



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

Authors: Maria-Fernanda Moreno , Wellman Ribón
Submitted: 5. December 2017
Published: 6. December 2017
Volume: 4
Issue: 6
Affiliation: Universidad Industrial de Santander.
Languages: Spanish, Castilian
Keywords: Mycobacterium tuberculosis, tuberculosis, antimycobacterial activity, synthetic molecules, essential oils, plant extracts,
DOI: 10.17160/josha.4.6.367

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 $\geq 99\%$ 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 organoides* were bioactive with MICs between 793.70 and 1000µg/mL. There was no evidence of bioactivity of extracts from *Baccharis aff. buddleioides*, *Nectrandia*

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.
Capítulo 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-benzazepinas	24
3.7.1.2 Derivados de las naftazepinas	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>Eucalyptus 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 Dimetil sulfóxido
- EMB Etambutol
- INH Isoniacida
- LJ Medio de cultivo Lowestein Jensen
- LSO Laboratorio de Síntesis Orgánica
- MTB *Mycobacterium tuberculosis*
- MTT 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromuro
- MWHD Hidrodestilación asistida por la radiación de microondas
- OADC Acido oleico – albumina – dextrosa - catalasa
- OMS Organización Mundial de la Salud
- OPS Organización Panamericana de la Salud
- PAS Acido para amino salicílico
- PBS Solución salina fosfato
- RIF Rifampicina
- ROC Curva de las características operativas del receptor
- SFE Extracción con fluidos supercríticos
- SM Estreptomina
- TB Tuberculosis
- TB-MDR Tuberculosis multidrogorresistente

TB-XDR Tuberculosis extensivamente drogorresistente

UFC Unidades formadoras de colonias

VIH Virus de la Inmunodeficiencia Humana

LISTA DE 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 *M. tuberculosis*. 70

Tabla 10. Concentración mínima inhibitoria de EVs contra *M. tuberculosis* 71

Tabla 11. Concentración mínima inhibitoria de AEs contra *M. tuberculosis* 72

INTRODUCCION

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

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

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

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

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

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

1. IDENTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

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

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

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

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

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

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

2. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

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

3. MARCO TEÓRICO

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

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

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

3.2 EVOLUCIÓN DEL TRATAMIENTO ANTI TUBERCULOSIS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

3.3 DESAFÍOS EN EL CONTROL DE LA TUBERCULOSIS

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

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

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

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

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

3.3.2 Resistencia en tuberculosis

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

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

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

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

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

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

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

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

3.3.3 Inequidades sociales

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

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

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

3.4 NECESIDAD DE NUEVOS FÁRMACOS ANTITUBERCULOSOS

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

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

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

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

3.5 DESCUBRIMIENTO Y DESARROLLO DE NUEVOS FÁRMACOS ANTI TUBERCULOSIS

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

3.5.1 Fase de descubrimiento

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

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

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

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

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

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

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

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

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

3.5.2 Fase de desarrollo

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

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

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

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

3.6 NUEVOS FÁRMACOS ANTI TUBERCULOSIS: CANDIDATOS EN FASE III

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

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

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

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

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

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

3.7 FUENTES DE NUEVOS COMPUESTOS BIOACTIVOS CONTRA *Mycobacterium tuberculosis*

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

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

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

3.7.1 Moléculas sintéticas

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

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

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

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

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

3.7.1.1 Derivados de las 1-benzoazepinas

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

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

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

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

3.7.1.2 Derivados de las naftoazepinas

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

3.7.1.3 Derivados de las quinolonas

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

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

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

3.7.2 Sustancias de origen vegetal

3.7.2.1 Aceites esenciales (AEs)

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

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

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

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



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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

3.7.2.2 Extractos vegetales (EVs)

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

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

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

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



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

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

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

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

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

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

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

4.2 Objetivos específicos

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

5. JUSTIFICACIÓN

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

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

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

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

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

BIBLIOGRAFÍA

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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