

Búsqueda de sustancias de origen natural y sintético con bioactividad *in vitro* contra *Mycobacterium tuberculosis*

María Fernanda Moreno Vargas

**Universidad Industrial de Santander
Facultad de Salud
Escuela de Bacteriología y Laboratorio Clínico
Escuela de Medicina
Maestría en Ciencias Básicas Biomédicas
Bucaramanga
2012**

Búsqueda de sustancias de origen natural y sintético con bioactividad *in vitro* contra *Mycobacterium tuberculosis*

María Fernanda Moreno Vargas

**Tesis de Grado como requisito para optar al título de
Magíster en Ciencias Básicas Biomédicas**

**Director: Wellman Ribón MSc.
Docente Escuela de Bacteriología**

**Universidad Industrial de Santander
Facultad de Salud
Escuela de Bacteriología y Laboratorio Clínico
Escuela de Medicina
Maestría en Ciencias Básicas Biomédicas
Bucaramanga
2012**

DEDICATORIA

Al Rey de Reyes y Señor de Señores por concederme el deseo de mi corazón y la petición de mis labios.

A mi amado esposo Oscar por ser mi fuerza y mi aliento. Por su apoyo y sacrificio. Por creer en un futuro junto a mí.

A mi hijo Lukas por su amor incondicional, por todos los días y noches de paciencia. Por ser mi fuente de alegría.

A madre Martha Cecilia, por sus consejos y por su entereza.

A mi abuela Isabel, por seguir enseñándome tantas cosas aun en la distancia.

A mi hermana Silvia Juliana por estar siempre a mi lado por ser mi ejemplo de valentía.

A todos ellos mi mas sincero agradecimiento porque sin su ayuda y acompañamiento simplemente no hubiera podido llegar a la meta.

AGRADECIMIENTOS

Al profesor Wellman Ribón, director de mi tesis, por su confianza y acompañamiento en el cumplimiento de esta meta.

A los Doctores Elena Staschenko, Jairo René Martínez del Centro de Investigación en Biomoléculas (CENIVAM) y Alirio Palma del Laboratorio de Síntesis Orgánica (LSO) por su contribución en la obtención de las sustancias evaluadas en este trabajo.

A los Doctores Clara Isabel González, Alba Lucía Arámbula, Luz Helena Sánchez y Carlos Conde de la Universidad Industrial de Santander (UIS), por su amistad y consejos.

A los integrantes del Grupo de Inmunología y Epidemiología Molecular (GIEM) y a mis compañeros y colegas de la maestría por su apoyo y comprensión durante este proceso.

A la Maestría en Ciencias Básicas Biomédicas por su contribución a mi formación personal y profesional.

A NEOMUNDO y la UIS por la financiación de este trabajo.

CONTENIDO

	pág.
Introducción	21
1. IDENTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	23
2. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	26
3. MARCO TEÓRICO	27
3.1 INICIOS DE LA RELACIÓN ENTRE <i>Mycobacterium tuberculosis</i> Y LA RAZA HUMANA	27
3.2 EVOLUCIÓN DEL TRATAMIENTO ANTI TUBERCULOSIS	28
3.3 DESAFÍOS EN EL CONTROL DE LA TUBERCULOSIS	31
3.3.1 Coinfección tuberculosis – Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH)	31
3.3.2 Resistencia en tuberculosis	32
3.3.3 Inequidades sociales	35
3.4 NECESIDAD DE NUEVOS FÁRMACOS ANTITUBERCULOSOS	35
3.5 DESCUBRIMIENTO Y DESARROLLO DE NUEVOS FÁRMACOS ANTI TUBERCULOSIS	37
3.5.1 Fase de descubrimiento	37
3.5.2 Fase de desarrollo	40
3.6 NUEVOS FÁRMACOS ANTI TUBERCULOSIS: CANDIDATOS EN FASE III	40
3.7 FUENTES DE NUEVOS COMPUESTOS BIOACTIVOS CONTRA <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	42
3.7.1 Moléculas sintéticas	43
3.7.1.1 Derivados de las 1-benzazepinas	44
3.7.1.2 Derivados de las naftazepinas	46
3.7.1.3 Derivados de las quinolonas	46
3.7.2 Sustancias de origen vegetal	47
3.7.2.1 Aceites esenciales (AEs)	47

3.7.2.2 Extractos vegetales (EVs)	53
4. OBJETIVOS	56
4.1. OBJETIVO GENERAL	56
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	56
5. JUSTIFICACION	57
6. DISEÑO METODOLÓGICO	60
6.1 CEPAS BACTERIANAS	60
6.2 SUSTANCIAS DE PRUEBA	61
6.2.1 Moléculas sintéticas: criterio de selección, método de obtención y preparación de soluciones iniciales	61
6.2.2 Sustancias de origen natural: criterio de selección, calificación taxonómica, método de obtención y preparación de soluciones iniciales	64
6.3 MEDICAMENTOS CONTROL: criterio de selección y preparación de soluciones iniciales	66
6.4. INDICADOR DE CRECIMIENTO: preparación de soluciones iniciales	67
6.5 MEDIOS DE CULTIVO	67
6.6 IMPLEMENTACIÓN DE LA METODOLOGÍA COLORIMÉTRICA DEL MTT PARA EL ALCANCE DEL OBJETIVO ESPECÍFICO NÚMERO 1	68
6.7 ENSAYOS DE BIOACTIVIDAD DE MOLÉCULAS SINTÉTICAS, EXTRACTOS VEGETALES Y ACEITES ESENCIALES PARA EL ALCANCE DEL OBJETIVO ESPECÍFICO NÚMERO 2	68
6.7.1 Ensayos de bioactividad frente a <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	68
6.7.1.1 Obtención del inóculo	68
6.7.1.2 Preparación de soluciones de trabajo	69
6.7.1.3 Montaje del ensayo de microdilución en placa para evaluación de moléculas sintéticas	72
6.7.1.4 Montaje del ensayo de microdilución en placa para evaluación de extractos vegetales	74
6.7.1.5 Montaje del ensayo de macrodilución en tubo para evaluación de aceites esenciales	76

6.7.1.6 Condiciones de incubación de los ensayos	77
6.7.1.7 Revelado de los ensayos	77
6.7.1.8 Lectura e interpretación de resultados	77
6.7.1.9 Criterio de actividad	78
6.7.2 Ensayos de bioactividad frente a <i>Escherichia coli</i> y <i>Staphylococcus aureus</i>	78
6.7.2.1 Obtención del inóculo	78
6.7.2.2 Preparación de soluciones de trabajo	79
6.7.2.3 Montaje del ensayo de macrodilución en tubo para evaluación de aceites esenciales	80
6.7.2.4 Condiciones de incubación del ensayo	80
6.7.2.5 Revelado de los ensayos	80
6.7.2.6 Lectura e interpretación de resultados	80
6.8 CURVAS DE LETALIDAD CONTRA <i>Mycobacterium tuberculosis</i> PARA CUMPLIR CON EL OBJETIVO ESPECÍFICO NÚMERO 3.	81
6.8.1 Montaje del ensayo	81
6.8.2 Condiciones de incubación del ensayo	82
6.8.3 Lectura e interpretación de resultados	82
6.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	82
6.10 CONSIDERACIONES ÉTICAS	83
7. RESULTADOS	85
7.1 IMPLEMENTACIÓN DE LA METODOLOGÍA COLORIMÉTRICA DEL MTT	85
7.2 EVALUACIÓN DE LA BIOACTIVIDAD DE MOLÉCULAS SINTÉTICAS, EXTRACTOS VEGETALES Y ACEITES ESENCIALES	89
7.2.1 Tres moléculas sintéticas fueron activas contra <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	89
7.2.2 Tres extractos vegetales fueron activos contra <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	90
7.2.3 Todos los aceites esenciales fueron activos contra <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	91
7.2.4 Los aceites esenciales de <i>Cymbopogon citratus</i> y <i>Cymbopogon flexuosus</i> fueron activos contra <i>Staphylococcus aureus</i>	94

7.3 EVALUACIÓN DEL EFECTO BACTERICIDA DE <i>Eucalyptus citriodora</i> Hook, <i>Cymbopogon citratus</i> , <i>Cymbopogon flexuosus</i> y <i>Turnera diffusa</i> FRENTE A <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	94
7.3.1 Dos aceites esenciales presentaron efecto bactericida y dos efecto bacteriostático	94
8. DISCUSIÓN	99
9. CONCLUSIONES	109
10. DIVULGACIÓN	110
BIBLIOGRAFÍA	111
ANEXOS	132

LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1: Diversos AEs extraídos mediante MWHD (Fuente <i>Mycobacterium</i> : Laboratorio de Investigación y Extensión)	48
Figura 2: Algunos EVs obtenidos mediante SFE. (Fuente <i>Mycobacterium</i> : Laboratorio de Investigación y Extensión)	54
Figura 3. Distribución de muestras y controles para la primera fase de evaluación de la bioactividad moléculas sintéticas frente a <i>M. tuberculosis</i> .	73
Figura 4. Distribución de muestras y controles para la segunda fase de evaluación de la bioactividad moléculas sintéticas frente a <i>M. tuberculosis</i> .	73
Figura 5. Distribución de muestras y controles para la evaluación de la bioactividad de EVs frente a <i>M. tuberculosis</i> .	75
Figura 6. Esquema de montaje del ensayo de macrodilución en tubo para la evaluación de la bioactividad de AEs frente a <i>M. tuberculosis</i> .	76
Figura 7. Esquema de montaje del ensayo de curvas de letalidad para la evaluación del efecto bactericida y bacteriostático de AEs frente a <i>M. tuberculosis</i> .	81
Figura 8: Inspección visual del ensayo colorimétrico del MTT. Tubo amarillo: muestra Bioactiva. Tubo violeta: muestra No Bioactiva.	85
Figura 9: porcentaje de muestras de acuerdo al valor de ABC.	87

Figura 10: Porcentaje de resultados bien clasificados como Bioactivos o No bioactivos de acuerdo la muestra.	87
Figura 11: Curvas ROC de las muestras N°2, N°4, N°5 y N°10	88
Figura 12: curva de letalidad de RIF frente a <i>M. tuberculosis</i>	95
Figura 13: curva de letalidad de INH frente a <i>M. tuberculosis</i>	95
Figura 14: curva de letalidad de <i>C. citratus</i> frente a <i>M. tuberculosis</i>	96
Figura 15: curva de letalidad de <i>T. diffusa</i> frente a <i>M. tuberculosis</i>	96
Figura 16: curva de letalidad de <i>C. flexuosus</i> frente a <i>M. tuberculosis</i>	97
Figura 17: curva de letalidad de <i>E. citriodora</i> Hook frente a <i>M. tuberculosis</i>	98
Figura 18. Estructura del compuesto 9-cloro-5-(4-hidroxifenil)-2,3,4,5-tetrahidro-1H-3-benzazepina-7, 8-diol hidrobromido. Fenoldopam.	102

LISTA DE ABREVIATURAS

- ABC Área bajo la curva
- ATCC Colección de cultivos tipo americana
- CENIVAM Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas y Medicinales Tropicales
- CMI Concentración Mínima Inhibitoria
- DMSO Dimetil sulfóxido
- EMB Etambutol
- INH Isoniacida
- LJ Medio de cultivo Lowestein Jensen
- LSO Laboratorio de Síntesis Orgánica
- MTB *Mycobacterium tuberculosis*
- MTT 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromuro
- MWHD Hidrodestilación asistida por la radiación de microondas
- OADC Acido oleico – albumina – dextrosa - catalasa
- OMS Organización Mundial de la Salud
- OPS Organización Panamericana de la Salud
- PAS Acido para amino salicílico
- PBS Solución salina fosfato
- RIF Rifampicina
- ROC Curva de las características operativas del receptor
- SFE Extracción con fluidos supercríticos
- SM Estreptomina
- TB Tuberculosis
- TB-MDR Tuberculosis multidrogorresistente
- TB-XDR Tuberculosis extensivamente drogorresistente
- UFC Unidades formadoras de colonias
- VIH Virus de la Inmunodeficiencia Humana

LISTA DE TABLAS

	pág.
Tabla 1. Actividad anti <i>M. tuberculosis</i> de AEs de plantas aromáticas Colombianas (Adaptada de Bueno-Sánchez <i>et al.</i> 2009)	52
Tabla 2. Moléculas sintéticas evaluadas en el estudio.	61
Tabla 3. AEs de plantas endémicas del departamento de Santander-Colombia incluidos en el estudio.	65
Tabla 4. EVs de plantas endémicas del departamento de Santander-Colombia incluidos en el estudio.	66
Tabla 5. Preparación de soluciones de trabajo para la evaluación de moléculas sintéticas contra <i>M. tuberculosis</i> .	70
Tabla 6. Preparación de soluciones de trabajo para la evaluación de AEs contra <i>M. tuberculosis</i> .	70
Tabla 7. Preparación de soluciones de trabajo para la evaluación de EVs contra <i>M. tuberculosis</i> .	71
Tabla 8: Preparación de soluciones de trabajo para la evaluación de AEs contra <i>E. coli</i> y <i>S. aureus</i>	79
Tabla 9. Concentración mínima inhibitoria de moléculas sintéticas contra <i>M. tuberculosis</i> .	90
Tabla 10. Concentración mínima inhibitoria de EVs contra <i>M. tuberculosis</i>	91

LISTA DE ANEXOS

	pág.
ANEXO A Tablas consolidadas de resultados de bioactividad de moléculas sintéticas, aceites esenciales y extractos vegetales frente a <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	132
ANEXO B Evidencias fotográficas de los ensayos de bioactividad de moléculas sintéticas, aceites esenciales y extractos vegetales frente a <i>Mycobacterium tuberculosis</i> y <i>Staphylococcus aureus</i>	137
ANEXO C Tablas consolidadas de resultados de curvas de letalidad de aceites esenciales frente a <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	144
ANEXO D Evidencias fotográficas de los ensayos de curvas de letalidad de aceites esenciales frente a <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	150
ANEXO E Protocolos generados y utilizados durante el presente estudio para la evaluación de la bioactividad de moléculas sintéticas, Aceites esenciales y extractos vegetales	158
ANEXO F Concentraciones de las soluciones madre de aceites esenciales	187

RESUMEN

TÍTULO: búsqueda de sustancias de origen sintético y natural con bioactividad *in vitro* contra *Mycobacterium tuberculosis**

AUTOR: María Fernanda Moreno Vargas, Wellman Ribón**

PALABRAS CLAVE: *Mycobacterium tuberculosis*, tuberculosis, actividad antimicobacteriana, moléculas sintéticas, aceites esenciales, extractos vegetales.

INTRODUCCIÓN: la tuberculosis (TB) es considerada como una emergencia mundial en salud. Aunque algunos fármacos se investigan para incluirse dentro del esquema estándar de tratamiento ya se han reportado cepas resistentes o se prevé su existencia por tanto nuevos medicamentos antiTB son necesarios.

OBJETIVO: determinar la actividad antimicobacteriana *in vitro* de 15 moléculas sintéticas, 14 aceites esenciales y 6 extractos vegetales de plantas provenientes del departamento de Santander, Colombia.

METODOLOGÍA: la actividad de las sustancias fue probada contra la cepa de referencia de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv de la Colección de Cultivos tipo Americana (ATCC) 27294, aplicando los métodos de microdilución y macrodilución para evaluar la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) que fue evidenciada mediante el ensayo colorimétrico del 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolio bromuro (MTT). Se realizaron curvas de letalidad para determinar el efecto bactericida de las sustancias consideradas como promisorias que presentaron las CMI más bajas.

RESULTADOS: 3 moléculas sintéticas fueron bioactivas con CMI entre 50,8 y 100 µg/mL y las 12 restantes no fueron bioactivas. Los extractos de *Salvia officinalis*, *Escallonia pendula* y *Lippia origanoides* fueron bioactivos a CMI entre 793,70 y 1000µg/mL. No se evidenció bioactividad de *Baccharis aff. Buddleioides*, *Wedelia calycina* y *Nectranda reticulata* Los 14 AEs presentaron bioactividad contra el microorganismo. Los ensayos de curvas de letalidad evidenciaron un efecto bactericida de *C. citratus* y *T. diffusa* con un porcentaje de muerte bacteriana ≥99%. *E. citriodora* y *C. flexuosus* presentaron efecto bacteriostático.

CONCLUSION: La actividad bactericida de los aceites *C. citratus* y *T. diffusa* contra *M. tuberculosis*, apoyan la continuidad de los estudios de estas sustancias como agentes antiTB. La actividad bacteriostática *C. flexuosus* y *E. citriodora Hook*, apoyan su perspectiva de uso dentro de diversos productos industriales no farmacológicos. La presente investigación contribuye al estudio y caracterización de la biodiversidad nacional.

* Tesis de grado. Maestría en Ciencias Básicas Biomédicas

** Facultad de Salud. Maestría en Ciencias Básicas Biomédicas. Director Wellman Ribón, MSc

ABSTRACT

TITLE: search for synthetic and natural substances with bioactivity *in vitro* against *Mycobacterium tuberculosis**

AUTHOR: María Fernanda Moreno Vargas, Wellman Ribón**

KEY WORDS: *Mycobacterium tuberculosis*, tuberculosis, antimycobacterial activity, synthetic molecules, essential oils, plant extracts.

INTRODUCTION: tuberculosis (TB) is considered as a worldwide health emergency. Although some drugs are investigated for inclusion in the standard treatment scheme, for some it resistant strains have been reported or are expected its existence making the requirement for new drugs antiTB continue.

OBJECTIVE: determine the in vitro antimycobacterial activity of 15 synthetic molecules, 14 essential oils and 6 extracts from endemic plants grown in the department of Santander, Colombia.

METHODS: bioactivity of substances was tested against the reference strain of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv from American Type Culture Collection (ATCC) 27294 using the macrodilution or microdilution methods to evaluate the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) which was evidenced by colorimetric assay of 3 - (4,5 - dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT). Killing curves were performed to determine the bactericidal effect of the substances considered as promising with lower MICs.

RESULTS: 3 of analyzed molecules were bioactive with MICs between 50.8 and 100 mg / mL and the other 12 were not bioactive. The extracts from *Salvia officinalis*, *Escallonia pendula* and *Lippia origanoides* were bioactive with MICs between 793.70 and 1000µg/mL. There was no evidence of bioactivity of extracts from *Baccharis aff. buddleioides*, *Nectranda calycina* and *Wedelia reticulata*. The 14 essential oils showed bioactivity against microorganism. The killing curves indicated a bactericidal effect of *C. citratus* and *T. diffusa* with a ≥ 99% of bacterial death. *E. citriodora* and *C. flexuosus* presented bacteriostatic effect.

CONCLUSIONS: bactericidal activity from *C. citratus* and *T. diffusa* against *M. tuberculosis* support their future research to continue within the discovery and development process as anti - TB agents. Bacteriostatic activity results from *C. flexuosus* and *E. citriodora* Hook support their promissory use in various industrial nonpharmacologic products. This research contributes to the study and characterization of national biodiversity.

* Thesis of grade of Master in Basic Biomedical Science

** Faculty of Health, Master in Basic Biomedical Science, director Wellman Ribón, MSc

INTRODUCCION

La TB es una enfermedad infectocontagiosa que se transmite por vía aérea. Cerca de un tercio de la población mundial está infectada con el bacilo de la TB, sin embargo una de cada diez personas infectadas contraerá tuberculosis activa en algún momento de su vida. Los portadores del VIH son diez veces más propensos a padecer la enfermedad. La TB se presenta mayormente en adultos jóvenes, lo cual afecta su etapa productiva. El mayor número de casos y decesos por TB se producen en los países en vía de desarrollo por causa de las condiciones de vida deficientes y las inequidades en el acceso a los fármacos anti TB. Adicionalmente, si no se administra el tratamiento adecuado el individuo puede desarrollar TB resistente. Todos estos factores han conducido a que la TB se declare como una emergencia mundial en salud (World Health Organization, 2012; Haydel, 2010).

Es por eso que agencias nacionales e internacionales como la Organización Mundial de la Salud (OMS), la Organización Panamericana de la Salud (OPS), La Alianza contra la Tuberculosis (TB Alliance) y los entes gubernamentales como el Ministerio de Salud y de la Protección Social de Colombia, fomentan y promocionan el estudio sobre métodos diagnósticos, medicamentos y vacunas que permitan un mejor manejo y control de la enfermedad (World Health Organization, 2006^a; Organización Panamericana de la Salud, 2006; TB Alliance, 2012; Ministerio de la Protección Social República de Colombia, 2009).

Aunque existen alrededor de siete fármacos que se investigan actualmente para ser incluidos como medicamentos anti TB, se cree que son insuficientes para el reto que supone el control y tratamiento de la enfermedad y para algunos ya se han reportado cepas resistentes o se prevé su aparición, por lo cual descubrir

nuevos compuestos que tengan efecto contra el microorganismo continua siendo un reto para el personal investigador en todo el mundo (TB Alliance, 2012; El Sahly *et al.*, 2011; Poissy *et al.*; 2010; VonGroll *et al.*, 2009; Rivers *et al.*, Matteelli *et al.*, 2007; 2008; Medecins Sans Frontieres, 2006; Ginsburg *et al.*, 2005)

Con base en lo anteriormente expuesto, el presente estudio estuvo encaminado hacia la búsqueda de sustancias de origen natural y sintético con propiedades bioactivas contra *M. tuberculosis*, para lo cual la línea de bioactividad en micobacterias del Grupo de Inmunología y Epidemiología Molecular (GIEM), el Laboratorio de Síntesis Orgánica (LSO) y Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas y Medicinales Tropicales (CENIVAM), contribuyeron en el diseño y fabricación de moléculas sintéticas y la obtención de AEs y EVs que posteriormente fueron evaluados a nivel *in vitro* contra el microorganismo.

Durante el curso del proyecto pudieron identificarse varias sustancias con actividad antimicobacteriana promisorias, dos de las cuales presentaron un efecto bactericida. Otro importante aporte realizado durante el curso del proyecto, consistió en la adaptación del ensayo colorimétrico del MTT a las condiciones medioambientales de Bucaramanga y del *Mycobacterium*: Laboratorio de Investigación y Extensión de la Universidad Industrial de Santander (UIS), con el fin de establecer una metodología rápida y práctica para la evaluación de la actividad de sustancias de diversa naturaleza contra bacterias de importancia en salud pública.

1. IDENTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La TB, es una enfermedad infectocontagiosa causada por bacterias pertenecientes al complejo *Mycobacterium tuberculosis* que se transmiten por vía aérea mediante aerosoles expulsados al ambiente por un individuo enfermo. Un tercio de la población mundial está infectada, de la cual el 5 a 10% desarrollará la enfermedad. Sin tratamiento, un individuo con infección activa puede infectar anualmente entre 10 y 15 personas. La asociación de la TB con el VIH, la aparición de cepas con perfiles de multirresistencia y extrema drogorresistencia a los fármacos de primera y segunda línea respectivamente utilizados en el manejo actual del padecimiento, junto con las inequidades en el acceso y la calidad del tratamiento, representan un gran desafío para el control de la enfermedad (World Health Organization, 2012; Haydel, 2010; Caminero, 2007; Cayla *et al.*, 2008).

En 1993 la OMS declaró la TB como una emergencia mundial y en 2006 se desplegó la estrategia Alto a la Tuberculosis dentro de la cual se contempla el fomento y la promoción de investigaciones sobre métodos diagnósticos, medicamentos y vacunas que guiarán hacia el mejoramiento de las prácticas y la posterior eliminación de la enfermedad (World Health Organization, 2006^a).

Actualmente solo siete medicamentos se encuentran en la fase clínica de estudio para ser incluidos en el esquema de tratamiento estándar de la TB, pero se cree que son insuficientes para el reto que supone la enfermedad y en algunos casos ya se prevé resistencia, haciendo necesario continuar con la exploración e identificación de nuevos agentes terapéuticos (TB Alliance, 2012; ElSahly *et al.*, 2011; Poissy *et al.*; 2010; VonGroll *et al.*, 2009; Medecins Sans Frontieres, 2006; Ginsburg *et al.*, 2005).

Los compuestos de naturaleza heterocíclica representan un área de gran interés farmacéutico debido a su amplia ocurrencia en la naturaleza. Éstos pueden encontrarse formando parte de moléculas que participan en procesos vitales como la codificación genética (las purinas y pirimidinas presentes en los ácidos nucleicos, son heterociclos que contienen uno y dos átomos de nitrógeno respectivamente) y la síntesis de proteínas (los aminoácidos prolina, histidina y triptófano son un ejemplo exitoso de la aplicación de compuestos heterociclos en los seres vivos), entre otros. En investigación microbiológica, se han podido sintetizar gran variedad de dichas moléculas con propiedades antibióticas (Ciprofloxacina), antifúngicas (Fluconazol), antiparasitarias (Mebendazol) y antivirales (Ritonavir) por lo cual la continuación de los estudios encaminados a descubrir nuevos heterociclos con propiedades antimicobacterianas es muy prometedora (Dua *et al.*, 2011).

Adicionalmente, la creciente tendencia hacia el uso de compuestos de origen natural en diversos campos industriales así como los usos de las plantas en medicina tradicional, ha orientado la sospecha de la utilidad de los AEs y EVs en el manejo de la TB (Mohamad *et al.*, 2011; McGaw *et al.*, 2008; Baquero *et al.*, 2007). Esto ha sido potenciado por la actual intención de los gobiernos de lograr una caracterización de los ecosistemas de cada país que contribuya al conocimiento de las especies nativas, debido al reconocimiento del impacto de las mismas en la vida y el bienestar de los seres humanos (Ministerio del Medio Ambiente, 1995). Cerca de 28 AEs han sido incluidos en la Farmacopea Europea (2007), 3 en la Farmacopea Británica (1993) y 6 en la Farmacopea Francesa, basados en los estudios de las propiedades antimicrobianas de estas sustancias (Pauli y Schilcher, 2009). Colombia, considerado como un país megadiverso, se ubica como la cuarta nación en biodiversidad a nivel mundial y por grupo taxonómico como el segundo en biodiversidad a nivel de plantas con 41.000 especies reportadas, lo que refleja su riqueza en fuentes naturales utilizables en la búsqueda de nuevos fitofármacos (Romero *et al.*, 2008). Varias especies

vegetales nacionales han sido documentadas con actividad anti *M. tuberculosis*, entre ellas *Achyrocline alata*, *Lippia americana*, *Salvia aratocensis*, *Swinglea glutinosa* y *Turnera diffusa* (Bueno-Sánchez *et al.*, 2009^{a,b}) Santander cuenta con las condiciones geobotánicas que permiten el crecimiento endémico de un gran número de plantas lo que plantea la posibilidad del desarrollo de cultivos con bajos costos de tecnificación ya que éstas están bien adaptadas al terreno. Es por eso que la investigación de sus efectos antibacterianos representa un gran avance en el conocimiento acerca de sus usos potenciales aplicables a diferentes campos industriales que puedan promover además el desarrollo económico, social y científico de la región.

2. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Los aceites esenciales, extractos vegetales de plantas provenientes del departamento de Santander y moléculas sintéticas poseen actividad *in vitro* contra *M. tuberculosis*?

3. MARCO TEÓRICO

3.1 INICIOS DE LA RELACIÓN ENTRE *Mycobacterium tuberculosis* Y LA RAZA HUMANA

La TB es una enfermedad que ha acompañado al hombre a través de su historia. Se han documentado lesiones compatibles con la enfermedad de Pott, caracterizada por las deformidades óseas a nivel de la columna vertebral; en momias egipcias y recientemente en momias peruanas y chilenas que datan del periodo precolombino (Daniel, 2006; Arriaza *et al.*, 1995). Adicionalmente, los estudios sobre el ADN del complejo *M. tuberculosis* que alberga las especies que pueden causar la enfermedad, así como la búsqueda de biomarcadores específicos como los ácidos micólicos han contribuido de manera decisiva con el diagnóstico de TB en las muestras de tejido tomadas de éstos especímenes (Lombardi y García, 2000; Sotomayor *et al.*, 2004; Donoghue *et al.*, 2010; Zink *et al.*, 2001). Mediante el análisis de seis genes housekeeping (*katG*, *gyrB*, *gyrA*, *rpoB*, *hsp65* y *sodA*) y de la subunidad 16S del rRNA de aislamientos pulmonares y extrapulmonares de pacientes europeos y africanos; en 2005 Gutiérrez y colaboradores concluyeron que el antepasado más temprano del MTB estuvo presente en el oriente africano hace 3.000 millones de años, sugiriendo que los primeros homínidos pudieron sufrir TB y que de esta manera tanto el bacilo tuberculoso como la raza humana iniciaron su historia de manera contemporánea (Gutiérrez *et al.*, 2005).

Desde entonces, la relación del hombre con el MTB ha estado marcada por los intentos de entender y contrarrestar la enfermedad. La terapia antituberculosa actual es uno de los logros más importantes de la medicina; sin embargo, la humanidad ha tenido que viajar un largo camino y pagar un alto precio para conseguirla.

3.2 EVOLUCIÓN DEL TRATAMIENTO ANTI TUBERCULOSIS

Durante los tiempos bíblicos la TB era atribuida a los malos espíritus o al castigo divino y el tratamiento se basaba en rituales mágicos y ceremonias religiosas (Daniel y Daniel, 1999, Pérez Cruz *et al.*, 2009). Posteriormente, se pensó que la causa era hereditaria y parcialmente atribuida a las debilidades mentales y morales del individuo y se recomendaba descanso, rezos, ejercicio y consumo de leche (Rosenblatt, 1973; Daniel, 2006). En 1859 fue creado el primer establecimiento destinado a la cura de la enfermedad y posteriormente se acuñó el concepto de “sanatorio” para denotar un lugar orientado a la estancia prolongada de pacientes bajo un régimen estricto de reposo, alimentación, exposición al aire puro y ejercicio moderado (Duarte y López, 2009; Warren, 2006; Bashford, 2010).

En 1882, Robert Koch aisló el *M. tuberculosis* y en 1890 realizó la publicación de sus postulados. Desde entonces la prioridad fue detectar la enfermedad antes de que progresara a su forma activa y una vez el pulmón fue reconocido como órgano blanco del bacilo, el control del esputo fue prioritario en las campañas de salud pública (Warren, 2006; Bashford, 2010; Koch, 1882). Así mismo, el desarrollo y evolución de la cirugía estuvieron ampliamente entrelazados al tratamiento de la TB, aunque a menudo las técnicas invasivas sobrevenían con infección de tejidos e incluso ampliación de la TB formación de fístulas y empiema (Meyer, 1991).

No fue sino hasta 1944 que se inicio el tratamiento farmacológico de la TB. Después de que se demostró la actividad de la estreptomycin (SM) sobre *M. tuberculosis* en los ensayos *in vitro* y en los modelos de infección en animales (Waksman *et al.*, 1946; Waksman, 1953), el Concejo Británico de Investigación Médica llevo a cabo el primer estudio en pacientes con enfermedad pulmonar avanzada. Sin embargo, aunque se mostraron resultados ventajosos inmediatos

para el grupo tratado con el medicamento, muchos de los pacientes desarrollaron resistencia (A Medical Research Council Investigation, 1948).

Poco después se pudo comprobar el efecto protector del PAS sobre el desarrollo de resistencia inducida a la SM (Graessle y Pietrowski, 1949) y se estableció el tratamiento combinado como uno de los axiomas para tratar la forma activa de la enfermedad (Murray, 2004).

Para 1952 se introduce la INH, una droga que resultó tener una actividad antituberculosa mayor a la de cualquier otra sustancia probada hasta el momento. Los estudios clínicos demostraron el valor terapéutico del fármaco aunque el desarrollo rápido y frecuente de resistencia afectaba la respuesta al tratamiento (A Medical Research Council Investigation, 1952). Después se concluyó que la terapia diaria de SM+INH constituía la opción más efectiva y eficaz de todas las estudiadas hasta el momento (A Medical Research Council Investigation, 1953^a; A Medical Research Council Investigation, 1953^b; Seventh Report to the Medical Research Council, 1955).

Posteriormente la adición de la INH a la combinación PAS/SM potenció los efectos del tratamiento mientras que la continuación de la quimioterapia combinada durante un segundo año redujo considerablemente la tasa de recaída. Por otro lado, se abolió el tratamiento sanatorial lo que conllevó a un mayor alcance en el manejo de la TB a nivel mundial. Sin embargo, la modalidad extra hospitalaria trajo consigo la necesidad de la supervisión directa del consumo de los medicamentos (British Medical Research Council, 1962; Tuberculosis Chemotherapy Centre Madras, 1959; Bayer y Wilkinson, 1995; Mitchison, 2005).

El siguiente remplazo del PAS por el etambutol (EMB) en la década de 1960, trajo dos grandes beneficios; una mejor tolerancia al nuevo fármaco y una reducción del tiempo de tratamiento a 18 meses (World Health Organization, 2006^b).

El próximo escalón en el desarrollo del actual esquema estándar anti TB vino con la introducción de la RIF a la terapia multidroga. Esta vez se estableció un régimen de INH/RIF durante nueve meses, suplementado con SM o EMB los primeros dos meses. La nueva terapia de corta duración proveyó una alternativa segura, efectiva y mayormente económica para el tratamiento de la TB con tasas de curación del 90-95% (Lorian y Finland, 1969; Baronti y Lukinovich, 1968; Hyde, 1972; Corpe y Sánchez, 1972; Dutt *et al.*, 1979).

Finalmente, la pirazinamida una droga de uso clínico desde 1952, fue probada e incluida en el esquema de tratamiento en 1980 y consiguió disminuir aún más el período de medicación hasta los seis meses. Las ventajas de la terapia a corto plazo incluyeron entre otras una menor toxicidad crónica, menor suministro y menor costo de los servicios de salud que ahora debían ser concentrados en garantizar el cumplimiento del paciente además de una menor posibilidad de recaída tras el abandono del tratamiento (Schwartz, 1957; Ekweani, 2004; Palomino *et al.*, 2007).

Dos características biológicas explican la efectividad de la terapia combinada en comparación con la monoterapia. La primera es que el uso de un solo medicamento permite la selección de bacilos drogo resistentes, ocasionando un fracaso en la eliminación de la enfermedad. La siguiente son los diversos patrones de susceptibilidad a los medicamentos antituberculosos presentados por las diferentes poblaciones de bacilos que pueden coexistir en un mismo paciente (Palomino *et al.*, 2007, Shamputa *et al.*, 2006; Fang *et al.*, 2008). De esta manera, una fase inicial de dos meses que incluye medicamentos que permiten una rápida eliminación de las bacterias que se dividen activamente (INH, RIF, PZA y EMB o SM) resulta en la negativización del esputo. Seguidamente una fase de continuación con menos medicamentos (generalmente INH y RIF) durante cuatro a siete meses tiene por objetivo eliminar los bacilos latentes y prevenir la recurrencia. Actualmente las drogas utilizadas para el tratamiento de la TB son

clasificadas en drogas de primera y segunda línea en función de su disponibilidad, vía de administración y efectos secundarios, entre otros y se imparten dentro de la estrategia DOTS (por sus siglas en inglés Directly Observed Therapy Short Course) desarrollada por la OMS en la década de 1990 (Palomino *et al.*, 2007; World Health Organization, 2011^a; Kaufmann y Hahn, 2003).

3.3 DESAFÍOS EN EL CONTROL DE LA TUBERCULOSIS

Tras el establecimiento del esquema estándar, sobrevino una excesiva confianza en el control de la enfermedad que condujo a pensar en su posible erradicación (Kimmey, 1972; Perkins, 1963). Sin embargo, pese a la gran investigación y descubrimiento de fármacos entre 1950 y 1970, en 1993 con 7 a 8 millones de casos estimados y una mortalidad de entre 1.3 y 1.6 millones de personas; la OMS declaró la TB como una emergencia mundial de salud pública. Actualmente la TB es considerada como una enfermedad reemergente y cobra cerca un millón de vidas al año, convirtiéndose en la segunda pandemia más importante a nivel mundial producida por un agente infeccioso (World Health Organization, 2004).

A continuación se exponen los aspectos más relevantes que representan un gran reto para el control de la enfermedad.

3.3.1 Coinfección tuberculosis – Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH)

Se estima que hay 34 millones de individuos VIH positivos alrededor del mundo y un tercio de ellos también están infectados con el bacilo tuberculoso (World Health Organization, 2011^b). El impacto de la asociación de las dos infecciones se fundamenta en que por un lado el VIH incrementa no sólo el riesgo sino también la tasa de progresión de la latencia a la enfermedad tuberculosa debido a que el

número y función de los linfocitos T CD4 se ven disminuidos y la respuesta inmune no es efectiva en prevenir el crecimiento de *M. tuberculosis* que se disemina a nivel extrapulmonar a medida que aumenta el grado de inmunosupresión. También se ha demostrado que el virus afecta la respuesta apoptótica de los macrófagos infectados por la bacteria permitiendo su supervivencia. En contraste, se ha visto un aumento de la replicación viral en las zonas pulmonares infectadas por *M. tuberculosis* y dentro de las células de la respuesta inmune activadas en la cavidad pleural, así como en macrófagos y células pulmonares obtenidas por lavado broncoalveolar de individuos coinfectados. Adicionalmente, la producción del factor de necrosis tumoral (TNF) que es necesaria para el control del crecimiento bacteriano, también activa la replicación del virus intra macrófago. De esta manera la respuesta inmune contra un patógeno promueve la replicación del otro (World Health Organization. 2011^b; Pawlowski *et al.*, 2012). A nivel farmacológico, la RIF estimula la actividad del sistema enzimático Citocromo P450, responsable de metabolizar los inhibidores de proteasa (PIs) e inhibidores no nucleotídicos de la transcriptasa reversa (NNRTIs) utilizados como anti-retrovirales; disminuyendo sus niveles plasmáticos y afectando el tratamiento anti VIH. A su vez, los PIs y NNRTIs pueden potenciar o inhibir el sistema enzimático alterando los niveles sanguíneos de RIF. Con todo esto, las interacciones farmacológicas pueden resultar en un tratamiento inefectivo para las dos entidades e incrementar el riesgo de toxicidad (World Health Organization. 2011^b; Schutz *et al.*, 2010).

3.3.2 Resistencia en tuberculosis

El tratamiento de la TB activa es el componente principal del programa de control de ésta enfermedad. Sin embargo, la capacidad de *M. tuberculosis* para mutar le ha permitido sobrevivir la incorporación de cada uno de los fármacos dirigidos en su contra llevando al campo médico y científico a desarrollar nuevas estrategias

de tratamiento para contrarrestar los efectos devastadores que este microorganismo ocasiona al individuo infectado.

La resistencia se origina como consecuencia de una multiplicación continua, que conlleva a que un cierto número de bacilos de una misma cepa muten en lugares genéticos que están relacionados con la acción de los medicamentos. Cuando la mutación se presenta en una cepa salvaje, es decir que no ha estado previamente en contacto con el fármaco; se habla de resistencia “natural”. En otras ocasiones, puede que el desarrollo de resistencia se genere durante el curso de un tratamiento mal realizado ya sea por la prescripción inadecuada de medicamentos o por una mala adherencia del enfermo a estos; ante lo cual se trata de una resistencia “adquirida”. Las cepas generadas entonces, pueden ser transmitidas a individuos susceptibles, quienes desarrollarán una TB con resistencia “inicial” (Canetti, G.; *et al.*, 1963; Caminero, 2001).

Aunque el bacilo tuberculoso se encuentra constantemente bajo mutación espontánea que a consecuencia genera resistencia a medicamentos individuales, la frecuencia de dichas mutaciones simples es bastante baja y no se expresa fenotípicamente por lo cual no tiene consecuencias clínicas; siempre y cuando el paciente reciba un tratamiento adecuado (Canetti, G.; *et al.*, 1963; Caminero, 2001).

Sin embargo, la enfermedad puede verse provocada por cepas de *M. tuberculosis* ante las cuales más de un agente anti-TB es inactivo. Tal es el caso de la Tuberculosis Multidrogo Resistente (TB-MDR) causada por cepas resistentes a RIF e INH, que actualmente hacen parte de los fármacos utilizados como primera línea en el tratamiento de la enfermedad y la tuberculosis extensivamente drogoresistente (TB-XDR) que es aquella TB-MDR que además presenta resistencia a una fluoroquinolona y al menos un agente de segunda línea inyectable ya sean amikacina, canamicina o crapreomicina (World Health

Organization, 2010; Centers for Disease Control and Prevention, 2006) o en el peor de los casos como se han reportado desde el 2009, puede existir una “TDR” TB o tuberculosis totalmente drogo resistente causada por cepas que presentan resistencia a todos los fármacos de primera y segunda línea (Velayati *et al.*, 2009; Udwadia *et al.*, 2011), pero cuyo término sin embargo, no ha sido avalado por la OMS debido a que pueden existir otros fármacos a los que sí sean sensibles, con lo cual el término totalmente drogorresistente entraría a ser revaluado.

Si bien en un principio la situación de la resistencia representaba un problema aislado en algunos enfermos o en algunas partes del mundo, actualmente se está convirtiendo en un fenómeno epidémico generalizado. Para el 2008 fueron estimados 440.000 casos de TB-MDR y 963 casos de TB-XDR a nivel mundial (World Health Organization, 2010).

El gran impacto de la TB-MDR y TB-XDR se ve reflejado en la necesidad de recurrir a fármacos alternativos que son más tóxicos, costosos y de difícil acceso para la mayoría de la población afectada que se encuentra en los países más pobres (Haydel, 2010). Los medicamentos para el tratamiento de la TB-MDR tienen un valor 50 a 200 veces más elevado que el tratamiento de una TB susceptible y el costo del cuidado médico es aproximadamente 10 veces mayor. Adicionalmente, el tiempo de tratamiento debe ser extendido a un período de 14-24 meses lo que complica aún más la situación ya que hay una menor adherencia por parte de los enfermos quienes sufren una amplia gama de efectos secundarios y en algunos casos abandonan el tratamiento; volviéndose diseminadores crónicos de la infección (World Health Organization, 2010; Caminero, 2007). Por otro lado, se ha reportado que un paciente con tratamiento previo anti-TB tiene cinco veces más probabilidades de desarrollar resistencia con respecto a los que no han sido medicados. Otros factores como el abuso de alcohol y los fenómenos migratorios, también han sido considerados factores de riesgo para adquirir las formas resistentes de la enfermedad (Chiang *et al.*, 2010).

3.3.3 Inequidades sociales

La distribución de la pobreza en el mundo coincide perfectamente con la distribución de la TB. Esto debido a que proporciona un ambiente favorecedor para su transmisión además de producir hacinamiento y desnutrición, considerados como importantes factores de riesgo para la adquisición y el desarrollo de forma activa de la enfermedad (Caminero, 2007; Cayla *et al.*, 2008).

Por otro lado, la inestabilidad política y la ocurrencia de desastres naturales y epidemias diferentes a la TB en los países más pobres, conlleva a que los gobiernos reorienten los recursos asignados a los programas de control de TB disminuyendo su cobertura y creando una crisis de inaccesibilidad a la atención sanitaria y a un tratamiento con fármacos de calidad; lo que trae como consecuencia el mantenimiento de altos índices de prevalencia e incidencia de la enfermedad (Ministerio de la Protección Social Republica de Colombia, 2009).

Todo lo anterior se suma a los fenómenos migratorios que han posibilitado que la TB se desplace desde zonas con alta epidemia hacia otros con menor epidemia, desencadenando un sistema cíclico en el que pese a que los países más desarrollados posean mejores condiciones de vida, sus población siempre está en peligro de adquirir la infección (Caminero, 2007; Cayla *et al.*, 2008).

3.4 NECESIDAD DE NUEVOS FÁRMACOS ANTITUBERCULOSOS

La falta de inclusión de nuevas alternativas terapéuticas desde hace 60 años ha vuelto a ubicar la TB en la época en la que no existían fármacos antituberculosos, trayendo como consecuencia un pronóstico desfavorable que en algunos casos ante la imposibilidad de cura, puede conducir al fallecimiento del enfermo.

Para enfrentar los desafíos que representa el control de la TB, son necesarios nuevos medicamentos con nuevos mecanismos de acción y menos efectos tóxicos, que puedan ser utilizados en el tratamiento de la TB-MDR y TB-XDR; con una fuerte actividad bactericida contra bacilos activos, de replicación esporádica y aquellos que se encuentran en estado latente; que permitan una disminución del tiempo de tratamiento; con características farmacocinéticas que incluyan larga vida media y biodisponibilidad tisular, para lograr frecuencias de administración más amplias; en combinaciones más eficaces que disminuyan el número de pastillas a consumir en una sola dosis y con mínimas interacciones indeseadas con otros medicamentos como los antirretrovirales (Koul *et al.*, 2011).

Las inversiones para el desarrollo de nuevos medicamentos antituberculosos son no solo necesarias a nivel humanitario, sino económico. El desarrollo de fármacos que permitan un tratamiento más corto, seguro y eficaz, aumentarán la productividad de los países debido a una población con un mejoramiento de sus condiciones de salud (World Economic Forum, 2008).

Es por eso que el componente número 6 de la Estrategia Alto a la Tuberculosis, planteada por la OMS en respuesta a la urgente necesidad de reducir la carga mundial de la enfermedad; contempla la promoción de investigaciones para el desarrollo de nuevos fármacos antituberculosos (World Health Organization, 2006). Por su parte, la inclusión de la investigación operativa, clínica y epidemiológica dentro de los planes de los programas nacionales de control de la TB representa una línea estratégica para alcanzar las metas del Plan Regional de Tuberculosis 2006- 2015 elaborado por la OPS y del Plan Estratégico Colombia Libre de Tuberculosis 2010-2015 (Ministerio de la Protección Social Republica de Colombia, 2009; Organización Panamericana de la Salud, 2006).

3.5 DESCUBRIMIENTO Y DESARROLLO DE NUEVOS FÁRMACOS ANTI TUBERCULOSIS

La obtención de nuevos fármacos es un proceso bastante largo y complejo en el que deben ser invertidos gran cantidad de tiempo y recursos con el fin de realizar el aislamiento, purificación e identificación de componentes activos que deben estudiarse a nivel *in vitro* e *in vivo* para luego ser avalados por las entidades reguladoras y posteriormente poder comercializarse a través de diversas estrategias de marketing. Se estima que para que un nuevo medicamento salga al mercado, se requiere el estudio de al menos un millón de sustancias y un tiempo promedio de 10 a 12 años durante los cuales son invertidos alrededor de 800 millones de dólares (Tamimi y Ellis, 2009; Astra Zeneca España, 2012).

3.5.1 Fase de descubrimiento

Una vez identificada la necesidad terapéutica, inicia la etapa de descubrimiento cuyo objetivo es encontrar y optimizar candidatos promisorios (hits) que podrían ser luego desarrollados como medicamentos (Richards, 2008; Asif *et al.*, 2009).

El diseño racional de éste proceso en TB, inicia con el tamizaje de las sustancias para evaluar su bioactividad sobre la cepa sensible de *M. tuberculosis* H37Rv ATCC 27294. Las ventajas del uso rutinario de ésta cepa para los estudios de compuestos antituberculosos se debe a que su genoma está secuenciado, es genéticamente transformable y conserva su virulencia en los modelos animales. La información obtenida permitirá conocer la CMI (Primm y Franzblau, 2007; Pavan *et al.* 2012; Palomino *et al.* 2002). Se considera que para que sea factible continuar dentro del proceso de descubrimiento, una molécula sintética debe tener una CMI $\leq 10\mu\text{g/mL}$ o su equivalente molar (Pavan *et al.* 2012; Bueno-Sánchez y Kouznetsov, 2010; Senthilkumar *et al.* 2009). En el caso de las sustancias

naturales, por ejemplo las de origen vegetal, si bien su composición diversa, se ha sugerido una buena actividad con CMI < 100 µg/mL para los extractos crudos y ≤ 1µg/mL para los compuestos puros (Pavan *et al.*, 2009; Bueno-Sánchez *et al.* 2011; Bueno-Sánchez, 2012).

El siguiente paso consiste en realizar pruebas de citotoxicidad que sirven para estudiar las consecuencias de la interacción entre la sustancia y otras estructuras diferentes a la diana, que pudieran traer resultados deletéreos a nivel celular. El objetivo es obtener la IC₅₀ (concentración más alta de la sustancia a la cual el 50% de las células se mantienen viables, con respecto al control) y posteriormente se calcula el Índice de Selectividad (IS) que refleja la relación entre la concentración de la sustancia que produce un efecto tóxico y la que produce un efecto terapéutico deseado (IC₅₀/ CMI). Con valores de IS ≥10 el compuesto es considerado selectivo y por tanto seguro y se puede continuar con los estudios preclínicos (Pavan *et al.*, 2012; Pavan *et al.*, 2010; Guzman *et al.*, 2010).

Debido a que *M. tuberculosis* se desarrolla dentro de los macrófagos y puede permanecer en estado latente dentro de las lesiones caseosas de los pulmones; en el estado pre-clínico de estudio deben conducirse estudios para comprobar si la actividad biológica se mantiene estando éste tanto en el ambiente intracelular como en el de hipoxia (Pavan *et al.*, 2012). También se realizan pruebas para conocer su efecto sobre cepas de la bacteria ya sean de referencia aislamientos clínicos, que posean perfiles de resistencia (Bueno-Sánchez *et al.* 2011; Zanetti *et al.*, 2010). Esto orienta sobre la posible resistencia cruzada que pudiera generarse en caso de que la sustancia presente un mecanismo de acción igual o similar a las drogas contra las cuales la bacteria es resistente. Ya que el tratamiento actual de la enfermedad consiste en una terapia multidroga, posteriormente se determina la interacción de la sustancia con los medicamentos de primera línea (Pavan *et al.*, 2012).

Además de los estudios *in vitro*, la experimentación *in vivo* correspondiente al estado pre-clínico de estudio, es altamente relevante ya que simulará en lo posible los efectos que pudieran producirse cuando la sustancia sea administrada en humanos. El flujo de la investigación en esta etapa está orientado a obtener datos sobre el margen de seguridad terapéutica mediante la determinación de la Dosis Letal 50 (LD₅₀), el potencial mutagénico, la inducción de cáncer (oncogénesis) y la provocación de malformaciones (teratogénesis); así como la máxima información que permita el entendimiento de las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas (Richards, 2008; Pavan *et al.*, 2012).

Los modelos animales para investigación en TB son utilizados para evaluar los efectos de la administración del agente bajo estudio tanto en animales sanos como infectados. Estos involucran ratones, cobayos, conejos y primates no humanos cada uno de los cuales presenta sus propias ventajas y limitaciones (Gupta y Katoch, 2005; Borrero *et al.*, 2011).

Los compuestos que superen los estudios *in vivo* presentarán entonces características como ser absorbidos al torrente sanguíneo y distribuidos a su sitio de acción, metabolizarse de manera eficiente y eficaz, ser excretados total o parcialmente y tener un efecto tóxico mínimo o ausente. Sin embargo, antes de dar inicio a la fase clínica de estudio es usual que el hit sea modificado químicamente con el fin de obtener una mejor relación estructura-actividad. Para esto se trabaja sobre características como potencia, solubilidad acuosa, estabilidad y selectividad (Showalter y Denny, 2008).

Finalmente, si se confirma que el hit cumple con la “Regla de cinco” de Lipinski, éste puede ser promovido como un compuesto líder (lead), para su optimización. Dicha regla, permite la evaluación de las propiedades fisicoquímicas del compuesto y su relación con el perfil de absorción oral (Lipinski *et al.*, 1997).

3.5.2 Fase de desarrollo

Los estudios de Fase I, que pueden tardar alrededor de un año tienen como objetivo evaluar la seguridad y farmacocinética de la droga en un grupo de entre 20 a 80 voluntarios sanos. Aquí se determina si el rango de dosis usada es adecuado o si se debe mejorar ese aspecto antes de continuar con su uso en pacientes (Richards, 2008).

Esto es lo concerniente a la Fase II, que dura aproximadamente dos años durante los cuales la administración del compuesto permite evaluar los aspectos anteriormente mencionados esta vez en quienes poseen la enfermedad o la condición bajo estudio (Richards, 2008).

Si la droga continúa siendo prometedora, se da inicio a la Fase III en la que se evalúa un grupo mayor de pacientes voluntarios. El propósito es generar datos estadísticamente significativos sobre la seguridad, eficacia y relación riesgo-beneficio al administrar la droga (Richards, 2008).

La fase IV incluye los estudios post-marketing, así como la búsqueda de nuevas indicaciones y nuevas formulaciones. El objetivo es extender el uso del medicamento para el tratamiento de otras condiciones de salud o enfermedad (Richards, 2008).

3.6 NUEVOS FÁRMACOS ANTI TUBERCULOSIS: CANDIDATOS EN FASE III

Para cumplir los objetivos de las políticas planteadas para la investigación y obtención de nuevos fármacos anti TB, en los últimos años la colaboración entre instituciones educativas, organismos internacionales, entidades gubernamentales

y compañías farmacéuticas ha permitido la generación de varios candidatos que actualmente se encuentran en las diferentes etapas clínicas de desarrollo.

En 1999 las fluoroquinolonas Gatifloxacina (GATI) y Moxifloxacina (MOXI) fueron introducidas para el tratamiento de infecciones del tracto respiratorio y posteriormente han sido utilizadas para el tratamiento de la MDR-TB y en pacientes con TB por cepas sensibles que presentan reacciones adversas a los fármacos de primera línea. Su actividad farmacológica está dada por su efecto inhibidor sobre las enzimas bacterianas dependientes de ATP Topoisomerasa II (girasa de ADN) y topoisomerasa IV. Sin embargo, dado que en *M. tuberculosis* no se ha demostrado la existencia de ésta última enzima, la actividad biológica podría estar concentrada en la girasa de ADN como única diana, implicando esto un tipo de acción sub óptima del fármaco. Ahora bien, GATI y MOXI han presentado mejor actividad *in vitro* contra *M. tuberculosis* H37Rv que otras fluoroquinolonas, con CMI de 0.12-0.25 µg/mL y 0.18-0.5 µg/mL respectivamente (Villemagne *et al.*, 2012; Gatifloxacina, 2008; Moxifloxacina, 2008). En la actualidad los dos fármacos han superado los ensayos clínicos de fase I y II. La fase III está en proceso y su principal objetivo es evaluar la eficacia y seguridad de los fármacos y la posibilidad de reducir el tiempo de tratamiento de 6 a 4 meses (Villemagne *et al.*, 2012; Coll, 2009).

Las desventajas del uso de GATI y MOXI para el tratamiento de la TB se han asociado a su alto efecto fetotóxico limitando su uso en gestantes, a su efecto hepatotóxico severo y a la posibilidad de hipoglicemia, riesgo que puede verse aumentado en ancianos, entre otras (Gatifloxacina, 2008; Moxifloxacina, 2008). Así mismo, al tiempo que se conducen estudios para avalar el uso de fluoroquinolonas como medicamentos de primera línea en el tratamiento de la TB, la emergencia de cepas resistentes a estos fármacos ya ha sido reportada. Esto se ha atribuido principalmente al uso extendido de quinolonas para el tratamiento previo de infecciones diferentes a la TB que le permitirían a la bacteria un tiempo de

exposición prolongado, comprendido entre la infección y el diagnóstico de TB (Ginsburg *et al.*, 2005; Poissy *et al.*, 2010).

La exploración de nuevas fuentes de agentes antituberculosos que permitan hallar compuestos promisorios para ser promovidos como candidatos a fármacos anti-TB continúa siendo por tanto, un componente esencial para el control de la enfermedad.

3.7 FUENTES DE NUEVOS COMPUESTOS BIOACTIVOS CONTRA *Mycobacterium tuberculosis*

La búsqueda de compuestos antituberculosos ha estado orientada hacia el diseño, fabricación y mejoramiento de moléculas sintéticas. Algunos son análogos o derivados de compuestos ya existentes; otros son nuevas entidades que pueden ya sea estar orientadas hacia los mismos mecanismos de acción que manejan los fármacos tradicionales, haber sido re direccionadas hacia nuevos mecanismos de acción o cuya actividad antituberculosa ha sido evaluada pero aún no se conoce claramente cómo actúan (Coll, 2009; Diacon *et al.*, 2009; Médecins Sans Frontières, 2006).

Por otro lado, la experiencia previa de numerosos fármacos, cuyos principios activos fueron extraídos inicialmente de sustancias naturales y la creciente tendencia hacia el uso de éstos compuestos en diversos campos industriales, ha orientado la sospecha de su utilidad para el tratamiento de la TB. Adicionalmente, existe un creciente interés de los gobiernos por lograr una caracterización de la biodiversidad de cada país ya que se reconoce su impacto en la vida y el bienestar de los seres humanos. Se calcula que la diversidad taxonómica mundial se compone de alrededor de 5 a 30 millones de especies, de las cuales 2 millones han sido formalmente descritas. A este respecto, Colombia es considerado como

un país megadiverso situándose como la cuarta nación en biodiversidad a nivel mundial y por grupo taxonómico como el segundo en biodiversidad a nivel de plantas con 41.000 especies reportadas, las cuales en su mayoría están ubicadas en la región Andina; reflejando la riqueza del país en fuentes vegetales que pueden ser utilizadas en la búsqueda de nuevos fitofármacos y compuestos antituberculosos (http://www.siac.net.co:8088/web/sib/cifras#Biodiv_mundo, Romero et al, 2008).

3.7.1 Moléculas sintéticas

La obtención de moléculas con promisorio actividad biológica puede realizarse a partir de tres estrategias; la primera de ellas es la síntesis orientada hacia un blanco (TOS), proceso en el que pequeñas moléculas aisladas de fuentes naturales son puestas como blancos para el diseño de rutas sintéticas que permitan la obtención de las mismas. La segunda, está basada en la química combinatoria que explora grupos de compuestos estructuralmente relacionados, obtenidos ya sea de productos naturales, drogas conocidas o estructuras previamente diseñadas de manera racional, a los cuales se les atribuyen propiedades biológicas útiles. La tercera estrategia se enfoca en la síntesis orientada a la diversidad (DOS), que permite la generación racional de librerías (quimiotecas) de compuestos sintéticos con características estructurales similares, usando materiales de partida simples que son transformados a través de rutas sintéticas generadas por medio de reacciones prácticas y sencillas (Burke y Schreiber, 2003; Schreiber, 2000).

Debido a que el efecto biológico de una sustancia se relaciona con su estructura química; lo que busca la estrategia DOS, es generar grupos de moléculas con pequeñas variaciones estructurales entre sí, modulando el factor azar y aumentando la racionalidad de dichos cambios. De esta manera, con los ensayos

biológicos se reconoce la estructura (farmacóforo) que se cree necesaria para la actividad biológica y aquellas que influyen en características como lipofilidad, reactividad y estabilidad (Ravaschino, 2007).

Dentro de la colección de moléculas que pueden ser obtenidas a través de la estrategia DOS, se encuentran compuestos de naturaleza heterocíclica; formados por anillos de tamaño variable que incluyen uno o más átomos diferentes al carbono y que pueden o no fusionarse a otros sistemas cíclicos o heterocíclicos. Estas sustancias representan interés científico, debido a que se encuentran como constituyentes fundamentales de moléculas biológicamente activas como las bases nitrogenadas y medicamentos sintéticos utilizados en terapia antibiótica, anticancerígena y ansiolítica, entre otras (Dua *et al.*, 2011).

A continuación se describen los compuestos heterocíclicos objeto de estudio en el presente trabajo:

3.7.1.1 Derivados de las 1-benzazepinas

Conformados por un sistema de un anillo bencénico fusionado a un anillo azepínico, los derivados de las 1-benzazepinas constituyen uno de los grupos de moléculas orgánicas más promisorios para aplicaciones farmacológicas. La bioactividad de estas moléculas ha sido estudiada para el tratamiento de diversas enfermedades y situaciones clínicas. Ejemplo de ello es su acción sobre el sistema arginina vasopresina (AVP), una hormona producida por la neurohipófisis. La AVP actúa a nivel renal sobre los receptores V_2 , desencadenando el aumento de la permeabilidad de los conductos y túbulos colectores y por tanto la reabsorción de agua. Adicionalmente, actúa sobre los receptores V_{1a} presentes en células musculares lisas del sistema vascular, plaquetas y células mesenquimales; ejerciendo un potente efecto vasopresor y mediando la proliferación e hipertrofia

celular y la agregación plaquetaria. El fármaco tolvaptán (también conocido como OPC-41061) actúa a nivel renal como antagonista del receptor V_2 de la AVP causando la disminución de la retención de líquidos en personas con insuficiencia cardiaca congestiva, cirrosis hepática y síndrome nefrótico (Yamamura *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 2011). Por otro lado, basados en estudios realizados sobre ratas, el compuesto YM-218 se ha propuesto para tratar enfermedades renales ya que actúa como inhibidor selectivo del receptor V_{1A} contrarrestando la respuesta fisiológica inducida por la AVP que conlleva a la hiperplasia e hipertrofia de células mesangiales (Tsukada *et al.*, 2005; Tahara *et al.*, 2007).

La actividad antiviral de los derivados de las 1-benzazepinas también ha sido informada. Dichas moléculas han sido estudiadas por su efecto sobre el co-receptor CCR5, un receptor de quimiocina situado sobre monocitos y linfocitos y que es utilizado por el VIH- 1 para ingresar a la célula diana. Al actuar como ligandos del CCR5 los derivados de las 1-benzazepinas que contienen un grupo metileno entre el sulfóxido y el grupo 2-piridil, han mostrado un incremento en la actividad farmacológica, causando un mayor efecto inhibitorio de la interacción del virus con el receptor y evitando por tanto la entrada del virus a la célula (Seto *et al.*, 2005).

A nivel antiparasitario, estudios *in vitro* de los derivados 1,4-epoxi-2-exo-aril- y cis-2-aril-4-hidroxitetrahydro-1-benzazepina, revelaron la bioactividad de éstos compuestos contra los promastigotes de *Leishmania chagasi*, así como contra epimastigotes y amastigotes intracelulares de *Trypanosoma cruzi*, encontrándose algunos con valores de IC_{50} similares a los del nifurtimox, medicamento utilizado en la actualidad para el tratamiento de la enfermedad de chagas (Gomez-Ayala *et al.*, 2010).

3.7.1.2 Derivados de las naftoazepinas

Otros heterociclos recientemente estudiados en su actividad biológica, son los derivados de las naftoazepinas, los cuales presentan en su estructura un anillo de naftaleno fusionado a un anillo azepínico. En ensayos *in vitro*, derivados de la 2-exo-aril-1,4-epoxitetrahidronafto[1,2-b]azepina y cis-2-aril-4-hidroxitetrahidronafto[1,2-b]azepina, mostraron ser activos contra las formas libres de *T. cruzi* y *Leishmania chagasi* y tener un bajo o moderado efecto citotóxico en células VERO y THP-1 (Palma *et al.*, 2009).

3.7.1.3 Derivados de las quinolonas

Las quinolonas de uso farmacológico, están constituidas por dos anillos, con un nitrógeno en la posición 1, un grupo carbonilo en la posición 4 y un grupo carboxilo en la posición 3. Las fluoroquinolonas a su vez, tienen esta estructura básica, con un átomo de flúor en la posición 6 (Peterson, 2001). Estas moléculas han sido evaluadas como agentes antimicrobianos, ya que actúan sobre las enzimas específicas bacterianas DNA girasa y topoisomerasa IV, necesarias para el proceso de replicación y recombinación del DNA (Showalter y Denny, 2008). Dichas moléculas son usadas para el tratamiento de infecciones resistentes o cuando hay alguna intolerancia a los fármacos antituberculosos de primera línea usados en el tratamiento de la enfermedad, ya que comúnmente aquellas cepas resistentes tanto a RIF como INH presentan buena sensibilidad a las quinolonas. Sin embargo, pocos estudios se han realizado para optimizar la estructura y lograr mayor especificidad del fármaco contra el *M. tuberculosis* (Senthilkumar *et al.* 2009). Se ha observado que diferentes grados de sustitución y lipofilidad a nivel de N₁ y C₇ del núcleo de las fluoroquinolonas modifica la actividad antimicrobiana del compuesto (Senthilkumar *et al.* 2009). Por otro lado, un derivado de las quinolonas, el 3-metil-9-substituido-6-oxo-6,9-dihidro-3H-[1,2,3]-

triazolo[4,5-h]-7-carboxílico quinolona ha mostrado actividad contra cepas MDR de *M. tuberculosis* y al no haber sido asociado con citotoxicidad, actualmente se están llevando a cabo estudios *in vivo* (Carta *et al.*, 2007).

Teniendo en cuenta lo anteriormente mencionado, en este trabajo se evaluaron compuestos en cuya estructura está presente el anillo de la quinolona pero fusionado a un anillo benzoazepínico, siendo éste un nuevo sistema tetracíclico de la quinolina no reportado aún en la literatura.

3.7.2 Sustancias de origen vegetal

3.7.2.1 Aceites esenciales (AEs)

Los AEs son una mezcla compleja de componentes volátiles, provenientes de diversas partes de plantas como hojas, flores, semillas, raíces, tallos y cortezas. Se producen como metabolitos secundarios en respuesta a varios propósitos fisiológicos de la planta como protección contra plagas, atracción de insectos y aves polinizadoras, fotoprotección y alelopatía. Sus constituyentes son predominantemente de naturaleza terpenoide, aunque también pueden encontrarse ésteres, alcoholes, aldehídos, cetonas y derivados bencénicos entre otros, cuya proporción puede variar en función de diversos factores como las condiciones geobotánicas del medio (clima, altitud, tipo de suelo, cantidad de lluvias), método de cultivo (abono, fertilizantes y otros químicos empleados), época de recolección, edad de la planta y la parte de la cual son extraídos, así como la técnica de extracción utilizada (Leyva *et al.*, 2007; United Nations Industrial Development Organization, 2005; Wei y Shibamoto, 2009; Bandoni, 2000; Stashenko y Combariza, 1998). Se habla de componentes mayoritarios de la esencia, cuando están presentes en una proporción superior al 0.5 al 1% y de componentes minoritarios, cuando están en una proporción menor a dicho rango.

Generalmente, las esencias contienen un mayor número de compuestos minoritarios con respecto a los mayoritarios y en muchos casos son éstos los que determinan sus características organolépticas, así como sus propiedades biológicas (Bandoni, 2000).

Diversos métodos de expresión o técnicas destilativas pueden ser utilizados para la obtención de los AEs. Dentro de las técnicas destilativas se encuentra la hidrodestilación asistida por la radiación de microondas (MWHD), que se lleva a cabo utilizando un equipo de destilación y calentamiento por radiación de microondas. La figura 1 muestra diversos AEs extraídos mediante MWHD. El proceso de calentamiento genera el vapor de agua requerido para la liberación, arrastre y condensación de los AEs. Ésta técnica es práctica, rápida y no afecta la naturaleza química de la sustancia extraída (Stashenko y Combariza, 1998; Stashenko, 2010).

Figura 1: Diversos AEs extraídos mediante MWHD (Fuente *Mycobacterium*: Laboratorio de Investigación y Extensión)



Debido a su heterogeneidad química, los AEs presentan una amplia gama de propiedades biológicas y químicas, lo que ha permitido su aprovechamiento en diversas industrias como aromatizantes y saborizantes, en preparados farmacéuticos, en la fabricación de perfumes, cosméticos, desodorantes, lociones, desinfectantes, antisépticos, jabones líquidos, cremas dentales y plaguicidas, entre otros (Stashenko y Combariza, 1998). Varias características de los AEs

apoyan su uso a nivel farmacológico, dentro de ellas su volatilidad, que hace posible su uso en nebulizaciones e inhalaciones; su lipofilidad y el bajo peso molecular de sus componentes, que conllevan a su fácil penetración a través de la piel pudiendo ser usados en preparaciones dermatológicas; sus características sensoriales de olor y sabor que facilitan su prescripción sobretodo en niños y en muchos casos su baja toxicidad, la cual permite un amplio margen de seguridad para determinar su dosificación adecuada (Bandoni, 2000). El potencial sinérgico entre AEs y medicamentos constituye otro aspecto importante de su aplicación médica. Su uso en terapia antimicrobiana, está dado por el beneficio que puede obtenerse al disminuir las CMI de los fármacos administrados, así como el efecto protector contra la toxicidad generada por los medicamentos y la prevención del desarrollo de resistencias (Fadli *et al.*, 2011; Fadli *et al.*, 2012).

El mecanismo de acción sobre los microorganismos no se ha demostrado completamente pero se ha asociado con la desorganización y ruptura de la membrana celular y la inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos. En función de su naturaleza química, se reconoce que la acción de dichos fitocompuestos depende de su carácter hidrofílico o lipofílico. Su contenido terpenoide se asocia con inhibición de la actividad o la producción de proteínas y enzimas membranales, afectando procesos como la respiración celular. Algunos componentes fenólicos como el carvacrol y el timol causan ruptura de los lipopolisacáridos de la membrana externa bacteriana causando su desintegración parcial. Otros componentes, pueden actuar como desacopladores que interfieren con la translocación de protones durante el proceso de fosforilación del ADP (Ramos Mendonça-Filho, 2006). A su vez la acción de los AEs también depende del microorganismo bajo estudio y de la estructura de su pared celular y la disposición de su membrana externa. En bacterias Gram negativas como *Pseudomonas aeruginosas* se ha visto una resistencia intrínseca a algunos AEs debido a la superficie hidrofílica de su membrana externa rica en lipopolisacáridos, la cual le actúa como una barrera de permeabilidad contra agentes tóxicos. En

algunos hongos y bacterias Gram positivas, que presentan membranas celulares ricas en ácidos grasos insaturados, la interacción con los AEs puede ocasionar reordenamientos de los componentes de membrana resultando en pérdida de viabilidad celular y lisis (Kalemba y Kunicka 2003). Adicionalmente, se ha visto la acción de algunos AEs sobre la expresión de genes de virulencia, como el caso de los AE de *Perilla frutescens* y *Origanum vulgare* L. que mostraron afectar la producción de exotoxinas y endotoxinas estafilocócicas a concentraciones subinhibitorias (Qiu *et al.*, 2011; DeSouza *et al.*, 2010).

Aunque el efecto antimicrobiano de los AEs ha sido ampliamente estudiado, demostrándose su bioactividad sobre virus, parásitos, bacterias y hongos (Pauli y schilcher, 2009), son pocos los datos disponibles acerca de su actividad antimicobacteriana y anti *M. tuberculosis*. Esto constituye una importante evidencia de la necesidad de explorar este campo con el fin de obtener información relevante sobre nuevos compuestos promisorios que pudieran continuar con el proceso de descubrimiento y desarrollo de nuevos agentes anti-TB.

En un estudio reportado en 1988, diferentes muestras de AEs de flores de *Lavandula angustifolia* Mill. x *Lavandula latifolia* (L.f.) *Medicus* recolectadas durante los años 1982 a 1985 y procedentes de Valensole, Francia, fueron evaluadas contra las micobacterias no tuberculosas, *M. chelonae* (81 0192), *M. fortuitum* (HB 1792), *M. kansasii* (HB 4962), *M. marinum* (ATCC 927) y *M. scrofulaceum* (HB 1565) utilizando el método de difusión en agar con el uso de sensidiscos. Todas las muestras presentaron actividad contra los microorganismos probados. Sin embargo, aunque existieron diferencias de actividad entre los AEs recolectados en diferentes épocas, estas no son discutidas (Gabbrielli *et al.*, 1988).

Los AEs registrados por la Farmacopea Europea incluyen aquellos obtenidos de anís, canela, cilantro, citronela, clavo, comino, eucalipto, hinojo amargo, lavanda, limón, matricaria, menta, naranja dulce, nuez moscada, romero y tomillo. Se ha reportado la actividad antimicobacteriana de estos AEs, con un rango de CMI de 125 a 3200 µg/mL evaluados por el método de dilución (Pauli y schilcher, 2009).

Se ha sugerido el potencial efecto bioactivo de algunos AEs de plantas Surafricanas, basados en su uso para tratar los síntomas de la TB; entre ellos los extraídos de *Foeniculum vulgare* Mill., *Senecio quinquelobus* (Thunb.) DC., *Pelargonium* spp. y *Psidium guajava* L. (McGaw *et al.*, 2008).

Los AEs de *Acorus calamus* L. (10 µg/mL), *Alpinia galanga* Willd (25 µg/mL), *Cannabis sativa* L. (0,1 mg/mL), *Chenopodium ambrosioides* L., *Hyssopus officinalis* L., *Melaleuca leucadendron* L. y *Piper betle* L. extraídos de plantas provenientes de la India, se reportaron con actividad anti *M. tuberculosis* y algunos son usados en etnomedicina para el tratamiento de TB, bronquitis, asma y otras afecciones pulmonares (Gautam *et al.*, 2007).

El AE de *Myrtus communis* utilizado para la producción de un licor tradicional italiano, es utilizado además en medicina tradicional como antioxidante, antibacteriano y antiséptico, así como para el tratamiento de padecimientos pulmonares. En un estudio realizado para investigar su efecto contra *M. tuberculosis* en el que se usaron las cepas H37Rv y H37Ra junto con aislamientos clínicos resistentes a una o más drogas anti TB, se evidenció un efecto inhibitor del crecimiento bacteriano a una CMI de 0,17% (v/v), aplicando el método de las proporciones múltiples. Algunos componentes individuales del AEs también fueron evaluados, entre ellos el limoneno, el 8-cineol y el α-pineno, sin embargo éstos no presentaron un mejor efecto que el aceite original (Zanetti *et al.* 2010).

En 2009, se publicó un estudio de la actividad de AEs de plantas aromáticas provenientes de diferentes departamentos de Colombia, evaluados contra *M. tuberculosis* H37Rv mediante ensayos de macrodilución *in vitro*. La tabla 1 presenta un resumen de los resultados obtenidos. Todas las muestras probadas fueron bioactivas dentro del rango de concentraciones probadas. Aquellos AEs obtenidos de *Achyrocline alata* y *Swinglea glutinosa* exhibieron una pronunciada actividad antimicobacteriana con CMI menores a 125 µg/ml. Posteriormente los ensayos para determinar la cinética de muerte bacteriana revelaron que su actividad se debía a un efecto bacteriostático. El mayor efecto antimicobacteriano del AE de *A. alata* fue correlacionado con su alto contenido de terpenoides (Bueno-Sánchez *et al.*, 2009^b).

Tabla 1. Actividad anti *M. tuberculosis* de AEs de plantas aromáticas Colombianas (Adaptada de Bueno-Sánchez *et al.* 2009)

Especie vegetal	Origen	CMI (µg / ml)
<i>Achyrocline alata</i>	Potosí, Nariño	62,5
<i>Swinglea glutinosa</i>	Bucaramanga, Santander	100
<i>Hyptis mutabilis</i>	Villavicencio, Meta	125
<i>Lippia origanoides</i>	Pedregal, Nariño	125
<i>Lippia alba</i>	Bucaramanga, Santander	130
<i>Piper bogotense</i>	Ipiales, Nariño	130
<i>Lippia origanoides</i>	Piedecuesta, Santander	160
<i>Lippia alba</i>	Venadillo, Tolima	200
<i>Cananga odorata</i>	Bucaramanga, Santander	300
<i>Lippia origanoides</i>	Los Santos, Santander	400
<i>Piper auritum</i>	Cali, Valle del Cauca	400

Posteriormente, otro estudio sobre la bioactividad de plantas colombianas, reportó que los AEs extraídos de *Salvia aratocensis*, *Turnera diffusa* y *Lippia americana* presentaron actividad contra las cepas de *M. tuberculosis* H37Rv (sensible), ATCC 35837 (resistente a EMB), ATCC 35838 (resistente a RIF), ATCC 35822 (resistente a INH) y ATCC 35820 (resistente a SM) a un rango de CMI entre 49,6 y 125 µg/ml. *S. aratocensis* presentó un efecto bactericida contra *M. tuberculosis*

H37Rv a una concentración equivalente al doble de su CMI en los ensayos de curvas de letalidad (Bueno-Sánchez *et al.*, 2011).

La actividad antimicobacteriana de los componentes mayoritarios de los AEs también ha sido documentada. Diversos terpenos han sido evaluados contra *M. tuberculosis* H37Rv, entre ellos los monoterpenos geranilgeraniol (CMI 1,56 µg/mL), acetato de geranilgeraniol (CMI 3,13 µg/mL), geraniol (CMI 64 µg/mL), citronelol (CMI 64 µg/mL), carvacrol y timol (CMI 125 µg/mL), nerol (CMI 128 µg/mL), α-Pineno (CMI 198,42 µg/mL) y mirceno (CMI 250 µg/mL); también el sesquiterpeno farnesol (CMI 8 µg/mL), el diterpeno 12-dimetilmulticaulino (CMI 0,46 µg/mL) y los triterpenos 6β-hidroxiculactona y ácido fusídico (CMI 4 µg/mL) (Bueno-Sánchez *et al.*, 2009^b; Cantrell *et al.*, 2001).

3.7.2.2 Extractos vegetales (EVs)

Diversos compuestos vegetales como lípidos, grasas, fotoquímicos y pigmentos entre otros, pueden ser extraídos de las plantas para ser utilizados en campos industriales como el agrícola, farmacéutico y cosmético (Burillo, *et al.* 2010).

Los métodos empleados para la obtención de dichos extractos son variados. Algunos se basan en la elección de un solvente apropiado en el que pueda ser extraído el compuesto deseado, como la hidrodestilación y la maceración mezclada con agua, alcohol o grasa caliente. La extracción con fluidos supercríticos (SFE) es una técnica que ha surgido con el objeto de disminuir el tiempo de extracción y el consumo de solvente, aumentar el rendimiento de extracción y mejorar la calidad del extracto. La figura 2 muestra algunos EVs obtenidos mediante SFE. Está basada en el uso de un fluido en estado supercrítico (CO₂) que circula a través de una cámara de acero inoxidable, permitiendo separar diversos componentes del material vegetal. Posteriormente el

solvente es eliminado y de esta manera se obtiene un extracto de fragancia más intensa, libre de solvente y presumiblemente sin cambios químicos en sus componentes (Stashenko *et al.* 2003; Reyes y Porras 2007).

Figura 2: Algunos EVs obtenidos mediante SFE. (Fuente *Mycobacterium*: Laboratorio de Investigación y Extensión)



La actividad antibacteriana de los EVs es ha sido ampliamente documentada. Su mecanismo de acción se ha asociado con granulación del citoplasma, ruptura de la membrana citoplasmática e inactivación o inhibición de la síntesis de enzimas tanto intracelulares como extracelulares (Cowan, 1999; Henie *et al.* 2009).

Numerosos EVs han sido probados contra el género *Mycobacterium*. Se han reportado extractos de *Acorus calamus*, *Adhatoda vasica*, *Allium sativum*, *Alpinia galanga*, *Artocarpus lakoocha*, *Caesalpinia pulcherrima*, *Calotropis gigantea*, *Canscora decussata*, *Cinnamomum camphora*, *Cissampelos pareira*, *Citrullus colocynthis*, *Erythrina variegata*, *Glycyrrhiza glabra*, *Inula racemosa*, *Juniperus excelsa*, *Morinda citrifolia*, *Ocimum sanctum*, *Piper cubeba*, *Plantago major*, *Portulaca oleracea*, *Psoralea corylifolia*, *Sassurea lappa*, *Solanum dulcamara*, *Tinospora cordifolia*, *Zingiber officinale* recolectadas de los trópicos y los Alpes del Himalaya en India, con actividad antimicobacteriana a CMI entre 10 y 100 µg/mL (Gautam *et al* 2007).

Adicionalmente, el estudio de plantas surafricanas utilizadas en medicina tradicional, ha mostrado que cerca de 180 de ellas se utilizan para tratar los síntomas relacionados con la TB y algunas han sido probadas contra *M. tuberculosis*. Como ejemplo están los extractos acetónicos de *Chenopodium ambrosioides* L. (CMI 0.1 mg/mL); los extractos etanólicos de *Galenia africana* L. (CMI = 1.2 mg/mL) y los extractos acuosos de *Senecio serratuloides* DC. var. *Serratuloides* (CMI 5 mg/mL) (McGaw *et al.* 2008).

El estudio de *Crinum glaucum*, *Treculia africana*, *Erythrina mildbaedi*, *Ficus thonningii* y *Xylopiis aethiopica* crecidas en Nigeria y usadas por los herboristas locales, cuyos extractos etanólicos y acuosos fueron probados contra la cepa de referencia de *M. tuberculosis* H37RV(ATCC 27294) y una cepa de *M. tuberculosis* aislada localmente, mostró que el microorganismo era resistente a las concentraciones probadas y por tanto el uso clínico de estas plantas para el tratamiento de pacientes con TB no era recomendable (Anochie *et al.* 2011).

Varias especies vegetales colombianas también han sido reportadas con actividad antimicobacteriana. En un estudio en el que se investigaron los extractos y fracciones de los extractos obtenidos de *Virola* sp., *V. peruviana*, *V. sebifera*, *V. flexuosa*, *V. calophylla*, *Iryanthera* sp., *I. laevis*; *Piper* sp., *P. peltatum*, *P. hispidum*, *P. auriculatum*, *P. jericense*; *Dugandiodendron* sp. y *Persea americana* contra *M. tuberculosis* H37Rv a la concentración de 128 µg/mL, se determinó que aquellos de *V. flexuosa*, *Piper* sp. Y *P. hispidum* podrían ser considerados como promisorios, al presentar porcentajes de inhibición de la proliferación bacteriana superiores a 90 (Baquero *et al.* 2007). A su vez el clorhidrato de 3-metil nordomesticina, un compuesto alcaloide extraído de la planta *Ocotea macrophylla* crecida en Colombia, mostró inhibir la enzima ATP dependiente MurE ligasa de *M. tuberculosis*, la cual participa en la vía de síntesis del peptidoglicano (Guzman *et al.* 2010).

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Determinar la actividad antimicobacteriana *in vitro* de AEs y EVs de plantas provenientes del departamento de Santander y moléculas sintéticas.

4.2 Objetivos específicos

- Implementar una metodología para la evaluación del efecto antimicobacteriano de las sustancias objeto de estudio mediante la aplicación de los protocolos de macrodilución y microdilución utilizando el método colorimétrico del 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolio bromuro (MTT).
- Determinar la actividad biológica de 14 AEs y 5 EVs de plantas provenientes del departamento de Santander y 15 moléculas sintéticas, frente a la cepa de referencia de *M. tuberculosis* H37Rv ATCC 27294.
- Evaluar el efecto bactericida de las sustancias consideradas como promisorias que presenten las CMI más bajas, mediante la realización de curvas de letalidad.

5. JUSTIFICACIÓN

La realización de este estudio se justifica en los siguientes aspectos:

- El gran número de casos de TB sensible y TB resistente a nivel mundial: 2011 fueron estimados cerca de 8.7 millones de casos nuevos de TB y un total de 1.4 millones de personas murieron a causa de la enfermedad. Se informaron alrededor de 630.000 casos de TB-MDR y se estimó que el 3.7% correspondían a casos nuevos y el 20% a casos previamente tratados. Adicionalmente la TB-XDR fue identificada en 84 países. El objetivo de hallar nuevos fármacos se fundamenta en la inminente necesidad de mejorar el esquema actual de manejo para prevenir el desarrollo de resistencias y tratar los casos de TB resistente ya existentes, además de proveer un tratamiento mucho más práctico, menos tóxico y que genere menos efectos secundarios con el fin de disminuir la tasa de abandono; al tiempo que sea menos costoso para que un mayor número de pacientes puedan acceder a él (World Health Organization, 2012; Coll, 2009).
- La falta de inclusión de nuevos fármacos anti TB desde hace 60 años: con el establecimiento del esquema estándar de tratamiento anti TB sobrevino una excesiva confianza en que la enfermedad podía ser controlada y erradicada por lo que las investigaciones pasaron a orientarse a las asociaciones entre fármacos, los tiempos de tratamiento y formas de administración que permitieran un manejo del paciente en un entorno extrahospitalario. Además, la apatía y la percepción de que tales agentes no generaran una rentabilidad considerable ha contribuido a que la investigación sobre nuevas

sustancias bioactivas no se lleven a cabo por parte de la industria farmacéutica causando el fin de la introducción de nuevos fármacos anti TB hasta el presente (Pavan *et al.*, 2012; Daniel, 2006; Pérez Cruz *et al.*, 2009).

- El número insuficiente de candidatos a fármacos anti TB que se encuentran en la fase clínica de estudio: alrededor de siete agentes son investigados actualmente para ser incluidos como medicamentos anti TB pero se cree que son pocos para el gran reto acerca del control y tratamiento de la enfermedad. Adicionalmente para algunos ya se han reportado cepas resistentes o se espera que aparezcan, por lo tanto continuar con la búsqueda de nuevos compuestos antituberculosos sigue siendo un desafío para el personal investigador en todo el mundo (TB Alliance, 2012; ElSahly *et al.*, 2011; Poissy *et al.*; 2010; VonGroll *et al.*, 2009; Showalter y Denny, 2008; Medecins Sans Frontieres, 2006; Ginsburg *et al.*, 2005).
- Las actuales políticas internacionales y nacionales que fomentan la investigación sobre nuevos medicamentos anti TB: uno de los aspectos clave de la estrategia Alto a la Tuberculosis lanzada por la OMS en 2006, fomenta el apoyo a la investigación sobre nuevos fármacos anti TB. Esta iniciativa ha sido establecida también por otras entidades internacionales como la OPS y la Alianza contra la Tuberculosis quienes en conjunto con los entes gubernamentales, la academia y la industria privada, actualmente llevan a cabo nuevos proyectos de investigación en terapia anti TB (World Health Organization, 2006^a; Organización Panamericana de la Salud, 2006; TB Alliance, 2012; Ministerio de la Protección Social República de Colombia, 2009; Showalter y Denny, 2008).

- La existencia de varias fuentes de compuestos bioactivos que pueden ser estudiadas en la búsqueda de nuevos agentes anti TB: los compuestos sintéticos y sustancias de origen natural constituyen un universo que aún no ha sido totalmente explorado para tal fin. Adicionalmente, ahondar en las propiedades bioactivas de diferentes compuestos naturales procedentes de nuestro departamento permitirá contribuir con la caracterización de su biodiversidad y proporcionará un mayor conocimiento acerca de sus usos potenciales aplicables a diferentes campos industriales. Varias razones apoyan la búsqueda de compuestos bioactivos de origen natural entre las cuales están su fácil obtención, su susceptibilidad para ser modificados y sintetizar compuestos potencialmente más activos y seguros que los actuales, así como el valor económico que representa su utilización y aprovechamiento no solo para la industria farmacéutica sino para diversas industrias como la química que puede aplicar los conocimientos generados de este estudio en la producción de diversas sustancias que controlen el crecimiento y multiplicación del microorganismo y puedan ser comercializadas en diferentes presentaciones como desinfectantes y detergentes entre otros (Bueno-Sánchez *et al.*, 2011^a, Bueno-Sánchez y Kouznetzov, 2010; Stashenko, 2010; Ajikumar *et al.*, 2008; Verpoorte *et al.*, 2006; Nakatsu *et al.*, 2000; Cowan, 1999).

6. DISEÑO METODOLÓGICO

Para el cumplimiento de los objetivos planteados, el desarrollo del trabajo experimental fue conducido en el *Mycobacterium*: Laboratorio de Investigación y Extensión, así como en el Laboratorio Central de Investigaciones del GIEM; ubicados en la Facultad de Salud de la Universidad Industrial de Santander, en Bucaramanga – Colombia.

6.1 CEPAS BACTERIANAS

Se emplearon las siguientes cepas de referencia procedentes de la colección de cultivos tipo americana (ATCC):

- Cepa objeto de estudio: *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (27294), como microorganismo sensible a todos los medicamentos empleados en el tratamiento actual de la tuberculosis.
- Cepas control: *Escherichia coli* (25922), como control de microorganismo Gram negativo y *Staphylococcus aureus* (25923), como control de microorganismo Gram positivo.

M. tuberculosis H37Rv fue mantenido en medio Lowestein-Jensen (LJ) (AnexoE). *E. coli* y *S. aureus* se cultivaron en agar Mueller Hinton (MHA) (*Difco Laboratories*) (Anexo E).

Los microorganismos control fueron utilizados para probar las sustancias consideradas como promisorias que obtuvieron las CMI más bajas en los ensayos de bioactividad frente a *M. tuberculosis*.

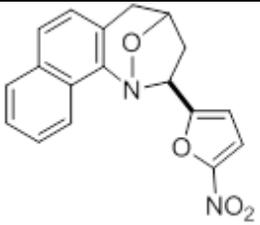
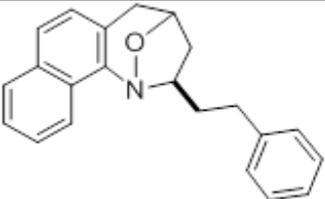
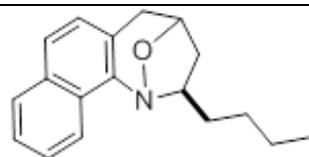
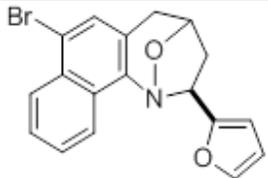
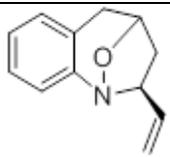
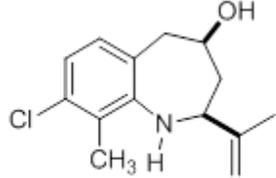
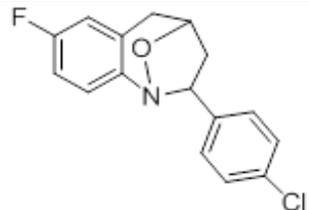
6.2 SUSTANCIAS DE PRUEBA

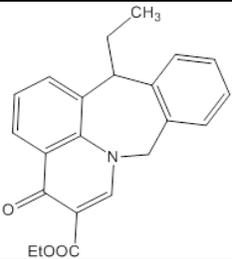
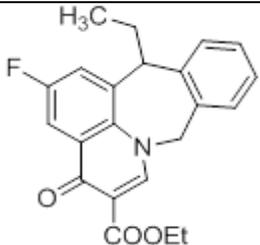
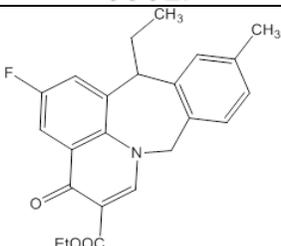
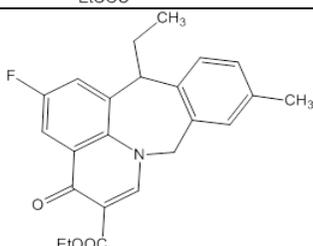
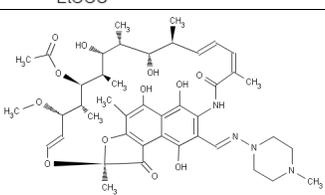
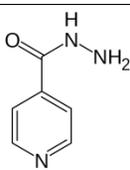
6.2.1 Moléculas sintéticas: criterio de selección, método de obtención y preparación de soluciones iniciales

Las moléculas objeto de estudio fueron seleccionadas de acuerdo a la actividad biológica reportada previamente (Palma *et al.*, 2009; Gómez Ayala *et al.* 2010); sin embargo cabe aclarar que no existen reportes previos de su efecto sobre el género *Mycobacterium*. Estos compuestos fueron sintetizados en el LSO de la UIS bajo la dirección del Doctor Alirio Palma. Se emplearon rutas sintéticas diseñadas específicamente para tales propósitos (Palma *et al.*, 2009). Los compuestos sintéticos utilizados en este estudio se detallan en la tabla 2.

Tabla 2. Moléculas sintéticas evaluadas en el estudio. Fuente LSO.

Grupo	Código LSO	Nombre	Estructura química
1. Derivados de las naftoazepinas	AF160	7-Bromo-2- <i>exo</i> -(2-clorofenil)-2,3,4,5-tetrahidro-1,4-epoxinafto[1,2- <i>b</i>]azepina	
	AF166	7-Bromo- <i>cis</i> -(2-clorofenil)-2,3,4,5-tetrahidro-1 <i>H</i> -nafto[1,2- <i>b</i>]azepin-4-ol	
	AF167	2- <i>exo</i> -(Furan-2-il)-2,3,4,5-tetrahidro-1,4-epoxinafto[1,2- <i>b</i>]azepina	
	AF171	2- <i>exo</i> -(3-Metiltiofen-2-il)-2,3,4,5-tetrahidro-1,4-epoxinafto[1,2- <i>b</i>]azepina	

	AF174	2- <i>exo</i> -(5-Nitrofuran-2-il)-2,3,4,5-tetrahidro-1,4-epoxinafto[1,2- <i>b</i>]azepina	
	AF190	2- <i>exo</i> -Fenil-2,3,4,5-tetrahidro-1,4-epoxinafto[1,2- <i>b</i>]azepina	
	AF194	2- <i>exo</i> -Butil-2,3,4,5-tetrahidro-1,4-epoxinafto[1,2- <i>b</i>]azepina	
	AF195	7-Bromo-2- <i>exo</i> -(furan-2-il)-2,3,4,5-tetrahidro-1,4-epoxinafto[1,2- <i>b</i>]azepina	
2. Derivados de las 1-benzoazepinas	LIA1D	2- <i>exo</i> -Vinil-2,3,4,5-tetrahidro-1,4-epoxibenzo[<i>b</i>]azepina	
	LIA4P	8-Cloro-9-metil- <i>cis</i> -2-(prop-1-en-2-il)-2,3,4,5-tetrahidro-1 <i>H</i> -benzo[<i>b</i>]azepin-4-ol	
	SAM99	7-Flúoro-2- <i>exo</i> -(4-clorofenil)-2,3,4,5-tetrahidro-1,4-epoxibenzo[<i>b</i>]azepina	

3. Derivados de las quinolonas	ES1D1	Etil 13-etil-4-oxo-8,13-dihidro-4H-benzo[5,6]azepino[3,2,1-ij]quinolina-5-carboxilato	
	ES2D1	Etil 13-etil-2-flúoro-4-oxo-8,13-dihidro-4H-benzo[5,6]azepino[3,2,1-ij]quinolina-5-carboxilato	
	ES2DB	Etil 13-etil-2-flúoro-11-metil-4-oxo-8,13-dihidro-4H-benzo[5,6]azepino[3,2,1-ij]quinolina-5-carboxilato	
	ES2DC	Etil 13-etil-2-flúoro-10-metil-4-oxo-8,13-dihidro-4H-benzo[5,6]azepino[3,2,1-ij]quinolina-5-carboxilato	
Medicamentos control		Rifampicina	
		Isoniacida	

Las soluciones iniciales de moléculas sintéticas fueron preparadas un día antes de la realización de los ensayos. Para esto se diluyeron 2mg de muestra en 100 μ L de DMSO (*Sigma-Aldrich*) para obtener una concentración de 20mg/mL, las cuales fueron almacenadas a 4°C.

6.2.2 Sustancias de origen natural: criterio de selección, clasificación taxonómica, método de obtención y preparación de soluciones iniciales

Las especies aromáticas a evaluar, fueron escogidas de acuerdo a sus características de crecimiento endémico en el departamento de Santander – Colombia y a la disponibilidad de sus productos en el CENIVAM, donde se realizaron los procedimientos de extracción.

La clasificación taxonómica fue realizada en el Herbario Nacional Colombiano del Instituto de Ciencias Naturales, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia (Bogotá).

La extracción de AEs se realizó mediante la técnica de MWHD, siguiendo las metodologías descritas por Stashenko *et al.* (1993).

Para la obtención de EVs se aplicó el proceso de extracción con SFE, siguiendo las metodologías descritas por Stashenko *et al.* (1996).

Los AEs y EVs utilizados en este estudio se detallan en las tablas 3 y 4.

Para el trabajo con AEs se tomaron alícuotas de 250 μ L para ser diluidas en igual volumen de DMSO. Las concentraciones de las soluciones madre dependieron del peso de cada aceite (Anexo F). Las soluciones iniciales de cada aceite se prepararon a partir de las soluciones madre a concentraciones de 20; 10; 5; 2,5 y 1,25 mg/mL. Las soluciones iniciales de los EVs se prepararon pesando 10 mg de muestra y diluyéndolos en 100 μ L de DMSO para lograr una concentración de 100 mg/mL. Las soluciones fueron almacenadas a 4°C

Tabla 3. AEs de plantas endémicas del departamento de Santander-Colombia incluidos en el estudio. Fuente CENIVAM.

Código de la muestra	Nombre científico	Nombre común	Lugar de colecta	Número de Voucher HNC*	Parte empleada
N° 1	<i>Tagetes lucida Cav.</i>	Anisillo	Bucaramanga, Santander	512074	Hojas + tallos
N° 2	<i>Cymbopogon citratus</i>	Limoncillo	Bucaramanga, Santander	519986	Hojas
N° 3	<i>Rosmarinus officinalis</i>	Romero	Sucre, Santander	555842	Hojas + tallos
N° 4	<i>Turnera diffusa</i>	Damiana	Los Santos, Santander	516293	Hojas + tallos
N° 5	<i>Cymbopogon flexuosus</i>	Limoncillo	Bucaramanga, Santander	Pendiente	Hojas
N° 6	<i>Lippia alba Mill</i>	Pronto alivio	Bucaramanga, Santander	480750	Hojas + tallos
N° 7	<i>Citrus scinensis Osbeck</i>	Naranja	Bucaramanga, Santander	Pendiente	Cáscara
N° 8	<i>Swinglea glutinosa</i>	Limón africano	Bucaramanga, Santander	521530	Frutos
N° 9	<i>Cananga odorata</i>	Ilang-ilang	Bucaramanga, Santander	531012	Flores
N° 10	<i>Eucaliptus citriodora Hook</i>	Eucalipto	Bucaramanga, Santander	Pendiente	Hojas
N° 20	<i>Lippia origanioides</i> Qto. Carvacrol	Orégano de monte	Socorro, Santander	512271	Hojas + tallos
N° 21	<i>Lippia origanioides</i> FD: 0252 Qto. Carvacrol	Orégano de monte	Piedecuesta, Santander	516290	Hojas + tallos
N° 22	<i>Lippia origanioides</i> FD: 0250 Qto. Carvacrol	Orégano de monte	Piedecuesta, Santander	516290	Hojas + tallos
N° 23	<i>Lippia origanioides</i> FD: 0251 Qto. Carvacrol	Orégano de monte	Piedecuesta, Santander	516290	Hojas + tallos

* HNC: Herbario Nacional Colombiano (COL)

Tabla 4. EVs de plantas endémicas del departamento de Santander-Colombia incluidos en el estudio. Fuente CENIVAM.

Código de la muestra	Nombre científico	Nombre común	Lugar de colecta	Número de Voucher HNC*	Parte empleada
N° 27	<i>Baccharis aff. buddleioides</i>	-	Sogamoso, Boyacá	517744	Hojas + tallos
N° 40	<i>Salvia officinalis</i>	Salvia	Sucre, Santander	555844	Hojas + tallos
N° 54	<i>Wedelia calycina</i>	Amarillo	Barichara, Santander	559439	Hojas + tallos
N° 55	<i>Nectranda reticulata</i>	Laurel	Charalá, Santander	560248	Hojas + tallos
N° 57	<i>Escallonia pendula</i>	Tibar	Curití, Santander	560238	Hojas + tallos
N° 58	<i>Lippia origanoides</i>	Orégano de monte	Umpalá, Santander	560267	Hojas + tallos

* HNC: Herbario Nacional Colombiano (COL)

6.3 MEDICAMENTOS CONTROL: criterio de selección y preparación de soluciones iniciales

Se incluyeron medicamentos para los cuales las cepas utilizadas presentarían sensibilidad. RIF e INH (*Sigma-Aldrich*) se usaron como controles positivos para los ensayos de bioactividad frente a *M. tuberculosis* y Gentamicina (GNT) (*Invitrogen*) como control positivo para los ensayos frente a *E.coli* y *S.aureus*.

RIF e INH fueron preparadas a 1mg/mL, mientras que GNT se preparó a 0,1 mg/mL. Se utilizó agua destilada estéril como diluyente para INH y GNT y una mezcla de metanol y agua destilada estéril como diluyente para RIF. Las soluciones se esterilizaron por filtración utilizando filtros de membrana con poro de 0,22 µm y luego se almacenaron en alícuotas a -20°C (Anexo E).

6.4 INDICADOR DE CRECIMIENTO: preparación de soluciones iniciales

Soluciones de MTT en Tween 80 y PBS fueron utilizadas como indicador de crecimiento bacteriano para el revelado de las pruebas de bioactividad frente a *M. tuberculosis* y *E. coli* y *S. aureus*, respectivamente.

La solución inicial de MTT (*Sigma-Aldrich*) fue preparada a pesando de 5 mg/mL en agua destilada estéril y posteriormente se esterilizó por filtración almacenándose protegida de la luz (Anexo E).

Para los ensayos frente a *M. tuberculosis* fue utilizada una solución inicial de Tween 80 (*Merck*) al 20% en agua destilada estéril (Anexo E).

Para los ensayos frente a *E. coli* y *S. aureus* se usó una solución inicial de PBS 10x (Anexo E).

Todas las soluciones iniciales se almacenaron a 4°C.

6.5 MEDIOS DE CULTIVO

Para las pruebas de bioactividad frente a *M. tuberculosis* se empleó el medio Middlebrook 7H9 (Difco Laboratories), suplementado con 10% de OADC (ácido oleico-albúmina-dextrosa-catalasa) (Difco Laboratories) (Anexo E). Los ensayos conducidos contra *E.coli* y *S.aureus* se realizaron utilizando caldo Mueller Hinton (MHB) (Baltimore Biological Laboratory, BBL) (Anexo E). En las curvas de letalidad se usó medio de cultivo LJ (Baltimore Biological Laboratory, BBL).

6.6 IMPLMETACIÓN DE LA METODOLOGÍA COLORIMÉTRICA DEL MTT PARA EL ALCANCE DEL OBJETIVO ESPECÍFICO NÚMERO 1.

La actividad antimicobacteriana fue evaluada teniendo como referencia las metodologías recomendadas por Abate *et al.* (1998) y Palomino *et al.* (2002); con las modificaciones propuestas por Bueno Sánchez *et al.* (2009). La metodología colorimétrica de MTT fue implementada y adaptada a las condiciones medioambientales de Bucaramanga y del *Mycobacterium*: Laboratorio de Investigación y Extensión, para los ensayos de microdilución en placa y macrodilución en tubo, a ser utilizados en la determinación de la bioactividad de sustancias de origen natural y sintético contra las cepas objeto de estudio. Los reactivos utilizados en la preparación de soluciones iniciales y los protocolos finales paso a paso para implementar la metodología se detallan en el anexo E.

6.7 ENSAYOS DE BIOACTIVIDAD DE MOLÉCULAS SINTÉTICAS, EXTRACTOS VEGETALES Y ACEITES ESENCIALES PARA EL ALCANCE DEL OBJETIVO ESPECÍFICO NÚMERO 2.

6.7.1 Ensayos de bioactividad frente a *Mycobacterium tuberculosis*

6.7.1.1 Obtención del inóculo

En frasco de vidrio estéril de 25 mL con 8 perlas de vidrio, marcado, tapado y previamente pesado ($P1$); se depositó la masa bacilar obtenida con espátula de madera estéril a partir de un cultivo bacteriano con 15-28 días de incubación y se estableció la diferencia entre el peso inicial y el peso final ($P2$) para determinar el peso de masa bacilar ($P3$) ($P3 = P2 - P1$). Para homogenizar la biomasa, se realizó una agitación inicial en seco utilizando un agitador mecánico durante 30 segundos. Con el fin de conseguir una suspensión bacteriana de 1mg/mL,

correspondiente al tubo N°1 del estándar de McFarland (3×10^8 ufc/mL), se adiciono un volumen en mL de agua destilada estéril igual al peso de la masa bacilar; por ejemplo 10 mL para P3= 10 mg. Se agitó nuevamente mecánicamente durante 60 segundos para lograr una suspensión homogénea. Seguidamente se realizó una dilución 1:10 con medio de cultivo líquido Middlebrook 7H9 + OADC 10%, la cual fue utilizada como inóculo de trabajo. Adicionalmente se preparó una solución bacilar correspondiente al 1% del inóculo de trabajo, usada como uno de los controles de crecimiento.

6.7.1.2 Preparación de soluciones de trabajo

A partir de las soluciones iniciales de cada una de las muestras se realizaron diluciones en medio de cultivo líquido Middlebrook 7H9 + OADC 10%, para lograr las concentraciones de trabajo requeridas en cada ensayo particular las cuales se detallan en tablas 5, 6 7. En todas las pruebas se incluyo un control con DMSO, cuya solución de trabajo fue preparada a partir del compuesto puro (98%) diluido de la misma forma y a la concentración más alta a la que se iban a probar las muestras. Una vez preparadas, las soluciones se esterilizaron por filtración.

Las concentraciones evaluadas correspondieron a la mitad de las concentraciones de trabajo. Aquellas soluciones marcadas con (*) fueron soluciones intermedias requeridas para preparar las soluciones de trabajo pero no se usaron en los ensayos contra *M. tuberculosis*. Las soluciones de trabajo se esterilizaron por filtración.

Tabla 5. Preparación de soluciones de trabajo para la evaluación de moléculas sintéticas contra *M. tuberculosis*.

Nombre y concentración de la solución de trabajo a preparar	Volumen y concentración de sustancia	Volumen de diluyente
RIF [100 µg/mL]*	100 µL RIF [1mg/mL]	900 µL medio M7H9+OADC
RIF [4 µg/mL]	100 µL RIF [100 µg/mL]	2400 µL medio M7H9+OADC
INH [100 µg/mL]*	100 µL RIF [1mg/mL]	900 µL medio M7H9+OADC
INH [2 µg/mL]	50 µL RIF [100 µg/mL]	2450 µL medio M7H9+OADC
Fase 1: Molécula [200 µg/mL]	10 µL Molécula [20000 µg/mL]	990 µL medio M7H9+OADC
Fase 1: Molécula [20 µg/mL]	100 µL Molécula [200 µg/mL]	990 µL medio M7H9+OADC
Fase 1: Molécula [2 µg/mL]	100 µL Molécula [20 µg/mL]	990 µL medio M7H9+OADC
Fase 1: Molécula [0,2 µg/mL]	100 µL Molécula [2 µg/mL]	990 µL medio M7H9+OADC
Fase 2: Molécula [128 µg/mL]	6,7 µL Molécula [20000 µg/mL]	993,6 µL medio M7H9+OADC
DMSO Fase 1	10 µL DMSO	990 µL medio M7H9+OADC
DMSO Fase 2	6,7 µL DMSO	993,6 µL medio M7H9+OADC

Tabla 6. Preparación de soluciones de trabajo para la evaluación de AEs contra *M. tuberculosis*.

Nombre y concentración de la solución de trabajo a preparar	Volumen y concentración de sustancia	Volumen de diluyente
RIF [10 µg/mL]*	10 µL RIF [1mg/mL]	990 µL medio M7H9+OADC
RIF [0,5 µg/mL]	150 µL RIF [10 µg/mL]	2850 µL medio M7H9+OADC
INH [10 µg/mL]*	10 µL INH [1mg/mL]	990 µL medio M7H9+OADC
INH [0,25 µg/mL]	75 µL INH [10 µg/mL]	2925 µL medio M7H9+OADC
AE [1000 µg/mL]	200 µL Aceite [20 mg/mL]	3800 µL medio M7H9+OADC

AE [500 µg/mL]	200 µL Aceite [10 mg/mL]	3800 µL medio M7H9+OADC
AE [250 µg/mL]	200 µL Aceite [5 mg/mL]	3800 µL medio M7H9+OADC
AE [125 µg/mL]	200 µL Aceite [2,5 mg/mL]	3800 µL medio M7H9+OADC
AE [62,5 µg/mL]	200 µL Aceite [1,25 mg/mL]	3800 µL medio M7H9+OADC
DMSO	200 µL DMSO	3800 µL medio M7H9+OADC

Tabla 7. Preparación de soluciones de trabajo para la evaluación de EVs contra *M. tuberculosis*.

Nombre y concentración de la solución de trabajo a preparar	Volumen y concentración de sustancia	Volumen de diluyente
RIF [10 µg/mL]*	10 µL RIF [1mg/mL]	990 µL medio M7H9+OADC
RIF [0,5 µg/mL]	150 µL RIF [10 µg/mL]	2850 µL medio M7H9+OADC
INH [10 µg/mL]*	10 µL INH [1mg/mL]	990 µL medio M7H9+OADC
INH [0,25 µg/mL]	75 µL INH [10 µg/mL]	2925 µL medio M7H9+OADC
EV [4000 µg/mL]	100 µL Extracto [100 mg/mL]	2400 µL medio M7H9+OADC
DMSO	100 µL DMSO	2400 µL medio M7H9+OADC

La preparación de la solución de trabajo de MTT se realizó en el momento del revelado del ensayo, mezclando un volumen de solución inicial de MTT + 1,2 volúmenes de solución inicial de tween 80 al 20%. Posteriormente se esterilizó por filtración utilizando membranas de 0,22 µm.

6.7.1.3 Montaje del ensayo de microdilución en placa para evaluación de moléculas sintéticas

Para los experimentos se utilizaron placas de poliestireno de 96 pozos de fondo plano y con tapa, estériles.

La fase inicial fue conducida para determinar la bioactividad de cada molécula a concentraciones de 100, 10, 1 y 0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. La distribución de las muestras y controles se realizó como se muestra en la figura 3. Inicialmente se añadieron 100 μL de medio M7H9+OADC en B10, C10, D10 y E10 así como en B11, C11 y D11 y 200 μL en E11, F11 y G11, estos últimos fueron considerados como controles de esterilidad del medio de cultivo. Luego cada pozo correspondiente a las muestras fue adicionado con 100 μL de solución de la solución de trabajo respectiva. Ejemplo: compuesto 1 de [200 $\mu\text{g}/\text{mL}$] en B2, C2 y D2; compuesto 1 de [20 $\mu\text{g}/\text{mL}$] en B3, C3 y D3; compuesto 1 de [2 $\mu\text{g}/\text{mL}$] en B4, C4 y D4; compuesto 1 de [0,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$] en B5, C5 y D5. Para los pozos control de medicamento, 100 μL de solución de trabajo de INH fueron dispensados en el pozo B10 y 100 μL de solución de trabajo de RIF en el pozo B11. Seguidamente se realizaron diluciones seriadas de 2 hasta el pozo D10 y D11 respectivamente. Se desecharon los 100 μL finales. Las concentraciones evaluadas para la INH fueron 0.5; 0.25 y 0,125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y las de RIF fueron 1; 0.5 y 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$. El G10 fue utilizado como control con DMSO, al cual se le añadieron 100 μL de la solución de trabajo de la sustancia. Finalmente se agregaron 100 μL de inóculo de trabajo en todos los pozos, excepto en los de la periferia y en E11, F11 y G11 y en F10. En el pozo F10 fueron adicionados 200 μL de inóculo bacteriano del 1% de concentración. Los pozos de la periferia de la placa se llenaron con 200 μL de agua destilada estéril.

Figura 3. Distribución de muestras y controles para la primera fase de evaluación de la bioactividad moléculas sintéticas frente a *M. tuberculosis*.

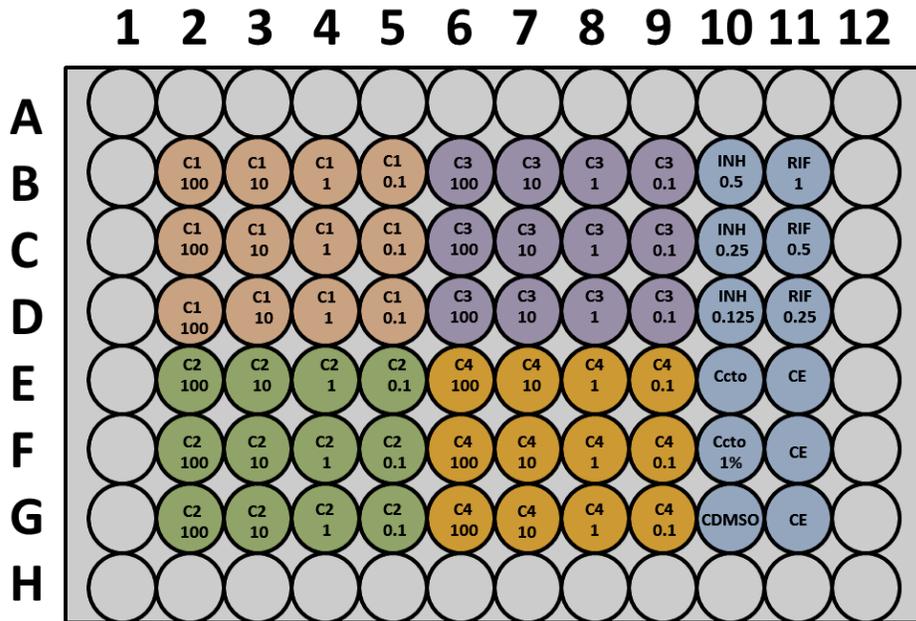
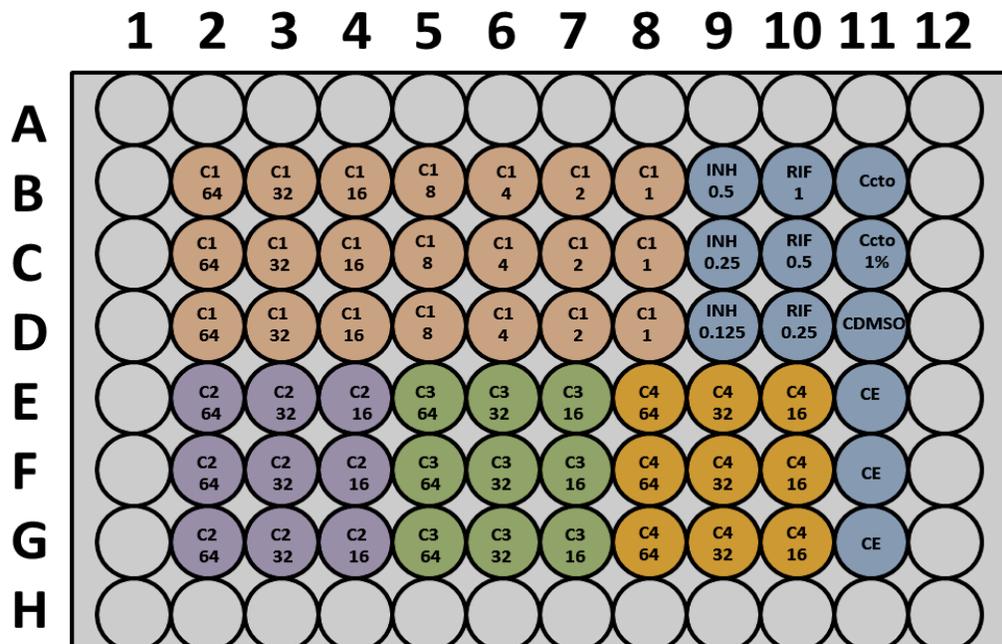


Figura 4. Distribución de muestras y controles para la segunda fase de evaluación de la bioactividad moléculas sintéticas frente a *M. tuberculosis*.



Las moléculas que en la primera fase presentaron bioactividad menor o igual 100 µg/mL, se evaluaron nuevamente a 64, 32, 16, 8, 4, 2 y 1 µg/mL

En la figura 4 se observa la distribución de las muestras y controles en la placa. Inicialmente, se adicionaron 100µL de medio de cultivo líquido M7H9+OADC en las columnas 3, 4, 6, 7, 9 y 10, desde B hasta G, así como en B5, C5 y D5 y B8, C8, D8, B11 y 200µL en E11, F11 y G11. Luego se dispensaron 200µL de solución de trabajo del compuesto 1 en los pozos B2, C2 y D2, 200 µL de solución de trabajo del compuesto 2 en E2, F2 y G2, 200µL de solución de trabajo del compuesto 3 en E5, F5 y G5 y 200µL de solución de trabajo del compuesto 4 en E8, F8 y G8; de los cuales se tomaron 100 µL para realizar diluciones seriadas de 2 en los pozos correspondientes a cada compuesto. Se desecharon los 100 µL finales. Para el montaje de los pozos control de medicamentos se dispensaron 100µL de solución de trabajo de INH en el pozo B9 y 100 µL de solución de trabajo de RIF en el pozo B10. Seguidamente se realizaron diluciones seriadas de 2 hasta el pozo D9 y D10 respectivamente y se desecharon los 100µL finales. Las concentraciones evaluadas para la INH y RIF fueron las mismas que en la fase inicial. El pozo D11 fue utilizado como control con DMSO al cual se adicionó 100µL de solución de trabajo de la sustancia. Finalmente se agregaron 100µL de inóculo de trabajo en todos los pozos, excepto en los de la periferia y en C11. En C11 se adicionaron 200µL de solución bacilar del 1% de concentración. Los pozos de la periferia se llenaron con 200 µL de agua destilada estéril.

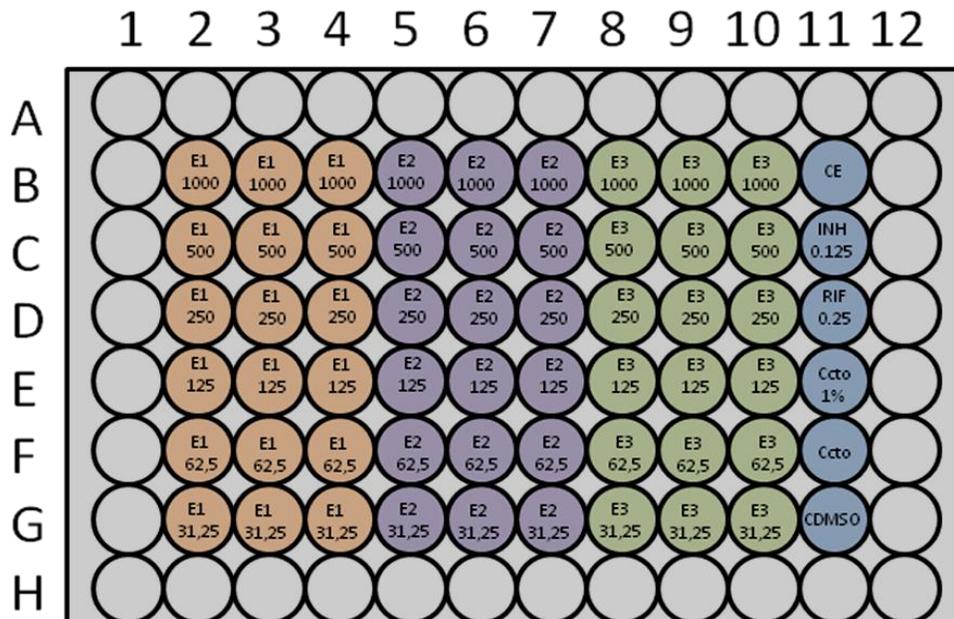
6.7.1.4 Montaje del ensayo de microdilución en placa para evaluación de extractos vegetales

Se utilizaron placas con las mismas especificaciones que las descritas en 6.7.1.3.

En principio, se depositaron 200µL de medio M7H9+OADC en B11 y 100µL en todas las columnas desde 2 hasta 10, desde B hasta G y en C11, D11 y F11.

Posteriormente se adicionaron 100µL de solución de trabajo del extracto 1 en B2, B3 y B4; 100µL de solución de trabajo del extracto 2 en B5, B6 y B7 y 100µL de solución de trabajo del extracto 3 en B8, B9 y B10 y se realizaron diluciones seriadas de 2 de cada extracto desde B hasta G y se descartaron los 100µL finales. Se adicionaron 100µL de solución de trabajo de INH de 0.5µg/mL en C11, 100µL de solución de trabajo de RIF de 1µg/mL en D11 y 100µL de solución de trabajo de DMSO en G11. Luego se adicionaron 100µL de inóculo bacteriano en todos los pozos, pero no en B11 ni E11. Posteriormente se adicionaron 200µL de inóculo bacteriano del 1% de concentración en E11. Finalmente se adicionaron 200µL de agua destilada en los pozos de la periferia. La distribución de las muestras y los controles re realizó como se muestra en la figura 5.

Figura 5. Distribución de muestras y controles para la evaluación de la bioactividad de EVs frente a *M. tuberculosis*.

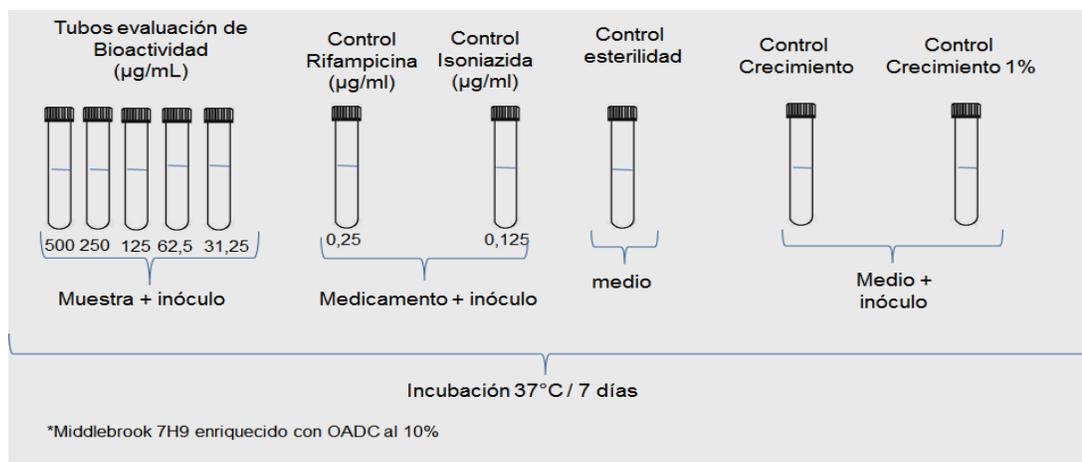


6.7.1.5 Montaje del ensayo de macrodilución en tubo para evaluación de aceites esenciales

Los experimentos fueron realizados utilizando tubos de vidrio 13X100mm con tapa rosca.

Se dispuso de 5 tubos para evaluar cada uno de los aceites y en cada tubo se dispensó 1mL de solución de trabajo de la muestra. Dos tubos fueron utilizados para el control de medicamentos a los cuales se les adicionó 1mL de solución de trabajo de INH 0.25µg/mL de y 1mL de solución de trabajo de RIF de 0,5 µg/mL, respectivamente. Otro tubo se tomó como control de DMSO, en el cual se agregó 1mL de solución de trabajo de la sustancia. Seguidamente se adicionó 1mL de inóculo de trabajo en cada tubo. Adicionalmente se preparó un tubo con 2mL de medio M7H9+OADC el cual fue utilizado como control de esterilidad; un tubo con 1mL de medio M7H9+OADC y 1mL de inóculo de trabajo, que fue utilizado como control de crecimiento y uno con 1.98mL medio M7H9+OADC y 0,02mL de inóculo de trabajo, que correspondió al control de crecimiento del 1%. Una representación del esquema de montaje es mostrado en la figura 6.

Figura 6. Esquema de montaje del ensayo de macrodilución en tubo para la evaluación de la bioactividad de AEs frente a *M. tuberculosis*.



6.7.1.6 Condiciones de incubación del ensayo

Las placas de todos los ensayos de microdilución se incubaron tapadas y dentro del empaque original, en cámara húmeda con gasas estériles impregnadas con agua destilada estéril. Tanto los ensayos en microplaca como los ensayos en tubo fueron incubados durante 7 días a 37 °C. Cada muestra fue evaluada por triplicado y se realizaron 3 réplicas del ensayo en tres días diferentes.

6.7.1.7 Revelado de los ensayos

Concluido el tiempo del ensayo de bioactividad se procedió a realizar el revelado de los ensayos. Para los ensayos en microplaca, se dispensaron 22 μ L de solución de trabajo de MTT en cada pozo, excepto en los de la periferia. Para los ensayos de macrodilución se añadieron 220 μ L a cada tubo. Luego se procedió a una nueva incubación de 24 horas a 37°C.

6.7.1.8 Lectura e interpretación de resultados

Pasado el tiempo de revelado, se realizó la confirmación visual del color. El cambio de color de amarillo a violeta indicó la viabilidad de la bacteria. La CMI fue definida como la menor concentración de la muestra donde no hubo cambio de color. Se interpretó como No Bioactiva aquella muestra en la que todos los pozos o tubos de ensayo tuvieron un color violeta y como Bioactiva aquella en la que al menos a una concentración se mantuvo el color amarillo (Ver figura 8).

6.7.1.9 Criterio de actividad

De acuerdo a lo reportado en la literatura, se consideraron promisorias aquellas moléculas sintéticas con CMI $\leq 10\mu\text{g/mL}$ o su equivalente molar y las sustancias de origen vegetal con CMI $< 100 \mu\text{g/mL}$ (Pavan *et al.* 2012; Bueno-Sánchez y Kouznetsov, 2010)

De acuerdo a los datos de bioactividad obtenidos de los ensayos con moléculas sintéticas, AEs y EVs se pudo definir cuales sustancias podían ser consideradas como promisorias. Cinco muestras de AEs fueron consideradas para este proceso ya que obtuvieron CMI $< 100 \mu\text{g/mL}$; estas correspondieron a *E. citriodora* Hook, *C. flexuosus*, *C. citratus*, *T. diffusa* y *L. organoides* (N°20).

E. citriodora Hook, *C. flexuosus*, *C. citratus*, *T. diffusa* fueron evaluados contra los microorganismos control *E. coli* y *S. aureus* y se determinó su efecto bactericida o bacteriostático frente a *M. tuberculosis* mediante la realización de curvas de letalidad.

6.7.2 Ensayos de bioactividad de frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*

La realización de estos ensayos se condujo siguiendo las indicaciones de las guías M26-A, M07-A8 del y M100_S21 del NCCLS - CLSI.

6.7.2.1 Obtención del inóculo

A partir de cultivos puros de cada uno de los microorganismos en MHA con 16 a 24 horas de crecimiento, se tomaron entre 5 y 30 colonias que fueron luego inoculadas en 5mL de MHB usando una temperatura de 35°C. Los caldos fueron incubados a 35°C hasta lograr una turbidez comparable visualmente con el tubo

Nº 0.5 del estándar de McFarland ($1-2 \times 10^8$ ufc/mL). Cuando fue necesario ajustar la turbidez, se utilizó caldo estéril a la misma temperatura. Posteriormente se realizó una dilución 1:150 para conseguir una concentración de 1×10^6 ufc/mL, la cual fue utilizada como inóculo de trabajo.

6.7.2.2 Preparación de soluciones de trabajo

Se realizaron diluciones en medio de MHB para lograr las concentraciones de trabajo las cuales se esterizaron por filtración (Ver tabla 8).

Tabla 8: Preparación de soluciones de trabajo para la evaluación de AEs contra *E. coli* y *S. aureus*

Nombre y concentración de la solución de trabajo a preparar	Volumen y concentración de sustancia	Volumen de diluyente
GNT [8 µg/mL]	240 µL GNT [0,1mg/mL]	2760 µL caldo Mueller Hinton
AE [1000 µg/mL]	200 µL Aceite [20 mg/mL]	3800 µL caldo Mueller Hinton
AE [500 µg/mL]	200 µL Aceite [10 mg/mL]	3800 µL caldo Mueller Hinton
AE [250 µg/mL]	200 µL Aceite [5 mg/mL]	3800 µL caldo Mueller Hinton
AE [125 µg/mL]	200 µL Aceite [2,5 mg/mL]	3800 µL caldo Mueller Hinton
AE [62,5 µg/mL]	200 µL Aceite [1,25 mg/mL]	3800 µL caldo Mueller Hinton
DMSO	200 µL DMSO	3800 µL caldo Mueller Hinton

Para la preparación de la solución de trabajo de MTT se mezcló un volumen de solución inicial de MTT + 1,2 volúmenes de solución inicial de PBS. Posteriormente se esterilizó por filtración utilizando membranas de 0,22 µm.

6.7.2.3 Montaje del ensayo de macrodilución en tubo para evaluación de aceites esenciales

Se empleo material de vidrio de las mismas especificaciones y se realizo el procedimiento de montaje de igual manera que en 6.7.1.5; con la salvedad de que se empleo GNT de 8 µg/mL como medicamento control y MHB fue utilizado para la preparación de los controles de crecimiento y el control de esterilidad.

6.7.2.4 Condiciones de incubación del ensayo

Los tubos fueron incubados a 37°C durante 20 horas, luego de lo cual se realizó el revelado.

6.7.2.5 Revelado del ensayo

Concluido el tiempo del ensayo de bioactividad se procedió a realizar el revelado del ensayo Se añadieron 220µL de indicador de MTT a cada tubo. Luego se procedió a una nueva incubación de 30 minutos a 37°C.

6.7.2.6 Lectura e interpretación de resultados

Se realizó la confirmación visual del color, se definieron la CMI para cada muestra y se obtuvieron los datos de bioactividad, siguiendo lo descrito para los ensayos con *M. tuberculosis*.

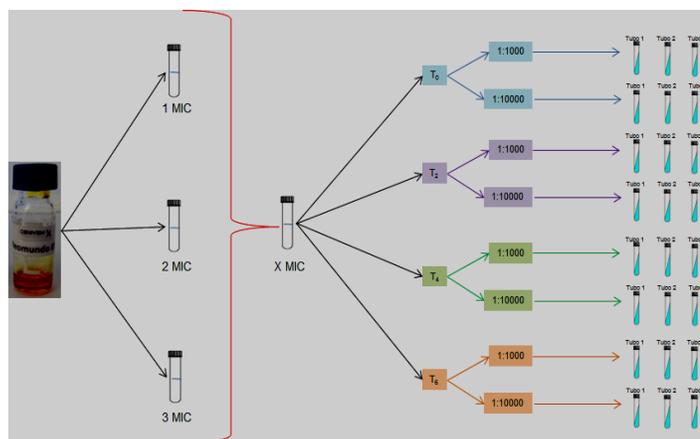
6.8 CURVAS DE LETALIDAD CONTRA *Mycobacterium tuberculosis* PARA CUMPLIR CON EL OBJETIVO ESPECÍFICO NÚMERO 3.

Estos AEs fueron evaluados en su actividad bactericida o bacteriostática mediante los ensayos de curvas de letalidad antimicobacteriana, según las recomendaciones del CLSI, como se muestra en la figura 7.

6.8.1 Montaje del ensayo

La fase inicial del ensayo, consistió en el montaje del ensayo de bioactividad como se describió en 6.7.1.5, con un volumen final de 6mL. Las concentraciones evaluadas consistieron en 1, 2 y 3 veces la respectiva CMI de cada muestra. Se tomaron alícuotas de 1mL de cada tubo durante los tiempos 0, 2, 4 y 6 días; las cuales fueron centrifugadas a 3000rpm durante 15 minutos y lavadas con agua destilada estéril, procedimiento que se repitió 3 veces. Finalmente, se prepararon diluciones 1:100 y 1:10000 con agua destilada estéril y se sembraron por triplicado en medio LJ a razón de 200µL.

Figura 7. Esquema de montaje del ensayo de curvas de letalidad para la evaluación del efecto bactericida y bacteriostático de AEs frente a *M. tuberculosis*.



6.8.2 Condiciones de incubación del ensayo

Los tubos fueron incubados a 37°C durante 30 días y se realizó la lectura.

6.8.3 Lectura e interpretación de resultados

Transcurrido el tiempo de incubación, se procedió al conteo colonias y se obtuvo la media del conteo de UFC/mL en cada tubo del triplicado.

6.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La estimación global de la exactitud del ensayo colorimétrico del MTT se realizó mediante el análisis ROC (acrónimo de las palabras Receiver Operating Characteristic, o Característica Operativa del Receptor) utilizando el programa IBM SPSS Statistics 20.

Para el análisis de las CMI se utilizó el programa EXCEL, expresando los resultados como la media geométrica.

Los datos obtenidos de los ensayos de curvas de letalidad se graficaron en escala logarítmica de las Unidades Formadoras de Colonia por mililitro (Log₁₀ UFC/mL).

La actividad bactericida fue definida como la disminución mayor o igual a 3 log₁₀ en el conteo de UFC, correspondientes al 99% de muerte bacteriana a cada tiempo específico con respecto al tiempo inicial.

6.10 CONSIDERACIONES ÉTICAS

De acuerdo con los principios establecidos en la Resolución 008430 de Octubre 4 de 1993 del Ministerio de Salud de la República de Colombia y debido a que esta se consideró una investigación sin riesgo, este estudio fue desarrollado conforme a los siguientes criterios:

- Para la ejecución de las actividades correspondientes al logro de objetivos, no fue necesaria la interacción con pacientes, por lo cual ésta investigación no requirió de la aplicación del consentimiento informado.
- La experimentación en bioactividad sobre microorganismos de importancia en salud pública ha sido conducida previamente en múltiples laboratorios de investigación a nivel mundial y hay reportados varios protocolos para la conducción de los ensayos.
- El conocimiento generado a partir de éste estudio no puede obtenerse por otro medio idóneo y fue necesaria la aplicación de pruebas *in vitro* sobre los microorganismos de prueba.
- Para la correcta manipulación de cepas ATCC de *M. tuberculosis*, incluido como un microorganismo perteneciente al grupo de riesgo III; las actividades se llevaron a cabo en el *Mycobacterium*: Laboratorio de Investigación y Extensión de la Facultad de Salud de la Universidad Industrial de Santander, siguiendo los reglamentos específicos para el manejo de este tipo de microorganismos emanados de la Organización Mundial de la Salud, el CDC (Centers for Disease Control and Prevention) de Atlanta y el Ministerio de la Protección Social.

- Se hizo uso del equipo básico de protección personal que incluyó bata de laboratorio desechable en material anti fluido, máscara respiratoria N-95, guantes, cofia y polainas, así como con una póliza de accidentes juveniles y con el cubrimiento en salud por parte de una Entidad Promotora de Salud (EPS).
- La Escuela de Bacteriología y Laboratorio Clínico de la Universidad Industrial de Santander, lugar en el que se realizaron los procedimientos respectivos, cuenta con la infraestructura requerida para garantizar la bioseguridad y biocontención del microorganismo.
- La investigación se llevó a cabo previa autorización de los representantes legales de las entidades adscritas al convenio en el cual estuvo enmarcado éste estudio, así como del director del proyecto.

7. RESULTADOS

7.1 IMPLEMENTACIÓN DE LA METODOLOGÍA COLORIMÉTRICA DEL MTT

Se generó un protocolo experimental (Anexo E) según los lineamientos del método científico y la literatura descrita acerca de este tipo de ensayos para lograr la implementación de la metodología colorimétrica del MTT adaptada a las condiciones medioambientales de Bucaramanga y del *Mycobacterium*: Laboratorio de Investigación y Extensión de la Facultad de Salud de la Universidad Industrial de Santander, en Bucaramanga – Colombia.

En la figura 8 se muestra un ensayo de MTT revelado. El tubo con solución de color amarillo indica que la muestra es Bioactiva a la concentración probada. El tubo con solución de color violeta indica metabolismo celular y por tanto la muestra es No Bioactiva a la concentración probada.

Figura 8: Inspección visual del ensayo colorimétrico del MTT para la evaluación de la actividad antibacteriana de AEs. Tubo amarillo: muestra Bioactiva. Tubo violeta: muestra No Bioactiva.



Se realizó un análisis ROC para las moléculas sintéticas, AEs y EVs incluidos en el estudio el cual permitió obtener una representación global de la exactitud del

ensayo colorimétrico del MTT para 26 de un total de 35 muestras. La exactitud máxima fue considerada para un área bajo la curva de ROC (ABC) con valor de 1 y la mínima con un valor de 0,5.

El 96,15% de las muestras tuvieron valor de ABC entre 0,5 y 1,0. La figura 9 muestra el porcentaje de muestras de acuerdo a los rangos dados del ABC. Las muestras correspondientes a 10 AEs (N°1, N°3, N°4, N°6, N°7, N°8, N°20, N°21, N°22 y N°23) y 5 EVs (N°27, N°40, N°54, N°55 y N°58) tuvieron un valor de ABC entre 0,9 y 1,0 (58%); 5 muestras correspondientes a 3 aceites esenciales (N°2, N°5 y N°9), 1 extracto vegetal (N°57) y 1 molécula sintética (AF174) tuvieron un valor de ROC entre 0,7 y 0,8 (19%), 5 muestras correspondientes a 4 moléculas sintéticas (SAM99, AF166, ES1D1 y ES2D1) y un aceite esencial (N°10) obtuvieron un valor de ROC entre 0,5 y 0,6 (19,23%). Solo una molécula sintética (LIA4P) obtuvo un valor de ROC <0,5 (3,85%).

El ensayo mostro características de discriminación perfecta (100% de sensibilidad y 100% de especificidad, ROC 1,0) para las muestras de AEs N°21: *L. origanoides* (Orégano de monte) FD: 0252, N°22: *L. origanoides* FD: 0250 y N°23: *L. origanoides* FD: 0251

La sensibilidad del ensayo fue de 100% para las muestras de AEs N°2, N°3, N°4, N°5, N°6, N°8, N°9, N°10, N°21, N°22 Y N°23, los EVs N°27, N°54, N°55 y N°58 y las moléculas SAM99, AF166, ES1D1, ES2D1 y LIA4P.

Se obtuvo 90% de sensibilidad para la muestra N°20, 75% para la muestra N°40, 69% para la muestra AF174, 67% para las muestras N°1 y N°7 y 64% para la muestra N°57.

Figura 9: porcentaje de muestras de acuerdo al valor de ABC.

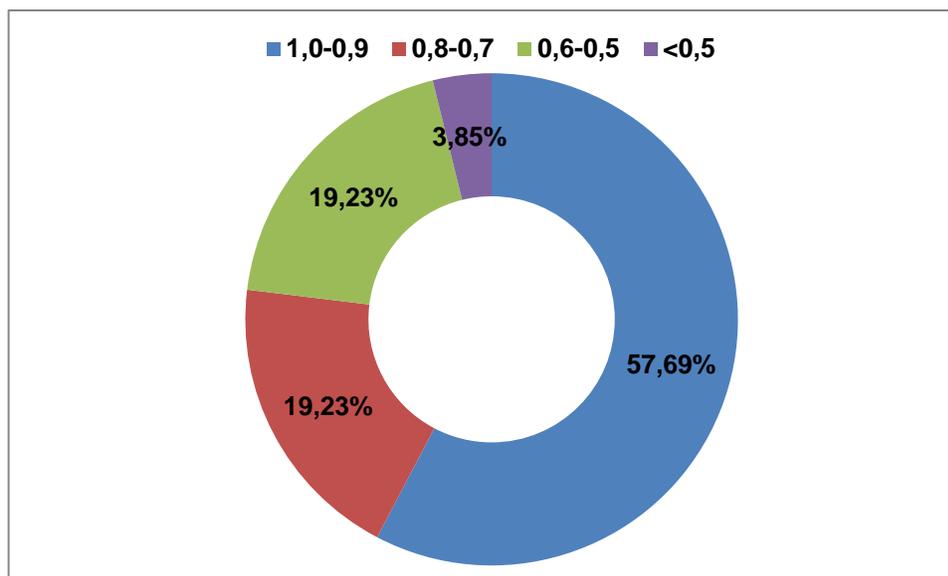
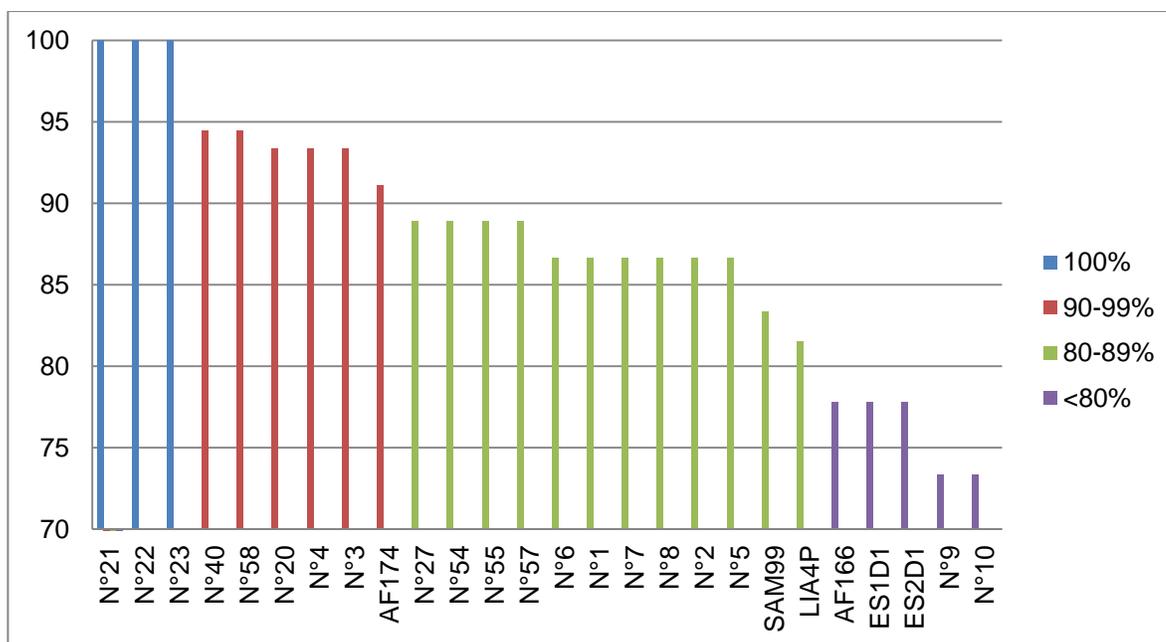


Figura 10: Porcentaje de resultados bien clasificados como Bioactivos o No bioactivos de acuerdo la muestra.



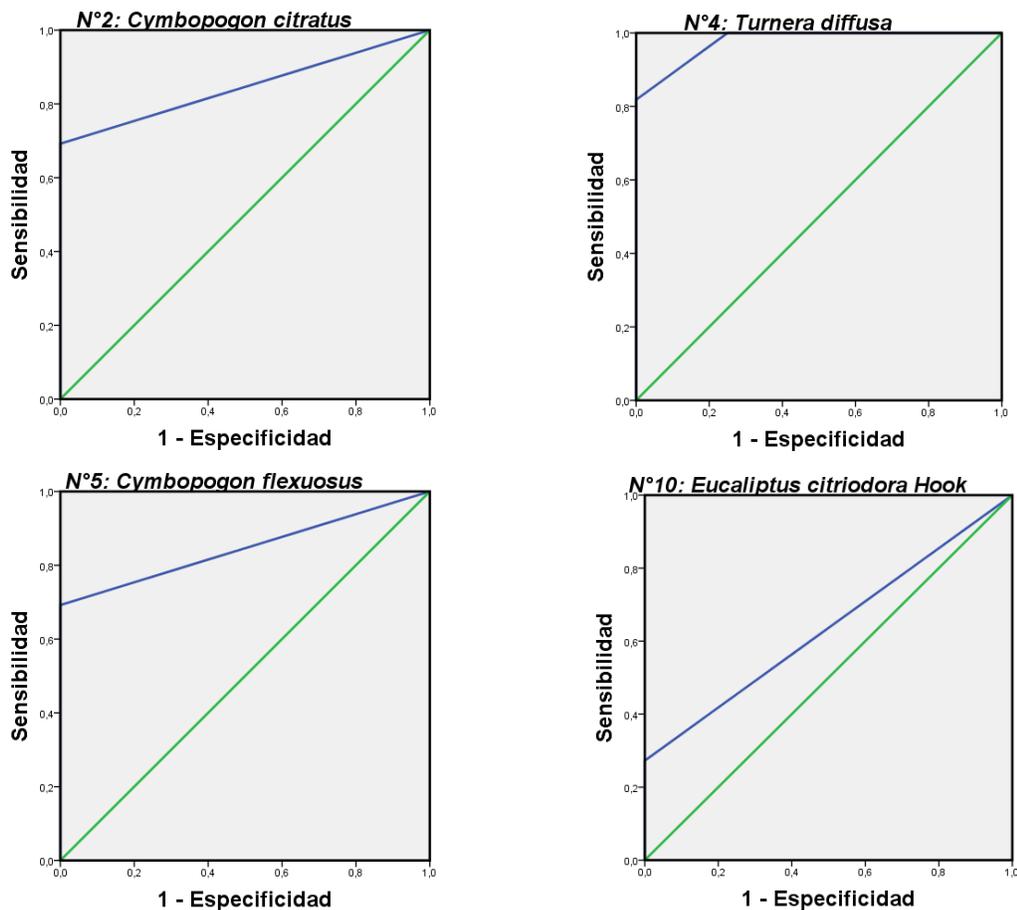
La especificidad para las muestras N°20, N°21, N°22, N°23, N°40 y AF164 fue del 100%; para las muestras N°1, N°3, N°7, N°57 y N°58 estuvo entre 92 y 94%;

mientras que en las muestras N°8, N°27, N°54 y N°55 oscilo entre 82 y 88% y en las muestras N°2, N°4, N°5, N°6, N°9, N°10, SAM 99, AF166, ES1D1, ES2D1 y LIA4P fue menor del 82%.

El porcentaje de resultados bien clasificados como Bioactivos o No bioactivos para cada muestra se representa en la figura 10. 21 de 26 muestras analizadas por ROC tuvieron un porcentaje de resultados bien clasificados mayor al 80%. En las 5 muestras restantes el porcentaje estuvo entre 77,78 y 73,33%.

La figura 11 muestra las curvas ROC generadas para las muestras consideradas como promisorias a las cuales se les determino el efecto bactericida.

Figura 11: Curvas ROC de las muestras N°2, N°4, N°5 y N°10



7.2 EVALUACIÓN DE LA BIOACTIVIDAD DE MOLÉCULAS SINTÉTICAS, EXTRACTOS VEGETALES Y ACEITES ESENCIALES

7.2.1 Tres moléculas sintéticas fueron activas contra *Mycobacterium tuberculosis*

En los anexos A y B se muestran los resultados y las evidencias fotográficas de los ensayos de bioactividad de las moléculas sintéticas objeto de estudio contra *M. tuberculosis*. De las 15 moléculas analizadas, 3 (20%) fueron bioactivas contra el microorganismo entre 50,8 y 100 µg/mL; las 12 restantes (80%) no fueron bioactivas dentro del rango de concentraciones probadas; estas correspondieron a las identificadas con los códigos AF160, AF166, AF167, AF171, AF190, AF194 y AF195 del grupo de los derivados de las naftoazepinas; LIA1D del grupo de los derivados de las 1-benzoazepinas y ES1D1, ES2D1, ES2DB y ES2DC de los derivados de las quinolonas.

En la tabla 9 se muestra la CMI determinada para todos los compuestos con base en tres ensayos realizados durante las fases 1 y 2.

Comparados con RIF e INH, los compuestos AF174, SAM99 y LIA4P presentaron CMI significativamente más altas. Ahora bien, tomando en cuenta el criterio de actividad propuesto en esta investigación para moléculas sintéticas (CMI \leq 10µg/mL), el efecto bactericida de estas moléculas no fue evaluado ya que no se consideraron como promisorias.

Tabla 9. Concentración mínima inhibitoria de moléculas sintéticas contra *M. tuberculosis*.

Grupo	Código LSO	CMI ^a ± S ^b , n ^c =3	
		(µg/mL)	µM
1. Derivados de las naftoazepinas	AF160	>100 (S: NR ^d)	>249,5
	AF166	>100 (S: NR)	>248,3
	AF167	>100 (S: NR)	>360,5
	AF171	>100 (S: NR)	>325,2
	AF174	50,80 ± 10,67	157,6
	AF190	>100 (S: NR)	>317
	AF194	>100 (S: NR)	>374
	AF195	>100 (S: NR)	>280,7
2. Derivados de las 1-benzoazepinas	LIA1D	>100 (S: NR)	>534
	LIA4P	100 ± 0	397,2
	SAM99	100 ± 0	345,1
3. Derivados de las quinolonas	ES1D1	>100 (S: NR)	>287,8
	ES2D1	>100 (S: NR)	>273,6
	ES2DB	>100 (S: NR)	>263,5
	ES2DC	>100 (S: NR)	>263,5
Medicamentos control	RIF	0,25 ± 0	0,303
	INH	0,125 ± 0	0,9

^aConcentración mínima Inhibitoria; ^b Error estándar de la media; ^cNúmero de réplicas; ^d No Reportado.

7.2.2 Tres extractos vegetales fueron activos contra *Mycobacterium tuberculosis*

En los anexos A y B se muestran los resultados y las evidencias fotográficas de los ensayos de bioactividad de las moléculas sintéticas objeto de estudio contra *M. tuberculosis*. El 50% de los extractos analizados fueron bioactivos contra el microorganismo a CMI entre 793,70 y 1000µg/mL; estos correspondieron a las especies vegetales *Salvia officinalis*, *Escallonia pendula* y *Lippia organoides*. No se evidenció bioactividad de los extractos obtenidos de *Baccharis aff. Buddleioides*, *Wedelia calycina* y *Nectranda reticulata*.

En la tabla 10 se muestra la CMI determinada para todos los EVs con base en tres ensayos realizados.

Tabla 10. Concentración mínima inhibitoria de EVs *M. tuberculosis*

Código de la muestra	Nombre científico	Nombre común	CMI ^a (µg/mL) ± S ^b , n ^c =3
N° 27	<i>Baccharis aff. buddleioides</i>	-	>1000
N° 40	<i>Salvia officinalis</i>	Salvia	793,70 ± 96,23
N° 54	<i>Wedelia calycina</i>	Amarillo	>1000
N° 55	<i>Nectandra reticulata</i>	Laurel	>1000
N° 57	<i>Escallonia pendula</i>	Tibar	793,70 ± 96,23
N° 58	<i>Lippia organoides</i>	Orégano de monte	1000 ± 0

^a Concentración mínima Inhibitoria; ^b Error estándar de la media; ^c Número de réplicas

Los extractos obtenidos de *S. officinalis* y *E. pendula* fueron activos a una CMI de 793,7µg/mL, mientras que *L. organoides* presentó una CMI de 1000µg/mL.

De acuerdo al criterio de actividad propuesto en esta investigación para sustancias de origen natural (CMI < 100 µg/mL), el efecto bactericida de los extractos no fue evaluado ya que no se consideraron como promisorios.

7.2.3 Todos los aceites esenciales fueron activos contra *Mycobacterium tuberculosis*

En los anexos A y B se muestran los resultados y las evidencias fotográficas de los ensayos de bioactividad de los AEs objeto de estudio contra *M. tuberculosis*. El 100% de las muestras analizadas fueron bioactivas contra el microorganismo a CMI entre 500 y 31,25 µg/mL. Esto puede correlacionarse con el alto contenido de componentes volátiles presentes en este tipo de productos vegetales, los cuales han mostrado tener un amplio espectro antimicrobiano.

Tabla 11. Concentración mínima inhibitoria de aceites esenciales contra *M. tuberculosis*

Código de la muestra	Nombre científico	CMI ^a (µg/mL) ± S ^b , n ^c =3	Componentes mayoritarios (%)
N° 10	<i>Eucalyptus citriodora</i> Hook	31,25 ± 0,0	α-Pineno (6.3), β-pineno (4.8), 1.8-cineol (3.4), linalol (2.9), citronelal (49.3), iso-pulegol (12.9), citronelol (9.5)
N° 2	<i>Cymbopogon citratus</i>	49,61 ± 18,04	β-Mirceno (20.2), linalol (3.0), neral (29.0%), geranial (26.0), geraniol (2.9).
N° 5	<i>Cymbopogon flexuosus</i>	49,61 ± 18,04	Geranial (37.5), neral (28.2), acetato de geranilo (10.0), geraniol (9.0), trans-β-cariofileno (2.0)
N° 4	<i>Turnera diffusa</i>	78,75 ± 12,03	α-Pineno (2.5%), β-mirceno (2.4), Δ ³ -careno (8.7), <i>p</i> -cimeno (16.5), limoneno (4.0), γ-terpineno (3.8), β-elemeno (3.4), trans-β-cariofileno (3.5), drima-7,9(11)-dieno (11.6), β-selineno (4.2), γ-patchuleno (4.5), viridifloreno (4.7).
N° 20	<i>Lippia origanioides</i> "socorro" FD: 0249 Qto. Carvacrol	99,21 ± 12,03	<i>p</i> -Cimeno (8.7), γ-terpineno (5.1), timol (11.5), carvacrol (50.6), trans-β-cariofileno (5.2)
N° 9	<i>Cananga odorata</i>	125,00 ± 84,20	α-Pineno (1.5), <i>p</i> -metilanisol (8.9), benzoato de metilo (10.0), linalol (14.1), acetato de bencilo (18.2), trans-β-cariofileno (3.8), germacreno D (7.8), benzoato de bencilo (12.3)
N° 21	<i>Lippia origanioides</i> FD: 0252 Qto. Carvacrol "Pescadero"	125,00 ± 0,0	<i>p</i> -Cimeno (11.9), γ-terpineno (8.5), timol (10.1), carvacrol (40.4), trans-β-cariofileno (5.4)
N° 22	<i>Lippia origanioides</i> FD: 0250 Qto. Carvacrol "Pescadero"	125,00 ± 0,0	<i>p</i> -Cimeno (13.2), γ-terpineno (7.6), timol (10.1), carvacrol (42.0), trans-β-cariofileno (5.0)
N° 23	<i>Lippia origanioides</i> FD: 0251 Qto. Carvacrol "Pescadero"	125,00 ± 0,0	<i>p</i> -Cimeno (9.2), γ-terpineno (6.42), timol (12.4), carvacrol (41.2), trans-β-cariofileno (5.6)

N° 6	<i>Lippia alba Mill</i>	198,43 ± 72,17	Limoneno (31.8), carvona (38.3), piperitona (2.6), piperitenona (4.4), β-burboneno (1.3), biciclosesquifelandreno (9.0)
N° 8	<i>Swinglea glutinosa</i>	250,00 ± 0,0	α-Pineno (12.0), sabineno (11.0), β-pineno (49.6), limoneno (4.4), 1,8-cineol (3.0), terpinen-4-ol (2.7), trans-β-cariofileno (1.5), germacreno D (8.1)
N° 7	<i>Citrus scinensis Osbeck</i>	353,55 ± 72,17	Limoneno (71.3), β-mirceno (5.0), linalol (5.4), sabineno (1.6), γ-terpineno (2.0), <i>n</i> -octanol (2.0)
N° 1	<i>Tagetes lucida Cav.</i>	353,55 ± 72,17	β-Mirceno (1.6), trans-β-ocimeno (1.0), estragol (95.7)
N° 3	<i>Rosmarinus officinalis</i>	500,00 ± 0,0	α-Pineno (20.0), β-pineno (10.5), 1,8-cineol (13.3), γ-terpineno (2.1), alcanfor (25.0), trans-β-cariofileno (10.7), α-humuleno (2.1), óxido de cariofileno (5.2)

^aConcentración mínima Inhibitoria; ^b Error estándar de la media; ^cNúmero de réplicas;

En la tabla 11 se muestra la CMI determinada para todos los AEs con base en tres ensayos realizados.

Los aceites obtenidos de *L. alba Mill*, *S. glutinosa*, *C. scinensis Osbeck*, *T. lucida Cav*, *R. officinalis*, *C. odorata* y *L. origanioides* (N°21, N°22 y N°23) presentaron actividad contra el microorganismo a un rango de CMI entre 125 y 500 µg/mL.

Los extraídos de *E. citriodora Hook*, *C. citratus*, *C. flexuosus*, *T. diffusa* y *L. origanioides* (N°20) fueron activos a CMI <100 µg/mL, por lo cual se consideraron como promisorios. *E. citriodora Hook*, *C. citratus*, *C. flexuosus*, *T. diffusa* fueron probados contra las cepas de referencia de *S. aureus* y *E. coli* y se realizó el ensayo de curvas de letalidad de contra *M. tuberculosis*.

Las especies analizadas de *Cymbopogon* contenían porcentajes de neral, geranial y β -Mirceño entre 20-37%. Los componentes trans- β -cariofileno, α -Pineno, cimeno y limoneno fueron los más comunes dentro los AEs estudiados

7.2.4 Los aceites esenciales de *Cymbopogon citratus* y *Cymbopogon flexuosus* fueron activos contra *Staphylococcus aureus*

De 4 aceites analizados, *C. citratus* y *C. flexuosus* fueron activos frente a *S. aureus* a una CMI de 500 $\mu\text{g/mL}$ (anexo B) en los tres ensayos realizados. *E. citriodora* Hook y *T. diffusa* no presentaron actividad frente al microorganismo incluso a la máxima concentración probada. Ninguno de los 4 aceites presentó bioactividad frente a *E. coli*.

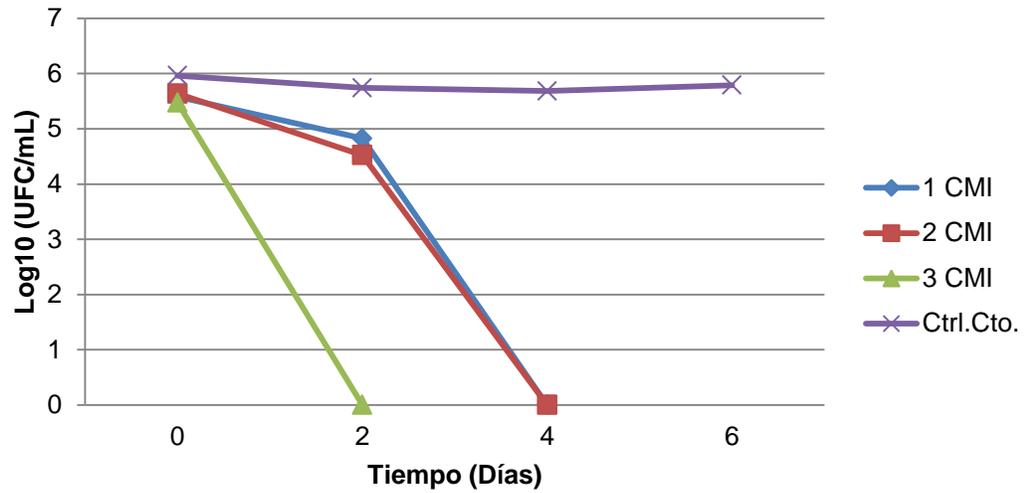
7.3 EVALUACIÓN DEL EFECTO BACTERICIDA DE *Eucalyptus citriodora* Hook, *Cymbopogon citratus*, *Cymbopogon flexuosus* y *Turnera diffusa* FRENTE A *Mycobacterium tuberculosis*

7.3.1 Dos aceites esenciales presentaron efecto bactericida y dos efecto bacteriostático

Los resultados y las evidencias fotográficas del ensayo de curvas de letalidad de los AEs y los medicamentos control se muestran en los anexos C y D. Las gráficas generadas con estos resultados se muestran en las figuras 12 a 17

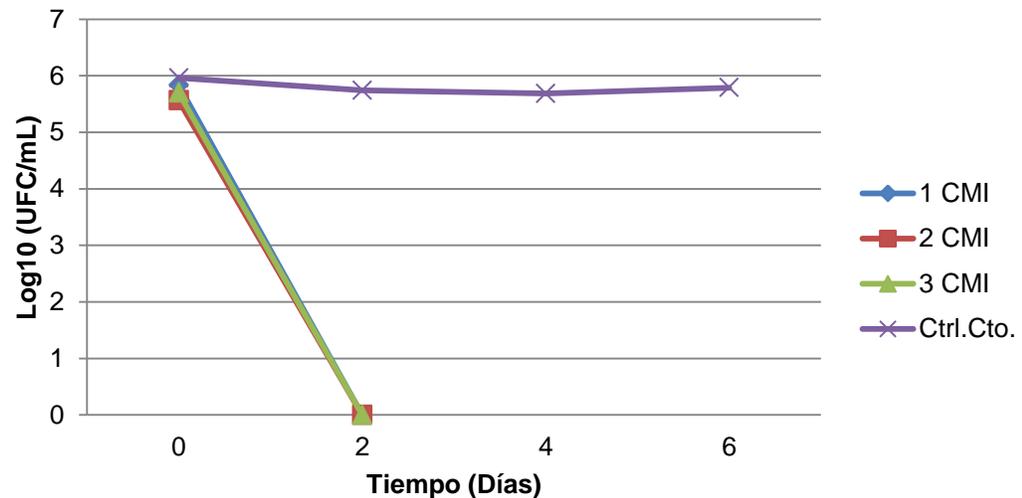
RIF e INH presentaron efecto bactericida a las concentraciones probadas correspondientes a 1CMI, 2CMI y 3CMI.

Figura 12: curva de letalidad de RIF frente a *M. tuberculosis*



El segundo día del ensayo con RIF se lograron porcentajes de muerte bacteriana del 83 y 92% con 1CMI y 2CMI respectivamente. Estos porcentajes aumentaron el cuarto día obteniéndose un efecto bactericida ($\geq 99\%$ de muerte bacteriana). El mismo efecto observado con 3CMI desde el segundo día del ensayo.

Figura 13: curva de letalidad de INH frente a *M. tuberculosis*



INH mostró un potente efecto esterilizante desde el segundo día del ensayo con el cual se lograron porcentajes de muerte bacteriana $\geq 99\%$.

C. citratus y *T. diffusa* presentaron efecto bactericida a 125 $\mu\text{g/mL}$ (3CMI).

Figura 14: curva de letalidad de *C. citratus* frente a *M. tuberculosis*

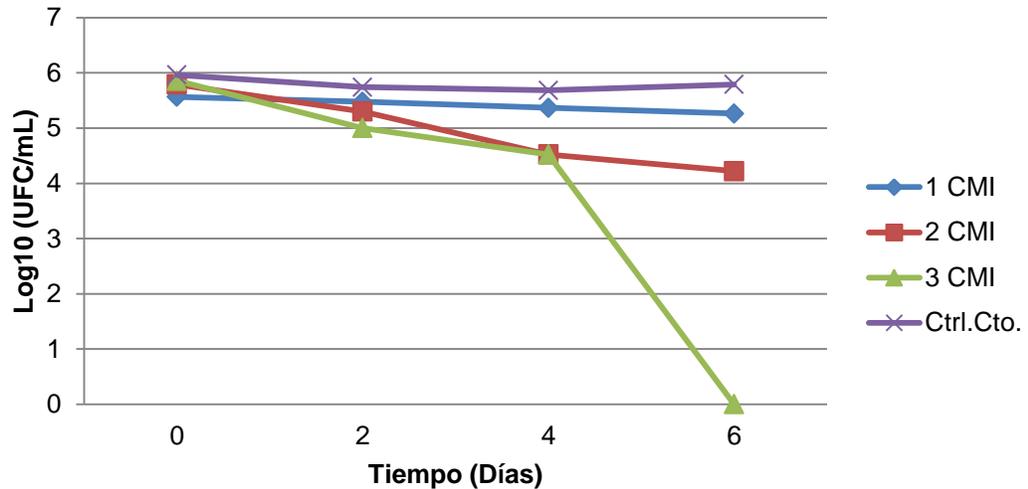
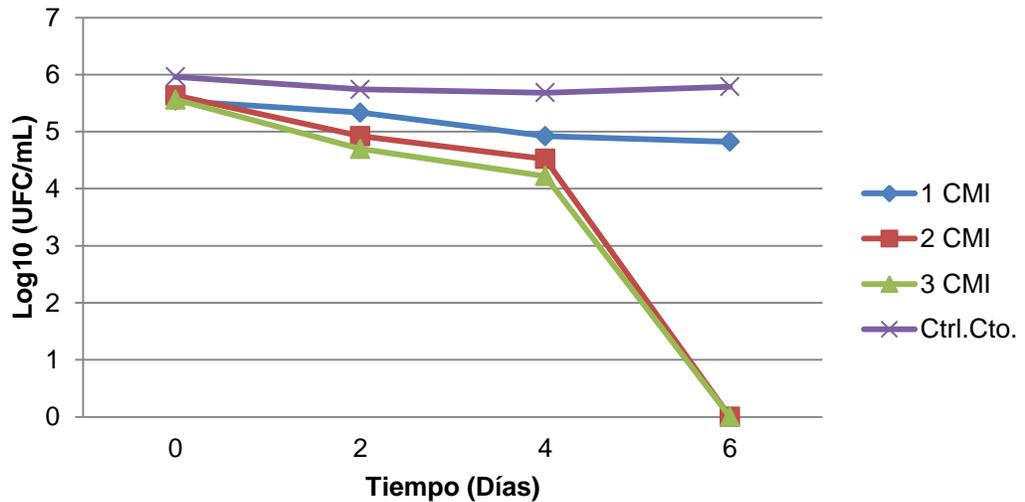


Figura 15: curva de letalidad de *T. diffusa* frente a *M. tuberculosis*



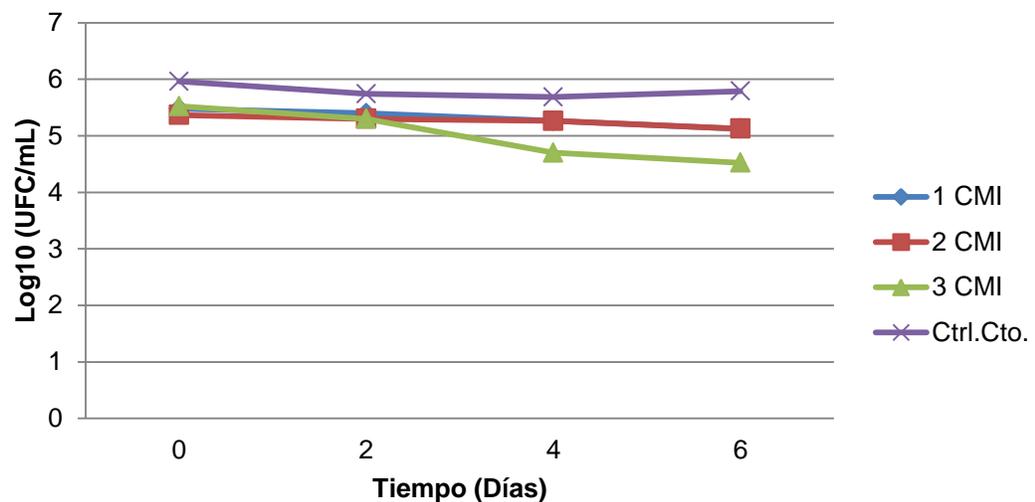
C. citratus inició mostrando un efecto bacteriostático durante el segundo día del ensayo con porcentajes de muerte bacteriana de 18, 68 y 86% con 1CMI, 2CMI y

3CMI respectivamente. Para el cuarto día se logró el 36% de muerte bacteriana con 1CMI y el 95% con 2CMI y 3CMI. Para el sexto día el efecto bacteriostático se mantuvo con 1CMI (50%) y 2CMI (97%), mientras que con 3CMI se obtuvo un efecto bactericida.

Se evidenció un efecto bacteriostático de *T. diffusa* desde el segundo día del ensayo con porcentajes de muerte bacteriana de 38 (1CMI), 81 (2CMI) y 86% (3CMI). Un aumento de estos porcentajes fue observado durante el cuarto día del ensayo, sin embargo el efecto bacteriostático se mantuvo hasta el sexto día con 1CMI (81%), mientras que se logró un efecto bactericida con 2CMI y 3CMI.

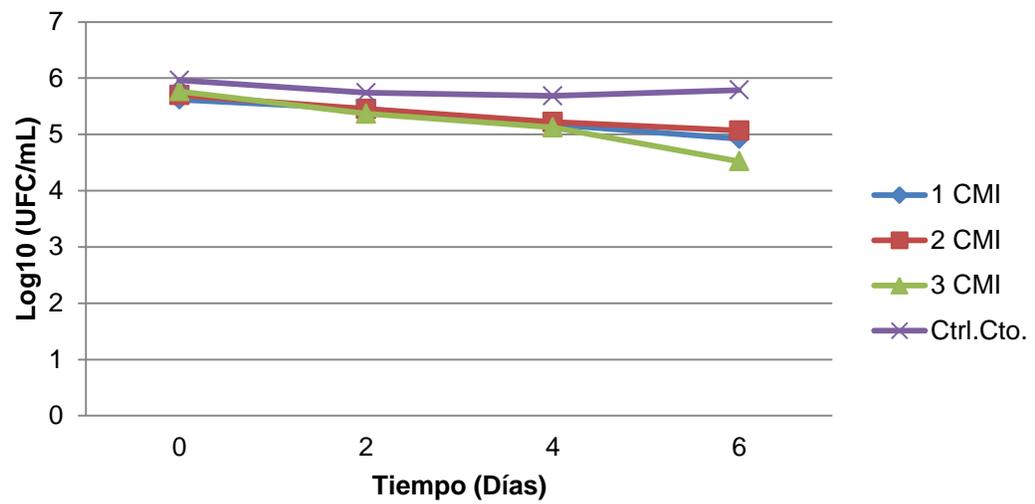
C. flexuosus y *E. citriodora* Hook presentaron actividad bacteriostática a todas las concentraciones probadas.

Figura 16: curva de letalidad de *C. flexuosus* frente a *M. tuberculosis*



Un aumento en el porcentaje de muerte bacteriana fue observado para los dos AEs durante todos los días del ensayo a 1CMI, 2CMI y 3CMI. Para el día sexto del ensayo se obtuvo el 90 y 94% de muerte bacteriana con *C. flexuosus* y *E. citriodora* Hook respectivamente usando 3CMI

Figura 17: curva de letalidad de *E. citriodora* Hook frente a *M. tuberculosis*



El efecto de la INH fue tiempo dependiente. El efecto de la RIF, *C. citratus* y *T. diffusa* fue tiempo y concentración dependiente observándose un mayor porcentaje de muerte bacteriana a través del tiempo.

8. DISCUSIÓN

Existen diversas metodologías para la determinación de la bioactividad de nuevas sustancias contra el *M. tuberculosis*; sin embargo en este estudio se optó por la implementación del ensayo colorimétrico del MTT por las razones que se exponen a continuación:

Los métodos de dilución y difusión en agar, son metodologías que también pueden usarse para la determinación de la CMI de nuevas sustancias, sin embargo al usarse cajas de Petri la muestra puede volatilizarse, afectando los resultados. La prueba del MTT acoplada al ensayo de macrodilución en tubo, permite la evaluación de sustancias volátiles como los AEs sorteando esta dificultad, ya que se emplean tubos con tapa rosca que permiten un cierre hermético que impide la pérdida de muestra durante el proceso. Adicionalmente debido al uso de medios de cultivo sólidos, el tiempo necesario para la lectura de la prueba es mucho más largo (20-40 días) en comparación con las metodologías de dilución en medio líquido, como el que se usa en el MTT (8 días incluyendo el ensayo de revelado) (Bueno-Sánchez, 2012; Primm y Franzblau, 2007; Martin *et al.*, 2003).

Otras alternativas como el método radiométrico y la citometría de flujo requieren equipos automatizados que aumentan el costo de la prueba y exponen al investigador al uso de reactivos más tóxicos. En el caso de las metodologías colorimétricas como el MTT puede realizarse una inspección visual y determinar la CMI por un viraje en el color en los pozos o tubos de ensayo, lo cual la convierte en una metodología mucho más práctica y económica (Primm y Franzblau, 2007; Groll *et al.*, 2010; Mshana *et al.*, 1998; Bueno-Sánchez, 2012; Martin *et al.*, 2005; Palomino *et al.*, 2002).

Si bien se ha documentado una eficiencia similar de las metodologías colorimétricas MTT y REMA (resazurin microtiter assay) para la determinación de susceptibilidad a las drogas antituberculosas, el MTT permite una interpretación visual del color mucho más fácil ya que la diferencia entre sus colores es mucho más definida (MTT: amarillo – violeta, REMA: azul – rosado) (Martin *et al.*, 2005).

El ensayo colorimétrico del MTT hace parte de una serie de metodologías empleadas en la determinación de la viabilidad celular. En el caso de las micobacterias, estas pruebas han sido propuestas como alternativas para la investigación de la susceptibilidad a las drogas antituberculosas y son usadas rutinariamente en el descubrimiento de nuevas sustancias antimicobacterianas (Mshana *et al.* 1998, Palomino *et al.* 2002, Martin *et al.* 2003, Montoro *et al.* 2005, Primm y Franzblau 2007, Bueno Sánchez y Kouznetsov 2010).

Debido a que el colorante utilizado (MTT) que posee un color original amarillo, puede ser reducido a cristales de formazan insolubles en medios acuosos por las enzimas participantes en el metabolismo celular ocasionando el viraje del color a violeta; puede discriminarse eficientemente cuándo las células presentes en la muestra se encuentran metabólicamente activas o no (ver figura 8) (Pontino *et al.*, 2006; Abate *et al.*, 2004; Berridge *et al.*, 1996).

Esta característica permite clasificar las sustancias investigadas entre Bioactivas y No Bioactivas contra el microorganismo a cada concentración determinada, haciendo posible la generación de una variable dicotómica susceptible de ser analizada mediante el análisis ROC (Zweig y Campbell, 1993; Martin *et al.*, 2005; Montoro *et al.*, 2005).

La sensibilidad reflejada por el ensayo colorimétrico del MTT indica que es válida como prueba de tamizaje para el descubrimiento de nuevas sustancias bioactivas contra *M. tuberculosis*. Estos resultados concuerdan con los reportados por

Montoro y colaboradores (2005) quienes obtuvieron sensibilidades entre 88,5 y 100% al evaluar la conveniencia de la prueba para la determinación de susceptibilidad de aislamientos clínicos de *M. tuberculosis* a las drogas antituberculosas.

Las diferencias en los resultados de sensibilidad y especificidad de la prueba entre las diferentes sustancias analizadas es atribuible a la naturaleza diversa de las mismas; adicionalmente en el caso de las sustancias de origen natural la totalidad de sus componentes no ha sido determinada por lo cual no es posible conocer a cabalidad cómo se ven afectados estos parámetros.

Por otro lado, cabe anotar que las características de crecimiento propias de las micobacterias dificultan la obtención de un inóculo de distribución homogénea en solución ya que hay formación de agregados bacterianos y al presumirse que cerca del 1% de la población bacilar puede presentar características de resistencia, los resultados pueden variar de un ensayo a otro.

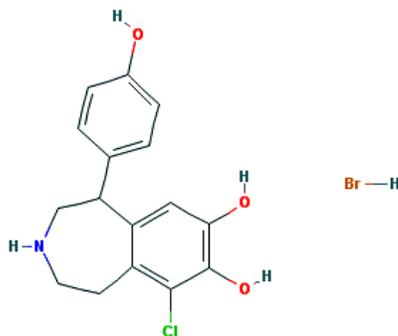
La correlación entre la estructura química, teniendo en cuenta los sustituyentes del compuesto AF174 y su actividad antimicobacteriana, refleja la importancia del nitrofurano en la posición 5 de la naftoazepina. Esto concuerda con lo reportado en la literatura acerca de la actividad antimicobacteriana *in vitro* de algunos derivados del 5-Nitrofurano-2-il que han mostrado inhibir a los bacilos de crecimiento lento y bacilos latentes de *M. tuberculosis* y *M. smegmatis* a CMI de 13,9 a 153,9 y 43,2 a 213,2 μM respectivamente; resultando incluso más potentes que RIF e INH por lo que se han propuesto como importantes agentes que pudieran ser utilizados para acortar el tratamiento de las infecciones causadas por estas micobacterias (Sriram *et al.* 2009).

Otros ensayos han mostrado una actividad bactericida superior de los nitrofuranos, contra los bacilos latentes de BCG en comparación con el nitroimidazol.

Adicionalmente, se han relacionado las diferencias en el potencial redox de estas dos clases de heterociclos nitrogenados con las variaciones en su actividad biológica, ya que en los nitrofuranos es más alto y estos a su vez pueden ser reducidos y activados más fácilmente (Murugasu-Oei y Dick 2000).

Dentro del grupo de los derivados de las 1-benzazepinas, la bioactividad se vio aumentada cuando los compuestos presentaban mayor número de sustituyentes. La forma alcohólica del compuesto LIA4P junto con los sustituyentes de cloro en la posición 8 y metilo en la posición 9 de la benzazepina, parecen favorecer de manera positiva la actividad biológica. Así mismo, es posible que la adición de un átomo de flúor en la posición 7 y un grupo clorofenilo en la posición 2 del compuesto SAM99, estén relacionadas con su efecto inhibitorio sobre *M. tuberculosis*. Los resultados obtenidos concuerdan con los reportados sobre el fármaco Fenoldopam (ver figura 18), un derivado de la benzazepina que presenta un sustituyente de cloro y un hidroxifenilo y que ha mostrado tener un efecto bioactivo contra *M. tuberculosis* actuando sobre la enzima fructosa bifosfato aldolasa (FBA) (Fenoldopam / NCBI Wep page).

Figura 18. Estructura del compuesto 9-cloro-5-(4-hidroxifenil)-2,3,4,5-tetrahidro-1H-3-benzazepina-7, 8-diol hidrobromido. Fenoldopam. Fuente Fenoldopam / NCBI Wep page



Dado que en aún no existen datos disponibles acerca de los compuestos derivados de las quinolonas investigados en el presente estudio, se hace difícil la comparación de su actividad biológica con otros compuestos relacionados. Posiblemente estas moléculas no presentaron bioactividad contra el microorganismo porque estaban en la forma de éster y no de ácido, como usualmente aparecen las quinolonas.

Aunque no han sido reportados otros estudios del efecto de esta planta contra *M. tuberculosis*, los resultados del presente trabajo se correlacionan con otros que documentan la actividad antimicobacteriana de extractos obtenidos de otras especies de *Salvia*. Por ejemplo *S. dolomítica*, *S. rádula* y *S. verbenaca* recolectadas en Suráfrica con CMI entre 100 y 500 µg/mL (Kamatou *et al.* 2007) y *S. verticillata* L. procedente de Turkía con CMI de 16 µg/mL (Ozcelik *et al.* 2012).

No existen reportes de la actividad biológica de *E. pendula*, por lo cual los resultados obtenidos en este estudio representan un primer acercamiento al conocimiento de sus propiedades bioactivas sobre bacterias de importancia en salud pública como *M. tuberculosis*, brindando además una visión de su potencial uso como agente antibacteriano. Adicionalmente, esta planta ha sido estudiada para hacer parte de un programa mixto de reforestación en algunas zonas de Colombia y en caso de continuarse el interés por sus potenciales usos biocomerciales, su cultivo no representaría mayor requerimiento de tecnificación (Cabezas Gutierrez *et al.* 2008).

El efecto antibacteriano de *L. origanoides* nativa de Colombia ya ha sido investigado documentándose un efecto bactericida selectivo más contra bacterias patógenas (Concentración mínima bactericida (CMB) 0.098mg/mL frente a *Salmonella enteritidis*) que contra bacterias benéficas (CMB 50mg/mL frente a *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium breve*) (Betancourt *et al.* 2012). En otros estudios se ha encontrado una mayor actividad de sus extractos en bacterias

Gram – positivas que en Gram – negativas, razón que se atribuye a las diferencias en la morfología de la membrana bacteriana (Henao *et al.* 2009). Por otro lado, *M. tuberculosis* mostró resistencia a los extractos etanólicos de *L. lacunosa* y *Lippia rotundifolia* provenientes de Brasil cuando fueron probados a una concentración máxima de 100µg/m, mientras que fue sensible a las fracciones de hexano y diclorometano de las mismas especies a concentraciones entre 25 y 100 µg/m. En el mismo estudio se pudo concluir la influencia de los procedimientos previos a la extracción sobre la actividad biológica de los extractos y además se pudo correlacionar una mayor actividad antimicobacteriana de sus fracciones más lipofílicas (hexano y diclorometano) con respecto a sus fracciones polares (agua y metanol) (Leitao *et al.* 2006). Ensayos posteriores realizados por Castellar y colaboradores en 2004 revelaron que los componentes de *L. lacunosa* mayormente involucrados en su actividad biológica incluían las metoxiflavonas cirsimaritina, eupatilina, eupatorina, salvigenina, 3'-O-metil-eupatorina, 3',7-dimetoxi-5,6,4'- trihidroxiflavona y 7'-O-metilapigenina, y el triterpeno ácido oleanólico, los cuales presentaron CMI entre 25 to 200 µg/mL.

Aunque en el presente estudio el extracto obtenido de *L. organoides* no fue considerado como promisorio es pertinente la obtención de fracciones extraídas por otras metodologías y con la utilización de diferentes solventes, con el fin de corroborar la actividad biológica de los componentes individuales de la mezcla.

Debido a que no existen muchos reportes acerca de la evaluación del efecto antimicobacteriano de AEs mediante la aplicación del método de macrodilución en tubo y adicionalmente de la actividad antimicobacteriana de AEs obtenidos de plantas colombianas algunos apartes de la discusión se centran en los estudios realizados por Bueno Sánchez y colaboradores acerca de este tema.

Comparando la CMI del aceite esencial extraído *C. odorata* proveniente de Bucaramanga – Santander reportada anteriormente con actividad anti *M.*

tuberculosis a 300 µg/mL por Bueno-Sánchez y colaboradores (2009); la muestra analizada en nuestro estudio presentó mayor efecto inhibitorio contra el microorganismo (CMI 125 µg/mL). Posiblemente haya correlación entre los diferentes sitios de recolección y las partes de la planta utilizadas para el proceso de extracción con las divergencias en la actividad biológica de los dos aceites. Adicionalmente, cabe resaltar que algunos componentes como el α -Pino y el trans- β -cariofileno presentes en el aceite analizado en este proyecto, estaban ausentes en la muestra analizada en 2009; por el contrario otros como el cinamil acetato, geranil acetato y α -humuleno sí estaban presentes en aquella y no en la nuestra. También se advirtieron diferencias en la proporción de los componentes comunes para las dos muestras, lo que conlleva a pensar de nuevo en la importancia del análisis individual de los mismos para determinar su efecto sobre el microorganismo.

Por el contrario, el aceite obtenido de *S. glutinosa* analizado en este estudio presentó menor CMI (250 µg/mL) que la analizada en 2009 por Bueno-Sánchez y colaboradores (CMI 100 µg/mL). Los componentes α -Pino, β -Pino, sabineno, limoneno, 1,8-cineol, terpinen-4-ol y trans- β -cariofileno, fueron comunes para los dos aceites, sin embargo los componentes bicyclosesquifelanandreno, γ -Terpino y α -Terpineol no estuvieron presentes en la muestra analizada en nuestro estudio.

L. alba también fue analizada en los dos estudios. Pese a existir diferencias en cuanto a la zona de recolección y el número y porcentaje de sus componentes, la muestra procedente del departamento del Tolima analizada en 2009 y la analizada en este estudio presentaron CMI similares (Bueno-Sánchez *et al.* 2009). Sin embargo, una segunda muestra analizada en 2009 procedente de Bucaramanga – Santander presentó CMI menor (130 µg/mL) que la de este estudio (198,43 µg/mL). Carvona, piperitona, piperitenona, β -burboneno, bicyclosesquifelandreno,

geranial, neral, geraniol, trans- β -Cariofileno, geranil acetato, 6-Metil-5-hepten-2-ona, cis-Verbenol, trans-Verbenol y α -Humuleno fueron los componentes discordantes entre las dos muestras.

Las diferentes muestras obtenidas de *L. origanoides* recolectadas en el municipio de Pescadero- Santander presentaron CMI de 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Estos datos concuerdan con lo anteriormente reportado acerca de la actividad antimicobacteriana de *L. origanoides* procedente del departamento de Nariño – Colombia donde se obtuvo igual CMI cuando el aceite fue probado contra *M. tuberculosis* (Bueno-Sanchez *et al* 2009).

Así mismo la muestra analizada en el presente estudio procedente del municipio de Socorro – Santander presento una menor CMI (99,21 $\mu\text{g}/\text{mL}$) que las procedentes del municipio de Pescadero. Si bien todas provenían del quimiotipo carvacrol, aquella procedente del municipio de Socorro contenía un porcentaje ligeramente mayor de carvacrol, lo cual refleja el impacto de las condiciones geobotánicas en las que se desarrolla la planta sobre la composición del aceite y por tanto de su actividad biológica. La actividad antimicobacteriana del carvacrol ya ha sido documentada obteniéndose valores de CMI de 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ frente a *M. tuberculosis* H37Rv, 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ frente a *M. chelonae* MNT 1407 (Bueno-Sanchez *et al.* 2009) y 72,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ *M. avium* subsp. *paratuberculosis* (Wong *et al.* 2008).

El efecto inhibitorio del crecimiento del aceite esencial de *E. citriodora* Hook sobre microorganismos patógenos ya ha sido reportado anteriormente (Akin-Osanaiye *et al.* 2007, Macedo *et al.* 2011, Luqman *et al.* 2008) y aunque su actividad antimicobacteriana se documentó frente a *M. smegmatis* a una CMI de 10 mg/mL , en el presente estudio se obtuvo un efecto inhibitorio sobre *M. tuberculosis* a 31,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

El potencial antibacteriano de *C. citratus* y *C. flexuosus* también se ha investigado previamente sobre bacterias como *S. aureus* y *E. coli* entre otras, encontrándose CMI entre 0,31 y 5 mg/mL y un mayor efecto sobre Gram positivos que sobre Gram negativos. El alto contenido de citral (70-80%), una mezcla de los aldehídos neral y geranial ha sido relacionado específicamente a estas dos especies por lo cual es ampliamente cultivado a nivel mundial. Se ha demostrado el efecto antimicrobiano positivo de estos dos componentes el cual a su vez es reforzado por la presencia del mirceno (Ordóñez *et al.* 2004, Negrelle *et al.* 2007, Naik *et al.* 2010, Adukwu *et al.* 2012, Machado *et al.* 2012).

Los datos obtenidos del AEs de *T. diffusa* analizado en el presente estudio, concuerdan con los reportados previamente donde se obtuvieron CMI entre 62,5 y 127 µg/mL para las cepas de *M. tuberculosis* H37Rv sensible y sus variantes resistentes ATCC35837, ATCC35838, ATCC35822 Y ATCC35820 (Bueno-Sánchez *et al.* 2011).

Los hallazgos de bioactividad de *C. citratus*, *C. flexuosus*, *E. citriodora* Hook y *T. diffusa* frente a *E. coli* y *S. aureus* son concordantes con los reportados anteriormente donde se ha obtenido un mayor efecto inhibitor frente a microorganismos Gram – positivos que frente a Gram – negativos (Luqman *et al.* 2008, Ordóñez *et al.* 2004, Naik *et al.* 2010).

El porcentaje de muerte bacteriana logrado con los AEs estudiados presentó un comportamiento dinámico aumentando en función del tiempo y la concentración utilizada. El efecto bactericida de *C. citratus* y *T. diffusa* da cuenta de su potencial como agentes antimicobacterianos. Un efecto similar fue observado en el estudio de Bueno Sánchez *et al.* 2009 donde se reporta el efecto bactericida de *T. diffusa* frente a *M. chelonae*.

La diferencia entre los efectos bactericida y bacteriostático de los AEs de la especie vegetal *Cymbopogon* puede deberse a las diferencias entre sus componentes mayoritarios y minoritarios así como a su proporción (Archila Calderon, 2008; Ordonez *et al.*, 2004).

A pesar de las diferencias en las CMI presentadas entre este estudio y otros diferentes reportes las cuales son atribuibles a las diferentes especies evaluadas de cada planta, el método de obtención del extracto y sus componentes, las cepas bacterianas empleadas así como el método de evaluación de la actividad biológica (United Nations Industrial Development Organization, 2005; Wei y Shibamoto, 2009; Archila Calderon, 2008; Leyva *et al.*, 2007; Bandoni, 2000; Stashenko y Combariza, 1998), cabe resaltar las similitudes en cuanto al efecto antimicobacteriano de los AEs y EVs aquí evaluados con los datos reportados en la literatura científica, lo cual da cuenta del gran potencial de estas sustancias como fuente de nuevos agentes anti TB.

Futuros estudios son requeridos para evaluar el efecto de los AEs probados sobre la pared celular micobacteriana. Adicionalmente es importante evaluar el efecto de los componentes individuales de cada AEs sobre *M. tuberculosis* así como las interacciones entre estos y los medicamentos antituberculosos de referencia para determinar los posibles efectos sinérgicos y aditivos que se pudieran presentar.

Finalmente se enfatiza en la relevancia que la información obtenida en la presente investigación representa para el conocimiento de las propiedades biológicas de especies vegetales endémicas del departamento de Santander, lo cual a su vez apoya las políticas nacionales que fomentan la caracterización de la biodiversidad colombiana.

9. CONCLUSIONES

La implementación de la metodología colorimétrica del MTT para el proceso de descubrimiento de nuevas sustancias bioactivas contra *M. tuberculosis* representa grandes ventajas sobre otros sistemas para la determinación de la bioactividad en términos de practicidad, costos y rapidez de los resultados.

Los resultados de actividad bactericida de los aceites *C. citratus* y *T. diffusa* contra *M. tuberculosis*, apoyan la continuidad de los estudios de descubrimiento y desarrollo de estas sustancias como agentes anti TB.

Los resultados de actividad bacteriostática de los aceites *C. flexuosus* y *E. citriodora* Hook contra *M. tuberculosis*, apoyan su perspectiva de uso dentro de diversos productos industriales no farmacológicos, como productos de limpieza e higiene y cuidado personal.

Se resalta la importancia de los datos obtenidos sobre la actividad biológica de las especies vegetales estudiadas ya que esto contribuye al conocimiento sobre sus potenciales usos como antimicrobianos.

Santander constituye una fuente de compuestos antimicobacterianos utilizables en diversas áreas conducentes al control y erradicación de la enfermedad, además de contar con las fuentes de financiación, la infraestructura y el potencial y capacidad investigativa para llevar a cabo y dar continuidad a los estudios de bioactividad.

10. DIVULGACIÓN

XII Seminario Internacional del Medio Ambiente y Desarrollo Sostenible “Ciencia y Tecnología para la Supervivencia”. Bucaramanga - Santander, Colombia. Agosto de 2011. Ponencia: “Bioactividad en bacterias de importancia clínica”.

CIPIASR- International Collaboration Forum. Octubre 2011. Indiana, USA. Indiana, USA. Octubre de 2011. Poster: Fabrication of antibacterial *Furcrea bedinghausii* fibers loaded with silver and copper nanoparticles and bioactivity of Colombian plants against *Mycobacterium tuberculosis*.

CIPIASR- International Collaboration Forum. Octubre 2011. Indiana, USA. Indiana, USA. Octubre de 2011. Poster: Bioactivity of Colombian plants against *Mycobacterium tuberculosis*.

Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology. Drug Resistance and Persistence in Tuberculosis. Kampala, Uganda. Mayo de 2012. Poster: Essential oils as an alternative source in searching for anti MDR-TB compounds.

International Congress: Tuberculosis, Leprosy and Mycobacteriosis: Back to Biblical times, Today Solutions. VI Meeting of the SLAMTB 2012. Bucaramanga, Colombia. Septiembre de 2012. Session: Bioactivity. Ponencia: “Bioactivity of tropical plants as a new source in the alternative therapeutics against *Mycobacterium tuberculosis*”.

BIBLIOGRAFÍA

A Medical Research Council Investigation. Streptomycin Treatment of Pulmonary Tuberculosis. En: *British medical journal* [En línea]. 1948, Vol. 2, no. 4582, pp. 769–7. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2091872/>.

A Medical Research Council Investigation. Treatment of Pulmonary Tuberculosis with Isonizid. En: *British medical journal*. 1952, Vol. 2, no. 4787, pp. 735–746.

A Medical Research Council Investigation. Isoniazid in Treatment of Pulmonary Tuberculosis. En: *British medical journal* [En línea]. 1953^a, Vol. 1, no. 4809, pp. 521–536. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2015509/>.

A Medical Research Council Investigation. Isoniazid in Combination with Streptomycin or with P.A.S. in the Treatment of Pulmonary Tuberculosis. En: *British medical journal* [En línea]. 1953^b, Vol. 2, no. 4844, pp. 1005–1014. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2030022/>.

ABATE, Getahun, *et al.* Drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated from re-treatment cases of pulmonary tuberculosis in Ethiopia: susceptibility to first-line and alternative drugs. En: *The international journal of tuberculosis and lung disease* [En línea]. July 1998, Vol. 2, no. 7, pp. 580–4. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9661826>.

ABATE, Getahun, *et al.* Direct Colorimetric Assay for Rapid Detection of Rifampin-Resistant *Mycobacterium tuberculosis*. En: *Journal of clinical microbiology*. 2004, Vol. 42, no. 2, pp. 871–873. DOI 10.1128/JCM.42.2.871.

ADUKWU, EC, ALLEN, SC y PHILLIPS, C.A. The anti-biofilm activity of lemongrass (*Cymbopogon flexuosus*) and grapefruit (*Citrus paradisi*) essential oils against five strains of *Staphylococcus aureus*. En: *Journal of Applied Microbiology* [En línea]. 2012, Vol. 113, no. 5, pp. 1217–1227. DOI 10.1111/j.1365-2672.2012.05418.x. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22862808#>.

AJIKUMAR, Parayil Kumaran, *et al.* Terpenoids : Opportunities for Biosynthesis of Natural Product Drugs Using Engineered Microorganisms. En: *Molecular Pharmaceutics*. 2008, Vol. 5, no. 2, pp. 167–190.

AKIN-OSANAIYE, B.C, AGBAJI, A.S y DAKARE, M.A. Antimicrobial Activity of Oils and Extracts of *Cymbopogon citratus* (Lemon Grass), *Eucalyptus citriodora* and *Eucalyptus camaldulensis*. En: *Journal of Medical Sciences* [En línea]. 2007,

Vol. 7, no. 4, pp. 694–697. DOI 10.3923/jms.2007.694.697. Disponible en: <http://scialert.net/abstract/?doi=jms.2007.694.697>.

ANOCHIE, P. I, *et al.* Anti- tuberculosis activities of medicinal plants used in the treatment of tuberculosis in HIV patients in Nigeria. En: *African Journal of Microbiology Research*. 2011, Vol. 5, no. 10, pp. 1126–1130.

ARCHILA CALDERÓN, Johanna Andrea. *Estudio de los metabolitos secundarios de los extractos y aceites esenciales de flores, hojas y tallos de YLANG-YLANG, y determinación de los ácidos grasos en sus semillas* [En línea]. UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER, 2008. Disponible en: http://cenivam.uis.edu.co/cenivam/infraestructura/cibimol/tesis_cibimol/JOhanna_Archila.pdf.

ARRIAZA, Bernardo T., *et al.* Pre-Columbian tuberculosis in Northern Chile: Molecular and skeletal evidence. En: *American Journal of Physical Anthropology*. 1995, Vol. 8, no. 1, pp. 37–45. DOI 10.1002/ajpa.1330980104.

ASIF, Siddiqui M, *et al.* Dataset of potential targets for *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv through comparative genome analysis Bioinformatics. En: *Bioinformaion* [En línea]. 2009, Vol. 2063, no. 6, pp. 245–248. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2951718/pdf/97320630004245.pdf>.

ASTRAZENECA ESPAÑA. Descubrimiento de nuevos fármacos. [En línea]. 2012. [Consultado 10 Junio 2012]. Disponible en: <http://www.astrazeneca.es/investigacion-desarrollo/nuevos-farmacos/>.

BANDONI, Arnaldo. (Ed). Los aceites esenciales. En: Los recursos vegetales aromáticos en latinoamérica, su aprovechamiento industrial para la producción de aromas y sabores, 1ª edición, Argentina, La Plata, 2000, p.p. 27-38.

BAQUERO, Eduard, *et al.* Actividad antimicobacteriana de algunas plantas de la flora colombiana. En: *Scientia et Technica* [En línea]. 2007, Vol. 1, no. 33, pp. 133–136. Disponible en: <http://revistas.utp.edu.co/index.php/revistaciencia/article/view/6157>.

BARONTI, A. y LUKINOVICH, N. A pilot trial of rifampicin in tuberculosis. En: *Tubercle*. 1968, Vol. 49, no. 2, pp. 180–186.

BASHFORD, Alison. Living with tuberculosis: the prehistory of HIV/AIDS. En: *The Lancet* [En línea]. Mayo 2010, Vol. 375, no. 9728, pp. 1774–1775. [Consultado 8 October 2012]. DOI 10.1016/S0140-6736(10)60794-5. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673610607945>.

BAYER, Donald y WILKINSON, David. Directly observed therapy for tuberculosis: history of an idea. En: *Lancet* [En línea]. 17 Junio 1995, Vol. 345, no. 8964, pp. 1545–8. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7677849>.

BERRIDGE, Michael V, *et al.* The Biochemical and Cellular Basis of Cell Proliferation Assays That Use Tetrazolium Salts. En: *Biochemica*. 1996, Vol. 4, pp. 4–9.

BETANCOURT, L, PHANDANAUVONG, V y PATIÑO, R. Composition and bactericidal activity against beneficial and pathogenic bacteria of oregano essential oils from four chemotypes of *Origanum* and *Lippia* Genus *Origanum* genus covers a wide range of more than 60 plant species used as spice . En: *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia*. 2012, Vol. 59, no. 1, pp. 21–31.

Biodiversidad en Cifras. [Página de internet del Sistema de información sobre biodiversidad en Colombia]. [Consultado 19 julio 2012]. Disponible en: http://www.siac.net.co:8088/web/sib/cifras#Biodiv_mundo

BORRERO, Reinier, *et al.* *Mycobacterium tuberculosis*: factores de virulencia. En: *VacciMonitor*. 2011, Vol. 20, no. 1, pp. 34–38.

BRITISH MEDICAL RESEARCH COUNCIL. Long-term chemotherapy of chronic tuberculosis with cavitation. En: *Tubercle*. 1962, Vol. 43, pp. 201–267.

BUENO-SÁNCHEZ, Juan Gabriel, *et al.* Anti-tubercular activity of eleven aromatic and medicinal plants occurring in Colombia. En: *Biomédica: revista del Instituto Nacional de Salud* [En línea]. Marzo 2009^a, Vol. 29, no. 1, pp. 51–60. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19753839>.

BUENO-SÁNCHEZ, Juan Gabriel, MARTÍNEZ-MORALES, Jairo René y STASHENKO, Elena E. Actividad antimicobacteriana de terpenos. En: *Salud UIS*. 2009^b, Vol. 41, pp. 231–235.

BUENO SÁNCHEZ, Juan Gabriel y KOUZNETSOV, Vladimir V. Antymicobacterial Susceptibility Testing Methods for Natural products Research. En: *Brazilian Journal of Microbiology*. 2010, Vol. 41, pp. 270–277.

BUENO-SÁNCHEZ, Juan Gabriel, *et al.* Composition of Three Essential Oils, and their Mammalian Cell Toxicity and Antimycobacterial Activity against Drug Resistant-Tuberculosis and Nontuberculous Mycobacteria Strains. En: *Natural Product Communications*. 2011, Vol. 6, no. 11, pp. 1743–1748.

BUENO-SÁNCHEZ, Juan Gabriel. Antitubercular *In Vitro* Drug Discovery: Tools for Begin the Search. In: PERE-JOAN CARDONA (ed.), *Understanding Tuberculosis -*

New Approaches to Fighting Against Drug Resistance [En línea]. 1th. Croatia: InTech, 2012. pp. 147–168. Disponible en: <http://www.intechopen.com/books/understanding-tuberculosis-new-approaches-to-fighting-against-drug-resistance/antitubercular-in-vitro-drug-discovery-tools-for-the-beginning-of-the-search>.

BURILLO, Jesús, VILA, *et al.* Extracción con dióxido de carbono supercrítico. In: DELLACASSA, Eduardo (ed.), *Normalización de productos naturales obtenidos de especies de la flora aromática latinoamericana latinoamericana*. Porto Alegre: Elsevier B.V., 2010. pp. 161–163. ISBN 9788539700530.

Burke, M. D. and Schreiber, S. L. A Planning strategy for diversity-oriented synthesis. En: *Angewandte Chemie International Edition.*, 2003, Vol. 43, no 43, pp. 46-58.

CABEZAS GUTIERREZ, Marco, *et al.* Dosel de tres especies forestales y su relación con la adaptación a suelos degradados por la erosión. En: *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica* [En línea]. 2008, Vol. 11, no. 2, pp. 175–185. Disponible en: http://www.scielo.unal.edu.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-42262008000200018&lng=pt&nrm=.

CAMINERO, José A. Origen, presente y futuro de las resistencias en tuberculosis. En: *Arch. Bronconeumol* [En línea]. 2001, Vol. 37, no. 1, pp. 35–42. Disponible en: http://www.archbronconeumol.org/watermark/ctl_servlet?_f=10&pident_articulo=13821&pident_usuario=0&pident_revista=6&fichero=6v37n035.pdf&ty=141&accion=L&origen=abn&web=www.archbronconeumol.org&lan=es.

CAMINERO, Jose A. La vieja batalla entre la especie humana y el bacilo de Koch . ¿Es posible soñar con erradicar la tuberculosis? En: *Anales Sis San Navarra* [En línea]. 2007, Vol. 30, no. 2, pp. 163–180. Disponible en: <http://scielo.isciii.es/pdf/asisna/v30s2/original11.pdf>.

CANETTI, G, *et al.* Mycobacteria: Laboratory Methods for Testing Drug Sensitivity and Resistance. En: *Bulletin of the World Health Organization* [En línea]. Enero 1963, Vol. 29, no. December 1961, pp. 565–78. Disponible en: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2555065&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

CANTRELL, C L, FRANZBLAU, S G and FISCHER, N H. Antimycobacterial plant terpenoids. En: *Planta medica* [En línea]. November 2001, Vol. 67, no. 8, pp. 685–94. DOI 10.1055/s-2001-18365. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11731906>.

CARTA, Antonio, *et al.* [1,2,3]Triazolo[4,5-h]quinolones. A new class of potent antitubercular agents against multidrug resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains. En: *Bioorganic & medicinal chemistry letters* [En línea]. 1 Septiembre 2007, Vol. 17, no. 17, pp. 4791–4. DOI 10.1016/j.bmcl.2007.06.064. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17604166>

CASTELLAR, Aline, *et al.* The activity of flavones and oleanolic acid from *Lippia lacunosa* against susceptible and resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains. En: *Brazilian Journal of Pharmacognosy* [En línea]. 2004, Vol. 25, no. 5, pp. 835–840. Disponible en: <http://www.scielo.br/pdf/rbfar/v21n5/aop7011.pdf>.

CAYLÁ, Joan, CAMINERO, José A y ANCOCHEA, Julio. Tuberculosis y solidaridad. En: *Archivos de Bronconeumología* [En línea]. Diciembre 2008, Vol. 44, no. 12, pp. 657–659. DOI 10.1016/S0300-2896(08)75773-9. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0300289608757739>.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Emergence of *Mycobacterium tuberculosis* with extensive resistance to second-line drugs worldwide. En: *Morbidity and Mortality weekly Report (MMWR)* [En línea]. 2006, Vol. 55, no. 11, pp. 301–305. Disponible en: <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5511a2.htm>.

CHIANG, Chen-Yuan, CENTIS, Rosella y MIGLIORI, Giovanni Battista. Drug-resistant tuberculosis: past, present, future. En: *Respirology (Carlton, Vic.)* [En línea]. Abril 2010, Vol. 15, no. 3, pp. 413–32. DOI 10.1111/j.1440-1843.2010.01738.x. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20337989>.

CLSI. *M07-A8. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard — Eighth Edition*. 8th. Wayne, PA.: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2009. ISBN 1562386891.

CLSI. *M100-S21 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-First Informational Supplement*. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2011. ISBN 1562387421.

COLL, Pere. Farmacos con actividad frente a *Mycobacterium tuberculosis*. En: *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica* [En línea]. Octubre 2009, Vol. 27, no. 8, pp. 474–80. DOI 10.1016/j.eimc.2009.06.010. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19766360>.

COLOMBIA. MINISTERIO DE SALUD. *Resolucion N° 8430 de 1993* [En línea]. 1993. República de Colombia. Disponible en: http://www.dib.unal.edu.co/promocion/etica_res_8430_1993.pdf.

COLOMBIA. MINISTERIO DEL MEDIO AMBIENTE, DEPARTAMENTO NACIONAL DE PLANEACIÓN and INSTITUTO “ALEXANDER VON HUMBOLDT.” *Política nacional de biodiversidad* [En línea]. 1995. República de Colombia: Disponible en: http://www.minambiente.gov.co/documentos/politica_nacional-biodiversidad.pdf.

COLOMBIA. MINISTERIO DE LA PROTECCIÓN SOCIAL REPÚBLICA DE COLOMBIA, INSTITUTO NACIONAL DE SALUD y ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. *Plan Estratégico Colombia Libre de Tuberculosis 2010-2015. Para la Expansión y Fortalecimiento de la Estrategia Alto a la TB.* [En línea]. Tercera Ed., 2009. ISBN 978-958-8472-09-6. Disponible en: http://new.paho.org/COL/index.php?option=com_content&view=article&id=431:plan-estrategico-colombia-libre-de-tuberculosis-2010-2015&catid=686&Itemid=361.

CORPE, Raymond F. y SANCHEZ, Elio S. Rifampin in initial treatment of advanced pulmonary tuberculosis. En: *Chest*. Junio 1972, Vol. 61, no. 6, pp. 564–73.

COWAN, Marjorie. Plant products as antimicrobial agents. En: *Clinical microbiology reviews* [En línea]. Octubre 1999, Vol. 12, no. 4, pp. 564–82. Disponible en: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=88925&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

DANIEL, Thomas M. The history of tuberculosis. En: *Respiratory medicine* [En línea]. Noviembre 2006, Vol. 100, no. 11, pp. 1862–70. DOI 10.1016/j.rmed.2006.08.006 Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16949809>.

DANIEL, Virginia S y DANIEL, Thomas M. Old Testament biblical references to tuberculosis. En: *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America* [En línea]. Diciembre 1999, Vol. 29, no. 6, pp. 1557–8. DOI 10.1086/313562. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10585812>.

DE SOUZA, Evandro Leite, *et al.* Influence of *Origanum vulgare* L. essential oil on enterotoxin production, membrane permeability and surface characteristics of *Staphylococcus aureus*. En: *International journal of food microbiology* [En línea]. 28 Febrero 2010, Vol. 137, no. 2-3, pp. 308–11. DOI 10.1016/j.ijfoodmicro.2009.11.025. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20015563>.

Diacon , A.; *et al.* 2009. The diarylquinoline TMC207 for multidrug-resistant tuberculosis. *N. Engl. J. Med.* Vol. 360, p. 2397-2405.

DONOGHUE, Helen D, *et al.* Tuberculosis in Dr Granville's mummy: a molecular re-examination of the earliest known Egyptian mummy to be scientifically examined and given a medical diagnosis. En: *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society* [En línea]. 7 Enero 2010, Vol. 277, no. 1678, pp. 51–6. DOI 10.1098/rspb.2009.1484. Disponible en: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2842630&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

DUA, Rajiv, SHRIVASTAVA, Suman, SONWANE, S K y SRIVASTAVA, S K. Pharmacological Significance of Synthetic Heterocycles Scaffold: A Review. En: *Advances in Biological Research*. 2011, Vol. 5, no. 3, pp. 120–144.

DUARTE G, Ignacio y LÓPEZ C, Marcelo. Importancia del reposo en los sanatorios para tuberculosos. En: *Revista chilena de infectología* [En línea]. Junio 2009, Vol. 26, no. 3, pp. 273–278. DOI 10.4067/S0716-10182009000400013. Disponible en: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182009000400013&lng=en&nrm=iso&tlng=en.

DUTT, Asim K., JONES, L. y STEAD, William W. Short-course chemotherapy of tuberculosis with largely twice-weekly isoniazid-rifampin. En: *Chest* [En línea]. 1 Abril 1979, Vol. 75, no. 4, pp. 441–447. DOI 10.1378/chest.75.4.441. Disponible en: <http://journal.publications.chestnet.org/article.aspx?doi=10.1378/chest.75.4.441>.

EKWEANI, C. N. Anti-tuberculous chemotherapy: 120 YEARS ON. En: *Annals of African Medicine*. 2004, Vol. 3, no. 3, pp. 116–119.

EL SAHLY, Hana M, *et al.* Incidence of moxifloxacin resistance in clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Houston, Texas. En: *Journal of clinical microbiology* [online]. Agosto 2011, Vol. 49, no. 8, pp. 2942–2945. DOI 10.1128/JCM.00231-11. Disponible en: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3147712&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

FADLI, Mariam, *et al.* Essential oils from Moroccan plants as potential chemosensitisers restoring antibiotic activity in resistant Gram-negative bacteria. En: *International journal of antimicrobial agents* [En línea]. Octubre 2011, Vol. 38, no. 4, pp. 325–30. DOI 10.1016/j.ijantimicag.2011.05.005. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21752605>.

FADLI, Mariam, *et al.* Antibacterial activity of *Thymus maroccanus* and *Thymus broussonetii* essential oils against nosocomial infection - bacteria and their synergistic potential with antibiotics. En: *Phytomedicine: international journal of phytotherapy and phytopharmacology* [En línea]. 15 Marzo 2012, Vol. 19, no. 5,

pp. 464–71. DOI 10.1016/j.phymed.2011.12.003. Disponible en:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22257599>.

FANG, Rendong, *et al.* Mixed infections of *Mycobacterium tuberculosis* in tuberculosis patients in Shanghai, China. En: *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)* [En línea]. Septiembre 2008, Vol. 88, no. 5, pp. 469–73. DOI 10.1016/j.tube.2008.02.002. Disponible en:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18424179>.

GABBRIELLI, G., *et al.* Activity of lavandino essential oil against non-tubercular opportunistic rapid grown mycobacteria. En: *Pharmacological Research Communications*. Diciembre 1988, Vol. 20, no. 5, pp. 37–40. DOI 10.1016/S0031-6989(88)80836-1.

Gatifloxacin. In: *Tuberculosis. Handbook of Anti-Tuberculosis Agents*. January 2012, Vol. 88, no. 2, pp. 109–111. DOI 10.1016/B978-0-12-397220-0.00005-2.

GAUTAM, Raju, SAKLANI, Arvind y JACHAK, Sanjay M. Indian medicinal plants as a source of antimycobacterial agents. En: *Journal of ethnopharmacology* [En línea]. 21 Marzo 2007, Vol. 110, no. 2, pp. 200–34. DOI 10.1016/j.jep.2006.12.031. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17276637>.

GINSBURG, Amy Sarah, *et al.* Emergence of Fluoroquinolone Resistance in *Mycobacterium tuberculosis* during Continuously Dosed Moxifloxacin Monotherapy in a Mouse Model. En: *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2005, Vol. 49, no. 9, pp. 3977–3979. DOI 10.1128/AAC.49.9.3977.

GÓMEZ-AYALA, Sandra, *et al.* Synthesis, structural elucidation and in vitro antiparasitic activity against *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania chagasi* parasites of novel tetrahydro-1-benzazepine derivatives. En: *Bioorganic & medicinal chemistry* [En línea]. 1 Julio 2010, Vol. 18, no. 13, pp. 4721–39. DOI 10.1016/j.bmc.2010.05.018. Disponible en:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20627590>.

GRAESSLE, Otto E y PIETROWSKI, Joseph J. The *in vitro* effect of para-aminosalicylic acid (pas) in preventing acquired resistance to streptomycin by *Mycobacterium tuberculosis*. In: *Journal of Bacteriology*. [En línea]. 1 Abril 1949, Vol. 57, no. 4, pp. 459–464. Disponible en:
<http://jb.asm.org/content/57/4/459.short>.

GROLL, Andrea von, *et al.* Growth Kinetics of *Mycobacterium Tuberculosis* Measured By Quantitative Resazurin Reduction Assay: A Tool For Fitness Studies. En: *Brazilian Journal of Microbiology*. 2010, Vol. 41, pp. 300–303.

GUPTA, U D y KATOCH, V M. Animal models of tuberculosis. En: *Tuberculosis* [En línea]. 2005, Vol. 85, pp. 277–93. DOI 10.1016/j.tube.2005.08.008. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16249122>.

GUTIERREZ, M. Cristina, *et al.* Ancient origin and gene mosaicism of the progenitor of *Mycobacterium tuberculosis*. En: *PLoS pathogens* [En línea]. Septiembre 2005, Vol. 1, no. 1, pp. e5. DOI 10.1371/journal.ppat.0010005. Disponible en: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1238740&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

GUZMAN, Juan D, *et al.* Anti-tubercular screening of natural products from Colombian plants: 3-methoxynordomesticine, an inhibitor of MurE ligase of *Mycobacterium tuberculosis*. En: *The Journal of antimicrobial chemotherapy* [En línea]. Octubre 2010, Vol. 65, no. 10, pp. 2101–7. DOI 10.1093/jac/dkq313. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20719764>.

HAYDEL, Shelley E. Extensively Drug-Resistant Tuberculosis: A Sign of the Times and an Impetus for Antimicrobial Discovery. En: *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)* [En línea]. 1 Julio 2010, Vol. 3, pp. 2268–2290. DOI 10.3390/ph3072268. Disponible en: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3002907&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

HENAO, Julieth, *et al.* Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos de la planta *Lippia origanoides* h . b . k . Cultivada en el departamento del Quindío. En: *Revista de Investigaciones Universidad del Quindío*. 2009, Vol. 19, pp. 159–164.

HENIE, E.F. P, ZAITON, H y SUHAILA, M. Bacterial membrane disruption in food pathogens by *Psidium guajava* leaf extracts. En: *International Food Research Journal*. 2009, Vol. 16, pp. 297–311.

HYDE, Leroy. Rifampin in the Treatment of Pulmonary Tuberculosis. En: *California Medicine* [En línea]. 1972, Vol. 117, no. 6, pp. 18–21. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1518748/pdf/califmed00120-0044.pdf>.

KALEMBA, D y KUNICKA, A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. En: *Current medicinal chemistry* [En línea]. Mayo 2003, Vol. 10, no. 10, pp. 813–29. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12678685>.

KAUFMANN, Stefan H.E. y HAHN, Helmut (eds.). *Mycobacteria and TB. Issues in Infectious Diseases, Vol. 2*. Berlin. 2003. ISBN 3805574592.

KIMMEY, James R. What Needs to be Done to Eradicate Tuberculosis. En: *American Journal of Public Health* [En línea]. 1972, Vol. 62, no. 2, pp. 127–129. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1530271/>.

KOCH, Roberth. *The_Etiology_of_TB.pdf* [En línea]. 1882. Disponible en: <http://202.114.65.51/fzjx/wsw/newindex/wswfzjs/pdf/1884p116.pdf>.

KOUL, Anil, ARNOULT, *et al.* The challenge of new drug discovery for tuberculosis. En: *Nature* [En línea]. 27 Enero 2011, Vol. 469, no. 7331, pp. 483–90. DOI 10.1038/nature09657. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21270886>.

LEITÃO, Suzana G, *et al.* Screening of Central and South American plant extracts for antimycobacterial activity by the Alamar Blue test. En: *Brazilian Journal of Pharmacognosy* [En línea]. 2006, Vol. 16, no. 1, pp. 6–11. Disponible en: <http://www.scielo.br/pdf/rbfar/v16n1/a02v16n1.pdf>.

LEYVA, Miguel Antonio, *et al.* Variación anual de la composición química del aceite esencial de flores de YLANG-YLANG (*Cananga odorata* Hook Fill et Thomson, forma genuina). En: *Scientia et Technica* [En línea]. 2007, Vol. XIII, no. 33, pp. 151–153. Disponible en: <http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=84903335#>.

LIPINSKI, Christopher A, *et al.* Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. En: *Advanced drug delivery reviews* [En línea]. 13 Septiembre 1997, Vol. 23, pp. 3–25. DOI 10.1016/j.addr.2012.09.019. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22983332>.

LIU, Kevin K-C, *et al.* Synthetic approaches to the 2009 new drugs. En: *Bioorganic & medicinal chemistry* [En línea]. 1 Febrero 2011, Vol. 19, no. 3, pp. 1136–54. DOI 10.1016/j.bmc.2010.12.038. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21256756>.

LOMBARDI, Guido P. y GARCIA CACERES, Uriel. Multisystemic tuberculosis in a pre-columbian Peruvian mummy: four diagnostic levels, and a paleoepidemiological hypothesis. En: *Chungará (Arica)* [En línea]. 2000, Vol. 32, no. 1, pp. 55–60. DOI 10.4067/S0717-73562000000100010. Disponible en: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-73562000000100010.

LORIAN, Victor y FINLAND, Maxwell. In vitro effect of rifampin on mycobacteria. In: *Applied microbiology* [En línea]. Febrero 1969, Vol. 17, no. 2, pp. 202–7. Disponible en:

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=377649&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

LUQMAN, S., *et al.* Antimicrobial activity of *Eucalyptus citriodora* essential oil. En: *International Journal of Essential Oil Therapeutics*. 2008, Vol. 2, pp. 69–75.

MACHADO, M, *et al.* Monoterpenic aldehydes as potential anti-Leishmania agents: activity of *Cymbopogon citratus* and citral on *L. infantum*, *L. tropica* and *L. major*. En: *Experimental parasitology* [En línea]. Marzo 2012, Vol. 130, no. 3, pp. 223–31. DOI 10.1016/j.exppara.2011.12.012. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22227102>.

MARTIN, Anandi, CAMACHO, Mirtha y PALOMINO, Juan Carlos. Resazurin Microtiter Assay Plate Testing of *Mycobacterium tuberculosis* Susceptibilities to Second-Line Drugs : Rapid , Simple , and Inexpensive Method. En: *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2003, Vol. 47, no. 11, pp. 3616–3619. DOI 10.1128/AAC.47.11.3616.

MARTIN, A, *et al.* Multicenter study of MTT and resazurin assays for testing susceptibility to first-line anti-tuberculosis drugs. En: *The international journal of tuberculosis and lung disease* [En línea]. Agosto 2005, Vol. 9, no. 8, pp. 901–6. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16104638>.

Matteelli, A.; *et al.* 2010. TMC207: the first compound of a new class of potent anti-tuberculosis drugs. En: *Future Microbiol*. Vol. 5, no.6, pp.849-58.

MCGAW, L J, *et al.* The potential of South African plants against *Mycobacterium* infections. En: *Journal of ethnopharmacology* [En línea]. 28 Octubre 2008, Vol. 119, no. 3, pp. 482–500. DOI 10.1016/j.jep.2008.08.022. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18805475>.

MÉDECINS SANS FRONTIÈRES. *DEVELOPMENT OF NEW DRUGS* [En línea]. Geneva. Médecins Sans Frontières Campaign for Access to Essential Medicines, 2006. Disponible en: http://www.msfaccess.org/sites/default/files/MSF_assets/TB/Docs/TB_report_CurrentDrugPipeline_ENG_2006.pdf.

MEYER, John a. Tuberculosis, the adirondacks, and coming of age for thoracic surgery. En: *The Annals of Thoracic Surgery*. Octubre 1991, Vol. 52, no. 4, pp. 881–885. DOI 10.1016/0003-4975(91)91240-V.

MITCHISON, Denis A. The diagnosis and therapy of tuberculosis during the past 100 years. En: *American journal of respiratory and critical care medicine* [En línea].

1 Abril 2005, Vol. 171, no. 7, pp. 699–706. DOI 10.1164/rccm.200411-1603OE. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15709048>.

MOHAMAD, Suriyati, *et al.* Antituberculosis potential of some ethnobotanically selected Malaysian plants. En: *Journal of ethnopharmacology* [En línea]. 16 Febrero 2011, Vol. 133, no. 3, pp. 1021–6. DOI 10.1016/j.jep.2010.11.037. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21094237>.

MONTORO, Ernesto, *et al.* Comparative evaluation of the nitrate reduction assay, the MTT test, and the resazurin microtitre assay for drug susceptibility testing of clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. En: *The Journal of antimicrobial chemotherapy* [En línea]. Abril 2005, Vol. 55, no. 4, pp. 500–5. DOI 10.1093/jac/dki023. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15731200>

Moxifloxacin. 2008. Tuberculosis. Vol. 88(2), p. 127–131.

MSHANA, Robert N, *et al.* Use of 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyl Tetrazolium Bromide for Rapid Detection of Rifampin-Resistant *Mycobacterium tuberculosis*. En: *Journal of clinical microbiology*. 1998, Vol. 36, no. 5, pp. 1214–1219.

MURRAY, John F. A century of tuberculosis. En: *American journal of respiratory and critical care medicine* [En línea]. 1 Junio 2004, Vol. 169, no. 11, pp. 1181–6. DOI 10.1164/rccm.200402-140OE. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15161611>.

MURUGASU-OEI, Bernadette y DICK, Thomas. Bactericidal activity of nitrofurans against growing and dormant *Mycobacterium bovis* BCG. En: *The Journal of antimicrobial chemotherapy* [En línea]. Diciembre 2000, Vol. 46, no. 6, pp. 917–9. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11102410>.

NAIK, Mohd Irfan, *et al.* Antibacterial activity of lemongrass (*Cymbopogon citratus*) oil against some selected pathogenic bacteria. En: *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. Agosto 2010, Vol. 3, no. 7, pp. 535–538. DOI 10.1016/S1995-7645(10)60129-0.

NAKATSU, Tetsuo, *et al.* Biological Activity of Essential Oils and Their Constituents. En: *Studies in Natural Products Chemistry*. 2000, Vol. 21, pp. 571–631.

NCCLS. *M26-A Methods for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents; Approve Guideline*. Wayne, PA: National committee for clinical laboratory standards, 1999. ISBN 1562383841.

NEGRELLE, R.R.B and GOMES, E.C. *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf : chemical composition and biological activities. En: *Revista Brasileira de Plantas Medicinales*. 2007, Vol. 9, no. 1, pp. 80–92.

ORDÓÑEZ, Marta Guerra, *et al.* Actividad antimicrobiana del aceite esencial y crema de *Cymbopogon citratus* (DC). Stapf. En: *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. 2004, Vol. 9, no. 2, pp. 7–12.

ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. *Plan regional de tuberculosis 2006-2012* [En línea]. Washington DC. 2006. Disponible en: <http://www.paho.org/Spanish/AD/DPC/CD/tb-reg-plan-2006-15.pdf>.

ÖZÇELİK, Didem, *et al.* Assessment of antioxidant, antibacterial, antimycobacterial, and antifungal activities of some plants used as folk remedies in Turkey against dermatophytes and yeast-like fungi. En: *Turkish Journal of Biology*. 2012, Vol. 36, pp. 1–15. DOI 10.3906/biy-1203-33.

PALMA, Alirio, YÉPES, Andrés Felipe, LEAL, Sandra Milena, CORONADO, Carlos Andrés and ESCOBAR, Patricia. Synthesis and in vitro activity of new tetrahydronaphtho[1,2-b]azepine derivatives against *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania chagasi* parasites. En: *Bioorganic & medicinal chemistry letters* [En línea]. 15 Abril 2009, Vol. 19, no. 8, pp. 2360–3. DOI 10.1016/j.bmcl.2008.05.013. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19321339>.

PALOMINO, Juan-carlos, *et al.* Resazurin Microtiter Assay Plate : Simple and Inexpensive Method for Detection of Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis* Resazurin Microtiter Assay Plate : Simple and Inexpensive Method for Detection of Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. En: *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2002, Vol. 46, no. 8, pp. 2720–2722. DOI 10.1128/AAC.46.8.2720.

PALOMINO, Juan Carlos, CARDOSO LEÃO, Sylvia y RITACCO, Viviana (eds.). *Tuberculosis 2007. From basic science to patient care* [En línea]. Firsth edi, 2007. Disponible en: www.TuberculosisTextbook.com.

PAULI, Alexander y SCHILCHER, Heinz. In vitro Antimicrobial Activities of Essential Oils Monographed in the European Pharmacopoeia 6th Edition. In: BASER, Husnu Can and BUCHBAUER, Gerhard (eds.), *Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Applications*. S.l.: CRC Press, 2009. pp. 353–547.

PAVAN, Fernando R., *et al.* In vitro anti-*Mycobacterium tuberculosis* activity of some Brazilian “Cerrado” plants. En: *Brazilian Journal of Microbiology* [En línea]. 2009, Vol. 19, no. 1B, pp. 204–206. Disponible en: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102-95X2009000200004&script=sci_arttext.

PAVAN, Fernando R., *et al.* Thiosemicarbazones, semicarbazones, dithiocarbazates and hydrazide/hydrazones: anti-*Mycobacterium tuberculosis* activity and cytotoxicity. En: *European journal of medicinal chemistry* [En línea]. Mayo 2010, Vol. 45, no. 5, pp. 1898–905. DOI 10.1016/j.ejmech.2010.01.028. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20163897>.

PAVAN, Fernando R, SATO, Daisy N and LEITE, Clarice Q F. Approach to the Search for New Drugs Against Tuberculosis. En: CARDONA, Pere-Joan (ed.), *UNDERSTANDING TUBERCULOSIS – NEW APPROACHES TO FIGHTING AGAINST Drug resistance* [En línea]. 1th. Croatia: InTech, 2012. pp. 137–146. ISBN 9789533079486. Disponible en: www.intechopen.com.

PAWLOWSKI, Andrzej, *et al.* Tuberculosis and HIV co-infection. En: *PLoS pathogens* [En línea]. Febrero 2012, Vol. 8, no. 2, pp. e1002464. DOI 10.1371/journal.ppat.1002464. Disponible en: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3280977&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

PEREZ CRUZ, Hayvin, *et al.* Historia de la lucha antituberculosa. En: *Rev haban cienc méd* [En línea]. 2009, Vol. 8, no. 2, pp. 0–0. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/rhcm/v8n2/rhcm03209.pdf>.

PERKINS, James E. Can tuberculosis be eradicated? En: *Public health reports* [En línea]. Mayo 1963, Vol. 78, no. 5, pp. 419–22. Disponible en: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1915263&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

PETERSON, L R. Quinolone molecular structure-activity relationships: what we have learned about improving antimicrobial activity. En: *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America* [En línea]. 15 Septiembre 2001, Vol. 33 Suppl 3, no. 3, pp. S180–6. DOI 10.1086/321846. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11524717>.

POISSY, Julien, *et al.* Should moxifloxacin be used for the treatment of extensively drug-resistant tuberculosis? An answer from a murine model. En: *Antimicrobial agents and chemotherapy* [En línea]. Noviembre 2010, Vol. 54, no. 11, pp. 4765–71. DOI 10.1128/AAC.00968-10. Disponible en: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2976119&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

PONTINO, M V, Giulio, *et al.* Evaluación de un micrométodo colorimétrico para determinar la concentración inhibitoria mínima de drogas antituberculosas frente a

Mycobacterium tuberculosis. En: *Revista Argentina de Microbiología*. 2006, Vol. 38, pp. 145–151.

PRIMM, Todd P. y FRANZBLAU, Scott G. Recent Advances in Methodologies for the Discovery of Antimycobacterial Drugs. En: *Current Bioactive Compounds* [En línea]. 1 Septiembre 2007, Vol. 3, no. 3, pp. 201–208. DOI 10.2174/157340707781695550. Disponible en: <http://openurl.ingenta.com/content/xref?genre=article&issn=1573-4072&volume=3&issue=3&spage=201>.

QIU, Jiazhang, *et al.* Subinhibitory concentrations of perilla oil affect the expression of secreted virulence factor genes in *Staphylococcus aureus*. En: *PloS one* [En línea]. Enero 2011, Vol. 6, no. 1, pp. e16160. DOI 10.1371/journal.pone.0016160. Disponible en: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3023776&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

RAMOS MENDONÇA-FILHO, Ricardo. Bioactive Phytocompounds: New Approaches in the Phytosciences. En: AHMAD, I., AQIL, F. and OWAIS, M. (eds.), *Modern Phytomedicine. Turning Medicinal Plants into Drugs* [En línea]: WILEY-VCH, 2006. pp. 1–24. ISBN 3527315306. Disponible en: http://media.johnwiley.com.au/product_data/excerpt/06/35273153/3527315306.pdf.

Ravaschino, E. L. 2007. Diseño racional de drogas: en busca de la droga ideal. *Química Viva*. Vol. 3, p. 91–103.

REYES, Johan Augusto y PORRAS, José Gregorio. comparación de los metabolitos secundarios volátiles de dos especies de *Ocimum sp.* (labiatae), en función del método de su extracción y estudio de las actividades antioxidante, citotóxica y antifúngica [En línea]. UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER, 2007. Disponible en: http://cenivam.uis.edu.co/cenivam/infraestructura/cibimol/tesis_cibimol/JohanReyes_y_Gregorio_Pati%C3%B1o.pdf.

RICHARDS, Duncan. Drug development and regulation. En: *Medicine* [En línea]. Julio 2008, Vol. 36, no. 7, pp. 369–376. DOI 10.1016/j.mpmed.2008.04.007. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1357303908001163>.

RIVERS, Emma C y MANCERA, Ricardo L. New anti-tuberculosis drugs in clinical trials with novel mechanisms of action. En: *Drug discovery today* [En línea]. Diciembre 2008, Vol. 13, no. 23-24, pp. 1090–8. DOI 10.1016/j.drudis.2008.09.004. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18840542>.

ROMERO, Milton Hernán, CABRERA, Edersson y ORTÍZ, Néstor. *Informe sobre el estado de la biodiversidad en Colombia*. Bogotá D.C: Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt, 2008. ISBN 9789588343228.

ROSENBLATT, Milton B. Pulmonary tuberculosis: evolution of modern therapy. In: *Bulletin of the New York Academy of Medicine* [En línea]. 1973, Vol. 49, no. 3, pp. 163–196. Disponible en: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1806933&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

SCHUTZ, C, *et al.* Clinical management of tuberculosis and HIV-1 co-infection. En: *The European respiratory journal: official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology* [En línea]. Diciembre 2010, Vol. 36, no. 6, pp. 1460–81. DOI 10.1183/09031936.00110210. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20947678>.

SCHWARTZ, Joseph A. Comparative Efficacy of the Concurrent Use of Pyrazinamide and Isoniazid with That of Other Forms of Therapy in the Treatment of Pulmonary Tuberculosis the Concurrent Use of with That of Other in the Treatment Tuberculosis. En: *Dis Chest* [En línea]. 1957, Vol. 32, pp. 455–459. DOI 10.1378/chest.32.4.455. Disponible en: <http://chestjournal.chestpubs.org/content/32/4/445>.

Schreiber, Stuart L. 2000. Target-oriented and diversity-oriented organic synthesis in drug discovery. En: *Science*. Vol. 287, p. 1964-1969.

SENTHILKUMAR, Palaniappan, *et al* Antimycobacterial activities of novel fluoroquinolones. En: *Biomedicine & pharmacotherapy* [En línea]. Enero 2009, Vol. 63, no. 1, pp. 27–35. DOI 10.1016/j.biopha.2007.10.004. Disponible en : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18031974>.

SETO, Masaki, *et al.* Orally active CCR5 antagonists as anti-HIV-1 agents. Part 3: Synthesis and biological activities of 1-benzazepine derivatives containing a sulfoxide moiety. En: *Bioorganic & medicinal chemistry* [En línea]. 17 Enero 2005, Vol. 13, no. 2, pp. 363–86. DOI 10.1016/j.bmc.2004.10.021. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15598559>.

Seventh Report to the Medical Research Council. Various Combinations of Isoniazid with Streptomycin or with P.A.S. in the Treatment of Pulmonary Tuberculosis. En: *British medical journal* [En línea]. 1955, Vol. 1, no. 4911, pp. 435–445. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2061210/>.

SHAMPUTA, Isdore C, *et al.* Mixed infection and clonal representativeness of a single sputum sample in tuberculosis patients from a penitentiary hospital in

Georgia. En: *Respiratory research* [En línea]. Enero 2006, Vol. 7, pp. 99. DOI 10.1186/1465-9921-7-99. Disponible en: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1538999&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

SHOWALTER, H D Hollis y DENNY, William a. A roadmap for drug discovery and its translation to small molecule agents in clinical development for tuberculosis treatment. En: *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)* [En línea]. Agosto 2008, Vol. 88 no. 1, pp. S3–17. DOI 10.1016/S1472-9792(08)70032-5. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18762151>.

SOTOMAYOR, Hugo, BURGOS, Javier y ARANGO, Magnolia. Demostración de tuberculosis en una momia prehispánica colombiana por la ribotipificación del ADN de *Mycobacterium tuberculosis*. En: *Biomédica: revista del Instituto Nacional de Salud* [En línea]. 2004, Vol. 24, no. 1, pp. 18–26. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-41572004000500004&lng=en&nrm=iso.

SRIRAM, Dharmarajan, *et al.* 5-Nitrofurán-2-yl derivatives: synthesis and inhibitory activities against growing and dormant mycobacterium species. En: *Bioorganic & medicinal chemistry letters* [En línea]. 15 Febrero 2009, Vol. 19, no. 4, pp. 1152–4. DOI 10.1016/j.bmcl.2008.12.088. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19131245>.

Stashenko, Elena E., *et al.* “HRGC and GC-MS analysis of essential oil from Colombian ylang-ylang (*Cananga odorata* Hook Fil. Et Thomson, formagenuine)” En: *Journal of High Resolution Chromatography*. 1993. Vol. 16, pp. 441-444.

Stashenko, Elena E., Quiroz, N. y Martínez, J.R. “HRGC/FID/ NPD and HRGC/MSD study of Colombian ylang-ylang (*Cananga odorata*) oils obtained by different extraction techniques”, En: *Journal of High Resolution Chromatography*. 1996. Vol. 19, pp. 353-358.

STASHENKO, Elena E., COMBARIZA, Yajaira. Aceites esenciales: técnicas de extracción y análisis. UIS. Facultad de Ciencias. Bucaramanga, 1998.

STASHENKO, Elena E, JARAMILLO, Beatriz E y MARTÍNEZ, Jairo R. Comparación de la composición química y de la actividad antioxidante *in vitro* de los metabolitos secundarios volátiles de plantas de la familia *Verbenaceae*. En: *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales* [En línea]. 2003, Vol. 27, no. 105, pp. 579–597. Disponible en: http://www.accefyn.org.co/revista/Vol_27/105/8-COMPARACION.pdf.

STASHENKO, Elena E. Estudio comparativo de la composición y actividad biológica de aceites esenciales de *Lippia alba*, de diferentes regiones de Colombia. En: DELLACASSA, Eduardo (ed.), *Normalización de productos naturales obtenidos de especies de la flora aromática latinoamericana latinoamericana*. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2010. pp. 173–191. ISBN 9788539700530.

TAMIMI, Nihad A. M y ELLIS, Peter. Drug development: from concept to marketing! In: *Nephron. Clinical practice* [En línea]. Enero 2009, Vol. 113, no. 3, pp. c125–31. DOI 10.1159/000232592. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19729922>.

Tahara, A, *et al.* 2007. Effect of YM218, a nonpeptide vasopressin V_{1A} receptor-selective antagonist, on rat mesangial cell hyperplasia and hypertrophy. *Vascul Pharmacol*. Vol. 46, p. 463–469.

TB ALLIANCE. *TB Alliance Pipeline* [En línea]. 2012. Disponible en: <http://www.tballiance.org/downloads/Pipeline/TBA-Pipeline-May-2012.pdf>.

Tsukada, K.; *et al.* 2005. Pharmacologic properties of YM218, a novel, potent, nonpeptide vasopressin V_{1A} receptor-selective antagonist. *Vascul Pharmacol*. Vol. 42, p. 47–55.

Tuberculosis Chemotherapy Centre Madras. A concurrent comparison of home and sanatorium treatment of pulmonary tuberculosis in South India. In: *Bull World Health Organ* [En línea]. 1959, Vol. 21, no. 1, pp. 51–144. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2537809/>.

UDWADIA, Zarir, *et al.* Totally Drug-Resistant Tuberculosis in India. En: *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America* [En línea]. 2011. DOI 10.1093/cid/cir889. Disponible en: <http://cid.oxfordjournals.org/cgi/content/long/cir889v1>.

UNITED NATIONS INDUSTRIAL DEVELOPMENT ORGANIZATION, Food and Agriculture Organization of The United Nations. *Herbs , spices and essential oils* [online]. Vienna., 2005. Available from: http://www.unido.org/fileadmin/user_media/Publications/Pub_free/Herbs_spices_and_essential_oils.pdf.

VELAYATI, Ali Akbar, *et al.* Emergence of new forms of totally drug-resistant tuberculosis bacilli: super extensively drug-resistant tuberculosis or totally drug-resistant strains in iran. En: *Chest* [En línea]. Agosto 2009, Vol. 136, no. 2, pp. 420–5. DOI 10.1378/chest.08-2427. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19349380>.

VERPOORTE, R, KIM, H K y CHOI, Y H. Plants as a source of medicines. En: BOGERS, R. B, CRAKER, L. E y LANGE, D. (eds.), *Medical and aromatic plants*. Netherlands: Springer, 2006. pp. 261–273.

VILLEMAGNE, Baptiste, *et al.* Tuberculosis: the drug development pipeline at a glance. En: *European journal of medicinal chemistry* [En línea]. Mayo 2012, Vol. 51, pp. 1–16. DOI 10.1016/j.ejmech.2012.02.033. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22421275>.

VON GROLL, Andrea, *et al.* Fluoroquinolone resistance in *Mycobacterium tuberculosis* and mutations in *gyrA* and *gyrB*. En: *Antimicrobial agents and chemotherapy* [En línea]. Octubre 2009, Vol. 53, no. 10, pp. 4498–500. DOI 10.1128/AAC.00287-09. Disponible en: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2764174&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

WAKSMAN, Selman A., REILLY, H. Christine y JOHNSTONE, Donald B. Isolation of Streptomycin-producing Strains of *Streptomyces griseus*. En: *Journal of Bacteriology* [En línea]. 1 Septiembre 1946, Vol. 52, no. 3, pp. 393–397. Disponible en: <http://jlb.asm.org/content/52/3/393.short>.

WAKSMAN, Selman A. Streptomycin: background, isolation, properties, and utilization. En: *Science (New York, N.Y.)* [En línea]. 4 Septiembre 1953, Vol. 118, no. 3062, pp. 259–66. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13089668>.

WARREN, Peter. The evolution of the sanatorium: the first half-century, 1854-1904. En: *Canadian bulletin of medical history = Bulletin canadien d'histoire de la médecine* [En línea]. Enero 2006, Vol. 23, no. 2, pp. 457–76. Disponible en: <http://www.cbmh.ca/index.php/cbmh/article/view/1239/1230>.

Wei, Alfreda y Shibamoto, Takayuki. Medicinal Activities of Essential Oils: Role in Disease Prevention. En: Ronald Ross Watson and Victor R. Preedy. *Bioactive Foods in Promoting Health*. Academic Press, 19 October 2009. p. 59-70.

WONG, Stella Y Y, *et al.* Antibacterial activities of naturally occurring compounds against *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. En: *Applied and environmental microbiology* [En línea]. Octubre 2008, Vol. 74, no. 19, pp. 5986–90. DOI 10.1128/AEM.00981-08. Disponible en: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2565950&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

WORLD ECONOMIC FORUM. *Protecting Your Workforce from Tuberculosis A Toolkit for an Integrated Approach to TB and HIV for Businesses in South Africa*

[En línea]. Geneva. 2008. Disponible en: https://members.weforum.org/pdf/GHI/TB_Protecting_workforce.pdf.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. *TB/HIV: A clinical manual*. 2th. Geneva: World Health Organization, 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. *The stop TB strategy. Building on and enhancing DOTS to meet the TB-related Millennium Development Goals* [En línea]. 2006^a. Disponible en: http://www.ghdonline.org/uploads/WHO_HTM_STB_2006.368_eng.pdf.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Ethambutol efficacy and toxicity: Ethambutol efficacy and toxicity: En: *Ethambutol efficacy and toxicity: literature review and recommendations for daily and intermittent dosage in children*. [En línea]. 2006^b. pp. 1–2. Disponible en: http://www.who.int/maternal_child_adolescent/documents/htm_tb_2006_365/en/index.html.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Multidrug and extensively drug-resistant TB (M/XDR-TB): 2010 global report on surveillance and response*. [En línea]. 2010. Disponible en: http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241599191_eng.pdf.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. *THE GLOBAL PLAN TO STOP TB 2011-2015. Transforming the Fight. TOWARDS ELIMINATION OF TUBERCULOSIS*. Geneva. 2011^a.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, UNAIDS and UNICEF. *Global hiv/aids response. Epidemic update and health sector progress towards Universal Access. Progress Report 2011*. [En línea]. 2011^b. Disponible en: http://www.unaids.org/en/media/unaids/contentassets/documents/unaidspublication/2011/20111130_UA_Report_en.pdf.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Global Tuberculosis Report 2012* [En línea]. 2012. Disponible en: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/75938/1/9789241564502_eng.pdf.

YAMAMURA, Y, *et al.* OPC-41061, a highly potent human vasopressin V2-receptor antagonist: pharmacological profile and aquaretic effect by single and multiple oral dosing in rats. En: *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* [En línea]. Diciembre 1998, Vol. 287, no. 3, pp. 860–7. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9864265>.

ZANETTI, Stefania, *et al.* Evaluation of the Antimicrobial Properties of the Essential Oil of *Myrtus communis* L. against Clinical Strains of *Mycobacterium spp.* En:

Interdisciplinary perspectives on infectious diseases [En línea]. Enero 2010, Vol. 2010, pp. 1–3. DOI 10.1155/2010/931530. Disponible en: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2914267&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

ZINK, Albet, *et al.* Molecular analysis of skeletal tuberculosis in an ancient Egyptian population. En: *Journal of medical microbiology* [En línea]. Abril 2001, Vol. 50, no. 4, pp. 355–66. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11289521>.

**ANEXO A Tablas consolidadas de resultados de bioactividad de
moléculas sintéticas, aceites esenciales y extractos vegetales
frente a *Mycobacterium tuberculosis***

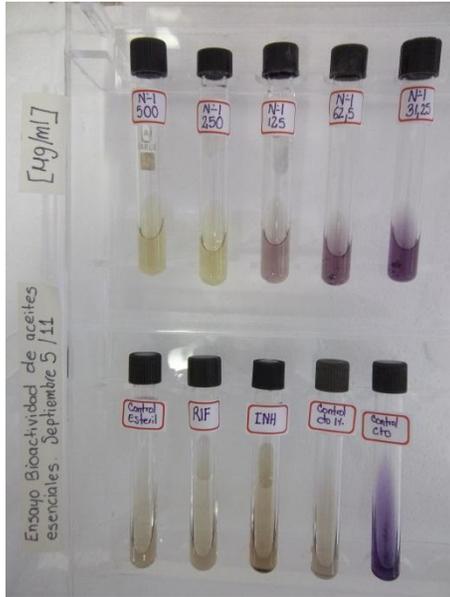
Resultados de bioactividad de la fase 2 de moléculas sintéticas contra *Mycobacterium tuberculosis*

Moléculas Fase 2	Replica 1																				
	64			32			16			8			4			2			1		
	P1	P2	P3	P1	P2	P3	P1	P2	P3	P1	P2	P3	P1	P2	P3	P1	P2	P3	P1	P2	P3
	64	64	64	32	32	32	16	16	16	8	8	8	4	4	4	2	2	2	1	1	1
AF174	B	B	B	NB																	
SAM99	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LIA4P	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Moléculas Fase 2	Replica 2																				
	64			32			16			8			4			2			1		
	P1	P2	P3	P1	P2	P3	P1	P2	P3	P1	P2	P3	P1	P2	P3	P1	P2	P3	P1	P2	P3
	64	64	64	32	32	32	16	16	16	8	8	8	4	4	4	2	2	2	1	1	1
AF174	B	B	B	NB																	
SAM99	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LIA4P	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Moléculas Fase 2	Replica 3																				
	64			32			16			8			4			2			1		
	P1	P2	P3	P1	P2	P3	P1	P2	P3	P1	P2	P3	P1	P2	P3	P1	P2	P3	P1	P2	P3
	64	64	64	32	32	32	16	16	16	8	8	8	4	4	4	2	2	2	1	1	1
AF174	B	B	B	B	B	B	NB														
SAM99	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LIA4P	NB	B	NB	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-						

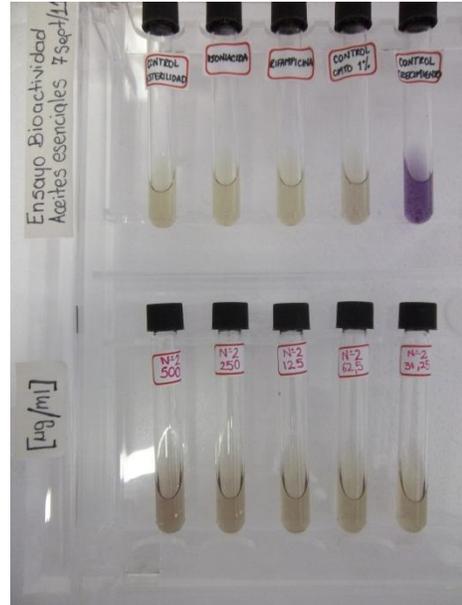
B: bioactivo; NB: no bioactivo. Concentraciones en µg/mL. P1: prueba 1. P2: prueba 2. P3: prueba 3.

**ANEXO B Evidencias fotográficas de los
ensayos de bioactividad de moléculas
sintéticas, aceites esenciales y extractos
vegetales frente a *Mycobacterium
tuberculosis* y *Staphylococcus aureus***

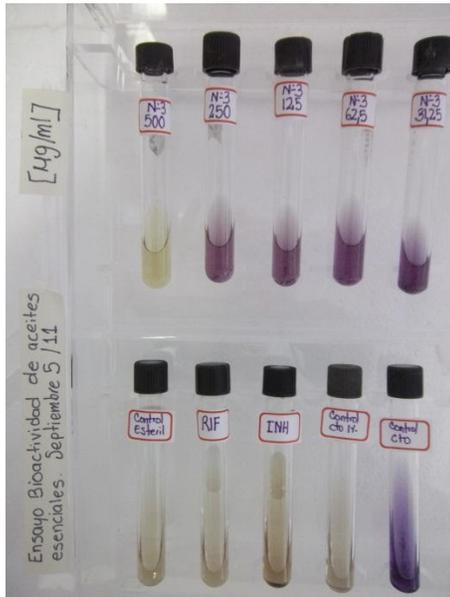
**Evidencias fotográficas de los ensayos de bioactividad de aceites esenciales
contra *Mycobacterium tuberculosis***



Nº1 *Tagetes lucida Cav*



Nº 2 *Cymbopogon citratus*



Nº3 *Rosmarinus officinalis*



Nº4 *Turnera diffusa*

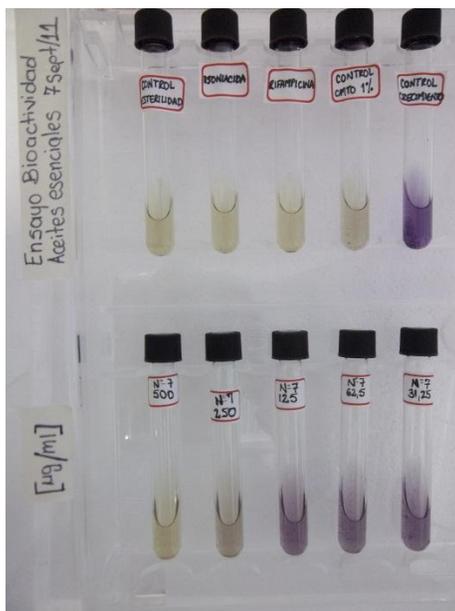
**Evidencias fotográficas de los ensayos de bioactividad de aceites esenciales
contra *Mycobacterium tuberculosis***



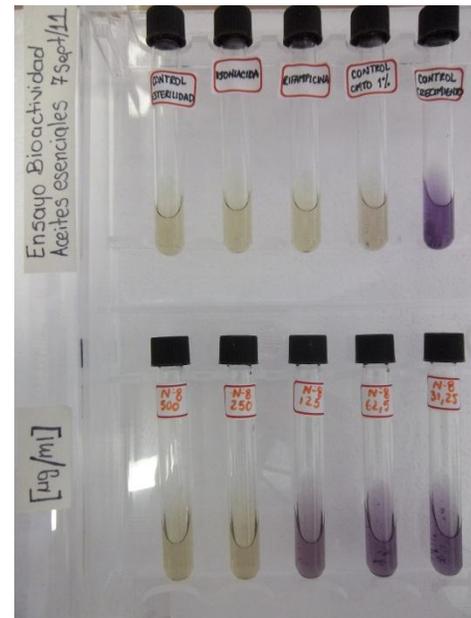
N° 5 *Cymbopogon flexuosus*



N° 6 *Lippia alba Mill*



N° 7 *Citrus scinensis Osbeck*

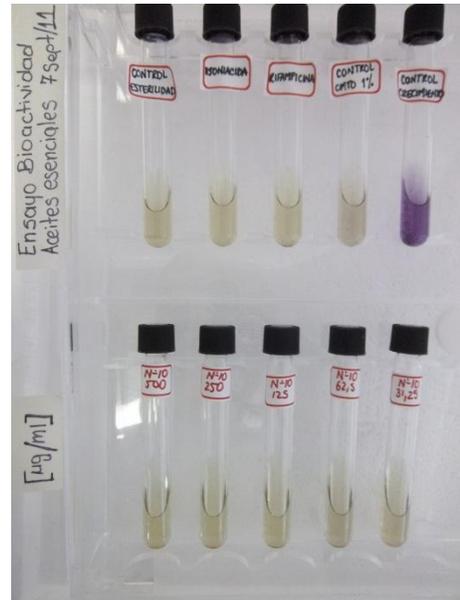


N° 8 *Swinglea glutinosa*

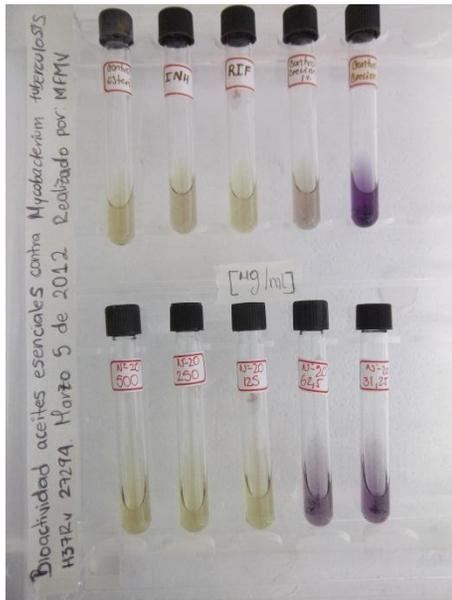
**Evidencias fotográficas de los ensayos de bioactividad de aceites esenciales
contra *Mycobacterium tuberculosis***



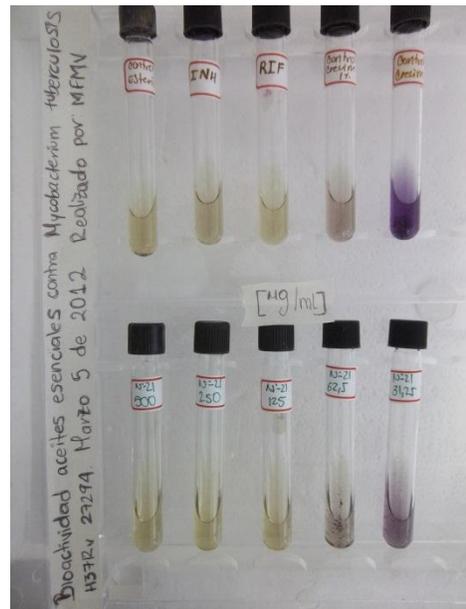
Nº 9 *Cananga odorata*



Nº 10 *Eucaliptus citriodora* Hook

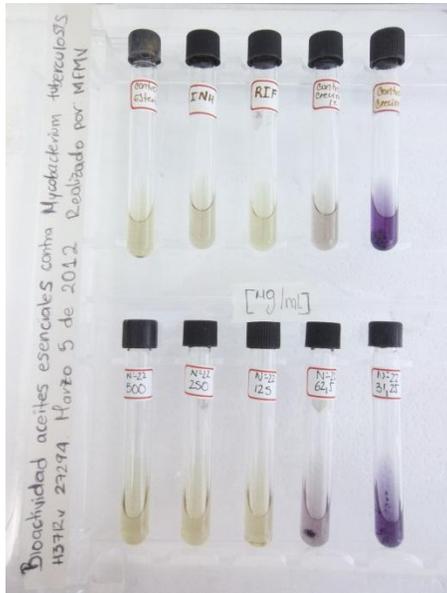


Nº 20 *Lippia organoides* "Socorro"



Nº 21 *Lippia organoides* "Piedecuesta"

**Evidencias fotográficas de los ensayos de bioactividad de aceites esenciales
contra *Mycobacterium tuberculosis***



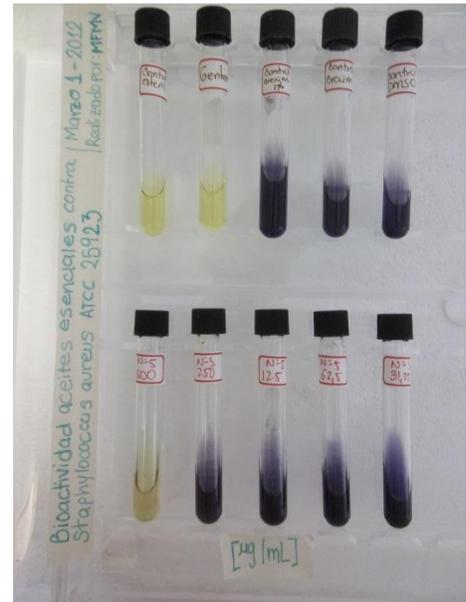
Nº 22 *Lippia origanoides* "Piedecuesta"

Nº 23 *Lippia origanoides* "Piedecuesta"

**Evidencias fotográficas de los ensayos de bioactividad de aceites esenciales
contra *Staphylococcus aureus***

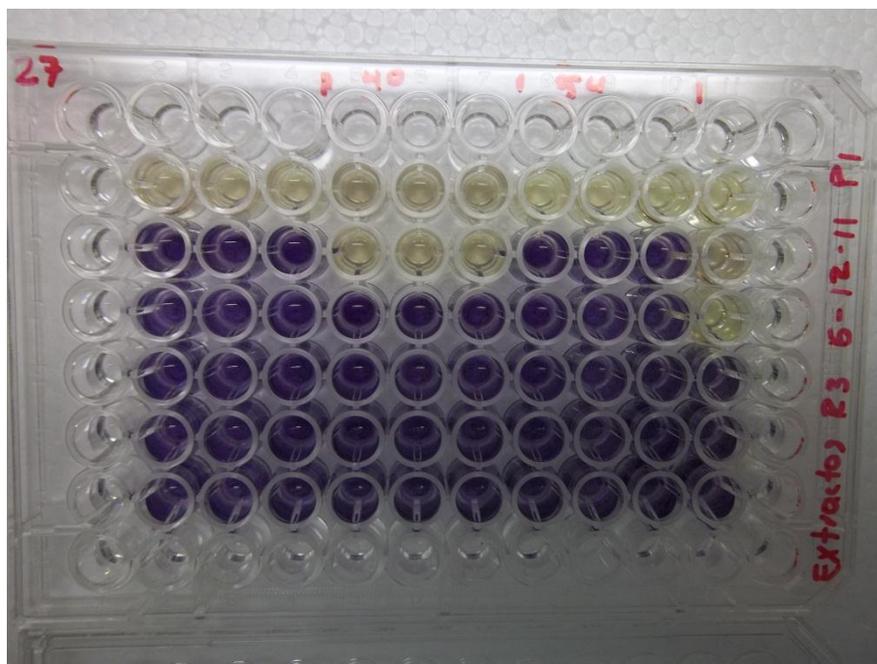


Nº 2 *Cymbopogon citratus*

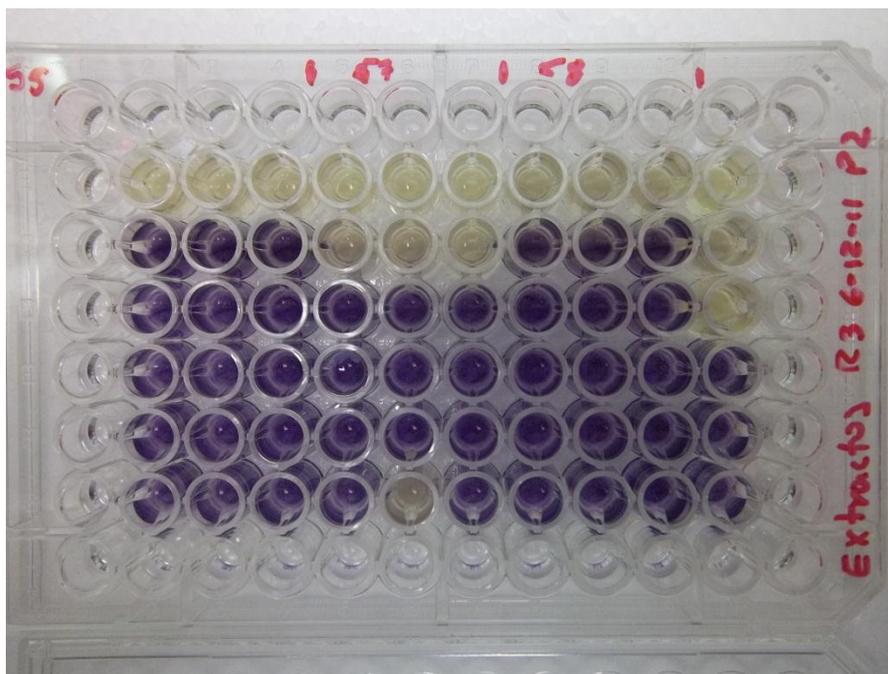


Nº 5 *Cymbopogon flexuosus*

Evidencias fotográficas de los ensayos de bioactividad de extractos vegetales contra *Mycobacterium tuberculosis*

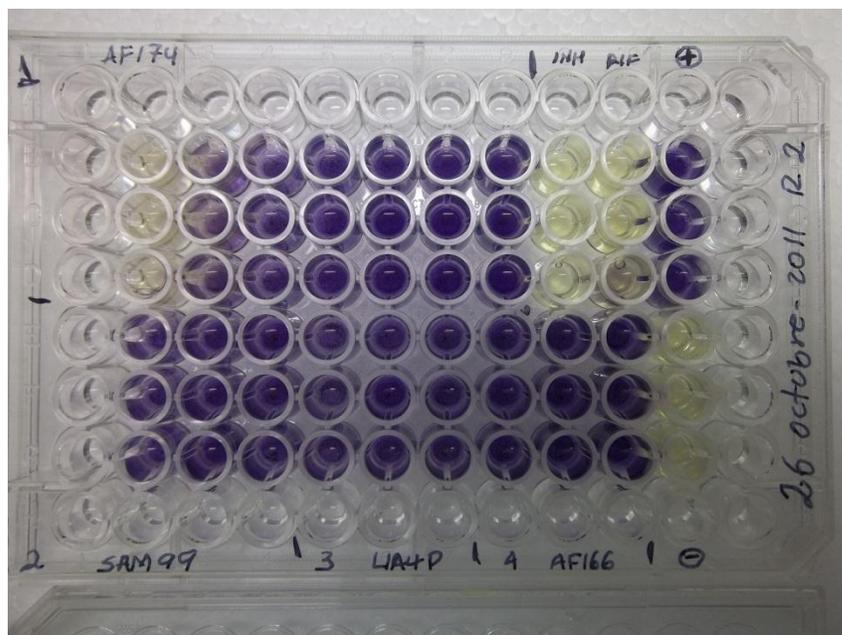


N° 27 *Baccharis aff. Buddleioides*; N° 40 *Salvia officinalis*; N° 54 *Wedelia calycina*



N° 55 *Nectranda reticulata*; N° 57 *Escallonia pendula*; N° 58 *Lippia organoides*

**Evidencia fotográfica de los ensayos de bioactividad moléculas sintéticas
contra *Mycobacterium tuberculosis***



N°1: AF174; N° 2: SAM99; N° 3: LIA4P; N° 4: AF166

**ANEXO C Tablas consolidadas de resultados
de bioactividad de las moléculas sintéticas,
Aceites esenciales y extractos vegetales**

**Conteo de unidades formadoras de colonia del ensayo de curvas de letalidad
en los cultivos correspondientes al control de crecimiento de
*Mycobacterium. tuberculosis***

Control de crecimiento			
Tiempo	Dilución	Tubo	UFC
0	100	1	> 100
0	100	2	> 100
0	100	3	> 100
0	10000	1	18
0	10000	2	19
0	10000	3	18
2	100	1	> 100
2	100	2	> 100
2	100	3	> 100
2	10000	1	10
2	10000	2	12
2	10000	3	11
4	100	1	> 100
4	100	2	> 100
4	100	3	> 100
4	10000	1	10
4	10000	2	10
4	10000	3	9
6	100	1	> 100
6	100	2	> 100
6	100	3	> 100
6	10000	1	12
6	10000	2	13
6	10000	3	12

Conteo de unidades formadoras de colonia del ensayo de curvas de letalidad frente a *Mycobacterium tuberculosis* en los cultivos correspondientes a los controles de rifampicina e isoniacida

Rifampicina					Isoniacida				
Tiempo	Concentración	Dilución	Tubo	UFC	Tiempo	Concentración	Dilución	Tubo	UFC
0	0,25	100	1	> 100	0	0,125	100	1	> 100
0	0,25	100	2	> 100	0	0,125	100	2	> 100
0	0,25	100	3	> 100	0	0,125	100	3	> 100
0	0,25	10000	1	6	0	0,125	10000	1	11
0	0,25	10000	2	10	0	0,125	10000	2	16
0	0,25	10000	3	7	0	0,125	10000	3	14
2	0,25	100	1	50	2	0,125	100	1	24
2	0,25	100	2	32	2	0,125	100	2	25
2	0,25	100	3	41	2	0,125	100	3	21
2	0,25	10000	1	1	2	0,125	10000	1	0
2	0,25	10000	2	1	2	0,125	10000	2	0
2	0,25	10000	3	2	2	0,125	10000	3	0
4	0,25	100	1	9	4	0,125	100	1	14
4	0,25	100	2	6	4	0,125	100	2	18
4	0,25	100	3	3	4	0,125	100	3	18
4	0,25	10000	1	0	4	0,125	10000	1	0
4	0,25	10000	2	0	4	0,125	10000	2	0
4	0,25	10000	3	0	4	0,125	10000	3	0
6	0,25	100	1	7	6	0,125	100	1	7
6	0,25	100	2	6	6	0,125	100	2	3
6	0,25	100	3	3	6	0,125	100	3	7
6	0,25	10000	1	0	6	0,125	10000	1	0
6	0,25	10000	2	0	6	0,125	10000	2	0
6	0,25	10000	3	0	6	0,125	10000	3	0
0	0,5	100	1	> 100	0	0,25	100	1	> 100
0	0,5	100	2	> 100	0	0,25	100	2	> 100
0	0,5	100	3	> 100	0	0,25	100	3	> 100
0	0,5	10000	1	10	0	0,25	10000	1	10
0	0,5	10000	2	8	0	0,25	10000	2	5
0	0,5	10000	3	8	0	0,25	10000	3	7
2	0,5	100	1	20	2	0,25	100	1	16
2	0,5	100	2	18	2	0,25	100	2	16
2	0,5	100	3	17	2	0,25	100	3	16
2	0,5	10000	1	0	2	0,25	10000	1	0
2	0,5	10000	2	2	2	0,25	10000	2	0
2	0,5	10000	3	0	2	0,25	10000	3	0
4	0,5	100	1	10	4	0,25	100	1	8
4	0,5	100	2	7	4	0,25	100	2	11
4	0,5	100	3	8	4	0,25	100	3	11
4	0,5	10000	1	0	4	0,25	10000	1	0
4	0,5	10000	2	0	4	0,25	10000	2	0
4	0,5	10000	3	0	4	0,25	10000	3	0
6	0,5	100	1	3	6	0,25	100	1	4
6	0,5	100	2	0	6	0,25	100	2	4
6	0,5	100	3	0	6	0,25	100	3	4
6	0,5	10000	1	0	6	0,25	10000	1	0
6	0,5	10000	2	0	6	0,25	10000	2	0
6	0,5	10000	3	0	6	0,25	10000	3	0
0	1	100	1	> 100	0	0,5	100	1	> 100
0	1	100	2	> 100	0	0,5	100	2	> 100
0	1	100	3	> 100	0	0,5	100	3	> 100
0	1	10000	1	8	0	0,5	10000	1	10
0	1	10000	2	5	0	0,5	10000	2	9
0	1	10000	3	5	0	0,5	10000	3	11
2	1	100	1	16	2	0,5	100	1	16
2	1	100	2	6	2	0,5	100	2	9
2	1	100	3	15	2	0,5	100	3	18
2	1	10000	1	0	2	0,5	10000	1	0
2	1	10000	2	0	2	0,5	10000	2	0
2	1	10000	3	0	2	0,5	10000	3	0
4	1	100	1	6	4	0,5	100	1	5
4	1	100	2	7	4	0,5	100	2	4
4	1	100	3	7	4	0,5	100	3	5
4	1	10000	1	0	4	0,5	10000	1	0
4	1	10000	2	0	4	0,5	10000	2	0
4	1	10000	3	0	4	0,5	10000	3	0
6	1	100	1	0	6	0,5	100	1	1
6	1	100	2	0	6	0,5	100	2	3
6	1	100	3	1	6	0,5	100	3	0
6	1	10000	1	0	6	0,5	10000	1	0
6	1	10000	2	0	6	0,5	10000	2	0
6	1	10000	3	0	6	0,5	10000	3	0

**Conteo de unidades formadoras de colonia del ensayo de curvas de letalidad
Mycobacterium tuberculosis en los cultivos correspondientes a los aceites
 esenciales de *Cymbopogon citratus* y *Turnera diffusa***

<i>Cymbopogon citratus</i>					<i>Turnera diffusa</i>				
Tiempo	Concentración	Dilución	Tubo	UFC	Tiempo	Concentración	Dilución	Tubo	UFC
0	31,25	100	1	> 100	0	62,5	100	1	> 100
0	31,25	100	2	> 100	0	62,5	100	2	> 100
0	31,25	100	3	> 100	0	62,5	100	3	> 100
0	31,25	10000	1	7	0	62,5	10000	1	6
0	31,25	10000	2	6	0	62,5	10000	2	6
0	31,25	10000	3	9	0	62,5	10000	3	9
2	31,25	100	1	> 100	2	62,5	100	1	> 100
2	31,25	100	2	> 100	2	62,5	100	2	> 100
2	31,25	100	3	> 100	2	62,5	100	3	> 100
2	31,25	10000	1	6	2	62,5	10000	1	4
2	31,25	10000	2	5	2	62,5	10000	2	4
2	31,25	10000	3	7	2	62,5	10000	3	5
4	31,25	100	1	167	4	62,5	100	1	> 100
4	31,25	100	2	172	4	62,5	100	2	> 100
4	31,25	100	3	160	4	62,5	100	3	> 100
4	31,25	10000	1	5	4	62,5	10000	1	2
4	31,25	10000	2	5	4	62,5	10000	2	2
4	31,25	10000	3	4	4	62,5	10000	3	1
6	31,25	100	1	> 100	6	62,5	100	1	37
6	31,25	100	2	> 100	6	62,5	100	2	39
6	31,25	100	3	> 100	6	62,5	100	3	35
6	31,25	10000	1	2	6	62,5	10000	1	1
6	31,25	10000	2	4	6	62,5	10000	2	2
6	31,25	10000	3	5	6	62,5	10000	3	1
0	62,5	100	1	> 100	0	125	100	1	> 100
0	62,5	100	2	> 100	0	125	100	2	> 100
0	62,5	100	3	> 100	0	125	100	3	> 100
0	62,5	10000	1	12	0	125	10000	1	9
0	62,5	10000	2	13	0	125	10000	2	8
0	62,5	10000	3	12	0	125	10000	3	9
2	62,5	100	1	> 100	2	125	100	1	51
2	62,5	100	2	> 100	2	125	100	2	54
2	62,5	100	3	> 100	2	125	100	3	62
2	62,5	10000	1	4	2	125	10000	1	1
2	62,5	10000	2	3	2	125	10000	2	3
2	62,5	10000	3	5	2	125	10000	3	1
4	62,5	100	1	77	4	125	100	1	31
4	62,5	100	2	77	4	125	100	2	33
4	62,5	100	3	80	4	125	100	3	30
4	62,5	10000	1	0	4	125	10000	1	1
4	62,5	10000	2	2	4	125	10000	2	1
4	62,5	10000	3	0	4	125	10000	3	0
6	62,5	100	1	75	6	125	100	1	21
6	62,5	100	2	48	6	125	100	2	22
6	62,5	100	3	78	6	125	100	3	23
6	62,5	10000	1	0	6	125	10000	1	0
6	62,5	10000	2	0	6	125	10000	2	0
6	62,5	10000	3	1	6	125	10000	3	0
0	125	100	1	> 100	0	250	100	1	> 100
0	125	100	2	> 100	0	250	100	2	> 100
0	125	100	3	> 100	0	250	100	3	> 100
0	125	10000	1	13	0	250	10000	1	6
0	125	10000	2	15	0	250	10000	2	7
0	125	10000	3	15	0	250	10000	3	9
2	125	100	1	> 100	2	250	100	1	35
2	125	100	2	> 100	2	250	100	2	29
2	125	100	3	> 100	2	250	100	3	29
2	125	10000	1	2	2	250	10000	1	1
2	125	10000	2	2	2	250	10000	2	2
2	125	10000	3	2	2	250	10000	3	0
4	125	100	1	27	4	250	100	1	12
4	125	100	2	13	4	250	100	2	12
4	125	100	3	23	4	250	100	3	12
4	125	10000	1	1	4	250	10000	1	0
4	125	10000	2	0	4	250	10000	2	1
4	125	10000	3	1	4	250	10000	3	0
6	125	100	1	0	6	250	100	1	3
6	125	100	2	3	6	250	100	2	3
6	125	100	3	4	6	250	100	3	7
6	125	10000	1	0	6	250	10000	1	0
6	125	10000	2	0	6	250	10000	2	0
6	125	10000	3	0	6	250	10000	3	0

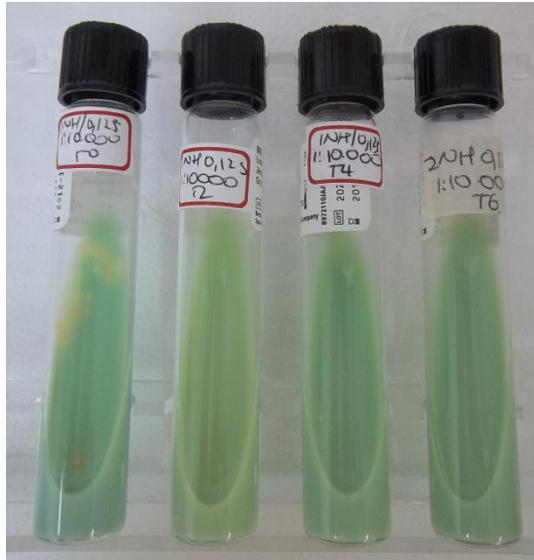
**Conteo de unidades formadoras de colonia del ensayo de curvas de letalidad
Mycobacterium tuberculosis en los cultivos correspondientes a los aceites
 esenciales de *Cymbopogon flexuosus* y *Eucalyptus citriodora* Hook**

<i>Cymbopogon flexuosus</i>					<i>Eucalyptus citriodora</i> Hook				
Tiempo	Concentración	Dilución	Tubo	UFC	Tiempo	Concentración	Dilución	Tubo	UFC
0	31,25	100	1	> 100	0	31,25	100	1	> 100
0	31,25	100	2	> 100	0	31,25	100	2	> 100
0	31,25	100	3	> 100	0	31,25	100	3	> 100
0	31,25	10000	1	7	0	31,25	10000	1	6
0	31,25	10000	2	6	0	31,25	10000	2	9
0	31,25	10000	3	5	0	31,25	10000	3	10
2	31,25	100	1	> 100	2	31,25	100	1	> 100
2	31,25	100	2	> 100	2	31,25	100	2	> 100
2	31,25	100	3	> 100	2	31,25	100	3	> 100
2	31,25	10000	1	5	2	31,25	10000	1	7
2	31,25	10000	2	4	2	31,25	10000	2	5
2	31,25	10000	3	6	2	31,25	10000	3	5
4	31,25	100	1	55	4	31,25	100	1	> 100
4	31,25	100	2	50	4	31,25	100	2	> 100
4	31,25	100	3	50	4	31,25	100	3	> 100
4	31,25	10000	1	5	4	31,25	10000	1	3
4	31,25	10000	2	4	4	31,25	10000	2	3
4	31,25	10000	3	2	4	31,25	10000	3	3
6	31,25	100	1	> 100	6	31,25	100	1	66
6	31,25	100	2	> 100	6	31,25	100	2	70
6	31,25	100	3	> 100	6	31,25	100	3	76
6	31,25	10000	1	2	6	31,25	10000	1	3
6	31,25	10000	2	3	6	31,25	10000	2	1
6	31,25	10000	3	3	6	31,25	10000	3	1
0	62,5	100	1	> 100	0	62,5	100	1	> 100
0	62,5	100	2	> 100	0	62,5	100	2	> 100
0	62,5	100	3	> 100	0	62,5	100	3	> 100
0	62,5	10000	1	4	0	62,5	10000	1	9
0	62,5	10000	2	5	0	62,5	10000	2	10
0	62,5	10000	3	5	0	62,5	10000	3	11
2	62,5	100	1	> 100	2	62,5	100	1	> 100
2	62,5	100	2	> 100	2	62,5	100	2	> 100
2	62,5	100	3	> 100	2	62,5	100	3	> 100
2	62,5	10000	1	4	2	62,5	10000	1	5
2	62,5	10000	2	4	2	62,5	10000	2	5
2	62,5	10000	3	4	2	62,5	10000	3	7
4	62,5	100	1	>100	4	62,5	100	1	>100
4	62,5	100	2	>100	4	62,5	100	2	>100
4	62,5	100	3	>100	4	62,5	100	3	>100
4	62,5	10000	1	4	4	62,5	10000	1	4
4	62,5	10000	2	3	4	62,5	10000	2	3
4	62,5	10000	3	4	4	62,5	10000	3	3
6	62,5	100	1	70	6	62,5	100	1	44
6	62,5	100	2	70	6	62,5	100	2	37
6	62,5	100	3	70	6	62,5	100	3	44

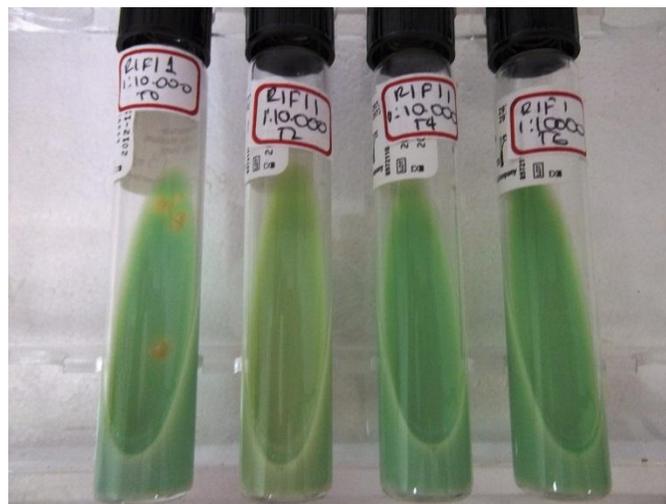
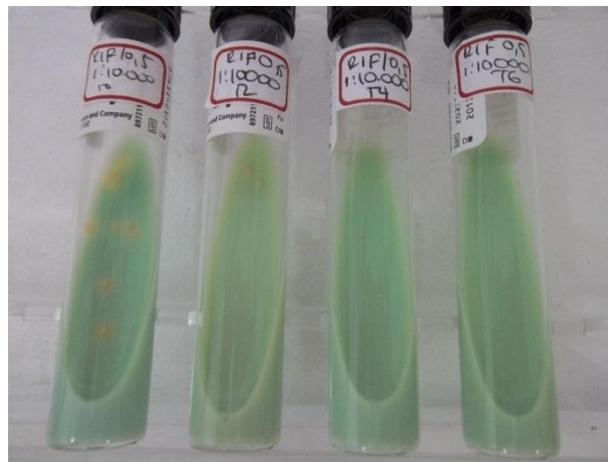
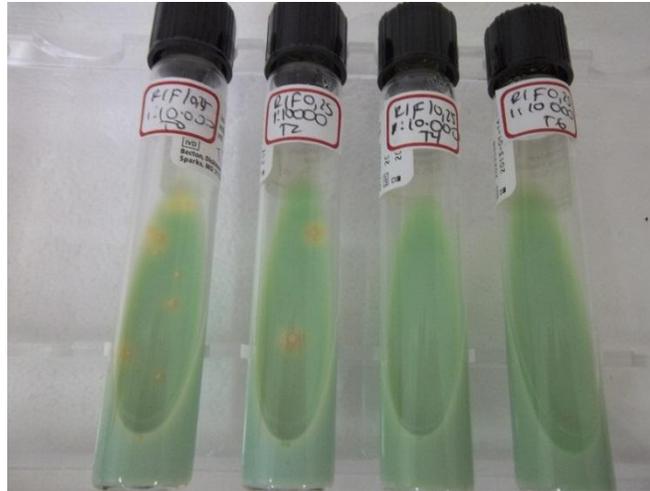
6	62,5	10000	1	2	6	62,5	10000	1	1
6	62,5	10000	2	4	6	62,5	10000	2	2
6	62,5	10000	3	2	6	62,5	10000	3	4
0	125	100	1	>100	0	125	100	1	>100
0	125	100	2	>100	0	125	100	2	>100
0	125	100	3	>100	0	125	100	3	>100
0	125	10000	1	8	0	125	10000	1	12
0	125	10000	2	5	0	125	10000	2	11
0	125	10000	3	7	0	125	10000	3	12
2	125	100	1	>100	2	125	100	1	>100
2	125	100	2	>100	2	125	100	2	>100
2	125	100	3	>100	2	125	100	3	>100
2	125	10000	1	5	2	125	10000	1	6
2	125	10000	2	4	2	125	10000	2	5
2	125	10000	3	3	2	125	10000	3	3
4	125	100	1	104	4	125	100	1	>100
4	125	100	2	85	4	125	100	2	>100
4	125	100	3	100	4	125	100	3	>100
4	125	10000	1	2	4	125	10000	1	3
4	125	10000	2	1	4	125	10000	2	2
4	125	10000	3	0	4	125	10000	3	3
6	125	100	1	27	6	125	100	1	44
6	125	100	2	24	6	125	100	2	45
6	125	100	3	25	6	125	100	3	40
6	125	10000	1	0	6	125	10000	1	0
6	125	10000	2	2	6	125	10000	2	0
6	125	10000	3	0	6	125	10000	3	2

**ANEXO D Evidencias fotográficas de los
ensayos de curvas de letalidad de aceites
esenciales frente a *Mycobacterium
tuberculosis***

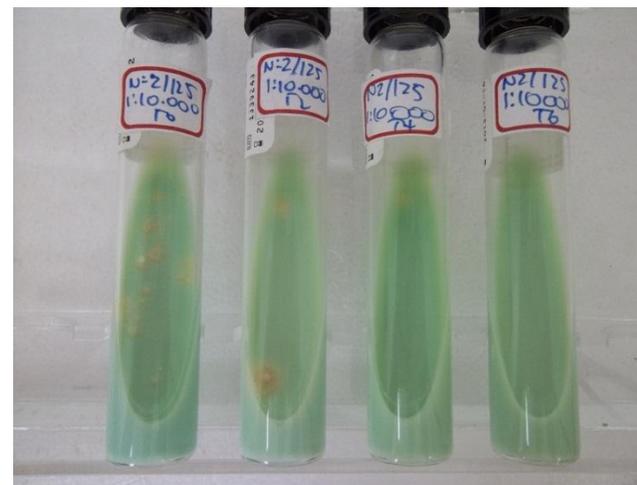
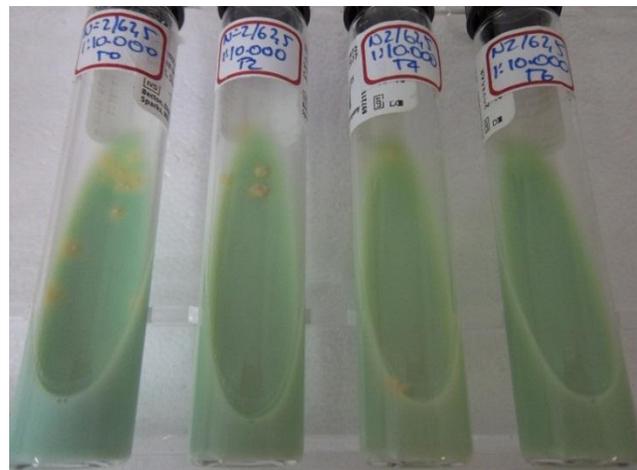
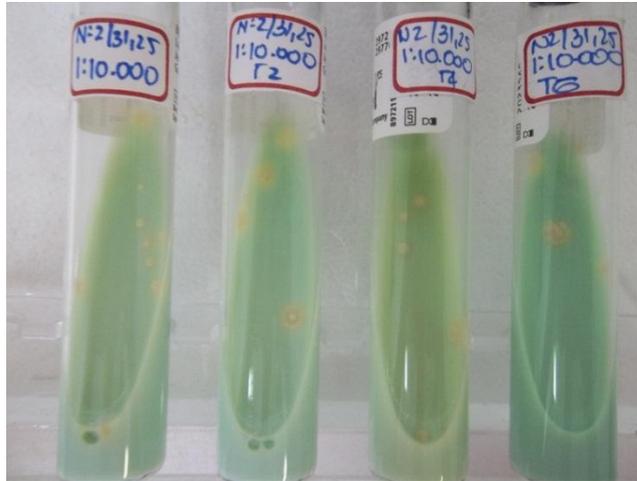
Unidades formadoras de colonia del ensayo de curvas de letalidad frente a *Mycobacterium tuberculosis* en los cultivos correspondientes a los controles de isoniacida



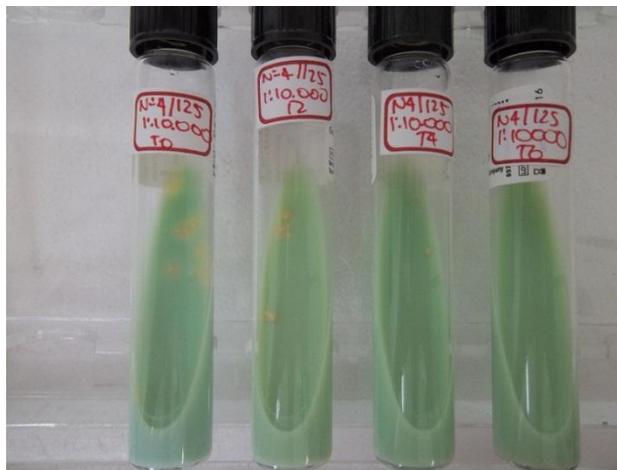
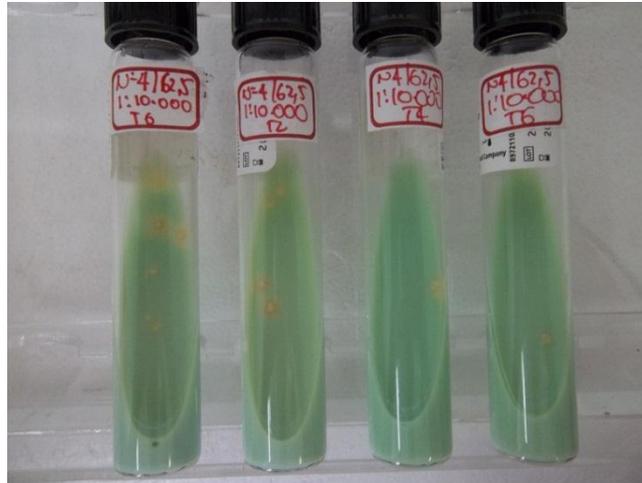
Unidades formadoras de colonia del ensayo de curvas de letalidad frente a *Mycobacterium tuberculosis* en los cultivos correspondientes a los controles de rifampicina



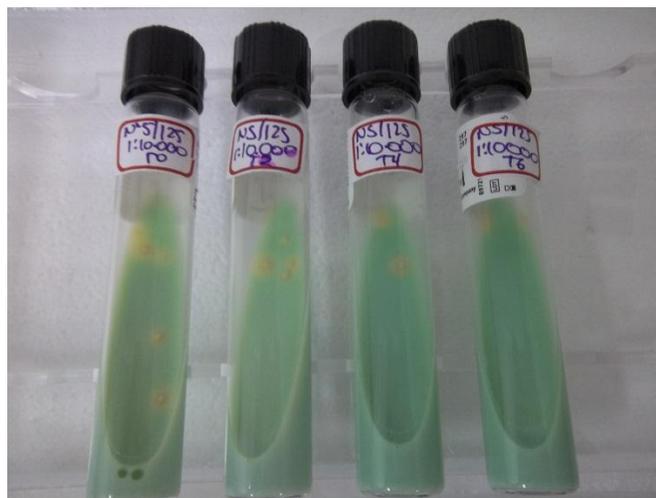
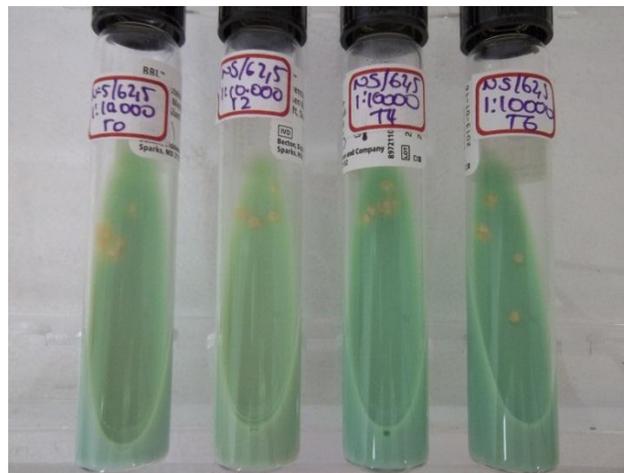
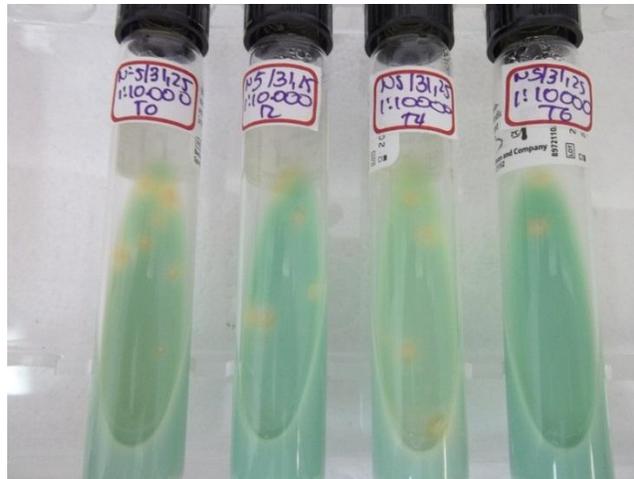
**Unidades formadoras de colonia del ensayo de curvas de letalidad
Mycobacterium tuberculosis en los cultivos correspondientes a los aceites
esenciales de *Cymbopogon citratus***



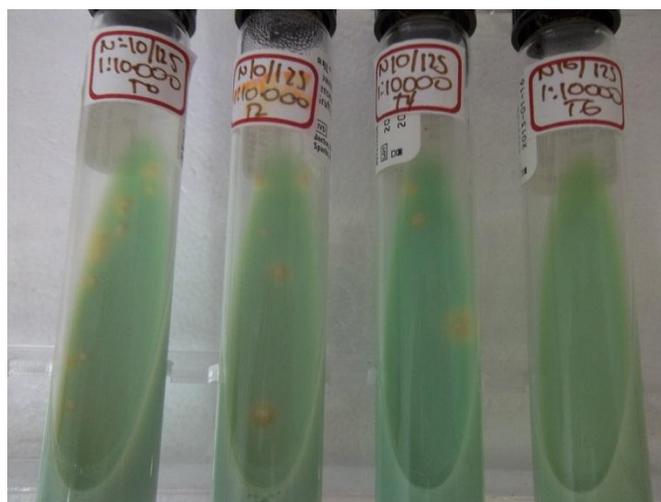
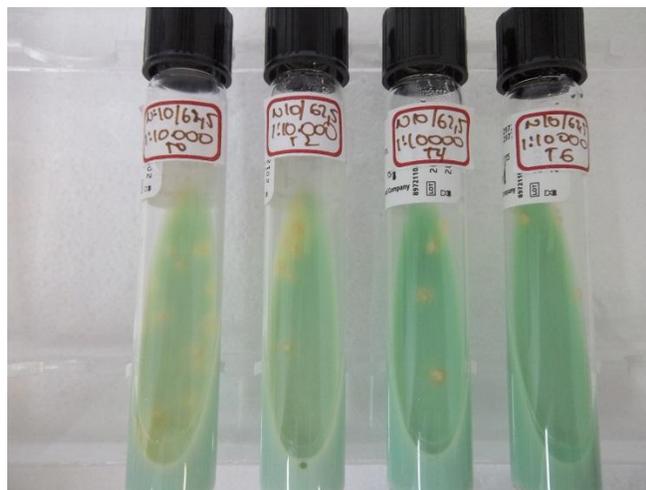
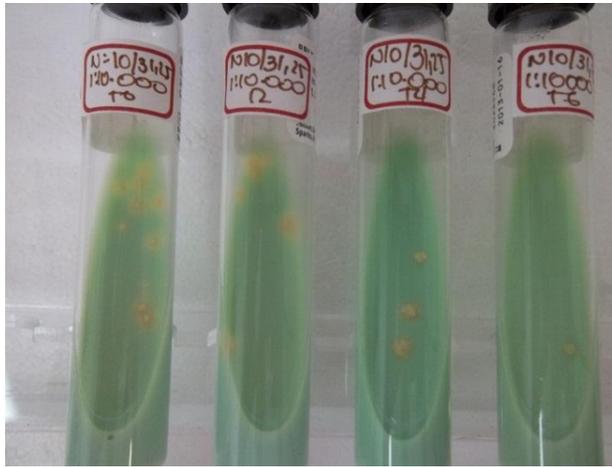
**Unidades formadoras de colonia del ensayo de curvas de letalidad
Mycobacterium tuberculosis en los cultivos correspondientes a los aceites
esenciales de *Turnera diffusa***



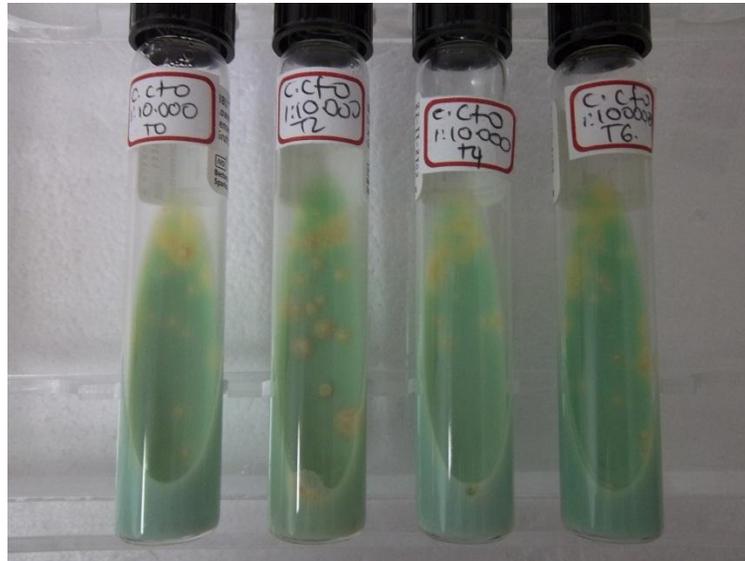
Unidades formadoras de colonia del ensayo de curvas de letalidad *Mycobacterium tuberculosis* en los cultivos correspondientes a los aceites esenciales de *Cymbopogon flexuosus*



Conteo de unidades formadoras de colonia del ensayo de curvas de letalidad *Mycobacterium tuberculosis* en los cultivos correspondientes a los aceites esenciales de *Eucalyptus citriodora* Hook



Unidades formadoras de colonia del ensayo de curvas de letalidad en los cultivos correspondientes al control de crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis*



ANEXO E Protocolos generados y utilizados durante el presente estudio para la evaluación de la bioactividad de moléculas sintéticas, aceites esenciales y extractos vegetales

Protocolo para la realización del ensayo de bioactividad de aceites esenciales contra *Mycobacterium tuberculosis*

Fundamento del ensayo: Los aceites esenciales son mezclas de componentes volátiles obtenidos de plantas aromáticas cuya actividad biológica contra diversos microorganismos ha sido ampliamente demostrada y es atribuida a la acción individual o sinérgica de los diversos componentes presentes en la muestra. El ensayo permite la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), es decir el valor más bajo dentro de las concentraciones probadas de la muestra, capaz de inhibir el metabolismo bacteriano.

Materiales	<ul style="list-style-type: none"> • Puntas amarillas estériles • Puntas azules estériles • Pipetas de vidrio de 1, 2, 5 y 10 mL estériles • Frascos de vidrio con 6 a 8 perlas estériles • Tubos tapa rosca 13X100 mm estériles • Viales de vidrio tapa rosca estériles • Espátulas de madera estériles • Tubos cónicos 15 y 50 mL estériles • Filtros de membrana de 0,22 micrómetros de diámetro estériles • Jeringas de 5, 10 mL estériles • Toallas de papel desechables • Bandeja de descarte con tapa • Papel Kraft • Equipo de protección personal (guantes, bata desechable antifluido, gorro, polainas y respirador N95) • Gradillas para tubos cónicos • Gradillas para tubos 13X100 mm, resistentes a autoclave • Micropipetas de 10 - 100 μL, 100 - 1000 μL • Marcadores permanentes
Reactivos	<ul style="list-style-type: none"> • Cepa H37Rv de <i>M. tuberculosis</i> ATCC 27294 con 15—18 días de crecimiento en medio Lowenstein - Jensen • Agua destilada estéril • Medio líquido Middlebrook 7H9 + OADC 10% • Soluciones iniciales de medicamentos (RIF, INH) y aceites esenciales • Dimetil Sulfoxido (DMSO) • Hipoclorito al 2.5% • Fenol al 5% • Alcohol al 70%
Equipos	<ul style="list-style-type: none"> • Pipeteador • Balanza analítica • Cabina de bioseguridad tipo II • Incubadora a 37°C \pm 1 • Nevera • Agitador mecánico • Carrito auxiliar para transporte de material

Metodología:

1. Antes de iniciar el procedimiento, asegúrese de tener disponibles los materiales, reactivos y equipos necesarios.
2. Encienda la cabina de bioseguridad y verifique el buen funcionamiento del equipo.
3. Póngase el equipo de protección personal.
4. Limpie la cabina de bioseguridad utilizando una toalla de papel desechable impregnada con fenol.

Protocolo para la realización del ensayo de bioactividad de aceites esenciales contra *Mycobacterium tuberculosis*

Metodología:

5. Disponga un trozo de papel kraft de medidas similares a las de la bandeja de la cabina y rocíelo con alcohol.
6. Ubique el papel kraft sobre la bandeja de la cabina.
7. Prepare una bandeja de descarte con el hipoclorito.
8. Desinfecte los materiales a utilizar con alcohol e ingréselos a la cabina.
9. Marque los viales y tubos a utilizar con nombre y concentración de las muestras y medicamentos.
10. Prepare las soluciones de trabajo de la siguiente forma:

Nombre y concentración de la solución de trabajo a preparar	Volumen y concentración de sustancia	Volumen de diluyente
RIF [10 µg/mL]*	10 µL RIF [1mg/mL]	990 µL medio M7H9+OADC
RIF [0,5 µg/mL]	150 µL RIF [10 µg/mL]	2850 µL medio M7H9+OADC
INH [10 µg/mL]*	10 µL INH [1mg/mL]	990 µL medio M7H9+OADC
INH [0,25 µg/mL]	75 µL INH [10 µg/mL]	2925 µL medio M7H9+OADC
Aceite [1000 µg/mL]	200 µL Aceite [20 mg/mL]	3800 µL medio M7H9+OADC
Aceite [500 µg/mL]	200 µL Aceite [10 mg/mL]	3800 µL medio M7H9+OADC
Aceite [250 µg/mL]	200 µL Aceite [5 mg/mL]	3800 µL medio M7H9+OADC
Aceite [125 µg/mL]	200 µL Aceite [2,5 mg/mL]	3800 µL medio M7H9+OADC
Aceite [62,5 µg/mL]	200 µL Aceite [1,25 mg/mL]	3800 µL medio M7H9+OADC
DMSO	200 µL DMSO	3800 µL medio M7H9+OADC

11. Filtre cada una de las soluciones de trabajo. Las Concentraciones evaluadas corresponderán a la mitad de las concentraciones de trabajo.
Nota: las soluciones marcadas con (*) son soluciones intermedias requeridas para preparar las soluciones de trabajo pero no se usan en el ensayo contra *M. tuberculosis*.
12. Distribuya 1mL de cada una de las soluciones de trabajo en tubos 13X100 mm por triplicado, excepto los medicamentos y el DMSO que se evalúan con tubo único.
13. Pese el frasco de vidrio con perlas, marcado y tapado (P1).
14. Raspe la superficie del cultivo bacteriano utilizando la espátula de madera.
15. Tome una pequeña cantidad de masa bacilar, teniendo en cuenta no incluir medio de cultivo y deposítela dentro del frasco.
16. Pese de nuevo el frasco tapado (P2).
17. Determine el peso de la masa bacilar contenida en el frasco. (P3) ($P3 = P2 - P1$).
18. Realice una agitación inicial en seco utilizando agitador mecánico durante 30 segundos.
19. Prepare una suspensión bacteriana de 1mg/mL, correspondiente al tubo N°1 del estándar de McFarland (3×10^8 ufc/mL), adicionando un volumen en mL de agua destilada estéril igual al peso de la masa bacilar; por ejemplo 10 mL para P3= 10 mg.

Protocolo para la realización del ensayo de bioactividad de aceites esenciales contra *Mycobacterium tuberculosis*

Metodología:

20. Agite nuevamente con agitador mecánico durante 60 y verifique que la suspensión está homogénea.
21. Realice una dilución 1:10 con medio de cultivo líquido Middlebrook 7H9 + OADC 10%, ésta será utilizada como inóculo de trabajo.
22. Adicionalmente prepare una solución bacilar correspondiente al 1% del inóculo de trabajo, con medio M7H9 + OADC 10%. Ésta será usada como uno de los controles de crecimiento.
23. Adicione 1mL de inóculo de trabajo en cada uno de los tubos 13X100 mm que contienen las soluciones de trabajo de las muestras, los medicamentos y el DMSO.
24. Deposite 2 mL de inóculo del 1% en un tubo 13X100 mm y márkelo como control del 1%.
25. Prepare un tubo con 1mL de medio M7H9 + OADC 10% y 1mL de inóculo de trabajo. Márkelo como control de crecimiento.
26. Prepare un tubo con 2 mL de medio M7H9 + OADC 10%. Márkelo como control de esterilidad del medio.
27. Incube los ensayos 7 días a $37^{\circ}\text{C} \pm 1$.
28. Retire los materiales sobrantes de la cabina y desinfectela de nuevo con fenol.
29. Diligencie los respectivos formatos de uso de equipos.

Lectura e interpretación de resultados:

Pasado el tiempo de reacción, realice el ensayo colorimétrico del MTT a todos los tubos y proceda a definir la Concentración Mínima Inhibitoria de cada muestra. Los controles de medicamentos y el control de esterilidad del medio deben conservar el color amarillo. Los controles de crecimiento y del DMSO deben desarrollar el color violeta. Esto permitirá validar el ensayo.

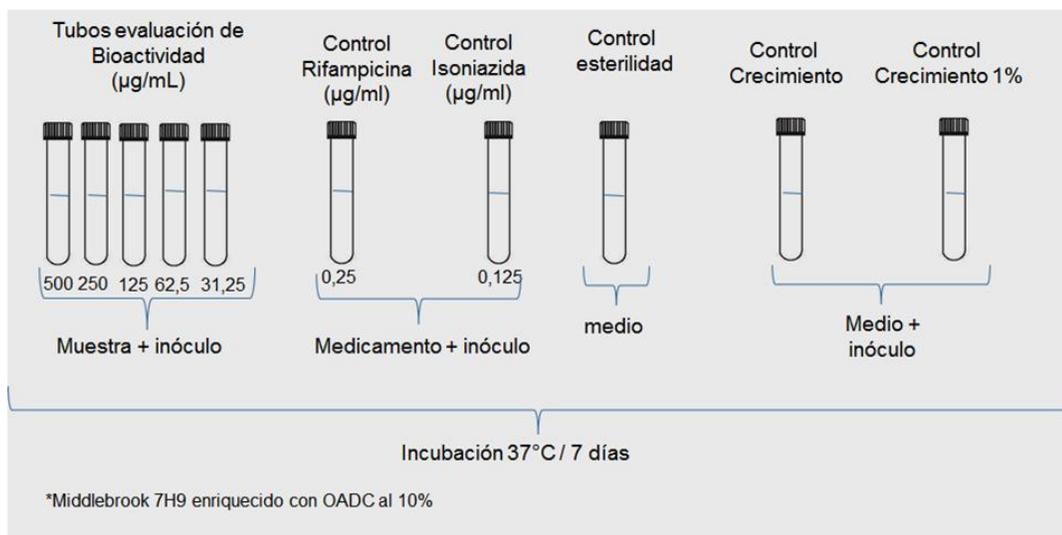


Figura 1. Esquema de montaje del ensayo de macrodilución en tubo para la evaluación de la bioactividad de aceites esenciales frente a *M. tuberculosis*.



Protocolo para la realización del ensayo de bioactividad de extractos vegetales contra *Mycobacterium tuberculosis*

Fundamento del ensayo: Los extractos vegetales son productos extraídos de diferentes partes de las plantas, como hojas, tallos, flores y frutos; mediante la utilización de diversos solventes como etanol, metanol y agua, entre otros. Su actividad biológica contra diversos microorganismos ha sido ampliamente demostrada y es atribuida a la acción de los metabolitos secundarios dentro de los que se encuentran los flavonoides, taninos, hidroquinonas, esteroides, alcaloides y carotenoides, los cuales pueden ser extraídos usando el solvente apropiado. El ensayo permite la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), es decir el valor más bajo dentro de las concentraciones probadas de la muestra, capaz de inhibir el metabolismo bacteriano.

Materiales	<ul style="list-style-type: none"> • Puntas amarillas estériles • Puntas azules estériles • Pipetas de vidrio de 1, 2, 5 y 10 mL estériles • Frascos de vidrio con 6 a 8 perlas estériles • Placas de poliestireno de 96 pozos de fondo plano y con tapa, estériles • Viales de vidrio tapa rosca estériles • Espátulas de madera estériles • Tubos cónicos 15 y 50 mL estériles • Filtros de membrana de 0,22 micrómetros de diámetro estériles • Jeringas de 5, 10 mL estériles • Toallas de papel desechables • Bandeja de descarte con tapa • Bandeja con tapa para incubación de placas, resistente a autoclave • Gasas estériles • Papel Kraft • Equipo de protección personal (guantes, bata desechable antifluído, gorro, polainas y respirador N95) • Gradillas para tubos cónicos • Micropipetas de 10 - 100 μL, 100 - 1000 μL • Marcadores permanentes
Reactivos	<ul style="list-style-type: none"> • Cepa H37Rv de <i>M. tuberculosis</i> ATCC 27294 con 15—18 días de crecimiento en medio Lowenstein - Jensen • Agua destilada estéril • Medio líquido Middlebrook 7H9 + OADC 10% • Soluciones iniciales de medicamentos (RIF, INH) y extractos vegetales • Dimetil Sulfoxido (DMSO) (<i>SIGMA ALDRICH</i> / D4550-1L) • Hipoclorito al 2.5% • Fenol al 5% • Alcohol al 70%
Equipos	<ul style="list-style-type: none"> • Pipeteador • Balanza analítica • Cabina de bioseguridad tipo II • Incubadora a 37°C \pm 1 • Nevera • Agitador mecánico • Carrito auxiliar para transporte de material



Protocolo para la realización del ensayo de bioactividad de extractos vegetales contra *Mycobacterium tuberculosis*

Metodología:

1. Antes de iniciar el procedimiento, asegúrese de tener disponibles los materiales, reactivos y equipos necesarios.
2. Encienda la cabina y verifique el buen funcionamiento del equipo.
3. Póngase el equipo de protección personal.
4. Limpie la cabina utilizando una toalla de papel desechable impregnada con fenol.
5. Disponga un trozo de papel kraft de medidas similares a las de la bandeja de la cabina de bioseguridad y rocíelo con alcohol.
6. Ubique el papel kraft sobre la bandeja de la cabina de bioseguridad.
7. Prepare una bandeja de descarte con hipoclorito.
8. Desinfecte los materiales a utilizar con alcohol e ingréselos a la cabina.
9. Marque los viales y tubos a utilizar con nombre y concentración de las muestras y medicamentos.
10. Prepare las soluciones de trabajo de la siguiente forma:

Nombre y concentración de la solución de trabajo a preparar	Volumen y concentración de sustancia	Volumen de diluyente
RIF [10 µg/mL]*	10 µL RIF [1mg/mL]	990 µL medio M7H9+OADC
RIF [0,5 µg/mL]	150 µL RIF [10 µg/mL]	2850 µL medio M7H9+OADC
INH [10 µg/mL]*	10 µL INH [1mg/mL]	990 µL medio M7H9+OADC
INH [0,25 µg/mL]	75 µL INH [10 µg/mL]	2925 µL medio M7H9+OADC
Extracto [4000 µg/mL]	100 µL Extracto [100 mg/mL]	2400 µL medio M7H9+OADC
DMSO	100 µL DMSO	2400 µL medio M7H9+OADC

11. Filtre cada una de las soluciones de trabajo. Las Concentraciones evaluadas corresponderán a la mitad de las concentraciones de trabajo. **Nota:** las soluciones marcadas con (*) son soluciones intermedias requeridas para preparar las soluciones de trabajo pero no se usan en el ensayo contra *M. tuberculosis*.
12. Adicione 100 µL de medio M7H9+OADC en todas las columnas desde 2 hasta 10, desde B hasta G y en C11 y D11 y 200 µL en B11.
13. Adicione 100 µL de solución de trabajo del extracto 1 en B2, B3 y B4; 100 µL de solución de trabajo del extracto 2 en B5, B6 y B7 y 100 µL de solución de trabajo del extracto 3 en B8, B9 y B10.
14. Realice diluciones seriadas de 2 de las columnas 2 a la 10 desde B hasta G y descarte los 100 µL finales.
15. Adicione 100 µL de solución de trabajo de INH en C11.
16. Adicione 100 µL de solución de trabajo de RIF en D11.
17. Adicione 100 µL de solución de trabajo de DMSO en G11.
18. Tape la placa.
19. Tome una pequeña cantidad de masa bacilar, teniendo en cuenta no incluir medio de cultivo y deposítela dentro del frasco.
21. Pese de nuevo el frasco tapado (P2).

Protocolo para la realización del ensayo de bioactividad de extractos vegetales contra *Mycobacterium tuberculosis*

Metodología:

22. Determine el peso de la masa bacilar contenida en el frasco. ($P3$) ($P3 = P2 - P1$).
23. Realice una agitación inicial en seco utilizando vortex durante 30 segundos.
24. Prepare una suspensión bacteriana de 1mg/mL, correspondiente al tubo N°1 del estándar de McFarland (3×10^8 ufc/mL), adicionando un volumen en mL de agua destilada estéril igual al peso de la masa bacilar; por ejemplo 10 mL para $P3 = 10$ mg.
25. Agite nuevamente con vortex durante 60 y verifique que la suspensión está homogénea.
26. Realice una dilución 1:10 con medio de cultivo líquido Middlebrook 7H9 + OADC 10%, ésta será utilizada como inóculo de trabajo.
27. Adicionalmente prepare una solución bacilar correspondiente al 1% del inóculo de trabajo, con medio M7H9 + OADC 10%. Ésta será usada como uno de los controles de crecimiento.
28. Adicione 100 μ L de inóculo bacteriano en todos los pozos, pero no en B11 ni E11.
29. Adicione 200 μ L de inóculo bacteriano del 1% de concentración en E11.
30. Adicione 200 μ L de agua destilada estéril en los pozos de la periferia de la placa.
31. Tape la placa y márkela con nombre del ensayo, muestras analizadas y fecha.
32. Guarde la placa en su empaque original.
33. Ubique las gasas estériles dentro de la bandeja de incubación y humedézcalas con agua destilada estéril.
34. Deposite la placa dentro de la bandeja y tápela.
35. Incube el ensayo durante 7 días a $37^{\circ}\text{C} \pm 1$.
36. Retire los materiales sobrantes de la cabina y desinfectela de nuevo con fenol.
37. Diligencie los respectivos formatos de uso de equipos.

Lectura e interpretación de resultados:

Pasado el tiempo de reacción, realice el ensayo colorimétrico del MTT a todos los tubos y proceda a definir la Concentración Mínima Inhibitoria de cada muestra. Los controles de medicamentos y el control de esterilidad del medio deben conservar el color amarillo. Los controles de crecimiento y del DMSO deben desarrollar el color violeta. Esto permitirá validar el ensayo.

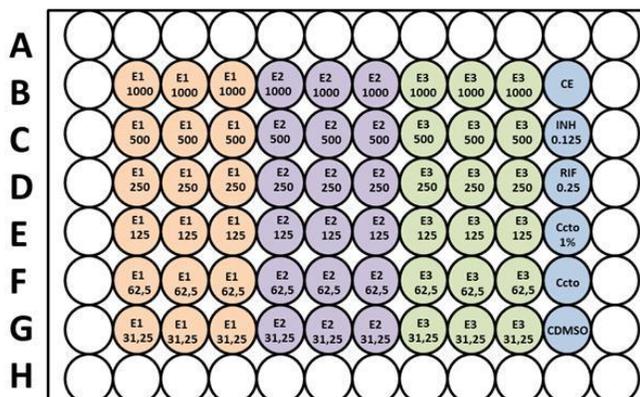


Figura 1. Distribución de muestras y controles para la evaluación de la bioactividad extractos vegetales frente a *M. tuberculosis*.



Protocolo para la realización del ensayo de bioactividad de moléculas sintéticas contra *Mycobacterium tuberculosis*

Fundamento del ensayo: Las moléculas sintéticas reaccionan con dianas específicas del microorganismo, causando la inhibición de su crecimiento y/o muerte. El ensayo permite la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), es decir el valor más bajo dentro de las concentraciones probadas de la muestra, capaz de inhibir el metabolismo bacteriano.

Materiales	<ul style="list-style-type: none"> • Puntas amarillas estériles • Puntas azules estériles • Pipetas de vidrio de 1, 2, 5 y 10 mL estériles • Frascos de vidrio con 6 a 8 perlas estériles • Placas de poliestireno de 96 pozos de fondo plano y con tapa, estériles. • Viales de vidrio tapa rosca estériles • Espátulas de madera estériles • Tubos cónicos 15 y 50 mL estériles • Filtros de membrana de 0,22 micrómetros de diámetro estériles • Jeringas de 5, 10 mL estériles • Toallas de papel desechables • Bandeja de descarte con tapa • Bandeja con tapa para incubación de placas, resistente a autoclave • Gasas estériles • Papel Kraft • Equipo de protección personal (guantes, bata desechable antifluido, gorro, polainas y respirador N95) • Gradillas para tubos cónicos • Micropipetas de 10 - 100 μL, 100 - 1000 μL • Marcadores permanentes
Reactivos	<ul style="list-style-type: none"> • Cepa H37Rv de <i>M. tuberculosis</i> ATCC 27294 con 15—18 días de crecimiento en medio Lowenstein - Jensen • Agua destilada estéril • Medio líquido Middlebrook 7H9 + OADC 10% • Soluciones iniciales de medicamentos (RIF, INH) y moléculas sintéticas • Dimetil Sulfoxido (DMSO) • Hipoclorito al 2.5% • Fenol al 5% • Alcohol al 70%
Equipos	<ul style="list-style-type: none"> • Pipeteador • Balanza analítica • Cabina de bioseguridad tipo II • Incubadora a 37°C \pm 1 • Nevera • Agitador mecánico • Carrito auxiliar para transporte de material



Protocolo para la realización del ensayo de bioactividad de moléculas sintéticas contra *Mycobacterium tuberculosis*

Metodología Fase 1 y 2:

1. Antes de iniciar el procedimiento, asegúrese de tener disponibles los materiales, reactivos y equipos necesarios.
2. Encienda la cabina de bioseguridad y verifique el buen funcionamiento del equipo.
3. Póngase el equipo de protección personal.
4. Limpie la cabina de bioseguridad utilizando una toalla de papel desechable impregnada con fenol.
5. Disponga un trozo de papel kraft de medidas similares a las de la bandeja de la cabina de bioseguridad y rocíelo con alcohol.
6. Ubique el papel kraft sobre la bandeja de la cabina de bioseguridad.
7. Prepare una bandeja de descarte con hipoclorito.
8. Desinfecte los materiales a utilizar con alcohol e ingréselos a la cabina.
9. Marque los viales y tubos a utilizar con nombre y concentración de las muestras y medicamentos.
10. Prepare las soluciones de trabajo de la siguiente forma:

Nombre y concentración de la solución de trabajo a preparar	Volumen y concentración de sustancia	Volumen de diluyente
RIF [100 µg/mL]*	100 µL RIF [1mg/mL]	900 µL medio M7H9+OADC
RIF [4 µg/mL]	100 µL RIF [100 µg/mL]	2400 µL medio M7H9+OADC
INH [100 µg/mL]*	100 µL RIF [1mg/mL]	900 µL medio M7H9+OADC
INH [2 µg/mL]	50 µL RIF [100 µg/mL]	2450 µL medio M7H9+OADC
Fase 1: Molécula [200 µg/mL]	10 µL Molécula [20000 µg/mL]	990 µL medio M7H9+OADC
Fase 1: Molécula [20 µg/mL]	100 µL Molécula [200 µg/mL]	990 µL medio M7H9+OADC
Fase 1: Molécula [2 µg/mL]	100 µL Molécula [20 µg/mL]	990 µL medio M7H9+OADC
Fase 1: Molécula [0,2 µg/mL]	100 µL Molécula [2 µg/mL]	990 µL medio M7H9+OADC
Fase 2: Molécula [128 µg/mL]	6,7 µL Molécula [20000 µg/mL]	993,6 µL medio M7H9+OADC
DMSO Fase 1	10 µL DMSO	990 µL medio M7H9+OADC
DMSO Fase 2	6,7 µL DMSO	993,6 µL medio M7H9+OADC

11. Filtre cada una de las soluciones de trabajo. Las Concentraciones evaluadas corresponderán a la mitad de las concentraciones de trabajo. **Nota:** las soluciones marcadas con (*) son soluciones intermedias requeridas para preparar las soluciones de trabajo pero no se usan en el ensayo contra *M. tuberculosis*.



Protocolo para la realización del ensayo de bioactividad de moléculas sintéticas contra *Mycobacterium tuberculosis*

Metodología Fase 1:

Nota: esta fase es conducida para determinar la bioactividad de cada molécula a concentraciones de 100, 10, 1 y 0,1 µg/mL.

12. Adicione 100 µL de medio M7H9+OADC en B10, C10 y D10, B11, C11 y D11, E10 y 200 µL en E11, F11 y G11.
13. Adicione 100 µL de solución de la solución de trabajo respectiva de cada compuesto en cada pozo correspondiente a las muestras. Ejemplo: compuesto 1 de [200 µg/mL] en B2, C2 y D2; compuesto 1 de [20 µg/mL] en B3, C3 y D3; compuesto 1 de [2 µg/mL] en B4, C4 y D4; compuesto 1 de [0,2 µg/mL] en B5, C5 y D5.
14. Adicione 100 µL de solución de trabajo de INH en B10 y realice diluciones seriadas hasta el pozo D10. Deseche los 100 µL finales.
15. Adicione 100µL de solución de trabajo de RIF en B11 y realice diluciones seriadas hasta el pozo D11. Deseche los 100 µL finales.
16. Adicione 100 µL de la solución de trabajo de DMSO en G10.
17. Tape la placa.
18. Pese el frasco de vidrio con perlas, marcado y tapado (P1)
19. Raspe la superficie del cultivo bacteriano utilizando la espátula de madera.
20. Tome una pequeña cantidad de masa bacilar, teniendo en cuenta no incluir medio de cultivo y deposítela dentro del frasco.
21. Pese de nuevo el frasco tapado (P2).
22. Determine el peso de la masa bacilar contenida en el frasco. (P3) ($P3 = P2 - P1$).
23. Realice una agitación inicial en seco utilizando agitador mecánico durante 30 segundos.
24. Prepare una suspensión bacteriana de 1mg/mL, correspondiente al tubo N°1 del estándar de McFarland (3×10^8 ufc/mL), adicionando un volumen en mL de agua destilada estéril igual al peso de la masa bacilar; por ejemplo 10 mL para P3= 10 mg.
25. Agite nuevamente con agitador mecánico durante 60 y verifique que la suspensión está homogénea.
26. Realice una dilución 1:10 con medio de cultivo líquido Middlebrook 7H9 + OADC 10%, ésta será utilizada como inóculo de trabajo.
27. Adicionalmente prepare una solución bacilar correspondiente al 1% del inóculo de trabajo, con medio M7H9 + OADC 10%. Ésta será usada como uno de los controles de crecimiento.
28. Adicione 100µL de inóculo bacteriano en todos los pozos de prueba, pero no en F10 ni E11, F11 ni G11.
29. Adicione 200µL de inóculo bacteriano del 1% de concentración en F11.
30. Adicione 200µL de agua destilada estéril en los pozos de la periferia de la placa.
31. Marque la placa con nombre del ensayo, muestras analizadas y fecha y tápela.
32. Guarde la placa en su empaque original.
33. Ubique las gasas estériles dentro de la bandeja de incubación y humedézcalas con agua destilada estéril.
34. Deposite la placa dentro de la bandeja y tápela.
35. Incube el ensayo durante 7 días a $37^{\circ}\text{C} \pm 1$.
36. Retire los materiales sobrantes de la cabina y desinfectela de nuevo con fenol.
37. Diligencie los respectivos formatos de uso de equipos.



Protocolo para la realización del ensayo de bioactividad de moléculas sintéticas contra *Mycobacterium tuberculosis*

Metodología Fase 2:

Nota: las moléculas que en la primera fase presentaron bioactividad menor o igual 100 µg/mL, son evaluadas nuevamente a un rango de concentraciones entre 64, 32, 16, 8, 4, 2 y 1 µg/mL.

12. Adicione 100µL de medio de cultivo líquido M7H9+OADC en las columnas 3, 4, 6, 7, 9 y 10, desde B hasta G, así como en B5, C5 y D5 y B8, C8 y D8 y en B11.
13. Adicione 200µL de medio de cultivo líquido M7H9+OADC en E11, F11 y G11.
14. Adicione 200µL de solución de trabajo del compuesto 1 en los pozos B2, C2 y D2; 200 µL de solución de trabajo del compuesto 2 en E2, F2 y G2; 200µL de solución de trabajo del compuesto 3 en E5, F5 y G5 y 200µL de solución de trabajo del compuesto 4 en E8, F8 y G8.
15. Tome 100 µL de los pozos iniciales de cada compuesto, para realizar diluciones seriadas de 2 en los pozos siguientes. Deseche los 100 µL finales.
16. Adicione 100 µL de solución de trabajo de INH en B9. Realice diluciones seriadas de 2 hasta D9. Deseche los 100 µL finales.
17. Adicione 100 µL de solución de trabajo de RIF en B10. Realice diluciones seriadas de 2 hasta D10. Deseche los 100 µL finales.
18. Adicione 100µL de solución de trabajo de DMSO en D11.
19. Tape la placa.
20. Pese el frasco de vidrio con perlas, marcado y tapado (P1)
21. Raspe la superficie del cultivo bacteriano utilizando la espátula de madera.
22. Tome una pequeña cantidad de masa bacilar, teniendo en cuenta no incluir medio de cultivo y deposítela dentro del frasco.
23. Pese de nuevo el frasco tapado (P2).
24. Determine el peso de la masa bacilar contenida en el frasco. (P3) ($P3 = P2 - P1$).
25. Realice una agitación inicial en seco utilizando agitador mecánico durante 30 segundos.
26. Prepare una suspensión bacteriana de 1mg/mL, correspondiente al tubo N°1 del estándar de McFarland (3×10^8 ufc/mL), adicionando un volumen en mL de agua destilada estéril igual al peso de la masa bacilar; por ejemplo 10 mL para P3= 10 mg.
27. Agite nuevamente con agitador mecánico durante 60 y verifique que la suspensión está homogénea.
28. Realice una dilución 1:10 con medio de cultivo líquido Middlebrook 7H9 + OADC 10%, ésta será utilizada como inóculo de trabajo.
29. Adicionalmente prepare una solución bacilar correspondiente al 1% del inóculo de trabajo, con medio M7H9 + OADC 10%. Ésta será usada como uno de los controles de crecimiento.
30. Añada 100µL de inóculo de trabajo en todos los pozos de prueba excepto en C11, E11, F11 y G11.
31. Añada 200µL de solución bacilar del 1% de concentración en C11.
32. Añada 200 µL de agua destilada estéril en los pozos de la periferia.
33. Marque la placa con nombre del ensayo, muestras analizadas y fecha y tápela.
34. Guarde la placa en su empaque original.
35. Ubique las gasas estériles dentro de la bandeja de incubación y humedézcalas con agua destilada estéril.
36. Deposite la placa dentro de la bandeja y tápela.
37. Incube el ensayo durante 7 días a $37^{\circ}\text{C} \pm 1$.
38. Retire los materiales sobrantes de la cabina y desinfectela de nuevo con fenol.
39. Diligencie los respectivos formatos de uso de equipos.

Código: MLIE.P10 Versión: 01 Fecha de elaboración: Agosto de 2012 Elaboró: María Fernanda Moreno Vargas Aprobó: Wellman Ribón

Protocolo para la realización del ensayo de bioactividad de moléculas sintéticas contra *Mycobacterium tuberculosis*

Lectura e interpretación de resultados:

Pasado el tiempo de reacción, realice el ensayo colorimétrico del MTT a todos los tubos y proceda a definir la Concentración Mínima Inhibitoria de cada muestra. Los controles de medicamentos y el control de esterilidad del medio deben conservar el color amarillo. Los controles de crecimiento y del DMSO deben desarrollar el color violeta. Esto permitirá validar el ensayo.

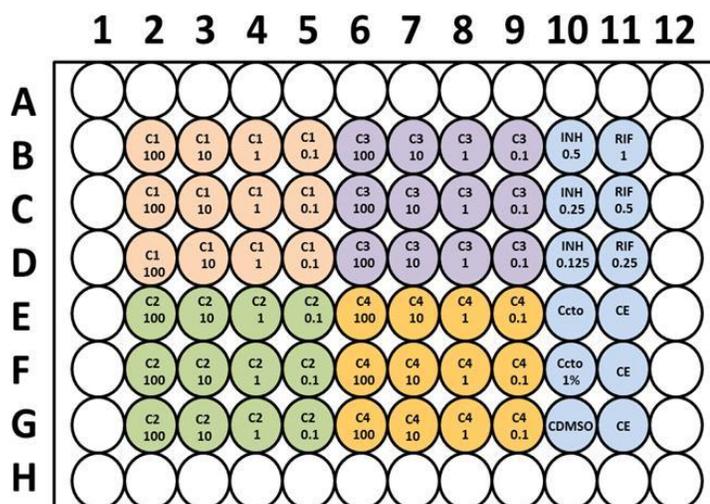


Figura 1. Distribución de muestras y controles para la primera fase de evaluación de la bioactividad moléculas sintéticas frente a *M. tuberculosis*.

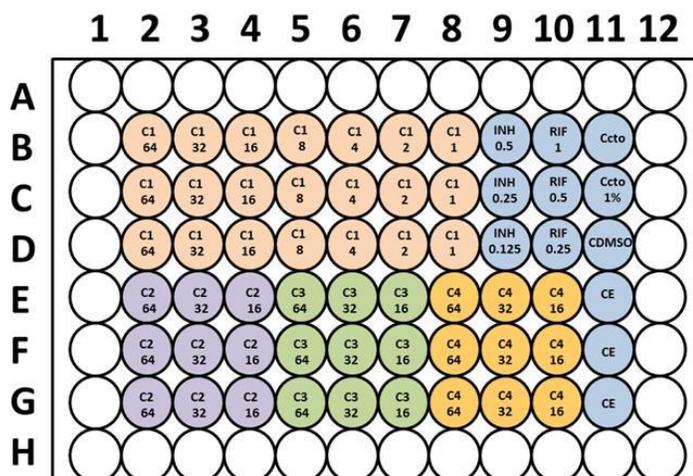


Figura 2. Posible distribución de muestras y controles para la segunda fase de evaluación de la bioactividad moléculas sintéticas frente a *M. tuberculosis*.



Protocolo para la realización del ensayo de bioactividad de aceites esenciales contra patógenos comunes tipo *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*

Fundamento del ensayo: Los aceites esenciales son mezclas de componentes volátiles obtenidos de plantas aromáticas cuya actividad biológica contra diversos microorganismos ha sido ampliamente demostrada y es atribuida a la acción individual o sinérgica entre los diversos componentes presentes en la muestra. El ensayo permite la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), es decir el valor más bajo dentro de las concentraciones probadas de la muestra, capaz de inhibir el metabolismo bacteriano.

Materiales	<ul style="list-style-type: none"> • Tubo N° 0.5 del estándar de McFarland • Puntas amarillas estériles • Puntas azules estériles • Pipetas de vidrio de 1, 2, 5 y 10 mL estériles • Tubos tapa rosca 16X160 mm estériles • Tubos tapa rosca 13X100 mm estériles • Viales de vidrio tapa rosca estériles • Hisopos estériles • Tubos cónicos 15 y 50 mL estériles • Filtros de membrana de 0,22 micrómetros de diámetro estériles • Jeringas de 5, 10 mL estériles • Toallas de papel desechables • Bandeja de descarte con tapa • Papel Kraft • Equipo de protección personal (guantes, bata desechable antifluido, gorro, polainas y tapabocas) • Gradillas para tubos cónicos • Gradillas para tubos 13X100 mm, resistentes a autoclave • Micropietas de 10 - 100 µL, 100 - 1000 µL • Marcadores permanentes
Reactivos	<ul style="list-style-type: none"> • Cepa bacteriana tipo <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 ó <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 cultivada en agar Mueller Hinton con 16 a 24 horas de crecimiento • Solución salina estéril • Caldo Mueller Hinton • Soluciones iniciales de medicamento (GNT) y aceites esenciales • Dimetil Sulfóxido (DMSO) • Hipoclorito al 2.5% • Fenol al 5% • Alcohol al 70%
Equipos	<ul style="list-style-type: none"> • Pipeteador • Cabina de bioseguridad tipo II • Incubadora a 37°C ± 1 • Nevera • Carrito auxiliar para transporte de material



Protocolo para la realización del ensayo de bioactividad de aceites esenciales contra patógenos comunes tipo *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*

Metodología:

1. Antes de iniciar el procedimiento, asegúrese de tener disponibles los materiales, reactivos y equipos necesarios.
2. Encienda la cabina de bioseguridad y verifique el buen funcionamiento del equipo.
3. Póngase el equipo de protección personal.
4. Limpie la cabina de bioseguridad utilizando una toalla de papel desechable impregnada con fenol.
5. Disponga un trozo de papel kraft de medidas similares a las de la bandeja de la cabina de bioseguridad y rocíelo con alcohol.
6. Ubique el papel kraft sobre la bandeja de la cabina de bioseguridad.
7. Prepare una bandeja de descarte con hipoclorito.
8. Desinfecte los materiales a utilizar con alcohol e ingréselos a la cabina.
9. Marque los viales y tubos a utilizar con nombre y concentración de las muestras y medicamentos.
10. Prepare las soluciones de trabajo de la siguiente forma:

Nombre y concentración de la solución de trabajo a preparar	Volumen y concentración de sustancia	Volumen de diluyente
GNT [8 µg/mL]	240 µL GNT [1mg/mL]	2760 µL caldo Mueller Hinton
Aceite [1000 µg/mL]	200 µL Aceite [20 mg/mL]	3800 µL caldo Mueller Hinton
Aceite [500 µg/mL]	200 µL Aceite [10 mg/mL]	3800 µL caldo Mueller Hinton
Aceite [250 µg/mL]	200 µL Aceite [5 mg/mL]	3800 µL caldo Mueller Hinton
Aceite [125 µg/mL]	200 µL Aceite [2,5 mg/mL]	3800 µL caldo Mueller Hinton
Aceite [62,5 µg/mL]	200 µL Aceite [1,25 mg/mL]	3800 µL caldo Mueller Hinton
DMSO	200 µL DMSO	3800 µL caldo Mueller Hinton

11. Filtre cada una de las soluciones de trabajo. Las Concentraciones evaluadas corresponderán a la mitad de las concentraciones de trabajo.
12. Distribuya 1mL de cada una de las soluciones de trabajo en tubos 13X100 mm por triplicado, excepto los medicamentos y el DMSO que se evalúan con tubo único.
13. Con hisopo estéril, tome entre 5 y 30 colonias bacterianas e inoculelas en 5mL de MHB atemperado a 37°C.
14. Incube las suspensión bacteriana a 37°C ± 1 hasta lograr una turbidez comparable visualmente con el tubo N° 0.5 del estándar de McFarland (1-2 X 10⁸ ufc/mL). Cuando fue necesario ajustar la turbidez, utilice caldo estéril a la misma temperatura.



Protocolo para la realización del ensayo de bioactividad de aceites esenciales contra patógenos comunes tipo *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*

Metodología:

15. Realice una dilución 1:150 de ésta suspensión bacteriana, para conseguir una concentración de 1×10^6 ufc/mL, la cual será utilizada como inóculo de trabajo.
16. Adicione 1 mL de inóculo de trabajo en cada uno de los tubos 13X100 mm que contienen las soluciones de trabajo de las muestras, el medicamento y el DMSO.
17. Prepare un tubo con 1 mL de caldo Mueller Hinton y 1 mL de inóculo de trabajo. Márquelo como control de crecimiento.
18. Prepare un tubo con 2 mL de caldo Mueller Hinton. Márquelo como control de esterilidad del medio.
19. Incube los ensayos 20 horas a $37^\circ\text{C} \pm 1$.
20. Retire los materiales sobrantes de la cabina y desinféctela de nuevo con fenol.
21. Diligencie los respectivos formatos de uso de equipos.

Lectura e interpretación de resultados:

Pasado el tiempo de reacción, realice el ensayo colorimétrico del MTT a todos los tubos y proceda a definir la Concentración Mínima Inhibitoria de cada muestra. Los controles de medicamentos y el control de esterilidad del medio deben conservar el color amarillo. Los controles de crecimiento y del DMSO deben desarrollar el color violeta. Esto permitirá validar el ensayo.

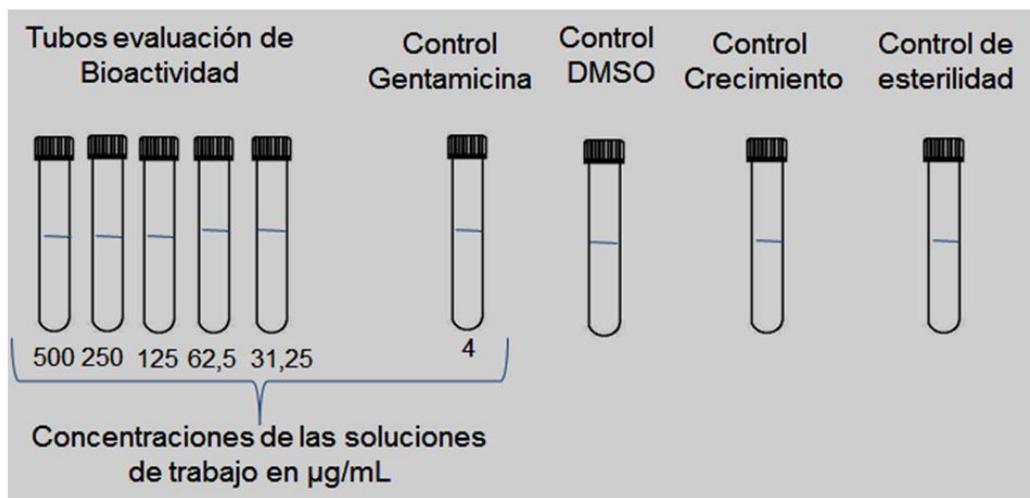
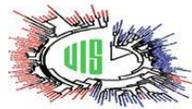


Figura 1. Esquema de montaje del ensayo de macrodilución en tubo para la evaluación de la bioactividad de aceites esenciales frente patógenos comunes Gram positivos y Gram negativos.



Mycobacterium
Laboratorio de Investigación y Extensión

Protocolo para preparación del medio de cultivo Lowenstein - Jensen

Materiales	<ul style="list-style-type: none"> • Papel aluminio • Papel Kraft • Mecheros (aproximadamente 7) • Baja lenguas • Pipetas de vidrio de 5 y 10 mL estériles* • Tubos de vidrio 20X125 mm estériles* • Gradillas para tubos 20 mm • Embudo de 20 cm de diámetro estéril* • Vasos de precipitado de 100 mL (uno por cada embudo) estériles* • Vaso de precipitado de 50 mL estéril* • Gasas de 24 dobleces (una por cada embudo) estériles* • Dos Gasas de 10 X 10 cm limpias • Una gasa de 40 X 40 cm limpia • Erlenmeyer de 1000 mL estéril* • Probeta de 1000 mL o 500 mL (una por cada embudo) estéril* • Frasco tapa rosca de 2000 mL, 1000 mL y 50 mL estériles* • Varilla de vidrio estéril* • Toallas de papel desechables* • Equipo de protección personal (guantes, bata de laboratorio, gorro, polainas y tapabocas) • Fósforos • Jabón en polvo • Cubetas de plástico • Marcador permanente
Reactivos	<ul style="list-style-type: none"> • Huevos de gallina, libres de antibióticos o residuos de estos, con fecha de postura de no más de 3 días y sin fisuras. • Fosfato monopotásico anhidro (KH_2PO_4) • Citrato de magnesio ($\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Mg}_3 \cdot 14\text{H}_2\text{O}$)* • Sulfato de magnesio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)* • L-Asparagina ($\text{C}_4\text{H}_9\text{N}_2\text{O}_3$) • Glicerol ($\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$) • Oxalato de verde malaquita ($\text{C}_{52}\text{H}_{54}\text{N}_4\text{O}_{12}$) • Agua destilada • Alcohol industrial • Alcohol al 70%
Equipos	<ul style="list-style-type: none"> • Estufa • Balanza analítica • Pipeteador • Autoclave • pH-metro • Equipo coagulador de medio / Incubadora u horno a 80°C • Cabina de flujo laminar • Nevera • Carrito auxiliar para transporte de material

* Verifique el número de moléculas de agua de cada reactivo y recalculé si son diferentes.

* Debido al largo tiempo de preparación del medio, conviene esterilizar el material y preparar las soluciones de sales y verde malaquita un día antes.



Protocolo para preparación del medio de cultivo Lowenstein - Jensen

Metodología para la preparación de 200 tubos de medio LJ:

Preparación de soluciones

1. Antes de iniciar el procedimiento, asegúrese de tener disponibles los materiales, reactivos y equipos necesarios.
2. Póngase el equipo de protección personal.
3. Precaliente a temperatura baja 700 mL de agua destilada.
4. Limpie la balanza utilizando una brocha o pincel limpio.
5. Encienda la balanza y verifique el buen funcionamiento del equipo.
6. Disponga un trozo de papel aluminio para pesar cada uno de los siguientes reactivos (sales): fosfato monopotásico anhidro 2.8 gr; citrato de magnesio 0.7 gr; sulfato de magnesio 0.28 gr; L-Asparagina 4.2 gr.
7. Disuelva las sales una a una en el agua caliente, en el orden en que se pesaron. No deje hervir la solución.
8. Adicione 14 mL de glicerol. No deje hervir la solución.
9. Disponga un trozo de papel aluminio para pesar 0.6 gr de oxalato de verde malaquita.
10. Disuelva el verde malaquita en 30 mL de agua destilada.
11. Esterilice las soluciones de sales y verde malaquita en autoclave durante 15 minutos a 121°C.
12. Limpie el área de trabajo y diligencie los respectivos formatos de uso de equipos.

Limpieza y desinfección de huevos

1. Antes de iniciar el procedimiento, asegúrese de tener disponibles los materiales, reactivos y equipos necesarios.
2. Póngase el equipo de protección personal.
3. Prepare una cubeta con agua jabonosa y sumerja los huevos.
4. Prepare una cubeta con agua de grifo.
5. Tome una gasa de 10X10 cm y frote cada huevo 10 veces cubriendo la totalidad de la cáscara o hasta retirar los residuos de suciedad.
6. Sumerja los huevos en la cubeta con agua de grifo.
7. Tome una gasa de 10X10 cm y frote cada huevo 10 veces cubriendo la totalidad de la cáscara o hasta retirar los residuos de jabón.
8. Prepare una cubeta con agua destilada.
9. Sumerja los huevos en la cubeta con agua destilada durante 15 minutos.
10. Retire los huevos y déjelos secar.
11. Rocíe los huevos con alcohol en la totalidad de la cáscara.
12. Disponga los huevos en una cubeta limpia y tápelos con una gasa limpia humedecida con alcohol.

Nota: verifique que al sumergir los huevos no se generen burbujas estando éstos en el fondo, esto indica que el huevo está fisurado y el contenido externo podría entrar afectando la calidad del medio. Los huevos viejos flotan. Esto se debe a que al ir envejeciendo, eliminan agua a través de la cáscara, perdiendo peso y aumentando su cámara de aire.



Protocolo para preparación del medio de cultivo Lowenstein - Jensen

Preparación de homogenizado de huevos

1. Limpie y desinfecte un mesón de superficie amplia.
2. Aliste un pedazo de papel kraft de aproximadamente 1.5 mts y rocielo con alcohol.
3. Disponga el papel kraft sobre el mesón y asegúrelo con cinta en sus extremos.
4. Ubique el material necesario para la preparación del homogenizado sobre el papel kraft.
5. Ubique los mecheros alrededor del material y enciéndalos.
6. Monte la gasa estéril sobre el embudo y asegúrela con cinta.
7. Monte el embudo sobre la probeta de vidrio.
8. Parta uno a uno los huevos y realice la inspección física.

Nota: los huevos frescos conservan la yema en forma abultada y circular. La clara del huevo fresco es consistente y se vuelve más líquida al pasar el tiempo. Los huevos frescos tienen un olor agradable y no presentan manchas de otros colores ni en la yema que debe ser amarilla ni en la clara que debe ser transparente o ligeramente amarillenta pero cristalina.

9. Realice una mezcla vigorosa por cada tres huevos y procure lograr un homogenizado bastante líquido.
10. Tamice el homogenizado de huevo a través de la gasa estéril, hasta obtener un volumen de 1000 mL.

Preparación del medio

Nota: la preparación del medio debe realizarse en forma rápida para evitar que las sales se precipiten afectando la calidad del medio.

1. Mezcle 1000 mL de homogenizado de huevo, 600 mL de sales y 20 mL de verde malaquita. Evite la formación de burbujas.
2. Ajuste el pH a 6.8.
3. Conserve el medio a temperatura ambiente y protegido de la luz.
4. Encienda la cabina de flujo laminar y verifique el buen funcionamiento del equipo.
5. Limpie la cabina utilizando una toalla de papel desechable impregnada con alcohol.
6. Disponga un trozo de papel kraft de medidas similares a las de la bandeja de la cabina, rocielo con alcohol y ubíquelo en la bandeja.
7. Desinfecte los materiales (pipeteador, pipetas, tubos estériles y gradillas) rociándolos con alcohol e ingréselos a la cabina.
8. Encienda la luz UV por 15 min y posteriormente accione el flujo de aire continuo.
9. Ingrese el medio de cultivo a la cabina y dispense el volumen requerido en cada tubo.
10. Ubique los tubos con el medio dentro del equipo coagulador. Verifique una posición que permita un ángulo de inclinación que deje en la parte inferior del tubo una cuña de 1 cm y 2 cm libres de medio en la boca del tubo. Evite la formación de burbujas.
11. Coagule el medio a 80°C durante 60 minutos, con las tapas de los tubos sin ajustar. Evite que el medio hierva o se deshidrate.

Protocolo para preparación del medio de cultivo Lowenstein - Jensen

Preparación del medio

12. Compruebe la coagulación del medio golpeando los tubos sobre la palma de la mano. El medio debe quedar firme y adherido a las paredes del tubo. De no ser así continúe coagulando hasta lograr la textura apropiada.
13. Retire los medios del equipo coagulador y déjelos enfriar a temperatura ambiente y protegidos de la luz.
14. Ajuste las tapas de los tubos.
15. Almacene los tubos a 4°C, con la información del medio que contienen, la fecha de preparación y el nombre de quien los preparó.
16. Limpie el área de trabajo y diligencie los respectivos formatos de uso de equipos.

Esquema de preparación del medio LJ.



Limpie y desinfecte los huevos.
Realice inspección física.



Prepare el área de trabajo.



Homogenice y tamice los huevos.
Realice inspección física.



Prepare el medio líquido y sírvalo en los tubos.



Coagule el medio y atempérello protegido de la luz.



Rotule el medio con nombre y fecha y almacene a 4°C



Protocolo para preparación del agar Mueller Hinton

Materiales	<ul style="list-style-type: none"> • Papel aluminio • Papel Kraft • Baja lenguas • Pipetas de vidrio de 20 mL estériles • Probeta de 1000 mL o 500 mL • Frasco tapa rosca o Erlenmeyer de 2000 mL • Tubos de vidrio tapa rosca 20X150 mL • Gradillas para tubos de 20 mm • Toallas de papel desechables • Equipo de protección personal (guantes, bata de laboratorio, gorro, polainas y tapabocas) • Marcador permanente
Reactivos	<ul style="list-style-type: none"> • Agar Mueller Hinton (Merck 1.05437.0500) • Agua destilada • Alcohol al 70%
Equipos	<ul style="list-style-type: none"> • Estufa • Balanza analítica • Pipeteador • Autoclave • pH-metro • Cabina de flujo laminar • Nevera • Carrito auxiliar para transporte de material

Metodología:

1. Antes de iniciar el procedimiento, asegúrese de tener disponibles los materiales, reactivos y equipos necesarios.
2. Póngase el equipo de protección personal.
3. Limpie la balanza utilizando una brocha o pincel limpio.
4. Encienda la balanza verifique el buen funcionamiento del equipo.
5. Disponga un trozo de papel aluminio para pesar 34 gr de agar Mueller Hinton en polvo.
6. Mezcle el reactivo con 1 Lt de agua y caliente en la estufa hasta disolver.
7. Ajuste el pH a 7.4 ± 0.2 .
8. Esterilice en autoclave a 121°C por 15 minutos.
9. Atempere el medio a 50°C .
10. Encienda la cabina de flujo laminar y verifique el buen funcionamiento del equipo.
11. Limpie la cabina utilizando una toalla de papel desechable impregnada con alcohol.
12. Disponga un trozo de papel kraft de medidas similares a las de la bandeja de la cabina, rocíelo con alcohol y ubíquelo en la bandeja.
13. Desinfecte el los materiales (pipeteador, pipetas, tubos estériles y gradillas) rociándolos con alcohol e ingréselos a la cabina.
14. Encienda la luz UV por 15 min y posteriormente accione el flujo de aire continuo.
15. Ingrese el medio de cultivo a la cabina y dispense 25 mL de medio en cada tubo.
16. Almacene los tubos con el medio solidificado a 4°C , con la información del medio que contienen, la fecha de preparación y el nombre de quien los preparó.
17. Limpie el área de trabajo y diligencie los respectivos formatos de uso de equipos.



Protocolo para preparación del caldo Mueller Hinton

Materiales	<ul style="list-style-type: none"> • Papel aluminio • Papel Kraft • Baja lenguas • Probeta de 1000 mL o 500 mL • Frasco tapa rosca o Erlenmeyer de 2000 mL • Toallas de papel desechables • Equipo de protección personal (guantes, bata de laboratorio, gorro, polainas y tapabocas) • Marcador permanente
Reactivos	<ul style="list-style-type: none"> • Caldo Mueller Hinton (BD BBL / 211443) • Agua destilada
Equipos	<ul style="list-style-type: none"> • Estufa • Balanza analítica • Autoclave • pH-metro • Nevera • Carrito auxiliar para transporte de material

Metodología:

1. Antes de iniciar el procedimiento, asegúrese de tener disponibles los materiales, reactivos y equipos necesarios.
2. Póngase el equipo de protección personal.
3. Limpie la balanza utilizando una brocha o pincel limpio.
4. Encienda la balanza verifique el buen funcionamiento del equipo.
5. Disponga un trozo de papel aluminio para pesar 22 gr de caldo Mueller Hinton en polvo.
6. Disuelva el reactivo en 1 Lt de agua y caliente en la estufa hasta disolver. No deje hervir la solución.
7. Ajuste el pH a 7.3 ± 0.1 .
8. Esterilice en autoclave a 121°C por 15 minutos.
9. Deje enfriar el medio hasta temperatura ambiente.
10. Almacene a 4°C , con la información del medio, la fecha de preparación y el nombre de quien lo preparó.
11. Limpie el área de trabajo y diligencie los respectivos formatos de uso de equipos.



Mycobacterium
Laboratorio de Investigación y Extensión

Protocolo para preparación del medio líquido M7H9+OADC

Materiales	<ul style="list-style-type: none">• Papel aluminio• Papel Kraft• Baja lenguas• Pipetas de vidrio de 20 mL estériles• Probeta de 1000 mL o 500 mL• Frasco tapa rosca o Erlenmeyer de 2000 mL• Frascos tapa rosca o Erlenmeyers de 50 mL• Toallas de papel desechables• Equipo de protección personal (guantes, bata de laboratorio, gorro, polainas y tapabocas)• Marcador permanente
Reactivos	<ul style="list-style-type: none">• Caldo Broth Middlebrook 7H9 (BD / 271310)• Middlebrook OADC (BD / 211886)• Glicerol (<i>Sigma Aldrich</i>)• Agua destilada• Alcohol al 70%
Equipos	<ul style="list-style-type: none">• Estufa• Balanza analítica• Pipeteador• Autoclave• pH-metro• Cabina de flujo laminar• Nevera• Carrito auxiliar para transporte de material

Metodología:

1. Antes de iniciar el procedimiento, asegúrese de tener disponibles los materiales, reactivos y equipos necesarios.
2. Póngase el equipo de protección personal.
3. Limpie la balanza utilizando una brocha o pincel limpio.
4. Encienda la balanza verifique el buen funcionamiento del equipo.
5. Disponga un trozo de papel aluminio para pesar 2,35 gr de Caldo Broth Middlebrook 7H9 en polvo.
6. Mezcle el reactivo con 450 mL de agua y 2.5 mL de glicerol.
7. Caliente en la estufa hasta disolver.
8. Esterilice en autoclave a 121°C por 15 minutos.
9. Encienda la cabina de flujo laminar y verifique el buen funcionamiento del equipo.
10. Limpie la cabina utilizando una toalla de papel desechable impregnada con alcohol.
11. Disponga un trozo de papel kraft de medidas similares a las de la bandeja de la cabina, rocíelo con alcohol y ubíquelo en la bandeja.
12. Desinfecte los materiales (pipeteador, pipetas, tubos estériles y gradillas) rociándolos con alcohol e ingréselos a la cabina.
13. Encienda la luz UV por 15 min y posteriormente accione el flujo de aire continuo.
14. Ingrese el medio de cultivo a la cabina y el Middlebrook OADC.
15. Verifique que el medio esté a 45°C y adicione 50 mL de Middlebrook OADC
16. Dispense 45 mL de medio en frascos tapa rosca.
17. Almacene los frascos a 4°C, con la información del medio que contienen, la fecha de preparación y el nombre de quien los preparó.
18. Limpie el área de trabajo y diligencie los respectivos formatos de uso de equipos.

Código: MLIE.P17 Versión: 01 Fecha de elaboración: Agosto de 2012 Elaboró: María Fernanda Moreno Vargas Aprobó: Wellman Ribón

Protocolo para preparación del reactivo de MTT

Materiales	<ul style="list-style-type: none"> • Papel aluminio • Baja lenguas • Pipetas de vidrio de 5 y 10 mL estériles • Tubos cónicos 50 mL estériles • Filtros de membrana de 0,22 micrómetros de diámetro • Jeringas de 20 mL estériles • Toallas de papel desechables • Equipo de protección personal (guantes, bata desechable, gorro, polainas tapabocas) • Gradillas para tubos cónicos • Marcador permanente
Reactivos	<ul style="list-style-type: none"> • Reactivo de MTT (<i>SIGMA ALDRICH / M5655-1G</i>) • Agua destilada estéril • Alcohol al 70%
Equipos	<ul style="list-style-type: none"> • Balanza analítica • Pipeteador • Agitador mecánico • Cabina de flujo laminar • Nevera • Carrito auxiliar para transporte de material

Metodología:

1. Antes de iniciar el procedimiento, asegúrese de tener disponibles los materiales, reactivos y equipos necesarios.
2. Póngase el equipo de protección personal.
3. Limpie la balanza utilizando una brocha o pincel limpio.
4. Encienda la balanza analítica y la cabina de flujo laminar y verifique el buen funcionamiento de los equipos.
5. Desinfecte la cabina de flujo laminar utilizando alcohol.
6. Desinfecte los materiales (pipeteador, pipetas, filtros, agua destilada estéril, tubos cónicos estériles de 50 mL, gradilla) rociándolos con alcohol e ingréselos a la cabina.
7. Encienda la luz UV por 15 min y posteriormente accione el flujo de aire continuo.
8. Disponga un trozo de papel aluminio para pesar el reactivo.
9. Para la preparación de 50 mL de solución inicial, pese 250 mg de reactivo utilizando baja lenguas.
10. Adicione el reactivo pesado al tubo cónico.
11. En la cabina de flujo laminar, adicione 10 mL de agua destilada al tubo que contiene el reactivo.
12. Proceda a la agitación mecánica del tubo, utilizando agitador mecánico hasta que se disuelva el MTT.
13. Dentro de la cabina, adicione los 40 mL de agua destilada restantes.
14. Agite mecánicamente por 60 segundos.
15. Filtre la solución utilizando membranas de 0,22 micrómetros.
16. Distribuya en alícuotas de 10 mL.
17. Marque los tubos con el nombre de la solución preparada, fecha y nombre de quien la preparó.
18. Envuelva los frascos que contienen la solución de MTT en papel aluminio y refrigérelos a 4°C.
19. Limpie el área de trabajo y diligencie los respectivos formatos de uso de equipos.



Protocolo para preparación del reactivo de Tween 80 al 20%

Materiales	<ul style="list-style-type: none"> • Pipetas de vidrio de 10 mL • Tubos cónicos 50 mL • Toallas de papel desechables • Equipo de protección personal (guantes, bata desechable, gorro, polainas tapabocas) • Gradillas para tubos cónicos • Marcador permanente • Erlenmeyer 500 mL
Reactivos	<ul style="list-style-type: none"> • Reactivo de Tween 80 (MERCK / 8.22187.050) • Agua destilada estéril
Equipos	<ul style="list-style-type: none"> • Pipeteador • Estufa • Nevera • Carrito auxiliar para transporte de material

Metodología:

1. Antes de iniciar el procedimiento, asegúrese de tener disponibles los materiales, reactivos y equipos necesarios.
2. Póngase el equipo de protección personal.
3. Precaliente agua en el Erlenmeyer a temperatura baja.
4. Adicione 10 mL de reactivo de Tween 80 a cada un tubo cónico de 50 mL.
5. Adicione 10 mL de agua destilada.
6. Caliente el tubo en el erlenmeyer.
7. Mezcle por inversión, evitando la formación de burbujas.
8. Repita los pasos 5, 6 y 7 hasta adicionar 40 mL de agua destilada.
9. Marque el tubo con el nombre de la solución preparada, fecha y nombre de quien la preparó.
10. Refrigere la solución a 4°C.
11. Limpie el área de trabajo y diligencie los respectivos formatos de uso de equipos.



Protocolo para preparación del reactivo de PBS

Materiales	<ul style="list-style-type: none"> • Papel aluminio • Baja lenguas • Probeta • Frasco de vidrio tapa rosca estéril • Toallas de papel desechables • Equipo de protección personal (guantes, bata desechable, gorro, polainas tapabocas) • Marcador permanente
Reactivos	<ul style="list-style-type: none"> • NaCl, KCl, NaPO₄H₂, KPO₄H₂ • Agua destilada estéril
Equipos	<ul style="list-style-type: none"> • Balanza analítica • pH-metro • Autoclave • Nevera • Carrito auxiliar para transporte de material

Metodología:

1. Antes de iniciar el procedimiento, asegúrese de tener disponibles los materiales, reactivos y equipos necesarios.
2. Póngase el equipo de protección personal.
3. Limpie la balanza utilizando una brocha o pincel limpio.
4. Encienda la balanza analítica y verifique el buen funcionamiento del equipo.
5. Utilice papel aluminio en trozos individuales para pesar los reactivos a saber: NaCl 8 gr, KCl 0.2 gr, NaPO₄H₂ 1.44 gr, KPO₄H₂ 0.24 gr.
6. Adicione los reactivos pesados al frasco de vidrio.
7. Disuelva los reactivos en 1 Lt de agua destilada.
8. Ajuste el pH a 6.8.
9. Esterilice la solución en autoclave durante 20 minutos a 121°C.
10. Deje enfriar la solución a temperatura ambiente.
11. Marque el frasco de vidrio con el nombre de la solución a preparar, fecha y nombre de quien la preparó.
12. Refrigere la solución a 4°C.
13. Limpie el área de trabajo y diligencie los respectivos formatos de uso de equipos.



Protocolo para la realización del ensayo colorimétrico del MTT

Fundamento del ensayo: El 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil bromuro de tetrazolio (MTT), es una sal de color amarillo, soluble en agua. Mediante la acción enzimática de las deshidrogenasas celulares y extracelulares, la sal es reducida produciéndose la destrucción del anillo de tetrazolio y formándose cristales insolubles de formazán que revelan un color púrpura. La producción de los cristales es empleada como una medida indirecta del metabolismo y por tanto de la viabilidad celular.

Materiales	<ul style="list-style-type: none"> • Puntas amarillas estériles • Puntas azules estériles • Pipetas de vidrio de 5 y 10 mL estériles • Tubos cónicos 15 y 50 mL estériles • Filtros de membrana de 0,22 micrómetros de diámetro • Jeringas de 5, 10 y 20 mL estériles • Toallas de papel desechables • Bandeja de descarte con tapa • Papel Kraft • Equipo de protección personal (guantes, bata desechable, gorro, polainas y respirador N95 o tapabocas) • Gradillas para tubos cónicos • Micropietas de 10—100 μL, 100—1000 μL
Reactivos	<ul style="list-style-type: none"> • Solución de inicial de diluyente (Tween 80 al 20% ó PBS 10X) • Solución de inicial de MTT (5mg/mL) • Hipoclorito al 2.5% • Fenol al 5% • Alcohol al 70% • Ensayo de bioactividad a revelar
Equipos	<ul style="list-style-type: none"> • Pipeteador • Cabina de bioseguridad tipo II • Incubadora a 37°C \pm 1 • Carrito auxiliar para transporte de material

Metodología:

1. Antes de iniciar el procedimiento, asegúrese de tener disponibles los materiales, reactivos y equipos necesarios.
2. Encienda la cabina de bioseguridad y verifique el buen funcionamiento del equipo.
3. Póngase el equipo de protección personal.
4. Limpie la cabina de bioseguridad utilizando una toalla de papel desechable impregnada con fenol.
5. Disponga un trozo de papel kraft de medidas similares a las de la bandeja de la cabina de bioseguridad y rocíelo con alcohol.
6. Ubique el papel kraft sobre la bandeja de la cabina de bioseguridad.
7. Prepare una bandeja de descarte con hipoclorito.
8. Desinfecte los materiales a utilizar con alcohol e ingréselos a la cabina.
9. Prepare una solución de trabajo de MTT mezclando un volumen de solución de inicial de MTT + 1,2 volúmenes de solución inicial de diluyente por cada muestra a revelar.
10. Esterilice por filtración.

Protocolo para la realización del ensayo colorimétrico del MTT

Metodología:

11. Adicione un volumen de 22 μ L de solución de trabajo de MTT a cada pozo de prueba del ensayo con microplaca o 220 μ L a cada uno de los ensayos en tubo.
12. Incube los ensayos 24 horas a 37°C si es el caso de *Mycobacterium tuberculosis* o 30 minutos si es el caso de *Escherichia coli* o *Staphylococcus aureus*.
13. Retire los materiales sobrantes de la cabina y desinfectela de nuevo con fenol.
14. Diligencie los respectivos formatos de uso de equipos.

Lectura e interpretación de resultados:

Pasado el tiempo de revelado, realice la confirmación visual del color. El cambio de color de amarillo a violeta indica la viabilidad de la bacteria. Interprete como No Bioactivo todo pozo o tubo de ensayo donde se obtuvo un color violeta y como Bioactivo en caso de mantenerse el color amarillo.



Figura 1. Ensayo de MTT revelado. El tubo con solución de color amarillo indica que la muestra es Bioactiva a la concentración probada. El tubo con solución de color violeta indica metabolismo celular y por tanto la muestra es No Bioactiva a la concentración probada.



Protocolo para preparación de soluciones madre de AEs

Materiales	<ul style="list-style-type: none"> • Papel Kraft • Viales de vidrio tapa rosca estériles* • Gradilla para viales de vidrio • Toallas de papel desechables* • Equipo de protección personal (guantes, bata de laboratorio, gorro, polainas y tapabocas) • Marcador permanente • Rotulos para viales o cinta de enmascarar
Reactivos	<ul style="list-style-type: none"> • AEs puros • DMSO (Dimetil sulfóxido) (<i>Sigma Aldrich</i>) • Alcohol al 70%
Equipos	<ul style="list-style-type: none"> • Balanza analítica • Micropipeta 100-1000µL • Nevera • Carrito auxiliar para transporte de material

Metodología

1. Antes de iniciar el procedimiento, asegúrese de tener disponibles los materiales, reactivos y equipos necesarios.
2. Póngase el equipo de protección personal.
3. Limpie la balanza utilizando una brocha o pincel limpio.
4. Encienda la balanza y verifique el buen funcionamiento del equipo.
5. Disponga un vial estéril por cada solución madre a preparar.
6. Marque cada vial con el nombre respectivo del AE, el código asignado por el *Mycobacterium*: Laboratorio de Investigación y Extensión
7. Pese 250 µL de AE y anote el dato en mg (*P1*)
8. Adicione 250 µL de DMSO
9. Cierre el vial y mezcle suavemente por inversión
10. Calcule la concentración de la solución madre (*C1*) en mg/mL usando la siguiente fórmula:

$$(P1) / 500 = (C1)$$

11. Anote la concentración de la solución madre en el rótulo del vial.
12. Almacene los viales con los AE y las soluciones madre a 4°C por un tiempo no mayor a 6 meses.
13. Limpie el área de trabajo y diligencie los respectivos formatos de uso de equipos.

Protocolo para preparación de soluciones iniciales de medicamentos

Materiales	<ul style="list-style-type: none"> • Papel Kraft • Tubos cónicos 15 mL estériles • Viales de plásticos estériles • Gradillas para tubos cónicos y viales plásticos • Toallas de papel desechables • Filtros de membrana de 0,22 micrómetros de diámetro estériles • Jeringas de 5, 10 mL estériles • Equipo de protección personal (guantes, bata de laboratorio, gorro, polainas y tapabocas) • Marcador permanente
Reactivos	<ul style="list-style-type: none"> • Rifampicina (Sigma Aldrich) • Isoniacida (Sigma Aldrich) • Gentamicina de 10 mg / mL (Invitrogen Ref. 15710-064) • Agua destilada estéril • Metanol • Alcohol al 70%
Equipos	<ul style="list-style-type: none"> • Balanza analítica • Cabina de flujo laminar • Agitador mecánico • Micropipeta 100-1000μL • Nevera • Carrito auxiliar para transporte de material

Metodología

1. Antes de iniciar el procedimiento, asegúrese de tener disponibles los materiales, reactivos y equipos necesarios.
2. Póngase el equipo de protección personal.
3. Limpie la balanza utilizando una brocha o pincel limpio.
4. Encienda la balanza y verifique el buen funcionamiento del equipo.
5. Disponga un tubo cónico estéril por cada solución inicial a preparar.
6. Marque cada tubo cónico con el nombre respectivo del medicamento
7. Para la preparación de rifampicina: pese 2 mg de reactivo y adicione 30 μ L de metanol y agite suavemente, luego adicione 1970 μ L de agua destilada y mezcle en el agitador mecánico.
8. Para la preparación de isoniacida: pese 2 mg de reactivo y adicione 2 mL de agua destilada, luego mezcle utilizando el agitador mecánico.
9. Encienda la cabina de flujo laminar y verifique el buen funcionamiento del equipo.
10. Para la preparación de gentamicina: mezcle 20 μ L de reactivo con 1980 μ L de agua destilada y mezcle suavemente.
11. Filtre cada una de las soluciones iniciales.
12. Marque 4 a 5 viales por cada uno de los medicamentos. Rotule con nombre, fecha y concentración de la solución inicial.
13. Distribuya cada una de las soluciones iniciales en alícuotas de 0.5 μ L.
12. Almacene los viales con las soluciones iniciales -20°C por un tiempo no mayor a 6 meses.
13. Limpie el área de trabajo y diligencie los respectivos formatos de uso de equipos.

ANEXO F Concentraciones de las soluciones madre de aceites esenciales

Código de la muestra	Nombre científico	Concentración de la solución madre (mg/mL)
N° 1	<i>Tagetes lucida Cav.</i>	480
N° 2	<i>Cymbopogon citratus</i>	436
N° 3	<i>Rosmarinus officinalis</i>	440
N° 4	<i>Turnera diffusa</i>	460
N° 5	<i>Cymbopogon flexuosus</i>	448
N° 6	<i>Lippia alba Mill</i>	446
N° 7	<i>Citrus scinensis Osbeck</i>	416
N° 8	<i>Swinglea glutinosa</i>	400
N° 9	<i>Cananga odorata</i>	476
N° 10	<i>Eucaliptus citriodora Hook</i>	430
N° 20	<i>Lippia origanioides</i> Qto. Carvacrol	461
N° 21	<i>Lippia origanioides</i> FD: 0252 Qto. Carvacrol	462
N° 22	<i>Lippia origanioides</i> FD: 0250 Qto. Carvacrol	461
N° 23	<i>Lippia origanioides</i> FD: 0251 Qto. Carvacrol	459