



Search for synthetic and natural substances with in vitro bioactivity against Mycobacterium tuberculosis.

Authors: Maria-Fernanda Moreno , Wellman Ribón
Submitted: 10. January 2018
Published: 12. January 2018
Volume: 5
Issue: 1
Affiliation: Universidad Industrial de Santander. Colombia.
Languages: Spanish, Castilian
Keywords: Mycobacterium tuberculosis, tuberculosis, antimycobacterial activity, synthetic molecules, essential oils, plant extracts.
DOI: 10.17160/josha.5.1.380

JOSHA

josha.org

**Journal of Science,
Humanities and Arts**

JOSHA is a service that helps scholars, researchers, and students discover, use, and build upon a wide range of content

**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**

RESUMEN

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

AUTOR: María Fernanda Moreno Vargas, Wellman Ribón

INTRODUCCIÓN: la tuberculosis (TB) es considerada como una emergencia mundial en salud. Debido a esto, organismos internacionales y nacionales fomentan investigaciones conducentes al mejoramiento y fortalecimiento de las estrategias de control y tratamiento de la enfermedad. Actualmente, existen fármacos que se encuentran adelantados en su proceso para ser incluidos como fármacos anti TB dentro del esquema estándar de tratamiento, sin embargo para algunos ya se han reportado cepas resistentes o se prevé su existencia haciendo que el requerimiento de nuevos fármacos continúe.

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: las 15 moléculas sintéticas fueron diseñadas mediante la estrategia de síntesis orientada a la diversidad (DOS), los 14 aceites esenciales (AEs) fueron extraídos mediante hidrodestilación asistida por la radiación de microondas (MWHD) y los 6 extractos vegetales (EVs) se obtuvieron mediante extracción con fluidos supercríticos (SFE). 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, mediante la realización de curvas de letalidad. Las pruebas fueron corridas con rifampicina (RIF) e isoniacida (INH) como medicamentos control, adicionalmente se incluyeron controles de crecimiento y controles de esterilidad del medio de cultivo.

RESULTADOS: se obtuvieron sustancias de origen natural y sintético con bioactividad contra *M. tuberculosis* en un rango de concentraciones probadas. De las 15 moléculas analizadas 3 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 los extractos obtenidos de *Baccharis aff. Buddleioides*, *Wedelia calycina* y *Nectranda reticulata* Los 14 AEs presentaron bioactividad contra el microorganismo y aquellos obtenidos de *Eucaliptus citriodora* Hook, *Cymbopogon citratus*, *Cymbopogon flexuosus* y *Turnera diffusa* se consideraron promisorios por presentar CMI entre 31,25 y 100 µg/mL. Los ensayos de curvas de letalidad evidenciaron un efecto bactericida de *C. citratus* y *T. diffusa* con un porcentaje de muerte bacteriana ≥99% al día 6 del ensayo. *E. citriodora* y *C. flexuosus* presentaron efecto bacteriostático.

CONCLUSION: 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, apoyan su perspectiva de uso dentro de diversos productos industriales no farmacológicos. La presente investigación contribuye al estudio y caracterización de la biodiversidad así como al desarrollo de nuevos principios activos contra enfermedades de interés en salud pública a nivel mundial como la TB.

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

ABSTRACT

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

AUTHOR: María Fernanda Moreno Vargas, Wellman Ribón.

INTRODUCTION: tuberculosis (TB) is still considered as an important worldwide health problem. For this reason, national and international health agencies encourage the researchers to improve and strengthen the control strategies and disease treatment. Currently, there have been important advances in the discovery and development of drugs that probably will be included in the standard scheme of anti-TB treatment, however for many of the current treatments, there have been resistant strains reported and even worst for most of the new treatments resistance is expected, making it necessary to maintain a continuous search for treatment alternatives.

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

METHODS: the 15 synthetic molecules were designed using the strategy of diversity-oriented synthesis (DOS), the 14 essential oils were extracted by hydrodistillation assisted by microwave radiation (MWHd) and the 6 plant extracts were obtained by supercritical fluid extraction (SFE). Bioactivity 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 the colourimetric 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. The tests were run with isoniazid and rifampin as control drugs. Additionally, growing control and sterility of the culture medium control were included.

RESULTS: Both, natural and synthetic substances showed bioactivity against *M. tuberculosis* within the range of concentrations tested. 3 of 15 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 1000 µg/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 the microorganism and the oils obtained from *Eucalyptus citriodora* Hook, *Cymbopogon citratus*, *Cymbopogon flexuosus* and *Turnera diffusa* were considered as promising (MICs between 31.25 and 100 µg / mL). The killing curves indicated a bactericidal effect of *C. citratus* and *T. diffusa* with a ≥ 99% of bacterial death rate at day 6th of the assay. *E. citriodora* and *C. flexuosus* presented bacteriostatic effect.

CONCLUSIONS: bactericidal activity showed from *C. citratus* and *T. diffusa* against *M. tuberculosis* support further research for the discovery and development of anti - TB agents. The bacteriostatic activity display by *C. flexuosus* and *E. citriodora* Hook suggest a promissory use of this extracts in various industrial nonpharmacological products. This research contributes to the study and characterization of biodiversity and the development of new active principles against diseases of public health concern as TB.

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

CONTENIDO

	pág.
CAPITULO 1 (CHAPTER 1)	
INTRODUCCIÓN	1
1. IDENTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	3
2. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	6
3. MARCO TEÓRICO	7
3.1 INICIOS DE LA RELACIÓN ENTRE <i>Mycobacterium tuberculosis</i> Y LA RAZA HUMANA	7
3.2 EVOLUCIÓN DEL TRATAMIENTO ANTI TUBERCULOSIS	8
3.3 DESAFÍOS EN EL CONTROL DE LA TUBERCULOSIS	11
3.3.1 Coinfección tuberculosis – Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH)	11
3.3.2 Resistencia en tuberculosis	12
3.3.3 Inequidades sociales	15
3.4 NECESIDAD DE NUEVOS FÁRMACOS ANTITUBERCULOSOS	15
3.5 DESCUBRIMIENTO Y DESARROLLO DE NUEVOS FÁRMACOS ANTI TUBERCULOSIS	17
3.5.1 Fase de descubrimiento	17
3.5.2 Fase de desarrollo	20
3.6 NUEVOS FÁRMACOS ANTI TUBERCULOSIS: CANDIDATOS EN FASE III	20
3.7 FUENTES DE NUEVOS COMPUESTOS BIOACTIVOS CONTRA <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	22
3.7.1 Moléculas sintéticas	23
3.7.1.1 Derivados de las 1-benzoazepinas	24
3.7.1.2 Derivados de las naftoazepinas	26
3.7.1.3 Derivados de las quinolonas	26
3.7.2 Sustancias de origen vegetal	27
3.7.2.1 Aceites esenciales (AEs)	27
3.7.2.2 Extractos vegetales (EVs)	33
4. OBJETIVOS	36
4.1. OBJETIVO GENERAL	36

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
5. JUSTIFICACION	37
CAPITULO 2 (CHAPTER 2)	
6. DISEÑO METODOLÓGICO	40
6.1 CEPAS BACTERIANAS	40
6.2 SUSTANCIAS DE PRUEBA	41
6.2.1 Moléculas sintéticas: criterio de selección, método de obtención y preparación de soluciones iniciales	41
6.2.2 Sustancias de origen natural: criterio de selección, calificación taxonómica, método de obtención y preparación de soluciones iniciales	44
6.3 MEDICAMENTOS CONTROL: criterio de selección y preparación de soluciones iniciales	46
6.4. INDICADOR DE CRECIMIENTO: preparación de soluciones iniciales	47
6.5 MEDIOS DE CULTIVO	47
6.6 IMPLEMENTACIÓN DE LA METODOLOGÍA COLORIMÉTRICA DEL MTT PARA EL ALCANCE DEL OBJETIVO ESPECÍFICO NÚMERO 1	48
6.7 ENSAYOS DE BIOACTIVIDAD DE MOLÉCULAS SINTÉTICAS, EXTRACTOS VEGETALES Y ACEITES ESENCIALES PARA EL ALCANCE DEL OBJETIVO ESPECÍFICO NÚMERO 2	48
6.7.1 Ensayos de bioactividad frente a <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	48
6.7.1.1 Obtención del inóculo	48
6.7.1.2 Preparación de soluciones de trabajo	49
6.7.1.3 Montaje del ensayo de microdilución en placa para evaluación de moléculas sintéticas	52
6.7.1.4 Montaje del ensayo de microdilución en placa para evaluación de extractos vegetales	54
6.7.1.5 Montaje del ensayo de macrodilución en tubo para evaluación de aceites esenciales	56
6.7.1.6 Condiciones de incubación de los ensayos	57
6.7.1.7 Revelado de los ensayos	57
6.7.1.8 Lectura e interpretación de resultados	57
6.7.1.9 Criterio de actividad	58
6.7.2 Ensayos de bioactividad frente a <i>Escherichia coli</i> y <i>Staphylococcus aureus</i>	58
6.7.2.1 Obtención del inóculo	58

6.7.2.2 Preparación de soluciones de trabajo	59
6.7.2.3 Montaje del ensayo de macrodilución en tubo para evaluación de aceites esenciales	60
6.7.2.4 Condiciones de incubación del ensayo	60
6.7.2.5 Revelado de los ensayos	60
6.7.2.6 Lectura e interpretación de resultados	60
6.8 CURVAS DE LETALIDAD CONTRA <i>Mycobacterium tuberculosis</i> PARA CUMPLIR CON EL OBJETIVO ESPECÍFICO NÚMERO 3.	61
6.8.1 Montaje del ensayo	61
6.8.2 Condiciones de incubación del ensayo	62
6.8.3 Lectura e interpretación de resultados	62
6.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	62
6.10 CONSIDERACIONES ÉTICAS	63
7. RESULTADOS	65
7.1 IMPLEMENTACIÓN DE LA METODOLOGÍA COLORIMÉTRICA DEL MTT	65
7.2 EVALUACIÓN DE LA BIOACTIVIDAD DE MOLÉCULAS SINTÉTICAS, EXTRACTOS VEGETALES Y ACEITES ESENCIALES	69
7.2.1 Tres moléculas sintéticas fueron activas contra <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	69
7.2.2 Tres extractos vegetales fueron activos contra <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	70
7.2.3 Todos los aceites esenciales fueron activos contra <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	71
7.2.4 Los aceites esenciales de <i>Cymbopogon citratus</i> y <i>Cymbopogon flexuosus</i> fueron activos contra <i>Staphylococcus aureus</i>	74
7.3 EVALUACIÓN DEL EFECTO BACTERICIDA DE <i>Eucaliptus citriodora</i> Hook, <i>Cymbopogon citratus</i> , <i>Cymbopogon flexuosus</i> y <i>Turnera diffusa</i> FRENTE A <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	74
7.3.1 Dos aceites esenciales presentaron efecto bactericida y dos efecto bacteriostático	74
8. DISCUSIÓN	79
9. CONCLUSIONES	89
10. DIVULGACIÓN	90
BIBLIOGRAFÍA	91
ANEXOS	112

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 Dimetíl 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
MWHHD 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 ANEXOS

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

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

ANEXO C Tablas consolidadas de resultados de curvas de letalidad de aceites esenciales frente a *Mycobacterium tuberculosis*

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

ANEXO F Concentraciones de las soluciones madre de aceites esenciales

LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1: Diversos AEs extraídos mediante MWHD (Fuente <i>Mycobacterium</i> : Laboratorio de Investigación y Extensión)	28
Figura 2: Algunos EVs obtenidos mediante SFE. (Fuente <i>Mycobacterium</i> : Laboratorio de Investigación y Extensión)	34
Figura 3. Distribución de muestras y controles para la primera fase de evaluación de la bioactividad moléculas sintéticas frente a <i>M. tuberculosis</i> .	53
Figura 4. Distribución de muestras y controles para la segunda fase de evaluación de la bioactividad moléculas sintéticas frente a <i>M. tuberculosis</i> .	53
Figura 5. Distribución de muestras y controles para la evaluación de la bioactividad de EVs frente a <i>M. tuberculosis</i> .	55
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> .	56
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> .	61
Figura 8: Inspección visual del ensayo colorimétrico del MTT. Tubo amarillo: muestra Bioactiva. Tubo violeta: muestra No Bioactiva.	65
Figura 9: porcentaje de muestras de acuerdo al valor de ABC.	67
Figura 10: Porcentaje de resultados bien clasificados como Bioactivos o No bioactivos de acuerdo la muestra.	67
Figura 11: Curvas ROC de las muestras N°2, N°4, N°5 y N°10	68

Figura 12: curva de letalidad de RIF frente a <i>M. tuberculosis</i>	75
Figura 13: curva de letalidad de INH frente a <i>M. tuberculosis</i>	75
Figura 14: curva de letalidad de <i>C. citratus</i> frente a <i>M. tuberculosis</i>	76
Figura 15: curva de letalidad de <i>T. diffusa</i> frente a <i>M. tuberculosis</i>	76
Figura 16: curva de letalidad de <i>C. flexuosus</i> frente a <i>M. tuberculosis</i>	77
Figura 17: curva de letalidad de <i>E. citriodora</i> Hook frente a <i>M. tuberculosis</i>	78
Figura 18. Estructura del compuesto 9-cloro-5-(4-hidroxifenil)-2,3,4,5-tetrahidro-1H-3-benzazepina-7, 8-diol hidrobromido. Fenoldopam.	82

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)	32
Tabla 2. Moléculas sintéticas evaluadas en el estudio.	41
Tabla 3. AEs de plantas endémicas del departamento de Santander-Colombia incluidos en el estudio.	45
Tabla 4. EVs de plantas endémicas del departamento de Santander-Colombia incluidos en el estudio.	46
Tabla 5. Preparación de soluciones de trabajo para la evaluación de moléculas sintéticas contra <i>M. tuberculosis</i> .	50
Tabla 6. Preparación de soluciones de trabajo para la evaluación de AEs contra <i>M. tuberculosis</i> .	50
Tabla 7. Preparación de soluciones de trabajo para la evaluación de EVs contra <i>M. tuberculosis</i> .	51
Tabla 8: Preparación de soluciones de trabajo para la evaluación de AEs contra <i>E. coli</i> y <i>S. aureus</i>	59
Tabla 9. Concentración mínima inhibitoria de moléculas sintéticas contra <i>M. tuberculosis</i> .	70
Tabla 10. Concentración mínima inhibitoria de EVs contra <i>M. tuberculosis</i>	71
Tabla 11. Concentración mínima inhibitoria de AEs contra <i>M. tuberculosis</i>	72

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*.

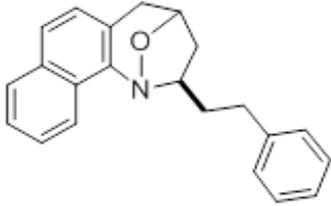
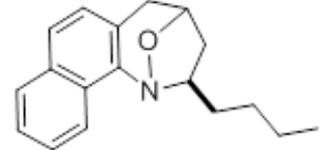
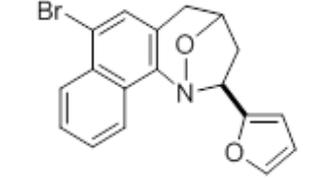
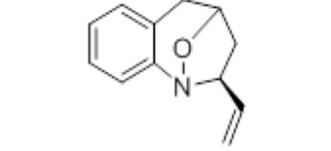
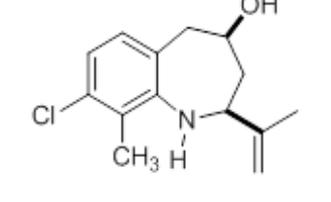
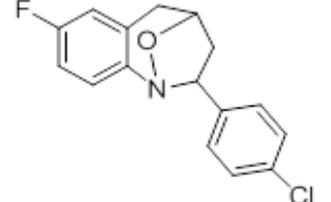
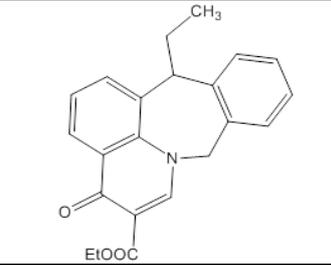
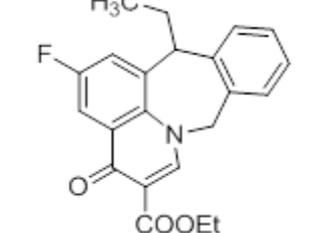
6.2 SUSTANCIAS DE PRUEBA

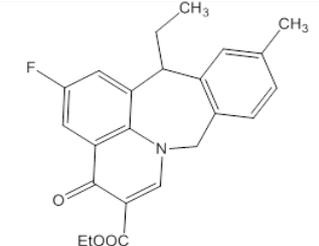
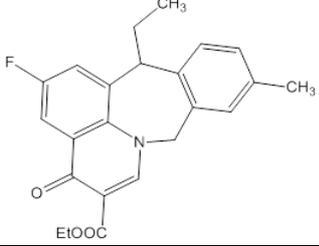
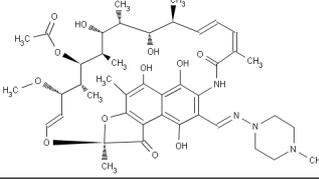
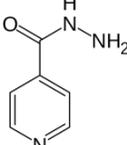
6.2.1 Moléculas sintéticas: criterio de selección, método de obtención y preparación de soluciones iniciales

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-benzazepinas	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-4 <i>H</i> -benzo[5,6]azepino[3,2,1- <i>ij</i>]quinolina-5-carboxilato	
	ES2D1	Etil 13-etil-2-flúoro-4-oxo-8,13-dihidro-4 <i>H</i> -benzo[5,6]azepino[3,2,1- <i>ij</i>]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 origanioides</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 presentaran 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 y 7. En todas las pruebas se incluyó 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*.

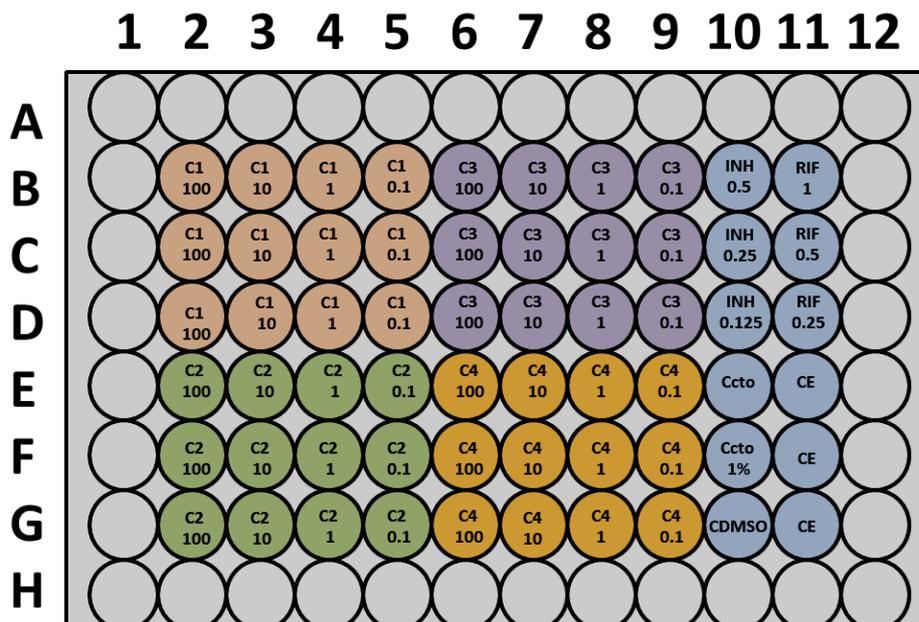
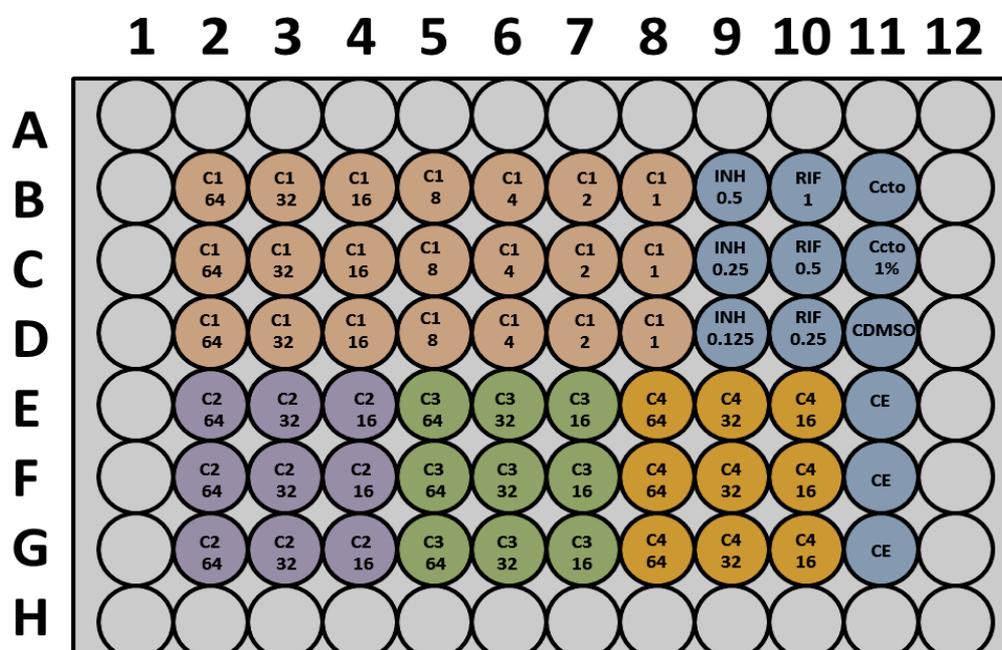


Figura 4. Distribución de muestras y controles para la segunda fase de evaluación de la bioactividad moléculas sintéticas frente a *M. tuberculosis*.



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 1µg/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.

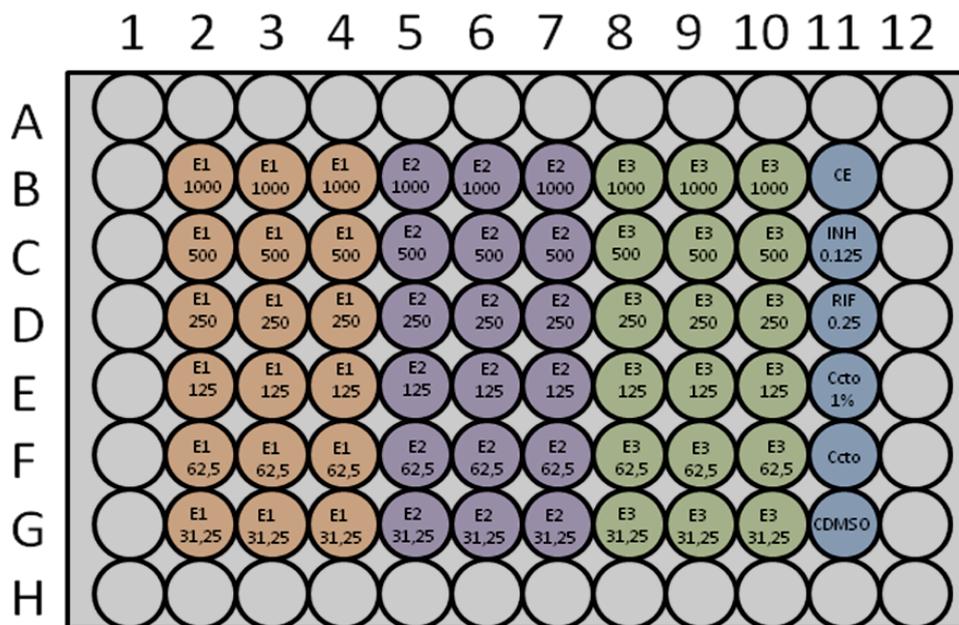
6.7.1.4 Montaje del ensayo de microdilución en placa para evaluación de extractos vegetales

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*.



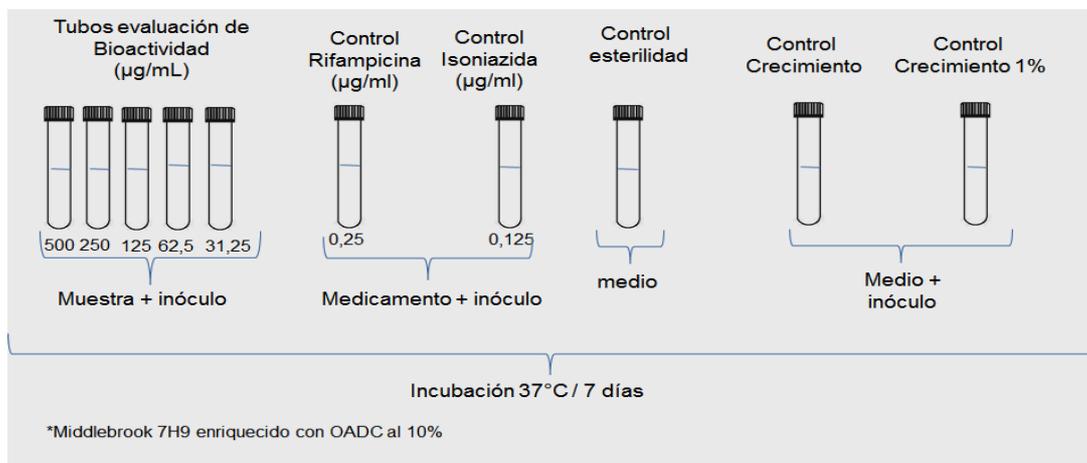
6.7.1.5 Montaje del ensayo de macrodilución en tubo para evaluación de aceites esenciales

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 22µL de solución de trabajo de MTT en cada pozo, excepto en los de la periferia. Para los ensayos de macrodilución se añadieron 220µL 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. origanoides* (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 N° 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 esterilizaron 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*.

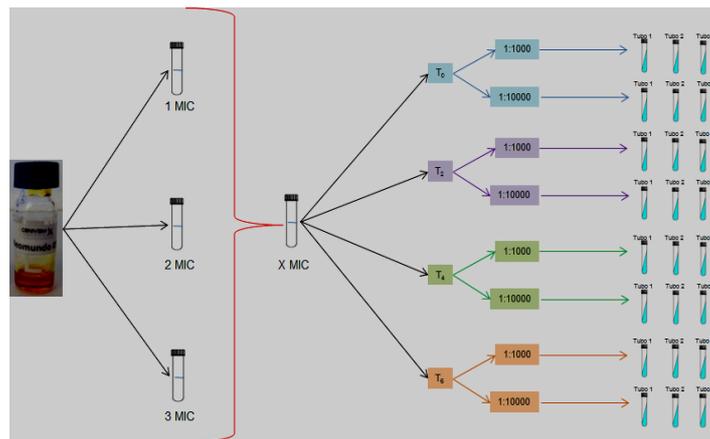
6.8 CURVAS DE LETALIDAD CONTRA *Mycobacterium tuberculosis* PARA CUMPLIR CON EL OBJETIVO ESPECÍFICO NÚMERO 3.

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.

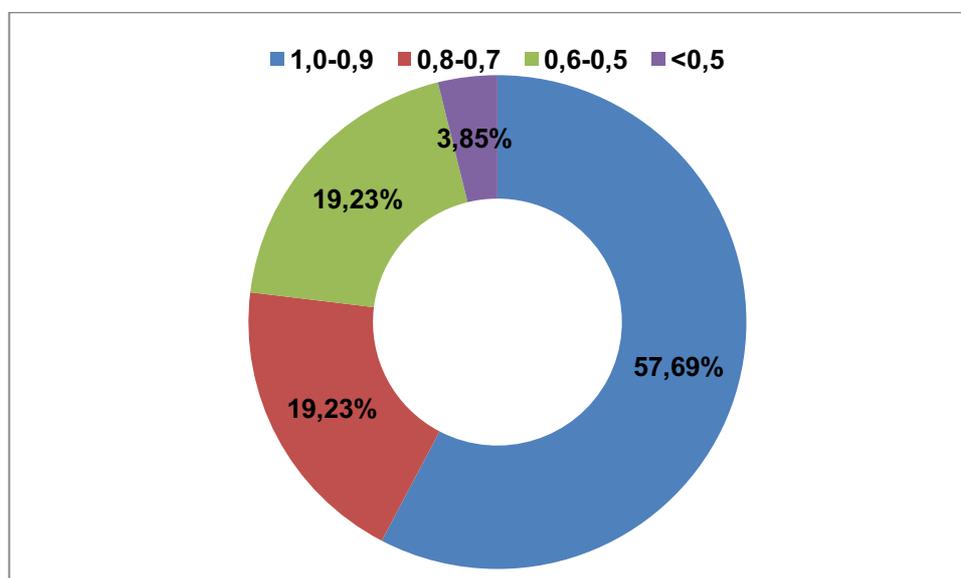
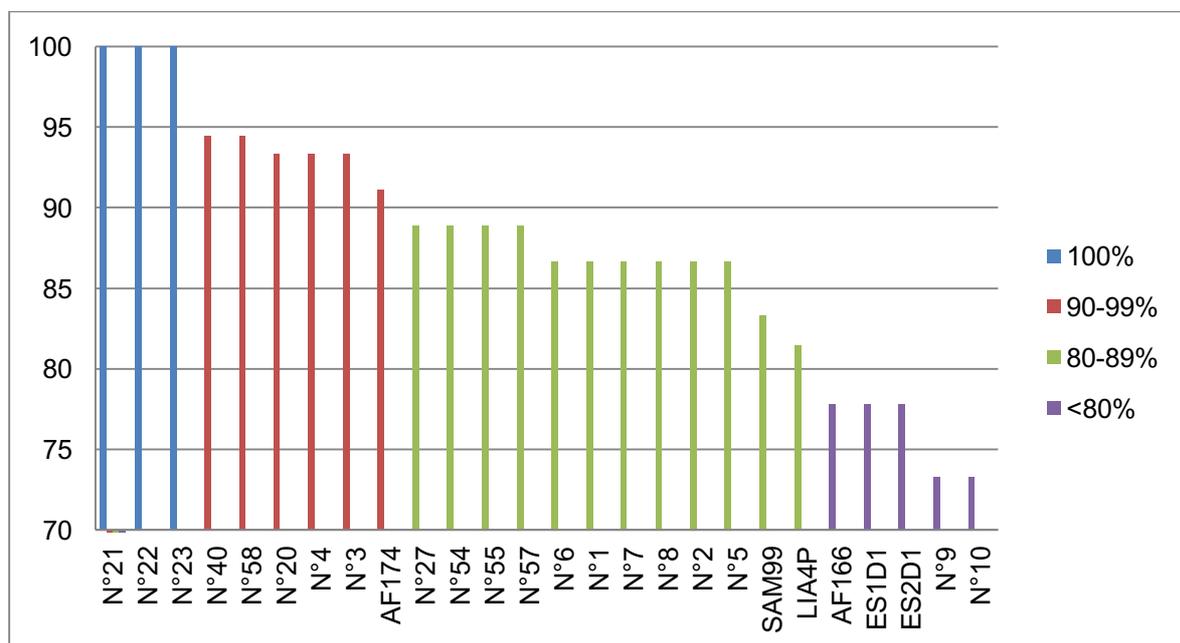


Figura 10: Porcentaje de resultados bien clasificados como Bioactivos o No bioactivos de acuerdo la muestra.

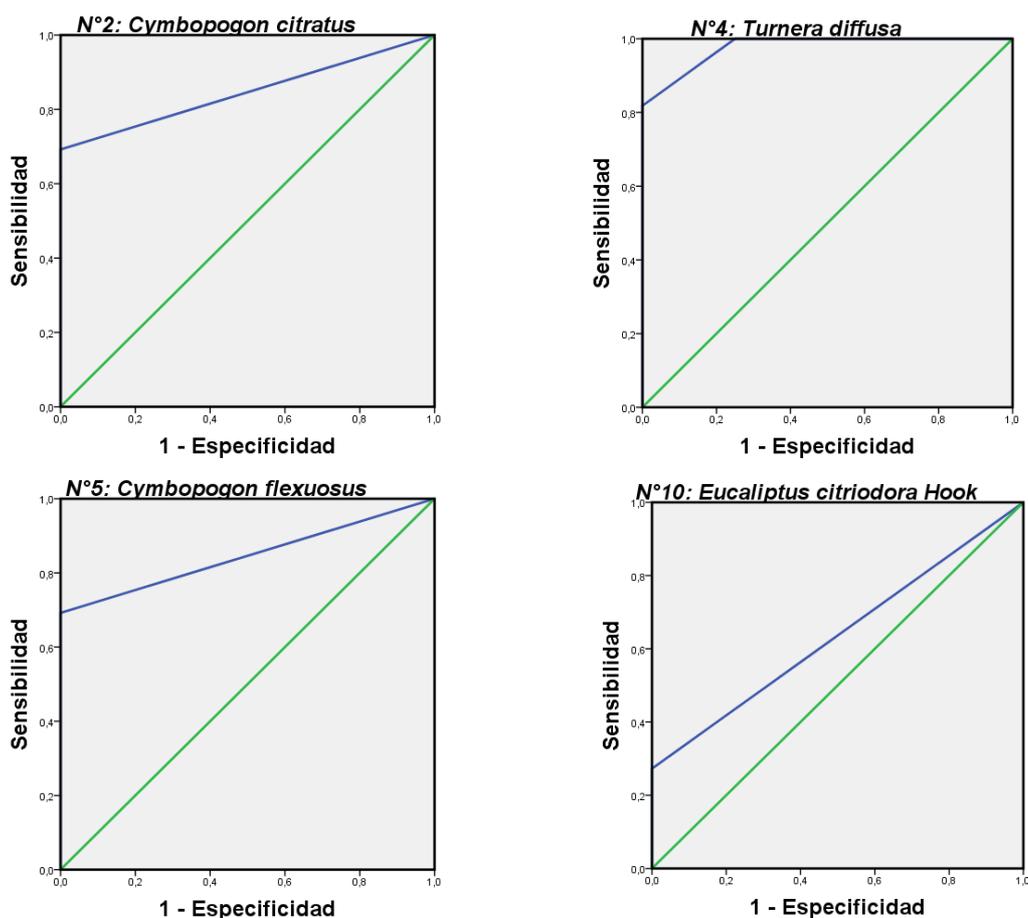


La especificidad para las muestras N°20, N°21, N°22, N°23, N°40 y AF164 fue del 100%; para las muestras N°1, N°3, N°7, N°57 y N°58 estuvo entre 92 y 94%; mientras que en las muestras N°8, N°27, N°54 y N°55 oscilo entre 82 y 88% y en las muestras N°2, N°4, N°5, N°6, N°9, N°10, SAM 99, AF166, ES1D1, ES2D1 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 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 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 ($CMI \leq 10\mu\text{g/mL}$), 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	
		($\mu\text{g/mL}$)	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

^a Concentración mínima Inhibitoria; ^b Error estándar de la media; ^c Número 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>Nectranda 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 ($\mu\text{g/mL}$) \pm S ^b , n ^c =3	Componentes mayoritarios (%)
N° 10	<i>Eucalyptus citriodora</i> Hook	31,25 \pm 0,0	α -Pinenos (6.3), β -pineno (4.8), 1.8-cineol (3.4), linalol (2.9), citranelal (49.3), <i>iso</i> -pulegol (12.9), citranelol (9.5)
N° 2	<i>Cymbopogon citratus</i>	49,61 \pm 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 \pm 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 \pm 12,03	α -Pinenos (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 \pm 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 \pm 84,20	α -Pinenos (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 \pm 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 \pm 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 \pm 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</i> Mill	198,43 \pm 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), <i>trans</i> -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)

^a Concentración mínima Inhibitoria; ^b Error estándar de la media; ^c Número 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-Mirceno 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 µg/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*.

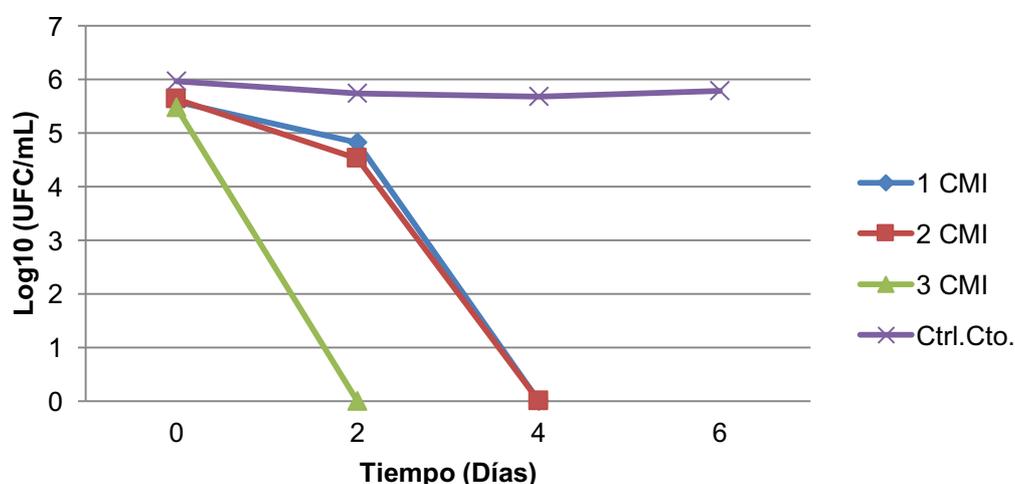
7.3 EVALUACIÓN DEL EFECTO BACTERICIDA DE *Eucalyptus citriodora* Hook, *Cymbopogon citratus*, *Cymbopogon flexuosus* y *Turnera diffusa* FRENTE A *Mycobacterium tuberculosis*

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

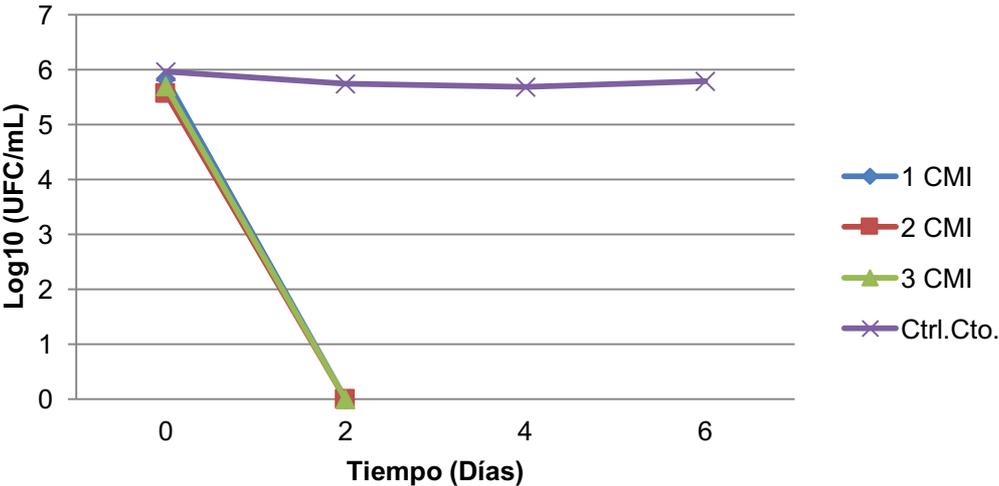
RIF e INH presentaron efecto bactericida a las concentraciones probadas correspondientes a 1CMI, 2CMI y 3CMI.

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*

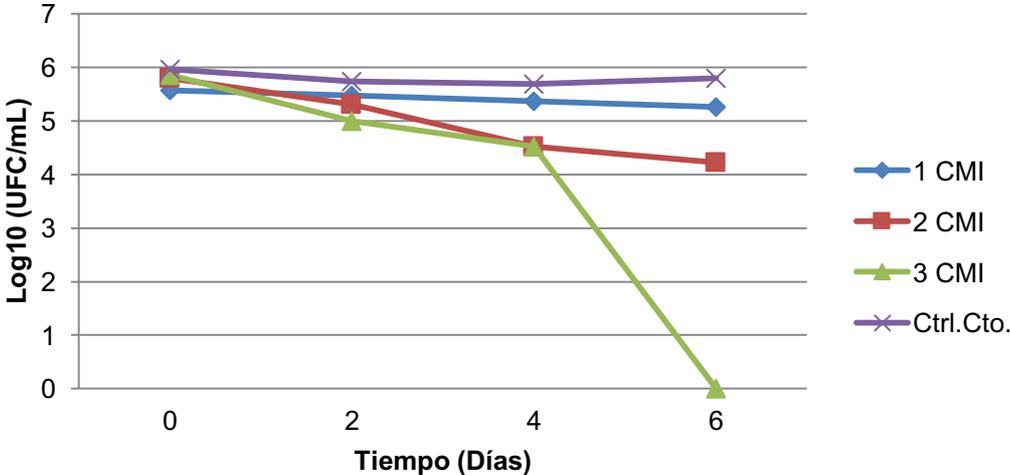
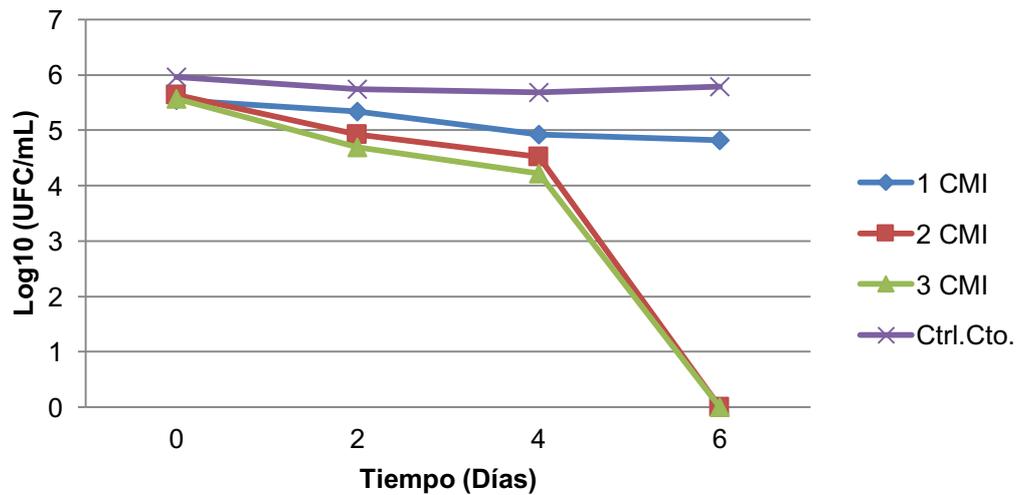


Figura 15: curva de letalidad de *T. diffusa* frente a *M. tuberculosis*

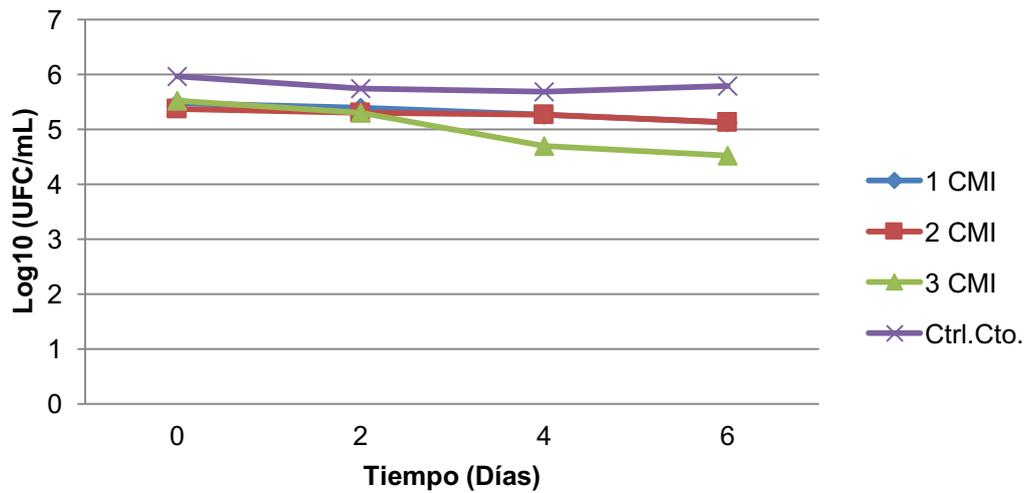


C. citratus inició mostrando un efecto bacteriostático durante el segundo día del ensayo con porcentajes de muerte bacteriana de 18, 68 y 86% con 1CMI, 2CMI y 3CMI respectivamente. Para el cuarto día se logró el 36% de muerte bacteriana con 1CMI y el 95% con 2CMI y 3CMI. Para el sexto día el efecto bacteriostático 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.

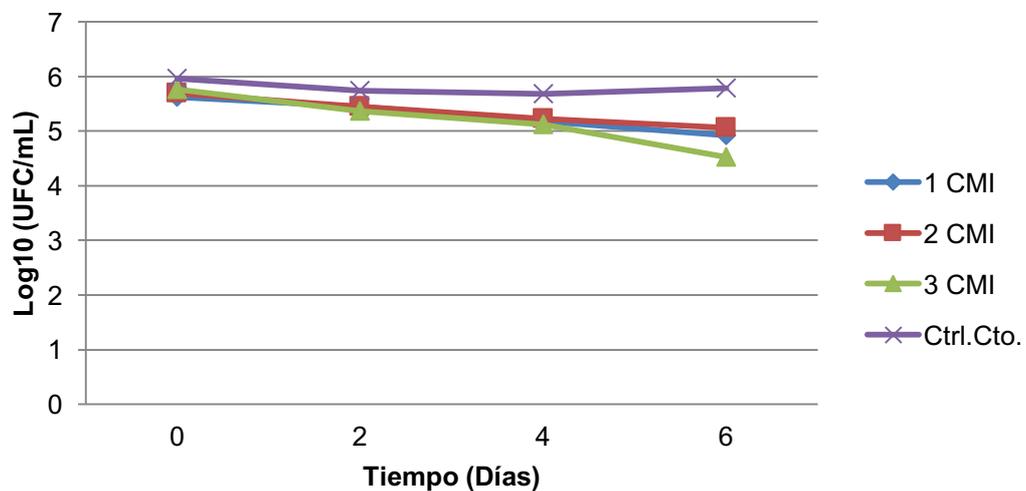
C. flexuosus y *E. citriodora* Hook presentaron actividad bacteriostática a todas las concentraciones probadas.

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 Kouztnetsov 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.

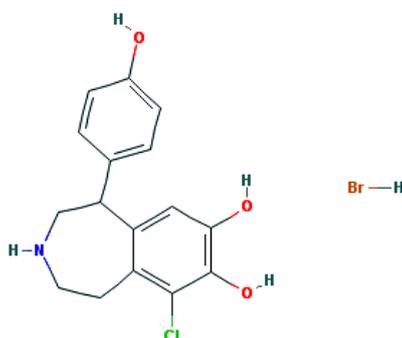
La correlación entre la estructura química, teniendo en cuenta los sustituyentes del compuesto AF174 y su actividad antimicobacteriana, refleja la importancia del nitrofurano en la posición 5 de la naftoazepina. Esto concuerda con lo reportado en la literatura acerca de la actividad antimicobacteriana *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 antimicrobacteriana 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 (Henaó *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. origanoides* 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 bicyclosesquifelandreno, β -Terpino y γ -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

mirceño (Ordonez *et al.* 2004, Negrelle *et al.* 2007, Naik *et al.* 2010, Adukwu *et al.* 2012, Machado *et al.* 2012).

Los datos obtenidos de los 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-Sanchez *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 inhibitorio frente a microorganismos Gram – positivos que frente a Gram – negativos (Luqman *et al.* 2008, Ordonez *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 Sanchez *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/JOhannaArchila.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. Antimicrobial 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.msfaaccess.org/sites/default/files/MSF_assets/TB/Docs/TB_report_Current_DrugPipeline_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 bacterias. 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*. 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.I.: 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/Johan Reyes y Gregorio Pati%C3%B1o.pdf](http://cenivam.uis.edu.co/cenivam/infraestructura/cibimol/tesis_cibimol/Johan_Reyes_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, Isidore 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-Nitrofuranyl 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://jb.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>.

ANEXOS

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

Resultados de bioactividad de aceites esenciales contra *Mycobacterium tuberculosis*

N°	Replica 1															Replica 2															Replica 3														
	500			250			125			62,5			31,25			500			250			125			62,5			31,25																	
	P1	P2	P3	P1	P2	P3	P1	P2	P3	P1	P2	P3	P1	P2	P3	P1	P2	P3	P1	P2	P3	P1	P2	P3	P1	P2	P3	P1	P2	P3	P1	P2	P3	P1	P2	P3									
N° 1: <i>Tagetes lucida</i> Cav.	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB									
N°2: <i>Cymbopogon citratus</i>	B	B	B	B	B	B	B	B	B	NB	NB	NB	NB	NB	NB	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B									
N°3: <i>Rosmarinus officinalis</i>	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	B	B	B	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB									
N°4: <i>Turnera diffusa</i>	B	B	B	B	B	B	B	B	B	NB	NB	NB	NB	NB	NB	B	B	B	B	B	B	B	B	B	NB	NB	NB	B	B	B	B	B	B	NB	NB	NB									
N°5: <i>Cymbopogon flexuosus</i>	B	B	B	B	B	B	B	B	B	NB	NB	NB	NB	NB	NB	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B									
N°6: <i>Lippia alba</i> Mill	B	B	B	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	B	B	B	B	B	B	NB	NB	NB	NB	NB	NB	B	B	B	B	B	B	NB	NB	NB									
N°7: <i>Citrus scinensis</i> Osbeck	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	B	B	B	B	B	B	NB	NB	NB	NB	NB	NB	B	B	B	NB	NB	NB	NB	NB	NB									
N°8: <i>Swinglea glutinosa</i>	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	B	B	B	B	B	B	NB	NB	NB	NB	NB	NB	B	B	B	NB	NB	NB	NB	NB	NB									
N°9: <i>Cananga odorata</i>	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	B	B	B	B	B	B	B	B	B	NB	NB	NB	B	B	B	B	B	B	NB	NB	NB									
N°10: <i>Eucaliptus citriodora</i> Hook	B	B	B	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B									
N°20: <i>Lippia origanoides</i> "Socorro"	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	NB	NB	NB	B	B	B	B	B	B	NB	NB	NB	NB	NB	NB	B	B	B	B	B	B	NB	NB	NB									
N°21: <i>Lippia origanoides</i> FD: 0252	B	B	B	B	B	B	B	B	B	NB	NB	NB	NB	NB	NB	B	B	B	B	B	B	NB	NB	NB	NB	NB	NB	B	B	B	B	B	B	NB	NB	NB									
N°22: <i>Lippia origanoides</i> FD: 0250	B	B	B	B	B	B	B	B	B	NB	NB	NB	NB	NB	NB	B	B	B	B	B	B	NB	NB	NB	NB	NB	NB	B	B	B	B	B	B	NB	NB	NB									
N°23: <i>Lippia origanoides</i> FD: 0251	B	B	B	B	B	B	B	B	B	NB	NB	NB	NB	NB	NB	B	B	B	B	B	B	NB	NB	NB	NB	NB	NB	B	B	B	B	B	B	NB	NB	NB									

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

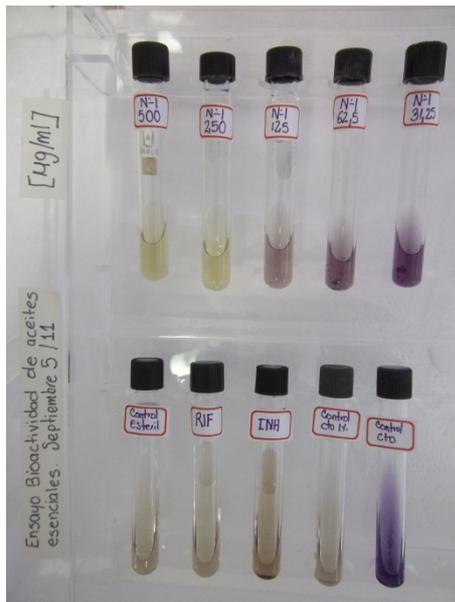
Resultados de bioactividad de la fase 2 de moléculas sintéticas contra *Mycobacterium tuberculosis*

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	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-						

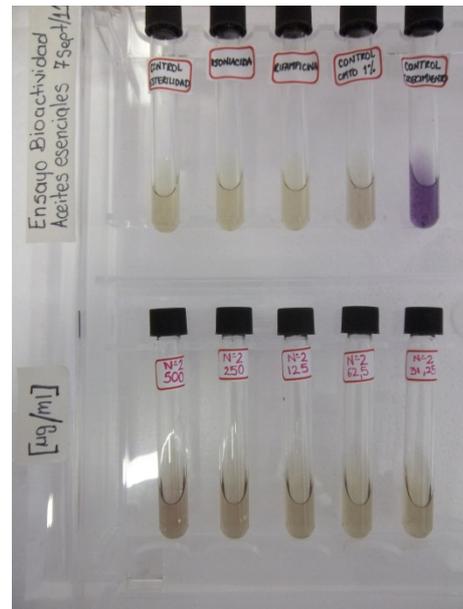
B: bioactivo; **NB:** no bioactivo. Concentraciones en µg/mL. P1: prueba 1. P2: prueba 2. P3: prueba 3.

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

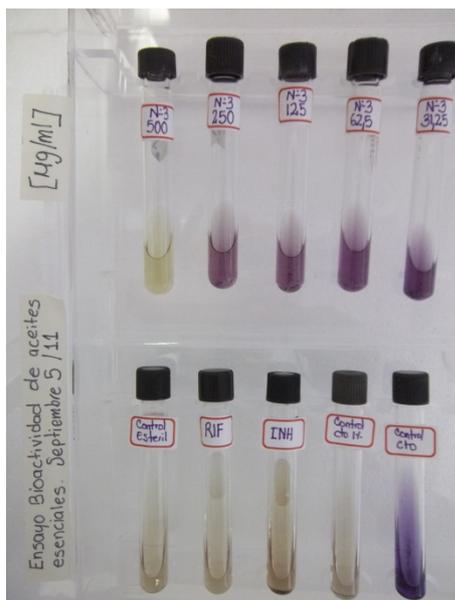
Evidencias fotográficas de los ensayos de bioactividad de aceites esenciales contra *Mycobacterium tuberculosis*



N°1 *Tagetes lucida Cav*



N° 2 *Cymbopogon citratus*



N°3 *Rosmarinus officinalis*



N°4 *Turnera diffusa*

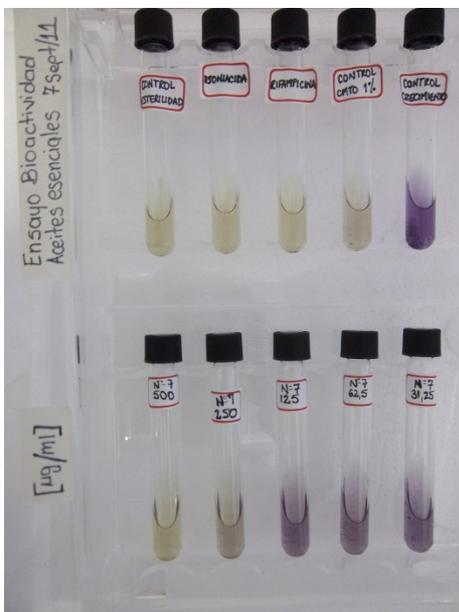
**Evidencias fotográficas de los ensayos de bioactividad de aceites esenciales
contra *Mycobacterium tuberculosis***



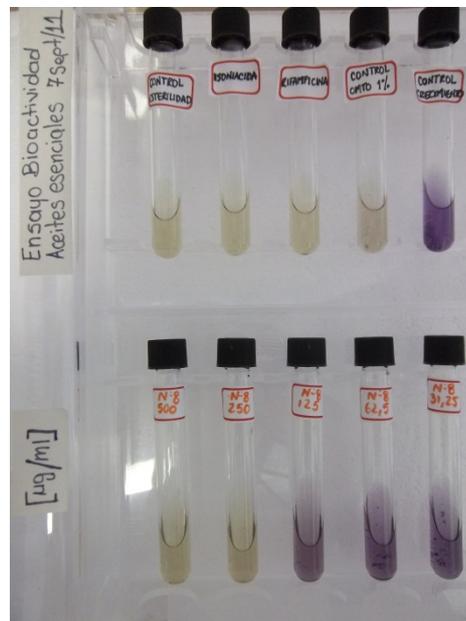
N° 5 *Cymbopogon flexuosus*



N° 6 *Lippia alba Mill*

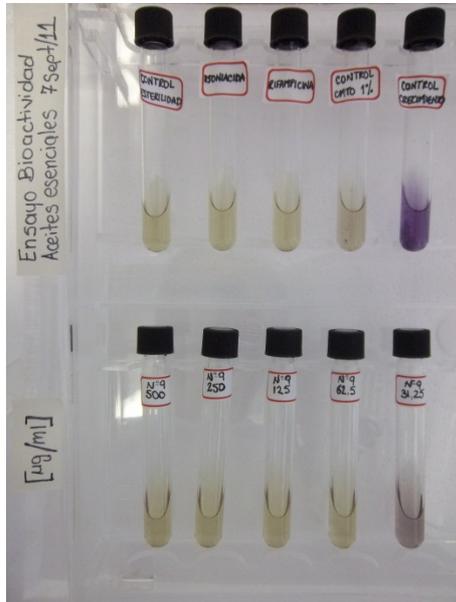


N° 7 *Citrus scinensis Osbeck*

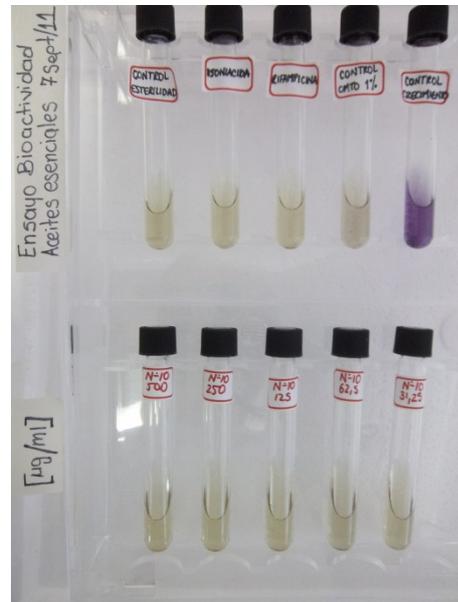


N° 8 *Swinglea glutinosa*

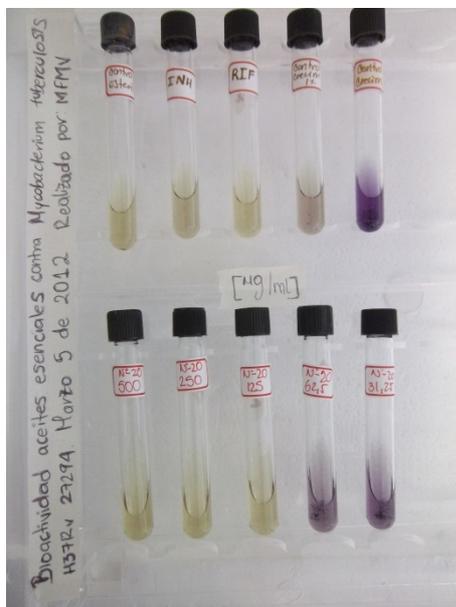
Evidencias fotográficas de los ensayos de bioactividad de aceites esenciales contra *Mycobacterium tuberculosis*



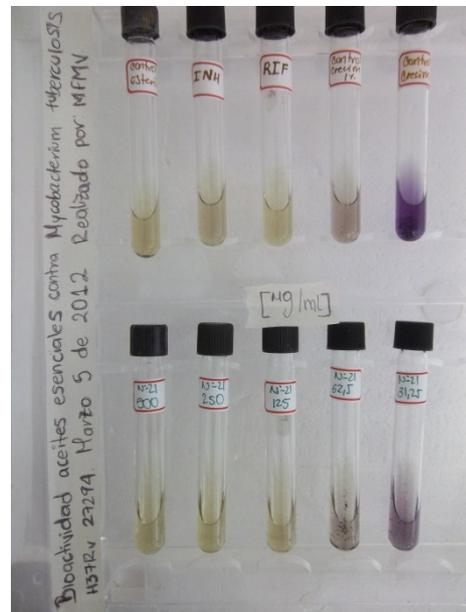
N° 9 *Cananga odorata*



N° 10 *Eucaliptus citriodora* Hook

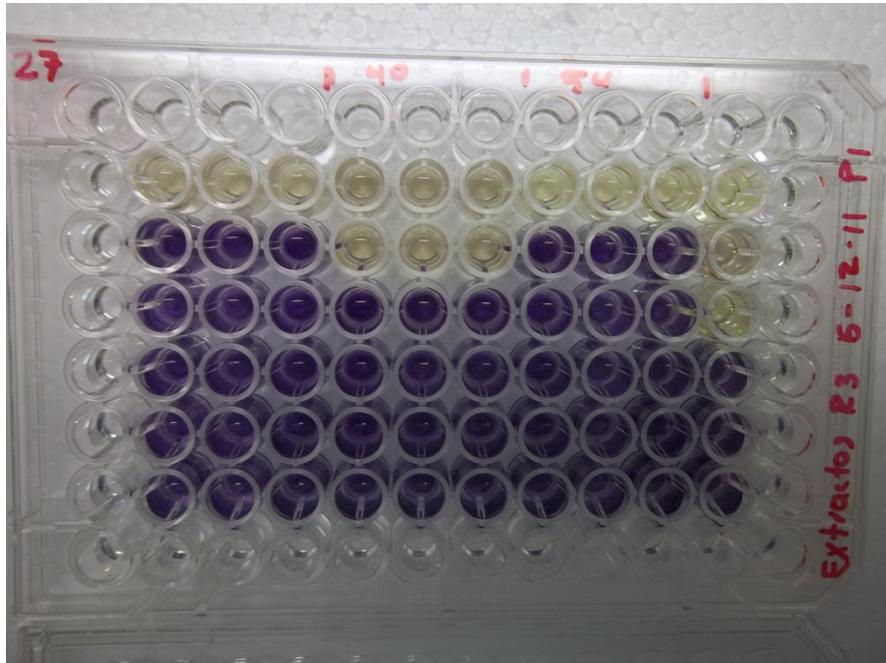


N° 20 *Lippia organoides* "Socorro"

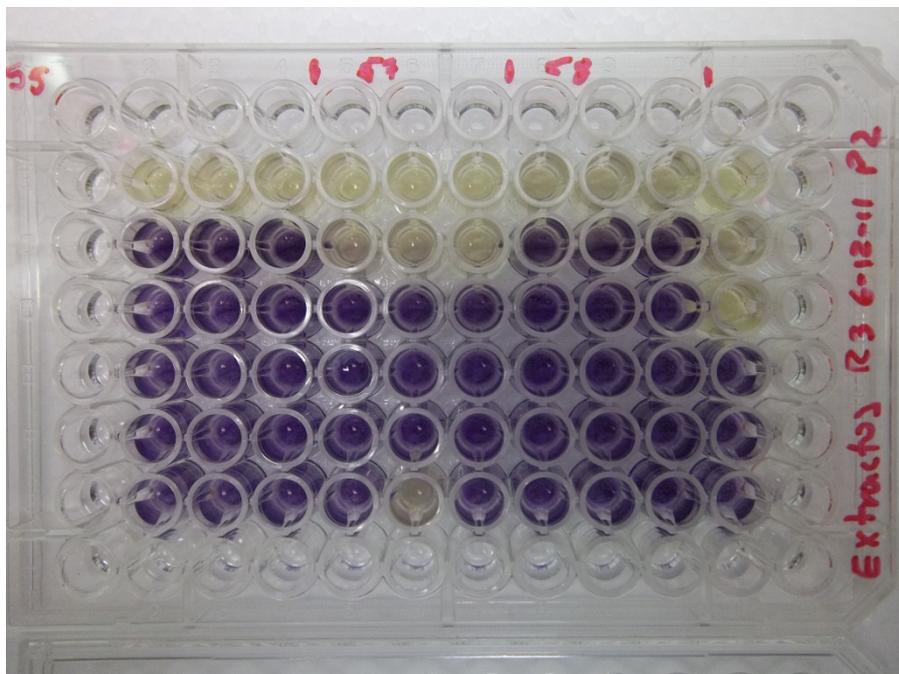


N° 21 *Lippia organoides* "Piedecuesta"

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

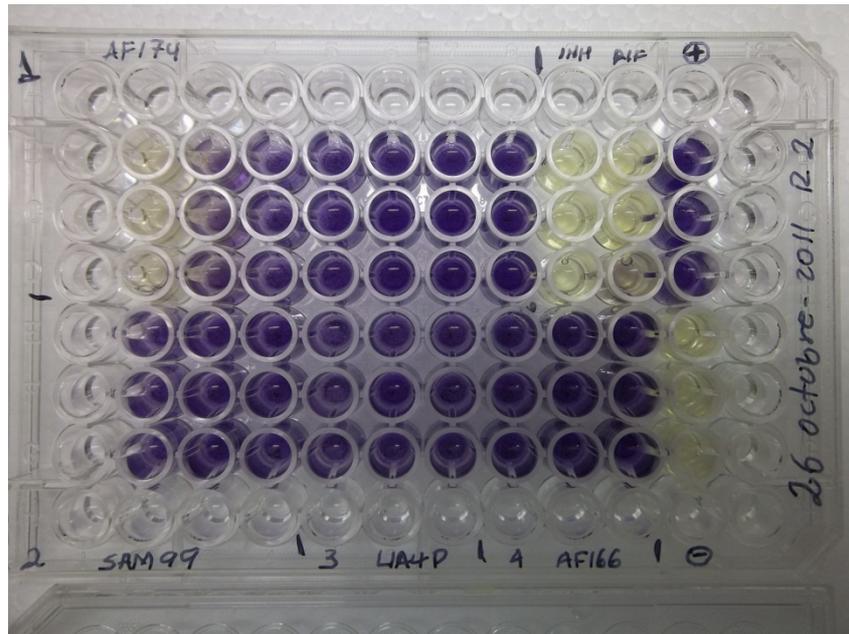


N° 27 *Baccharis aff. Buddleioides*; N° 40 *Salvia officinalis*; N° 54 *Wedelia calycina*



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***

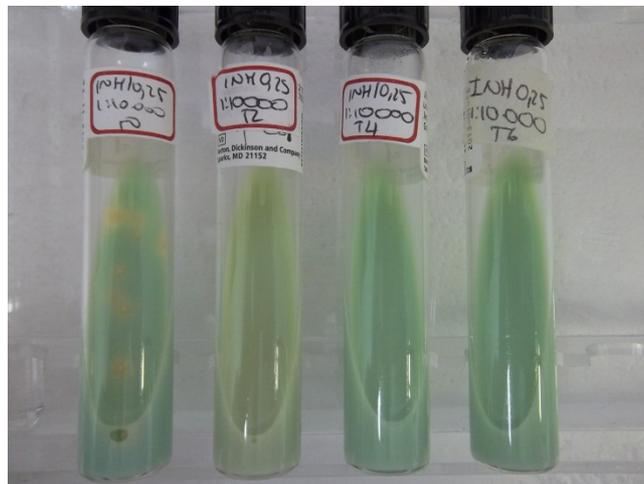
<i>Cymbopogon citratus</i>					<i>Turnera diffusa</i>				
Tiempo	Concentración	Dilución	Tubo	UFC	Tiempo	Concentración	Dilución	Tubo	UFC
0	31,25	100	1	> 100	0	62,5	100	1	> 100
0	31,25	100	2	> 100	0	62,5	100	2	> 100
0	31,25	100	3	> 100	0	62,5	100	3	> 100
0	31,25	10000	1	7	0	62,5	10000	1	6
0	31,25	10000	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

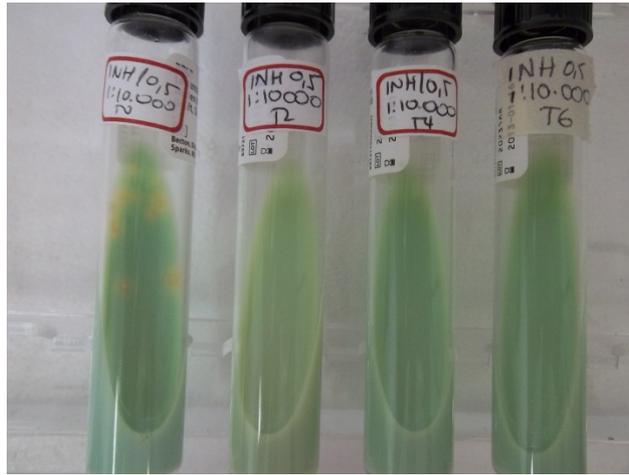
**Conteo de unidades formadoras de colonia del ensayo de curvas de letalidad
Mycobacterium tuberculosis en los cultivos correspondientes a los aceites
 esenciales de *Cymbopogon flexuosus* y *Eucalyptus citriodora* Hook**

<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

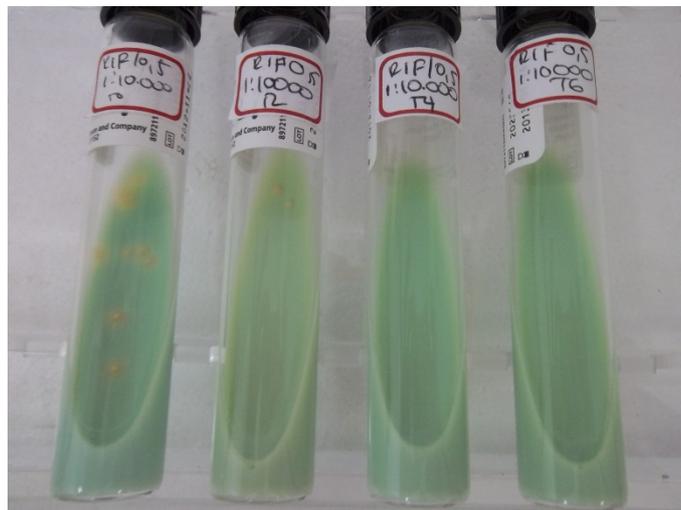
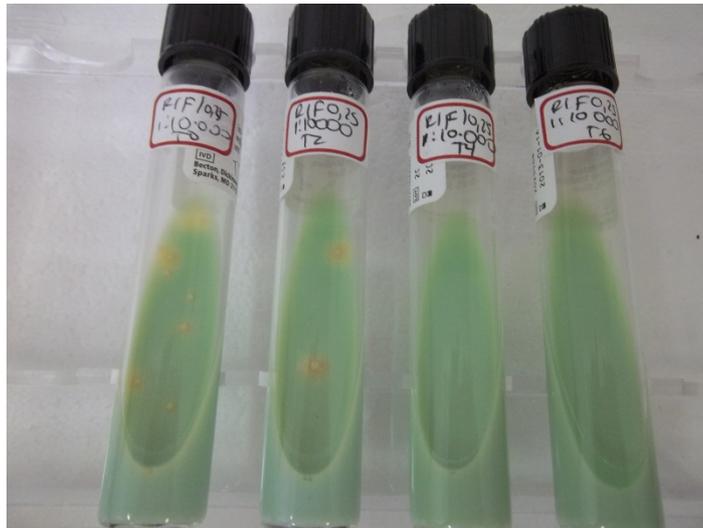
ANEXO D Evidencias fotográficas de los ensayos de curvas de letalidad de aceites esenciales frente a *Mycobacterium tuberculosis*

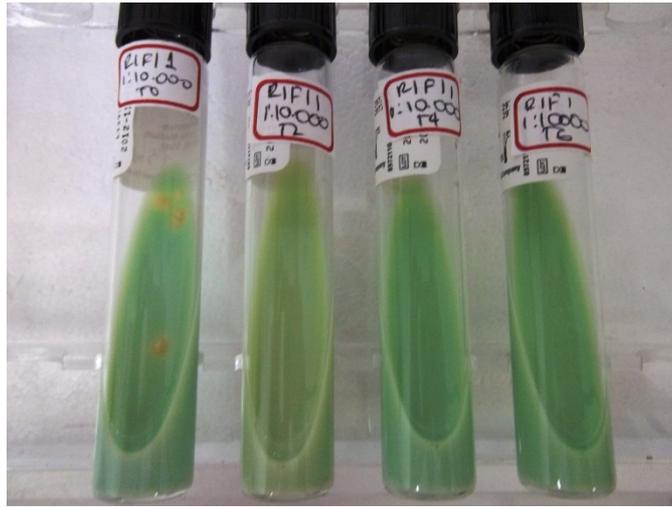
Unidades formadoras de colonia del ensayo de curvas de letalidad frente a *Mycobacterium tuberculosis* en los cultivos correspondientes a los controles de isoniacida



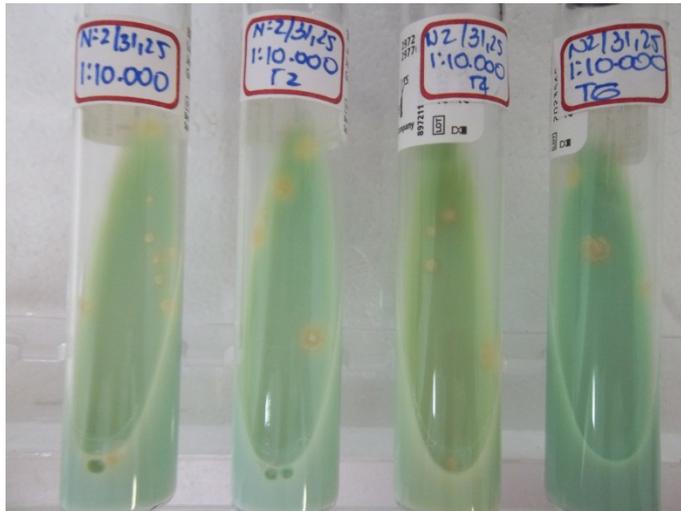


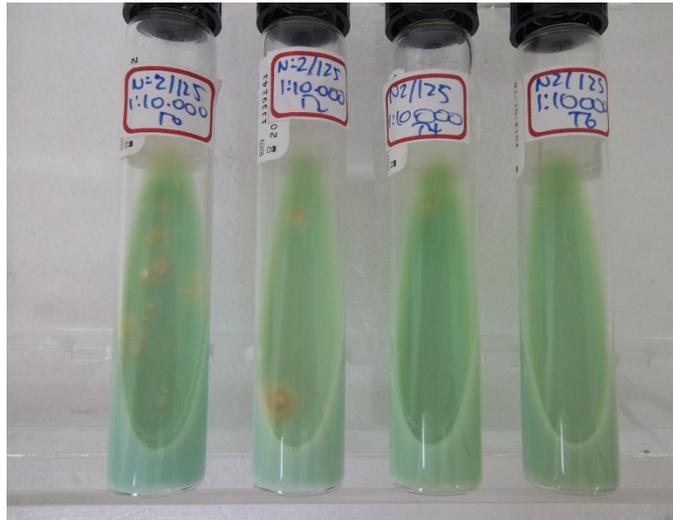
Unidades formadoras de colonia del ensayo de curvas de letalidad frente a *Mycobacterium tuberculosis* en los cultivos correspondientes a los controles de rifampicina



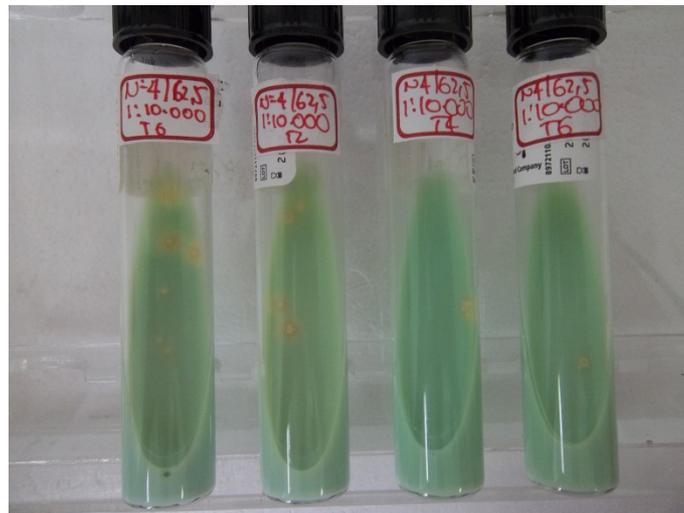


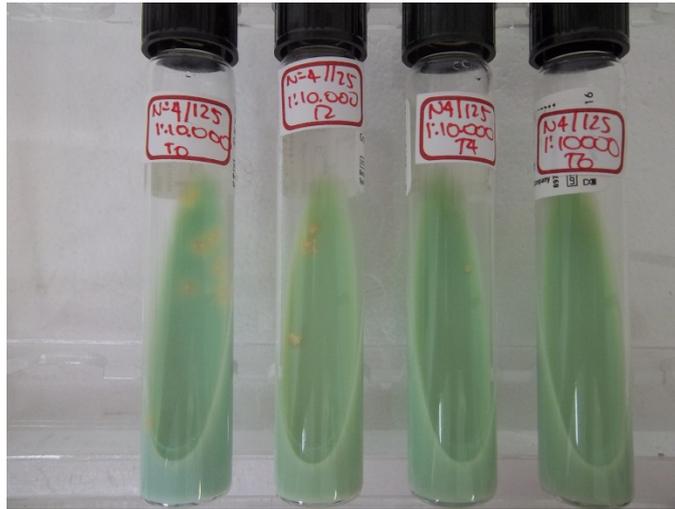
Unidades formadoras de colonia del ensayo de curvas de letalidad *Mycobacterium tuberculosis* en los cultivos correspondientes a los aceites esenciales de *Cymbopogon citratus*



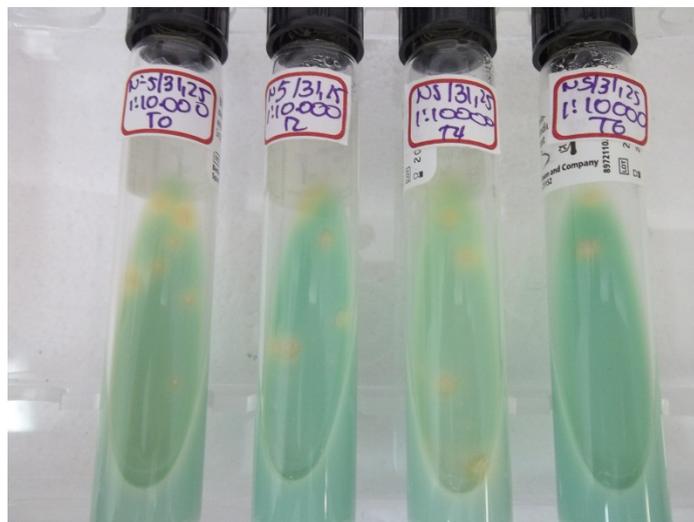


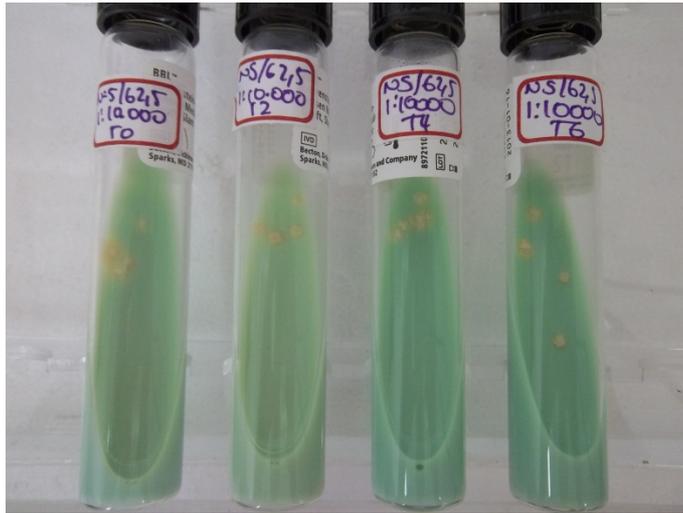
**Unidades formadoras de colonia del ensayo de curvas de letalidad
Mycobacterium tuberculosis en los cultivos correspondientes a los aceites
esenciales de *Turnera diffusa***



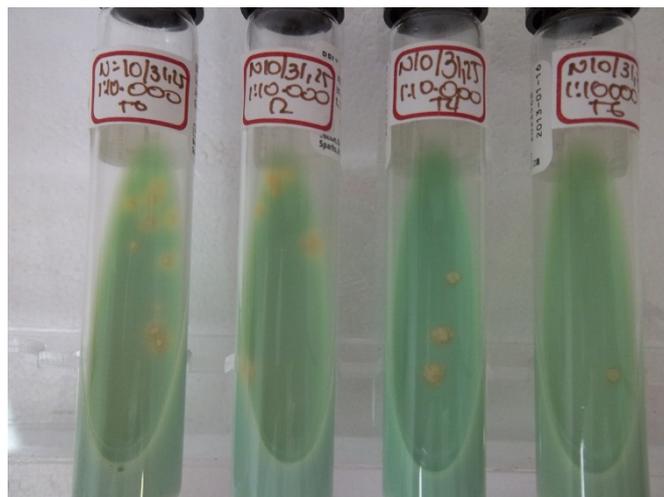


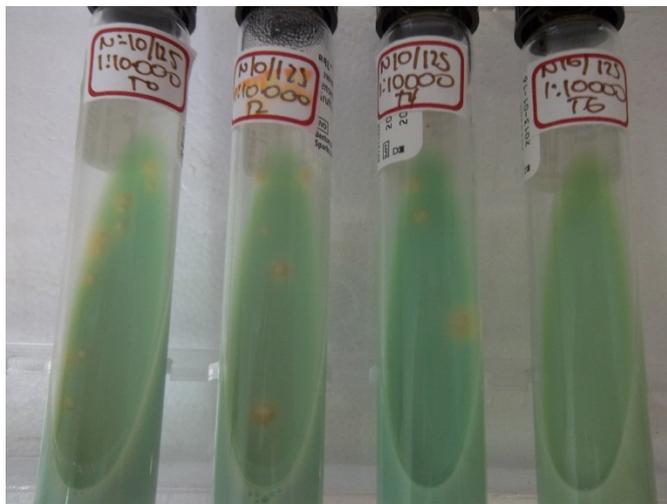
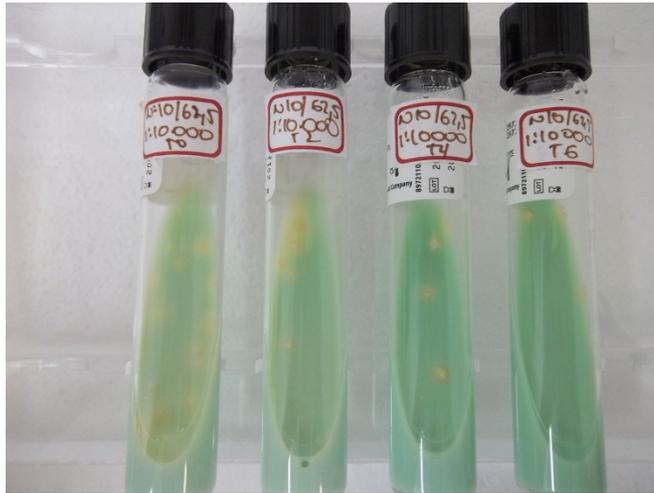
Unidades formadoras de colonia del ensayo de curvas de letalidad *Mycobacterium tuberculosis* en los cultivos correspondientes a los aceites esenciales de *Cymbopogon flexuosus*



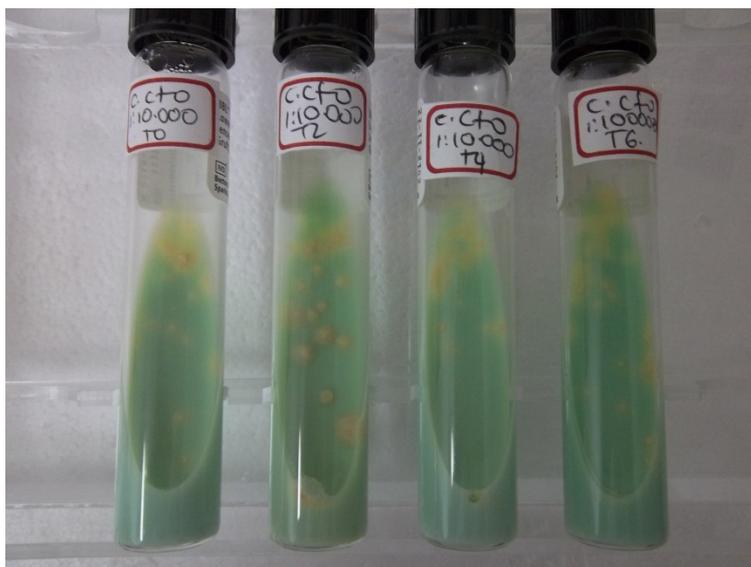


Conteo de unidades formadoras de colonia del ensayo de curvas de letalidad *Mycobacterium tuberculosis* en los cultivos correspondientes a los aceites esenciales de *Eucalyptus citriodora* Hook





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



ANEXO 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

