereus schottii</i> (Engelm) Britton and Rose (Cactaceae)	Cardón, muso, sina (m), sinita, músaro (y)	Tallo (y, m)	Tuberculosis , cáncer (y, m), diabetes (y, m), llagas (y, m), úlceras, desórdenes estomacales	Mayo Yaqui	Johnson y col., 1996; Orozco-Barocio y col., 2013

(m): nombre en lengua Mayo; (s): nombre en lengua Seri; (y): nombre en lengua Yaqui.

Tabla 3. Uso tradicional de los aceites esenciales evaluados para su actividad antimicrobacteriana

Nombre científico (familia)	Nombre común	Parte utilizada de la planta	Uso tradicional	Etnia	Referencia
<i>Thymus vulgaris</i> L. (Lamiaceae)	Tomillo	Aceite esencial	Antimicrobiano pulmonar , inmunoestimulante, antiinflamatorio, drenador renal y hepatovesicular, cicatrizante, antitusígeno, estimulante del sistema nervioso central (SNC)	ND	Gasca, 2001
<i>Lavandula officinalis</i> Chaix (Lamiaceae)	Lavanda	Extracto acuoso y metanólico	Anticonvulsivo, sedativo, hipnótico, antidepresivo	ND	Alnamer y col., 2011
<i>Citrus aurantium</i> L. (Rutaceae)	Naranja	Flor	Antidepresivo	Mayo	Bañuelos, 1999
<i>Salvia officinalis</i> L. (Lamiaceae)	Salvia	Hojas	Antiespasmódico, antiinflamatorio, astringente	ND	BHMA, 1996
<i>Origanum vulgare</i> L. (Lamiaceae)	Orégano	Hojas	Antibacteriano, antioxidante, antiespasmódico, antiséptico	ND	Chávez y col., 2012
<i>Melaleuca viridiflora</i> Sol. ex Gaertn. (Myrtaceae)	Niaouli	Hojas	Antibacteriano, insecticida, antifúngico, nematicida	ND	Fuselli y col., 2010
<i>Syzygium aromaticum</i> (L.) Merr. & L. M. Perry (= <i>Eugenia caryophyllata</i> Thunb.) (Myrtaceae)	Clavo	ND	Antibacteriano, antiviral, antiinflamatorio, antiséptico	ND	Öztürk y Özbek, 2005
<i>Pinus pinaster</i> Aiton (Pinaceae)	Trementina	ND	Antiinflamatorio, enfermedades cardiovasculares, incremento de la permeabilidad vascular	ND	Iravani y Zolfaghari, 2011.
<i>Eucalyptus globulosus</i> St.-Lag. (Myrtaceae)	Eucalipto	Hojas	Bronquitis	Mayo	Bañuelos, 1999
<i>Rosmarinus officinalis</i> L. (Lamiaceae)	Romero	Hojas	Estimula el SNC, y circulatorio, antiespasmódico, diurético	ND	Özcan y Chalchat, 2008
<i>Melaleuca alternifolia</i> Cheel (Myrtaceae)	Árbol de té	Hojas	Tos , resfriado, antibacteriano, antifúngico, antiinflamatorio	ND	Vila y Cañigüeral, 2006
<i>Lippia graveolens</i> Kunth	Mariola, bura mariola (m),	ND	Tos , gripe, enfermedades	Mayo	Yetman y Van Devender, 2002

(Verbenaceae)	orégano de burro		respiratorias		
<i>Chenopodium ambrosioides</i> L. (Amaranthaceae)	Epazote	ND	Antihelmíntico	Mayo Yaqui	Bañuelos, 1999
<i>Schinus molle</i> L. (Anacardiaceae)	Pirul, pimiento	Hojas y frutos	Tuberculosis , blenorragia, gonorrea, estreñimiento	Mayo	López e Hinojosa, 1998
<i>Azadirachta indica</i> A. Juss. (Lamiaceae)	Neem	Hojas	Antihelmíntico	ND	Dublín y col., 2012
<i>Baccharis salicina</i> Torr. & A. Gray (Asteraceae)	Batamote, jarilla, hierba del pasmo, bachomo	Hojas	Obesidad, anticonceptivo, rabia, heridas, calentura, hemorragia después del parto, dolor de estómago, caída del cabello	Seri Mayo Ópata Yaqui	López e Hinojosa, 1998 Bañuelos, 1999 Johnson y col., 1996
<i>Lippia palmeri</i> S. Watson (Verbenaceae)	Orégano (m, g) Xomcahiift (s)	Hojas	Tos, asma y desórdenes menstruales	Mayos, Guarijíos, Yaquis, Seris	Bañuelos, 1999; Felger y Moser, 1973; Johnson y col., 1996; López e Hinojosa, 1988.
<i>Nicotiana glauca</i> Graham (Solanaceae)	Tabaco de coyote Don Juan Loco (sp) Cornetón (sp)	Hojas	Tos, asma , reumas	Mayos, Yaquis	Johnson y col., 1996; López e Hinojosa, 1988; Yetman y Van Devender, 2002.

(m): nombre en lengua Mayo; ND: No disponible

local asociado al tratamiento de infecciones por micobacterias no tuberculosas (NTM) (Lawal y col., 2011).

En el género *Lippia* se encontraron principalmente compuestos de tipo: terpenos (sesquiterpenos, di- y triterpenos), flavonoides, fenoles, iridoides glicósidos, fenilpropanoides y naftoquinonas (Ombito y col., 2014). Generalmente, los AE o los compuestos fenólicos (flavonoides) son los principios activos (Pascual y col., 2001).

JUSTIFICACIÓN

El creciente problema de la TB farmacorresistente requiere de investigaciones que aporten plantas candidatas para el aislamiento y caracterización química de compuestos antimicobacterianos. Estudios previos de plantas medicinales sonorenses demuestran su gran potencial para ser utilizadas en el descubrimiento de nuevos fármacos antimicobacterianos por lo que es de gran importancia extender estas investigaciones a otras familias de plantas (Agavaceae y Cactaceae), elaborar extractos orgánicos crudos y evaluar su actividad. Asimismo, debido a la actividad antimicrobiana natural de los aceites esenciales de plantas es necesario evaluar dicha actividad biológica.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad antimicobacteriana de plantas de la familia Agavaceae, Cactaceae y aceites esenciales contra *Mtb* mediante el MABA, y *Msm* mediante el fREMA.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Recolectar plantas de las familias Agavaceae y Cactaceae.
- Validar taxonómicamente las especies recolectadas en el Herbario de la Universidad de Sonora.
- Generar los extractos orgánicos crudos de las plantas con hexano, diclorometano, acetato de etilo, y metanol.
- Obtener aceites esenciales de plantas medicinales.
- Evaluar la actividad de los extractos orgánicos crudos y aceites esenciales contra *Mtb* mediante el MABA.
- Evaluar la actividad de los extractos orgánicos crudos y aceites esenciales de los extractos orgánicos crudos contra *Msm* mediante fREMA.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de las Muestras Vegetales

Se realizó la recolección de las plantas en el estado de Sonora, México: *L. schottii* y *Stenocereus thurberi* Buxb. (Playa La Manga, San Carlos, Guaymas, Sonora; 27.994912° N - 111.131545° O; Septiembre de 2014); *Carnegiea gigantea* (Hermosillo, Sonora; 29.207277° N, - 110.997743° O; Agosto de 2014); *Agave desmettiana* Jacobi; *Agave americana* L., *Agave angustifolia* Haw., *Agave colorata* Gentry y *Hesperaloe parviflora* Torr. (cultivadas en la Universidad de Sonora Unidad Centro; Hermosillo, Sonora; 29.082012° N, -10.961681° O; 22 de Febrero de 2015).

Los AE fueron provistos por el Dr. Jesús Borboa Flores responsable del Laboratorio de Entomología e investigador del DIPA de la Universidad de Sonora. 11 aceites fueron de origen comercial, y 8 se obtuvieron mediante destilación por arrastre con vapor de los cuales *Baccharis salicina* (Batamote) se recolectó en las coordenadas 29° 42' 0" N, 110° 09' 12" O, *Lippia palmeri* (Orégano) en 29° 02' 52" N, 110° 50' 16" O, *E. camaldulensis* (Eucalipto) en 29° 00' 44" N, 111° 08' 02" O, *Azadirachta indica* (Neem) 29° 04' 52.7" N, 110° 57' 45.8" O; y *Nicotiana glauca* (Tabaco) 27° 02' 36" N, 109° 00' 03" O (Iturriade, 2012).

Generación de los Extractos Orgánicos Crudos de Plantas de las Familias Agavaceae y Cactaceae

Se obtuvieron los extractos por maceración de cada una de las plantas recolectadas. Se cortaron 20 g de material vegetal y se molieron en un mortero de porcelana con mano en 200 mL de *n*-hexano, diclorometano, acetato de etilo y metanol (proporción 1:10 peso/volumen). Se extrajeron durante 7 días mediante agitación manual ocasional a temperatura ambiente (aproximadamente 25°C). Se filtraron las partes sólidas con algodón y papel filtro. Los extractos se concentraron mediante evaporación rotatoria a presión reducida a 45°C (Buchi; controlador de vacío V-850; rotavapor R-210; bomba de vacío V-700; baño térmico B-491; recirculador F-100).

Cepas Micobacterianas

Se utilizó la cepa de *Mtb* H37Rv como referencia (**Anexo 1**), la cual es sensible a fármacos de primera línea (estreptomycin, isoniazida, rifampicina, etambutol, y pirazinamida), fue provista por el Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE) de México a través del Laboratorio Estatal de Salud Pública del Estado de Sonora, México (LESP-SON). La cepa de *Msm* mc² 155 que se utilizó proviene de la American Type Culture Collection (ATCC) No. 700084.

Evaluación de la Actividad Antimicobacteriana

La evaluación de la actividad de los extractos orgánicos y de los AE contra *Mtb* H37Rv de las muestras se realizó en el laboratorio de aislamiento de gérmenes de alta peligrosidad (AGAP) del LESP-SON en la ciudad de Hermosillo, Sonora, y la actividad contra *Msm* se llevó a cabo en el Laboratorio de Investigación en Productos Naturales del Departamento de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad de Sonora (Unidad Centro).

Además de las cactáceas y agaves previamente mencionados, se evaluaron los AE de *Thymus vulgaris*, *Lavandula officinalis*, *Citrus aurantium*, *Salvia officinalis*, *Origanum vulgare*, *Melaleuca viridiflora*, *Eugenia caryophyllata*, *Pinus pinaster*, *Eucalyptus globulus*, *Rosmarinus officinalis*, *Melaleuca alternifolia*, *Lippia graveolens*, *L. palmeri*, *Chenopodium ambrosioides*, *Schinus molle*, *Eucalyptus sp.*, *A. indica*, *B. salicina* y *N. glauca*.

Elaboración de Stocks y Soluciones de Trabajo

Se prepararon soluciones stock de 20 mg/mL en dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma Aldrich) a partir de los extractos crudos obtenidos con diclorometano, acetato de etilo y metanol; y de 5 mg/mL de los extractos crudos obtenidos con *n*-hexano. Se dejaron los extractos en DMSO durante al menos 1 h con el objetivo de favorecer la solubilidad de la muestra, y con ello asegurar su esterilidad por efecto del disolvente (Molina-Salinas y col., 2006). Posteriormente se realizó una dilución 1:5 de los stock en medio de cultivo Middlebrook 7H9 no suplementado, para obtener las soluciones de trabajo de 4000 µg/mL y 1000 µg/mL respectivamente.

Todas las soluciones de trabajo se conservaron en refrigeración a 4°C hasta el momento de su evaluación.

Preparación de Inóculos

Tanto *Mtb* H37Rv y *Msm* fueron cultivadas en medio Lowenstein-Jensen a 37°C hasta alcanzar la fase logarítmica de crecimiento, 12-14 y 3-4 días respectivamente (Boligon y col., 2012; Robles-Zepeda y col., 2013). De manera individual, con un asa desechable estéril, se colectaron las colonias asépticamente, se dispusieron en un vial con 5 perlas de vidrio (~3 mm de diámetro) y 8 mL de solución salina (0.85% NaCl); se agitó en un vortex Genie II durante 10 y 0.5 min (*Mtb* H37Rv y *Msm* respectivamente), se dejaron reposar las suspensiones bacterianas 15 min a temperatura ambiente, los sobrenadantes se ajustaron a una turbidez igual al estándar de McFarland 1 utilizando un turbidímetro Orion Aquafast AQ 4500 (Thermo Scientific) y se obtuvo una concentración bacteriana aproximada a 3.0×10^8 unidades formadoras de colonias (UFC)/mL. Posteriormente se preparó el inóculo bacteriano de *Mtb* H37Rv y de *Msm*, se realizó una dilución 1:25 y 1:50, respectivamente, en Middlebrook 7H9 suplementado con 0.4% (v/v) glicerol y 10% (v/v) OADC (ácido oleico, albúmina, dextrosa y catalasa; Becton Dickinson) (MDB 7H9) (**Anexo 2**) (Robles-Zepeda y col., 2013, Jiménez-Arellanes y col., 2013). Los inóculos bacterianos se prepararon previamente a su utilización en el experimento.

Ensayo de Azul Alamar en Microplaca (MABA) para Evaluar la Actividad contra *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv

Determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC)

Para la determinación de la MIC de cada uno de los extractos, se trabajó con el método de MABA desarrollado por Franzblau y colaboradores en 1998; para ello se utilizaron placas de 96 pozos de poliestireno con fondo plano, con tapa de baja evaporación. Inicialmente, 200 µL de agua destilada estéril fue colocada en los pozos perimetrales, y 100 µL de caldo Middlebrook 7H9 suplementado con OADC (10%) se colocaron en los pozos restantes.

En una primera etapa, se evaluaron todos los extractos a su máxima concentración final en placa (*n*-hexano: 250 µg/mL; diclorometano, acetato de etilo, y metanol: 1000 µg/mL). Para ello, se colocaron 100 µL de las soluciones de trabajo de todos los extractos, se realizó una dilución 1:2 descartando los 100 µL sobrantes, y se agregaron 100 µL del inóculo bacteriano.

Como controles negativos se utilizaron 200 µL de medio solo, y 200 µL de la máxima concentración evaluada de los extractos (sin bacteria). Se utilizó un control de crecimiento de micobacteria. Como antibiótico control se utilizó rifampicina (Sigma Aldrich) a las

concentraciones de $15-9.15 \times 10^{-4}$ $\mu\text{g/mL}$. La máxima concentración final de DMSO en placa fue de 5%, la cual no resultó inhibitoria sobre el inóculo bacteriano (control interno).

Las placas se sellaron con parafilm e incubaron a 37°C dentro de una bolsa cerrada de plástico ziploc® CO_2 -permeable. Después de 5 días de incubación, se agregaron a cada pozo 50 μL de una mezcla fresca de Azul Alamar (Invitrogen; AbD Serotec) y Tween 80 al 10% reducido en peróxidos (Sigma Aldrich) en una proporción 1:1. La microplaca se reselló con parafilm y se volvió a incubar durante 48 h, después de las cuales se interpretaron los virajes de colores. En esta etapa, se consideraron inhibitorios aquellos extractos que no produjeron un viraje de color (de azul a rosa), es decir, que no redujeron el reactivo (de azul a rosa) (Collins y Franzblau, 1997).

Las muestras inhibitorias se reevaluaron a distintas concentraciones (125-1000 $\mu\text{g/mL}$ los AE y los extractos obtenidos con diclorometano, acetato de etilo y metanol; 31.25-250 $\mu\text{g/mL}$ los extractos hexánicos), para ello se colocaron 100 μL de la solución de trabajo de cada extracto, a partir de la cual se realizaron diluciones seriadas 1:2 a los siguientes 3 pozos, y se descartaron los 100 μL de la última dilución. Se agregaron 100 μL de inóculo bacteriano, se selló la placa con parafilm y se incubó a 37°C durante 5 días, después de los cuales se agregó la mezcla de Azul Alamar y Tween a los controles y se reincubó la placa durante 24 h. Si los pozos control negativos permanecieron azul y los pozos control positivos viraron a rosa, la mezcla de reactivos se agregó al resto de la microplaca, se reincubó durante 48 h adicionales, y los colores se interpretaron. Finalmente, la MIC se definió como la mínima concentración de extracto crudo o AE a la que no ocurrió un cambio de color de azul a rosa. Los experimentos fueron realizados por triplicado interensayo.

Determinación de la concentración mínima bactericida (MBC)

A todos los extractos que presentaron actividad inhibitoria en el MABA, se determinó su actividad micobactericida (Molina-Salinas y col., 2006). Brevemente, 5 μL de las suspensiones micobacterianas (con exposición de 7 días a los extractos crudos de plantas o AE) y de los controles duplicados no revelados se transfirieron a una nueva microplaca conteniendo 195 μL de medio fresco por pozo. Las microplacas se reincubaron y se revelaron de la misma manera que en MABA. La MBC correspondió a la mínima concentración de extracto que no produjo cambio de color en los cultivos reincubados.

Ensayo Fluorométrico de Resazurina en Microplaca (fREMA) para Evaluar la Actividad contra *Mycobacterium smegmatis*

Determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC)

El ensayo se realizó de manera similar al MABA, las principales diferencias consistieron en los intervalos de concentraciones evaluados para los AE (62.5-1000 µg/mL), los tiempos de incubación y el revelado. Una vez que se montó el experimento igual al MABA (agregando en este caso el inóculo de *Msm* y un control de dilución 1:100 del inóculo bacteriano en concentraciones de DMSO de 0.312%-5%), se incubó la placa durante 48 h y se agregaron 30 µL de resazurina (Sigma Aldrich) al 0.01% (peso/volumen) a todos los pozos (Palomino y col., 2002). Posteriormente se realizó una medición fluorométrica mediante el equipo Fluoroskan Ascent (Thermo Scientific, Finland), en modalidad de lectura por la parte superior de la placa, a una longitud de onda de excitación de 485 nm y a una longitud de onda de emisión de 538 nm. Se registraron las unidades relativas de fluorescencia (RFU).

Se utilizó gentamicina (Sigma Aldrich) como antibiótico control a las concentraciones de 0.125-16 µg/mL.

Pozos con extracto o AE, DMSO y medio de cultivo fueron utilizados para determinar la autofluorescencia de los compuestos, y se utilizaron como controles de substracción de fondo.

La MIC correspondió a la menor concentración de extracto crudo, AE o antibiótico que presentó menor intensidad de fluorescencia que la generada por el respectivo control del 1% de crecimiento (MIC₉₉).

RESULTADOS

Material vegetal

Obtención de los Aceites Esenciales

El origen de los AE (obtenidos por hidrodestilación y comerciales) es descrito en la **Tabla 4**.

Recolección y Validación Taxonómica de las Plantas

Se depositó un ejemplar de cada planta en el Herbario de la Universidad de Sonora, se validaron taxonómicamente por el Ing. Jesús Sánchez Escalante, y se les asignaron los números de folio presentados en las **Tabla 5 y 6**.

Obtención de los Extractos Orgánicos

Se obtuvieron los extractos orgánicos de cada planta con los solventes metanol, diclorometano, acetato de etilo y hexano. Los rendimientos de dichos extractos se encuentran descritos en las **Tablas 5 y 6**.

Los extractos obtenidos con metanol presentaron mayores rendimientos en comparación con los obtenidos con hexano, acetato de etilo y diclorometano.

Evaluación de los Extractos Orgánicos y de los Aceites Esenciales

Posteriormente, en el laboratorio de aislamiento de gérmenes de alta peligrosidad del LESP-SON se evaluó la actividad antimicobacteriana contra la cepa de *Mtb* H37Rv mediante el MABA, después se realizó la evaluación contra *Msm* ATCC 700084 en el Laboratorio de Investigación en Productos naturales del Departamento de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad de Sonora (Unidad Centro), obteniendo los resultados descritos en las **Tablas 4, 5 y 6**, donde el AE de *L. graveolens* Kunth. y *L. palmeri* S. Watson destacaron por su actividad (MIC= ≤ 125 $\mu\text{g/mL}$ MBC= 250 $\mu\text{g/mL}$) contra *Mtb*, en contraste, los AE de *Lavandula officinalis*, *Citrus aurantium*, *R. officinalis*, entre otros, no presentaron alguna actividad antimicobacteriana.

Tabla 4. Actividad antimicobacteriana de los aceites esenciales de plantas medicinales

Aceite esencial			<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv		<i>Mycobacterium smegmatis</i> ATCC 700084
Origen	Nombre	Nombre común	MIC (µg/mL)	MBC (µg/mL)	MIC ₉₉ (µg/mL)
Comercial	<i>Thymus vulgaris</i>	Tomillo	1000	1000	≤62.5
	<i>Lavandula officinalis</i>	Lavanda	NI	ND	NI
	<i>Citrus aurantium</i>	Azahar	NI	ND	NI
	<i>Salvia officinalis</i>	Salvia	NI	ND	≤1000
	<i>Origanum vulgare</i>	Orégano	500	500	≤62.5
	<i>Melaleuca viridiflora</i>	Niaouli	1000	1000	≤1000
	<i>Eugenia caryophyllata</i>	Clavo	500	500	≤62.5
	<i>Pinus pinaster</i>	Trementina	1000	1000	≤1000
	<i>Eucalyptus globulus</i>	Eucalipto	NI	ND	≤1000
	<i>Rosmarinus officinalis</i>	Romero	NI	ND	NI
DIPA-USON	<i>Melaleuca alternifolia</i>	Árbol del té	500	1000	NI
	<i>Lippia graveolens</i>	Orégano	≤125	250	125
	<i>Lippia palmeri</i>	Orégano	≤125	250	125
	<i>Chenopodium ambrosioides</i>	Epazote	500	1000	1000
	<i>Schinus molle</i>	Pirul	NI	ND	1000
	<i>Eucalyptus</i> sp.	Eucalipto	NI	ND	1000
	<i>Azadirachta indica</i>	Neem	NI	ND	1000
	<i>Baccharis salicifolia</i>	Batamote	1000	1000	125
SIGMA	Rifampicina		0.117	0.234	-
SIGMA	Gentamicina		-	-	≤0.125

MIC: concentración mínima inhibitoria; **MBC:** concentración mínima bactericida; -: No determinada; **MIC₉₉:** concentración inhibitoria mínima del 99% del inóculo bacteriano **ND:** No determinada debido a que no se presentó actividad inhibitoria; **DIPA-USON:** Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos de la Universidad de Sonora.

Tabla 5. Actividad antimicobacteriana de extractos orgánicos crudos de plantas de la familia Agavaceae

Nombre	Folio	Parte utilizada	Solvente	Rendimiento (%)	Actividad antimicobacteriana		
					<i>Mtb</i> H37Rv*		<i>Msm</i> ATCC 70084
					MIC	MBC	MIC ₉₉
<i>Agave desmettiana</i> Jacobi	22167	Hoja	A	0.79%	1000	1000	NI
			M	7.79%	NI	NB	≤1000
<i>Agave americana</i> L.	22166	Hoja	D	0.19%	NI	NB	NI
			A	0.36%	NI	NB	ND
			M	5.19%	NI	NB	NI
<i>Agave angustifolia</i> Haw.	22165	Hoja	A	0.52%	1000	NB	ND
			M	7.59%	NI	NB	ND
		Flor	D	0.37%	NI	NB	NI
			A	1.17%	1000	NB	NI
			M	12.22%	NI	NB	≤1000
<i>Agave colorata</i> Gentry	22169	Hoja	H	0.25%	NI	NB	ND
			A	0.28%	NI	NB	NI
			M	3.62%	NI	NB	≤1000
<i>Hesperaloe parviflora</i> Torr.	22170	Hoja	D	-	1000	NB	NI
			A	-	NI	NB	≤1000
			M	10.06%	NI	NB	NI
			Rifampicina		0.117	0.234	-
			Gentamicina		-	-	≤0.125

*: antibiótico control; **MIC**: concentración mínima inhibitoria; **MBC**: concentración mínima bactericida; -: No determinada; **MIC₉₉**: concentración inhibitoria mínima del 99% del inóculo bacteriano; **ND**: No determinada debido a que no se presentó actividad inhibitoria; **NI**: No inhibitoria a 1000 µg/mL; **NB**: No bactericida a la máxima concentración evaluada; **H**: Extracto hexánico (250 µg/mL); **D**: extracto de diclorometano, **A**: acetato de etilo, y **M**: metanol (1000 µg/mL).

Tabla 6. Actividad antimicobacteriana de extractos orgánicos crudos de plantas de la familia Cactaceae

Nombre	Folio	Parte utilizada	Solvente	Rendimiento (%)	Actividad antimicobacteriana		
					<i>Mtb</i> H37Rv		<i>Msm</i> ATCC700084
					MIC	MBC	MIC ₉₉
<i>Lophocereus schottii</i>	22168	Hoja	H	0.11%	1000	1000	ND
			D	ND	NI	NB	ND
			A	1.60%	NI	NB	≤1000
			M	3.61%	NI	NB	≤1000
<i>Stenocereus thurberi</i>	RHNM-MSH-2	Hoja	H	1.14%	NI	NB	NI
			D	2.81%	NI	NB	ND
			A	3.08%	NI	NB	ND
			M	9.35%	NI	NB	ND
<i>Carnegiea gigantea</i>	22168	Hoja	H	ND	NI	NB	ND
			D	ND	NI	NB	≤1000
			A	ND	NI	NB	NI
			M	ND	NI	NB	≤1000
			Rifampicina*		0.117	0.234	-
			Gentamicina*		-	-	≤0.125

*: antibiótico control; **MIC**: concentración mínima inhibitoria; **MBC**: concentración mínima bactericida; -: No determinada; **MIC₉₉**: concentración inhibitoria mínima del 99% del inóculo bacteriano; **ND**: No determinada debido a que no se presentó actividad inhibitoria. **NI**: No inhibitoria a 1000 µg/mL; **NB**: No bactericida a 1000 µg/mL. **H**: Extracto hexánico (250 µg/mL); **D**: extracto de diclorometano, **A**: acetato de etilo, y **M**: metanol (1000 µg/mL).

Después mediante el fREMA se realizó la evaluación de los AE contra *Msm* obteniendo los resultados descritos en la **Tabla 4**, donde destacó *E. caryophyllata* Thumb. con una MIC de ≤ 62.5 $\mu\text{g/mL}$, seguida de *L. graveolens*, *L. palmeri*, *O. vulgare* L., y *B. salicina* (Ruiz & Pav.) Pers. con una MIC de 250 $\mu\text{g/mL}$; mientras que *C. ambrosioides*, *S. molle*, *Eucalyptus sp.*, *A. indica* no presentaron una actividad destacable contra *Msm* (MIC= 1000 $\mu\text{g/mL}$).

Respecto a los extractos crudos orgánicos de agaves y cactáceas, ninguno presentó actividad antimicobacteriana de interés (MIC >250 $\mu\text{g/mL}$).

DISCUSIÓN

La TB es un problema de salud internacional cada vez mayor, el número de muertes causadas por ella es inaceptablemente alto: con un diagnóstico oportuno y el tratamiento correcto, casi todas las personas con TB se pueden curar (OMS 2015). Sin embargo, el aumento de la prevalencia de la TB multidrogorresistente (MDR-TB) ha contribuido en gran medida al aumento de las dificultades para su control (Tomioka, 2006). Algunas plantas han sido reconocidas por grupos étnicos para el tratamiento de enfermedades como la TB pulmonar y síntomas relacionados a ella (Yetman y Van Devender, 2002; Johnson y col., 1996). Por ello la apuesta en la obtención de compuestos de origen natural, que muestren un efecto inhibitorio y bactericida sobre micobacterias, principalmente sobre *Mtb* (Copp, 2003).

Hoy en día existen diversas metodologías *in vitro* e *in vivo* para evaluar actividad antimicobacteriana enfocadas principalmente contra *Mtb*. En su mayoría, los descubrimientos de fármacos comenzaron a desarrollarse en ensayos basados en la utilización de colorantes redox (Resazurina/Azul de Alamar) (Franzblau y col., 2012). Hasta mediados de la década de 1970 las lecturas estaban bastante limitadas a la observación visual o por medición espectrofotométrica de la turbidez de cultivos en tubo hasta que la descripción de un ensayo radiométrico automatizable para la determinación del crecimiento de *Mtb* fue el precursor del sistema BACTEC 460. Existen nuevas pruebas automatizadas para medir sensibilidad a los medicamentos donde conservan el formato individual en tubo, pero monitorizan el crecimiento/inhibición a través de la detección fluorométrica del consumo de oxígeno (MGIT), la detección colorimétrica de dióxido de carbono (MB/BacT) o la detección de un cambio de presión debido al consumo de oxígeno (Versa TREK).

En la presente investigación se utilizó azul alamar y una solución de resazurina (**Figura 1**) para observar la viabilidad de las micobacterias debido a que la resazurina previamente fue identificada como el compuesto activo del primero (O'Brien y col., 2000), y es un indicador de óxido-reducción utilizado para medir actividad antimicobacteriana (Palomino y col., 2002).

En la actualidad se han utilizado distintos métodos y procedimientos para evaluar agentes antimicobacterianos, lo que resulta en una diversidad de puntos de corte para definir un valor MIC como activo: MIC ≤ 100 $\mu\text{g/mL}$ (Jiménez-Arellanes y col, 2003), ≤ 125 $\mu\text{g/mL}$ (Molina-Salinas y col., 2007), ≤ 200 $\mu\text{g/mL}$, (Robles-Zepeda y col., 2013). Por esta razón, no hay una norma internacional establecida que defina adecuadamente el nivel de actividad

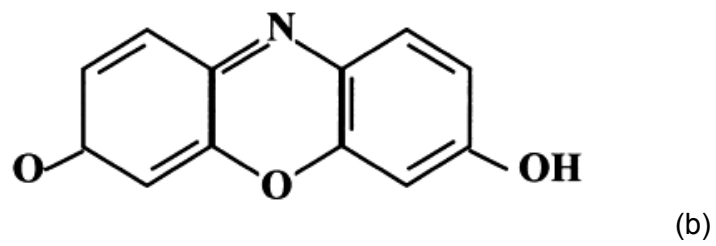
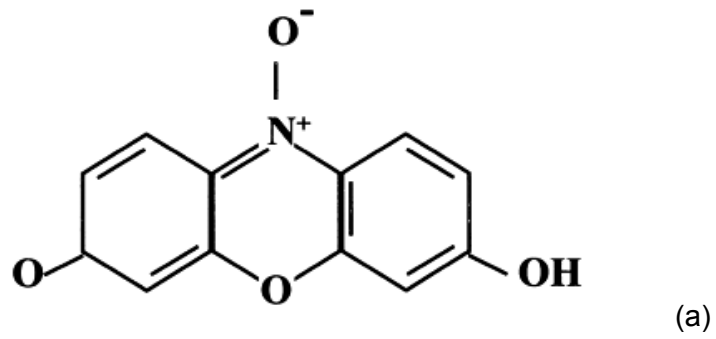


Figura 1. Estructuras de la resazurina (a) y resorufina (b) (O'Brien y col., 2000)

antimicobacteriana. Para el presente estudio definimos como activo el extracto o AE con un valor de MIC de ≤ 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Existen revisiones sobre la actividad antimicobacteriana de extractos orgánicos y compuestos puros de plantas medicinales mexicanas (Jiménez-Arellanes y col., 2010). Un estudio reciente mostró que los extractos etanólicos de *Murraya koenigii* L. (Rutaceae) y *Artemisia nilagirica* C.B. Clarke (Compositae) poseen una actividad antimicobacteriana significativa siendo *A. nilagirica* la que presentó un mayor nivel de inhibición frente a *Msm* (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Análisis fitoquímicos de esta planta mostraron la presencia de alcaloides, fenoles, quininas y saponinas, donde estas últimas demostraron que poseen actividad antimicrobiana (Naik y col., 2014).

Los agaves son plantas nativas de América. México es el centro de origen y diversificación de este género (García y Galván, 1995). En general, los agaves (*A. angustifolia*, *Agave vivipara* L., etc.) en el Estado de Sonora, han sido extensamente utilizados en la medicina para tratar síntomas como deshidratación, picaduras de insectos, calambres y hasta cálculos renales (Bañuelos y Salido, 2012). El conocimiento empírico ha demostrado que el jugo extraído de las hojas de *A. sisalana* es utilizado para el tratamiento contra la TB pulmonar (Debnath y col., 2010).

O'donnell y colaboradores (2006) evaluaron la actividad antimicobacteriana de dos compuestos del tipo isoflavononas aisladas de *Chlorophytum inornatum* Ker Gawl. de la familia Agavaceae (=Liliaceae). Esta familia es reconocida por su alto contenido en saponinas, las cuales se han identificado en plantas como *A. americana* L. (Yokosuka y col., 2000), *Agave attenuata* Salm-Dyck (da Silva y col., 2002) y *Agave decipiens* Baker (Abdel-Gawad y col., 1999). De la planta *Colubrina retusa* Pittier (Agavaceae) se aisló un compuesto del tipo saponina identificado como jujubogenin 3-O-R-L-arabinofuranosil(1 \rightarrow 2)-[3-O-(trans)-p-coumaroil- α -D-glucopiranosil (1 \rightarrow 3)]-R-L-arabinopiranosido (**Figura 2**) aislado el cual presentó una MIC de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ sobre *Mycobacterium intracellulare* ATCC 23068 (EISOhly y col., 1999). De los agaves evaluados no obtuvimos una MIC destacable que nos indicara que estas plantas poseen actividad antimicobacteriana. Probablemente el hecho de que las plantas colectadas son cultivadas para jardinería donde reciben tratamientos y cuidados especiales pueda influir en la producción de los metabolitos que presentan actividad antimicobacteriana, pues el nivel de estrés al que se someta la planta y otros factores condicionan la producción de éstos tales como la ubicación, el clima, la temporada de colecta, la composición del suelo donde se desarrollen, entre otros posibles factores (Ncube y col., 2008).

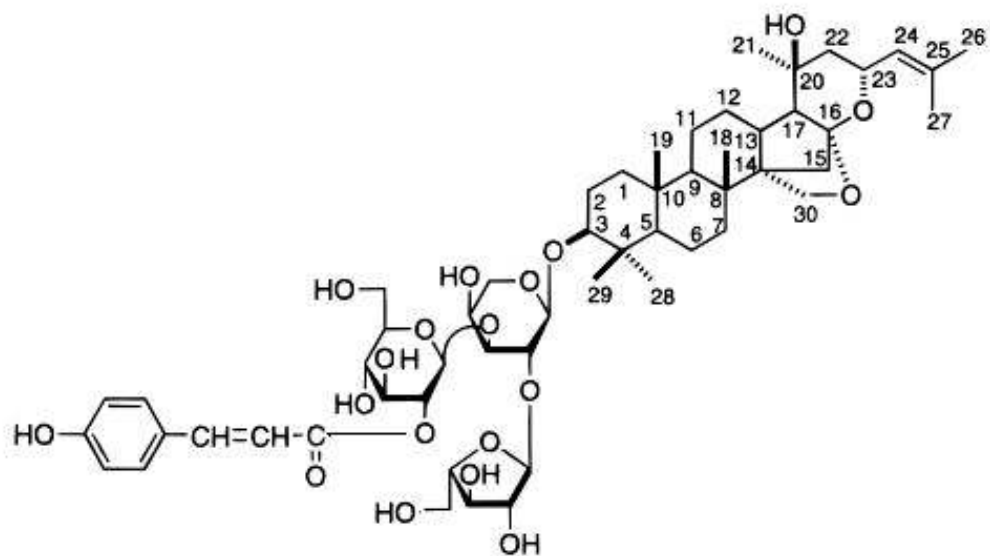


Figura 2. Estructura química de jujubogenin 3-O-R-L-arabinofuranosil (1→2)-[3-O-(trans)-p-coumaroil- α -D-glucopiranosil (1→3)]-R-L-arabinopiranosido. (ElSohly y col., 1999)

Por otro lado, las plantas pertenecientes a la familia Cactaceae son reconocidas por sus propiedades antirreumáticas, analgésicas, entre otras (Johnson y col., 1996; Felger y Moser, 1973). *L. schotti* es una cactácea que fue reportada por Orozco-Barocio y colaboradores (2013) para el tratamiento de la TB, sin embargo, en el presente estudio no se encontró actividad antimicobacteriana destacable (extracto hexánico, MIC= 1000 µg/mL) contra *Mtb*, mientras que el resto de los extractos resultaron inactivos. Posiblemente este resultado esté relacionado con la polaridad de los solventes utilizados en la obtención de los extractos, donde los mayores rendimientos fueron para el solvente de metanol, el cual extrae compuestos de características muy polares, los cuales presentan dificultades para atravesar la pared lipídica micobacteriana (Korycka y col., 2005)

Por otra parte, varios de los compuestos mayoritarios identificados en *Pereskia bleo* Kunth planta perteneciente a la familia Cactaceae, se encuentran conformados por fitol, β-sitosterol, 2,4-di-tert-butilfenol y vitamina E (**Figura 3**) (Rahman, 2008), de estos Saikia y colaboradores (2010) reportaron la actividad antimicobacteriana del fitol con una MIC de 100 µg/mL contra *Mtb*.

De otro lado, los AE obtenidos de las distintas partes de las plantas son producidos para cubrir sus necesidades como protección y de atracción, éstos están compuestos principalmente por metabolitos secundarios que poseen propiedades curativas y son frecuentemente estudiados debido a sus propiedades antihelmínticas, antibacterianas, antifúngicas, antiinflamatorias, antioxidantes, entre otras. Químicamente éstos están altamente enriquecidos con compuestos de tipo terpenos cuya base estructural es el isopreno (Tripath y col., 2011).

Los metabolitos secundarios de origen terpenoide dominan el número de productos naturales reportados con actividad antimicobacteriana, esto es quizás una consecuencia del hecho de que la búsqueda de productos naturales se ha centrado en las plantas terrestres, las cuales tienden a especializarse en la biosíntesis de terpenos, pero también porque los derivados de los terpenos poseen típicamente de moderada a alta lipofiliidad, lo cual favorece la penetración de la pared celular micobacteriana (Copp, 2003).

El orégano (*O. vulgare*) posee propiedades antioxidantes, antifúngicas, antiespasmódicas, antisépticas, y sobre todo se caracteriza por la potente acción de sus componentes mayoritarios carvacrol y timol (**Figura 4; Tabla 7**) que le otorgan a esta planta capacidad antibacteriana. Estos componentes tienen la capacidad de destruir la estructura de la membrana celular de *E. coli*, causando el incremento de su permeabilidad y por consiguiente la salida de iones inorgánicos, ATP, ácidos nucleicos y aminoácidos, etc. (Chávez y col., 2008).

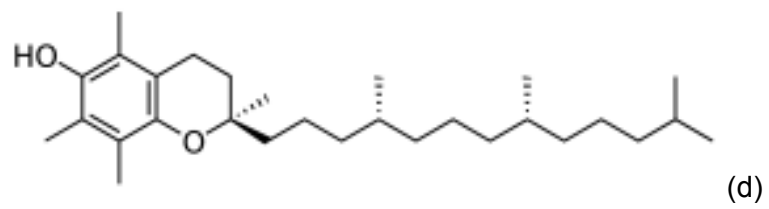
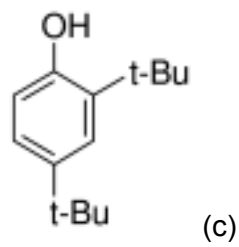
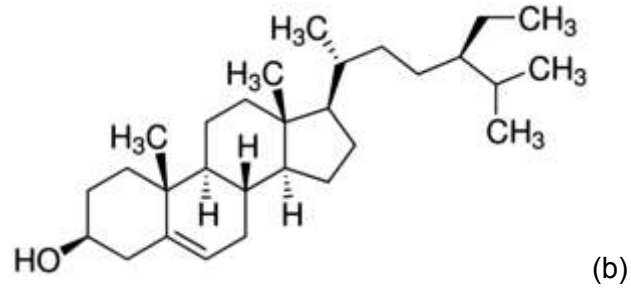
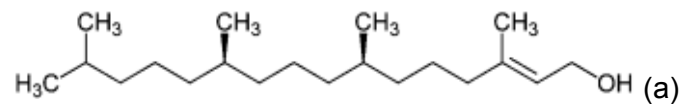


Figura 3. Estructuras químicas del fitol (a), β -sitosterol (b), 2,4-di-tert-butilfenol (c) y vitamina E (d). (Saikia y col., 2010)

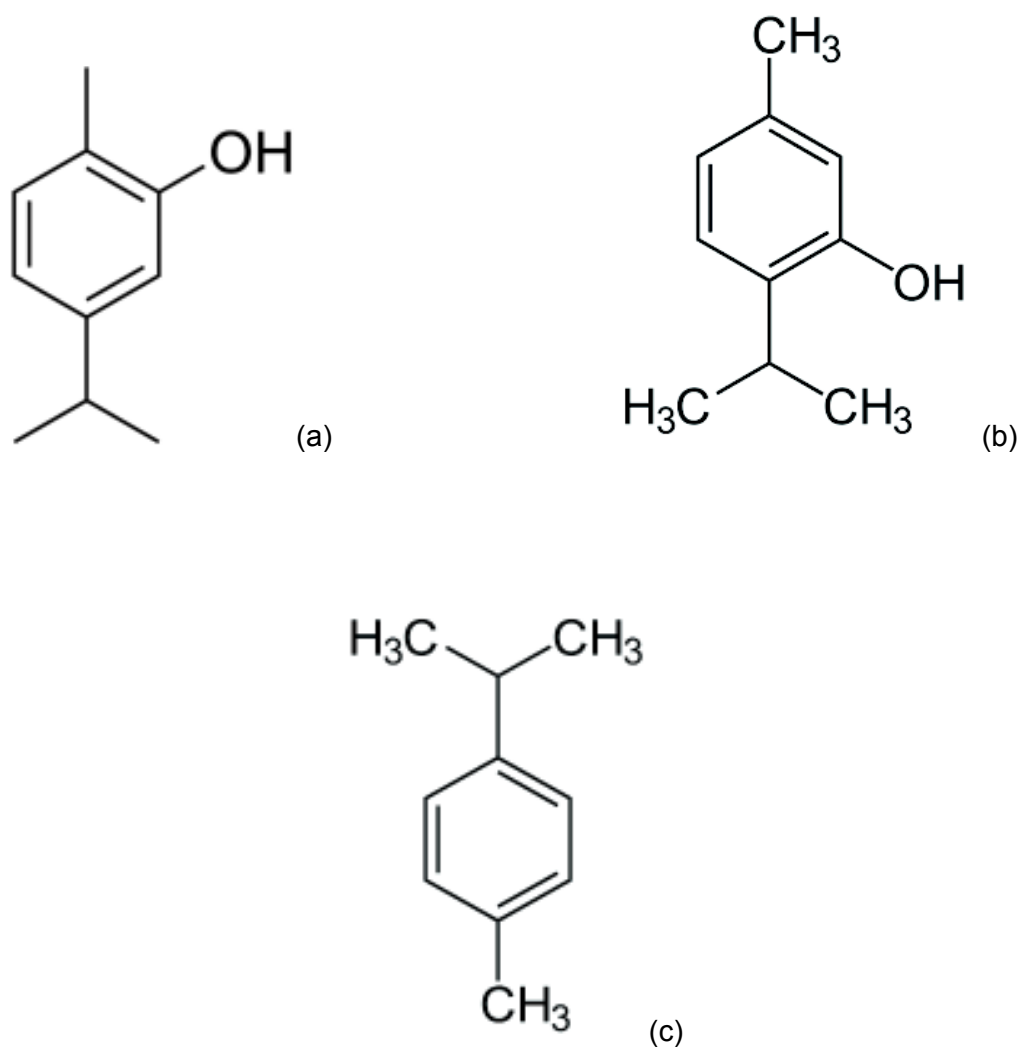


Figura 4. Estructuras químicas del carvacrol (a), timol (b) y p-cimeno (c) (Chávez y col., 2012; Ortega-Nieblas y col., 2011)

Tabla 7. Compuestos mayoritarios en aceites esenciales

Aceites esenciales	Componentes mayoritarios	Referencia
<i>Lavandula angustifolia</i> Mill. (= <i>L. officinalis</i>) choix	Linalol (32.1% de un 92.8%), acetato de linalil (22.7% de un 92.8%), eucaliptol (1,8-cineol) (7.5%), camfor (7.1% de un 92.8%)	(Rodríguez y col., 2014)
<i>Origanum vulgare</i> L.	Carvacrol (21.8%), *(12%), timol (18.2%),*(42%) y-muuroleno (4.4%), β-bisaboleno (4.1%), *cariofileno (24.5%)	(De Martino y col., 2009) *(Corella-Bernal y Ortega-Nieblas, 2013)
<i>Syzygium aromaticum</i> (L.) Merr.and L.M.Perry (= <i>Eugenia Caryophilata</i> thumb.)	Eugenol (88.5% de un 98.2%), acetato de eugenil (5.6% de un 98.2%), β-carofileno (1.38%)	(Chaieb y col., 2007)
<i>Lippia graveolens</i> Kunth.	Timol (24.59%), carvacrol (24.54%), p-cimeno (13.6%), γ-terpineno (7.43%)	(Martínez-Velázquez y col., 2011)
<i>Lippia palmeri</i> S. Watson	p-cimeno (22.37%), *(14.25%), timol (21.39%), *(15.11%), iso-aromandreno (16.7%), *carvacrol (24.57%)	(Ortega-Nieblas y col., 2011) *(Corella-Bernal y Ortega-Nieblas, 2013)
<i>Baccharis salicina</i> Torr. & A.Gray (= <i>Baccharis salicifolia</i> ; = <i>Baccharis glutinosa</i> Pers.)	α-felandreno (8.54%), δ-cadineno (4.86%), germacreno D (6.9%), biciclogermacreno (5.19%), verbocidentafurano (7.69%)	(Abad y Bermejo, 2007) (Loayza y col., 1995)
<i>Schinus molle</i> L.	α-felandreno (46.5%), β-felandreno (20.8%), α-terpineol 8.3%	(Bendaoud y col., 2010)

Esta información nos puede ayudar a comprender su posible mecanismo de acción sobre *Msm* (MIC= ≤ 62.5 $\mu\text{g/mL}$), donde anteriormente Dulger y Gonuz (2004), ya habían reportado una leve actividad antimicobacteriana de 8 mm (6 mm, diámetro del disco) evaluada mediante el método de difusión en disco sobre *Msm*. En la **Tabla 8** se encuentran descritas ésta y otras actividades antimicobacterianas reportadas previamente para los AE aquí estudiados.

La diferencia de las actividades entre timol y carvacrol reside en el grupo hidroxilo con respecto a la cadena alifática más grande (Andrade-Ochoa y col., 2015). Estudios *in vitro* y de QSAR (Relación Cuantitativa Estructura-Actividad) sugieren que timol y carvacrol, los compuestos químicos mayoritarios presentes en los AE de orégano (*O. vulgare*, *L. graveolens* y *L. palmeri*) activos contra *Mtb* y *Msm* tienen como objetivo la composición de la pared celular microbiana, debido a los componentes fenólicos contenidos en su estructura (Andrade-Ochoa y col., 2015). Dichas moléculas tienen afinidad por la enzima corismato mutasa en la vía de shikimato, donde es un catalizador en la conversión del ácido corísmico al ácido prefénico, el cual es precursor de la fenilalanina y tirosina, que son la estructura base de proteínas que juegan un papel importante dentro del metabolismo de las micobacterias (Alokam y col., 2014).

Otros estudios informaron que los AE del género *Lippia* han demostrado actividad antimicrobiana, por ejemplo, *Lippia sidoides* Cham. mostró una actividad inhibitoria frente a *E. coli*, *S. aureus*, *Bacillus subtilis*, y *Msm* (Sánchez y col., 2009). Otra especie del género *Lippia*, *L. graveolens*, conocida por su uso popular para el tratamiento de síntomas como diarrea, indigestión, vómito y disentería (Monroy y Castillo, 2000), presentó MIC's de 1 mg/mL, 4 mg/mL y 1 mg/mL, contra *S. aureus*, *Streptococcus faecalis* y *Candida albicans* respectivamente (Sánchez y col., 2009). En la presente investigación *L. graveolens* presentó una MIC de 125 $\mu\text{g/mL}$ contra *Mtb* y de ≤ 62.5 $\mu\text{g/mL}$ contra *Msm*. Dicha actividad también puede estar asociada a la presencia de timol y carvacrol, compuestos mayoritarios del AE (24.59% y 24.54% respectivamente) (Martínez-Velázquez y col., 2011). Timol fue reportado con una importante actividad antimicobacteriana de 0.78 $\mu\text{g/mL}$ y de 2.02 $\mu\text{g/mL}$ contra *Mtb* y *M. bovis* respectivamente; mientras que carvacrol presentó MIC's de 0.78 $\mu\text{g/mL}$ y 5.20 $\mu\text{g/mL}$ sobre los mismos patógenos (**Tabla 9**) (Andrade-Ochoa y col., 2015).

De la misma manera *L. palmeri* demostró una notable actividad con una MIC de 125 $\mu\text{g/mL}$ contra *Mtb* y de ≤ 62.5 $\mu\text{g/mL}$ contra *Msm* cuyos constituyentes principales también están conformados por carvacrol (24.57%), timol (21.39%), p-cimeno (22.37%) (**Figura 4**) (Ortega-Nieblas y col., 2011), donde éste último presentó una actividad de 91.66 $\mu\text{g/mL}$ contra *Mtb* y *M. bovis* (Andrade-Ochoa y col., 2015), y de 36 $\mu\text{g/mL}$ contra *Msm* (Tepe y col., 2004). Otro

Tabla 8. Actividad antimicobacteriana previamente reportada de aceites esenciales

Aceites esenciales	Micobacteria	Método utilizado	Aceites esenciales o extractos	Actividad	Controles	Referencia
<i>Lavandula angustifolia</i> (= <i>L. officinalis</i>) Choix	<i>Msm</i>	Difusión en disco	Aceite esencial	15.6 mm	NR	(Rodríguez y col., 2014)
<i>Origanum vulgare</i> L.	<i>Msm</i>	Difusión en disco	Extracto etanólico	8 mm	Penicilina 10 U Ampicilina 10 µg/mL Cefotaxima 30 µg/mL	(Dulger y Gonuz, 2004)
<i>Syzygium aromaticum</i> (L.) Merr. And L.M.Perry (= <i>Eugenia caryophyllata</i> thumb.)	<i>Mtb</i> H37Rv	MABA	Metanólico Acetona	0.8 µg/mL 12.5 µg/mL	Estreptomina Isoniazida Etambutol Rifampicina	(Kaur y Kaur, 2015)
<i>Lippia graveolens</i>	NR	NR	NR	NR	NR	NR
<i>Lippia palmeri</i>	NR	NR	NR	NR	NR	NR
<i>Baccharis salicina</i> Torr. & A. Gray (= <i>Baccharis salicifolia</i> ; = <i>Baccharis glutinosa</i> Pers.)	<i>Mtb</i>	MABA	Extracto metanólico	NI	Rifampicina	(Robles-Zepeda y col., 2013)
<i>Schinus molle</i> L.	<i>Mtb</i> H37Rv	MABA	Hexano	125 µg/mL	Isoniazida Rifampicina	(Molina-Salinas y col., 2007)

NI: No inhibitorio **NR:** No reportado

Tabla 9. Compuestos de aceites esenciales con actividad antimicobacteriana reportada

Compuestos	Micobacteria	Actividad (evaluada por MABA)	Control(es)	Referencias
Timol	<i>Mtb</i> H37Rv <i>M. bovis</i> AN5 <i>Msm</i>	0.78 µg/mL 2.02 µg/mL 0.28 µg/mL	Rifampicina Isoniazida *Netilmicina *Ampicilina	(Andrade-Ochoa y col., 2015) (Tepe y col., 2004)
Carvacrol	<i>Mtb</i> H37Rv <i>M. bovis</i> AN5 <i>Msm</i>	(2.02 µg/mL) *(64 µg/mL) *(64 µg/mL) (5.20 µg/mL) **(0.14 µg/mL)	Rifampicina Isoniazida **Netilmicina **Ampicilina	(Andrade-Ochoa y col., 2015) *(Kilic, 2006) **(Tepe y col., 2004)
Camfor	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv <i>M. bovis</i> AN5	41.66 µg/mL 50 µg/mL	Rifampicina Isoniazida	(Andrade-Ochoa y col., 2015)
Eucaliptol (1,8-cineol)	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv <i>M. bovis</i> AN5	41.66 µg/mL 41.66 µg/mL	Rifampicina Isoniazida	(Andrade-Ochoa y col., 2015)
Linalool	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv <i>M. bovis</i> AN5	33.33 µg/mL 41.66 µg/mL	Rifampicina Isoniazida	(Andrade-Ochoa y col., 2015)
Eugenol	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv <i>M. bovis</i> AN5	25.00 µg/mL 20.83 µg/mL	Rifampicina Isoniazida	(Andrade-Ochoa y col., 2015)
β-Cariofileno	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv <i>M. bovis</i> AN5	100 µg/mL 100 µg/mL	Rifampicina Isoniazida	(Andrade-Ochoa y col., 2015)
p-cimeno	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv <i>M. bovis</i> AN5 ** <i>M. smegmatis</i>	91.66µg/mL *(>200 µg/mL) 91.66µg/mL **36 µg/mL	Rifampicina Isoniazida *Netilmicina *Ampicilina	(Andrade-Ochoa y col., 2015) *(Sandoval-Montemayor y col., 2012) **(Tepe y col., 2004)
Terpinen-4-ol	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	200 µg/mL	Rifampicina Isoniazida Etambutol	(Sandoval-Montemayor y col., 2012)

compuesto identificado entre los mayoritarios fue iso-aromandreno (16.7%), del cual no se tienen reportes de su actividad antimicobacteriana. Cabe rescatar que ni para *L. graveolens* ni para *L. palmeri* hay referencias de evaluaciones antimicobacterianas reportadas.

Por otro lado *E. caryophyllata* fue reportada con actividad antiséptica, así como bacteriostática y bactericida contra varias bacterias incluyendo *E. coli* y *S. aureus* (Burt y Reinders, 2003), su AE fue evaluado contra *Mtb* mediante MABA y presentó una MIC de 25 µg/mL (Andrade-Ochoa y col., 2013), mientras que en nuestro estudio obtuvimos una MIC de 500 µg/mL contra *Mtb* por el mismo método, y una destacable MIC de ≤62.5 µg/mL contra *Msm*. Un análisis mediante cromatografía de gases del AE de *E. caryophyllata* reportó al eugenol como el compuesto mayoritario (aproximadamente 90%) (Öztürk y Özbek, 2005). En el 2015, Andrade-Ochoa y colaboradores reportaron una MIC de 25 µg/mL contra *Mtb* y de 20.83 µg/mL contra *Mycobacterium bovis*.

De la misma manera *Baccharis salicifolia* comúnmente llamada “Batamote” es utilizada por las etnias Seri, Mayo, y Ópata en el tratamiento de enfermedades como las hemorroides, rabia, trastornos digestivos, obesidad, tratamiento de heridas y anticonceptivo (Robles-Zepeda y col., 2013). También Las hojas calentadas sobre las brasas, se colocan en la cabeza como un remedio para el dolor de cabeza, o en un área con dolor del cuerpo (Felger y Moser, 1973). Un estudio reportó la actividad insecticida del AE de *B. salicifolia* contra *Tribolium castaneum* adulto (García y col., 2005). Otro estudio evaluó la actividad del extracto metanólico de *B. salicifolia* contra *Mtb* H37Rv donde obtuvieron inactividad incluso a la más alta concentración evaluada (1000 µg/mL) (Robles-Zepeda y col., 2013). Al evaluar en el presente estudio el AE de *B. salicifolia*, se obtuvo una MIC de 1000 µg/mL sobre *Mtb*, a diferencia de *Msm* donde se obtuvo una MIC de ≤62.5 µg/mL.

Para observar la viabilidad de las micobacterias se utilizó azul alamar en el MABA, y una solución de resazurina en el fREMA, debido a que la resazurina previamente fue identificada como el compuesto activo del primero (O’Brien y col., 2000), y es un indicador de óxido-reducción utilizado para medir actividad antimicobacteriana (Palomino y col., 2002).

Los métodos fluorométricos son ampliamente utilizados en ensayos biológicos debido a su alta sensibilidad, particularmente existe una alta correlación entre las MIC’s determinadas por fluorometría y las determinadas mediante observación visual (Collins y Franzblau, 1997). Se encontró una correlación entre el resultado fluorométrico y la observación visual, donde el color rosa debido a la resorufina presentó los valores de RFU más altos (Navarro-García y col., 2011; Collins y Franzblau, 1997).

Las referencias a las plantas medicinales utilizadas por los grupos étnicos son considerados principalmente como una guía relevante en la investigación de productos naturales, sin embargo, en muchos casos no fue posible confirmar científicamente sus propiedades. Es posible que las plantas que resultaron inactivas posean propiedades inmunomoduladoras, ya que algunos extractos de plantas inducen la producción de IFN-gamma y otras citocinas que puedan ayudar a eliminar el bacilo de *Mtb* (Rahmani y col., 2014).

Finalmente, podemos confirmar la utilidad del estudio de extractos y AE de las plantas medicinales, ya que son considerados un importante recurso de nuevos agentes terapéuticos antimicobacterianos. Este estudio establece las bases para la purificación de los compuestos antimicobacterianos más abundantes, principalmente aquellos compuestos cuya actividad antimicobacteriana aún no ha sido descrita.

CONCLUSIONES

- Los aceites esenciales presentaron las mejores actividades antimicobacterianas.
- Los aceites esenciales de *L. graveolens* y *L. palmeri* fueron los más activos contra *Mtb* (MIC= 125 µg/mL; MBC= 250 µg/mL).
- Los aceites esenciales de *Thymus vulgaris* L., *Origanum vulgare* L. y *Eugenia caryophyllata* Thumb. presentaron las mejores actividades contra *Msm* (MIC= ≤62.5 µg/mL).
- Los extractos de agaves y cactáceas evaluadas no presentaron actividad antimicobacteriana destacable (MIC >250 µg/mL).
- Las plantas son un recurso útil para la búsqueda de compuestos micobacteriostáticos y micobactericidas.

RECOMENDACIONES

- Realizar un aislamiento biodirigido de los compuestos activos presentes en los aceites esenciales antimicobacterianos.
- Evaluar contra cepas de *Mtb* sensibles y resistentes a fármacos.
- Ampliar la actividad de los compuestos activos en busca de otras actividades biológicas como: antifúngico, antiparasitario, antiinflamatorio, etc.
- Evaluar la actividad antimicobacteriana del compuesto iso-aromandreno.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdel-Gawad MM, El-Sayed MM, Abdel-Hameed ES. 1999. Molluscicidal steroidal saponins and lipid content of *Agave decipiens*. *Fitoterapia* 70(4): 371-381.
- Abad MJ, Bermejo P. 2007. *Baccharis* (Compositae): a review update. *Arkivoc*, 7(7): 76-96.
- Alnamer R, Alaoui K, Boudida EH, Benjouad A, Cherrah Y. 2011. Sedative and hypnotic activities of the methanolic and aqueous extracts of *Lavandula officinalis* from Morocco. *Adv Pharmacol Sci* 2012.
- Alokam R, Jeankumar VU, Sridevi JP, Matikonda SS, Peddi S, Alvala M, Sriram D. 2014. Identification and structure-activity relationship study of carvacrol derivatives as *Mycobacterium tuberculosis* chorismate mutase inhibitors. *J Enzyme Inhib Med Chem* 29(4): 547-554.
- Andrade-Ochoa S, Nevárez-Moorillón GV, Sánchez-Torres LE, Villanueva-García M, Sánchez-Ramírez BE, Rodríguez-Valdez LM, Rivera-Chavira BE. 2015. Quantitative structure-activity relationship of molecules constituent of different essential oils with antimycobacterial activity against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis*. *BMC Complement Altern Med* 15(1):1.
- Andrade-Ochoa, S, Chacón-Vargas F, Guadalupe NM, Rivera-Chavira B, León HO. 2013. Evaluation of antimycobacterium activity of the essential oils of cumin (*Cuminum cyminum*), clove (*Eugenia caryophyllata*), cinnamon (*Cinnamomum verum*), laurel (*Laurus nobilis*) and anis (*Pimpinella anisum*) against *Mycobacterium tuberculosis*. *Adv Biol Chem* 3(5): 480.
- Ávalos GA, Pérez-Urria CE. 2009. Metabolismo secundario de plantas. *Reduca* 2(3).
- Azevedo M, Chaves F, Almeida CA, Bizzo HR, Duarte RS, Campos-Takaki GM, Alviano DS. 2013. Antioxidant and antimicrobial activities of 7-hydroxy-calamenene-rich essential oils from *Croton cajucara* Benth. *Molecules* 18(1): 1128-1137.
- Bañuelos FN. 1999. Medicina Doméstica Mayo: de plantas, mujeres y salud. Ed. CIAD, A.C. Hermosillo, Sonora, México. Pp. 173.
- Bañuelos FN, Salido APL. 2012. El mezcal en Sonora, México, más que una bebida espirituosa. Etnobotánica de *Agave angustifolia* Haw. *Estudios sociales* (2):169-197.
- [BHMA] British Herbal Medicine Association. 1996. British herbal pharmacopoeia 1996. *Bournemouth: British Herbal Medicine Association* 212p. ISBN, 903032104.

- Bendaoud H, Romdhane M, Souchard JP, Cazaux S, Bouajila J. 2010. Chemical composition and anticancer and antioxidant activities of *Schinus molle* L. and *Schinus terebinthifolius* Raddi berries essential oils. *J Food Sci* 75(6): 466-472.
- Boligon AA, Agertt V, Janovik V, Cruz RC, Campos M, Guillaume D, Athayde ML, dos Santos ARS. 2012. Antimycobacterial activity of the fractions and compounds from *Scutia buxifolia*. *Rev Bras Farmacogn* 22: 45-52.
- Burt SA, Reinders RD. 2003. Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157: H7. *Lett Appl Microbiol* 36(3): 162-167.
- Chaieb K, Hajlaoui H, Zmantar T, Kahla-Nakbi AB, Rouabhia M, Mahdouani K, Bakhrouf A. 2007. The chemical composition and biological activity of clove essential oil, *Eugenia caryophyllata* (*Syzygium aromaticum* L. Myrtaceae): a short review. *Phytother Res* 21(6): 501-506.
- Chávez TL, Díaz CFDM, Escalante RG, Estrada ME. 2012. Efecto sinérgico del aceite esencial de *Origanum vulgare* a la gentamicina en cultivos de *Escherichia coli*. *Ciencia e investigación médico estudiantil latinoamericana* 13:2.
- Coll P. 2002. Drugs with activity against *Mycobacterium tuberculosis*. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 21(6): 299-307.
- Collins L, Franzblau SG. 1997. Microplate alamar blue assay versus BACTEC 460 system for high-throughput screening of compounds against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium*. *Antimicrob Agents Chemother* 41(5): 1004-1009.
- Copp BR. 2003. Antimycobacterial natural products. *Nat Prod Rep* 20(6): 535-557.
- Corella-Bernal RA, Ortega-Nieblas MM. 2013. Importancia del aceite esencial y la producción de orégano *Lippia palmeri* Watson en el estado de Sonora. *Biotecnia* XV (1): 57-64.
- Cruz S, Gómez A, García V, Álvarez L, Cáceres A, Morales J, Cobar O, Samayoa C, Orozco R, Gaitán I. 2006. Caracterización de Aceites Esenciales y extractos de ocho especies Mesoamericanas de Piperaceas y evaluación de la actividad biocida para su aprovechamiento como nuevos recursos aromáticos y/o medicinales. Universidad de San Carlos de Guatemala. 53 pp.
- Da Silva BP, Sousa ACD, Silva GM, Mendes TP, Parente JP. 2002. A new bioactive steroidal saponin from *Agave attenuata*. *Z Naturforsch C Bio Sci* 57(5-6): 423-428.
- De Martino L, De Feo V, Formisano C, Mignola E, Senatore F. 2009. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from three chemotypes of *Origanum vulgare* L. ssp. *hirtum* (Link) letsvaart growing wild in Campania (Southern Italy). *Molecules* 14(8): 2735-2746.

- Debnath M, Mukeshwar P, Sharma R, Thakur GS, Lal P. 2010. Biotechnological intervention of *Agave sisalana*: a unique fiber yielding plant with medicinal property. *J Med Plants Res* 4(3): 177-187.
- Driks M, Weinhold F, Cokingtin Q. 2011. Pneumonia caused by *Mycobacterium smegmatis* in a patient with a previous gastrectomy. *BMJ Case Reports* 2011: 1-4.
- Dublín DR, López ER, Ortiz JE. 2012. Eficacia del extracto de las hojas del *Neem Azadirachta indica* A. Juss en el control de nemátodos gastrointestinales en ovino Pelibuey. *Redvet* 13(7): 1-16.
- Dulger B, Gonuz A. 2004. Antimicrobial activity of certain plants used in Turkish traditional medicine. *Asian J Plant Sci* 3(1): 104-107.
- El-Hilaly J, Hmammouchi M, Lyoussi B. 2003. Ethnobotanical studies and economic evaluation of medicinal plants in Taounate province (Northern Morocco). *J Ethnopharmacol* 86(2): 149-158.
- ElSohly HN, Danner S, Li XC, Nimrod AC, Clark AM. 1999. New antimycobacterial saponin from *Colubrina retusa*. *J Nat Prod* 62(9): 1341-1342.
- Ergan B, Cöplü L, Alp A, Artvinli M. 2004. *Mycobacterium smegmatis* pneumonia. *Respirology* 9(2): 283-285.
- Felger RS, Moser MB. 1973. Seri Indian pharmacopoeia. *Econ Bot* 28: 415-436.
- Franzblau SG, Witzig RS, McLaughlin JC, Torres P, Madico G, Hernández A, Degnan MT, Cook MB, Quenzer VK, Ferguson RM, Gilman RH. 1998. Rapid, low-technology MIC determination with clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates by using the microplate Alamar Blue assay. *J Clin Microbiol* 36: 362-366.
- Franzblau SG, DeGroot MA, Cho SH, Andries K, Nuermberger E, Orme IM, Lenaerts AJ. 2012. Comprehensive analysis of methods used for the evaluation of compounds against *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis* 92(6): 453-488.
- Fuselli SR, de la Rosa BG, Eguaras MJ, Fritz R. 2010. In vitro antibacterial effect of exotic plants essential oils on the honeybee pathogen *Paenibacillus larvae*, causal agent of American foulbrood. *Span J Agric Res* 8(3): 651-657.
- García MA, Galván R. 1995. Riqueza de la familia Agavaceae y Nolinaceae en México. México. *B Soc Bot Mex* 56: 7-24
- García M, Donadel OJ, Ardanaz CE, Tonn CE, Sosa ME. 2005. Toxic and repellent effects of *Baccharis salicifolia* essential oil on *Tribolium castaneum*. *Pest Manag Sci* 61(6): 612-618.
- Gasca JMG. 2001. Tomillo (*Thymus vulgaris* L.). *Medicina naturista* (3): 53-55.

- Heinrich M, Gibbons S. 2001. Ethnopharmacology in drug discovery: an analysis of its role and potential contribution. *J Pharm Pharmacol* 53(4): 425-432.
- Iravani S, Zolfaghari B. 2011. Pharmaceutical and nutraceutical effects of *Pinus pinaster* bark extract. *Res Pharm Sci* 6(1): 1.
- Iturriade R. 2012. Efecto de los Aceites Esenciales sobre la mortalidad y la repelencia de *Rhyzopertha dominicia* (Fabricius) en grano de trigo almacenado. Universidad de Sonora. Pp. 42
- Jiménez-Arellanes A, Meckes M, Ramírez R, Torres J, Luna-Herrera J. 2003. Activity against multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Mexican plants used to treat respiratory diseases. *Phytother Res* 17(8): 903-908.
- Jiménez-Arellanes MA, Garrido JC, Díaz RL. 2010. Las plantas medicinales mexicanas como fuente de compuestos antimicobacterianos. *Rev Mex Cienc Farm* 41(1): 22-29.
- Jiménez-Arellanes A, Luna-Herrera J, Ruiz-Nicolás R, Cornejo-Garrido J, Tapia A, Yépez-Mulia L. 2013. Antiprotozoal and antimycobacterial activities of *Persea americana* seeds. *BMC Complement Altern Med* 13, 109.
- Jiménez-Sierra CL. 2011. Las cactáceas mexicanas y los riesgos que enfrentan. *Revista Digital Universitaria* 12(1).
- Johnson DG, Moreno SSF, López ER. 1996. Compendio fitoquímico de la medicina tradicional herbolaria de Sonora. Ed. Universidad de Sonora. Hermosillo, Sonora, México. Pp. 361.
- Kaufmann, SH. 2001. How can immunology contribute to the control of tuberculosis?. *Nat Rev Immunol* 1(1): 20-30.
- Kaur, R, Kaur, H. 2015. Antitubercular Activity and Phytochemical Screening of Selected Medicinal Plants. *Orient J Chem* 31: 597-600.
- Kiliç T. 2006. Analysis of essential oil composition of *Thymbra spicata* var. *spicata*: antifungal, antibacterial and antimycobacterial activities. *Z Naturforsch C Bio Sci.* 61(5-6): 324-328.
- Korycka M, Rumijowska A, Dziadek J. 2005. The effect of ethambutol on mycobacterial cell wall permeability to hydrophobic compounds. *Pol J Microbiol* 54: 5-11.
- Lawal TO, Adeniyi BA, Idowu OS, Moody JO. 2011. In vitro activities of *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh. and *Eucalyptus torelliana* F. Muell. against non-tuberculous mycobacteria species. *Afr J Microbiol Res* 5: 3652-3657.
- Loayza I, Abujder D, Aranda R, Jakupovic J, Collin G, Deslauriers H, Jean FI. 1995. Essential oils of *Baccharis salicifolia*, *B. latifolia* and *B. dracunculifolia*. *Phytochemistry* 38(2): 381-389.

- López ER, Hinojosa A. 1988. Catálogo de plantas medicinales sonorenses. Ed. Universidad de Sonora. Hermosillo, Sonora, México. Pp. 129.
- Martínez-Tomé M, Jiménez AM, Ruggieri S, Frega N, Strabbioli R, Murcia MA. 2001. Antioxidant properties of Mediterranean spices compared with common food additives. *J Food Prot* 64(9): 1412-1419.
- Martínez-Velázquez M, Rosario-Cruz R, Castillo-Herrera G, Flores-Hernández JM, Álvarez AH, Lugo-Cervantes A. 2011. Acaricidal Effect of Essential Oils from *Lippia graveolens* (Lamiales: Verbenaceae), *Rosmarinus officinalis* (Lamiales: Lamiaceae), and *Allium sativum* (Liliales: Liliaceae) against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). *J Med Entomol* 48(4): 822-827
- Molina-Salinas GM, Ramos-Guerra MC, Vargas-Villarreal J, Mata-Cárdenas BD, Becerril-Montes P, Said-Fernández S. 2006. Bactericidal activity of organic extracts from *Flourensia cernua* DC against strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *Arch Med Res* 37: 45-49.
- Molina-Salinas GM, Pérez-López A, Becerril-Montes P, Salazar-Aranda R, Said-Fernández S, de Torres NW. 2007. Evaluation of the flora of Northern Mexico for in vitro antimicrobial and antituberculosis activity. *J Ethnopharmacol* 109: 435-441.
- Monroy C, Castillo P. 2000. Plantas Medicinales Utilizadas en el Estado de Morelos, Centro de Investigaciones Biológicas. UAEM. P. 298.
- Müller B, Borrell S, Rose G, Gagneux S. 2013. The heterogeneous evolution of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Trends Genet* 29(3): 160-169.
- Naik SK, Mohanty S, Padhi A, Pati R, Sonawane A. 2014. Evaluation of antibacterial and cytotoxic activity of *Artemisia nilagirica* and *Murraya koenigii* leaf extracts against mycobacteria and macrophages. *BMC Complement Altern Med* 14:87
- Naturalista. 2016. Henequén o sisal (*Agave sisalana*). Accesado el 5 de Abril de 2016. <http://naturalista.conabio.gob.mx/taxa/158103-Agave-sisalana>
- Navarro-García VM, Luna-Herrera J, Rojas-Bribiesca MG, Álvarez-Fitz P, Ríos MY. 2011. Antibacterial activity of *Aristolochia brevipes* against multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Molecules* 16(9): 7357-7364.
- Ncube NS, Afolayan AJ, Okoh AI. 2008. Assessment techniques of antimicrobial properties of natural compounds of plant origin: current methods and future trends. *Afr J Biotechnol* 7: 1797-1806.
- Newman DJ, Cragg GM. 2012. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *J Nat Prod* 75(3): 311-335.




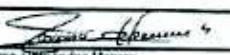
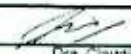
- O'Brien J, Wilson I, Orton T, Pognan F. 2000. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur J Biochem* 267: 5421-5426.
- O'Donnell G, Bucar F, Gibbons S. 2006. Phytochemistry and antimycobacterial activity of *Chlorophytum inornatum*. *Phytochemistry* 67(2): 178-182.
- Ocegueda S, Moreno E, Koleff P. 2005. Plantas Utilizadas en la Medicina Tradicional y su Identificación Científica. CONABIO. *Biodiversitas* 62: 12-15
- Ombito JO, Salano EN, Yegon PK, Ngetich WK, Mwangi EM. 2014. A review on the chemistry of some species of genus *Lippia* (Verbenaceae family). *J Sci Innov Res* 3: 460-466.
- Organización Mundial de la Salud. 2014. Tuberculosis. Informe mundial sobre la tuberculosis 2014. Accesado el 2 de Abril de 2016. http://www.who.int/tb/publications/global_report/gtbr14_execsummary_summary_es.pdf
- Organización Mundial de la Salud. 2015. Tuberculosis. Nota descriptiva no. 104, Marzo 2015. Accesado el 13 Marzo 2016. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/es/>
- Orozco-Barocio A, Paniagua-Domínguez BL, Benítez-Saldaña PA, Flores-Torales E, Velázquez-Magaña S, Nava HJA. 2013. Cytotoxic Effect of the Ethanolic Extract of *Lophocereus Schottii*: A Mexican Medicinal Plant. *Afr J Tradit Complement Altern Med* 10(3): 397.
- Ortega-Nieblas MM, Robles-Burgueño MR, Acedo-Félix E, González-León A, Morales-Trejo A, Vázquez-Moreno L. 2011. Composición química y actividad antimicrobiana del aceite esencial de oregano (*Lippia palmeri* S. Wats.). *Rev Fitotec Mex* 34:1.
- Özcan MM, Chalchat JC. 2008. Chemical composition and antifungal activity of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) oil from Turkey. *Int J Food Sci Nutr* 59(7-8): 691-698.
- Öztürk A, Özbek H. 2005. The anti-inflammatory activity of *Eugenia caryophyllata* essential oil: an animal model of anti-inflammatory activity. *Eur J Gen Med* 2(4):159-163
- Ozuna TL, Tapia PM, Aguilar CA. 2005. Plantas Medicinales de la Medicina Tradicional Mexicana Para Tratar Afecciones Gastrointestinales, Estudio Etnobotánico, Fitoquímico y Farmacológico. Ed. Universidad Barcelona.
- Palomino JC, Martin A, Camacho M, Guerra H, Swings J, Portaels F. 2002. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 46: 2720-2722.
- Pascual ME, Slowing K, Carretero E, Mata DS, Villar A. 2001. *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. *J Ethnopharmacol* 76(3): 201-214.
- Piersimoni C, Scarparo C. 2009. Extrapulmonary infections associated with nontuberculous mycobacteria in immunocompetent persons. *Emerg Infect Dis* 15(9): 1351.

- Rahman S. 2008. Cytotoxic activity of *Pereskia bleo* (Cactaceae) against selected human cell lines. *Int J Cancer Res* 4(1): 20-27.
- Rahmani AH, Aly SM, Ali H, Babiker AY, Srikar S. 2014. Therapeutic effects of date fruits (*Phoenix dactylifera*) in the prevention of diseases via modulation of anti-inflammatory, anti-oxidant and anti-tumour activity. *Int J Clin Exp Med* 7: 483-491.
- Rodriguez Flores C, Pennec A, Nugier-Chauvin C, Daniellou R, Herrera-Estrella L, Chauvin AL. 2014. Chemical Composition and Antibacterial Activity of Essential Oils Extracted from Plants Cultivated in Mexico. *J Mex Chem Soc* 58(4): 452-455.
- Robles-Zepeda RE, Coronado-Aceves EW, Velázquez-Contreras CA, Ruiz-Bustos E, Navarro-Navarro M, Garibay-Escobar A. 2013. In vitro anti-mycobacterial activity of nine medicinal plants used by ethnic groups in Sonora, Mexico. *BMC Complement Altern Med* 13(1): 329.
- Saikia D, Parihar S, Chanda D, Ojha S, Kumar JK, Chanotiya CS, Negi AS. 2010. Antitubercular potential of some semisynthetic analogues of phytol. *Bioorg Med Chem Lett* 20(2): 508-512.
- Sánchez DOS, Najera GLA, Rivera IL, Ramírez OD, Cisneros MG, García VMN. 2009. Antimicrobial activity of medicinal plants from the Huautla Sierra Biosphere Reserve in Morelos (México). *Polibotánica* 28: 213-225.
- Sandoval-Montemayor NE, García A, Elizondo-Treviño E, Garza-González E, Alvarez L, Camacho-Corona, MDR. 2012. Chemical composition of hexane extract of *Citrus aurantifolia* and anti-*Mycobacterium tuberculosis* activity of some of its constituents. *Molecules* 17(9): 11173-11184.
- Schreiber J, Burkhart U, Rüscher-Gerdes S, Amthor M, Richter E, Zuehör M, Ernst, M. 2001. Non-tubercular mycobacterial infection of the lungs due to *Mycobacterium smegmatis*. *Pneumologie* 55(5), 238-243.
- Skiest DJ, Levi ME. 1998. Catheter-related bacteremia due to *Mycobacterium smegmatis*. *South Med J* 91(1): 36-37.
- Taiz L, Zeiger E. 2006. *Fisiología vegetal* (Vol. 10). Universitat Jaume I.
- Tepe B, Daferera D, Sökmen M, Polissiou M, Sökmen A. 2004. In vitro antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils and various extracts of *Thymus eigi* M. Zohary et PH Davis. *J Agric Food Chem* 52(5): 1132-1137.
- Tomioka H. 2006. Current status of some antituberculosis drugs and the development of new antituberculous agents with special reference to their *in vitro* and *in vivo* antimicrobial activities. *Curr Pharm Des* 12(31): 4047-4070.

- Tripath NN, Mishra AK, Tripathi-II SWATI. 2011. Antibacterial potential of plant volatile oils: A review. *Proc Nat Acad Sci India Sect B*. 81: 23.
- Vila R, Cañigüeral S. 2006. El aceite esencial de *Melaleuca alternifolia* en el tratamiento de la vulvovaginitis. *Rev Fitoter* 6(2): 119-128.
- Vonmoos S, Leuenberger P, Beer V, De Haller R. 1986. Pleuropulmonary infection caused by *Mycobacterium smegmatis*. Case description and literature review. *Schweiz Med Wochenschr* 116(52): 1852-1856.
- Yetman D, Van Devender TR. 2002. Mayo ethnobotany: land, history, and traditional knowledge in northwest Mexico. Ed. University of California. Oakland, California, Estados Unidos de América.
- Yokosuka A, Mimaki Y, Kuroda M, Sashida Y. 2000. A new steroidal saponin from the leaves of *Agave americana*. *Planta Med* 66(4), 393-396.

ANEXOS

Anexo 1. *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv

  													
CENAVECE InDRE No. 09155-													
Especificaciones y Certificado del Microorganismo													
Especificaciones Nombre del microorganismo: <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv Número InDRE: LTM-08080 Número de pases a partir de la cepa original: < 5	Información adicional Información relacionada: Fecha de siembra: 18-sep-09 Número de pase: 2												
Características fenotípicas	Pruebas bioquímicas												
Resultados Morfología colonial en Lowenstein-Jensen: Colonias crema, rugosas y secas	<table border="1"> <tr><td>Niacina</td><td>Positivo</td></tr> <tr><td>Nitrito</td><td>5+</td></tr> <tr><td>Catalasa a 68°C</td><td>Negativo</td></tr> <tr><td>Catalasa a temperatura ambiente</td><td>Positivo</td></tr> </table>	Niacina	Positivo	Nitrito	5+	Catalasa a 68°C	Negativo	Catalasa a temperatura ambiente	Positivo				
Niacina	Positivo												
Nitrito	5+												
Catalasa a 68°C	Negativo												
Catalasa a temperatura ambiente	Positivo												
	Otras características / Pruebas: Resultados <table border="1"> <thead> <tr> <th colspan="2">PRUEBA DE SENSIBILIDAD</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>S</td><td>Sensible</td></tr> <tr><td>I</td><td>Sensible</td></tr> <tr><td>R</td><td>Sensible</td></tr> <tr><td>E</td><td>Sensible</td></tr> <tr><td>Z</td><td>Sensible</td></tr> </tbody> </table>	PRUEBA DE SENSIBILIDAD		S	Sensible	I	Sensible	R	Sensible	E	Sensible	Z	Sensible
PRUEBA DE SENSIBILIDAD													
S	Sensible												
I	Sensible												
R	Sensible												
E	Sensible												
Z	Sensible												
	Comentarios Cepa trazable a <i>M. tuberculosis</i> H37Rv del National Reference Center for Tuberculosis, Heat (LCDC Canada)												
 Gabriela Hernández Moroy Jefa del Departamento de Bacteriología	 Dra. Claudia E. Backer Jefa del Laboratorio de Micobacterias												
Prolongación de Carpio No. 470 Col. Casco de Santo Tomás, Del. Miguel Hidalgo, México, DF 11340 Tel. (55) 53427599 (55) 52419629 www.salud.gob.mx													

Anexo 2. Preparación de medio Middlebrook 7H9 suplementado con ácido oleico, albúmina, dextrosa y catalasa (OADC) al 10%

Ingredientes	Gramos/Litro
Sulfato de amonio	0.5
Fosfato disódico	2.5
Fosfato monopotásico	1.0
Citrato de sodio	0.1
Sulfato de magnesio	0.05
Cloruro de calcio	0.0005
Sulfato de zinc	0.001
Sulfato de cobre	0.001
Citrato férrico de amonio	0.04
Ácido L-glutámico	0.5
Piridoxina	0.001
Biotina	0.0005
pH final 6.6 +/- 0.2 a 25°C	

Preparación:

1. Suspender 2.35 g de Middlebrook 7H9 caldo base (Sigma-Aldrich M0178) en 450 mL de agua destilada.
2. Agregar 2 mL de glicerol.
3. Calentar hasta disolver el medio completamente.
4. Esterilizar en autoclave a 15 libras/pulgada² de presión (121°C) durante 10 minutos.
5. Enfriar a 45°C o menos y asépticamente agregar 50 mL de suplemento Middlebrook OADC (BD 212351).

Principio:

Este medio contiene varias sales inorgánicas que soportan el crecimiento micobacteriano. El citrato de sodio provee iones de citrato en el medio, que retienen cationes inorgánicas en solución. El suplemento Middlebrook OADC contiene albúmina bovina, dextrosa, catalasa y cloruro de sodio. La dextrosa aporta energía, mientras que el cloruro de sodio mantiene el equilibrio osmótico.