



**UNIVERSIDAD POPULAR AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE PUEBLA**

DECANATO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE BIOTECNOLOGÍA

Evaluación de la composición y eficacia de un extracto vegetal solo y encapsulado para combatir a *Mycobacterium tuberculosis* como propuesta complementaria al tratamiento de la tuberculosis

**Tesis para obtener el título de
Doctor en Biotecnología**

Presenta:

MCMI José Luis Gálvez Romero

Director de Tesis:

Dra. Zaida Nelly Juárez

Co-director:

Dra. Elizabeth Bautista Rodríguez

Asesores:

Dr. Luis Ricardo Hernández
Dr. Genaro Alberto Paredes Juárez
Dr. Elie Girgis El Kassis

Puebla, Pue., México

2022





UPAEP – Secretaría General

Dirección General de Apoyos Académicos

Dirección del Centro de Recursos para el Aprendizaje y la Investigación.

Biblioteca Central - **Karol Wojtyła**

Tesis Digitales Restricciones de uso:

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de textos, imágenes, gráficas, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente de donde la obtuvo mencionando el autor o autores involucrados en el documento.

Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

A la **D.C. Zaida Nelly Juárez**, directora de esta tesis, quien desde el principio de este proyecto me ha dirigido con su experiencia, me ha apoyado en mi formación científica, profesional y humana. Muchas gracias por toda su paciencia, por todo el apoyo en los momentos más difíciles y porque he recibido palabras de aliento en todo momento.

A mis asesores de tesis:

Dr. Luis Ricardo Hernández, por todas sus enseñanzas, por todo el apoyo para poder realizar los estudios de microbiología, por la caracterización de los metabolitos secundarios, por la orientación del curso de la investigación y por su amistad.

Dra. Elizabeth Bautista Rodríguez, por toda su orientación y apoyo en el desarrollo de este proyecto de investigación.

Dr. Génaro Paredes Juárez, por su apoyo y enseñanzas en el desarrollo de la enapsulación de los extractos en alginato.

Dr. Elie Girgis El Kassis, por todo su apoyo, sus acertivas observaciones y todos sus consejos.

Al **Dr. Horario Bach** por su apoyo y orientación en los experimentos de inmunomodulación y citotoxicidad.

A la **QFB. Griselda León Burgoa**, por el apoyo en los experimentos para evaluar la actividad anti-micobacteriana de los extractos.

A los Biólogos **Estela Hernández** y **Allen Coombes**, por el apoyo para caracterizar las plantas empleadas en este trabajo de investigación.

A la **Maestra Michelle Parada Sosa**, por el crecimiento profesional que nos unió en este proyecto.

A mi familia: mi esposa **Claudia Sánchez** y a mis hijas **Claudia Daniela** y **Alejandra Ameyalli**, por su paciencia, por su apoyo, por su amor, por ser inspiración y por ser el motor de mi vida.

A todos los que colaboraron directamente o indirectamente para poder concluir esta tesis.

Índice

RESUMEN.....	7
ABSTRACT.....	10
INTRODUCCIÓN.....	14
ANTECEDENTES	16
1. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , tratamientos convencionales y tratamientos alternativos.....	16
1.1 Patogenia de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	16
1.2 Diagnóstico y tratamiento de <i>Mtb</i>	18
1.3 Reacciones adversas de los fármacos antifímicos.....	18
1.4. Alternativa con extractos vegetales para tratar infecciones	22
2. Plantas regionales con probable actividad antifímica.....	28
2.1 <i>Artemisia ludoviciana</i>	28
2.2 <i>Helianthus annuus</i> var roja	30
2.3 <i>Lycopodium clavatum</i>	31
3. Purificación química de metabolitos secundarios	33
3.1 Estudios etnobotánico y etnofarmacológico.....	34
3.2 Estudios de actividad biológica	34
3.3 Extracción de los compuestos bioactivos.....	35
3.4 Identificación química de los componentes del extracto vegetal.....	37
4. Evaluación de la toxicidad y citotoxicidad de los extractos vegetales en modelos <i>in vivo</i> y <i>ex vivo</i>	40
5. Actividad antimicrobiana de los extractos <i>in vitro</i>	41
6. Microcápsulas de alginato para el transporte de fármacos y extractos vegetales	41
7. JUSTIFICACIÓN	43
8. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	44
9. OBJETIVOS.....	45
10. PLAN DE TRABAJO	46
11. METODOLOGÍA.....	48
11.1 Búsqueda bibliográfica, adquisición y clasificación taxonómica de los ejemplares objeto de estudio.	48
11.2 Obtención de los extractos	48
11.3 Pruebas fitoquímicas preliminares	48

11.4	Identificación de compuestos mayoritarios, encapsulación en alginato y velocidad de liberación del extracto.....	50
11.5	Evaluación de la actividad biológica del extracto <i>in vitro</i> y <i>ex vivo</i>	55
11.6.	Evaluación de citotoxicidad <i>ex vivo</i> del extracto activo	62
11.7.	Evaluación de la actividad inmjunomoduladora de los extractos en el modelo THP-1.....	62
11.8.	Evaluación de la actividad biológica del extracto <i>in vivo</i>	63
12.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	64
12.1	Identificación de las plantas objeto de estudio.....	64
12.2	Rendimiento de extractos	65
12.3	Identificación de metabolitos secundarios	67
12.3.1	Pruebas fitoquímicas preliminares.....	67
12.3.2	Detección de metabolitos a través de cromatografía de gases acomplada a espectrometría de masas	70
12.4.	Encapsulación del extracto en alginato y medición de velocidad de liberación del extracto.....	73
12.5	Citotoxicidad <i>in vivo</i> de los extractos de <i>Artemisia ludoviciana</i> en modelo de <i>Artemia</i> spp.....	87
12.6	Citotoxicidad <i>ex vivo</i> en modelo THP-1.....	91
12.7	Actividad inmunomoduladora de los extractos en el modelo THP-1	96
13.	RESUMEN DE RESULTADOS	101
14.	CONCLUSIÓN.....	103
15.	LIMITANTES.....	104
16.	FORTALEZAS.....	105
17.	PERSPECTIVAS.....	106
	BIBLIOGRAFIA.....	107
	ANEXOS	131
	Anexo 1. Ficha técnica de las plantas de estudio	131
	<i>Artemisia ludoviciana</i>	131
	<i>Helianthus annuus</i>	132
	<i>Lycopodium clavatum</i>	132
	Anexo 2. Resultados de citotoxicidad en el modelo de <i>Artemia</i> spp.	134
	Anexo 3. Pruebas fitoquímica preliminares	141
	Anexo 4. Actividad antimicrobiana de los extractos de <i>Artemisia ludoviciana</i> contra diversas cepas de <i>Mtb</i> , en el modelo de resazurina.	142

Anexo 5. Biocompuestos identificados por cromatografía de gases acoplada a espectrómetro de masas, en los extractos etanólicos y acetato de etilo de *Artemisia ludoviciana* 145

RESUMEN

ANTECEDENTES: *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) es una bacteria aerobia Gram positiva que infecta predominantemente el pulmón de los seres humanos, presenta una prevalencia mundial del 30 % y millones de muertes anuales. Los tratamientos actuales son tóxicos y muchos de ellos son ineficaces. Algunas plantas medicinales producen biocompuestos con potencial actividad antimicobacteriana, protección contra los efectos adversos de los fármacos y posible inmunomodulación del hospedero. Estudiamos tres plantas regionales del estado de Puebla con estas probables características: *Artemisia ludoviciana* (AL), *Helianthus annuus* (HA) y *Lycopodium clavatum* (LC).

MATERIAL Y MÉTODOS: se evaluó la actividad antimicobacteriana en cepas clínicas sensibles y resistentes de *Mtb* así como en la cepa experimental *HR37a* en los modelos BACTEC-MGIT y resazurina. También se evaluó la actividad citotóxica *in vivo* (modelo de *Artemia* spp.) y *ex vivo* (modelo THP-1) y la actividad inmunomoduladora (sobrenadante de THP-1) de los extractos hexánico, metanólico, acetato de etilo y etanólico de las partes aéreas de *Artemisia ludoviciana*, *Helianthus annuus* y las esporas de *Lycopodium clavatum*.

RESULTADOS: el rendimiento de los extractos de *Artemisia ludoviciana* fueron proporcionales a la polaridad del extracto: 1,2 % (hexánico), 3,2 % (metanólico), 3,3 % (acetato de etilo), y 6.2 % (etanólico). El rendimiento de los extractos de *Helianthus annuus* fue de 7,2 % (metanólico), 7,0 % (etanólico), y 1,4 % (hexánico y acetato de etilo). El rendimiento para *Lycopodium clavatum* fue de 0,01 % (hexánico), 6,1 % (acetato de etilo), 9,4 % (metanólico), y 10,4 % (etanólico).

Los componentes fitoquímicos identificados en AL fueron alcaloides y flavonoides, en HA fueron alcaloides y lactonas sesquiterpénicas, y LC fueron taninos y lactonas sesquiterpénicas. De las tres plantas, AL mostró la mayor actividad antimicobacteriana y los compuestos detectados (con mayor probabilidad) en los extractos etanólico y acetato de etilo en la cromatografía de gases acoplada a espectrometría masas fueron achillin, tujona, estigmasterol, fitosterol y sitosterol.

Con respecto a la actividad antimicobacteriana los extractos etanólicos de HL y de LC no mostraron actividad contra cepas clínicas caracterizadas como pansensibles (en sistema BACTEC MGIT) a las concentraciones de 250, 500 y 1000 ppm; en cambio los extractos de AL mostraron actividad contra cepas clínicas, en el caso del extracto hexánico a 250 ppm (escasa actividad), del extracto metanólico a 1000 ppm (escasa actividad), del extracto acetato de etilo a 500 y 1000 ppm (muy buena actividad) y del extracto etanólico a 250 y 1500 ppm (muy buena actividad). Por otro lado la CMI (concentración mínima inhibitoria) de los extractos de AL contra la cepa *H37Ra* (modelo de resazurina) fue de 600 ug/mL (hexánico), 800 ug/mL (metanólico), 400 ug/mL (acetato de etilo), y 700 ug/mL (etanólico). También AL mostró una CMI contra una cepa clínica pansensible, 500 y 700 ug/mL (acetato de etilo) y 700 ug/mL (etanólico); en el caso de una cepa clínica MDR (Multidrogorresistente -resistente a isoniacida y rifampicina-), AL mostró una CMI de 500 y 700 ug/mL (acetato de etilo) y 800 ug/mL (etanólico).

Con relación a la citotoxicidad en el modelo de *Artemia* spp., los extractos con mayor toxicidad (CL_{50}) fueron en el caso de AL 5.6 ug/mL (hexánico), 14 ug/mL (acetato de etilo y metanólico), y 195.6 ug/mL (etanólico). En el caso de HA 47.9 ug/mL (hexánico), 20.1 ug/mL (acetato de etilo), 11.7 ug/mL (metanólico), y 11337.8 ug/mL (etanólico).

Finalmente, para LC 47.9 ug/mL (acetato de etilo), 145 ug/mL (metanólico) y 240.9 ug/mL (etanólico).

La citotoxicidad *ex vivo* en el modelo THP-1 (CI₅₀) fue a 10 ug/mL para los extractos acetato de etilo de AL y HA, así como a 20 ug/mL para los extractos acetato de etilo y metanólico de AL y HA. La producción de citocinas en sobrenadante del modelo THP-1 (pg/mL) fue: a) ninguno de los extractos provocó la producción de TNF- α (Factor de Necrosis tumoral alfa), b) los extractos acetato de etilo y etanólico de HA indujeron 1550 y 1700 pg/mL de IL-6 a una concentración de 5 y 20 ug/mL (respectivamente), y c) ninguno de los extractos indujo producción de IL-10.

Los extractos acetato de etilo y etanólico de AL encapsulados en alginato, muestran una liberación constante hasta por dos semanas en solución salina al 0.9 % y en ácido clorhídrico.

CONCLUSIÓN: de las tres plantas estudiadas, *Artemisia ludoviciana* mostró la mejor actividad *in vitro* contra diversas cepas de *Mtb* (HR37a, cepas clínicas sensibles a rifampicina e isoniacida, y cepa MDR-resistente a rifampicina e isoniacida). Los extractos acetato de etilo y etanólico de esta planta, presentaron la mejor capacidad antimycobacteriana, moderada citotoxicidad *in vivo* en el modelo de *Artemia* spp., sin citotoxicidad *ex vivo* en el modelo THP-1 y no producen citocinas pro o anti-inflamatorias. La encapsulación en alginato de estos extractos, es potencialmente útil para su uso en modelos *in vivo*.

ABSTRACT

BACKGROUND: *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) is an aerobic gram-positive bacterium that predominantly infects the lung of humans, presents a global prevalence of 30% and millions of deaths annually. Current treatments are toxic and many of them are ineffective. Some medicinal plants produce biocompounds with potential antimycobacterial activity, protection against adverse effects of drugs and possible host immunomodulation. We studied three regional plants of the state of Puebla with these probable characteristics: *Artemisia ludoviciana* (AL), *Helianthus annuus* (HA) and *Lycopodium clavatum* (LC).

MATERIAL AND METHODS: Antimycobacterial activity was evaluated in sensitive and resistant clinical strains of *Mtb* as well as in the experimental strain *HR37a* in the BACTEC-MGIT and resazurine models. The cytotoxic activity *in vivo* (*Artemia* spp.) and *ex vivo* model (THP-1 model) and immunomodulatory activity (THP-1 supernatant) of the hexanic, methanol, ethyl acetate and ethanolic extracts of the aerial parts of *Artemisia ludoviciana* were also evaluated, *Helianthus annuus* and the spores of *Lycopodium clavatum*.

RESULTS: The yield of *Artemisia ludoviciana* extracts was proportional to the polarity of the extract: 1.2 % (hexanic), 3.2 % (methanol), 3.3 % (ethyl acetate), and 6.2 % (ethanolic). The yield of *Helianthus annuus* extracts was 7,2 % (methanol), 7,0 % (ethanol), and 1,4 % (hexanic and ethyl acetate). The yield for *Lycopodium clavatum* was 0,01 % (hexanic), 6,1 % (ethyl acetate), 9,4 % (methanol), and 10,4 % (ethanol).

The phytochemical components identified in AL were alkaloids and flavonoids, in HA were sesquiterpene alkaloids and lactones, and LC were tannins and sesquiterpene

lactones. Of the three plants, AL showed the highest antimycobacterial activity and the compounds detected (most likely) in ethanol extracts and ethyl acetate in gas chromatography coupled to mass spectrometry were achillin, thujona, stigmasterol, phytosterol and sitosterol.

Regarding to antimycobacterial activity for ethanolic extracts of LH and LC showed no activity against clinical strains characterized as pan-sensitive (in BACTEC MGIT system) at concentrations of 250, 500 and 1000 ppm; AL extracts showed activity against clinical strains, in the case of hexanic extract at 250 ppm (low activity), methanol extract at 1000 ppm (low activity), ethylacetate extract at 500 and 1000 ppm (very good activity) and ethanol extract at 250 and 1500 ppm (very good activity). On the other hand, the BMC (minimum inhibitory co-concentration) of AL extracts against the *H37Ra* strain (resazurine model) was 600 ug/mL (hexanic), 800 ug/mL (methanol), 400 ug/mL (ethyl acetate), and 700 ug/mL (ethanol). AL also showed a CMI against a pan-sensitive clinical strain, 500 and 700 ug/mL (ethyl acetate) and 700 ug/mL (ethanolic); for the clinical strain of MDR (Multidrug resistance -resistant to isoniazid rifampicin-), AL showed a CMI of 500 and 700 ug/mL (ethyl acetate) and 800 ug/mL (ethanol).

In relation to cytotoxicity in the model of *Artemia* spp., the extracts with greater toxicity (LC_{50}) were in the case of AL 5.6 ug/mL (hexane), 14 ug/mL (ethyl acetate and methanol), and 195.6 ug/mL (ethanol). For HA 47.9 ug/mL (hexanic), 20.1 ug/mL (ethyl acetate), 11.7 ug/mL (methanol), and 11337.8 ug/mL (ethanol).

Finally, LC 47.9 ug/ml (ethyl acetate), 145 ug/ml (methanol), 240.9 ug/ml (ethanol).

Ex vivo cytotoxicity in model THP-1 (CI_{50}) was at 10 ug/mL for ethyl acetate extracts of AL and HA, as well as at 20 ug/mL for ethyl acetate and methanol extracts of AL and

HA. The production of cytokines in supernatant of model THP-1 (pg/mL) was: a) none of the extracts caused the production of TNF- α (Tumor Necrosis Factor alpha), b) the ethyl acetate and ethanolic extracts of HA induced 1550 and 1700 pg/mL of IL-6 at a concentration of 5 and 20 ug/mL (respectively), and c) none of the extracts induced IL-10 production.

The ethyl acetate and ethanol extracts of AL encapsulated in alginate, show a constant release for up to two weeks in 0.9% saline and hydrochloric acid.

CONCLUSION: Among the three plants investigated, *Artemisia ludoviciana* showed the best in vitro activity against various strains of *Mtb* (*HR37a*, clinical strains sensitive to rifampicin and isoniazid, and strain MDR-resistant rifampicin and isoniazid). The ethyl acetate and ethanolic extracts of this plant, presented the best antimycobacterial capacity, moderate cytotoxicity *in vivo* in the model of *Artemia* spp., without *ex vivo* cytotoxicity in model THP-1 and do not produce pro or anti-inflammatory cytokines. The alginate encapsulation of these extracts is potentially useful for use in *in vivo* models.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades infectocontagiosas son la primera causa de morbimortalidad en el ser humano, *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) es el principal microorganismo patógeno, que más muertes ha causado a lo largo de la historia (Bates, *et al.*, 1994).

En el año 2018 la OMS (Organización Mundial de la Salud) estimó que 1.5 millones de personas fallecieron por tuberculosis como causa directa (Zaheen & Bloom, 2020). En sus inicios, el tratamiento médico consistió en hospitalización y tratamiento quirúrgico, entre 1944 y 1950 aparecieron los primeros antibióticos para controlar la enfermedad; sin embargo, en los últimos 150 años son pocos los antimicrobianos que se han incorporado para el control de esta enfermedad (Murray, 2004; Pezzella, 2019). Desde 1995, la estrategia de manejo ha consistido en la combinación de varios fármacos durante 6 meses y bajo una supervisión estricta (TAES-tratamiento acortado estrictamente supervisado) (Alvárez-Gordillo, 1998).

En los últimos decenios se ha incrementado la incidencia de casos resistentes a isoniacida y rifampicina (Chakaya, Kirenga, & Getahun, 2016) y bedaquilina, delamanid y pretonamid, son los únicos tres nuevos fármacos con eficacia documentada, pero presentan diversos efectos colaterales entre los cuales destacan toxicidad cardiaca, hepática, gastrointestinal y del sistema nervioso central (Pezzella, 2019).

La resistencia a fármacos, los efectos colaterales de los mismos y la continua expansión de la infección por tuberculosis en todo el mundo, expone la necesidad de nuevos medicamentos que puedan ser más eficaces y menos tóxicos. Las plantas medicinales pueden ser una alternativa, ya que contienen compuestos potencialmente

activos contra *Mtb*, la mayoría de las veces altamente complejos y por lo tanto difíciles de sintetizar (Kobarfard, 2010).

Los fitoconstituyentes comprenden compuestos químicos bioactivos (metabolitos secundarios) producidos de manera natural en las plantas, los cuales no son esenciales como nutrientes para la misma. Los metabolitos secundarios más estudiados y descritos son flavonas, cromonas, bezonoides, inositol, pirimidinas, triterpenos, esteroides, cumarinas, y glucósidos. En la era moderna se han desarrollado diversas técnicas para la extracción, purificación y experimentación *in vitro*, *ex vivo*, e *in vivo* de dichos metabolitos secundarios con potencial uso terapéutico en *Mtb* (Goyal, Suleria, & Harikrishnan, 2020).

En este trabajo, se propuso evaluar la composición y eficacia de un extracto vegetal solo y encapsulado, para combatir a *Mycobacterium tuberculosis*, así como también su inocuidad para el ser humano, utilizando diferentes modelos biológicos tanto *in vitro* como *ex vivo* e *in vivo*, con el fin de proponer una terapia adyuvante al tratamiento de la tuberculosis.

ANTECEDENTES

1. *Mycobacterium tuberculosis*, tratamientos convencionales y tratamientos alternativos

La infección por tuberculosis en el humano, es causada por un complejo de mycobacterias que comprende varias especies de bacterias y que comparten una identidad secuencial de ADN en un 99.9 % (Brites & Gagneux, 2015), la especie humana tiene particular predisposición a la infección por estas bacterias. La convivencia entre los individuos ha permitido el contagio y la perpetuidad de las mycobacterias. Se estima una prevalencia mundial de tuberculosis latente (infección con enfermedad no activa) en un 32 %, con un riesgo de reactivación que va del 5 al 20 % a lo largo de la vida de quien la padece (Martineau, 2012). El panorama cada vez es más complejo pues hemos creado mycobacterias resistentes a fármacos de primera línea (isoniacida, rifampicina, etambutol y prirazinamida) con menos posibilidad de curación y con mayores efectos adversos a los medicamentos.

1.1 Patogenia de *Mycobacterium tuberculosis*

Existe evidencia de la co-evolución genética entre *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) y la especie humana para el desarrollo de cambios adaptativos recíprocos entre patógeno y hospedero (Brites & Gagneux, 2012); esto permite que una primo-infección sea controlada por el hospedero lo que lleva a presentar latencias prolongadas por el microorganismo (tuberculosis latente) en el interior de un granuloma (necrosis caseosa con múltiples células tales como linfocitos y macrófagos regularmente localizados en el parénquima pulmonar y en el cual se encuentra atrapada *Mtb*), con la posibilidad de intensificar su replicación y de causar enfermedad, sobre todo en condiciones en las cuales

el sistema inmune disminuye su función (estrés, obesidad, Diabetes mellitus, desnutrición, VIH y senescencia) (Rodríguez-Rodríguez *et al.*, 2015).

El bacilo de *Mtb* se transmite a través de las gotitas de saliva de una persona con infección pulmonar; las gotas que miden entre 5 y 10 micras llegan fácilmente al alveolo y ahí la mycobacteria es fagocitada por el macrófago alveolar. La activación de la respuesta inmune innata genera una respuesta inmune adaptativa predominantemente de tipo celular para la formación final del granuloma (conformado por macrófagos, linfocitos TCD4+, linfocitos TCD8+ y fibroblastos); lugar donde los bacilos quedan atrapados la mayor parte de la vida del hospedero (Aderem & Underhill, 1999).

Lamentablemente, para el hospedero, el bacilo de *Mtb* presenta una pared muy gruesa, compuesta principalmente por lipoaralibomananos (LAM) y múltiples enzimas que dificultan una fagocitosis efectiva y, por lo tanto, el macrófago además de ser la célula reservorio, también puede ser la célula que transporte al bacilo por todos los órganos de la economía, principalmente en personas que cursan con algún inmunocompromiso (Srisvastata & Devignes, 2014).

Mtb genera una fagocitosis frustrada, una serie de mecanismos evitan que la *mycobacteria* sea eliminada completamente, incluso por las personas inmunocompetentes:

1. Evita la maduración del fagosoma (Philips, 2008), inhibe la migración de los lisosomas, por lo cual, no se consolida el fagolisosoma (Armstrong & Hart, 1971), produce metaloproteasas dependientes de Zinc (Zn^{2+} M), asociadas a la inhibición de caspasa 1 y a la disminución en la producción de IL-1 (Master *et al.*, 2008).

2. Inhibe el sistema de óxido reducción (estallido respiratorio dependiente de NADPH+ y de MPO) (Shin *et al.*, 2010), ya que produce proteasomas relacionados con inhibición en la liberación de óxido nítrico (Darwin, Ehrt, Gutierrez-Ramos, Weich, & Nathan, 2003), los lipoaralibomamanos (LAM) bloquean la producción de Interferón gamma (Shin *et al.*, 2010) .
3. Inhibe la producción de catelicidinas LL-37 asociadas con la formación de Etosis (trampas extracelulares de ADN) (Torres-Juarez *et al.*, 2015).

1.2 Diagnóstico y tratamiento de *Mtb*

Mtb puede afectar prácticamente cualquier órgano de la economía, sin embargo, el pulmón es el sitio más afectado, debido a ello, el medio de transmisión es la vía respiratoria, el medio de transmisión. La presencia de tos y expectoración con duración mayor a dos semanas (definición de sintomático respiratorio para tuberculosis pulmonar), así como la presencia de fiebre, diaforesis y hemoptoicos, nos hacen pensar enfermedad por tuberculosis activa e iniciar la búsqueda del microorganismo a través de tinción BAAR (Bacilo Ácido Alcohol Resistente o tinción de Ziel Nielsen) en expectoración, radiografías de tórax, cultivo (en diversos medios) de expectoración, reacción en cadena de la polimerasa para mycobacterias así como Gene Xpert en busca de resistencia a rifampicina (medicamento de primera línea con mayor capacidad esterilizante) (Rangaka *et al.*, 2015).

1.3 Reacciones adversas de los fármacos antifímicos.

El tratamiento farmacológico convencional de *Mtb* se divide en fármacos de primera línea, empleados para la tuberculosis sensible, los cuales incluyen isoniacida, rifampicina, pirazinamida y etambutol (dos meses de fase intensiva con los cuatro fármacos) y la

combinación de isoniacida con rifampicina por cuatro meses más (fase de sostén), los siguientes son los efectos adversos observados con cada uno de los fármacos:

Isoniacida

Leves: gastrointestinales (náusea, epigastralgia y vómito), hepatitis (elevación de las enzimas hepáticas), artralgia, afecciones neurológicas (cefalea, insomnio, euforia, agitación, ansiedad y somnolencia), acné, prurito y fiebre (Baghaei *et al.*, 2010; Moulding, Redeker, & Kanel, 1989).

Moderadas a graves: psicosis, crisis convulsivas, confusión mental y estado de coma, vasculitis, neuropatía periférica, hepatitis grave y síndrome de Lupus *like* (Forget & Menzies, 2006; Tajender & Saluja, 2006; Thwaites *et al.*, 2009).

Rifampicina

Leves: gastrointestinales (náusea y dolor abdominal), secreciones color amarillentas, *rash* cutáneo, síntomas parecido a catarro común, ataque al estado general, cefalea, ataxia y disnea (Arbex, Varella Mde, Siqueira, & Mello, 2010).

Graves: exantema grave, hepato-toxicidad grave y reacciones inmunológicas graves (citopenias) (Arbex *et al.*, 2010).

Pirazinamida

Leves: gastrointestinales (náusea, vómito y anorexia), hiperuricemia, exantema, prurito y dermatitis (Blumberg *et al.*, 2003).

Graves: exantema grave, rabdomiólisis, artritis y ataque de gota; hepatotoxicidad grave (Blumberg *et al.*, 2003).

Etambutol

Neuritis retrobulbar (principalmente en niños), gastrointestinales (náusea, vómito, dolor abdominal y hepatotoxicidad), hematológicas (eosinofilia y citopenias), cardiovasculares (miocarditis y pericarditis), hiperuricemia, gota, infiltrados pulmonares y fiebre (Blumberg *et al.*, 2003; "Ethambutol," 2008; Somoskovi, Parsons, & Salfinger, 2001).

Farmacos empleados en la tuberculosis drogo resistente

El tratamiento para la tuberculosis drogo resistente se lleva a cabo con fármacos de segunda línea, los cuales presentan menor probabilidad de curación y con complicaciones mucho más graves, los fármacos de segunda línea son inyectables (aminoglucósidos y capreomicina, al menos por seis meses), quinolonas (levofloxacino y moxifloxacino), protionamida (etionamida), cicloserina, PAS (ácido para-amino salicílico) diariamente hasta completar dos años (Zhang *et al.*, 2016). Otros fármacos son linezolid, imipenem y los últimos en la lista tales como delamanib y bedaquilina (Pontali *et al.*, 2018). A continuación, se describen las reacciones adversas de los fármacos de segunda línea más frecuentemente empleados

Aminoglucósidos

Ototoxicidad (vértigo y sordera), nefrotoxicidad (glomerulopatía e insuficiencia renal), neurotoxicidad, bloqueo neuromuscular e hipersensibilidad (de Jager & van Altena, 2002; Pai, Momary, & Rodvold, 2006; Rybak *et al.*, 1999).

Quinolonas

Gastrointestinales (náusea, vómito, anorexia, aerofagia y diarrea), del sistema nervioso central (cansancio, cefalea, insomnio, temblor fino y alucinaciones), reacciones

alérgicas de la piel, artropatía, tendinitis, prolongación del intervalo QT, nefritis e hiperglucemia (Arbex *et al.*, 2010).

Cicloserina

Sistema nervioso central (cefalea, vértigo central, somnolencia, convulsiones, pérdida de la memoria, confusión mental), reacciones psiquiátricas (estado catatónico, paranoia, depresión e ideación suicida), *rash* e incluso síndrome de Steven Johnson (Seaworth, 2002).

Etionamida

Gastrointestinales (náusea, vómito, sialorrea, anorexia, dolor abdominal), hepatotoxicidad, neurotoxicidad, afección cardiovascular (hipotensión postural), afecciones endocrinas (ginecomastia, alopecia hipotiroidismo, menorragia, impotencia y descontrol glucémico), acné, foto sensibilidad y exantema (Beltran, 2008; Migliori, D'Arcy Richardson, Sotgiu, & Lange, 2009; Morlock, Metchock, Sikes, Crawford, & Cooksey, 2003).

Capreomicina

Nefrotoxicidad (daño tubular, proteinuria, desequilibrio electrolítico), ototoxicidad (sordera y vértigo), dolor, edema y formación de abscesos en el sitio de la aplicación (Chirinos-Zegarra *et al.*, 2006)

Ácido Para-amino salicílico

Gastrointestinales (anorexia, diarrea, náusea y vómito), hipotiroidismo, hepatitis, reacciones cutáneas de alergia, síndrome de mal absorción, pericarditis, neumonía eosinofílica y encefalopatía (Caminero, 2010).

Solo existen tres nuevos medicamentos con eficacia probada para la *Mtb* resistente a fármacos, algunos de ellos se han empleado como tratamiento compasivo en casos graves y cuando se han agorado las opciones de manejo (Pontali *et al.*, 2018). Aunque se considera que son una opción de tratamiento, también presentan efectos colaterales, dentro de los cuales destacan:

Bedaquilina

Los eventos adversos más relevantes son prolongación del intervalo-QTc, náusea, cefalea y artralgias.

No se recomienda usar conjuntamente con delamanid o moxifloxacino porque incrementan el riesgo de toxicidad y la probabilidad de desarrollar arritmias (Pontali *et al.*, 2018).

Delamanid

Sus principales eventos adversos son ansiedad, vértigo, náusea y vómito, alteraciones electrolíticas, parestesias, temblores, y prolongación del intervalo-QTc (Pontali *et al.*, 2018).

Pretomanid

En combinación con bedaquilina y linezolid pueden causar hepatotoxicidad, acidosis láctica, mielosupresión, neuropatía, y prolongación del intervalo QTc (Lyons, 2018).

1.4. Alternativa con extractos vegetales para tratar infecciones

Los microorganismos y la especie humana han cohabitado desde su existencia, algunos microorganismos son simbioses (microorganismos que viven en simbiosis con el ser humano) y otros son patobioses (microorganismos que causan enfermedad en el ser

humano). El estado inmunológico y las características del hospedero, así como la virulencia de los microorganismos patógenos contribuyen a la manifestación o no de enfermedad. Por otro lado, actualmente nos enfrentamos a microorganismos resistentes debido al uso indiscriminado de antibióticos y debido a un fenómeno natural de resistencia, lo cual ha condicionado un impacto mundial como un problema de salud pública (Burnham, Leeds, Nordmann, O'Grady, & Patel, 2017).

Para combatir esta resistencia antimicrobiana se han desarrollado diversas estrategias, entre las cuales destaca el incluir fármacos alternativos con actividad antimicrobiana y de manera específica metabolitos secundarios de plantas medicinales, ya que poseen diversas propiedades simultáneas contra bacterias, hongos, protozoarios y contra virus. Además, otra característica es que al mismo tiempo pueden estimular el sistema inmunitario, lo cual permite un mejor control de infecciones con menor frecuencia de efectos adversos. Es importante destacar que si bien el margen de seguridad de las plantas medicinales es amplio, no están exentas de reacciones adversas, por lo cual es necesario identificar y purificar los metabolitos secundarios funcionales, así como evaluar su eficacia y seguridad en modelos experimentales (Enioutina *et al.*, 2017).

Actualmente, son pocos los antibióticos que existen para combatir la infección por *Mtb*, estos generan resistencia y multidrogoresistencia; por lo tanto, hoy en día se requieren nuevos fármacos tanto para la tuberculosis drogo sensible como para la tuberculosis drogo resistente. Recientemente, solo se han producido dos nuevos fármacos prometedores, bedaquilina y delamanib, lamentablemente por los costos y producción, solo tienen acceso a estos fármacos, el 5 % de las personas que son candidatas a esos antifímicos (Rawal & Butani, 2016).

Dentro de las 420.000 especies de plantas existentes en el mundo, son pocas las que se han estudiado con fines terapéuticos y existe una tendencia por investigar aquellas plantas que cuentan con uso en medicina tradicional (Rios, 2005). En todo el mundo, se encuentran en escrutinio múltiples plantas medicinales originarias de África, Europa, Asia, Sudamérica, Centro América y Canadá, de las cuales se han obtenido varios compuestos químicos tales como: punicalagina, alicina, glucósidos de antraquinona, iridoides, fenilpropanoides, beta-sitosterol, galantimina, crinina, friedelina, ácido gálico, ácido elágico, antocianidina, taraxerol, termiligina B, ácido arjunico, glucopiranosidos, 1-epicatecol, leucopelargonidol, ácidos hidroxibenzoicos, alcaloides de benzofenantridina, neolignanós y decarina (Chinsembu, 2016; Liu, *et al.*, 2008), también el ácido alfa-linoleico obtenido de *Sutherlandia frutescens* (Masoko, Mabusa, & Howard, 2016).

Los extractos de *Cola nítida* (125 µg/ml de concentración mínima inhibitoria) y *Cola milleni* (62,5 µg/ml de concentración mínima inhibitoria) disminuyen el crecimiento *in vitro* de *Mycobacterium bovis* (Adeniyi, Groves, & Gangadharam, 2004).

En Mozambique *Maerua edulis*, *Securidaca longedunculata*, *Zanthoxylum capense* y *Tabernaemontana elegans* mostraron actividad *in vitro* (15,6 a 62,5 µg/ml de concentración mínima inhibitoria) contra *M. bovis* y contra *M. tuberculosis* (Luo *et al.*, 2013; Luo *et al.*, 2011).

En Nigeria algunas plantas potenciales son *Cola acumminata*, *Garcinia Kola*, *Vitallaria paradoxa*, *Costus afrer*, *Pycnanthus angolensis* y *Afromomum melegueta* (Ogbole & Ajaiyeoba, 2009).

En Japón, emplearon *Hochuekkito* para el tratamiento del complejo de *Mycobacterium avium* (Enomoto *et al.*, 2014). Además, los extractos de *Artemisa capillaris* (ácido ursólico e hidroquinona, 12,5 µg/ml de concentración mínima inhibitoria) mostraron actividad contra *Mtb* sensible y drogoresistente (Jyoti *et al.*, 2016).

En Laos, investigaron 341 plantas y pudieron aislar el extracto (dipirithiona) de *Marsypopetalum modestum* como elemento que reduce el crecimiento de *Mtb* (Elkington *et al.*, 2014).

Otra planta procedente del sur de África y con probable efecto antifímico es la raíz de *Pelargonium sidoides* (conocida Umckaloabo) (Bladt & Wagner, 2007; Kolodziej, 2008), así como también *Allium sativum*, *Strychnos decusata* y *Rhizoma* (Famewo, Clarke, & Afolayan, 2017).

En Uganda, analizaron un total de 90 especies de plantas distribuidas en 44 familias, las más relevantes para el tratamiento de *Mtb*, fueron *Zanthoxylum leprieurii*, *Piptadeniastrum africanum*, *Albiza coriaria* y *Rubia cordifolia* (Bunalema, Obakiro, Tabuti, & Waako, 2014).

En relación con la medicina herbolaria China, destaca su contribución como adyuvantes, tales como hepatoprotectores y como controladores de las reacciones adversas de los tratamientos contra *M. tuberculosis* multidrogoresistente (Tong *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2015). También se han estudiado extractos de *Ranunculi ternati*, *Sophorae flavescentis*, *Prunella vulgaris* y *Stellera chamaejasme*, los cuales en modelos animales (rata), incrementan la inmunidad celular contra *Mtb* (Lu, *et al.*, 2013).

En Ucrania, se ha empleado Dzherelo (Immunoxel) en el tratamiento adyuvante para el manejo del binomio VIH-*Mtb* (Virus de inmunodeficiencia humana), encontraron mayor producción de IL-2 y de IL-6, aunque no encontraron diferencias importantes en IFN y TNF- α , es probable que inmunomodule la producción de citocinas protectoras (Arjanova *et al.*, 2009; Nikolaeva *et al.*, 2008).

En la India, los extractos de *Citrullus colocynthis* mostraron actividad contra *Mtb*, siendo sus compuestos mayoritarios el ácido ursólico y la curcubitacina, los que presentaron, 50 y 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ respectivamente de concentración mínima inhibitoria (Mehta *et al.*, 2013).

En Holanda, otros extractos que se han investigado *in vitro* son: *Aloe vera*, *Hypericum perforatum* y menta; a una concentración de 1 mg/mL, inhibieron el crecimiento de *Mtb* tras una semana de exposición. De todas estas plantas, los extractos de menta mostraron la mayor actividad antimicrobiana contra *Mtb* (Arjomandzadegan *et al.*, 2016).

En México se estudiaron *in vitro* a nueve plantas medicinales, de las cuales los extractos metanólicos de *Ambrosia confertifora*, *Ambrosia ambrosioides* y *Guajacum coulteri*, mostraron disminución de la actividad de *Mtb* a concentraciones mínimas inhibitorias de 200, 790 y 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ respectivamente (Robles-Zepeda *et al.*, 2013). En otro estudio también se estudiaron los extractos de *Euphorbia albomarginata* y *Helianthus annuus* como prospectos prometedores (Coronado-Aceves *et al.*, 2016), así como el extracto hexánico de *Lantana hispidia* el que mostró actividad antimicrobiana contra *Mtb* (Jimenez-Arellanes, Meckes, Ramirez, Torres, & Luna-Herrera, 2003).

En la siguiente figura (Figura 1), se abordan las vías metabólicas de *Mtb* que pueden ser inhibidas con la sinergia de diversos metabolitos secundarios provenientes de plantas medicinales (Guzman, Gupta, Bucar, Gibbons, & Bhakta, 2012).

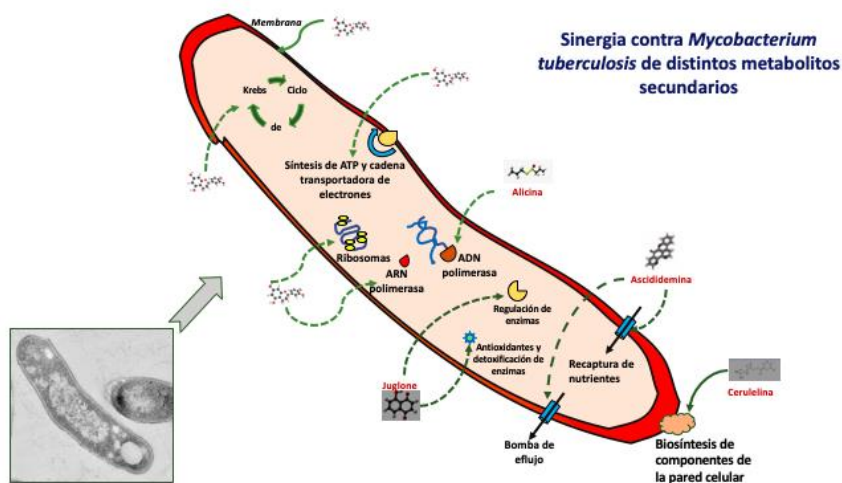


Figura 1. Sinergia de la actividad de metabolitos secundarios contra *Mycobacterium tuberculosis*.

Metabolitos secundarios de plantas medicinales presentan actividad sinérgica contra *Mtb* en diferentes vías metabólicas. La actividad puede ser parecida a la de algunos fármacos convencionales, inhibiendo: a) ARN mensajero (parecido a estreptomicina, kanamicina, amikacina, capreomicina y claritromicina), b) la integridad de la pared celular (parecido a betalactámicos y glicopéptidos), c) el complejo de división celular como la alicina (parecido a rifampicina), d) enzimas destoxicantes y antioxidantes como el 7-methyljuglona, e) la recaptura de nutrientes como la ascididemina, f) la biosíntesis de los componentes de la pared celular como la cerulenina y platensimisina (parecido isoniazida, thiolactomicina y cicloserina). Adaptado de (Guzman *et al.*, 2012).

2. Plantas regionales con probable actividad antifímica

La Organización Mundial de la Salud (OMS) en el año 2015, implementó tres estrategias para la erradicación de la tuberculosis, las cuales consisten en: promover el diagnóstico y tratamiento oportuno de pacientes con tuberculosis, mejorar las políticas de atención a los pacientes con tuberculosis a través de sociedades gubernamentales y no gubernamentales para las personas con escasos recursos y finalmente promover la investigación y la innovación a través de estrategias diagnóstico-terapéuticas más costo efectivas y con menor efectos colaterales (World Health Organization, 2015).

Se han investigado diversas plantas medicinales a lo largo del mundo con propiedades antifímicas, en México hay reportes de plantas regionales del estado de Sonora (Coronado-Aceves *et al.*, 2016); por otro lado, en el estado de Puebla existe la posibilidad de contar con plantas regionales con probable utilidad antifímica.

2.1 *Artemisia ludoviciana*

Es una hierba perenne, erguida, de cinco a doce centímetros, con las hojas verdes por la parte superior y blancas por la inferior, articuladas en la base y dividida en segmentos lanceolados y agudos; cabezuelas numerosas y pequeñas, formando un racimo de racimos. Las hojas y sumidades son emenagogos y estomáticas.

Sus características taxonómicas son las siguientes:

Clase: Equisetopsida

Subclase: Magnoliidae

Superorden: Asterales

Orden: Asterales

Familia: Asteraceae

Género: *Artemisia* L (Garden, 2017).

Sinonimia botánica: *Artemisia mexicana* y *Artemisia vulgaris*.

Sinonimia popular: estafiate, ajenjo, ajenjo del país, altamisa, altaniza, artemisia, azumate de Puebla, cola de zorrillo, esencia de mata verde, epazote de castilla, estomiate, hierba maestra, hierba maestra, incienso e istafiate (Miranda & Rivera 1999; México., 2017).

Ecología: originario de Estados Unidos; América, México y Guatemala. Habita en clima cálido, semicálido, semiseco y templado, desde el nivel del mar a los 3900 msnm. Cultivada en huertos familiares, crece a orillas de caminos, en terrenos abandonados y es común en vegetación perturbada de bosques tropicales caducifolios, subperrifolio y perennifolio, bosque espinoso, matorral xerófilo, bosque mesófilo de montaña, bosques de encino, de pino, mixto de pino-encino y de junípero (Miranda & Rivera 1999; México., 2017).

Usos medicinales: dolor de estómago, antidiarreico, antiparasitario, antiespasmódico biliar, afección hepática, problemas menstruales, abortivo, puerperio, padecimientos respiratorios (amigdalitis, bronquitis catarro común, tos y tosferina), anti reumático, hemorroides, dolor de oído, nervios, dolor de cabeza y mareos (Jasso-Gándara et al., 2020).

Farmacología: pocos estudios para verificar efectos diuréticos, como abortivo y como antibiótico de un extracto etanólico de las ramas para combatir *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella gallinarum*, *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium smegmatis* y *Candida*

albicans. El ácido hidroalcohólico retarda la acción del jugo gástrico y hace más lenta la digestión; sin embargo, no es tóxico y no ejerce ninguna otra influencia general o local (Alanis *et al.*, 2005; México., 2017).

Compuestos: aceite esencial con monoterpenos, alcanfor, alfa y beta-belandrenos, limoneno, borneol, car-3-ene, alfa-pineno y crisantemol; sesquiterpenos y estafiatina. Las partes aéreas de la planta contiene monoterpenos, alcanfor y transcrisantenol, sesquiterpenos y flavonoides. La raíz contiene monoterpeno, cetona de artemisia, dos compuestos azufrados y tres alquinos y en la flor se han detectado sesquiterpenos, antemidín y armexifolina (México, 2017; De Paz Merced, 2020).

Se considera una planta originaria y prácticamente solo estudiada en México, con aplicación comprobada como antihelmíntico (México, 2017; De paz Merced, 2020).

2.2 *Helianthus annuus* var roja

Hierba anual, con el tallo casi sencillo, de uno a dos metros, con las hojas anchas, ovales y cabezuelas terminales grandes, inclinadas, con el involucre formado por grandes brácteas ovales, anchas, pestañosas, bruscamente acuminadas y las flores amarillas; frutos (aquenios) grandes, tetragonales, comprimidos y coronados por un vilano de dos a cinco pajitas caedizas. Florece en verano. Los aquenios son comestibles y oleaginosos (Fernández *et al.*, 1998).

Sus características taxonómicas son las siguientes:

Clase: Equisetopsida

Subclase: Magnoliidae

Superorden: Asteranae

Orden: Asterales

Familia: Asteraceae

Género: *Helianthus* L (Garden, 2017).

Sinonimia botánica: *Helianthus aridus*, *Helianthus jaegeri*, *Helianthus lenticularis*, *Helianthus lindheimerianus*, *Helianthus macrocarpus*, *Helianthus multiflorus* y *Helianthus ovatus* (Garden, 2017).

Nombre común: girasol, calom, jáquima, maravilla, mirasol, tlapololote, maíz de teja, acahual o flor de escudo (Shosteck, 1974).

Ecología: originaria de América boreal, habita en climas semicálido y semiseco entre los 200 y los 900 msnm. Planta silvestre, crece a orillas de caminos, asociada a vegetación perturbada de pastizal y matorral xerófilo (México., 2017; Fragoso *et al.*, 2019).

Usos medicinales: derrame pleural, resfriado común, úlceras y heridas de la piel, trastornos nerviosos, cefalea y dolores reumáticos (de Tapia *et al.*, 2014; México., 2017), antimicrobiano contra *Staphylococci*, *Streptococci*, *Enterococci*, *Pseudomonas*, *Escherichia coli* y *Mycobacterium tuberculosis* (Sechi *et al.*, 2001).

Compuestos: el extracto hexánico presenta actividad contra *Mtb* H37Rv, con CMI de 15.6, 250 µg/mL (Coronado-Aceves *et al.*, 2016), también presenta actividad el aceite “oleozon” (Sechi *et al.*, 2001).

2.3 *Lycopodium clavatum*

L. clavatum es una hierba perenne, con los tallos rastreros y radiantes, de cuatro a ocho decímetros, cubiertos de hojas ovales pequeñas, estrechas, denticuladas y

alargadas; los tallos erguidos, terminan en espiguillas formadas por hojitas amarillentas más anchas y que llevan en la base de su cara interna un órgano (esporangio) de forma arriñonada, que se abre longitudinalmente y contiene cuatro esporas las cuales se conocen como polen de lycopodio o azufre vegetal (Uehara & Kurita, 199).

Características taxonómicas:

Clase: Equisetopsida

Subclase: Lycopodiidae

Orden: Lycopodiales

Familia: Lycopodiaceae

Género: Lycopodium L (Garden, 2017).

Sinonimia botánica: *Lepidotis ciliata*, *Lepidotis clavata*, *Lepidotis inflexa*, *Lycopodium aristatum*, *Lycopodium ciliatum*, *Lycopodium contigumm*, *Lycopodium eriostachys*, *Lycopodium inflexum*, *Lycopodium piliferum*, *Lycopodium preslii*, *Lycopodium serpens*, *Lycopodium Trichiatum*, *Lycopodium trichophyllum* (Garden, 2017).

Nombre común: lycopodio, caminera y colchón de pobre.

Ecología: se distribuye ampliamente por todo el mundo (la variedad *aristatum* se distribuye en México, Antillas, Centroamérica, Sudamérica y norte de Argentina), en España se encuentra en los Pirineos, crece en terrenos silíceos, matorrales y bosques de coníferas, en zonas templadas y frías del hemisferio Norte (Herbert Baxter, 1998).

Usos: funciones analgésicas, antiinflamatorias y anti-neuríticas, control de osteoporosis, anti-reumáticas.

Incremento de IFN- γ , IL-12, citocinas Th1 y disminución de IL-10 en ratas infectadas con *Tripanosoma cruzi* (Brustolin Aleixo et al., 2017; Falkowski-Temporini et al., 2016).

Compuestos: alcaloides, borbonicina, fawcettina, fawcettimina, flabelliformina y obscurina (Herbert Baxter, 1998; Ian W. Southon, 1989).

3. Purificación química de metabolitos secundarios

Las plantas presentan en su estructura, múltiples características químicas, las cuales forman parte de su metabolismo. Aunque no hay una distinción con base en la estructura química, molécula precursora u orígenes biosintéticos, los productos metabólicos de las plantas son clasificados de acuerdo con su función como metabolitos primarios y metabolitos secundarios (García & Carril, 2011).

Los metabolitos primarios presentes en los vegetales son carbohidratos, aminoácidos, ácidos grasos, ácidos nucleicos, aminos, clorofilas e intermediarios metabólicos de las vías anabólicas y catabólicas, los que a su vez producen metabolitos secundarios. Los metabolitos secundarios son sustancias que no participan de manera directa en el crecimiento o desarrollo, es decir, sustancias que no son indispensables, pero que aportan al vegetal una ventaja para responder a los estímulos de su entorno, ya sea como mecanismo de defensa contra depredadores o como materia de almacenamiento (Rivas-Morales, Oranday-Cárdenas, & Verde-Star, 2016). Las familias de los metabolitos secundarios se pueden clasificar como: terpenoides, esteroides, compuestos fenólicos-flavonoides, cumarinas, quinonas, lignanos, glucósidos cianógenos, glucósidos cardiotónicos, iridoides, alcaloides, saponinas y lactonas sesquiterpénicas (García, 2004).

Los metabolitos secundarios de algunas plantas presentan propiedades medicinales, por lo cual en los últimos años se ha incrementado el estudio con metodología científica de sus componentes. En países subdesarrollados, las plantas medicinales constituyen la base para el tratamiento de múltiples enfermedades, en aproximadamente 3300 millones de personas (Pan, 2013).

Primero se debe realizar una búsqueda de las plantas con probable capacidad terapéutica deseada y descripción de sus características botánicas.

3.1 Estudios etnobotánico y etnofarmacológico

Para iniciar los estudios de una planta, es importante realizar primero una investigación bibliográfica exhaustiva en buscadores de contenido científico de las características botánicas de la planta así como el conocimiento de su uso tradicional y sus efectos con propiedades medicinales. Luego de decidir la especie a investigar, se la ubica geográficamente la planta y se recolecta, se realiza una clasificación botánica por experto y su número de registro. Posteriormente, se procesa el material vegetal limpiando las impurezas visibles y cortando sus partes en trozos pequeños, se seca a la sombra para su posterior procesamiento (Ayme, 2021).

3.2 Estudios de actividad biológica

La comprobación científica del uso terapéutico por ensayos que involucran evaluación en modelos *in vitro* y/o *in vivo*. Ya que las plantas contienen una gran variedad de metabolitos secundarios, se requiere de esquemas de extracción estandarizados; los extractos de las plantas son obtenidos a través de maceración o percolación de las partes

aéreas, semillas o raíces ya sea en agua o en varios solventes orgánicos (Ayme, 2021; Eloff, 1998).

3.3 Extracción de los compuestos bioactivos

Un ensayo biodirigido, permite determinar cualitativamente los principales grupos químicos presentes en las plantas a partir del cual puede orientarse el fraccionamiento de los extractos. Los métodos extractivos más empleados son:

3.3.1. Extracción por maceración

En un método sólido-líquido donde el material vegetal que se pretende extraer contiene compuestos solubles en el líquido de la extracción. El material vegetal se corta en trozos pequeños, molido, fresco o seco y se coloca en un recipiente al cual se añade el solvente de acuerdo con su polaridad (desde menos polar a más polar), durante 5 a 7 días para después filtrar y extraer por evaporación a través de un rota vapor (Azwanida; U. N. I. D. Organization, Handa, Khanuja, Longo, & Rakesh, 2008; Sánchez, 2006).

3.3.2. Extracción por lixiviación

En este método se produce el desplazamiento de sustancias solubles por medio de un disolvente líquido; el material fresco se coloca en un recipiente a temperatura ambiente durante 3 días con el solvente y sin necesidad de cortar el material vegetal en trozos. Posteriormente, se decanta y se evapora en un rotavapor (U. N. I. D. Organization et al., 2008; Sierra, Barros, Gómez, Mejía, & Suarez, 2018).

3.3.3. Extracción por Soxhlet

Es un proceso de extracción continua de un material sólido que contiene algunos de los compuestos deseados, se coloca dentro de un papel filtro grueso (el cual se carga

en la cámara principal del extractor Soxhlet), a través del cual se hace pasar el solvente y con calentamiento. Este ciclo se repite varias veces durante horas o días (U. N. I. D. Organization *et al.*, 2008; Sierra *et al.*, 2018).

3.3.4. Arrastre por vapor

Se emplea principalmente en aceites esenciales, ya que contienen compuestos orgánicos volátiles o aromáticos, los cuales pueden ser alcoholes, cetonas, éteres, aldehídos y que se producen o almacenan en los canales secretores de las plantas. La forma de extracción es a través del uso de vapor saturado a presión atmosférica. Al líquido acuoso que queda del arrastre, se le realiza extracción con solvente durante 5 días a una temperatura de 30° a 40° C, al término de este tiempo, el extracto se evapora en rotavapor (U. N. I. D. Organization *et al.*, 2008; Sánchez, 2006).

3.3.5. Extracción por decocción

Se aplica a algunas plantas cuyos principios activos no pueden ser extraídos fácilmente. Se hace hervir la planta o las partes que interesen de la misma en agua a fuego lento, posteriormente se le deja macerar antes de pasar a la filtración. Lamentablemente, este método puede modificar algunos compuestos de la planta y puede ocurrir que se quiera obtener un principio activo y se obtenga otro de acción contraria. Debido al calor que alcanza el agua en la ebullición, se pierden la mayoría de los principios activos que presentan un bajo punto de ebullición, por lo que la decocción nunca tendrá los principios iniciales de la planta (U. N. I. D. Organization *et al.*, 2008; Sierra *et al.*, 2018).

3.4 Identificación química de los componentes del extracto vegetal.

3.4.1 Pruebas fitoquímicas preliminares

Las plantas contienen una gran cantidad de metabolitos secundarios, entre los cuales destacan los alcaloides, flavonoides, taninos y fenoles. El principio de las pruebas fitoquímicas preliminares consiste en identificar la formación de complejos con cambios de coloración al mezclarse con reactivos específicos.

3.4.2 Espectroscopias

En la actualidad se usan diferentes técnicas instrumentales para determinar la estructura de los compuestos orgánicos dentro de las cuales se encuentran las espectroscopías (estudio de la interacción de la materia y la radiación electromagnética) (Ralph L. Shriner, 2013; Yurkanis Bruice, 2007).

Las espectroscopias para el análisis de los compuestos orgánicos son:

Espectroscopia ultravioleta/visible (UV/vis), que ofrece información acerca de los compuestos orgánicos con enlaces dobles conjugados. La longitud de onda de luz ultravioleta oscila de 180 a 400 nm; la luz visible tiene ondas de luz de 400 a 780 nm. Cuanto más corta es la longitud de onda, mayor es la energía de radiación. Por lo tanto, entre más enlaces conjugados existan mayor será su longitud de onda (Ralph Shriner, 2013; Yurkanis Bruice, 2007).

La espectroscopia infrarroja (IR), que permite determinar los grupos funcionales de los compuestos orgánicos, se expresa en frecuencias características de flexión y extensión, ya que toma más energía alargar un enlace que doblarlo. Cuando un compuesto

se bombardea con radiación de una frecuencia que encaja exactamente con la frecuencia de una de sus vibraciones, la molécula absorbe energía y muestra una banda de absorción. La posición, intensidad y forma de una banda de absorción ayuda a identificar grupos funcionales. Los enlaces más fuertes muestran bandas de absorción a números de onda más grandes. La intensidad de una banda de absorción depende de la polaridad del enlace (Shriner, 2013; Yurkanis Bruice, 2007).

La espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN), la cual ofrece información acerca de los ambientes químicos de los átomos de hidrógeno o carbono en un compuesto. Cuando se coloca la muestra en un campo magnético, los protones se alinean con el mismo, están en el estado de espín a de menor energía; los que se alinean en dirección opuesta al campo están en estado de espín de mayor energía. La diferencia de energía entre los dos estados de espín depende de la intensidad del campo magnético aplicado. El número de señales en un espectro RMN ^1H indica el número de diferentes tipos de protones en un compuesto. El desplazamiento químico es una medida de cuán alejada está una señal de la señal de transferencia (Tetra metil sulfóxido –TMS). Cuanto mayor sea el campo magnético que sienten los protones, mayor es la frecuencia de la señal. La densidad de electrones del entorno en el que se ubica el protón apantalla al protón del campo magnético aplicado. Por lo tanto, un protón en un entorno rico en electrones muestra una señal a una frecuencia más baja que un protón cerca de grupos electronegativos o electrón-atractores. La integración indica el número relativo de protones que originan cada señal y la multiplicidad indica el número de protones unidos a carbonos adyacentes (Shriner, 2013; Yurkanis Bruice, 2007).

3.4.3 Cromatografía

La cromatografía consiste en la separación de los componentes de una mezcla por medio de la distribución selectiva de los mismos entre una fase móvil y una fase estacionaria. El origen etimológico de la palabra cromatografía se basa en la idea del color (vocablos griegos *khroma*, que significa “color”, y *graphe*, “acción de escribir”). La fase móvil es un líquido o un gas que transporta los compuestos a lo largo de una columna. La fase estacionaria puede ser óxido de silicio o gel de sílice. La capacidad para separar diversos componentes de una mezcla de compuestos orgánicos se basa en la absorción selectiva y preferencial de dichos componentes en la fase móvil por la fase estacionaria. Los tipos de cromatografía que existen son: cromatografía de gases (fase móvil gaseosa –helio o nitrógeno- y fase estacionaria un líquido adsorbido por un soporte sólido) y cromatografía de líquidos (fase móvil líquida, regularmente un solvente orgánico común y la fase estacionaria un líquido adsorbido a un soporte sólido) dentro de la cual se encuentra la cromatografía en capa fina, la cromatografía de columna y cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés) (Ralph Shriner, 2013).

Cuando la cromatografía está acoplada a un espectrómetro de gases, es la combinación sinérgica entre dos técnicas microanalíticas poderosas. La cromatografía de gases separa los componentes de una mezcla en un primer momento, y el espectrómetro de masas provee información de la estructura de cada componente. Esta técnica puede proporcionar un espectro de masa completo con pocos femtomoles de un analito. Da evidencia directa de la masa y el patrón de fragmentación característico del compuesto "huella química o fingerprint", el cual se compara con tiempo de retención del cromatógrafo de gases (Sparkman, Penton, & Kitson, 2011).

4. Evaluación de la toxicidad y citotoxicidad de los extractos vegetales en modelos *in vivo* y *ex vivo*

4.1 Los estudios de toxicidad y citotoxicidad: evalúan sobre células u organismos el posible efecto tóxico de los extractos de las plantas.

Bioensayo de toxicidad *in vivo*: es una de las pruebas más empleadas para evaluar la toxicidad de compuestos naturales *in vivo*, es el bioensayo en modelo de *Artemia* spp. Los quistes de artemia se pueden conservar por períodos prolongados, son de bajo costo y presentan una adecuada precisión en su reproducibilidad.

Es un modelo ideal para evaluar la toxicidad de fármacos, de residuos de pesticidas, de micotoxinas, de la contaminación y de múltiples extractos vegetales. La toxicidad se evalúa a través de la concentración letal media (CL₅₀), la cual se expresa en µg/ml y se interpreta como: <10 µg/mL (extremadamente tóxico), >10 a 100 µg/mL (moderadamente tóxico), >100 hasta 1000 µg/mL (moderadamente tóxico) y >1000 µg/mL (no tóxico) (Meyer *et al.*, 1982).

Citotoxicidad en modelo *ex vivo* son diversos estudios *ex vivo* y se han aplicado en cultivos celulares. Permiten elucidar el mecanismo de acción, efectos benéficos y toxicidad de los compuestos bioactivos. La línea celular monocítica THP-1 se ha empleado como modelo de macrófago y leucemia desde 1980. Es reproducible y precisa, al retarse con los metabolitos secundarios de extractos vegetales, permite evaluar la viabilidad a través de la concentración inhibitoria 50 (IC₅₀).

Estos estudios también se ha empleado para evaluar la capacidad antimicrobiana de los metabolitos secundarios contra *Mtb* simulando un modelo de macrófago humano

infectado por *Mycobacterium tuberculosis* inactiva (Jimenez-Arellanes *et al.*, 2013; Luo *et al.*, 2013).

5. Actividad antimicrobiana de los extractos *in vitro*

Existen diversos métodos *in vitro* para evaluar la actividad microbiológica de los extractos obtenidos de plantas, estos incluyen difusión en agar, ensayos de dilución en caldo micro y macro, radiometría BACTEC 460, MGIT 960 y ensayos de genes reportadores (Gupta *et al.*, 2011). Específicamente, el sistema BACTEC MGIT 960 consiste en un sistema automatizado no radiométrico, el cual emplea un caldo modificado de Middlebrook 7H9 con un sensor fluorescente para penta hidrato de cloruro de rutenio; este último cultivo, es un excelente método para contar con resultados en un promedio de 7-10 días (Jyoti *et al.*, 2016).

La actividad antimicrobiana de los extractos, fracciones, o compuestos de las plantas, generalmente se expresa en concentración mínima inhibitoria (CMI), y una actividad significativa se da cuando los valores de IC₅₀ (concentración inhibitoria 50) se encuentran por debajo de 0,1 mg/mL para los extractos de las plantas y de 0.025 mg/mL para compuestos puros (Rios JL, 2005; Silva *et al.*, 2013).

6. Microcápsulas de alginato para el transporte de fármacos y extractos vegetales

El alginato es un copolímero natural de ácido glucorónico y ácido manurónico y es el biopolímero más abundante en el mundo. El alginato puede obtenerse en una forma extrapura y puede ser mezclado con un amplio rango de sustancias (Skjak-Braek G, 1996).

El alginato presenta varios atributos que lo hacen un vehículo ideal para el transporte de fármacos: es un polímero natural, se produce a gran escala, es compatible

con un amplio rango de sustancias, presenta un proceso simple de encapsulación. Además, es mucoadhesivo, es biodegradable, no es tóxico, se puede formular en diferentes vehículos, puede mantener una liberación constante del fármaco e incrementa la viabilidad de múltiples fármacos (Raj & Sharma, 2003).

Las microcápsulas de alginato se han estudiado como vehículos que transportan fármacos tanto en estudios *in vitro* como *in vivo*. Cuando se mezcla con rifampicina, puede incrementar su concentración a las 2, 4 y 6 horas en comparación con rifampicina libre ($p < 0.001$). Cuando se administran los tres fármacos (isoniazida, rifampicina y pirazinamida) mezclados con alginato en un modelo murino, existe una liberación sostenida de los fármacos durante 5 días así como presencia del fármaco en distintos tejidos a los 9 días (Qurrat ul, Sharma, Khuller, & Garg, 2003).

La encapsulación en alginato de extractos vegetales puede mejorar potencialmente la utilidad de los metabolitos secundarios, tales como controlar su liberación, incrementar su vida media, separar compuestos incompatibles y mejorar la calidad del producto final (Chan, Yim, Phan, Mansa, & Ravindra, 2010).

La eficiencia de la encapsulación de los extractos vegetales, puede variar en rangos del 50-80 % dependiendo del método de encapsulación. Sin embargo, el proceso de encapsulación o bien el material empleado, no degradan los compuestos bioactivos y tampoco parece haber interacción química entre los compuestos del extracto y el alginato (Stojanovic *et al.*, 2012).

7. JUSTIFICACIÓN

En el mundo existe una alta prevalencia de tuberculosis latente (hasta el 30 % de la población mundial), con probabilidades de evolucionar a tuberculosis activa. En México, nos enfrentamos al binomio Diabetes Mellitus y Tuberculosis y el 40 % de las personas que padecen ambas comorbilidades, se asocian con drogo resistencia (Delgado Sánchez et al., 2015). Además, en el estado de Puebla se reportan alrededor de 400 casos anuales de tuberculosis y de ellos casi el 10 % manifiestan drogoresistencia (Tuberculosis.sinave.gob.mx).

Las reacciones adversas por los fármacos convencionales de primera línea (isoniacida, rifampicina, pirazinamida y etambutol) y de segunda línea (inyectables, quinolonas, protionamida, cicloserina y linezolid) se asocian a complicaciones graves funcionales (sordera, falla renal, hepatitis, gastritis, farmacodermias, convulsiones, neuropatía, convulsiones y depresión), a disminución en la calidad de vida y abandono del tratamiento (Palmero, D., et al., 2010). Actualmente, solo existen tres nuevos fármacos con eficacia probada (bedaquilina, delamanid, y pretomanid) para el manejo de infecciones por *Mtb* resistente a fármacos clásicos (Serrano, A., 2017). Lamentablemente, estos nuevos medicamentos, también presentan reacciones adversas graves y son de difícil acceso.

Existe evidencia en todo el mundo y en nuestro país, de la utilidad antimicrobiana contra *Mtb* de diversas plantas medicinales, las cuales pueden favorecer al éxito y a la disminución de las reacciones adversas de la terapéutica actual (Arellanes & Garrido J.C., 2010). Es relevante aumentar el conocimiento de las plantas con potencial uso medicinal utilizadas en nuestro medio, las especies propuestas en este trabajo (*Artemisia*

ludoviciana, *Helianthus annuus* y *Lycopodium clavatum*) cuentan con muy poco conocimiento y aplicación con validez científica.

8. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La infección por *Mycobacterium tuberculosis* en el ser humano, representa una alta prevalencia mundial, expresada como tuberculosis latente y con un alto riesgo de convertirse en una tuberculosis activa; los fármacos actuales muestran tendencia a la resistencia e inducen reacciones adversas, algunas graves (Chakaya *et al.*, 2021). Solo hay tres nuevos fármacos disponibles para su uso en humanos y varios fármacos aún en fases preclínicas de investigación (Li Y., Sun F., & Zhang, W., 2019).

Por otro lado, los metabolitos secundarios de plantas medicinales regionales como *Artemisia ludoviciana*, *Helianthus annuus* y *Lycopodium clavatum*, pueden ser útiles como adyuvantes en el tratamiento de *Mycobacterium tuberculosis*, ya que potencialmente pueden disminuir su crecimiento *in vitro*, pueden mejorar el sistema inmune del hospedero y podrían contribuir a disminuir las reacciones adversas de los fármacos actuales convencionales (Jimenez-Arellanes *et al.*, 2003; Guo, S., Ge, Y., & Na Jom, K., 2017; Dymek, A., *et al.*, 2018)

Ante la necesidad de investigar e innovar nuevas formas de tratamiento para combatir a la infección por *Mycobacterium tuberculosis*, nace la pregunta de investigación: ¿Cuál es la eficacia y seguridad de los compuestos bioactivos de extractos de *Artemisia ludoviciana*, *Lycopodium clavatum* y *Helianthus annuus*, como adyuvantes en el manejo de la infección de *Mycobacterium tuberculosis* en humanos?

9. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la composición y eficacia de un extracto vegetal solo y encapsulado, para combatir a *Mycobacterium tuberculosis*, así como también su inocuidad para el ser humano, utilizando diferentes modelos biológicos tanto *in vitro* como *ex vivo* e *in vivo*, con el fin de proponer una terapia alternativa adyuvante al tratamiento de la tuberculosis.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a- Realizar la búsqueda bibliográfica, obtener y clasificar taxonómicamente las tres especies.

b- Obtener los extractos (hexánico, acetato de etilo, metanólico y etanólico) de las tres plantas.

c- Obtener la CL₅₀ de los extractos en el modelo de *Artemia* spp.

d- Evaluar la utilidad antimicrobiana de los extractos contra *Mtb in vitro* (MGIT) y con el modelo de rezasurina.

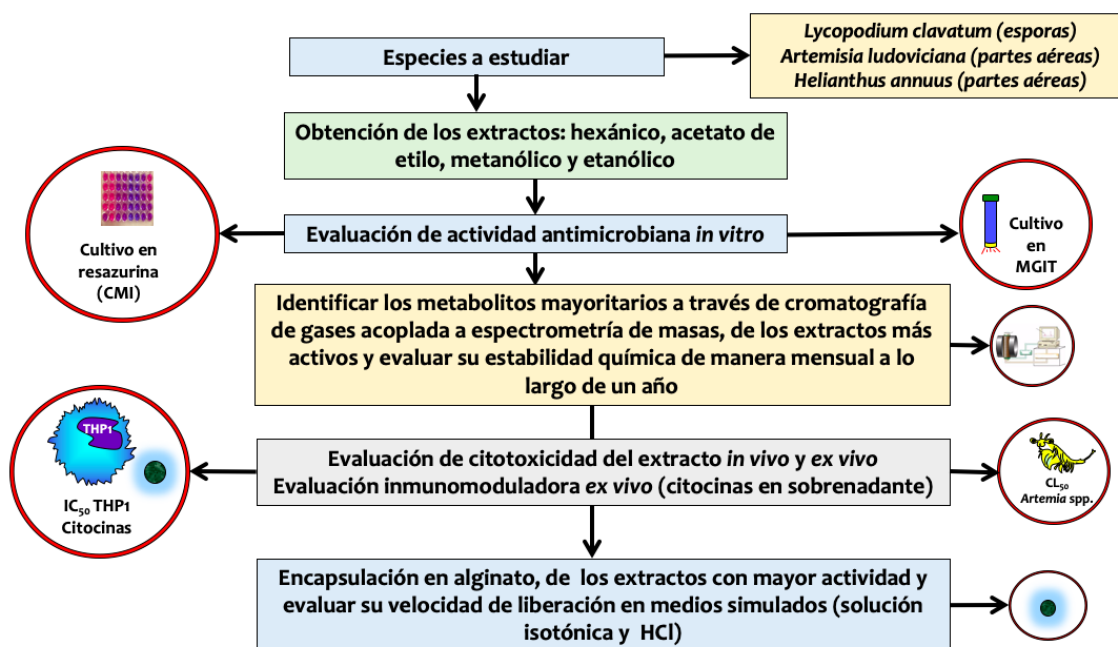
f- Encapsular en alginato los dos extractos de mayor actividad en los modelos anteriores y medir su velocidad de liberación en agua y HCl.

g- Determinar la citotoxicidad en modelos celulares (IC₅₀ en macrófagos THP-1), con los dos extractos más activos en los modelos anteriores.

h- Realizar las pruebas fitoquímicas preliminares del extracto más activo.

i- Identificar los metabolitos mayoritarios a través de cromatografía de gases acoplada a espectrómetro de masas, de los extractos más activos.

10. PLAN DE TRABAJO



Las especies regionales identificadas con potencial actividad contra *Mtb* son las partes aéreas de *Artemisia ludoviciana*, *Helianthus annuus* y las esporas de *Lycopodium clavatum*.

Para la obtención de los extractos, se realizó la maceración por 72 horas con solventes de menor a mayor polaridad para cada una de las plantas; es decir, hexano, acetato de etilo y metanol. En el caso del etanol, se realizó una extracción directa.

Se probó la actividad antimicrobiana *in vitro* a través de los modelos MGIT y resazurina, de los diferentes extractos y en diversas cepas tanto experimental HR37a, como cepas clínicas sensibles y resistentes.

Para determinar las características químicas de los extractos se realizaron pruebas fitoquímicas preliminares.

Los compuestos mayoritarios de los extractos con mayor actividad antimicrobiana, se analizaron a través de cromatografía de gases adaptada a espectrómetro de masas. Se determinó la consistencia de estos compuestos de manera mensual a lo largo de un año.

La citotoxicidad *in vivo* de los extractos, se determinó a través de la CL₅₀ en el modelo de *Artemia* spp.

La citotoxicidad *ex vivo* de los extractos, se determinó a través de la CI₅₀ en el modelo de THP-1.

Las propiedades inmunomoduladoras de los extractos, se midió mediante la producción de diversas interleucinas: IL-6, TNF- α , e IL-10, en el sobrenadante de células THP-1.

Para mejorar la estabilidad y mejorar la calidad de los extractos, se mezclaron con microcápsulas de alginato.

11. METODOLOGÍA

11.1 Búsqueda bibliográfica, adquisición y clasificación taxonómica de los ejemplares objeto de estudio.

Se realizó la búsqueda de uso medicinal tradicional y bibliográfica en Scifinder de plantas medicinales con probable uso terapéutico contra *Mycobacterium tuberculosis* y en base a los mismos se decidieron las tres especies a estudiar. La obtención y clasificación taxonómica de los ejemplares se realizó a través de un botánico y se registraron en el Jardín Botánico Francisco Peláez, San Andrés Cholula, Puebla, México.

11.2 Obtención de los extractos

Se colocan 300 g de las partes aéreas secas de *Artemisia ludoviciana* y *Helianthus annuus* var. Rojo, así como las esporas de *Lycopodium clavatum*, de manera secuencial con hexano, acetato de etilo y metanol, por el método de maceración ya descrito (Contreras Cardenas, Hernandez, Juarez, Sanchez-Arreola, & Bach, 2016; Fortuna *et al.*, 2011), cada solvente se mantendrá por 48 horas en dos ocasiones (doble extracción) con agitación ocasional. En el caso del etanol, se realizó la extracción única y doble.

Los solventes de los respectivos extractos se evaporaron con el uso del rotavapor Hahnshin modelo HS 2001 NS.

11.3 Pruebas fitoquímicas preliminares

Para la detección de alcaloides se empleó la prueba de Hager: se toman 50 mg del extracto libre de solvente y se diluye en ácido clorhídrico, se filtra y se añade 1 a 2 mL de reactivo de Hager (solución acuosa saturada en ácido pícrico). En caso de existir alcaloides, obtendremos un precipitado de color amarillo (Wagner & Bladt, 1996).

Para la detección de carbohidratos, se empleó la prueba de Molish: se usan 100 mg del extracto y se disuelve en 5 mL de agua destilada, se filtra y se añade dos gotas de solución alcohólica, se agita y se añade 1 mL de ácido sulfúrico concentrado. La formación de anillos violetas indican la presencia de carbohidratos (Ramakrishnan, 2004).

Para la detección de glucósidos se realizó la prueba de Bortrager: 50 mg de del extracto se hidrolizan con ácido clorhídrico (2 horas) y se filtra, después se añade 3 mL de cloroformo, se agita y se agrega 10 % de solución de amonio. Un color rosado indica la presencia de glucósidos (Evans, 1997).

Para la detección de saponinas se utilizó la prueba de Frothing: 50 mg del extracto se diluyen en 20 mL de agua destilada, durante 15 minutos se agita en tubo de ensayo y la presencia de una capa de 2 cm de grasa indica la existencia de saponinas (Kokate, 1999).

Para la detección de compuestos fenólicos, se empleó la prueba de acetato de plomo: 50 mg del extracto se disuelven en agua destilada y se le añade 3 mL de solución de acetato de plomo al 10 %. Un precipitado de color blanco indica la presencia de compuestos fenólicos (Thangaraj, 2016).

Para la detección de flavonoides se empleó la prueba de reacción alcalina: el extracto se mezcla con solución de hidróxido de amonio al 10 %, la presencia de amarillo fluorescente indica la presencia de flavonoides (Raaman, 2006).

Para la detección de glucósidos de flavonol se usó la reducción con ácido clorhídrico y magnesio: 50 mg del extracto se disuelven en 5 mL de alcohol y se agregan fragmentos

de magnesio y gotas de ácido hidroclicórico concentrado. La presencia de coloración rosa carmesí, indica la presencia de glucósidos de flavolol (Harborne, 1998).

11.4 Identificación de compuestos mayoritarios, encapsulación en alginato y velocidad de liberación del extracto.

11.4.1 Identificación de compuestos mayoritarios a través "Cromatografía de gases acoplada a espectrómetro de masas (CG-EM)"

Para determinar los compuestos mayoritarios de empleo la técnica de "Combinación de varias aproximaciones", es decir: a) índices de retención (IR), en conjunto con b) espectros de masas experimentales (EI, 70 eV) y c) su comparación con las bases de datos índice de retención obtenidos en columnas de polaridad ortogonal (polar y apolar) y de espectros de masas estándar (EI, 70 eV) (Stashenko & Martínez, 2010) (Figura 2).

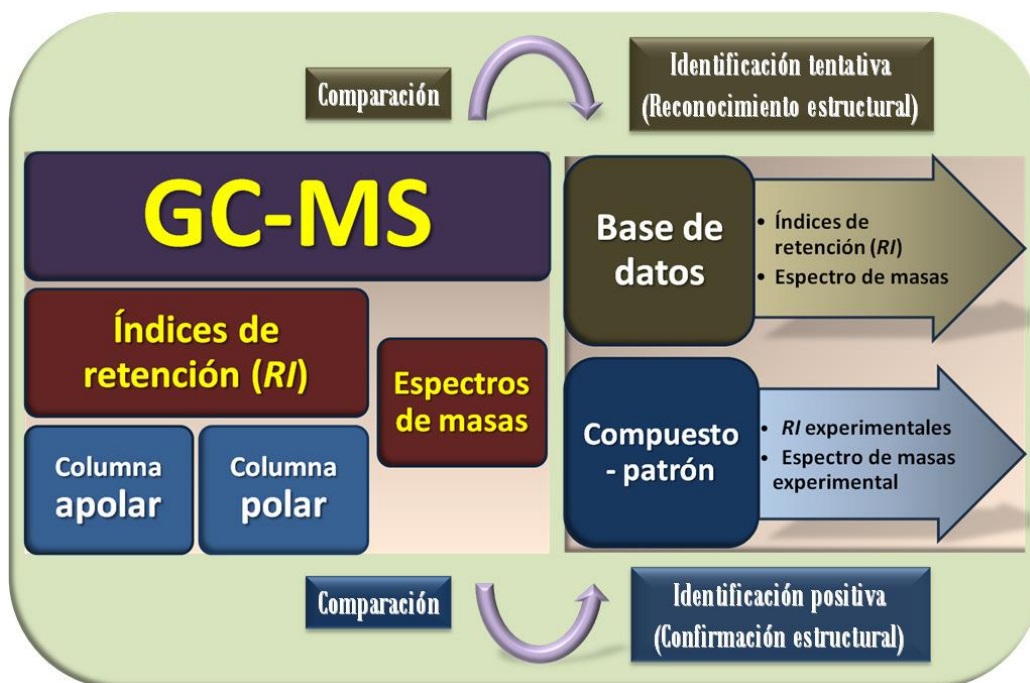


Figura 2. Flujograma general para la identificación presuntiva o confirmación de un compuesto presente en una mezcla problema (Stashenko & Martínez, 2010).

Los componentes del extracto etanólico y acetato de etilo de *Artemisia ludoviciana*, se analizaron mediante cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas (GC-MS, Agilent Technologies 7890B) y un detector de masas selectivo (MDS, Agilent 5977A). Se inyectaron 20 µL de las muestras en la columna polar Agilent DB-5HT (30 m de longitud x 320 µm de diámetro x 0,10 µm de espesor). Se utilizó helio como gas portador a un caudal de 1,1 ml/min. La temperatura del inyector se mantuvo a 280°C usando un modo splitless. El gradiente de temperatura comenzó en 80°C por 2 min, 3°C/min hasta 100°C por 10 min, 5°C/min hasta 150°C por 10 min, y finalmente 3°C/min hasta 330°C por 5 min. La unidad MS se operó a 70 eV usando un rango de masas entre 30 y 425 amu. Los componentes del extracto se identificaron después de comparar los patrones de fragmentación con la base de datos espectral de masas del Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (W10N11).

11.4.2 Encapsulación de los extractos vegetales

Se llevó a cabo la gelificación de los extractos vegetales de los extractos etanólico y acetato de etilo de *Artemisia ludoviciana*, con alginato ultrapuro, para formar cápsulas. Se preparó el alginato al 4 % diluyéndolo en una solución libre de Ca²⁺ con una osmolaridad de 310 mOsm y se le esterilizó utilizando una autoclave.

Se preparó 1 litro de las siguientes soluciones:

I. Solución Krebs-Ringer-Hepes (KRH) sin calcio con una osmolaridad de 310 mOsm/L

Procedimiento:

a. En medio litro de agua bidestilada se colocan los compuestos que se enlistan en la siguiente tabla (Tabla1) (deben aplicarse en el orden recomendado para evitar la formación de compuestos terciarios) y se mantienen en movimiento continuo hasta alcanzar una mezcla homogénea con cada uno:

Tabla 1. Compuestos para preparar solución Krebs-Ringer-Hepes

Compuesto	Cantidad en gr
1. NaCl	7.889
2. KCl	0.350
3. Hepes	5.960
4. KH ₂ PO ₄	0.163
5. MgSO ₄	0.296

b. Una vez obtenida la mezcla homogénea con todos los compuestos (se mide el pH el cual regularmente en este momento es de 5.4), se coloca el medio litro restante para alcanzar la osmolaridad deseada en el litro de solución.

c. La solución debe ajustarse a un pH de 7.4, para la cual, si aún es muy ácido, se aplican gotas de hidróxido de sodio, hasta alcanzar el pH deseado (procurar realizarlo lentamente para no exceder en la alcalinidad).

d. Una vez reconstituida la solución, se esteriliza en autoclave durante 15 minutos.

II. Solución de CaCl₂ a 100 mM por 1 litro

Procedimiento:

a. En medio litro de agua bidestilada se colocan los compuestos enlistados en la siguiente tabla (Tabla 2) (deben aplicarse en el orden recomendado para evitar la formación de compuestos terciarios) y se mantienen en movimiento continuo hasta alcanzar una mezcla homogénea con cada uno:

Tabla 2. Compuestos para elaborar CaCl₂ a 100 mM/L

Compuesto	Cantidad en gr
1. CaCl ₂	14.70
2. KCl	0.15
3. Hepes	2.38

b. Una vez obtenida la mezcla homogénea con todos los compuestos (se mide el pH el cual regularmente en este momento es de 5.4), se coloca el medio litro restante para alcanzar la osmolaridad deseada en el litro de solución.

c. La solución debe ajustarse a un pH de 7.4, para la cual si aún es muy ácido, se aplican gotas de hidróxido de sodio, hasta alcanzar el pH deseado (procurar realizarlo lentamente para no exceder en la alcalinidad).

d. Una vez reconstituida la solución, se esteriliza en autoclave durante 15 minutos.

III. Solución Krebs-Ringer-Hepes (KRH) con calcio a 25 mM por 1 litro

Procedimiento:

a. En medio litro de agua bidestilada se colocan los compuestos enlistados en la siguiente tabla (Tabla 3) (deben aplicarse en el orden recomendado para evitar la formación de compuestos terciarios) y se mantienen en movimiento continuo hasta alcanzar una mezcla homogénea con cada uno:

Tabla 3. Compuestos para elaborar KRH con calcio a 25 mM/L

Compuesto	Cantidad en gr
1. NaCl	7.773
2. KCl	0.350
3. Hepes	5.960
4. KH ₂ PO ₄	0.290
5. MgSO ₄	0.290
6. CaCl ₂	0.370

b. Una vez obtenida la mezcla homogénea con todos los compuestos (se mide el pH el cual regularmente en este momento es de 5.4), se coloca el medio litro restante para alcanzar la osmolaridad deseada en el litro de solución.

c. La solución debe ajustarse a un pH de 7.4, para la cual si aún es muy ácido, se aplican gotas de hidróxido de sodio, hasta alcanzar el PH deseado (procurar realizarlo lentamente para no exceder en la alcalinidad).

d. Una vez reconstituida la solución, se esteriliza en autoclave durante 15 minutos.

IV. Solución con alginato

El alginato se disuelve en la solución KRH sin calcio, a una temperatura de 4°C para alcanzar una concentración al 4 %, se mantiene en movimiento continuo durante toda una noche.

La solución se esteriliza a través de un filtro de 0.22 µm y se almacena hasta su uso a una temperatura de 4°C.

V. Encapsulación

El alginato se combina con el extracto etanólico y el extracto de acetato de etilo de *Artemisia ludoviciana* a una concentración de 100 mg/mL y se gelifica en la solución de CaCl₂. Las cápsulas obtenidas se lavan tres veces utilizando la solución de KRH y se almacenan en dicha solución hasta su uso.

11.4.3 Determinación de la velocidad de liberación de los extractos vegetales encapsulados

Una vez formadas las cápsulas de alginato con el extracto, se procedió a evaluar la velocidad de liberación de los extractos. Se determinó para cada uno de los mismos, la longitud de onda en el espectrofotómetro, que mejor les identificaba. En el caso del extracto etanólico de *Artemisia ludoviciana*, la medición fue de 680 nm y para el extracto acetato de etilo de *Artemisia ludoviciana* la medición fue de 380 nm.

Para la evaluación de la velocidad de liberación, se consideraron las vías de administración oral y subdérmica, por lo que se suspendieron los extractos solos y encapsulados en agua y en HCl 0.1 mM, de esta manera se simularon las condiciones que se encontrarían las cápsulas subdérmicas y en el estómago respectivamente. Se registraron las lecturas a diferentes longitudes de onda, dependiendo de cada extracto tomando lecturas cada 15 minutos durante 180 minutos, a los 7 días y a los 15 días.

11.5 Evaluación de la actividad biológica del extracto *in vitro* y *ex vivo*

Evaluación de la actividad biológica en líquido por sistema MGIT (Mycobacterial Growth Indicator Tube)

La evaluación antimicrobiana de los extractos *in vitro* se realizó en cepas de *Mycobacterium tuberculosis* drogo sensible y drogo resistente aisladas de pacientes se

cultivan en medio MGIT, para así obtener la concentración de los fármacos y en este caso de los extractos vegetales, que inhibe el crecimiento. El sistema BACTEC MGIT (Mycobacteria Growth Indicator Tube) 960, es un excelente método y altamente sensible para proveer resultados precisos en un período de 7 a 10 días. Consiste en un sistema automatizado no radiométrico y que usa un caldo modificado Middlebrook 7H9, el cual contiene un sensor fluorescente (penta hidrato clorido de rutenio) (Jyoti *et al.*, 2016).

PROCEDIMIENTO PARA IDENTIFICAR SENSIBILIDAD DE *Mycobacterium tuberculosis* A LOS EXTRACTOS VEGETALES

Sensibilidad para el extracto vegetal

1. Colocar en un transportador para dos tubos, tubos marcados como extracto (color verde).
2. Marcar al primer tubo de la izquierda el número de muestra y las iniciales “CC” (Control de crecimiento) y al tubo siguiente las iniciales de “EV”.
3. Agregar con Micropipeta 0,8 mL de suplemento BACTEC MGIT EV a cada tubo.
4. Transferir con una Micropipeta 0,1 mL de antibiótico (EV) al tubo marcado con dichas iniciales.

Nota: Tubo marcado como Control de Crecimiento no se agregó antibiótico

Preparación e inoculación para el tubo de control de crecimiento para EV

La preparación e inoculación del tubo de control de crecimiento, se realiza siguiendo los pasos enlistados a continuación:

1. Colocar en un tubo estéril 4 mL de Agua destilada estéril.

2. Transferir con una Micropipeta 0,1 mL de muestra (dilución 1:10).
3. Agitar en vórtex.
4. Agregar con Micropipeta 0,5 mL de dilución de 1:10 a tubo marcado como "CC".
5. Agregar con Micropipeta 0,5 mL de muestra directa al marcado como "EV".
6. Cerrar bien cada tubo y mezclar invirtiéndolos suavemente entre tres a cuatro veces.
7. Introducir el transportador con tubos al equipo MGIT 960 conforme a "Manual del Usuario del Instrumento BACTEC MGIT" o Instructivo de "Uso de MGIT*960" (PNT/VE/DP/18).

Nota: Al utilizar la función de introducción del conjunto de fármaco sensibilidad al instrumento es preciso asegurarse de que el orden de los tubos en el transportador coincida con las definiciones seleccionadas para el transportador.

Interpretación de la prueba

Para interpretar la prueba se realiza siguiendo los pasos enlistados a continuación:

1. Se realiza la detección inicial por la Interfase del equipo MGIT* 960 con Sistema Epicenter.
2. Sensible: El antibiótico presente indica que es funcional en el tratamiento, ya que inhibe el crecimiento de *M. tuberculosis*.
3. Resistente: El antibiótico presente indica que no es funcional en el tratamiento, ya que permite el crecimiento del *M. tuberculosis*.

Error (X): prueba invalidada.

Especificaciones de desempeño

Para determinar el desempeño, este método fluoro métrico permite la detección de micobacterias viables dentro de un período corto de tiempo entre 4–13 días.

La prueba permite detectar resistencia o sensibilidad a una cepa, comparado con un tubo de control de crecimiento al cual no se inocula con ningún antibiótico.

Interferencias

Puede existir interferencias en los resultados en los casos enlistados a continuación:

1. No exista la concentración adecuada para la inoculación en el tubo de control de crecimiento al realizar la dilución e invalide la prueba.
2. No se tenga conexión entre el instrumento MGIT 960 y el Sistema Epicenter para realizar lecturas de tubos.

Limitaciones del método

El método puede presentar limitaciones, las cuales deben considerarse y se enlistan a continuación:

1. El análisis de sensibilidad con el sistema no interpreta la sensibilidad de la cepa analizada, los resultados se informan con sensible (S) o resistente ® para el antibiótico y la concentración analizada.
2. El análisis de sensibilidad solo puede leerse por el sistema y no manualmente
3. Deben analizarse cepas puras de *Mtb*, ya que pueden producir resultados erróneos, no se recomienda el análisis directo de muestras clínicas.

4. Las preparaciones de inóculo a partir de medios sólidos deben compararse visualmente con un patrón de turbidez 0,5 de McFarland, en caso contrario pueden obtenerse resultados inexactos.
5. Si no se utilizan las cantidades descritas para cada punto del procedimiento pueden obtenerse resultados inexactos.
6. Si no hay una mezcla correcta de los tubos puede obtenerse resultados de falsa resistencia
7. Si no se carga correctamente el transportador en el equipo MGIT* 960 se originará una situación de identificación anónima.

Procedimiento para cultivo de *Mtb* en resazurina

La resazurina es un indicador redox de la permeabilidad celular, por lo cual nos permite evaluar el número de células vivas. La resazurina se disuelve en buffers fisiológicos (dando como resultado un color azul profundo o púrpura), las células vivas reducen la resazurina a resorufina y, por lo tanto, el color cambia a un rosa fluorescente. El resultado puede ser cuantificado en filtros de 530 nm de excitación/590 nm de emisión (Riss *et al.*, 2016).

Este procedimiento es barato y reproducible para realizar pruebas de citotoxicidad y en los últimos años se ha empleado y estandarizado en la evaluación de la actividad anti-mycobacteriana de los extractos vegetales (Webster *et al.*, 2010).

El procedimiento se realiza de acuerdo con lo descrito previamente (O'Neill *et al.*, 2014; Palomino & Portaels, 1999; Sarker, Nahar, & Kumarasamy, 2007).

Cultivo de *Mycobacterium tuberculosis* HR37a o muestra clínica

Para el estudio de la actividad microbiológica contra *Mtb*, se emplean cepas de origen clínico y la H37Rv (la más ampliamente empleada por su reproducibilidad y sensibilidad a fármacos) (Pauli GF, 2009).

Sometimos a tres tipos cepas de mycobacterias para probar el efecto antimicrobiano de los extractos de *Artemisia ludovicina*.

Para el cultivo de la cepa experimental HR37a se lleva a cabo la siguiente secuencia de pasos:

1. Se toma inóculo de *Mtb*, obtenido de medio sólido (Löwestein Jensen)
2. Se reconstituye en tubo con 5 ml de Middlebrok 7H9-S (0.1 % casitona, 0.5 % glicerol, ácido oleico, albúmina, dextrosa y catalasa) y se incuba durante 7 días a 37 °C.
3. Agitar en vortex por 2 minutos y dejar sedimentar durante 15 minutos.
4. El sobrenadante se transfiere a otro tubo para ajustar turbidez por nefelometría a Macfarland 1.
5. La suspensión resultante se diluye 1:5 en medio 7H9-S (a partir de aquí se toma él inóculo para la prueba), y se toman 10 a 20 µl para colocar en cada pocillo (5 x 10⁶ UFC/mL).

Preparación de las placas de 96 pocillos

1. Los extractos se llevan a una dilución v/v de DMSO al 10 % o bien agua estéril para quedar a una concentración de 10 mg/mL.

2. Se agregan 180 μL de 7H9-S en cada pocillo de placa de 96 pocillos (Falcon, Becton Dickson).
3. Se agregan 20 μL del inóculo en cada pocillo.
4. Se deja toda una columna sin antibiótico o extracto (control de crecimiento).
5. Se colocan diversos antibióticos (Rifampicina, Isoniacida, Etambutol, y Estreptomicina)
6. A la primera columna de extracto se colocan 100 μL lo que equivale a 1000 μg obtenidos de la concentración de 10 mg/mL.
7. Al resto de los pocillos se coloca concentraciones más diluidas en repeticiones de 3 pocillos por concentración (900 μg , 800 μg , 700 μg , 600 μg , 500 μg , 400 μg , 300 μg , 200 μg , 100 μg , 50 μg , 10 μg , 5 μg , 1 μg ; todas ellas en 100 μL).
8. Se cubre la placa con un film de poliéster estéril.
9. Se incuba por una semana a 37° C con CO 5 %.

Ensayo con resazurina

La realización del ensayo de resazurina se lleva a cabo siguiendo los pasos enlistados a continuación:

1. Se aplica 10 a 20 μL de resazurina por pocillo y se incuba nuevamente toda la noche.
2. Se observa el cambio o no de coloración a simple vista.
3. Se lee el crecimiento con lector de placa en RFU (unidades de fluorescencia relativa) con 530 nm de excitación y filtro de 590 nm.

4. El porcentaje de inhibición de crecimiento se calcula de la siguiente manera:

$$\% \text{ Inhibición de crecimiento} = 1 - \left(\frac{\text{Control positivo de fluorescencia}}{\text{Fluorescencia de control negativo}} \right) \times 100$$

11.6. Evaluación de citotoxicidad ex vivo del extracto activo

Evaluamos la CI_{50} de los diferentes extractos en el modelo THP-1 a través del ensayo MTT.

Para realizar la prueba de citotoxicidad ex vivo, se emplean monocitos de la línea celular THP-1. Las células se cultivan en RPMI 1640 (Sigma), suplementado con suero fetal bovino, 100 UI/mL de penicilina, 50 $\mu\text{g/mL}$ de estreptomycin y 2 mM de L-glutamina; con acetato de forbol miristado (20 ng/mL), las células THP-1 se diferencian a macrófagos y se siembran en placa de 96 pozos con una densidad final de 4×10^5 células/pozo. Las células se incuban a 37 °C toda una noche en medio húmedo suplementado con CO_2 al 5 %. Al próximo día, las células se rehabilitan con medio fresco y se incuban en un rango de 0,03 a 100 $\mu\text{g/mL}$ del extracto a estudiar. Se evalúa la viabilidad celular mediante colorimetría o mediante citometría de flujo; se determina la CI_{50} (concentración inhibitoria 50) a través del cálculo del porcentaje de células dañadas. Como control positivo se usa SDS (dodecil sulfato sódico) todos los experimentos se realizan por triplicado (Juárez, Z., 2015).

11.7. Evaluación de la actividad inmjunomoduladora de los extractos en el modelo THP-1

Sometimos cultivos celulares de THP-1 para determinar en sobrenadante la concentración de $\text{TNF-}\alpha$, con el estímulo de los siguientes extractos a 5, 10, y 20 $\mu\text{g/mL}$

acetato de etilo y etanólico de *Artemisia ludoviciana*, acetato de etilo y etanolico de *Helianthus annuus*, etanólico, metanólico y acetato de etilo de *Lycopodium clavatum*.

Sometimos cultivos celulares de THP-1 para determinar en sobrenadante la concentración de IL-6, con el estímulo de los siguientes extractos a 5, 10, y 20 µg/mL acetato de etilo y etanólico de *Artemisia ludoviciana*, acetato de etilo y etanolico de *Helianthus annuus*, etanólico, metanólico y acetato de etilo de *Lycopodium clavatum*.

Sometimos cultivos celulares de THP-1 para determinar en sobrenadante la concentración de IL-10, con el estímulo de los siguientes extractos a 5, 10, y 20 µg/mL acetato de etilo y etanólico de *Artemisia ludoviciana*, acetato de etilo y etanolico de *Helianthus annuus*, etanólico, metanólico y acetato de etilo de *Lycopodium clavatum*.

11.8. Evaluación de la actividad biológica del extracto *in vivo*.

Quistes de *Artemia* spp., son remojados y eclosionados en sal de mar artificial preparada con sal comercial (MARCA) (30 gr de sal de mar/litro de agua destilada). Los huevecillos se incuban a 25 °C por un período de 24 horas; utilizando una pipeta Pasteur se toman 10 nauplios y se colocan en tubos de ensayo de 10 mL (Juárez, Z., 2015).

Los nauplios de 24 horas de nacidos se someten a diferentes concentraciones con cada uno de los extractos (10, 25, 50, 75, 100, 200 y 500 µg/mL) y se incuban por 24 horas; la toxicidad se estima calculando la CL₅₀ (concentración letal 50), al cuantificar el número de nauplios muertos (falta de movimiento tras 10 segundos de observación), todos los experimentos se realizarán por triplicado y la CL₅₀ se calcula aplicando análisis de regresión Probit con IC_{95%} a través de XLSTAT (versión 2014).

12. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

12.1 Identificación de las plantas objeto de estudio

Con respecto a *Artemisia ludoviciana*, la identificación la realizó la Bióloga Estela Hernández en el jardín etnobotánico Francisco Peláez R. de San Andrés Cholula, Puebla., México y el Boucher se encuentra registrado en el folio 725.

Fecha de colecta: agosto/22/2017

Lugar de colecta: Puebla Pue.

Familia: Asteraceae = Compositae

Nombre Científico: *Artemisia ludoviciana*

Nombre Común: Estafiate

Descripción Botánica: planta aromática, herbácea perenne de hasta 1,5 metros de altura, con hojas alternas lanceoladas color verde blanco verdoso y el envés presenta pubescencia y son de color blanquecino, flores en cabezuelas en su madurez presentan un color paja.

Con respecto a *Helianthus annuus*, la identificación la realizó por el Biólogo Allen Coombes en el herbario de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla y el Boucher se encuentra registrado en el folio HUAP0077119.

Fecha de colecta: septiembre/21/2018

Lugar de colecta: Atlixco, Pue.

Familia: Asteraceae = Compositae

Nombre científico: *Helianthus annuus* var. roja “Autumn beauty” (belleza de otoño).

Sinonimia: *Sargassum fluitans* (Børgesen) Børgesen (también tiene una Bryozoa).

Nombre común: Girasol rojo (belleza de otoño).

Descripción botánica: plantra ornamental que crece hasta 2,5 metros de altura, con flores en tono rojizo y cabezuelas grandes, hojas alargadas, triangulares y ásperas.

Con respecto a *Lycopodium clavatum*, se emplearon las esporas comerciales de la misma y fueron identificadas por el Biólogo Miguel Ángel Gutiérrez.

12.2 Rendimiento de extractos

Rendimiento de Artemisia ludoviciana, Helianthus annuus y Lycopodium clavatum

En el caso de *Artemisia ludoviciana*, se obtuvieron los siguientes rendimientos: para el solvente hexánico se obtuvo un rendimiento de 3 g (1,2 %), para el solvente acetato de etilo se obtuvo un rendimiento de 8 g (3,2 %), para el solvente metanólico se obtuvo 8,3 g (3,3 %) y para el solvente etanólico un rendimiento de 15,5 g (6,2 %); es decir que en la medida que incrementa la polaridad del solvente, se obtiene más rendimiento del extracto (Tabla 1).

Los rendimientos para *Helianthus annuus* "Autumn Beauty" fueron: para el extracto hexánico de 1,4 %, para el extracto de acetato de etilo de 1,4 %, para el extracto metanólico de 7,2 % y para el extracto etanólico de 7,0 %.

Los rendimientos para las esporas de *Lycopodium clavatum* fueron: para el extracto hexánico de 0,01 %, para el extracto de acetato de etilo de 6,1 %, para el extracto metanólico de 9,4 % y para el extracto etanólico, del 10.4 %.

Artemisia pertenece a una diversidad de géneros de la familia Asteraceae, la cual muestra propiedades potenciales contra cáncer, diabetes y enfermedades infecciosas; los rendimientos de sus extractos son diferentes de otras plantas de su misma familia. En relación, a los extractos hexánico, acetato de etilo y metanólico; estos se obtuvieron a través de secuenciación polar, en comparación con el extracto etanólico el cual se obtuvo de manera directa. Es probable que esta sea una razón por la cual exista diferencia en los rendimientos, comparados con otros autores. En el caso de *Artemisia annua* reportan rendimientos apenas similares con un 3,3 % de rendimiento para el extracto hexánico y un 2,7 % para el extracto etanólico (S. Liu *et al.*, 2017). Destaca *Artemisia pallens* con rendimientos tan altos como 17,2 % para el extracto hexánico y de 51,1 % para el extracto etanólico (A. P. Kumar & Kumud, 2010), pero otras plantas de la misma familia reportan rendimientos no tan altos como es el caso de *Crassephalum vitellinum* con rendimiento de 10,6 % para el extracto etanólico (Moshi, Nondo, Haule, Mahunnah, & Kidukuli, 2014), *Vernonia cinerea* con rendimiento del 9 % para el extracto metanólico (Latha, Darah, Jain, & Sasidharan, 2010), o bien *Calendula officinalis* con 1,5 % de rendimiento para el extracto etanólico (Martin & Deo, 2000). Estos resultados muestran que existe variabilidad en los rendimientos entre plantas de la misma especie. Además, el porcentaje de rendimiento puede estar influenciado por la parte de la planta empleada y principalmente por la naturaleza polar del solvente, generalmente los rendimientos más importantes se obtienen a partir de la naturaleza prótica polar como lo es el etanol (Sharma & Cannoo, 2017).

Tabla 4. Rendimiento de extractos de *Artemisia ludoviciana* para diferentes solventes, comparado con plantas de su misma especie y familia.

Planta	Hexano (%)	Acetato de etilo (%)	Metanol (%)	Etanol (%)	Referencia
<i>Artemisia ludoviciana</i>	1,2	3,2	3,3	6,2	*
<i>Crassephallum vitellinum</i>				10,6	(Moshi <i>et al.</i> , 2014)
<i>Vernonia cinerea</i>			9		(Latha <i>et al.</i> , 2010)
<i>Artemisia annua</i>	0.8 a 3,3			2,7	(S. Liu <i>et al.</i> , 2017)
<i>Artemisia pallens</i>	17,2			51,1	(A. P. Kumar & Kumud, 2010)
<i>Calendula officinalis</i>				1,5	(Martin & Deo, 2000)

* Se realizó doble maceración de 250 g de las partes aéreas de *Artemisia ludoviciana*. A excepción del etanol (el cual se aplicó directamente), los demás solventes se aplicaron de manera progresiva de menor a mayor polaridad (hexano, metanol, y acetato de etilo).

12.3 Identificación de metabolitos secundarios

12.3.1 Pruebas fitoquímicas preliminares

Los metabolitos secundarios obtenidos a partir de las pruebas fitoquímicas preliminares en el extracto etanólico de las tres especies estudiadas se muestran en la siguiente tabla (Tabla 5):

Para las partes aéreas de *Artemisia ludoviciana* predominó el contenido de alcaloides, triterpenos, taninos hidrolizables, flavonoides, glucósidos cardiotónicos y lactonas sesquiterpénicas. Estos hallazgos son consistentes con lo evidenciado en el análisis fitoquímico preliminar del extracto etanólico de las partes aéreas de *Artemisia*

absinthium, con presencia de esteroides, triterpenos, alcaloides, lactonas terpénicas y flavonoides (MURILLO & DE LOS REYES, 2003).

Dentro de los terpenos reportados se encuentran terpineno, linalol, timol y carvacol en diferentes concentraciones (Bañuelos-Valenzuela, Delgadillo-Ruiz, Echavarría-Cháirez, Delgadillo-Ruiz, & Meza-López, 2018; Sainz Sotomayor, 2017). Algunos de estos metabolitos se les asocia con actividad antimicrobiana, para el tratamiento de enfermedades inflamatorias del tracto respiratorio, actividad antiparasitaria, actividad contra cáncer y efectos sobre la membrana celular, principalmente con cantidades abundantes de lactonas sesquiterpénicas y flavonoides (Bucay & Haiat, 2005; Hoffman & Herrmann, 1982; Huerta Melgarejo, 2016).

Para las partes aéreas de *Helianthus annuus* "Autum Beauty" predominó el contenido de alcaloides, taninos condensados, flavonoides y glucósidos cardiotónicos. Otros autores evidencian la presencia de flavonoides en las partes aéreas de esta planta tales como tambulina, kukulcanina B, heliannona A, B, y C (Kamal, 2011; Macías, Molinillo, Torres, Varela, & Castellano, 1997). Estos metabolitos secundarios se han asociado con actividad antioxidante y con elementos nutritivos suplementarios (Kostić *et al.*, 2019). En contraste, otros autores reportan la presencia de diterpenos de tipo kaurano, ácido kaurenoico, traquiobánico y de ácido grandiflorólico (Pyrek, 1970; Viciado, 2007).

Para las esporas de *Lycopodium clavatum* predominó el contenido de alcaloides, taninos condensados, flavonoides, glucósidos cardiotónicos y lactonas sesquiterpénicas. Nuestros resultados también son reportados por otros autores porque al parecer los alcaloides son metabolitos secundarios característicos de varios miembros de los Lycopidales (Tamayo-Castillo *et al.*, 2001). También existen reportes de la presencia de

abundantes flavonoides, incluso, con propiedades hepatoprotectoras (Hanaa, Elshafie, Ismail, Mahmoud, & Ibrahim; Rusu, Tamas, Puica, Roman, & Sabadas, 2005).

Tabla 5. Componentes fitoquímicos del extracto etanólico de las tres especies

Metabolito secundario	<i>Artemisia ludoviciana</i>	<i>Helianthus annuus</i> "Autumn Beauty"	<i>Lycopodium clavatum</i>
Alcaloides	+++	++	++
Saponinas	-	+	-
Triterpenos	+	+	
Taninos hidrolizables o gálicos	++	-	++
Taninos condensados (derivados de catecol)	+	++	+++
Flavonoides	++	++	++
Glucósidos cianógenos	-	-	-
Glucósidos cardiotónicos y lactonas sesquiterpénicas	++	+++	+++

+++ = abundante, ++ = moderado, y + = escaso

12.3.2 Detección de metabolitos a través de cromatografía de gases acomplada a espectrometría de masas

Los compuestos mayoritarios detectados en ambos extractos fueron Achillin con abundancia en el 55.9 % en el extracto etanólico y del 89.8 % en el extracto de acetato de etilo. Otros compuestos relevantes son tujona, fitol, y esigmasterol en el extracto etanólico. Así como tujona y estigmasterol en el extracto de acetato de etilo. En las tablas 6 y 7, se resumen los resultados mencionados.

Tabla 6. Compuestos mayoritarios en el extracto etanólico de *Artemisia ludoviciana*

Compuesto Químico	Tiempo de retención (min)	Abundancia (%)
Tujona	3.419	2.52
(+) -2- Bornanona	4.016	7.29
Alcanfor de borneo	4.419	5.88
Óxido de cariofileno	21.536	2.20
(+) Valeranona	25.292	1.27
Palmitato de etilo	38.802	2.79

Fitol	44.701	3.14
9,12,15- octadecatrienoato de etilo	46.957	2.90
Achillin	48.513	55.92
Estigmasterol	73.536	2.13
g-Sitosterol	74.734	6.01
b-amirina	74.806	1.81
a-mirina	75.635	3.82
Éster metílico del ácido 3- oxo-urs-12-en-24-oico	77.769	2.32

Tabla 7. Compuestos mayoritarios detectados en el extracto de acetato de etilo de *Artemisia ludoviciana*

Compuesto Químico	Tiempo de retención (min)	Abundancia (%)
Tujona	3.43	1.19
(+) -2- Bornanona	4.025	2.46
Alcanfor de borneo	4.431	2.02

3,7-dimetil-1,7-octadieno-3,6-diol	7.122	1.09
Óxido de cariofileno	21.498	0.62
(+) Valeranona	25.293	0.73
Achillin	49.33	89.76
Tereftalato de di (2-etilhexilo)	63.615	1.015
Estigmasterol	73.503	0.34
g-Sitosterol	74.658	0.74

Con relación a la actividad contra *Mtb*, se ha informado que algunos de los compuestos identificados en el análisis GC-MS inhiben su crecimiento. Por ejemplo, la tujona se considera el componente principal del extracto etanólico de *A. absintium* (90 % de rendimiento) (Hussain *et. al.*, 2017); el 20 %, 40 %, 70 % y 96 % del extracto etanólico de *A. absintium* mostró un porcentaje de crecimiento inhibitorio del 32 % al 100 %, cuando se ensayó frente a la cepa de referencia HR37v y las cepas clínicas MDR (Hojageldiyev, Bolmammedov, & Gurbanaliyev, 2019).

Además, otros compuestos como el óxido de cariofileno mostraron actividades inhibitorias de 200 $\mu\text{g/mL}$ contra cepas clínicas susceptibles y MDR de *M. tuberculosis* (Esquivel-Ferriño *et al.*, 2014), mientras que el fitol mostró actividades similares en un rango de 2-128 $\mu\text{g/ml}$ cuando se analizó frente a la cepa de laboratorio de referencia (Rajab, Cantrell, Franzblau y Fischer, 1998; Saikia *et al.*, 2010). Finalmente, el sitosterol mostró concentraciones inhibitorias en concentraciones que oscilaron entre 7,8 y 15 $\mu\text{g/mL}$ cuando se analizó frente a la cepa de referencia H37Ra (Fomogne-Fodjo *et al.*, 2017).

12.4. Encapsulación del extracto en alginato y medición de velocidad de liberación del extracto

Para el extracto etanólico de *Artemisia ludoviciana*, la liberación fue similar en ambos medios, con discretos picos de liberación a los 90 minutos y a los 120 minutos en el medio de HCl 0.1 Mol/L, tal y como se observa en la siguiente figura (Figura 3).

Velocidad de liberación del extracto Etanólico de *Artemisia ludoviciana* Nutt. encapsulado en alginato de calcio

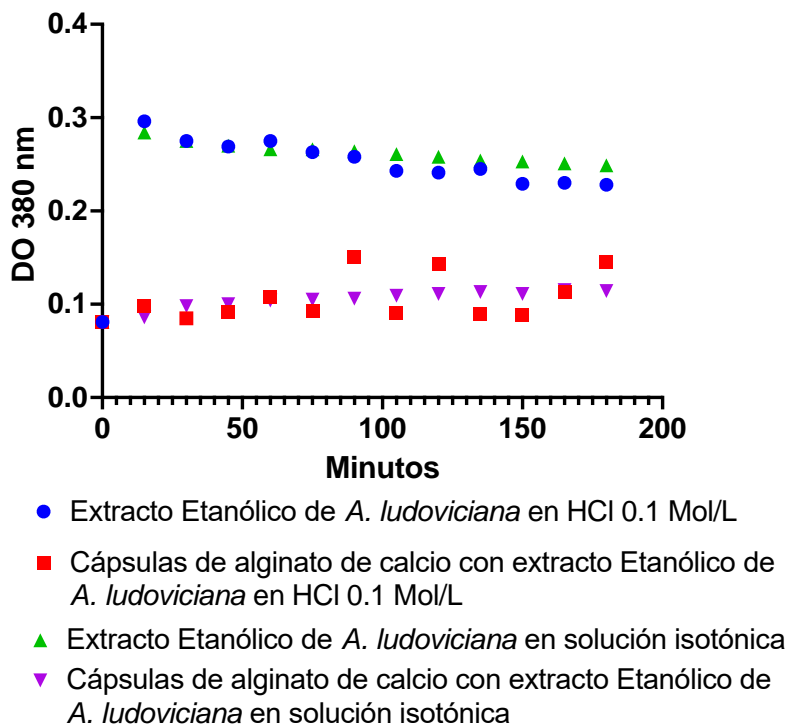


Figura 3. Velocidad de liberación del extracto etanólico de *Artemisia ludoviciana* encapsulado en alginato. Comparación de la liberación entre solución salina isotónica y HCl 0.1 Mol/L cada 15 minutos durante 180 minutos.

El extracto etanólico de *Artemisia ludoviciana* presentó a la semana, menor liberación en el medio de HCl 0.1 Mol/L; sin embargo, a las dos semanas presentó un repunte en su liberación, como se puede observar en la figura 4.

Velocidad de liberación del extracto Etanólico de *Artemisia ludoviciana* Nutt. encapsulado en alginato de calcio

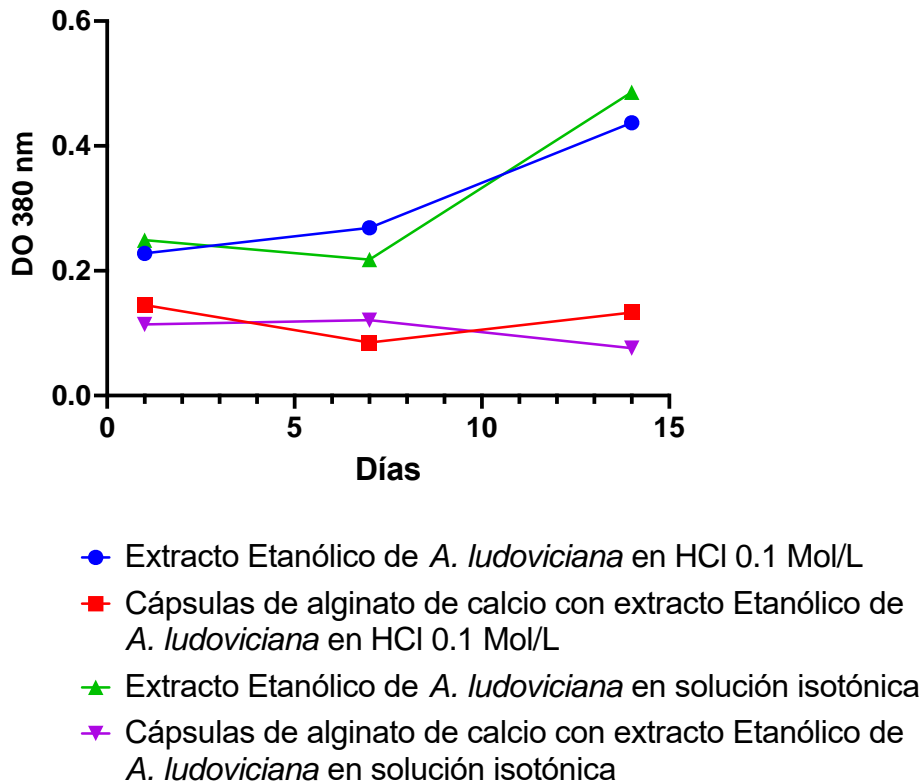


Figura 4. Velocidad de liberación del extracto etanólico de *Artemisia ludoviciana* encapsulado en alginato. Comparación de la liberación entre solución salina isotónica y HCl 0.1 Mol/L a los 7 y 14 días.

Para el extracto de acetato de etilo de *Artemisia ludoviciana*, la liberación fue similar en ambos medios, con discretos picos de liberación a los 45 minutos en el medio de HCl 0.1 Mol/L, tal y como se observa en la figura 5.

Velocidad de liberación del extracto de Acetato de etilo de *Artemisia ludoviciana* Nutt. en cápsulas de alginato de calcio

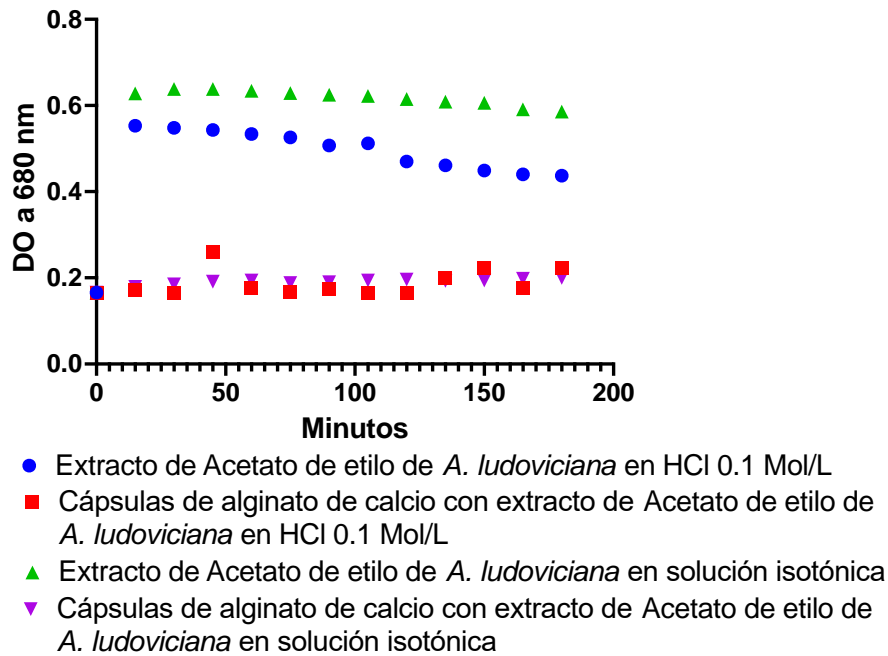
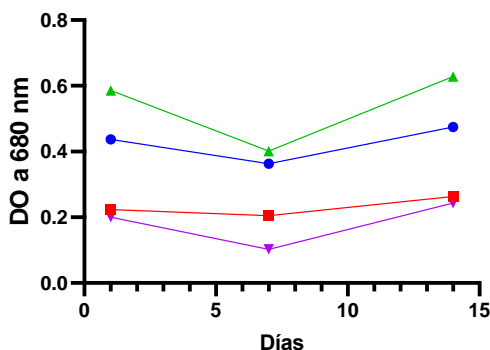


Figura 5. Velocidad de liberación del extracto acetato de etilo de *Artemisia ludoviciana* encapsulado en alginato. Comparación de la liberación entre solución salina isotónica y HCl 0.1 Mol/L, cada 15 minutos durante 180 minutos.

El extracto acetato de etilo de *Artemisia ludoviciana* a la semana presentó mayor liberación en el medio de HCl 0.1 Mol/L; sin embargo, a las dos semanas presentó una liberación similar en ambos medios, como se puede observar en la siguiente figura (Figura 6).

Velocidad de liberación del extracto de Acetato de etilo de *Artemisia ludoviciana* Nutt. en cápsulas de alginato de calcio



- Extracto de acetato de Etilo de *A. ludoviciana* en HCl 0.1 Mol/L
- Cápsulas de alginato de calcio con extracto de acetato de etilo de *A. ludoviciana* en HCl 0.1 Mol/L
- ▲ Extracto de acetato de etilo de *A. ludoviciana* en solución isotónica
- ▼ Cápsulas de alginato de calcio con extracto de acetato de etilo de *A. ludoviciana* en solución isotónica

Figura 6. Velocidad de liberación del extracto acetato de etilo de *Artemisia ludoviciana* encapsulado en alginato. Comparación de la liberación entre solución salina isotónica y HCl 0.1 Mol/L a los 7 y 14 días.

Diversos metabolitos secundarios (vitaminas, antioxidantes, aceites esenciales, etc.) pueden ser encapsulados en alginato de calcio, con la finalidad de mantener su actividad por aislamiento, hasta que se encuentren en el entorno adecuado para su liberación (Borgogna, *et al*, 2010). Dichos compuestos al combinarse con el alginato, producen una gelación iónica por el entrecruzamiento de distintas cadenas de alginato con cationes multivalentes (Ca^{++} , An^{++} , Fe^{++} , Co^{++} , Ba^{++} , Al^{+++}). Las cápsulas de alginato de calcio son las más empleadas por su adecuada emulsificación que persiste incluso en

condiciones estériles; además puede disminuir problemas de aglomeración y de volatilidad de líquidos, por lo cual mejora la dosificación del metabolitos secundario, su costo-efectividad, la eficacia del contenido del compuesto activo y la modulación en la liberación de su contenido (López *et al.*, 2011).

La velocidad de liberación controlada depende de la composición de la matriz polimérica y del medio circundante, por lo que el agente activo puede ser liberado al medio de acuerdo con la difusión, biodegradación y presión osmótica a la que se sometan las cápsulas de alginato (Barba *et al.*, 2009).

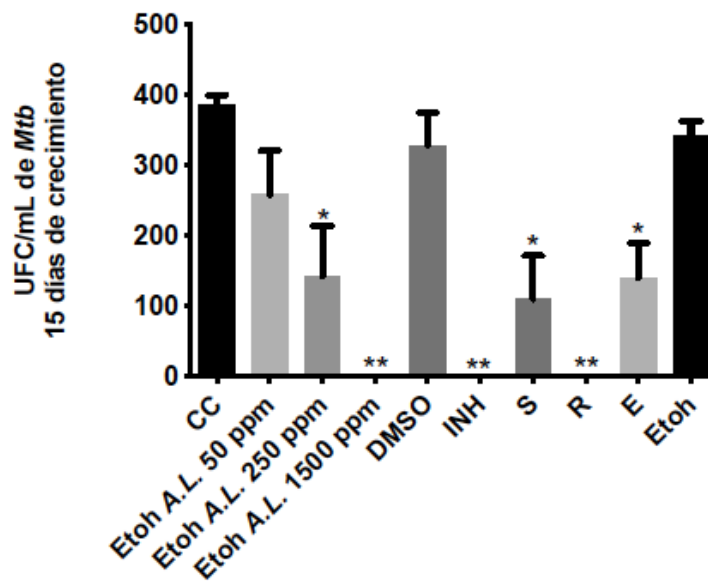
El alginato es un hidrocoloide biocompatible con muchos metabolitos secundarios de plantas, no tóxico y degradable (Funami *et al.*, 2009). Se ha estudiado la liberación de extractos de plantas a partir de cápsulas de alginato, en medios gastrointestinales simulados; en el caso del extracto acuoso de yerba mate, al igual que en nuestro estudio, es liberado a partir de los 15 minutos y después presenta una liberación sostenida hasta por 180 minutos (López *et al.*, 2012).

Otro caso son las cápsulas de alginato con aceite esencial de tomillo, el cual presenta una liberación que inicia a los 15 minutos y se mantiene de manera sostenida hasta por 48 horas, con un total de liberación de 6 % de su contenido (Muchiutti, *et al.*, 2019). Al parecer, la encapsulación en alginato de biocompuestos, genera una liberación lenta y sostenida de los mismos, la cual será inversamente proporcional a la hinchazón que sufren las cápsulas; es decir de la hidratación de los grupos hidrófilos de alginato (Hoffman *et al.*, 2012).

12.5. Resultados de actividad antimicrobiana contra *Mtb* en medio líquido "MIGIT"

Los resultados de sensibilidad de *Mtb* para el extracto etanólico de *Artemisia ludoviciana* mostraron actividad anti *Mtb* a partir de los 250 $\mu\text{g/mL}$, con una máxima actividad a los 1500 $\mu\text{g/mL}$ (Gráfico 1).

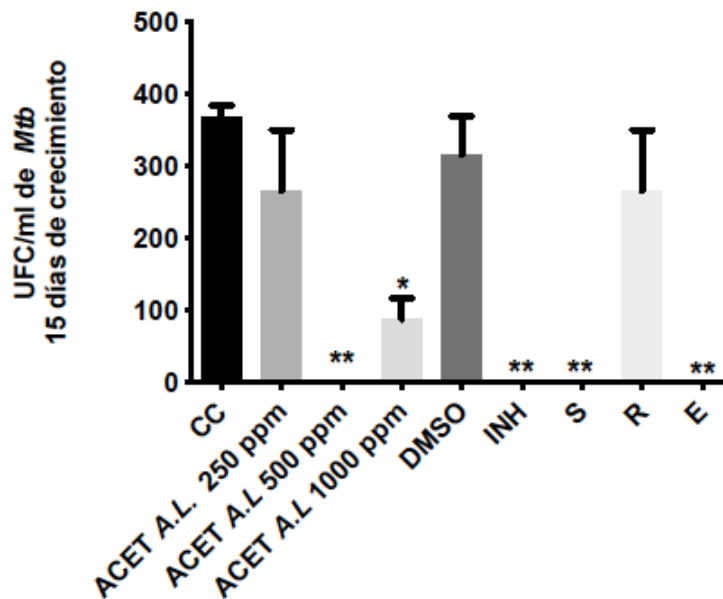
Gráfico 1. Actividad antimicrobiana contra cepa clínica de *Mtb* del extracto etanólico de *A. ludoviciana* en medio líquido MGIT



MGIT= Mycobacteria Growth Indicator Tube
EtOH A.L.= Extracto etanólico de *Artemisia ludoviciana*
Mtb= *Mycobacterium tuberculosis*
DMSO= Dimetilsulfoxido
INH= Isoniacida
S= Estreptomina
R= Rifampicina
E= Etambutol
EtOH= Etanol
ppm= partes por millón
****** $p < 0.05$

Para el extracto acetato de etilo de *Artemisia ludoviciana*, la actividad anti *Mtb* se presentó a partir de los 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Gráfico 2).

Gráfico 2. Actividad antimicrobiana contra cepa clínica de *Mtb* del extracto de acetato de etilo de *Artemisia ludoviciana* en medio líquido MGIT



MGIT= Mycobacteria Growth Indicator Tube

ACET A.L.= Extracto acetato de etilo de *Artemisia ludoviciana*

Mtb= *Mycobacterium tuberculosis*

DMSO= Dimetilsulfoxido

INH= Isoniacida

S= Estreptomina

R= Rifampicina

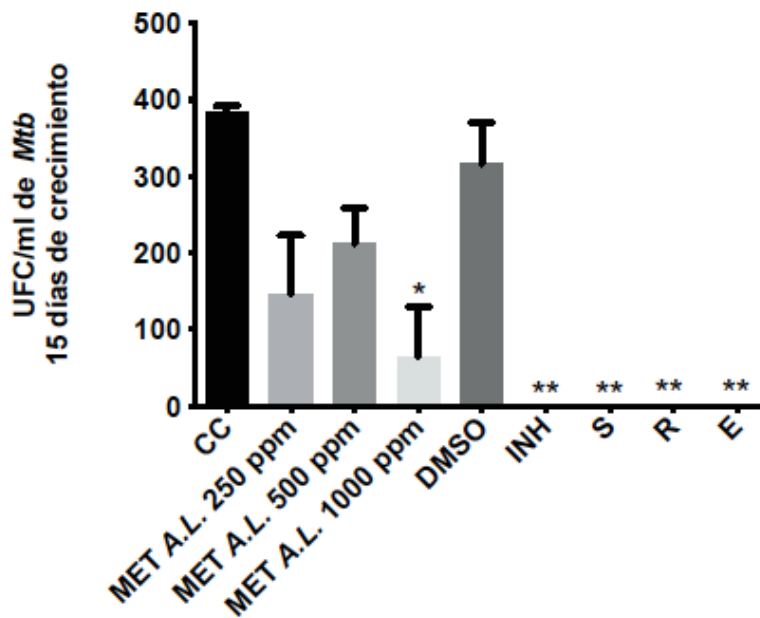
E= Etambutol

ppm= partes por millón

****** $p < 0.05$

Para el extracto metanólico de *Artemisia ludoviciana*, la actividad anti *Mtb* fue escasa a los 1000 $\mu\text{g/mL}$ (Gráfico 3).

Gráfico 3. Actividad antimicrobiana contra cepa clínica de *Mtb* del extracto metanólico de *Artemisia ludoviciana* en medio líquido MGIT



MGIT= Mycobacteria Growth Indicator Tube

MET A.L.= Extracto metanólico de *Artemisia ludoviciana*

Mtb= *Mycobacterium tuberculosis*

DMSO= Dimetilsulfoxido

INH= Isoniacida

S= Estreptomicina

R= Rifampicina

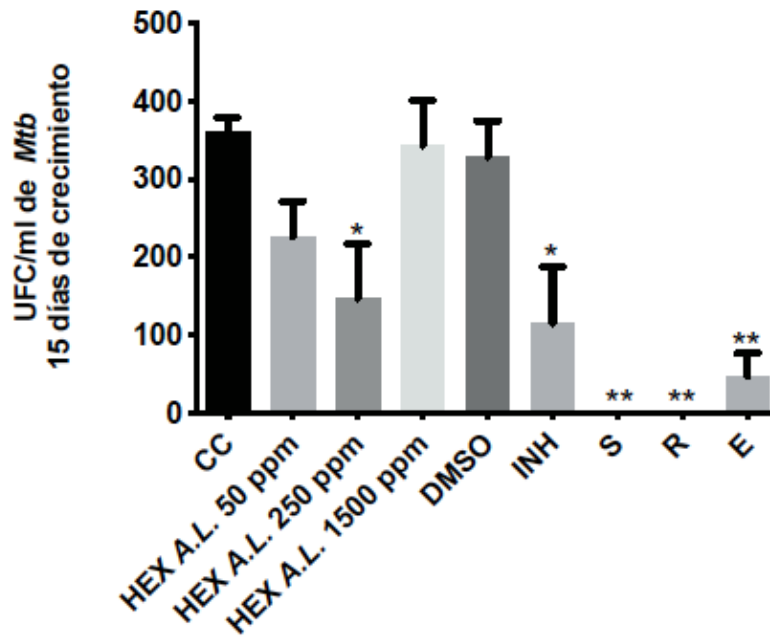
E= Etambutol

ppm= partes por millón

****** $p < 0.05$

Para el extracto acetato de etilo de *Artemisia ludoviciana*, la actividad anti *Mtb* fue escasa a los 1000 µg/mL (Gráfico 4).

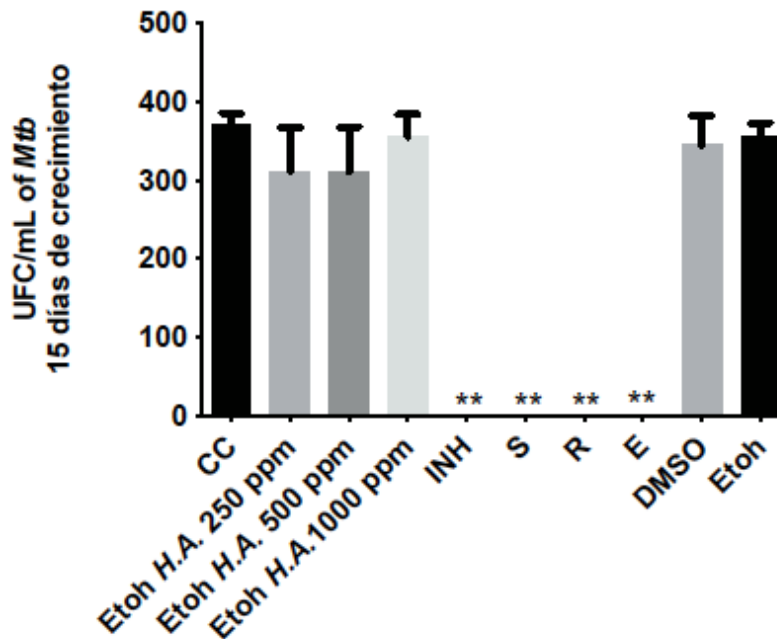
Gráfico 4. Actividad antimicrobiana contra cepa clínica de *Mtb* del extracto hexánico de *Artemisia ludoviciana* en medio líquido MGIT



MGIT= Mycobacteria Growth Indicator Tube
HEX A.L.= Extracto hexánico de *Artemisia ludoviciana*
Mtb= *Mycobacterium tuberculosis*
DMSO= Dimetilsulfoxido
INH= Isoniacida
S= Estreptomina
R= Rifampicina
E= Etambutol
ppm= partes por millón
****** $p < 0.05$

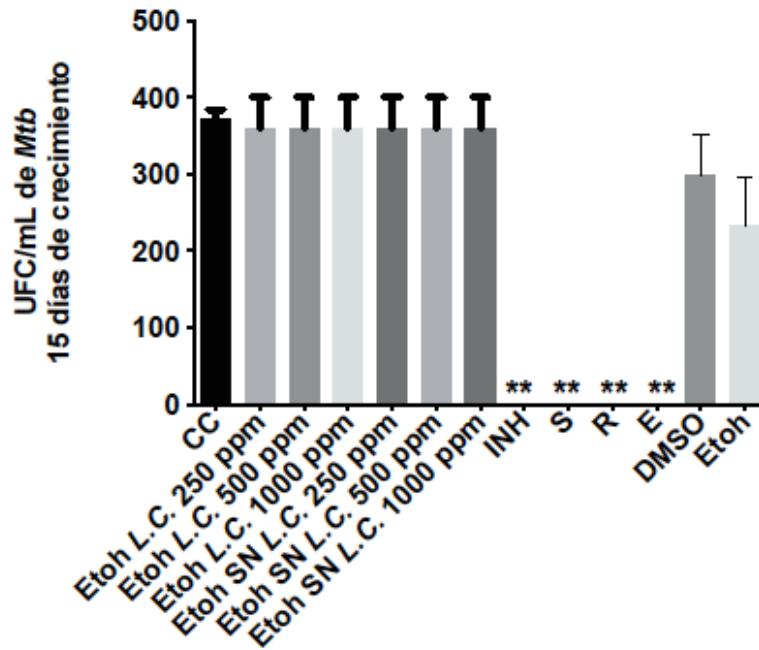
Los extractos etanólicos de *Helianthus annuus* y de *Lycopodium clavatum* no mostraron actividad contra *Mtb* (Gráficos 5 y 6).

Gráfico 5. Actividad antimicrobiana contra cepa clínica de *Mtb* del extracto etanólico de *Helianthus annuus* en medio líquido MGIT



MGIT= Mycobacteria Growth Indicator Tube
Etoh H.A.= Extracto etanólico de *Helianthus annuus*
Mtb= *Mycobacterium tuberculosis*
DMSO= Dimetilsulfoxido
INH= Isoniacida
S= Estreptomina
R= Rifampicina
E= Etambutol
Etoh= Etanol
ppm= partes por millón
****** $p < 0.05$

Gráfico 6. Actividad antimicrobiana contra cepa clínica de *Mtb* del extracto etanólico de *Lycopodium clavatum* en medio líquido MGIT



MGIT= Mycobacteria Growth Indicator Tube

EtOH L.C.= Extracto etanólico de *Lycopodium clavatum*

EtOH SN L.C.= Extracto etanólico de sobrenadante de *Lycopodium clavatum*

Mtb= *Mycobacterium tuberculosis*

DMSO= Dimetilsulfoxido

INH= Isoniacida

S= Estreptomicina

R= Rifampicina

E= Etambutol

EtOH= Etanol

ppm= partes por millón

** $p < 0.05$

12.5.2. Resultados de actividad antimicrobiana contra *Mtb* en modelo de resazurina

Para la cepa experimental HR37Ra, la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los diferentes extractos fue: extracto hexánico 600 µg/mL, extracto metanólico 800 µg/mL, extracto acetato de etilo 400 µg/mL, y extracto etanólico de 700 µg/mL.

Para cepa clínica sensible de *Mtb*, la CMI de los diferentes extractos fue: extracto de acetato de etilo 500 a 700 µg/mL y extracto etanólico de 700 µg/mL.

Para cepa clínica multidrogorresistente de *Mtb*, la CMI de los diferentes extractos fue: extracto de acetato de etilo de 500 a 700 µg/mL y extracto etanólico 800 µg/mL. (Tabla 8).

Tabla 8. CMI µg/mL de diferentes extractos de *Artemisia ludoviciana* en diferentes cepas de *Mtb* (modelo de resazurina)

Extractos de <i>Artemisia ludoviciana</i>	H37Ra CMI µg/mL	Cepa clínica <i>Mtb</i> sensible CMI µg/mL	Cepa clínica <i>Mtb</i> MDR CMI µg/mL
Hexánico	600	SR	SR
Metanólico	800	SR	SR
Acetato de etilo	400	500 a 700	500 a 700
Etanólico	700	700	800

Otros autores coinciden con nuestros resultados, ya que diversas plantas se han investigado *in vitro* para inhibir el crecimiento de *Mtb* tanto sensible como MDR (multidrogorresistente); entre ellas se encuentran:

El ácido ursólico e hidroquinona de *Artemisia capillaris* Thumb (Asteraceae) (CMI de 0,0125 a 0,025 mg/mL) (Jyoti *et al.*, 2016). El extracto etanólico de *Artemisia pallens* presenta CMI a 230 µg/mL contra *Mtb*, *M. smegmatis* y *M. avium* (Kerry *et al.*, 2018). Licarin

y eupomatenoide de *Aristolochia tariscana* Hook (Aristolochiaceae) (CMI de 0,0125 a 0,050 mg/mL) (León-Díaz R, 2010). Aristolactam de *Aristolochia brevipes* Benth. (Aristolochiaceae) (CMI de 0,0125 a 0,025 mg/ mL) (Navarro-Garcia, Luna-Herrera, Rojas-Bribiesca, Alvarez-Fitz, & Rios, 2011). Azorellanol de *Azorella compacta* Phil (Apiaceae) (CMI de 0,0125 mg/ mL) (Molina-Salinas et al., 2010). Compuestos curcuminoides de *Curcuma longa* L. (Zingiberaceae) (CMI de 0,0019 a 0,00312 mg/ mL) (Changtam, Hongmanee, & Suksamrarn, 2010). Diospirina de *Euclea natalensis* A.DC. (Ebenaceae) (CMI de 0,1 mg/mL) (Esquivel-Ferrino et al., 2012). Vasicina y zylamina de *Justicia adhatoda* L. (Acanthaceae) (CMI de 0,2 mg/mL) (Sun et al., 2010). P-metoxicinnamato de *Kaempferia galangal* L (Zingiberaceae) (CMI de 0,242 a 0,485mM) (Lakshmanan et al., 2011). Ácido oleanólico de *Lantana hispidia* Kunth (Verbenaceae), (CMI de 0,025 a 0,050 mg/mL) (Jimenez-Arellanes, Meckes, Torres, & Luna-Herrera, 2007). Ácido dihidroguaiaretico y 4-epi-larreatricina de *Larrea tridentata* Coville (Zypophyllaceae) (CMI de 0,0125 a 0,0050 mg/mL) (Favela-Hernandez et al., 2012). Abietana de *Plectranthus grandidentatus* Gurke (Lamiaceae) (CMI de 0,0031 a 0,0039 mg/mL) (Rijo et al., 2010). Plumericina de *Plumeria bicolor* Ruiz and Pav. (Apocynaceae), (CMI de 0,0015 a 0,002mg/mL) (P. Kumar et al., 2013). Tiliacorinina de *Tabernaemontana elegans* Stapf. (Apocynaceae), (CMI de 0,0031 mg/mL) (Sureram et al., 2012). Plumbagina de *Diospyros anisandra* S.F. Blake (Ebenacea) (CMI de 0,0015 mg/mL) (Uc-Cachon et al., 2014). El ácido ursólico de *Moringa stenopelata* presenta CMI de 125 µg/mL contra *Mtb* (A. Mehta, G. Srivastva, S. Kachhwaha, M. Sharma, & S. Kothari, 2013). En la tabla 6 se consideran extractos y compuestos identificados con actividad contra diversas especies de micobacterias (Tabla 9).

Tabla 9. Diversos extractos con actividad antimicrobiana contra varias especies de Micobacterias

Planta	Extracto o compuesto	CMI μ g/mL	Mycobacterias	Referencia
<i>Marchantia polymorpha</i>	Extracto crudo	100,0	<i>M. smegmatis</i> y <i>M. tuberculosis</i>	(Frame <i>et al.</i> , 2016)
<i>Mammea americana</i>	Extracto crudo	50,0	<i>M. smegmatis</i> y <i>M. tuberculosis</i>	(Frame <i>et al.</i> , 2016)
<i>Achyrocline alata</i>	Aceite esencial	62,5	<i>M. tuberculosis H37Rv</i>	(Bueno-Sánchez, Martínez-Morales, Stashenko, & Ribón, 2009)
<i>Swinglea glutinosa</i>	Aceite esencial	100,0	<i>M. tuberculosis H37Rv</i>	(Bueno-Sánchez <i>et al.</i> , 2009)
<i>Vernonia adoensis</i> y <i>Mangifera indica</i>	Extracto etanólico	500,0	<i>M. aurum</i>	(Chimponda & Mukanganya ma, 2010)
<i>Parinari curatellifolia</i>	Extracto etanólico	125,0	<i>M. aurum</i>	(Chimponda & Mukanganya ma, 2010)
<i>Pterodon emarginatus</i>	Aceite esencial	625-2500	<i>M. bovis</i>	(Carvalho, <i>et al.</i> , 2013)
<i>Moringa stenopelata</i>	Chlorflavonina	50,0	<i>M. tuberculosis H37Rv</i>	(Rehberg <i>et al.</i> , 2018)
<i>Citrullus colocynthis</i>	Ácido ursólico	125,0	<i>M. tuberculosis</i>	(Mehta <i>et al.</i> 2013)
<i>Lantana hispidia Kunt</i>	Sesquiterpenos	62,0	<i>M. tuberculosis</i>	(Jimenez, Meckes, Alvarez, Torres, & Parra, 2005)
<i>Artemisia capillaris</i>	Ácido ursólico e hidroquinona	125-500	<i>M. tuberculosis MDR</i>	(Leon-Diaz <i>et al.</i> , 2010)
<i>Artemisia pallens</i>	Extacto etanólico en partículas de plata	230,0	<i>M. tuberculosis</i> <i>M. avium</i> <i>M. smegmatis</i>	(Kerry <i>et al.</i> , 2018)
<i>Artemisia afra</i>	Extractos acuoso y metanólico	270,0	<i>M. tuberculosis</i>	(Mativandlela <i>et al.</i> , 2008)
<i>Artemisia nilagirica</i>	Extracto etanólico	300,0	<i>M. smegmatis</i>	(Naik, Mohanty, Padhi, Pati, & Sonawane, 2014)

12.5 Citotoxicidad *in vivo* de los extractos de *Artemisia ludoviciana* en modelo de *Artemia* spp.

Los resultados de la citotoxicidad *in vivo* en el modelo de artemia para el extracto hexánico se obtuvo una CL₅₀ de 644,9, para el extracto de acetato de etilo se obtuvo una CL₅₀ de 14,2, para el extracto etanólico se obtuvo una CL₅₀ de 14 y para el extracto etanólico una CL₅₀ de 117,5. Los extractos hexánico y etanólico mostraron moderada toxicidad, mientras que los extractos de acetato de etilo y metanólico mostraron una alta toxicidad (Tabla 10).

Tabla 10. Toxicidad de *Artemia* spp. (CL₅₀ µg/mL) con diferentes extractos de *Artemisia ludoviciana*, *Helianthus annuus* y *Lycopodium clavatum*

Planta	Hexano CL ₅₀ µg/mL	Acetato de etilo CL ₅₀ µg/mL	Metanol CL ₅₀ µg/mL	Etanol CL ₅₀ µg/mL
<i>Artemisia ludoviciana</i> *	5.6	14.2	14	195.6
<i>Helianthus annuus</i> rojo **	47.9	20.1	11.7	11337.8
<i>Lycopodium clavatum</i>	NA	47.9	145	240.9

CL₅₀: extremadamente tóxico < 10 µg/mL, altamente tóxico >10 a <100 µg/mL, moderadamente tóxico >100 a <1000 µg/mL, y no tóxico > 1000 µg/mL.

* Estafiate K0031

** Girasol rojo *Helianthus annuus* "Autumn Beauty" HUAP0077119

Los fármacos actuales contra *Mtb*, presentan citotoxicidad alta a moderadamente tóxica en el modelo de *Artemia* spp., con resultados similares a los de este trabajo de investigación. Por ejemplo, la bioquinolona híbrida derivada de isoniácida, muestra una CL₅₀ de 50 µg/mL (Freitas *et al.*, 2011). Los derivados de la rifampicina una CL₅₀ de 100 µg/mL (Subramani, Kumar, Prasad, & Aalbersberg, 2013). La tetraciclina presenta una CL₅₀ de 14,67 µg/mL (Jaki, Orjala, Bürgi, & Sticher, 1999) y los derivados de la quinolona presentan una CL₅₀ de 12 µg/mL (Gajera, Mehta, & Patel, 2015).

En contraste la isoniácida no muestra toxicidad ya que presenta una CL₅₀ de 1,074.75 µg/mL (Freitas *et al.*, 2011), esto de manera similar al extracto etanólico de *Helianthus annuus* (Tablas 11).

Tabla 11. Toxicidad de *Artemia* spp., con diferentes fármacos empleados en el tratamiento de *Mtb*

Fármaco	CL ₅₀ (mg/ml ⁻¹)	Referencia
INH	1074,75	(Freitas <i>et al.</i> , 2011)
Bioquinolona-híbridos de INH	50	(Freitas <i>et al.</i> , 2011)
Derivados de rifampicina	100	(Subramani, Kumar, Prasad, & Aalbersberg, 2013)
Tetraciclina	14,67	(Jaki, Orjala, Bürgi, & Sticher, 1999)
Derivados de quinolonas	12	(Gajera, Mehta, & Patel, 2015)

Los extractos de *Artemisia ludoviciana*, muestran desde extremada toxicidad, alta toxicidad, y moderada toxicidad contra *Artemia* spp. Al parecer, diversas plantas de la misma especie comparten las mismas características: el extracto metanólico de *Tulbaghia acutiloba* presenta CL₅₀ a 1,7 µg/mL. Los extractos acetato de etilo y metanólico de *Bulbine abyssinica* presentan CL₅₀ a 1,5 y 1,6 µg/mL (respectivamente) (Mnengi, Kappo, Kambizi, & Nakin, 2014). Los extractos metanólicos de *Heliopsis sinaloensis* y *Helicteres vegae* presentan CL₅₀ a 94,9 y 807,1 µg/mL (respectivamente) (Olivas-Quintero *et al.*, 2017). Los extractos hexánico y acetato de etilo de *Spilanthes paniculata* presentan CL₅₀ a 49 y 216,7 µg/mL (respectivamente) (Hossain *et al.*, 2014). El extracto metanólico de *Teucrium stocksianum* presenta una CL₅₀ de 5,2 µg/mL, mientras que el extracto metanólico de *Achillea wilhelmsii* presenta una CL₅₀ de 23 µg/mL (Ali, Blicharska, Shilpi, & Seidel, 2018).

El extracto metanólico de *Xanthium strumarium* presenta una CL₅₀ de 0,4 µg/mL (Islam, Ahmed, & Kishor, 2016). El extracto etanólico de *Chromolaena odorata* presenta una CL₅₀ de 392 µg/mL (Asomugha, 2015). El extracto metanólico de *Vernonia cinerea* presenta una CL₅₀ de 2720 µg/mL (Latha *et al.*, 2010). Los extractos hexánico y etanólico de *Vernonia anthelmintica* presenta una CL₅₀ de 216,1 y 104,2 µg/mL (respectivamente) (Jamil, Alam Khan, Afroz, & Ahmed, 2016). El extracto metanólico de *Gymnosperma glutinosum* presenta una CL₅₀ de 503,7 µg/mL (Canales *et al.*, 2007).

En contraste, solo *Bidens pilosa* no presenta toxicidad contra *Artemia* spp., ya que la CL₅₀ de los extractos hexánico, acetato de etilo y metanólico es de >1000 µg/mL como lo podemos ver en la siguiente tabla (Kwiecinski *et al.*, 2008) (Tabla 12).

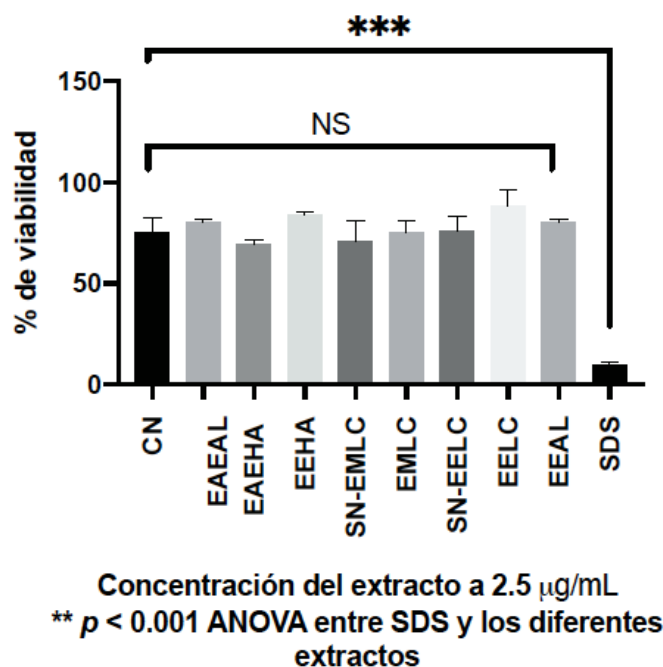
Tabla 12. Toxicidad en modelo de *Artemia* spp. CL₅₀ (µg/mL) de diferentes extractos de *Artemisia ludoviciana*, comparada con extractos de plantas de su misma familia

Planta	Hexánico µg/mL	Acetato de etilo µg/mL	Metanólico µg/mL	Etanólico µg/mL	Referencia
<i>Artemisia ludoviciana</i>	694,9	14,2	14,0	117,5	Resultados propios
<i>Bidens pilosa</i>	> 1000	> 1000	> 1000		(Kwiecinski <i>et al.</i> , 2008)
<i>Gymnosperma glutinosum</i>			503,7		(Canales <i>et al.</i> , 2007)
<i>Vernonia anthelmintica</i>	216,1			104,2	(Jamil, Alam Khan, Afroz, & Ahmed, 2016)
<i>Vernonia cinerea</i>			2720,0		(Latha <i>et al.</i> , 2010)
<i>Chromolaena odorata</i>				392,0	(Asomugha, 2015)
<i>Xanthium strumarium</i>			0,4		(Islam <i>et al.</i> , 2009)
<i>Achillea wilhelmsii</i>			23,0		(Ali <i>et al.</i> , 2011)
<i>Teucrium stocksianum</i>			5,2		(Ali <i>et al.</i> , 2011)
<i>Spilanthes paniculata</i>	49,0	216,7			(Hossain <i>et al.</i> , 2014)
<i>Helicteres vegae</i>			807,1		(Olivas-Quintero <i>et al.</i> , 2017)
<i>Heliopsis sinaloensis</i>			94,9		(Olivas-Quintero <i>et al.</i> , 2017)
<i>Bulbine abyssinica</i>		1,6	1,5		(Mnengi, Kappo, Kambizi, & Nakin, 2014)
<i>Tulbaghia acutiloba</i>			1,7		(Mnengi <i>et al.</i> , 2014)

12.6 Citotoxicidad *ex vivo* en modelo THP-1

Los resultados de la citotoxicidad *ex vivo* muestran que a una concentración de 2,5 $\mu\text{g/mL}$ los siguientes extractos fueron inocuos para THP-1: acetato de etilo y etanólico de *Artemisia ludoviciana*, acetato de etilo y etanólico de *Helianthus annuus*, metanólico y etanólico del sobrenadante de *Lycopodium clavatum*, metanólico y etanólico de *Lycopodium clavatum* (gráfico 7).

Gráfico 7. Citotoxicidad de diferentes extractos a 2.5 $\mu\text{g/mL}$ en células THP-1 y ensayo de MTT



CN= control negativo, células sin tratar

EAEAL= Extracto de Aceta de Etilo de *Artemisia ludoviciana*

EAEHA= Extracto de Acetato de Etilo de *Helianthus annuus*

EEHA= Extracto Etanólico de *Helianthus annuus*

SN-EMLC= Sobrenadante de Extracto Metanólico de *Lycopodium clavatum*

EMLC= Extracto Metanólico de *Lycopodium clavatum*

SN-EELC= Sobrenadante del Extracto Etanólico de *Lycopodium clavatum*

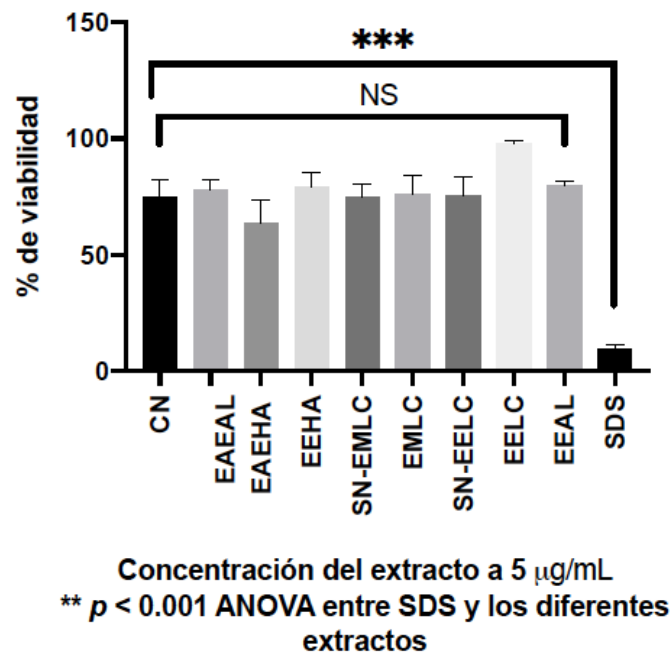
EELC= Extracto Etanólico de *Lycopodium clavatum*

EEAL= Extracto Etanólico de *Artemisia ludoviciana*

SDS= Dodecil Sulfato Sódico

A una concentración de 5 µg/mL los siguientes extractos fueron inocuos para THP-1: acetato de etilo y etanólico de *Artemisia ludoviciana*, acetato de etilo y etanólico de *Helianthus annuus*, metanólico y etanólico del sobrenadante de *Lycopodium clavatum*, metanólico y etanólico de *Lycopodium clavatum* (gráfico 8).

Gráfico 8. Citotoxicidad de diferentes extractos a 5 µg/mL en células THP-1 y ensayo de MTT



CN= control negativo, células sin tratar

EAEAL= Extracto de Aceta de Etilo de *Artemisia ludoviciana*

EAEHA= Extracto de Acetato de Etilo de *Helianthus annuus*

EEHA= Extracto Etanólico de *Helianthus annuus*

SN-EMLC= Sobrenadante de Extracto Metanólico de *Lycopodium clavatum*

EMLC= Extracto Metanólico de *Lycopodium clavatum*

SN-EELC= Sobrenadante del Extracto Etanólico de *Lycopodium clavatum*

EELC= Extracto Etanólico de *Lycopodium clavatum*

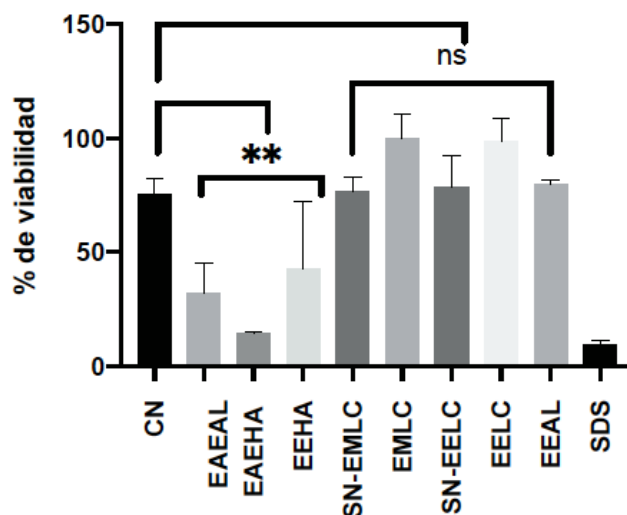
EEAL= Extracto Etanólico de *Artemisia ludoviciana*

SDS= Dodecil Sulfato Sódico

A una concentración de 10 µg/mL los siguientes extractos fueron inocuos para THP-1: etanólico de *Artemisia ludoviciana*, metanólico y etanólico del sobrenadante de *Lycopodium clavatum*, metanólico y etanólico de *Lycopodium clavatum* (gráfico 9).

A una concentración de 10 µg/mL los siguientes extractos mostraron citotoxicidad con CI50 para THP-1: acetato de etilo de *Artemisia ludoviciana*, acetato de etilo y etanólico de *Helianthus annuus* (gráfico 9).

Gráfico 9. Citotoxicidad de diferentes extractos a 10 µg/mL en células THP-1 y ensayo de MTT



Concentración del extracto a 10 µg/mL

** $p < 0.001$ ANOVA entre CN y los diferentes extractos

CN= control negativo, células sin tratar

EAEAL= Extracto de Acetato de Etilo de *Artemisia ludoviciana*

EAEHA= Extracto de Acetato de Etilo de *Helianthus annuus*

EEHA= Extracto Etanólico de *Helianthus annuus*

SN-EMLC= Sobrenadante de Extracto Metanólico de *Lycopodium clavatum*

EMLC= Extracto Metanólico de *Lycopodium clavatum*

SN-EELC= Sobrenadante del Extracto Etanólico de *Lycopodium clavatum*

EELC= Extracto Etanólico de *Lycopodium clavatum*

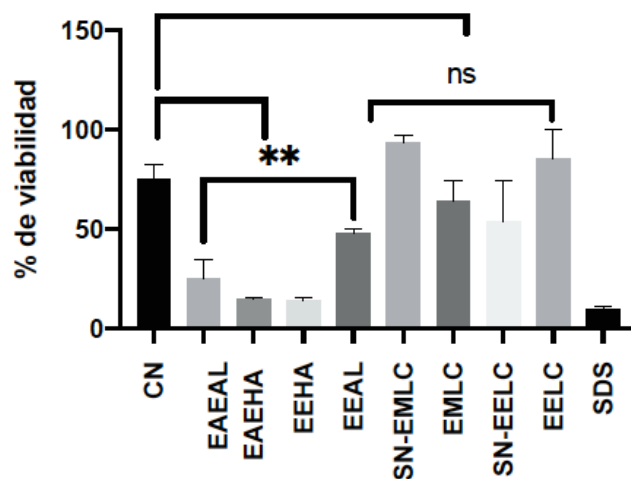
EEAL= Extracto Etanólico de *Artemisia ludoviciana*

SDS= Dodecil Sulfato Sódico

A una concentración de 20 µg/mL los siguientes extractos fueron inocuos para THP-1: metanólico y etanólico del sobrenadante de *Lycopodium clavatum*, metanólico y etanólico de *Lycopodium clavatum* (gráfico 10).

A una concentración de 10 µg/mL los siguientes extractos mostraron citotoxicidad con CI_{50} para THP-1: acetato de etilo y etanólico de *Artemisia ludoviciana*, acetato de etilo y etanólico de *Helianthus annuus* (gráfico 10).

Gráfico 10. Citotoxicidad de diferentes extractos a 20 µg/mL en células THP-1 y ensayo de MTT



Concentración del extracto a 20 µg/mL

** $p < 0.001$ ANOVA entre CN y los diferentes extractos

CN= control negativo, células sin tratar

EAEAL= Extracto de Acetato de Etilo de *Artemisia ludoviciana*

EAEHA= Extracto de Acetato de Etilo de *Helianthus annuus*

EEHA= Extracto Etanólico de *Helianthus annuus*

SN-EMLC= Sobrenadante de Extracto Metanólico de *Lycopodium clavatum*

EMLC= Extracto Metanólico de *Lycopodium clavatum*

SN-EELC= Sobrenadante del Extracto Etanólico de *Lycopodium clavatum*

EELC= Extracto Etanólico de *Lycopodium clavatum*

EEAL= Extracto Etanólico de *Artemisia ludoviciana*

SDS= Dodecil Sulfato Sódico

La mayoría de las especies de *Artemisia* spp. muestran a concentraciones variables, actividad citotóxica en el modelo THP-1, otros autores reportan hallazgos parecidos a los nuestros: los aceites esenciales de *Artemisia indica* presentan citotoxicidad contra THP-1 a concentraciones tan bajas de CI_{50} de 10 µg/mL (Rashid, Rather, Shah, & Bhat, 2013). Ludartina, un metabolito secundario de *Artemisia amygdalina* presenta una CI_{50} de 3,1 µM

(Lone *et al.*, 2013). Los extractos acetato de etilo y metanólico de *Artemisia nilagirinca* muestran una CI_{50} de 38 y 132 $\mu\text{g/mL}$ (respectivamente) (Gul *et al.*, 2016). Los aceites esenciales de *Artemisia abyssinica* muestran CI_{50} de 0.013 a 350 nl/mL (Tariku, Hymete, Hailu, & Rohloff, 2010). De diferentes extractos de *Artemisia scoparia*, el extracto metanólico mostró citotoxicidad en THP-1 con una CI_{50} de 6,93 $\mu\text{g/mL}$ (Khan, Fatima, Taqi, Zia, & Mirza, 2015). Otras plantas también son citotóxicas por ejemplo el extracto de acetato de etilo de *Tabernaemontana elegans* presenta una CI_{50} de 4 $\mu\text{g/mL}$ (X Luo *et al.*, 2011). El aceite esencial de *Origanum vulgare* también presenta citotoxicidad con CI_{50} de menor a 125 $\mu\text{g/mL}$ (Akkaoui *et al.*, 2020).

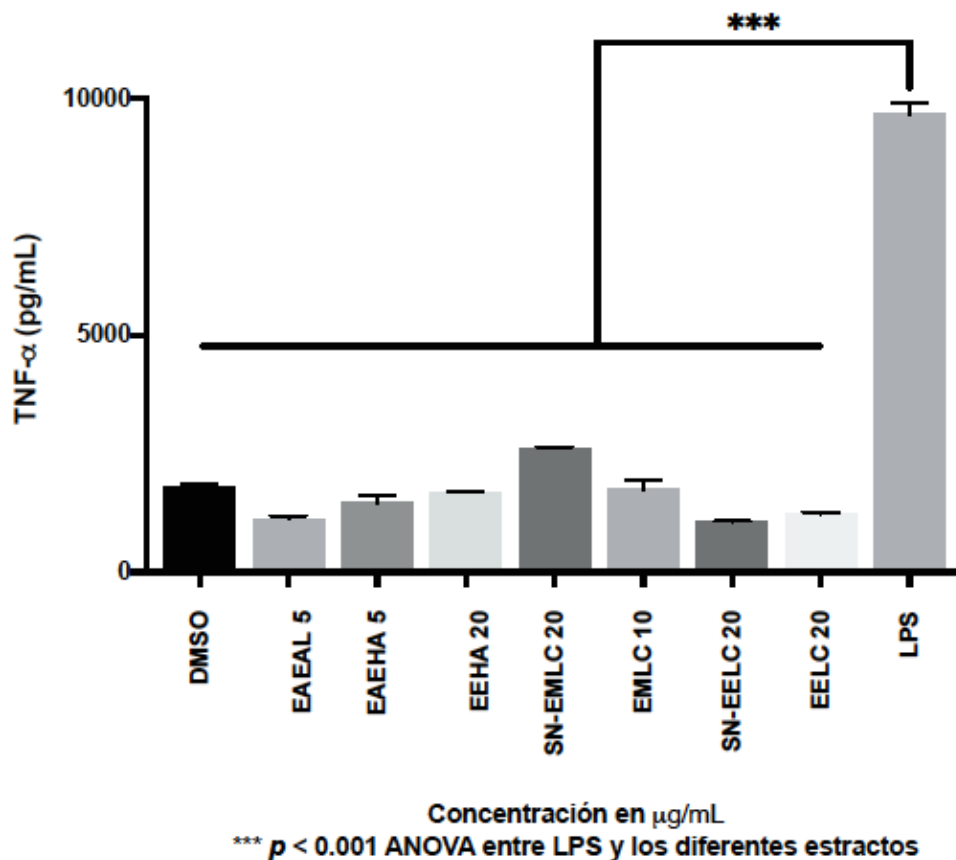
En contraste con nuestros resultados, los extractos metanólico y acuoso de *Artemisia rupestris* no muestran actividad citotóxica contra THP-1 (Nokerbek, Sakipova, Chalupová, Nejezchlebová, & Hošek, 2017).

12.7 Actividad inmunomoduladora de los extractos en el modelo THP-1

Secreción de TNF- α en sobrenadante de THP-1 con diversos extractos

Los resultados de la actividad inmunomoduladora de los extractos en el modelo de THP-1 muestran que ninguno de los extractos estimuló la producción de TNF- α (gráfico 11).

Gráfico 11. Secreción de TNF- α con diferentes extractos en el sobrenadante de THP-1



DMSO= Dimetil sulfoxido

EAEAL= Extracto de Acetato de Etilo de *Artemisia ludoviciana*

EAEHA= Extracto de Acetato de Etilo de *Helianthus annuus*

EEHA= Extracto Etanólico de *Helianthus annuus*

SN-EMLC= Sobrenadante de Extracto Metanólico de *Lycopodium clavatum*

SN-EAELC= Sobrenadante de Extracto de Acetato de Etilo de *Lycopodium clavatum*

SN-EELC= Sobrenadante del Extracto Etanólico de *Lycopodium clavatum*

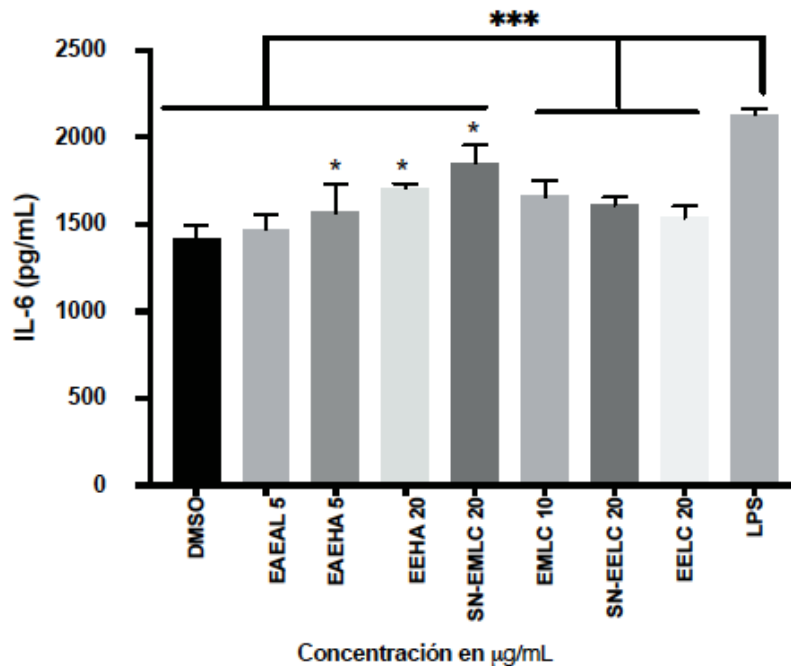
EELC= Extracto Etanólico de *Lycopodium clavatum*

LPS= Lipopolisacárido

Secreción de IL-6 en sobrenadante de THP-1 con diversos extractos

La actividad inmjunomoduladora de los extractos en el modelo de THP-1 muestran que los extractos acetato de etilo de etilo a 5 $\mu\text{g/mL}$ y el etanólico a 20 $\mu\text{g/mL}$ de *Helianthus annuus*, así como el sobrenadante del extracto metanólico de *Lycopodium clavatum*, indujeron la secreción de IL-6 de más de 1500 pg/mL , el resto de los extractos no indujé secreción de IL-6 en comparación con DMSO (gráfico 12).

Gráfico 12. Secreción de IL-6 con diferentes extractos en el sobrenadante de THP-1

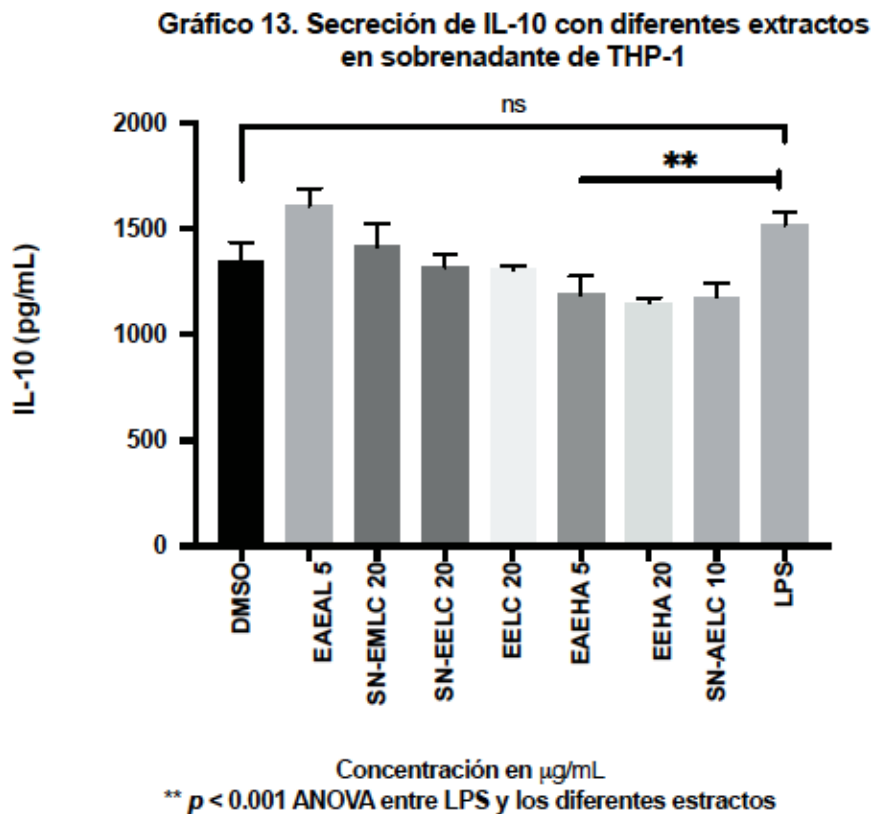


*** $p < 0.001$ ANOVA entre LPS y los diferentes extractos
 * $p < 0.01$ ANOVA entre DMSO y los diferentes extractos

DMSO= Dimetil sulfoxido
 EAEAL= Extracto de Acetato de Etilo de *Artemisia ludoviciana*
 EAEHA= Extracto de Acetato de Etilo de *Helianthus annuus*
 EEHA= Extracto Etanólico de *Helianthus annuus*
 SN-EMLC= Sobrenadante de Extracto Metanólico de *Lycopodium clavatum*
 SN-EAELC= Sobrenadante de Extracto de Acetato de Etilo de *Lycopodium clavatum*
 SN-EELC= Sobrenadante del Extracto Etanólico de *Lycopodium clavatum*
 EELC= Extracto Etanólico de *Lycopodium clavatum*
 LPS= Lipopolisacárido

Secreción de IL-10 en sobrenadante de THP-1 con diversos extractos

La actividad inmunomoduladora en el modelo THP-1 muestran que los extractos acetato de etilo de etilo a 5 µg/mL y el etanólico a 20 µg/mL de *Helianthus annuus*, así como el sobrenadante del acetato de etilo de *Lycopodium clavatum*, indujeron menor secreción de IL-10 por abajo de 1500 pg/mL en comparación con lipopolisacárido (gráfico 13).



DMSO= Dimetil sulfoxido

EAEAL= Extracto de Acetato de Etilo de *Artemisia ludoviciana*

EAEHA= Extracto de Acetato de Etilo de *Helianthus annuus*

EEHA= Extracto Etanólico de *Helianthus annuus*

SN-EMLC= Sobrenadante de Extracto Metanólico de *Lycopodium clavatum*

SN-EAELC= Sobrenadante de Extracto de Acetato de Etilo de *Lycopodium clavatum*

SN-EELC= Sobrenadante del Extracto Etanólico de *Lycopodium clavatum*

EELC= Extracto Etanólico de *Lycopodium clavatum*

LPS= Lipopolisacárido

Los metabolitos secundarios pueden estimular o inhibir la respuesta inmune innata o adaptativa, la mayoría parecen tener propiedades anti-inflamatorias, nuestros resultados muestran que los extractos estudiados no estimulan la respuesta inmune, muy parecido a lo reportado por otros autores quienes han estudiado algunos biocompuestos dentro de los cuales destacan: los extractos etanólicos de *Harpagophytum procumbens* inhiben la producción de TNF- α , IL-6 e IL-8 (Hostanska, Rostock, Suter, & Saller, 2010). Los metabolitos secundarios de *Glycyrrhiza uralensis* inhiben en el macrófago la producción de la citocina proinflamatoria IL-1 (Y. Wang et al., 2018). La piperlongumina de *Piper longum* inhibe en los macrófagos las citocinas IL-6, IL-12 y TNF- α (Stöhr, Xiao, & Bauer, 2001). La cumarina de *Cnidium monnieri* inhibe la producción de citocinas del tipo Th1 y Th2 (Fan et al., 2019). El metabolito secundario tripolide de *Trypterigium regelii* disminuye la producción de IL-2 (Brinker, Ma, Lipsky, & Raskin, 2007), la berberina de *Coptis japonica* inhibe la producción de citocinas del tipo Th1 y Th17 (Qin et al., 2012).

En contraste con nuestros resultados, otros metabolitos secundarios pueden inducir la producción de citocinas proinflamatorias que podrían incrementar la actividad de la respuesta inmune innata en contra de *Mtb*, algunos biocompuestos reportados son: polifenoles de *Astragalus membranaceus* inducen en los macrófagos la producción de las citocinas proinflamatorias IL-1 β , IL-6 y TNF- α (Qin et al., 2012). La curcumina de *Curcuma longa* puede intensificar la actividad antimicrobiana de los macrófagos en contra de *Mtb* (Mollazadeh et al., 2019) (Tabla 13).

Tabla 13. Metabolitos secundarios con propiedades inmunomoduladoras

Metabolito secundario	Planta	Actividad inmunomoduladora	Referencia
Curcumina	<i>Curcuma longa</i>	Incrementa la actividad antimicrobiana de los macrófagos contra <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	(Mollazadeh <i>et al.</i> , 2019)
Polifenoles	<i>Astragalus membranaceus</i>	Induce en los macrófagos, la producción de IL-6, IL-1b, y TNF-a	(Qin <i>et al.</i> , 2012)
Tripolide	<i>Trypterigium regelii</i>	Disminuye en los macrófagos, la producción de IL-12	(Brinker, Ma, Lipsky, & Raskin, 2007)
Berberina	<i>Coptis japonica</i>	Inhibe citocinas Th1 y Th17	(Qin <i>et al.</i> , 2012)
Biocompuestos de la raíz	<i>Glycyrrhiza uralensis</i>	Disminuye en los macrófagos, la producción de IL-1	(Y. Wang <i>et al.</i> , 2018)
Piperlongumina	<i>Piper longum</i>	Disminuye en los macrófagos, la producción de IL-6, IL-12, y TNF-a	(Stöhr, Xiao, & Bauer, 2001)
Cumarina	<i>Cnidium monnieri</i>	Inhibe citocinas Th1 y Th2	(Fan <i>et al.</i> , 2019)

13. RESUMEN DE RESULTADOS

De las tres especies estudiadas, *Artemisia ludoviciana* es la que presenta propiedades con potencial actividad contra *Mycobacterium tuberculosis*.

En las pruebas fitoquímicas preliminares los metabolitos secundarios más abundantes en el extracto etanólico de *Artemisia ludoviciana* fueron alcaloides, triterpenos, flavonoides, glucósidos cardiotónicos y lactonas sesquiterpénicas.

En las pruebas fitoquímicas preliminares los metabolitos secundarios más abundantes en el extracto etanólico de *Helianthus annuus* fueron alcaloides, saponinas, triterpenos, taninos, flavonoides, glucósidos cardiotónicos y lactonas sesquiterpénicas.

En las pruebas fitoquímicas preliminares los metabolitos secundarios más abundantes en el extracto etanólico de *Lycopodium clavatum* fueron alcaloides, saponinas, taninos hidrolizables, taninos derivados del catecol, flavonoides, glucósidos cardiotónicos y lactonas sesquiterpénicas.

Los compuestos mayoritarios identificados a través de cromatografía de gases acoplada a espectrómetro de masas de los extractos etanólico y acetato de etilo de *Artemisia ludoviciana*, son achillin, tujona, fitol, sitosterol y estigmasterol.

Las cápsulas de alginato tanto para el extracto etanólico como para el extracto de acetato de etilo de *Artemisia ludoviciana*, modulan una liberación lenta y constante de los extractos, la cual inicia desde los 15 minutos, se mantiene durante 180 minutos en los medios simulados subdérmico y gástrico. Además, a la semana y a las 2 semanas, aún puede identificarse liberación de los extractos en ambos medios simulados.

A excepción del extracto hexánico de *Helianthus annuus*, los extractos hexánico, acetato de etilo, metanólico y etanólico de *Artemisia ludoviciana* y *Lycopodium clavatum*, presentan de moderada a alta toxicidad en el modelo de *Artemia* spp.; sin embargo, la toxicidad es similar a la de otros fármacos convencionales empleados en el tratamiento de tuberculosis activa en humanos.

De las tres especies estudiadas, sólo los extracto acetato de etilo y etanólico, presentan actividad antimicrobiana contra cepas clínicas de *Mtb*, en el medio de cultivo líquido MGIT a 500 y 250 µg/mL respectivamente.

La actividad antimicrobiana de los extractos de *Artemisia ludoviciana* contra la cepa H37Ra en el modelo de resazurina, fue con CMI en µg/mL: extracto hexánico en 600, extracto metanólico en 800, extracto de acetato de etilo en 400, y extracto etanólico en 700.

La actividad antimicrobiana de los extractos de *Artemisia ludoviciana* contra cepa clínica sensible de *Mtb*, en el modelo de resazurina, fue con CMI en µg/mL: extracto de acetato de etilo entre 500 a 700, y extracto etanólico en 700.

La actividad antimicrobiana de los extractos de *Artemisia ludoviciana* contra cepa clínica multidrodoresistente de *Mtb*, en el modelo de resazurina, fue con CMI en µg/mL: extracto de acetato de etilo entre 500 a 700, y extracto etanólico en 800.

Los extractos acetato de etilo de *Artemisia ludoviciana* y de *Helianthus annuus*, así como el extracto etanólico de *Helianthus annuus* presentan toxicidad *ex vivo* en el modelo THP-1 a partir de los 10 µg/mL. El resto de los extractos de *Artemisia ludoviciana*, *Helianthus annuus* y *Lycopodium clavatum*, no presentaron toxicidad.

Ninguno de los extractos estudiados de *Artemisia ludoviciana*, *Helianthus annuus* y *Lycopodium clavatum*, indujeron la producción de TNF- α en el sobrenadante de THP-1.

Ninguno de los extractos estudiados de *Artemisia ludoviciana*, *Helianthus annuus* y *Lycopodium clavatum*, indujeron la producción de IL-10 en el sobrenadante de THP-1.

Solamente los extractos etanólico y acetato de etilo de *Helianthus annuus*, indujeron la producción de IL-6 en el sobrenadante de THP-1.

14. CONCLUSIÓN

De las tres especies estudiadas, los extractos etanólico y acetato de etilo de *Artemisia ludoviciana*, muestran la mejor actividad *in vitro*, contra cepas clínicas de *Mycobacterium tuberculosis* y contra la cepa experimental *HR37a*. La encapsulación en alginato de estos extractos puede optimizar su uso en modelos experimentales *in vivo*.

15. LIMITANTES

En el caso de la encapsulación de los extractos en alginato, su producción fue artesanal por lo que la homogeneidad de las microcápsulas se ve comprometida, además la medición de la liberación del extracto puede ser imprecisa ya que sólo se midió a través de espectroscopía y sólo se analizaron dos tipos de pH. Es recomendable usar microscopía electrónica para caracterizar adecuadamente las microcápsulas y también detectar la liberación específica de los biocompuestos de los extractos a diferentes pH. A pesar de ello, el modelo estudiado nos da una idea de la estabilidad de los extractos encapsulados en alginato.

16. FORTALEZAS

Se estudiaron cepas de *Mtb* experimental, clínica sensible y clínica resistente (a rifampicina e isoniciada), y en todas ellas, los extractos mostraron actividad antimicobacteriana *in vitro*. Las cepas clínicas muestran comportamientos más complejos relacionados con la interacción del hospedero.

17. PERSPECTIVAS

Los resultados muestran la potencial actividad de los extractos etanólico y acetato de etilo de *Artemisia ludoviciana* para estudiarse en modelos *in vivo*, de manera inicial en el modelo murino y posteriormente en el modelo humano.

Estos extractos, podrían tener un mejor desempeño si se aplican en forma de aerosol en nanoparticulas dirigidas a la vía respiratoria baja. Por otro lado, puede continuarse una línea de investigación con el aislamiento y purificación de los metabolitos secundarios de los extractos ya mencionados así como estudiar directamente la actividad antimicobacteriana de los mismos.

BIBLIOGRAFIA

- Adeniyi, B. A., Groves, M. J., & Gangadharam, P. R. (2004). In vitro anti-mycobacterial activities of three species of Cola plant extracts (Sterculiaceae). *Phytother Res*, 18(5), 414-418. doi:10.1002/ptr.1468
- Aderem, A., & Underhill, D. M. (1999). Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol*, 17, 593-623. doi:10.1146/annurev.immunol.17.1.593
- Akkaoui, S., Johansson, A., Yagoubi, M., Haubek, D., Rida, S., Claesson, R., & Ennibi, O. (2020). Chemical Composition, Antimicrobial activity, In Vitro Cytotoxicity and Leukotoxin Neutralization of Essential Oil from *Origanum vulgare* against *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Pathogens*, 9(3), 192.
- Alanis, A. D., Calzada, F., Cervantes, J. A., Torres, J., & Ceballos, G. M. (2005). Antibacterial properties of some plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of gastrointestinal disorders. *Journal of Ethnopharmacology*, 100(1-2), 153-157.
- Ali, M. T., Blicharska, N., Shilpi, J. A., & Seidel, V. (2018). Investigation of the anti-TB potential of selected propolis constituents using a molecular docking approach. *Scientific reports*, 8(1), 12238. Retrieved from https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6095843/pdf/41598_2018_Article_30209.pdf
- Alvarez-Gordillo, G. D. C., & Dorantes-Jiménez, J. E. (1998). Tratamiento acertado estrictamente supervisado para tuberculosis pulmonar. *salud pública de méxico*, 40, 272-275.
- Arbex, M. A., Varella Mde, C., Siqueira, H. R., & Mello, F. A. (2010). Antituberculosis drugs: drug interactions, adverse effects, and use in special situations. Part 1: first-line drugs. *J Bras Pneumol*, 36(5), 626-640. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21085830>
- Arellanes, M. A. J., Garrido, J. C., & Díaz, R. L. (2010). Las plantas medicinales mexicanas como fuente de compuestos antimicobacterianos. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 41(1), 22-29.
- Arjanova, O. V., Prihoda, N. D., Yurchenko, L. V., Sokolenko, N. I., Vihrova, L. A., Pylypchuk, V. S., . . . Kutsyna, G. A. (2009). Enhancement of efficacy of

- tuberculosis drugs with Immunoxel (Dzherelo) in HIV-infected patients with active pulmonary tuberculosis. *Immunotherapy*, 1(4), 549-556. doi:10.2217/imt.09.25
- Arjomandzadegan, M., Emami, N., Habibi, G., Farazi, A. A., Kahbazi, M., Sarmadian, H., . . . Ramezani, M. (2016). Antimycobacterial activity assessment of three ethnobotanical plants against *Mycobacterium Tuberculosis*: An In Vitro study. *Int J Mycobacteriol*, 5 Suppl 1, S108-S109. doi:10.1016/j.ijmyco.2016.10.025
- Armstrong, J. A., & Hart, P. D. (1971). Response of cultured macrophages to *Mycobacterium tuberculosis*, with observations on fusion of lysosomes with phagosomes. *J Exp Med*, 134(3 Pt 1), 713-740. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15776571>
- Asomugha, R. (2015). Acute and Cytotoxicity Studies of Aqueous and Ethanolic Leaf Extracts of. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 18(1), 46-49.
- Ayme, Y. M. (2021). Estudio etnobotánico y etnofarmacológico de plantas medicinales de Tambopata, Madre de Dios, Perú. *Ciencia y desarrollo*, 24(1), 79-98.
- Azwanida, N. N. 2015. *A Review On The Extraction Methods Use In Medical Plants, Principle, Strength and Limitation. Med Aromatic Plants*, 4, 196-201.
- Baghaei, P., Tabarsi, P., Chitsaz, E., Saleh, M., Marjani, M., Shemirani, S., Masjedi, M. (2010). Incidence, clinical and epidemiological risk factors, and outcome of drug-induced hepatitis due to antituberculous agents in new tuberculosis cases. *Am J Ther*, 17(1), 17-22. doi:10.1097/MJT.0b013e31818f9eae
- Bañuelos-Valenzuela, R., Delgadillo-Ruiz, L., Echavarría-Cháirez, F., Delgadillo-Ruiz, O., & Meza-López, C. (2018). Composición química y FTIR de extractos etanólicos de *Larrea tridentata*, *Origanum vulgare*, *Artemisa ludoviciana* y *Ruta graveolens*. *Agrociencia*, 52(3), 309-321.
- Barba, A. A., d'Amore, M., Chirico, S., Lamberti, G., & Titomanlio, G. (2009). A general code to predict the drug release kinetics from different shaped matrices. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 36(2-3), 359-368.
- Caminero, J. A. (2010). Tratamiento de la tuberculosis según el diferente patrón de resistencias. *Medicina clínica*, 134(4), 173-181.
- Daniel, T. M., Bates, J. H., & Downes, K. A. (1994). History of tuberculosis. *Tuberculosis: pathogenesis, protection, and control*, 13-24.

- Beamer, G. L., & Turner, J. (2005). Murine models of susceptibility to tuberculosis. *ARCHIVUM IMMUNOLOGIAE ET THERAPIAE EXPERIMENTALIS-ENGLISH EDITION*-, 53(6), 469.
- Beltran, O. (2008). *Investigation of the anti-mycobacterial and cytotoxic effect of three medicinal plants used in the traditional treatment of tuberculosis in northern Mexico and the Southwest United States*: The University of Texas at El Paso.
- Bladt, S., & Wagner, H. (2007). From the Zulu medicine to the European phytomedicine Umckaloabo. *Phytomedicine*, 14 Suppl 6, 2-4. doi:10.1016/j.phymed.2006.11.030
- Blumberg, H. M., Burman, W. J., Chaisson, R. E., Daley, C. L., Etkind, S. C., Friedman, L. N., the Infectious Diseases, S. (2003). American Thoracic Society/Centers for Disease Control and Prevention/Infectious Diseases Society of America: treatment of tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 167(4), 603-662. doi:10.1164/rccm.167.4.603
- Borgogna, M., Bellich, B., Zorzin, L., Lapasin, R., & Cesàro, A. (2010). Food microencapsulation of bioactive compounds: Rheological and thermal characterisation of non-conventional gelling system. *Food chemistry*, 122(2), 416-423.
- Brinker, A. M., Ma, J., Lipsky, P. E., & Raskin, I. (2007). Medicinal chemistry and pharmacology of genus *Tripterygium* (Celastraceae). *Phytochemistry*, 68(6), 732-766.
- Brites, D., & Gagneux, S. (2012). Old and new selective pressures on *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Genet Evol*, 12(4), 678-685. doi:10.1016/j.meegid.2011.08.010
- Brites, D., & Gagneux, S. (2015). Co-evolution of *Mycobacterium tuberculosis* and *Homo sapiens*. *Immunol Rev*, 264(1), 6-24. doi:10.1111/imr.12264
- Brustolin Aleixo, C. F., Ferraz, F. N., Massini, P. F., Lopes, C. R., Falkowski Temporini, G. J., Aleixo, D. L., & de Araujo, S. M. (2017). Beneficial immunomodulatory and neuro digestive effect in *Trypanosoma cruzi* infection after *Lycopodium clavatum* 13c treatment. *Microb Pathog*, 112, 1-4. doi:10.1016/j.micpath.2017.09.026
- Bucay, J. W., & Haiat, S. W. (2005). *Algunas plantas utilizadas popularmente en el tratamiento de enfermedades respiratorias. Parte I*. Paper presented at the Anales de Otorrinolaringología Mexicana.

- Bueno-Sánchez, J. G., Martínez-Morales, J. R., Stashenko, E. E., & Ribón, W. (2009). Anti-tubercular activity of eleven aromatic and medicinal plants occurring in Colombia. *Biomédica*, 29(1), 51-60.
- Bunalema, L., Obakiro, S., Tabuti, J. R., & Waako, P. (2014). Knowledge on plants used traditionally in the treatment of tuberculosis in Uganda. *J Ethnopharmacol*, 151(2), 999-1004. doi:10.1016/j.jep.2013.12.020
- Burnham, C. D., Leeds, J., Nordmann, P., O'Grady, J., & Patel, J. (2017). Diagnosing antimicrobial resistance. *Nat Rev Microbiol*, 15(11), 697-703. doi:10.1038/nrmicro.2017.103
- Canales, M., Hernández, T., Serrano, R., Hernández, L. B., Duran, A., Ríos, V., Avila, G. (2007). Antimicrobial and general toxicity activities of *Gymnosperma glutinosum*: A comparative study. *Journal of ethnopharmacology*, 110(2), 343-347. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.10.002>
- Capreomycin. (2008). *Tuberculosis (Edinb)*, 88(2), 89-91. doi:10.1016/S1472-9792(08)70004-0
- Carvalho, J. C. T., Perazzo, F. F., Machado, L., & Bereau, D. (2013). Biologic activity and biotechnological development of natural products. In: Hindawi.
- Chakaya, J., Kirenga, B., & Getahun, H. (2016). Long term complications after completion of pulmonary tuberculosis treatment: a quest for a public health approach. In: Elsevier.
- Chakaya, J., Khan, M., Ntoumi, F., Aklillu, E., Fatima, R., Mwaba, P., & Zumla, A. (2021). Global Tuberculosis Report 2020—Reflections on the Global TB burden, treatment and prevention efforts. *International Journal of Infectious Diseases*, 113, S7-S12.
- Chan, E.-S., Yim, Z.-H., Phan, S.-H., Mansa, R. F., & Ravindra, P. (2010). Encapsulation of herbal aqueous extract through absorption with ca-alginate hydrogel beads. *Food and Bioproducts Processing*, 88(2-3), 195-201.
- Changtam, C., Hongmanee, P., & Suksamrarn, A. (2010). Isoxazole analogs of curcuminoids with highly potent multidrug-resistant antimycobacterial activity. *Eur J Med Chem*, 45(10), 4446-4457. doi:10.1016/j.ejmech.2010.07.003

- Chimponda, T., & Mukanganyama, S. (2010). Antimycobacterial activities of selected medicinal plants from Zimbabwe against *Mycobacterium aurum* and *Corynebacterium glutamicum*. *Trop Biomed*, 27(3), 595-610.
- Chinsembu, K. C. (2016). Tuberculosis and nature's pharmacy of putative anti-tuberculosis agents. *Acta Trop*, 153, 46-56. doi:10.1016/j.actatropica.2015.10.004
- Chirinos Zegarra, L. H., Flores, V. O., & Vargas Anahua, O. (2006). Efecto de la capreomicina sobre la función renal en pacientes con tuberculosis multidrogoresistente. *Enfer. tórax (Lima)*, 47-53.
- Contreras Cardenas, A. V., Hernandez, L. R., Juarez, Z. N., Sanchez-Arreola, E., & Bach, H. (2016). Antimicrobial, cytotoxic, and anti-inflammatory activities of *Pleopeltis polylepis*. *J Ethnopharmacol*, 194, 981-986. doi:10.1016/j.jep.2016.10.071
- Coronado-Aceves, E. W., Sanchez-Escalante, J. J., Lopez-Cervantes, J., Robles-Zepeda, R. E., Velazquez, C., Sanchez-Machado, D. I., & Garibay-Escobar, A. (2016). Antimycobacterial activity of medicinal plants used by the Mayo people of Sonora, Mexico. *J Ethnopharmacol*, 190, 106-115. doi:10.1016/j.jep.2016.05.064
- Darwin, K. H., Ehrt, S., Gutierrez-Ramos, J. C., Weich, N., & Nathan, C. F. (2003). The proteasome of *Mycobacterium tuberculosis* is required for resistance to nitric oxide. *Science*, 302(5652), 1963-1966. doi:10.1126/science.1091176
- De Groote, M. A., Gilliland, J. C., Wells, C. L., Brooks, E. J., Woolhiser, L. K., Gruppo, V., Lenaerts, A. J. (2011). Comparative studies evaluating mouse models used for efficacy testing of experimental drugs against *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother*, 55(3), 1237-1247. doi:10.1128/AAC.00595-10
- de Jager, P., & van Altena, R. (2002). Hearing loss and nephrotoxicity in long-term aminoglycoside treatment in patients with tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis*, 6(7), 622-627. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12102302>
- de Tapia, E. M., Yrizar, D. M., Morales, E. I., & Morán, C. C. A. (2014, January). Los orígenes prehispánicos de una tradición alimentaria en la cuenca de México. In *Anales de antropología* (Vol. 48, No. 1, pp. 97-121). No longer published by Elsevier.
- Delgado-Sánchez, G., García-García, L., Castellanos-Joya, M., Cruz-Hervert, P., Ferreyra-Reyes, L., Ferreira-Guerrero, E., ... & Jiménez-Corona, M. E. (2015).

- Association of pulmonary tuberculosis and diabetes in Mexico: analysis of the national tuberculosis registry 2000–2012. *PloS one*, 10(6), e0129312.
- DE PAZ MERCED, N. A. T. A. E. L. EVALUACIÓN DE UN EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE ESTAFIATE (*Artemisia ludoviciana* Nutt.) SOBRE INHIBICIÓN DE ECLOSIÓN DE HUEVOS DEL NEMATODO PARÁSITO *Haemonchus contortus* (2020). <http://hdl.handle.net/20.500.11799/110136>
- Dymek, A., Widelski, J., Golus, J., Widelska, G., Sawicki, R., Ginalska, G., & Mroczek, T. (2018). Volatile compounds from different species of *Lycopodium* with anti-tuberculosis activity. *Facta Universitatis, Series Physics, Chemistry and Technology*, 16(1), 134.
- Elkington, B. G., Sydara, K., Newsome, A., Hwang, C. H., Lankin, D. C., Simmler, C., Soejarto, D. D. (2014). New finding of an anti-TB compound in the genus *Marsypopetalum* (Annonaceae) from a traditional herbal remedy of Laos. *J Ethnopharmacol*, 151(2), 903-911. doi:10.1016/j.jep.2013.11.057
- Eloff, J. N. (1998). Which extractant should be used for the screening and isolation of antimicrobial components from plants? *J Ethnopharmacol*, 60(1), 1-8. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9533426>
- Enioutina, E. Y., Teng, L., Fateeva, T. V., Brown, J. C. S., Job, K. M., Bortnikova, V. V., Sherwin, C. M. T. (2017). Phytotherapy as an alternative to conventional antimicrobials: combating microbial resistance. *Expert Rev Clin Pharmacol*, 10(11), 1203-1214. doi:10.1080/17512433.2017.1371591
- Enomoto, Y., Hagiwara, E., Komatsu, S., Nishihira, R., Baba, T., Kitamura, H., Ogura, T. (2014). Pilot quasi-randomized controlled study of herbal medicine Hochuekkito as an adjunct to conventional treatment for progressed pulmonary *Mycobacterium avium* complex disease. *PLoS One*, 9(8), e104411. doi:10.1371/journal.pone.0104411
- Esquivel-Ferrino, P. C., Favela-Hernandez, J. M., Garza-Gonzalez, E., Waksman, N., Rios, M. Y., & del Rayo Camacho-Corona, M. (2012). Antimycobacterial activity of constituents from *Foeniculum vulgare* var. dulce grown in Mexico. *Molecules*, 17(7), 8471-8482. doi:10.3390/molecules17078471

- Esquivel-Ferriño, P. C., Clemente-Soto, A. F., Ramírez-Cabriales, M. Y., Garza-González, E., Álvarez, L., & Camacho-Corona, M. d. R. (2014). Volatile constituents identified in hexane extract of *Citrus sinensis* peel and anti-mycobacterial tuberculosis activity of some of its constituents. *Journal of the Mexican Chemical Society*, *58*(4), 431-434.
- Ethambutol. (2008). *Tuberculosis (Edinb)*, *88*(2), 102-105. doi:10.1016/S1472-9792(08)70008-8
- Evans, W. (1997). Trease and evans pharmacology. *Harcourt Brace and Company. Asia. Pvt. Ltd. Singapore.*
- Falkowski-Temporini, G. J., Lopes, C. R., Massini, P. F., Brustolin, C. F., Sandri, P. F., Ferreira, E. C., . . . de Araujo, S. M. (2016). Predominance of Th1 response, increase of megakaryocytes and Kupffer cells are related to survival in *Trypanosoma cruzi* infected mice treated with *Lycopodium clavatum*. *Cytokine*, *88*, 57-61. doi:10.1016/j.cyto.2016.08.015
- Famewo, E. B., Clarke, A. M., & Afolayan, A. J. (2017). Ethno-medicinal documentation of polyherbal medicines used for the treatment of tuberculosis in Amathole District Municipality of the Eastern Cape Province, South Africa. *Pharm Biol*, *55*(1), 696-700. doi:10.1080/13880209.2016.1266670
- Fan, H., Gao, Z., Ji, K., Li, X., Wu, J., Liu, Y., Li, X. (2019). The in vitro and in vivo anti-inflammatory effect of osthole, the major natural coumarin from *Cnidium monnieri* (L.) Cuss, via the blocking of the activation of the NF- κ B and MAPK/p38 pathways. *Phytomedicine*, *58*, 152864.
- Favela-Hernandez, J. M., Garcia, A., Garza-Gonzalez, E., Rivas-Galindo, V. M., & Camacho-Corona, M. R. (2012). Antibacterial and antimycobacterial lignans and flavonoids from *Larrea tridentata*. *Phytother Res*, *26*(12), 1957-1960. doi:10.1002/ptr.4660
- Fernandez, J., Sanchez, M., Perez, N., Rodriguez, I., & Villafranca, Y. (1998). Density of population in sunflower (*Helianthus annuus*). In *Taller Internacional Geminivirus en el Caribe, La Habana (Cuba), Nov 1998*. Liliana.

- Forget, E. J., & Menzies, D. (2006). Adverse reactions to first-line antituberculosis drugs. *Expert Opin Drug Saf*, 5(2), 231-249. doi:10.1517/14740338.5.2.231
- Fortuna, A. M., Juárez, Z. N., Bach, H., Nematallah, A., Av-Gay, Y., Sanchez-Arreola, E., Hernandez, L. R. (2011). Antimicrobial activities of sesquiterpene lactones and inositol derivatives from *Hymenoxys robusta*. *Phytochemistry*, 72(18), 2413-2418. doi:10.1016/j.phytochem.2011.09.001
- FRAGOSO BENHUMEA, J. U. Y. M. A., & LÓPEZ REYES, E. A. (2019). DENSIDAD DE POBLACIÓN DE TRIPS EN UNICULTIVO DEL GLADIOLO (*Gladiolus grandiflorus* Andrews.) Y ASOCIADO CON GIRASOL (*Helianthus annuus* L.). <http://hdl.handle.net/20.500.11799/105156>
- Frame, A. D., Ríos-Olivares, E., De Jesúa, L., Ortiz, D., Pagán, J., & Méndez, S. (2016). Plants from Puerto Rico with anti-*Mycobacterium tuberculosis* properties. *Puerto Rico health sciences journal*, 17(3).
- Freitas, M. C., António, J. M., Ziolli, R. L., Yoshida, M. I., Rey, N. A., & Diniz, R. (2011). Synthesis and structural characterization of a zinc (II) complex of the mycobactericidal drug isoniazid–Toxicity against *Artemia salina*. *Polyhedron*, 30(11), 1922-1926.
- Fomogne-Fodjo, M., Ndinteh, D. T., Olivier, D., Kempgens, P., Van Vuuren, S., & Krause, R. (2017). Secondary metabolites from *Tetracera potatoria* stem bark with anti-mycobacterial activity. *Journal of ethnopharmacology*, 195, 238-245.
- Funami, T., Fang, Y., Noda, S., Ishihara, S., Nakauma, M., Draget, K. I., & Phillips, G. O. (2009). Rheological properties of sodium alginate in an aqueous system during gelation in relation to supermolecular structures and Ca²⁺ binding. *Food Hydrocolloids*, 23(7), 1746-1755.
- Gajera, S. B., Mehta, J. V., & Patel, M. N. (2015). DNA interaction, cytotoxicity, antibacterial and antituberculosis activity of oxovanadium (IV) complexes derived from fluoroquinolones and 4-hydroxy-5-((4-hydroxyphenyl) diazenyl) thiazole-2 (3 h)-thione. *RSC Advances*, 5(28), 21710-21719.
- García, A. Á., & Carril, E. P.-U. (2011). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (biología)*, 2(3).

- García, D. (2004). Los metabolitos secundarios de las especies vegetales. *Pastos y forrajes*, 27(1).
- Garden, M. B. (2017). Tropicos. Retrieved from <http://www.tropicos.org/Name/2700144>>
- Goyal, M. R., Suleria, H. A. R., & Harikrishnan, R. (2020). *The Role of Phytoconstituents in Health Care: Biocompounds in Medicinal Plants*: CRC Press.
- Gul, M. Z., Chandrasekaran, S., Bhat, M. Y., Maurya, R., Qureshi, I. A., & Ghazi, I. A. (2016). Bioassay-guided fractionation and in vitro antiproliferative effects of fractions of *Artemisia nilagirica* on THP-1 cell line. *Nutrition and cancer*, 68(7), 1210-1224.
- Guo, S., Ge, Y., & Na Jom, K. (2017). A review of phytochemistry, metabolite changes, and medicinal uses of the common sunflower seed and sprouts (*Helianthus annuus* L.). *Chemistry Central Journal*, 11(1), 1-10.
- Gupta, V. K., Shukla, C., Bisht, G. R., Saikia, D., Kumar, S., & Thakur, R. L. (2011). Detection of anti-tuberculosis activity in some folklore plants by radiometric BACTEC assay. *Lett Appl Microbiol*, 52(1), 33-40. doi:10.1111/j.1472-765X.2010.02963.x
- Guzman, J. D., Gupta, A., Bucar, F., Gibbons, S., & Bhakta, S. (2012). Antimycobacterials from natural sources: ancient times, antibiotic era and novel scaffolds. *Front Biosci*, 17(5), 1861-1881.
- Hanaa, M., Elshafie, M., Ismail, H., Mahmoud, M., & Ibrahim, H. CHEMICAL STUDIES AND PHYTOCHEMICAL SCREENING OF GRAPE SEEDS (*VITIS VINIFERA* L.).
- Harborne, A. (1998). *Phytochemical methods a guide to modern techniques of plant analysis*: springer science & business media.
- Herbert Baxter, J. B. H., Gerald P. Moss. (1998). *Phytochemical Dictionary: A Handbook of Bioactive Compounds from Plants*. (C. Press Ed. Second ed.).
- Hoffman, B., & Herrmann, K. (1982). Flavonol glycosides of wormwood (*Artemisia vulgaris*), tarragon (*Artemisia dracunculus*) and absinthe (*Artemisia absinthium*). 8. *Phenolics of spices. Z. Lebensm-Unters. Forsh*, 174(3), 211-215.
- Hoffman, A. S. (2012). Hydrogels for biomedical applications. *Advanced drug delivery reviews*, 64, 18-23.

- Hojageldiyev, T., Bolmammedov, Y., & Gurbanaliyev, S. (2019). Antimycobacterial activity of ethanolic extract of *Artemisia absinthium* L. *World Scientific News*, 119, 224-230.
- Hossain, M. M., Ahamed, S. K., Dewan, S. M. R., Hassan, M. M., Istiaq, A., Islam, M. S., & Moghal, M. M. R. (2014). In vivo antipyretic, antiemetic, in vitro membrane stabilization, antimicrobial, and cytotoxic activities of different extracts from *Spilanthes paniculata* leaves. *Biological Research*, 47(1), 1-9.
- Hostanska, K., Rostock, M., Suter, A., & Saller, R. (2010). Antiinflammatory profile of *Harpagophytum procumbens* crude extract and after its external metabolic activation in THP-1 monocytic cells in vitro. *Planta medica*, 76(12), P194.
- Huerta Melgarejo, Á. I. (2016). Evaluación in vitro de los extractos etanólicos de *Allium sativum*, *Allium cepa* y *Artemisia ludoviciana* sobre huevos y larvas infectantes de *Haemonchus contortus* y *Trichostrongylus colubriformis*.
- Hussain, M., Raja, N. I., Akram, A., Iftikhar, A., Ashfaq, D., Yasmeen, F. & Iqbal, M. A. (2017). A status review on the pharmacological implications of *Artemisia absinthium*: A critically endangered plant. *Asian Pac J Trop Dis*, 7(3), 185-192.
- Ian W. Southon, J. B. (1989). *Dictionary of Alkaloids*. (C. Press Ed. Second ed.).
- Islam, R. T., Ahmed, T., & Kishor, M. (2016). In vitro antioxidant activity of methanolic extract of *Helianthus annuus* seeds. *Journal of Medicinal Plants Studies*, 4(2), 15-17.
- Jaki, B., Orjala, J., Bürgi, H.-R., & Sticher, O. (1999). Biological screening of cyanobacteria for antimicrobial and molluscicidal activity, brine shrimp lethality, and cytotoxicity. *Pharmaceutical biology*, 37(2), 138-143.
- Jamil, S., Alam Khan, R., Afroz, S., & Ahmed, S. (2016). Phytochemistry, Brine shrimp lethality and mice acute oral toxicity studies on seed extracts of *Vernonia anthelmintica*. *Pakistan journal of pharmaceutical sciences*, 29(6).
- Jasso-GáNdara, S. N., Estrada-Castillon, E., Encina-DomíNquez, J. A., Villarreal Quintanilla, J. A., & Sierra, J. R. A. (2020). Plants used as medicinal in Güémez, Tamaulipas, north-eastern Mexico. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 48(3), 1130-1140.

- Jimenez, A., Meckes, M., Alvarez, V., Torres, J., & Parra, R. (2005). Secondary metabolites from *Chamaedora tepejilote* (Palmae) are active against *Mycobacterium tuberculosis*. *Phytother Res*, *19*(4), 320-322. doi:10.1002/ptr.1664
- Jimenez-Arellanes, A., Luna-Herrera, J., Cornejo-Garrido, J., Lopez-Garcia, S., Castro-Mussot, M. E., Meckes-Fischer, M., . . . Hernandez-Pando, R. (2013). Ursolic and oleanolic acids as antimicrobial and immunomodulatory compounds for tuberculosis treatment. *BMC Complement Altern Med*, *13*, 258. doi:10.1186/1472-6882-13-258
- Jimenez-Arellanes, A., Meckes, M., Ramirez, R., Torres, J., & Luna-Herrera, J. (2003). Activity against multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Mexican plants used to treat respiratory diseases. *Phytother Res*, *17*(8), 903-908. doi:10.1002/ptr.1377
- Jimenez-Arellanes, A., Meckes, M., Torres, J., & Luna-Herrera, J. (2007). Antimycobacterial triterpenoids from *Lantana hispida* (Verbenaceae). *J Ethnopharmacol*, *111*(2), 202-205. doi:10.1016/j.jep.2006.11.033
- Jyoti, M. A., Nam, K. W., Jang, W. S., Kim, Y. H., Kim, S. K., Lee, B. E., & Song, H. Y. (2016). Antimycobacterial activity of methanolic plant extract of *Artemisia capillaris* containing ursolic acid and hydroquinone against *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Chemother*, *22*(4), 200-208. doi:10.1016/j.jiac.2015.11.014
- Kamal, J. (2011). Quantification of alkaloids, phenols and flavonoids in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *African Journal of Biotechnology*, *10*(16), 3149-3151.
- Kerry, R. G., Gouda, S., Sil, B., Das, G., Shin, H.-S., Ghodake, G., & Patra, J. K. (2018). Cure of tuberculosis using nanotechnology: An overview. *Journal of Microbiology*, *56*(5), 287-299.
- Khan, K., Fatima, H., Taqi, M. M., Zia, M., & Mirza, B. (2015). Phytochemical and in vitro biological evaluation of *Artemisia scoparia* Waldst. & Kit for enhanced extraction of commercially significant bioactive compounds. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, *2*(3), 77-86.
- Kobarfard, F. (2010). Tuberculosis and traditional medicine: fighting the oldest infectious disease using the oldest source of medicines. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*(2), 71-72.

- Kokate, C. (1999). *Practical Pharmacognosy*. Vallabh Prakashan Publication. *New Delhi, India*, 115.
- Kolodziej, H. (2008). Aqueous ethanolic extract of the roots of *Pelargonium sidoides*--new scientific evidence for an old anti-infective phytopharmaceutical. *Planta Med*, 74(6), 661-666. doi:10.1055/s-2007-993778
- Kostić, A. Ž., Milinčić, D. D., Gašić, U. M., Nedić, N., Stanojević, S. P., Tešić, Ž. L., & Pešić, M. B. (2019). Polyphenolic profile and antioxidant properties of bee-collected pollen from sunflower (*Helianthus annuus* L.) plant. *LWT*, 112, 108244.
- Kumar, A. P., & Kumud, U. (2010). Pharmacognostic and Phytochemical investigation of aerial parts of *Artemisia pallens* Wall ex. Dc. *Pharmacognosy Journal*, 2(9), 285-288.
- Kumar, P., Singh, A., Sharma, U., Singh, D., Dobhal, M. P., & Singh, S. (2013). Anti-mycobacterial activity of plumericin and isoplumericin against MDR *Mycobacterium tuberculosis*. *Pulm Pharmacol Ther*, 26(3), 332-335. doi:10.1016/j.pupt.2013.01.003
- Kviecinski, M. R., Felipe, K. B., Schoenfelder, T., de Lemos Wiese, L. P., Rossi, M. H., Gonçalez, E., Pedrosa, R. C. (2008). Study of the antitumor potential of *Bidens pilosa* (Asteraceae) used in Brazilian folk medicine. *Journal of ethnopharmacology*, 117(1), 69-75.
- Lakshmanan, D., Werngren, J., Jose, L., Suja, K. P., Nair, M. S., Varma, R. L., Kumar, R. A. (2011). Ethyl p-methoxycinnamate isolated from a traditional anti-tuberculosis medicinal herb inhibits drug resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* in vitro. *Fitoterapia*, 82(5), 757-761. doi:10.1016/j.fitote.2011.03.006
- Latha, L. Y., Darah, I., Jain, K., & Sasidharan, S. (2010). Toxicity study of *Vernonia cinerea*. *Pharmaceutical biology*, 48(1), 101-104.
- Leon-Diaz, R., Meckes, M., Said-Fernandez, S., Molina-Salinas, G. M., Vargas-Villarreal, J., Torres, J., . . . Jimenez-Arellanes, A. (2010). Antimycobacterial neolignans isolated from *Aristolochia taliscana*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 105(1), 45-51. doi:10.1590/s0074-02762010000100006

- León-Díaz R, M. M., SAQid-Fernández S, Molina- Salinas GM, Vargas-Villarreal J, Torres J, Luna-Herrera J, Jiménez- Arellanes A. (2010). Antimycobacterial neolignans isolated from *Aristolochia taliscana*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.*, 105, 45-51.
- Liu, Q., Garner, P., Wang, Y., Huang, B., & Smith, H. (2008). Drugs and herbs given to prevent hepatotoxicity of tuberculosis therapy: systematic review of ingredients and evaluation studies. *BMC Public Health*, 8, 365. doi:10.1186/1471-2458-8-365
- Liu, S., da Silva Ferreira, J. F., Liu, L., Tang, Y., Tian, D., Liu, Z., & Tian, N. (2017). Isolation of dihydroartemisinic acid from the *Artemisia annua* L. by-product by combining ultrasound-assisted extraction with response surface methodology. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, c17-00192.
- Li, Y., Sun, F., & Zhang, W. (2019). Bedaquiline and delamanid in the treatment of multidrug-resistant tuberculosis: Promising but challenging. *Drug development research*, 80(1), 98-105
- Lone, S. H., Bhat, K. A., Naseer, S., Rather, R. A., Khuroo, M. A., & Tasduq, S. A. (2013). Isolation, cytotoxicity evaluation and HPLC-quantification of the chemical constituents from *Artemisia amygdalina* Decne. *Journal of Chromatography B*, 940, 135-141. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2013.09.027>
- López, A. F., Deladino, L., Alba, S. N., & Miriam, N. M. (2011). Encapsulación de compuestos bioactivos con alginatos para la industria de alimentos. *@ limentech, Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 10(1).
- Lu, J., Ye, S., Qin, R., Deng, Y., & Li, C. P. (2013). Effect of Chinese herbal medicine extracts on cell-mediated immunity in a rat model of tuberculosis induced by multiple drug-resistant bacilli. *Mol Med Rep*, 8(1), 227-232. doi:10.3892/mmr.2013.1491
- Luo, X., Pires, D., Ainsa, J., Gracia, B., Mulhovo, S., Duarte, A., Ferreira, M. (2011). Phytochemical characterization of antimycobacterial crude extracts from medicinal plants traditionally used in Mozambique. *Planta medica*, 77(12), PF48.
- Luo, X., Pires, D., Ainsa, J. A., Gracia, B., Duarte, N., Mulhovo, S., Ferreira, M. J. (2013). *Zanthoxylum capense* constituents with antimycobacterial activity against *Mycobacterium tuberculosis* in vitro and ex vivo within human macrophages. *J Ethnopharmacol*, 146(1), 417-422. doi:10.1016/j.jep.2013.01.013

- Luo, X., Pires, D., Ainsa, J. A., Gracia, B., Mulhovo, S., Duarte, A., Ferreira, M. J. (2011). Antimycobacterial evaluation and preliminary phytochemical investigation of selected medicinal plants traditionally used in Mozambique. *J Ethnopharmacol*, 137(1), 114-120. doi:10.1016/j.jep.2011.04.062
- Lyons, M. A. (2018). Modeling and simulation of pretomanid pharmacokinetics in pulmonary tuberculosis patients. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 62(7).
- Macías, F. A., Molinillo, J. M., Torres, A., Varela, R. M., & Castellano, D. (1997). Bioactive flavonoids from *Helianthus annuus* cultivars. *Phytochemistry*, 45(4), 683-687.
- Martin, R., & Deo, B. (2000). Effect of plant population on calendula (*Calendula officinalis* L.) flower production. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 28(1), 37-44.
- Martineau, A. R. (2012). Old wine in new bottles: vitamin D in the treatment and prevention of tuberculosis. *Proc Nutr Soc*, 71(1), 84-89. doi:10.1017/S0029665111003326
- Masoko, P., Mabusa, I. H., & Howard, R. L. (2016). Isolation of alpha-linolenic acid from *Sutherlandia frutescens* and its inhibition of *Mycobacterium tuberculosis*' shikimate kinase enzyme. *BMC Complement Altern Med*, 16, 366. doi:10.1186/s12906-016-1344-1
- Master, S. S., Rampini, S. K., Davis, A. S., Keller, C., Ehlers, S., Springer, B., Deretic, V. (2008). *Mycobacterium tuberculosis* prevents inflammasome activation. *Cell Host Microbe*, 3(4), 224-232. doi:10.1016/j.chom.2008.03.003
- Mativandlela, S. P. N. (2009). *Antituberculosis activity of flavonoids from Galenia africana L. var. Africana*. University of Pretoria,
- McCUNE, R. M., Feldmann, F. M., Lambert, H. P., & McDermott, W. (1966). Microbial persistence: I. The capacity of tubercle bacilli to survive sterilization in mouse tissues. *The Journal of experimental medicine*, 123(3), 445-468.
- Mehta, A., Srivastva, G., Kachhwaha, S., Sharma, M., & Kothari, S. (2013). Antimycobacterial activity of *Citrullus colocynthis* (L.) Schrad. against drug sensitive and drug resistant *Mycobacterium tuberculosis* and MOTT clinical isolates. *Journal of ethnopharmacology*, 149(1), 195-200.

- Mehta, A., Srivastva, G., Kachhwaha, S., Sharma, M., & Kothari, S. L. (2013). Antimycobacterial activity of *Citrullus colocynthis* (L.) Schrad. against drug sensitive and drug resistant *Mycobacterium tuberculosis* and MOTT clinical isolates. *J Ethnopharmacol*, 149(1), 195-200. doi:10.1016/j.jep.2013.06.022
- México., P. I. d. (2017). BIBLIOTECA DIGITAL de la Medicina Tradicional Mexicana. Retrieved from medicinatradicionalmexicana.unam.mx
- Meyer, B. N., Ferrigni, N. R., Putnam, J. E., Jacobsen, L. B., Nichols, D. E., & McLaughlin, J. L. (1982). Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Med*, 45(5), 31-34. doi:10.1055/s-2007-971236
- Migliori, G. B., D'Arcy Richardson, M., Sotgiu, G., & Lange, C. (2009). Multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis in the West. Europe and United States: epidemiology, surveillance, and control. *Clin Chest Med*, 30(4), 637-665, vii. doi:10.1016/j.ccm.2009.08.015
- Miranda, R. P., Agüero, J. A. R., & Rivera, J. R. A. (1999). Distribución geográfica y ecológica del Istafiate (*Artemisia ludoviciana* Nutt. ssp. *mexicana* (Willd. Ex Spreng.) Keck). *Botanical Sciences*, (64), 111-115.
- Mnengi, D., Kappo, A., Kambizi, L., & Nakin, M. (2014). Cytotoxicity of selected medicinal plants used in Mt. Frere District, South Africa. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 11(4), 62-65.
- Molina-Salinas, G. M., Borquez, J., Ardiles, A., Said-Fernandez, S., Loyola, L. A., San-Martin, A., . . . Pena-Rodriguez, L. M. (2010). Antituberculosis activity of natural and semisynthetic azorellane and mulinane diterpenoids. *Fitoterapia*, 81(1), 50-54. doi:10.1016/j.fitote.2009.07.005
- Mollazadeh, H., Cicero, A. F., Blesso, C. N., Pirro, M., Majeed, M., & Sahebkar, A. (2019). Immune modulation by curcumin: The role of interleukin-10. *Critical reviews in food science and nutrition*, 59(1), 89-101.
- Morlock, G. P., Metchock, B., Sikes, D., Crawford, J. T., & Cooksey, R. C. (2003). *ethA*, *inhA*, and *katG* loci of ethionamide-resistant clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *Antimicrob Agents Chemother*, 47(12), 3799-3805. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14638486>

- Moshi, M. J., Nondo, R. S., Haule, E. E., Mahunnah, R. L., & Kidukuli, A. W. (2014). Antimicrobial activity, acute toxicity and cytoprotective effect of *Crassocephalum vitellinum* (Benth.) S. Moore extract in a rat ethanol-HCl gastric ulcer model. *BMC research notes*, 7(1), 1-7.
- Moulding, T. S., Redeker, A. G., & Kanel, G. C. (1989). Twenty isoniazid-associated deaths in one state. *Am Rev Respir Dis*, 140(3), 700-705.
doi:10.1164/ajrccm/140.3.700
- Muchiutti, G. S., López Novello, L. H., Córscico, F. A., & Larrosa, V. J. (2019). Cápsulas de alginato para la protección de polifenoles presentes en el aceite esencial de orégano. *Ciencia, docencia y tecnología*, (59), 297-309.
- MURILLO, E., & DE LOS REYES, L. M. (2003). Potencial alelopático de los lixiviados acuosos y los extractos orgánicos de *Artemisia absinthium* (Asteracea). *Vitae*, 10(1), 51-58.
- Murray, J. F. (2004). A century of tuberculosis. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 169(11), 1181-1186.
- Naik, S. K., Mohanty, S., Padhi, A., Pati, R., & Sonawane, A. (2014). Evaluation of antibacterial and cytotoxic activity of *Artemisia nilagirica* and *Murraya koenigii* leaf extracts against mycobacteria and macrophages. *BMC complementary and alternative medicine*, 14(1), 87.
- Navarro-Garcia, V. M., Luna-Herrera, J., Rojas-Bribiesca, M. G., Alvarez-Fitz, P., & Rios, M. Y. (2011). Antibacterial activity of *Aristolochia brevipes* against multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Molecules*, 16(9), 7357-7364.
doi:10.3390/molecules16097357
- Nikolaeva, L. G., Maystat, T. V., Pylypchuk, V. S., Volyanskii, Y. L., Frolov, V. M., & Kutsyna, G. A. (2008). Cytokine profiles of HIV patients with pulmonary tuberculosis resulting from adjunct immunotherapy with herbal phytoconcentrates Dzherelo and Anemin. *Cytokine*, 44(3), 392-396. doi:10.1016/j.cyto.2008.10.009
- Nokerbek, S., Sakipova, Z., Chalupová, M., Nejezchlebová, M., & Hošek, J. (2017). Cytotoxic, anti-cancer, and anti-microbial effects of different extracts obtained from *Artemisia rupestris*. *Ceska a Slovenska farmacie: casopis Ceske farmaceuticke spolecnosti a Slovenske farmaceuticke spolecnosti*, 66(1), 15-22.

- O'Neill, T. E., Li, H., Colquhoun, C. D., Johnson, J. A., Webster, D., & Gray, C. A. (2014). Optimisation of the Microplate Resazurin Assay for Screening and Bioassay-guided Fractionation of Phytochemical Extracts against *Mycobacterium tuberculosis*. *Phytochemical Analysis*, 25(5), 461-467.
- Ogbole, O. O., & Ajaiyeoba, E. O. (2009). Traditional management of tuberculosis in Ogun State of Nigeria: the practice and ethnobotanical survey. *Afr J Tradit Complement Altern Med*, 7(1), 79-84. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21304616>
- Olivas-Quintero, S., López-Angulo, G., Montes-Avila, J., Díaz-Camacho, S. P., Vega-Aviña, R., López-Valenzuela, J. Á., . . . Delgado-Vargas, F. (2017). Chemical composition and biological activities of *Helicteres vegae* and *Heliopsis sinaloensis*. *Pharmaceutical biology*, 55(1), 1473-1482.
- Organization, U. N. I. D., Handa, S. S., Khanuja, S. P. S., Longo, G., & Rakesh, D. D. (2008). *Extraction technologies for medicinal and aromatic plants: Earth, Environmental and Marine Sciences and Technologies*.
- Organization, W. H. (2015). *Implementing The End TB Strategy: The Essentials*. 20 Avenue Appia, 1211 Geneva 27, Switzerland: WHO Press
- Pai, M. P., Momary, K. M., & Rodvold, K. A. (2006). Antibiotic drug interactions. *Med Clin North Am*, 90(6), 1223-1255. doi:10.1016/j.mcna.2006.06.008
- Palmero, D., Cruz, V., Museli, T., Pavlovsky, H., Fernández, J., & Waisman, J. (2010). Reacciones adversas a fármacos en tuberculosis multirresistente. *Medicina (Buenos Aires)*, 70(5), 427-433.
- Palomino, J., & Portaels, F. (1999). Simple procedure for drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* using a commercial colorimetric assay. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 18(5), 380-383.
- Pan SY, Z. S., Gao SH, Yu ZL, Zhang SF. (2013). New perspectives on how to discover drugs from herbal medicines: CAM's outstanding contribution to modern therapeutics. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2013, 627375. doi:10.1155/2013/627375
- Para-aminosalicylic acid. (2008). *Tuberculosis (Edinb)*, 88(2), 137-138. doi:10.1016/S1472-9792(08)70019-2

- Pauli GF, C. R., Inui T, Wang Y, Cho S, Fischer NH, Franzblau SG. . (2009). New perspectives on natural products in TB drug research. *Life Sci.*, 78, 485-494.
- Pezzella, A. T. (2019). History of Pulmonary Tuberculosis. *Thorac Surg Clin*, 29(1), 1-17. doi:10.1016/j.thorsurg.2018.09.002
- Philips, J. A. (2008). Mycobacterial manipulation of vacuolar sorting. *Cell Microbiol*, 10(12), 2408-2415. doi:10.1111/j.1462-5822.2008.01239.x
- Pontali, E., Sotgiu, G., Tiberi, S., Tadolini, M., Visca, D., D'Ambrosio, L., Migliori, G. B. (2018). Combined treatment of drug-resistant tuberculosis with bedaquiline and delamanid: a systematic review. *European Respiratory Journal*, 52(1).
- Pyrek, J. S. (1970). New pentacyclic diterpene acid: trachyloban-19-oic acid from sunflower. *Tetrahedron*, 26(21), 5029-5032.
- Qin, Q., Niu, J., Wang, Z., Xu, W., Qiao, Z., & Gu, Y. (2012). Astragalus membranaceus inhibits inflammation via phospho-P38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) and nuclear factor (NF)- κ B pathways in advanced glycation end product-stimulated macrophages. *International journal of molecular sciences*, 13(7), 8379-8387.
- Qurrat ul, A., Sharma, S., Khuller, G. K., & Garg, S. K. (2003). Alginate-based oral drug delivery system for tuberculosis: pharmacokinetics and therapeutic effects. *J Antimicrob Chemother*, 51(4), 931-938. doi:10.1093/jac/dkg165
- Raaman, N. (2006). Phytochemical techniques (pp. 19–22). In: New Delhi: New India Publishing Agency, Jai Bharat Printing Press.
- Rajab, M. S., Cantrell, C. L., Franzblau, S. G., & Fischer, N. H. (1998). Antimycobacterial activity of (E)-phytol and derivatives: a preliminary structure-activity study. *Planta medica*, 64(01), 2-4.
- Raj, N. K., & Sharma, C. P. (2003). Oral insulin--a perspective. *J Biomater Appl*, 17(3), 183-196. doi:10.1177/0885328203017003567
- Ralph L. Shriner, C. K. F. H., Terence C. Morril, David C. Morril. (2013). *Identificación sistémica de compuestos orgánicos*. (L. Wiley Ed. Segunda ed.).
- Ramakrishnan, S. (2004). *Textbook of medical biochemistry*. Orient Blackswan.
- Rangaka, M. X., Cavalcante, S. C., Marais, B. J., Thim, S., Martinson, N. A., Swaminathan, S., & Chaisson, R. E. (2015). Controlling the seedbeds of

- tuberculosis: diagnosis and treatment of tuberculosis infection. *The Lancet*, 386(10010), 2344-2353.
- Rashid, S., Rather, M. A., Shah, W. A., & Bhat, B. A. (2013). Chemical composition, antimicrobial, cytotoxic and antioxidant activities of the essential oil of *Artemisia indica* Willd. *Food Chemistry*, 138(1), 693-700.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.10.102>
- Rawal, T., & Butani, S. (2016). Combating Tuberculosis Infection: A Forbidding Challenge. *Indian J Pharm Sci*, 78(1), 8-16. Retrieved from
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27168676>
- Rehberg, N., Akone, H. S., Ioerger, T. R., Erlenkamp, G., Daletos, G., Gohlke, H., Kalscheuer, R. (2018). Chlorflavonin targets acetohydroxyacid synthase catalytic subunit IlvB1 for synergistic killing of *Mycobacterium tuberculosis*. *ACS infectious diseases*, 4(2), 123-134.
- Rijo, P., Simoes, M. F., Francisco, A. P., Rojas, R., Gilman, R. H., Vaisberg, A. J., Moiteiro, C. (2010). Antimycobacterial metabolites from *Plectranthus royleanone* derivatives against *Mycobacterium tuberculosis* strains. *Chem Biodivers*, 7(4), 922-932. doi:10.1002/cbdv.200900099
- Rios JL, R. M. (2005). Medicinal plants and antimicrobial activity. *J Ethnopharmacol*, 100, 80-84.
- Riss, T. L., Moravec, R. A., Niles, A. L., Duellman, S., Benink, H. A., Worzella, T. J., & Minor, L. (2016). Cell viability assays. *Assay Guidance Manual [Internet]*.
- Rivas-Morales, C., Oranday-Cárdenas, M. A., & Verde-Star, M. J. (2016). *Investigación en plantas de importancia médica*: OmniaScience.
- Robles-Zepeda, R. E., Coronado-Aceves, E. W., Velazquez-Contreras, C. A., Ruiz-Bustos, E., Navarro-Navarro, M., & Garibay-Escobar, A. (2013). In vitro anti-mycobacterial activity of nine medicinal plants used by ethnic groups in Sonora, Mexico. *BMC Complement Altern Med*, 13, 329. doi:10.1186/1472-6882-13-329
- Rodríguez-Rodríguez, S., Ruy-Díaz-Reynoso, S. J. A., & Vázquez-López, R. (2015). Tuberculosis concomitant with diabetes. *Revista Médica Del Hospital General De México*, 78(4), 183-187.

- Rusu, M., Tamas, M., Puica, C., Roman, I., & Sabadas, M. (2005). The hepatoprotective action of ten herbal extracts in CCl₄ intoxicated liver. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 19(9), 744-749.
- Rybak, M. J., Abate, B. J., Kang, S. L., Ruffing, M. J., Lerner, S. A., & Drusano, G. L. (1999). Prospective evaluation of the effect of an aminoglycoside dosing regimen on rates of observed nephrotoxicity and ototoxicity. *Antimicrob Agents Chemother*, 43(7), 1549-1555. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10390201>
- Sainz Sotomayor, P. (2017). Valorización y producción biotecnológica de biocidas a partir de dos especies de Artemisia (A. armeniaca, A. assoana).
- Sánchez, M. F. O. (2006). *Manual práctico de aceites esenciales, aromas y perfumes*: aiyana ediciones.
- Saikia, D., Parihar, S., Chanda, D., Ojha, S., Kumar, J., Chanotiya, C., Negi, A. S. (2010). Antitubercular potential of some semisynthetic analogues of phytol. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 20(2), 508-512.
- Sarker, S. D., Nahar, L., & Kumarasamy, Y. (2007). Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals. *Methods*, 42(4), 321-324.
- Scanga, C. A., Mohan, V., Joseph, H., Yu, K., Chan, J., & Flynn, J. L. (1999). Reactivation of latent tuberculosis: variations on the Cornell murine model. *Infection and immunity*, 67(9), 4531-4538.
- Seaworth, B. J. (2002). Multidrug-resistant tuberculosis. *Infect Dis Clin North Am*, 16(1), 73-105. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11917817>
- Sechi, L. A., Lezcano, I., Nunez, N., Espim, M., Dupre, I., Pinna, A., . . . Zanetti, S. (2001). Antibacterial activity of ozonized sunflower oil (Oleozon). *J Appl Microbiol*, 90(2), 279-284. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11168731>
- Serrano, A. G. (2017). Nuevos fármacos para el tratamiento de la tuberculosis. *MoleQla: revista de Ciencias de la Universidad Pablo de Olavide*, (27), 1.
- Sharma, A., & Cannoo, D. S. (2017). A comparative study of effects of extraction solvents/techniques on percentage yield, polyphenolic composition, and antioxidant potential of various extracts obtained from stems of *Nepeta leucophylla*: RP-

- HPLC-DAD assessment of its polyphenolic constituents. *Journal of Food Biochemistry*, 41(2), e12337.
- Shin, D. M., Jeon, B. Y., Lee, H. M., Jin, H. S., Yuk, J. M., Song, C. H., Jo, E. K. (2010). *Mycobacterium tuberculosis* eis regulates autophagy, inflammation, and cell death through redox-dependent signaling. *PLoS Pathog*, 6(12), e1001230. doi:10.1371/journal.ppat.1001230
- Shosteck, R. (1974). Flowers and Plants. In T. N. Y. T. Co. (Ed.), *An International Lexicon with Biographical Notes*. (pp. 329 pp.).
- Sierra, M., Barros, R., Gómez, D., Mejía, A., & Suarez, D. (2018). Productos naturales: metabolitos secundarios y aceites esenciales. In: Bogotá: Fundación Universitaria Agraria de Colombia.
- Silva, A. C., Santana, E. F., Saraiva, A. M., Coutinho, F. N., Castro, R. H., Pisciotano, M. N., . . . Albuquerque, U. P. (2013). Which approach is more effective in the selection of plants with antimicrobial activity? *Evid Based Complement Alternat Med*, 2013, 308980. doi:10.1155/2013/308980
- Skjak-Braek G, E. T. (1996). Application of alginate gels in biotechnology and biomedicine. *Carbohydr Eur*, 14, 19-25.
- Somoskovi, A., Parsons, L. M., & Salfinger, M. (2001). The molecular basis of resistance to isoniazid, rifampin, and pyrazinamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Respir Res*, 2(3), 164-168. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11686881>
- Sparkman, O. D., Penton, Z., & Kitson, F. G. (2011). *Gas chromatography and mass spectrometry: a practical guide*: Academic press.
- Srivastava, S., Ernst, J. D., & Desvignes, L. (2014). Beyond macrophages: the diversity of mononuclear cells in tuberculosis. *Immunological reviews*, 262(1), 179-192.
- Stashenko, E. E., & Martínez, J. R. (2010). Algunos aspectos prácticos para la identificación de analitos por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. *Scientia Chromatographica*, 2(1), 29-47.
- Stöhr, J. R., Xiao, P.-G., & Bauer, R. (2001). Constituents of Chinese Piper species and their inhibitory activity on prostaglandin and leukotriene biosynthesis in vitro. *Journal of ethnopharmacology*, 75(2-3), 133-139.


- Stojanovic, R., Belscak-Cvitanovic, A., Manojlovic, V., Komes, D., Nedovic, V., & Bugarski, B. (2012). Encapsulation of thyme (*Thymus serpyllum* L.) aqueous extract in calcium alginate beads. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92(3), 685-696.
- Subramani, R., Kumar, R., Prasad, P., & Aalbersberg, W. (2013). Cytotoxic and antibacterial substances against multi-drug resistant pathogens from marine sponge symbiont: Citrinin, a secondary metabolite of *Penicillium* sp. *Asian pacific journal of tropical biomedicine*, 3(4), 291-296.
- Sun, Z., Ren, G., Ma, Y., Wang, N., Ji, Y., Qi, Y., . . . Ruan, Q. (2010). Transcription pattern of UL131A-128 mRNA in clinical strains of human cytomegalovirus. *J Biosci*, 35(3), 365-370. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20826945>
- Sureram, S., Senadeera, S. P., Hongmanee, P., Mahidol, C., Ruchirawat, S., & Kittakoop, P. (2012). Antimycobacterial activity of bisbenzylisoquinoline alkaloids from *Tiliacora triandra* against multidrug-resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Bioorg Med Chem Lett*, 22(8), 2902-2905. doi:10.1016/j.bmcl.2012.02.053
- Tajender, V., & Saluja, J. (2006). INH induced status epilepticus: response to pyridoxine. *Indian J Chest Dis Allied Sci*, 48(3), 205-206. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18610679>
- Tamayo-Castillo, G., Romero-Chacón, R. M., Rosales-Ovares, K. M., Jiménez, A. M., Jiménez-Somarribas, A., Montenegro-Miranda, H. E., . . . Vargas-Salazar, L. D. (2001). Alkaloid contents in members of Lycopodiales. Contenidos de alcaloides en miembros de los Lycopodiales. *Journal of Tropical Medicinal Plants.*, 2(2), 155-161.
- Tariku, Y., Hymete, A., Hailu, A., & Rohloff, J. (2010). Essential-oil composition, antileishmanial, and toxicity study of *Artemisia abyssinica* and *Satureja punctata* ssp. *punctata* from Ethiopia. *Chemistry & biodiversity*, 7(4), 1009-1018.
- Thangaraj, P. (2016). Anti-diarrhoeal Activity. In *Pharmacological Assays of Plant-Based Natural Products* (pp. 129-130): Springer.



- Thwaites, G., Fisher, M., Hemingway, C., Scott, G., Solomon, T., Innes, J., & British Infection, S. (2009). British Infection Society guidelines for the diagnosis and treatment of tuberculosis of the central nervous system in adults and children. *J Infect*, 59(3), 167-187. doi:10.1016/j.jinf.2009.06.011
- Tong, Y., Jia, Q., & Sun, Y. (2009). A renal tuberculosis case: could Chinese medicine play a role? *J Altern Complement Med*, 15(8), 939-941. doi:10.1089/acm.2007.0759
- Torres-Juarez, F., Cardenas-Vargas, A., Montoya-Rosales, A., Gonzalez-Curiel, I., Garcia-Hernandez, M. H., Enciso-Moreno, J. A., Rivas-Santiago, B. (2015). LL-37 immunomodulatory activity during *Mycobacterium tuberculosis* infection in macrophages. *Infect Immun*, 83(12), 4495-4503. doi:10.1128/IAI.00936-15
- Tuberculosis.sinave.gob.mx (<http://tuberculosis.sinave.gob.mx>)
- Uc-Cachon, A. H., Borges-Argaez, R., Said-Fernandez, S., Vargas-Villarreal, J., Gonzalez-Salazar, F., Mendez-Gonzalez, M., Molina-Salinas, G. M. (2014). Naphthoquinones isolated from *Diospyros anisandra* exhibit potent activity against pan-resistant first-line drugs *Mycobacterium tuberculosis* strains. *Pulm Pharmacol Ther*, 27(1), 114-120. doi:10.1016/j.pupt.2013.08.001
- Uehara, K., & Kurita, O. (1991). Ultrastructural study on spore wall morphogenesis in *Lycopodium clavatum* (Lycopodiaceae). *American Journal of Botany*, 78(1), 24-36.
- Viciedo, R. E. D. (2007). *Farmacología de Terpenoides de Helianthus annuus L.* Paper presented at the Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia.
- Wagner, H., & Bladt, S. (1996). *Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas*: Springer Science & Business Media.
- Wang, M., Guan, X., Chi, Y., Robinson, N., & Liu, J. P. (2015). Chinese herbal medicine as adjuvant treatment to chemotherapy for multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB): A systematic review of randomised clinical trials. *Tuberculosis (Edinb)*, 95(4), 364-372. doi:10.1016/j.tube.2015.03.003
- Wang, Y., Li, Y., Ma, X., Ren, H., Fan, W., Leng, F., Wang, X. (2018). Extraction, purification, and bioactivities analyses of polysaccharides from *Glycyrrhiza uralensis*. *Industrial crops and products*, 122, 596-608.

- Webster, D., Lee, T. D., Moore, J., Manning, T., Kunimoto, D., LeBlanc, D., Gray, C. A. (2010). Antimycobacterial screening of traditional medicinal plants using the microplate resazurin assay. *Canadian journal of microbiology*, 56(6), 487-494.
- Wu, S., Zhang, Y., Sun, F., Chen, M., Zhou, L., Wang, N., & Zhan, S. (2016). Adverse events associated with the treatment of multidrug-resistant tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. *American journal of therapeutics*, 23(2), e521-e530.
- Yurkanis Bruice, P. (2007). *Fundamentos de Química Orgánica* (P. Educación Ed.). México.
- Zaheen, A., & Bloom, B. R. (2020). Tuberculosis in 2020 - New Approaches to a Continuing Global Health Crisis. *N Engl J Med*, 382(14), e26.
doi:10.1056/NEJMp2000325
- Zaida N. Juárez, L. R. H., Hagar Bach, Eugenio Sánchez-Arreola, Horacio Bach. (2015). Antifungal activity of essential oils extracted from *Agastache mexicana* ssp. *xolocotziana* and *Porophyllum linaria* against post-harvest pathogens. *Industrial Crops and Products*, 74, 178-182.

ANEXOS

Anexo 1. Ficha técnica de las plantas de estudio

Planta	Taxonomía	Características generales
<p><i>Artemisia ludoviciana</i></p>	 <p>Clase: Equisetopsida Subclase: Magnoliidae Superorden: Asterales Orden: Asterales Familia: Asteraceae Genéro: <i>Artemisia</i> L (Garden, 2017).</p> <p>Sinonimia botánica: <i>Artemisia mexicana</i> y <i>Artemisia vulgaris</i>. Sinonimia popular: estafiate, ajenjo, ajenjo del país, altamisa, altaniza, artemisia, azumate de Puebla, cola de zorrillo, esencia de mata verde, epazote de castilla, estomiate, hierba maestra, hierba maistra, incienso e istafiate (México., 2017).</p>	<p>Ecología: originario de Estados Unidos; América, México y Guatemala. Habita en clima cálido, semicálido, semiseco y templado, desde el nivel del mar a los 3900 msnm. Cultivada en huertos familiares, crece a orillas de caminos, en terrenos abandonados y es común en vegetación perturbada de bosques tropicales caducifolio, subperrifolio y perennifolio, bosque espinoso, matorral xerófilo, bosque mesófilo de montaña, bosques de encino, de pino, mixto de pino-encino y de junípero (México., 2017).</p> <p>Usos: dolor de estómago, antidiarreico, antiparasitario, anti espasmódico biliar, afección hepática, problemas menstruales, abortivo, puerperio, padecimientos respiratorios (amigdalitis, bronquitis catarro común, tos y tosferina), anti reumático, hemorroides, dolor de oído, nervios, dolor de cabeza y mareos.</p> <p>Farmacología: pocos estudios para verificar efectos diuréticos, como abortivo y como antibiótico de un extracto etanólico de las ramas para combatir <i>Klebsiella pneumonia</i>, <i>Salmonella gallinarum</i>, <i>Staphylococcus aureus</i>, <i>Mycobacterium smegmatis</i> y <i>Candida albicans</i> (con ausencia de actividad). El ácido hidroalcohólico retarda la acción del jugo gástrico y hace más lenta la digestión; sin embargo, no es tóxico y no ejerce ninguna otra influencia general o local (México., 2017).</p> <p>Compuestos: aceite esencial con monoterpenos, alcanfor, alfa y beta-belandrenos, limoneno, borneol, car-3-ene, alfa-pineno y crisantemol; sesquiterpenos y estafiatina. Las partes aéreas de la planta contiene monoterpenos, alcanfor y transcrisantenol, sesquiterpenos y flavonoides. La raíz contiene monoterpeno, cetona de artemisia, dos compuestos azufrados y tres alquinos y en la flor se han detectado sesquiterpenos, antemidín y armexifolina. Se considera una planta originaria y prácticamente sólo estudiada en México, con aplicación comprobada como antihelmíntico . (México., 2017)</p>

<p><i>Helianthus annuus</i></p>	 <p>Clase: Equisetopsida Subclase: Magnoliidae Superorden: Asteranae Orden: Asterales Familia: Asteraceae Genéro: <i>Helianthus</i> L (Garden, 2017).</p> <p>Sinonimia botánica: <i>Helianthus aridus</i>, <i>Helianthus jaegeri</i>, <i>Helianthus lenticularis</i>, <i>Helianthus lindheimerianus</i>, <i>Helianthus macrocarpus</i>, <i>Helianthus multiflorus</i> y <i>Helianthus ovatus</i> (Garden, 2017).</p> <p>Sinonimia popular: girasol, calom, jáquima, maravilla, mirasol, tlapololote, maíz de teja, acahual o flor de escudo (Shosteck, 1974).</p>	<p>Ecología: originaria de América boreal, habita en climas semicálido y semiseco entre los 200 y los 900 msnm. Planta silvestre, crece a orillas de caminos, asociada a vegetación perturbada de pastizal y matorral xerófilo(México., 2017).</p> <p>Usos: derrame pleural, resfriado común, úlceras y heridas de la piel, trastornos nerviosos, cefalea y dolores reumáticos (México., 2017), antimicrobiano contra <i>Staphylococci</i>, <i>Streptococci</i>, <i>Enterococci</i>, <i>Pseudomonas</i>, <i>Escherichia coli</i> y <i>MTB</i> (Sechi et al., 2001).</p> <p>Compuestos: extracto hexánico de las hojas contra MTB H37Rv, con MIC de 15.6, 250 ug/mL(Coronado-Aceves et al., 2016) y aceite “oleozon” (Sechi et al., 2001).</p>
<p><i>Lycopodium clavatum</i></p>		<p>Ecología: se distribuye ampliamente por todo el mundo (la variedad <i>aristatum</i> se distribuye en México, Antillas, Centroamérica, Sudamérica y nort de Argentina), en España se encuentra en los Pirineos, crece en terrenos silíceos, matorrales y bosques de</p>

	<p>Clase: Equiseptopsida</p> <p>Subclase: Lycopodiidae</p> <p>Orden: Lycopodiales</p> <p>Familia: Lycopodiaceae</p> <p>Genéro: Lycopodium L (Garden, 2017).</p> <p>Sinonimia botánica: <i>Lepidotis ciliata</i>, <i>Lepidotis clavata</i>, <i>Lepidotis inflexa</i>, <i>Lycopodium aristatum</i>, <i>Lycopodium ciliatum</i>, <i>Lycopodium contiguum</i>, <i>Lycopodium eriostachys</i>, <i>Lycopodium inflexum</i>, <i>Lycopodium piliferum</i>, <i>Lycopodium preslii</i>, <i>Lycopodium serpens</i>, <i>Lycopodium Trichiatum</i>, <i>Lycopodium trichophyllum</i> (Garden, 2017).</p> <p>Sinonimia popular: Licopodio, caminera y colchón de pobre</p>	<p>coníferas, en zonas templadas y frías del hemisferio Norte (Herbert Baxter, 1998).</p> <p>Usos: Funciones analgésicas, anti-inflamatorias y anti neuríticas, control de osteoporosis, anti reumáticas. Incremento de IFN-gamma, IL-12, citocinas Th1 y disminución de IL-10 en ratas infectadas con T. cruzi.(Brustolin Aleixo et al., 2017; Falkowski-Temporini et al., 2016)</p> <p>Compuestos: alcaloides, borbonicina, fawcettina, fawcettimina, flabelliformina y obscurina (Herbert Baxter, 1998; Ian W. Southon, 1989)</p>
--	---	--

Anexo 2. Resultados de citotoxicidad en el modelo de *Artemia* spp.

CL₅₀ para Artemias con extracto etanólico de *Artemisia ludoviciana*

Tabla de Predicciones Inversas para Concentración ppm

		LC Inferior 95.0%	LC Superior 95.0%
Porcentaje	Concentración ppm	Límite Conf.	Límite Conf.
0.1	-733.916	-1219.95	-502.092
0.5	-592.184	-999.819	-396.88
1.0	-523.447	-893.198	-345.717
2.0	-448.341	-776.849	-289.663
3.0	-400.689	-703.139	-253.988
4.0	-364.842	-647.764	-227.078
5.0	-335.684	-602.777	-205.132
6.0	-310.865	-564.534	-186.405
7.0	-289.104	-531.045	-169.943
8.0	-269.62	-501.097	-155.164
9.0	-251.899	-473.896	-141.688
10.0	-235.588	-448.892	-129.249
15.0	-168.053	-345.817	-77.3016
20.0	-114.379	-264.643	-35.2672
25.0	-68.3314	-195.859	1.64987
30.0	-26.9791	-135.148	35.8622
35.0	11.3399	-80.2726	68.9468
40.0	47.701	-30.0483	102.188
45.0	82.8808	16.0963	136.798
50.0	117.501	58.4394	173.925
55.0	152.121	97.3281	214.505
60.0	187.301	133.453	259.135
65.0	223.662	167.857	308.197
70.0	261.981	201.78	362.234
75.0	303.333	236.586	422.351
80.0	349.381	273.925	490.714
85.0	403.055	316.267	571.579
90.0	470.59	368.448	674.422
91.0	486.901	380.927	699.385
92.0	504.621	394.442	726.547
93.0	524.106	409.258	756.457
94.0	545.867	425.757	789.91
95.0	570.685	444.521	828.117
96.0	599.844	466.503	873.067
97.0	635.691	493.45	928.406
98.0	683.343	529.164	1002.08
99.0	758.449	585.264	1118.38
99.5	827.186	636.458	1224.97
99.9	968.918	741.71	1445.06

El StatAdvisor

Esta tabla muestra las predicciones inversas obtenidas del modelo ajustado. Las predicciones inversas indican el valor de Concentración ppm al cual el modelo alcanza ciertos porcentajes. Por ejemplo, el valor correspondiente a p=50% (LD50) es igual a 117.501. También se muestran intervalos fiduciaros aproximados de confianza para las predicciones inversas.

Análisis Probit - Art muertas/Art totales

Variable dependiente: Art_muertas/Art_totales

Tamaños de muestra: Artemias totales

Factores:

Concentración ppm

Modelo Estimado de Regresión (Máxima Verosimilitud)

	<i>Error</i>	
<i>Parámetro</i>	<i>Estimado</i>	<i>Estándar</i>
CONSTANTE	-0.426474	0.130298
Concentración ppm	0.00362954	0.000664395

Análisis de Desviación

<i>Fuente</i>	<i>Desviación</i>	<i>Gl</i>	<i>Valor-P</i>
Modelo	73.3432	1	0.0000
Residuo	30.0574	19	0.0511
Total (corr.)	103.401	20	

Porcentaje de desviación explicado por el modelo = 70.9311

Porcentaje ajustado = 67.0627

Pruebas de Razón de Verosimilitud

<i>Factor</i>	<i>Chi-Cuadrada</i>	<i>Gl</i>	<i>Valor-P</i>
Concentración ppm	73.3432	1	0.0000

Análisis de Residuos

	<i>Estimación</i>	<i>Validación</i>
n	21	
CME	0.104302	
MAE	0.0951932	
MAPE	39.6949	
ME	0.00837778	
MPE	-27.2534	

El StatAdvisor

La salida muestra los resultados de ajustar un modelo de regresión probit para describir la relación entre Art_muertas/Art_totales y 1 variable(s) independiente(s). La ecuación del modelo ajustado es

$$\text{Art_muertas/Art_totales} = \text{normal}(\eta)$$

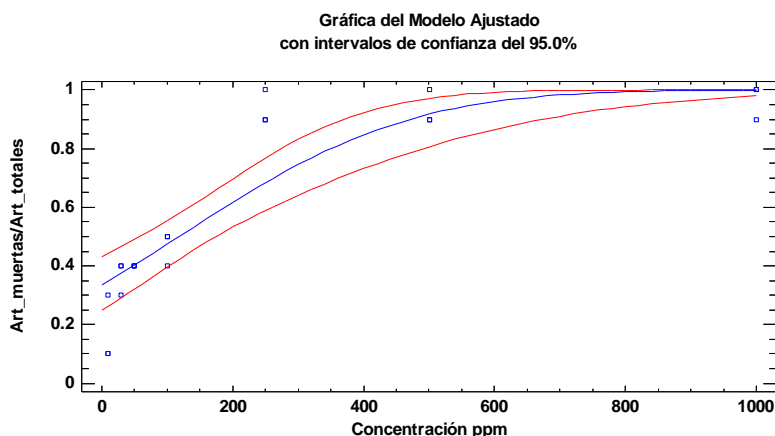
en donde

$$\eta = -0.426474 + 0.00362954 * \text{Concentración ppm}$$

Como el valor-P de la tabla de Análisis de Desviaciones es menor que 0.05, existe una relación estadísticamente significativa entre las variables, con un nivel de confianza del 95.0%. Además, el valor-P para los residuos es mayor o igual que 0.05, indicando que el modelo no es significativamente peor que el mejor modelo posible para estos datos con un nivel de confianza del 95.0% o mayor.

Esta ventana también muestra que el porcentaje de desviación de Art_muertas/Art_totales explicado por el modelo es igual a 70.9311%. Este estadístico es similar al estadístico R-Cuadrada habitual. El porcentaje ajustado, que es más apropiado para comparar modelos con diferente número de variables independientes, es 67.0627%.

Para determinar si el modelo puede ser simplificado, note que el valor-P más alto para las pruebas de verosimilitud es 0.0000, que pertenece a Concentración ppm. Como el valor-P es menor que 0.05, ese término es estadísticamente significativo al nivel de confianza del 95.0%. Consecuentemente, usted probablemente no quisiera eliminar ninguna variable del modelo.



Análisis Probit - Art_muertas/Art_totales del extracto hexánico de *A. ludoviciana*

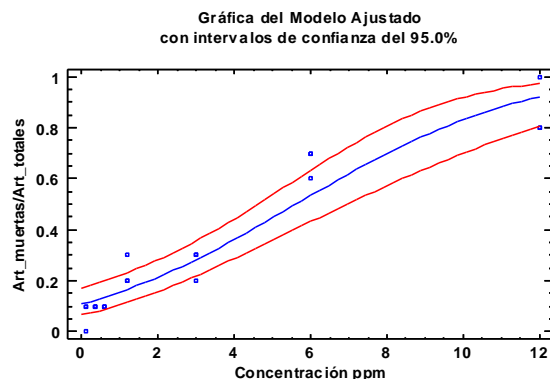
Análisis de Desviación

Fuente	Desviación	Gl	Valor-P
Modelo	77.7203	1	0.0000
Residuo	11.6077	19	0.9017
Total (corr.)	89.328	20	

El StatAdvisor

La ecuación del modelo ajustado es $-1.23342 + 0.219522 * \text{Concentración ppm}$

Como el valor-P de la tabla de Análisis de Desviaciones es menor que 0.05, existe una relación estadísticamente significativa entre las variables, con un nivel de confianza del 95.0%. Además, el valor-P para los residuos es mayor o igual que 0.05, indicando que el modelo no es significativamente peor que el mejor modelo posible para estos datos con un nivel de confianza del 95.0% o mayor.



Análisis Probit - Art_muertas/Art_totales del extracto Acetato de etilo de *A.*

ludoviciana

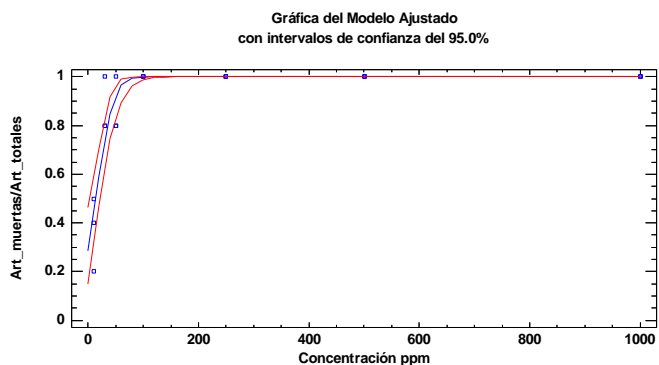
Análisis de Desviación

Fuente	Desviación	Gl	Valor-P
Modelo	69.8367	1	0.0000
Residuo	13.9379	19	0.7873
Total (corr.)	83.7746	20	

El StatAdvisor

La ecuación del modelo ajustado es $-0.565959 + 0.0398532 * \text{Concentración ppm}$

Como el valor-P de la tabla de Análisis de Desviaciones es menor que 0.05, existe una relación estadísticamente significativa entre las variables, con un nivel de confianza del 95.0%. Además, el valor-P



para los residuos es mayor o igual que 0.05, indicando que el modelo no es significativamente peor que el mejor modelo posible para estos datos con un nivel de confianza del 95.0% o mayor.

Análisis Probit - Art_muertas/Art_totales del extracto etanólico de *A. ludoviciana*

Análisis de Desviación

Fuente	Desviación	Gl	Valor-P
Modelo	68.9391	1	0.0000
Residuo	15.6858	19	0.6781
Total (corr.)	84.6249	20	

El StatAdvisor

La ecuación del modelo ajustado es $= -1.23342 + 0.219522 * \text{Concentración ppm}$

Como el valor-P de la tabla de Análisis de Desviaciones es menor que 0.05, existe una relación estadísticamente significativa entre las variables, con un nivel de confianza del 95.0%. Además, el valor-P para los residuos es mayor o igual que 0.05, indicando que el modelo no es significativamente peor que el mejor modelo posible para estos datos con un nivel de confianza del 95.0% o mayor.

Análisis Probit - Art_muertas/Art_totales del extracto metanólico de *A. ludoviciana*

Análisis de Desviación

Fuente	Desviación	Gl	Valor-P
Modelo	54.0731	1	0.0000
Residuo	81.1501	19	0.0000
Total (corr.)	135.223	20	

El StatAdvisor

La ecuación del modelo ajustado es $= -0.0482852 + 0.00344176 * \text{Concentración ppm}$

Como el valor-P de la tabla de Análisis de Desviaciones es menor que 0.05, existe una relación estadísticamente significativa entre las variables, con un nivel de confianza del 95.0%. Además, el valor-P para los residuos es mayor o igual que 0.05, indicando que el modelo no es significativamente peor que el mejor modelo posible para estos datos con un nivel de confianza del 95.0% o mayor.

Análisis Probit - Art_muertas/Art_totales del extracto de acetato de etilo de *L.*

clavatum

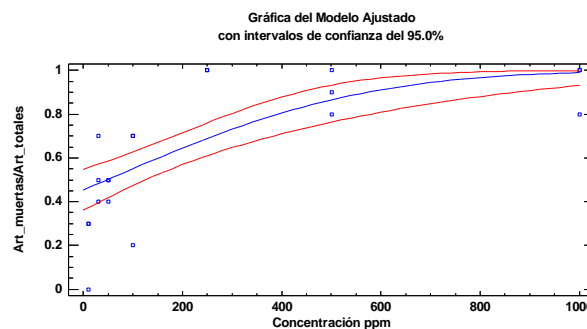
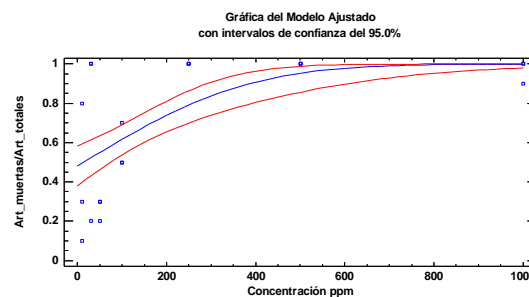
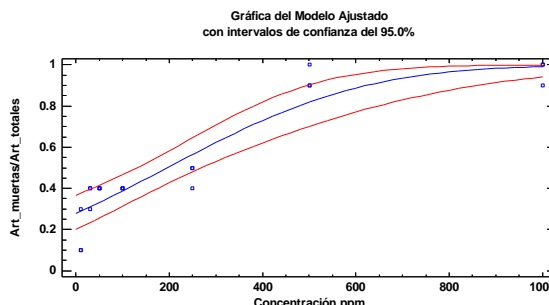
Análisis de Desviación

Fuente	Desviación	Gl	Valor-P
Modelo	46.1995	1	0.0000
Residuo	58.9823	19	0.0000
Total (corr.)	105.182	20	

El StatAdvisor

La ecuación del modelo ajustado es $= -0.117033 + 0.00244519 * \text{Concentración ppm}$

Como el valor-P de la tabla de Análisis de Desviaciones es menor que 0.05, existe una relación estadísticamente significativa entre las variables, con un nivel de confianza del 95.0%. Además, el valor-P



para los residuos es mayor o igual que 0.05, indicando que el modelo no es significativamente peor que el mejor modelo posible para estos datos con un nivel de confianza del 95.0% o mayor.

Análisis Probit - Art_muertas/Art_totales del extracto etanólico de *L. clavatum*

Análisis de Desviación

Fuente	Desviación	Gl	Valor-P
Modelo	78.1129	1	0.0000
Residuo	25.0091	19	0.1602
Total (corr.)	103.122	20	

El StatAdvisor

La ecuación del modelo ajustado es $-0.75731 + 0.00314399 * \text{Concentración ppm}$

Como el valor-P de la tabla de Análisis de Desviaciones es menor que 0.05, existe una relación estadísticamente significativa entre las variables, con un nivel de confianza del 95.0%.

Además, el valor-P para los residuos es mayor o igual que 0.05, indicando que el modelo no es significativamente peor que el mejor modelo posible para estos datos con un nivel de confianza del 95.0% o mayor.

Análisis Probit - Art_muertas/Art_totales del extracto metanólico de *L. clavatum*

Análisis de Desviación

Fuente	Desviación	Gl	Valor-P
Modelo	53.2782	1	0.0000
Residuo	21.4835	19	0.3107
Total (corr.)	74.7617	20	

El StatAdvisor

La ecuación del modelo ajustado es $-0.368561 + 0.00254148 * \text{Concentración ppm}$

Como el valor-P de la tabla de Análisis de Desviaciones es menor que 0.05, existe una relación estadísticamente significativa entre las variables, con un nivel de confianza del 95.0%.

Además, el valor-P para los residuos es mayor o igual que 0.05, indicando que el modelo no es significativamente peor que el mejor modelo posible para estos datos con un nivel de confianza del 95.0% o mayor.

Análisis Probit - Art_muertas/Art_totales del extracto hexánico de *H. annus* var.

Autumn Beauty

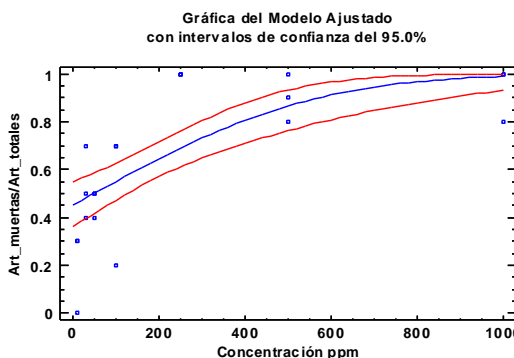
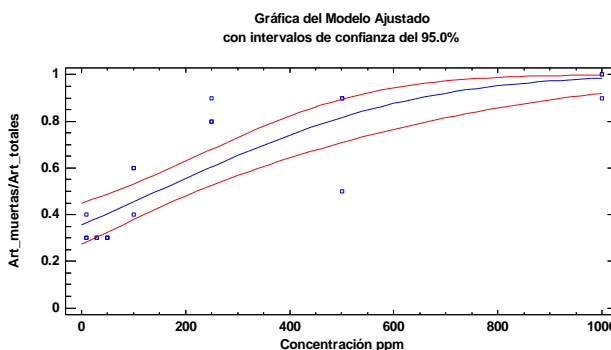
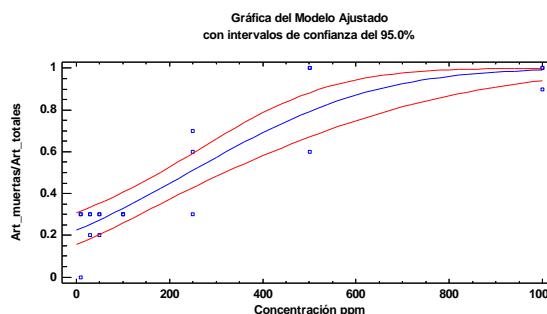
Análisis de Desviación

Fuente	Desviación	Gl	Valor-P
Modelo	46.1995	1	0.0000
Residuo	58.9823	19	0.0000
Total (corr.)	105.182	20	

El StatAdvisor

La ecuación del modelo ajustado es $-0.117033 + 0.00244519 * \text{Concentración ppm}$

Como el valor-P de la tabla de Análisis de Desviaciones es menor que 0.05, existe una relación estadísticamente significativa entre las variables, con un nivel de confianza del 95.0%.



para los residuos es mayor o igual que 0.05, indicando que el modelo no es significativamente peor que el mejor modelo posible para estos datos con un nivel de confianza del 95.0% o mayor.

Análisis Probit - Art_muertas/Art_totales del extracto de acetato de etilo de *H. annus*

var. *Autumn Beauty*

Análisis de Desviación

Fuente	Desviación	Gl	Valor-P
Modelo	91.2491	1	0.0000
Residuo	7.25263	19	0.9927
Total (corr.)	98.5017	20	

El StatAdvisor

La ecuación del modelo ajustado = $-1.03025 + 0.0511957 * \text{Concentración ppm}$

Como el valor-P de la tabla de Análisis de Desviaciones es menor que 0.05, existe una relación estadísticamente significativa entre las variables, con un nivel de confianza del 95.0%. Además, el valor-P para los residuos es mayor o igual que 0.05, indicando que el modelo no es significativamente peor que el mejor modelo posible para estos datos con un nivel de confianza del 95.0% o mayor.

Análisis Probit - Art_muertas/Art_totales del extracto etanólico de *H. annus* var.

Autumn Beauty

Análisis de Desviación

Fuente	Desviación	Gl	Valor-P
Modelo	9.25929	1	0.0023
Residuo	41.96	19	0.0018
Total (corr.)	51.2193	20	

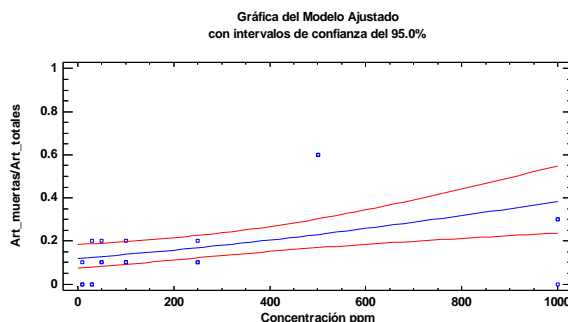
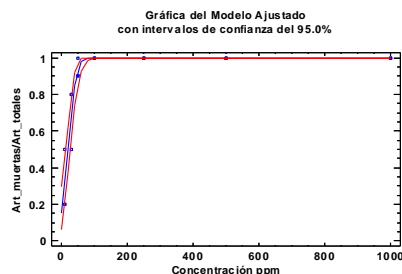
El StatAdvisor

La ecuación del modelo ajustado = $-1.17826 + 0.000880697 * \text{Concentración ppm}$

Como el valor-P de la tabla de Análisis de Desviaciones es menor que 0.05, existe una relación estadísticamente significativa entre las variables, con un nivel de confianza del 95.0%. Además, el valor-P para los residuos es mayor o igual que 0.05, indicando que el modelo no es significativamente peor que el mejor modelo posible para estos datos con un nivel de confianza del 95.0% o mayor.

Análisis Probit - Art_muertas/Art_totales del extracto metanólico de *H. annus* var.

Autumn Beauty



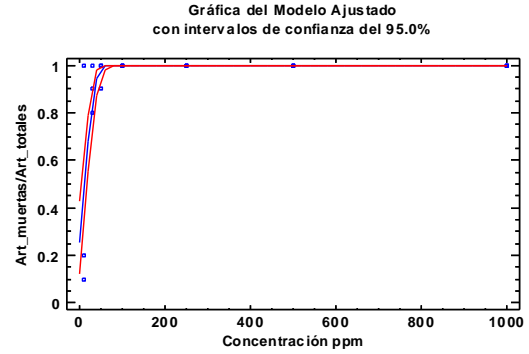
Análisis de Desviación

Fuente	Desviación	Gl	Valor-P
Modelo	65.9511	1	0.0000
Residuo	31.0627	19	0.0397
Total (corr.)	97.0138	20	

El StatAdvisor

La ecuación del modelo ajustado = $-0.667202 + 0.056834 \cdot \text{Concentración ppm}$

Como el valor-P de la tabla de Análisis de Desviaciones es menor que 0.05, existe una relación estadísticamente significativa entre las variables, con un nivel de confianza del 95.0%. Además, el valor-P para los residuos es mayor o igual que 0.05, indicando que el modelo no es significativamente peor que el mejor modelo posible para estos datos con un nivel de confianza del 95.0% o mayor.



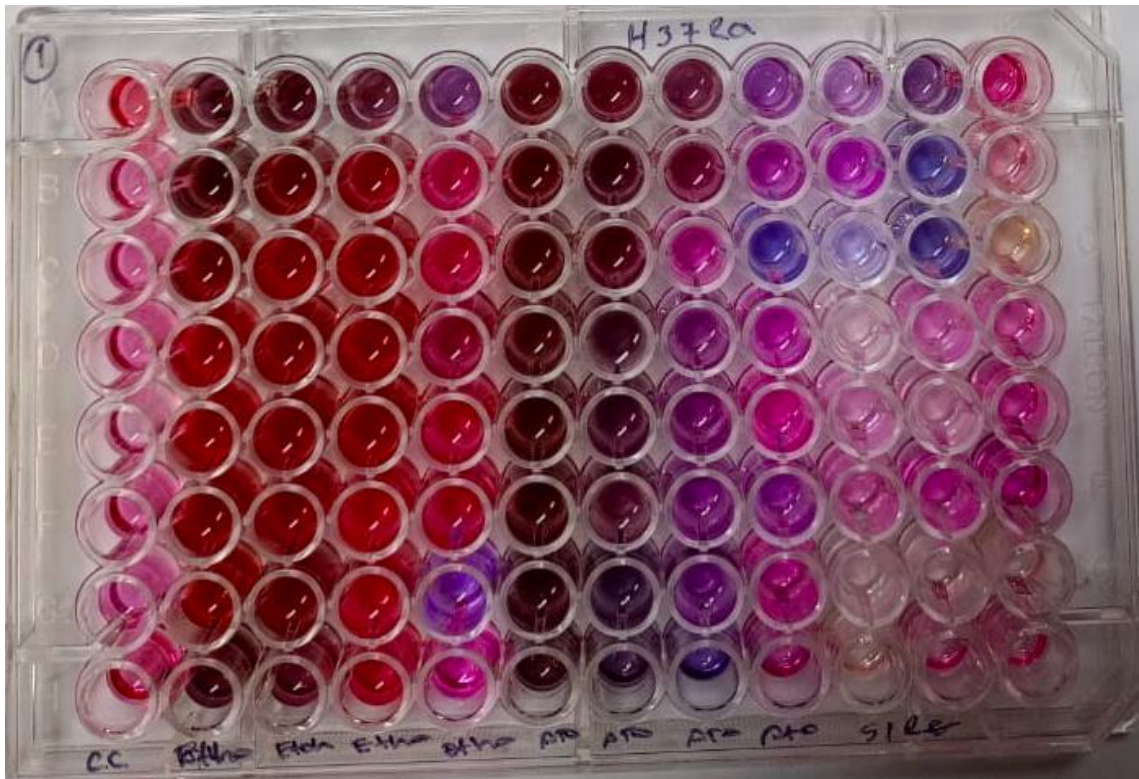
Anexo 3. Pruebas fitoquímica preliminares

Componentes fitoquímicos del extracto etanólico de *Artemisia ludoviciana*

Ensayo preliminar	Resultado	Metabolito secundario
Mayer	-	Alcaloides
Wagner	++	
Dragendorff	+++	
Agua caliente/espuma	-	Saponinas
Rosenthaler	-	
Triterpenos	+	Triterpenos
Cloruro ferrico	++	Taninos hidrolizables o gálicos
Reactivo de gelatina	+	Taninos condensados o derivados del catecol
Vapores de amoniaco	++	Flavonoides
Shinoda	++	
Pew	+	
Hidróxido de sodio	++	
Grignard	-	Glucósidos cianogénicos
Baljet	+	Glucósidos cardiotónicos y lactonas sesquiterpénicas
Legal	++	
Cloruro de antimonio	-	

+++ = abundante; ++ = moderado; + = escaso; - = ausente.

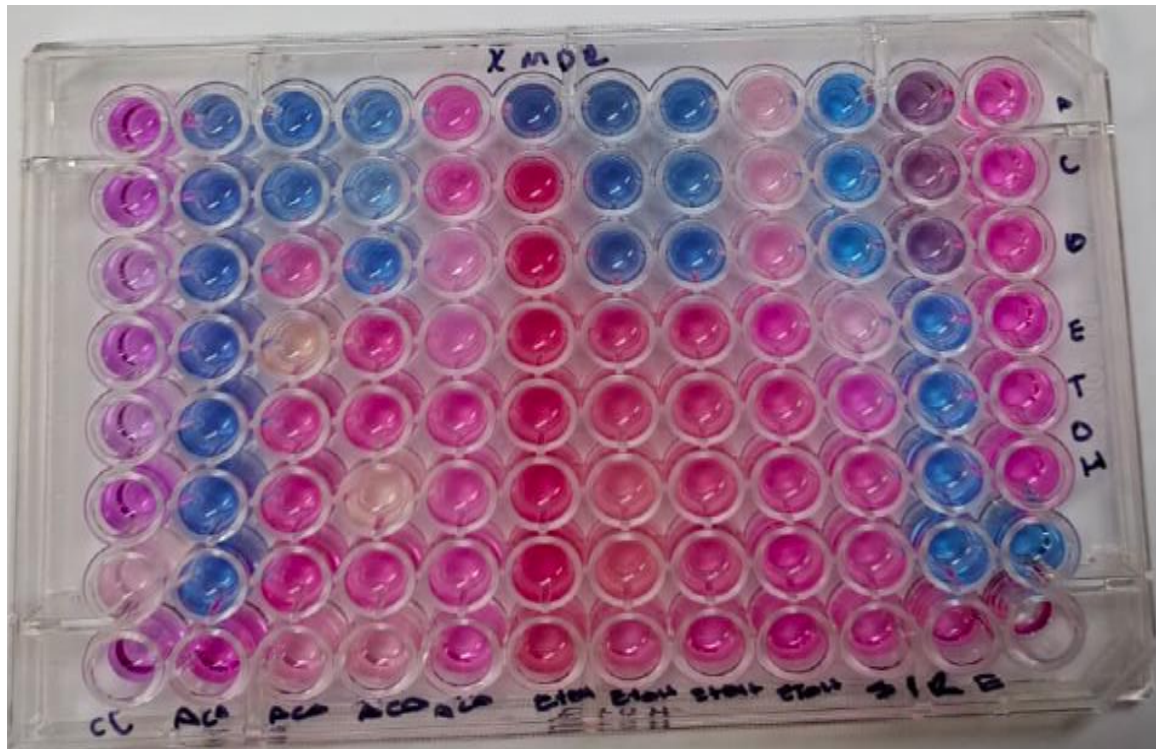
Anexo 4. Actividad antimicrobiana de los extractos de *Artemisia ludoviciana* contra diversas cepas de *Mtb*, en el modelo de resazurina.



4.1 Actividad antimicrobiana de los extractos etanólico y acetato de etilo contra la cepa experimental H37Ra.



4.2 Actividad antimicrobiana de los extractos etanólico y acetato de etilo contra cepa clínica sensible de *Mtb*.



4.3 Actividad antimicrobiana de los extractos etanólico y acetato de etilo contra cepa clínica multidrogorresistente de *Mtb*.

Anexo 5. Biocompuestos identificados por cromatografía de gases acoplada a espectrómetro de masas, en los extractos etanólicos y acetato de etilo de *Artemisia ludoviciana*



LABORATORIO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA AGRÍCOLA MÉDICA Y AMBIENTAL
Camino a la Presa San José No. 2053, Lomas Cuarta Sección,
Tel. 01 444 8342000 EXT. 7287/4004
<http://www.ipicyt.edu.mx/>, lanbama@ipicyt.edu.mx



INFORME DE RESULTADOS

Tabla 1. Extracto etanólico de *Artemisia ludoviciana*.

Extracto etanólico de <i>Artemisia ludoviciana</i>			
No.	tr (min)	Área	Compuesto detectado
1	3.419	265998405	Tujona
2	4.016	768118997	(+) - 2-Bornanona
3	4.419	620193726	Alcanfor de borneo
4	21.536	231710762	Óxido de cariofileno
5	25.292	134027679	(+) - Valeranona
6	38.802	294434218	Palmitato de etilo
7	44.701	331141641	Fitol
8	46.957	305134967	9,12,15-octadecatrienoato de etilo
9	48.051	2243375591	Achillin*
10	48.513	3649673449	Achillin*
11	73.536	224318103	Estigmasterol
12	74.734	633399606	γ -Sitosterol
13	74.806	190296655	β -amirina
14	75.635	402528406	α -amirina
15	77.769	244503969	Ester metílico del ácido 3-oxo-urs-12-en-24-oico

Note: *** es el mismo compuesto, pero al realizarse la deconvolución el programa fragmenta al pico originando varios tiempos de retención con el mismo compuesto.

Tabla 2. Extracto de acetato de etilo de *Artemisia ludoviciana*.

Extracto acetato de etilo de <i>Artemisia ludoviciana</i>			
No.	tr (min)	Área	Compuesto detectado
1	3.43	475638136	Tujona
2	4.025	981727697	(+) - 2-Bornanona
3	4.431	806651614	Alcanfor de borneo
4	7.122	434352301	3,7-dimetil-1,7-octadieno-3,6-diol
5	21.498	245705392	Óxido de cariofileno
6	25.293	290900080	(+) - Valeranona
7	48.754	2846254873	Achillin*
8	48.81	617521391	Achillin*
9	48.996	2485025716	Achillin*
10	49.06	1386093698	Achillin*
11	49.181	1381568084	Achillin*
12	49.339	2583501369	Achillin*
13	49.394	1249123643	Achillin*
14	63.615	421006320	Tereftalato de di (2-etilhexilo)
15	73.503	136322322	Estigmasterol
16	74.658	295463429	γ -Sitosterol

Note: *** es el mismo compuesto, pero al realizarse la deconvolución el programa fragmenta al pico originando varios tiempos de retención con el mismo compuesto.

L.Q. María Guadalupe Ortega Salazar

Dr. Ángel G. Alpuche Solís
Jefe de LANBAMA

Técnicos SCA
Responsables del Análisis

Este informe no puede ser reproducido ni modificado sin la aprobación por escrito del LANBAMA. Los datos y resultados en este informe corresponden exclusivamente a las muestras que se describen en él y son válidos únicamente bajo las condiciones especificadas en las que se realizó el ensayo. Cualquier duda o aclaración sobre este informe comuníquese con el Dr. Ángel G. Alpuche, como electrónico apuche@ipicyt.edu.mx o al teléfono 01 444 8342000 ext. 2088