

Trabajo Científico

Actividad antituberculosa del extracto de *Carya illinoensis*

Antituberculosis activity of a *Carya illinoensis* extract

Sáenz Esqueda María de los Angeles,¹ Álvarez Román Rocío,² Castro Ríos Rocío,²
Gómez Flores Ricardo,³ Nuñez Rodríguez María Adriana,¹ Galindo Rodríguez Sergio A.,¹
Chávez Montes Abelardo.¹

¹Departamento de Química, Cuerpo Académico de Químico-Biológica, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León

²Departamento de Química Analítica, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León

³Unidad de Inmunobiología y Acarreadores de Drogas. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León

Resumen

Se evaluó la actividad antituberculosa del extracto hexánico de *Carya illinoensis* (CIH) y dos de sus fracciones, metanólica (CIFM) y no metanólica (CIFNM), identificando las moléculas responsables de esta actividad. Tanto CIH, como CIFM y CIFNM presentaron actividad antituberculosa a una concentración de 125 µg mL⁻¹, con 80, 50 y 70 % de inhibición, respectivamente. Se encontró que los principales componentes del extracto y sus fracciones son tres fitoesteroles y un triterpenoide pentacíclico: β-sitosterol, α-amirina, sitostenona y ácido betulínico. La presencia de estos compuestos ofrece un nuevo panorama de las moléculas responsables de la actividad antituberculosa en la corteza de CIH y la posibilidad de explorar otras aplicaciones farmacéuticas para esta planta.

Abstract

Antituberculosis activity was assessed for a hexanic extract of *Carya illinoensis* (CIH) and its methanolic (CIFM) and non-methanolic (CIFNM) fractions. CIH, CIFM and CIFNM presented antimycobacterial activity at a concentration of 125 µg mL⁻¹ with inhibitions of 80, 50 and 70%, respectively. The main components in the extract and fractions were found to be three phytosterols and a pentacyclic triterpenoid: sitosterol, amyirin, sitostenone and betulinic acid. The presence of these compounds offers a new view on the kind of molecules responsible for the antituberculosis activity in the cortex of *C. illinoensis* and the possibility of exploring pharmaceutical applications for this plant.

Palabras clave: Tuberculosis, β-sitosterol, ácido betulínico *Carya illinoensis*.

Key words: Tuberculosis, β-sitosterol, betulinic acid, *Carya illinoensis*.

Correspondencia:

M. en C. María de los Angeles Sáenz Esqueda
Departamento de Química, Cuerpo Académico de
Químico-Biológica
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad Autónoma de Nuevo León
Pedro de Alba y M.L. Barragán s/n. Cd. Universitaria, San
Nicolás de los Garza, N.L. C.P. 66450.
e-mail: saenz_00@hotmail.com

Fecha de recepción: 20 de diciembre de 2011
Fecha de recepción de modificaciones: 3 de mayo de 2012
Fecha de aceptación: 1 de junio de 2012

Introducción

La tuberculosis (TB) es una infección del sistema respiratorio que puede llegar a ser mortal y representa uno de los principales retos de salud pública debido a su alta incidencia.¹ Más de 2000 millones de personas, es decir un tercio de la población mundial, están infectadas con el bacilo de la TB; esta enfermedad es una de las principales causas de muerte en las personas infectadas con VIH.²

A pesar de que el tratamiento farmacológico para la TB ha estado disponible desde hace 50 años, esta enfermedad sigue siendo la primera causa de muerte por infecciones prevenibles.³ Anualmente aparecen 9 millones de casos nuevos y cerca de 3 millones de personas mueren por esta causa.^{4,5}

Actualmente, el tratamiento más efectivo es una combinación de cuatro fármacos antituberculosis de primera línea: isoniazida, rifampicina, etambutol y pirazinamida.^{6,7} Sin embargo, la prolongada farmacoterapia y las altas dosis de ésta afectan la calidad de vida del paciente y dificultan el seguimiento estricto del tratamiento, lo cual contribuye al desarrollo de cepas farmacorresistentes (TB-MDR).⁸

Para el tratamiento de las cepas TB-MDR se emplean fármacos de segunda línea como la capreomicina, la kanamicina, la amikacina y las fluoroquinolonas, que tienen la desventaja de ser poco específicos, provocar severos efectos secundarios, inducir fácilmente resistencia y ser de elevado costo. Además, los tratamientos son aun más prolongados que los disponibles para las cepas no resistentes y en consecuencia de escaso apego.⁹⁻¹¹

Recientemente la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha reportado la aparición de cepas de resistencia extendida (TB-XDR), para las cuales no existe alternativa de tratamiento y responden precariamente ante fármacos de primera y segunda línea, por lo cual la necesidad de descubrir nuevos compuestos para la terapia de la TB se ha tornado urgente.^{10,12,13}

Los productos naturales y sus derivados semisintéticos, son importantes fuentes de nuevos fármacos anti-infecciosos, que juegan un papel significativo en la quimioterapia contra la TB. Como ejemplo de este tipo de compuestos puede mencionarse a antibióticos aminoglicósidos como la estreptomina, aislada de *Streptomyces griseus*¹⁴ y sus derivados kanamicina¹⁵ y amikacina,¹⁶ péptidos cíclicos como la viomicina¹⁷ y las capreomicinas 1A y 1B, aisladas de *Streptomyces capreolus* NRRL 2773,¹⁸⁻¹⁹ la rifamicina, rifabutina y rifapentina, análogos de la rifampicina²⁰ aislada de *Streptomyces mediterranei*.²¹

Estos productos naturales exhiben un amplio rango de actividad *in vitro* contra *M. tuberculosis* con concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) que van desde 0.2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para la

rifampicina, 0.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para estreptomina, 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para la amikacina, 4 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para la viomicina, 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para las capreomicinas hasta 6 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para la kanamicina.²²

Los productos naturales representan una ruta alterna en la búsqueda de nuevos agentes antituberculosos, la caracterización de los compuestos presentes en los extractos naturales es el primer paso para encontrar nuevos fitoquímicos.²³⁻²⁷ La actividad farmacológica de las plantas reside principalmente en los metabolitos secundarios, que han llegado a un primer plano de interés debido a su variada actividad biológica. Estas sustancias comprenden más de 30,000 compuestos diferentes identificados hasta ahora, que se han clasificado como: triterpenos, saponinas, fitoesteroles y/o sus precursores.²⁸⁻³⁰

Investigaciones previas han reportado que las especies de bacterias pertenecientes al género *Mycobacterium* son sensibles a algunos triterpenos, como el ácido betulínico.³¹ La principal fuente del ácido betulínico son las plantas pertenecientes a las familias *Betulaceae*, *Ebenaceae* y *Poniaceae*. El interés en este compuesto ha crecido en los últimos diez años, debido a sus propiedades farmacológicas, como la actividad anticancerígena, anti-VIH y antituberculosa.³²⁻³⁴

Otras sustancias pertenecientes al grupo de los triterpenos son los fitoesteroles, los cuales se encuentran en aceites esenciales, frutas y verduras. Los fitoesteroles se sintetizan por la vía del ácido mevalónico y están presentes en casi todas las partes de las plantas, pero sobre todo en las semillas y retoños. Debido a las propiedades benéficas que presentan sobre la salud su estudio se ha incrementado en los últimos años.³⁵⁻³⁷

El β -sitosterol es uno de los fitoesteroles más abundantes en las plantas y su efectividad biológica ha sido demostrada en estudios preclínicos para tratamientos de enfermedades como el cáncer de estómago,³⁸ colon,³⁹ próstata⁴⁰ y mama,⁴¹ así como en úlceras⁴² y en estudios clínicos para VIH⁴³⁻⁴⁵ y tuberculosis.⁴⁶ Además, se han encontrado evidencias del efecto inmunomodulador de los esteroides, usando una mezcla de beta-sitosterol/sitosterina. En dicho estudio se plantea que el mecanismo de acción posiblemente está relacionado con un efecto sobre el control de las citocinas inflamatorias. Esta modulación en la producción y actividad de citocinas, ejerce efectos beneficiosos en pacientes con enfermedades infecciosas.⁴⁷⁻⁴⁸

En el nogal se encuentran sustancias fitoquímicas, como los fitoesteroles, a los cuales se les han atribuido diversas propiedades biológicas como son protección frente a estrés oxidativo, disminución en el riesgo de padecer enfermedades coronarias, disminución del colesterol LDL, efectos antiinflamatorios y protección frente a algunos tipos de cáncer.⁴⁹⁻⁵¹ Además algunos estudios han demostrado la actividad antimicrobiana de las hojas y frutos del nogal,

atribuyendo esta actividad hasta ahora a la juglona.⁵²⁻⁵⁴ Sin embargo, existen pocos estudios acerca de la actividad biológica de la corteza.⁵⁵⁻⁵⁸

En el estudio realizado por Cruz-Vega y col. en el 2008⁵⁹ se reportó la actividad antituberculosa de extractos hexánicos de *Juglans mollis* y *C. illinoensis*. El presente trabajo presenta la evaluación de la actividad contra *M. tuberculosis* del extracto hexánico de corteza *C. illinoensis* y de dos fracciones. Adicionalmente, las muestras fueron caracterizadas por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS), identificando los componentes principales.

Materiales y métodos

Reactivos

El ácido ursólico (UA), la clofazimina (CLF), el ácido betulínico (AB) y el β -sitosterol fueron adquiridos en Sigma-Aldrich (EUA).

Recolección y preparación del extracto

La corteza de *Carya illinoensis* fue recolectada en el mes de septiembre del 2009 en el municipio de General Terán, Nuevo León, México. El material vegetal fue depositado en el herbario de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL para su identificación (Voucher No. 025528). La corteza se limpió y se secó a temperatura ambiente por espacio de cinco días, para después ser molida en un molino manual. De éste material se pesaron 60 g y se adicionaron 500 mL de hexano (JT Baker, México). La mezcla se colocó en reflujo continuo en un sistema soxhlet por 20 h. Una vez obtenido el extracto, se eliminó el solvente a presión reducida (Rotavapor Laborata 4003, Heidolph Instruments, Alemania). Los extractos se almacenaron en frascos de vidrio protegidos de la luz y la humedad hasta su uso.

Partición del extracto

A partir del extracto hexánico de *C. illinoensis* (CIH) se extrajo la parte soluble en metanol, para lo cual se pesaron 500 mg de extracto y se adicionaron 25 mL de metanol (CTR Scientific, México). Una vez realizada la partición, la fracción recuperada se llevó a sequedad y se guardó en frascos ámbar cerrados herméticamente en refrigeración hasta su uso. La fracción insoluble también fue pesada y almacenada en las condiciones mencionadas anteriormente.

Análisis cromatográfico por HPLC

La caracterización del extracto y sus fracciones se realizó utilizando un cromatógrafo de líquidos (Varian, E.U.A.) equipado con un sistema de bombeo ternario 9012, automuestreador 9100, detector de arreglo de diodos Polychrom

9065 y una columna Microsorb C₁₈ (150 x 4.6 mm, 5 μ m; Varian, E.U.A.). La fase móvil consistió en una mezcla de metanol (grado HPLC; J.T. Baker, México) y una solución acuosa de ácido fórmico (100 mM, pH 3.0) 55:45 v/v; con un flujo de 0.8 mL min⁻¹. El volumen de inyección fue de 20 μ L y la longitud de onda utilizada fue de 254 nm. El extracto hexánico de *C. illinoensis* (CIH) y las dos fracciones obtenidas de éste, fracción metanólica (CIFM) y fracción no metanólica (CIFNM) fueron disueltas en cloroformo (CTR Scientific, México) y filtradas usando membranas de filtración Durapore® de 0.45 μ m (Millipore, E.U.A.). Para el análisis de AU y CIFM, la fase móvil consistió en una mezcla metanol- ácido fórmico (100 mM, pH 3.0) 65:35 v/v; con un flujo de 1.0 mL min⁻¹. Las variables modificadas para optimizar la separación fueron el pH y la proporción de buffer en la fase móvil.

Caracterización del extracto por GC-MS

Se llevó a cabo empleando un cromatógrafo de gases 6890N con inyector split/splitless y detector selectivo de masas 5973 (Agilent Technologies, Alemania) con fuente de ionización de impacto electrónico y analizador cuadrupolar. La separación se realizó con una columna HP 5MS (30 m x 0.25 mm x 0.25 μ m; Agilent Technologies, Alemania). El gas acarreador fue helio con un flujo de 0.9 mL min⁻¹. El programa de temperatura del horno consistió en una etapa inicial a 70 °C por 2 min, subiendo 15 °C min⁻¹ hasta 200 °C manteniendo 5 min a esta temperatura, finalmente la temperatura se incrementó a una velocidad de 10 °C min⁻¹ hasta llegar a 320 °C y se mantuvo por 10 min. La temperatura del inyector fue de 270 °C y la de la línea de transferencia de 270 °C.

La adquisición de los datos se realizó en modo de barrido completo en un rango de 30-550 m/z. La identificación de los compuestos se realizó por comparación de los espectros de masas obtenidos con los de la biblioteca de espectros de masas del equipo (Wiley Registry of Mass Spectral Data, 7a Ed.). Para su análisis, las muestras se disolvieron en cloruro de metileno y la derivatización se realizó con trimetilsilano.

Activación de la cepa *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv

La cepa de *M. tuberculosis* H37Rv fue proporcionada por el Instituto de Investigaciones Biomédicas del Noroeste, en Monterrey, N.L. y se mantuvieron en tubos con medio Lowenstein-Jensen (Remel, Lenexa, Kansas City, MO). Las suspensiones bacterianas se prepararon cultivando un inóculo inicial en agar Middlebrook 7H10 (BBL, Becton-Dickinson; E.U.A.) y subcultivando en caldo Middlebrook 7H9 (Difco Laboratories, E.U.A.) conteniendo 0.5 % de glicerol (Boehringer Mannheim Biochemicals, E.U.A.), 10 % de enriquecimiento OADC (ácido oleico, albúmina, dextrosa y catalasa; Becton Dickinson and Company, E.U.A.) y 0.05% de Tween 80 (Polisorbato 80, Sorbitan-Oleato y Poli-Oxietileno;

Materiales y Abastos Especializados, México) por 72 h a 37 °C. Las suspensiones celulares se agitaron y sonicaron por 10 min en baño de ultrasonidos (Laboratory Supplies Co., E.U.A.) hasta que los agregados visibles se disgregaron. La solución de bacterias se centrifugó a 500 rpm por 10 min y se recuperó el sobrenadante. Posteriormente, el cultivo se diluyó en el mismo caldo a la concentración de 1×10^6 bacterias mL^{-1} utilizando una cámara de Neubauer (100X).⁶⁰ Esta suspensión se congeló a -80 °C hasta su uso.

Evaluación de la actividad antituberculosa

La evaluación de la actividad antituberculosa se realizó en placas de 96 pozos estériles de fondo plano con tapa. Las concentraciones ensayadas del extracto y sus fracciones estuvieron en un rango de 62 a 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$, mientras que la CLF, utilizada como control positivo se trabajó a una concentración de 0.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Para cada concentración de las muestras y del control se asignaron tres pozos por fila. A cada pozo, conteniendo la muestra o el control, se agregaron 50 μL de medio Middlebrook 7H9 suplementado con OADC. Posteriormente se añadieron 50 μL de la suspensión de *M. tuberculosis* (1×10^5 bacterias mL^{-1}). Se dejaron 2 pozos como control de crecimiento de la bacteria. Los pozos del perímetro fueron llenados con agua estéril para minimizar la evaporación en la placa. Las placas fueron selladas con cinta adhesiva e incubadas a 37 °C por 10 días en una atmósfera húmeda. Al décimo día se añadieron 15 μL de una mezcla de Azul de Alamar⁶¹⁻⁶² (Trek Sistemas Diagnóstico Ltd, Reino Unido) 1:1 con Tween 80 al 10 % a cada uno de los pozos. El ingrediente activo del Azul de Alamar es la resazurina, la cual es un compuesto no tóxico, permeable a las células que es de color azul y no fluorescente; la resazurina se convierte en resofurina de color rojo brillante a través de las reacciones de reducción de las células metabólicamente activas. Las placas se incubaron por 16 h y después se leyeron a una longitud de onda de excitación de 535 nm y a 595 nm de emisión.

Resultados y discusión

El método seleccionado para la obtención del CIH fue la extracción con soxhlet, debido a que en general este método tiene una eficiencia de extracción alta.⁶³ Con la utilización de este método, la eficiencia de la extracción fue de 1.32 %, coincidiendo con lo reportado por Salinas González (2004)⁶⁴ para esta especie. En general los componentes químicos de la corteza se dividen en lipofílicos e hidrofílicos, la fracción lipofílica está constituida por sustancias solubles en solventes poco polares (hexano, éter etílico, diclorometano) como terpenos, terpenoides, ceras, grasas y alcoholes alifáticos superiores. La fracción hidrofílica está constituida por sustancias extraíbles en agua o por solventes de alta polaridad

(acetona, alcohol etílico) y contiene gran cantidad de compuestos fenólicos. La acumulación de compuestos poco polares en la corteza es menor en comparación con los compuestos encontrados en la fracción hidrofílica.⁶⁵ Debido a lo descrito anteriormente se explica el bajo rendimiento del extracto CIH, en comparación con una extracción realizada a partir de un solvente de alta polaridad, como lo reporta Orea-Igarza y col., en el 2006.⁶⁶

Para su caracterización, el extracto y sus fracciones se analizaron por HPLC utilizando una columna de fase inversa C_{18} y un detector de arreglo de diodos. Las condiciones de separación fueron optimizadas con el fin de obtener el mayor número de señales posibles para el extracto hexánico. Se evaluaron distintas fases móviles, desde acetonitrilo puro hasta mezclas de metanol o acetonitrilo con soluciones acuosas de acetato de amonio y ácido fórmico a diferentes concentraciones y valores de pH. Los mejores resultados se obtuvieron con el uso de una mezcla de metanol-ácido fórmico (100 mM) 50:50 (Fig. 1). Con estas condiciones, fue posible identificar al AU, compuesto que ha sido encontrado en la corteza de otras especies de corteza como es el caso de *Physocarpus intermedius*.⁶⁵

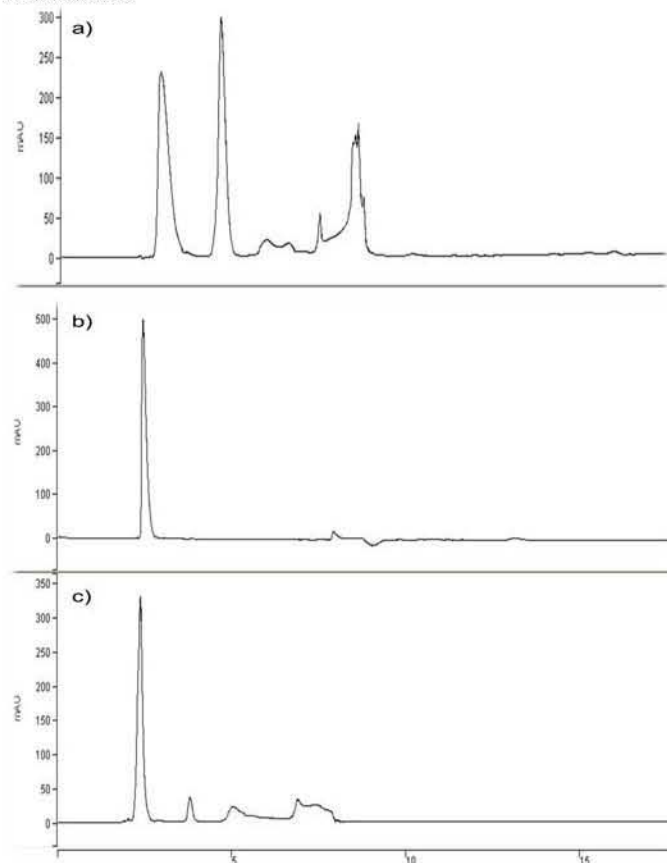


Figura 1. Cromatogramas obtenido por HPLC para el extracto hexánico de *C. illinoensis* (a), para la fracción metanólica (b) y la fracción no metanólica del extracto (c).

Las fracciones CIFM y CIFNM fueron analizadas bajo las mismas condiciones que el extracto completo. Como puede observarse en la figura 1, el número de las señales observadas para las fracciones fue menor que las obtenidas para el extracto completo y es reflejo de la partición realizada. En primera instancia, se pensó que la fracción CIFM contenía AU, ya que el cromatograma mostró un pico con tiempo de retención y espectro de absorción similar. Su presencia en CIFM podría explicarse por la naturaleza polar de éste fitoquímico, la cual permite que sea afín por el solvente utilizado en la partición Bankeu y col.⁶⁹ reportaron la presencia de AU en extractos metanólicos de la corteza de árboles de la familia *Moraceae*. Para confirmar la presencia de AU en CIFM, realizó un análisis por GC-MS. Para ello, todas las muestras fueron derivatizadas con trimetilsilano debido a la baja volatilidad esperada de los compuestos en el extracto.⁷⁰ El análisis del extracto hexánico y de CIFM mostró un pico con tiempo de retención similar al AU pero con espectro de masas muy diferente, por lo que se descartó la presencia de este compuesto.

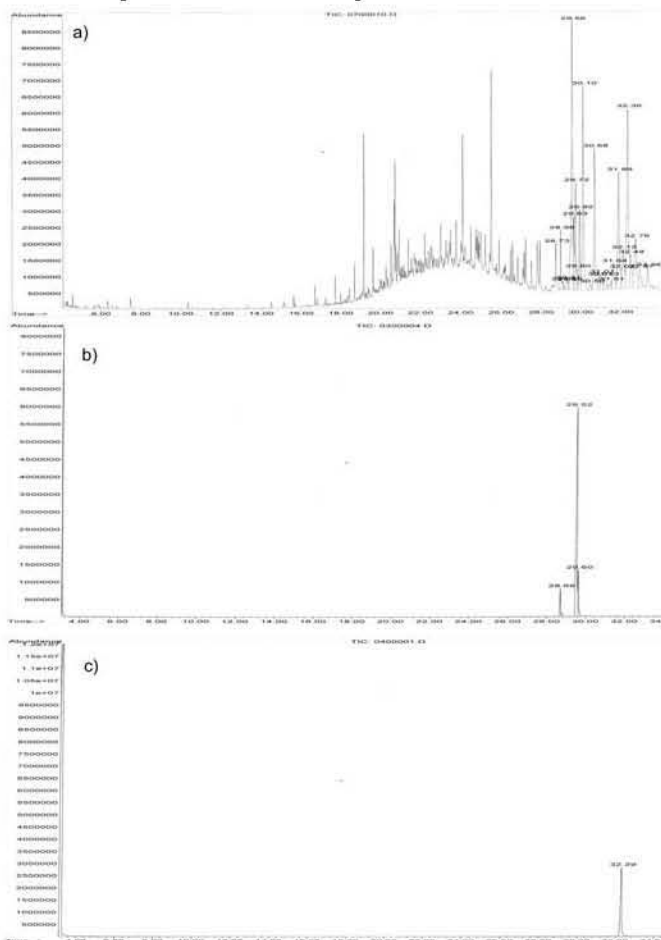


Figura 2. Cromatogramas obtenidos por GC-MS para el extracto hexánico de *C. illinoensis* (a), para el estándar de ácido betulínico (b) y para el estándar de β -sitosterol (c).

Al cotejar los espectros de masas de todos los picos obtenidos en el cromatograma de CIH con los de la biblioteca de espectros del equipo, fue posible identificar al ácido betulínico (AB) y al β -sitosterol.

La presencia de estos dos compuestos en CIH fue confirmada mediante el análisis de estándares puros, los cromatogramas obtenidos se muestran en la figura 2 mientras que los espectros de masas se muestran en las figuras 3 y 4.

Tanto el AB como el β -sitosterol fueron encontrados también en la fracción CIFM. Ambos compuestos han sido reportados en investigaciones previas por sus propiedades contra *M. tuberculosis*.^{71,72} Por otro lado, el análisis por GC-MS de la fracción CIFNM permitió identificar al γ -sitosterol, α -amirina y sitostenona, de los cuales solamente la α -amirina cuenta con reportes sobre su acción biológica frente a *M. tuberculosis*.

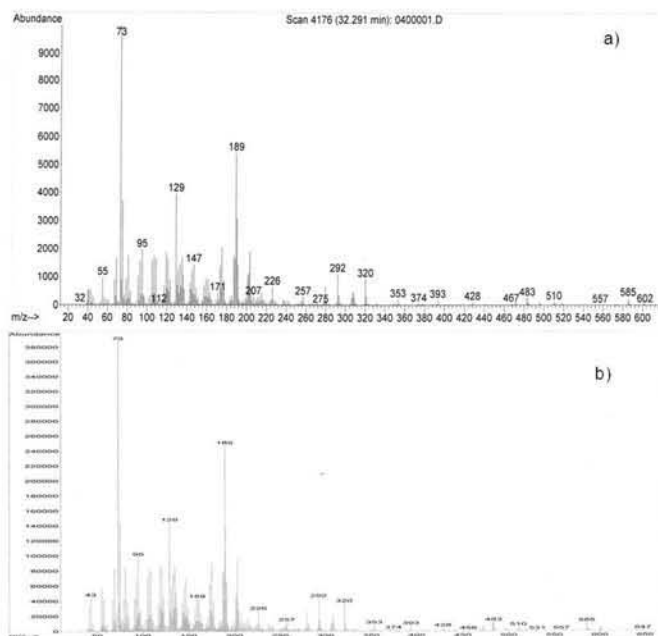


Figura 3. Comparación de espectros de masas obtenidos para el estándar de ácido betulínico (a) y el extracto hexánico de *C. illinoensis* (b).

La actividad antituberculosa de las fracciones se evaluó con el método colorimétrico de azul de alamar a partir de diluciones seriadas. Se empleó CLF como control positivo y la concentración de trabajo se determinó evaluando un rango de concentraciones de entre 0.312 a 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Se encontró una inhibición superior al 80 % en todos los niveles de concentración y la concentración utilizada para los ensayos de actividad antituberculosa fue de 0.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$. El uso de la CLF en todas las pruebas permitió controlar la variación intra e interensayo, con coeficientes de variación menores al 0.28 % en todos los casos.

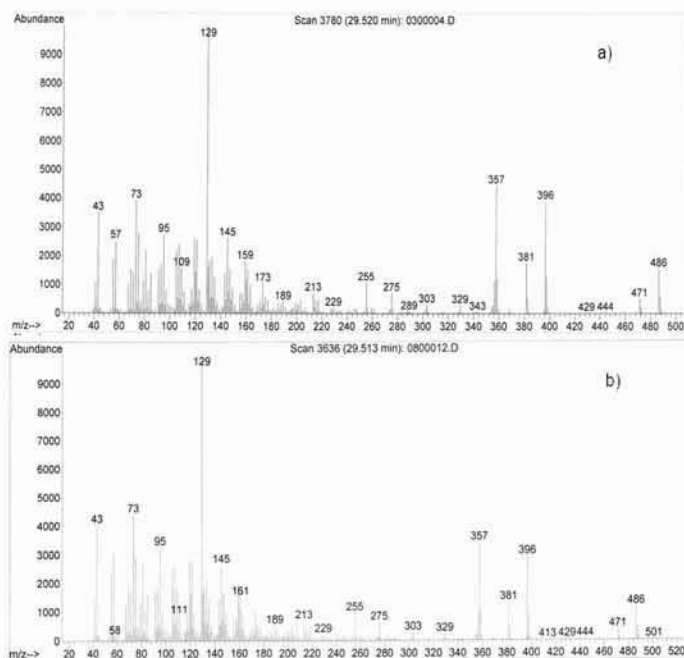


Figura 4. Comparación de espectros de masas obtenidos para el estándar de β -sitosterol (a) y el extracto hexánico de *C. illinoensis* (b).

En la tabla 1 se muestran los resultados obtenidos para el extracto CIH y sus dos fracciones. Como puede observarse CIH y sus dos fracciones resultaron activas de acuerdo a la evaluación microbiológica que se realizó. El CIH mostró un rango de inhibición entre 80 y 95 % en las tres concentraciones más altas ensayadas 125, 250 y 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$; mientras que ninguna de las concentraciones evaluadas para la fracción CIFM mostró una inhibición superior del 50 %.

Por su parte la fracción CIFNM, exhibió un 70 % de inhibición a partir de 62 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Sin embargo, las inhibiciones mostradas por CIH y CIFNM no presentaron una diferencia significativa ($p < 0.05$). Al analizar los cromatogramas obtenidos por HPLC se observó que la información proporcionada por los mismos no es suficiente para relacionar el perfil cromatográfico con la actividad antituberculosa exhibida por las fracciones; por esta razón se procedió a analizar las muestras por GC-MS.

Tabla 1: Evaluación de la actividad antituberculosa.*

Concentración ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	CIH	CIFM	CIFNM
	Porcentaje de Inhibición (%)		
31	40.17 + 6.5	39.00 + 30.0	41.07 + 16.0
62	48.35 + 9.9	47.32 + 29.0	72.26 + 14.0
125	81.53 + 0.7	49.59 + 26.0	71.17 + 18.8
250	95.33 + 1.2	50.24 + 17.0	68.45 + 17.9
500	90.75 + 1.5	50.85 + 35.8	70.51 + 18.3

*Inhibición del crecimiento de *M. tuberculosis* H37Rv frente al extracto hexánico (CIH), fracción metanólica del extracto (CIFM) y fracción no metanólica de (CIFNM) *C. illinoensis*.

El objetivo de haber realizado el fraccionamiento era incrementar la actividad, al concentrar la sustancias activas. Sin embargo, en este caso este proceso afectó la actividad antituberculosa de cada una de las muestras, provocando un decremento de la misma.

A pesar de la alta inhibición conseguida a una baja concentración por parte de CIFNM, se aprecia que el porcentaje de inhibición no guarda proporción con las diferentes concentraciones ensayadas ya que la inhibición alcanzada no tuvo variación; sugiriendo que los componentes activos se hayan presentes en una cantidad suficiente como para manifestar una inhibición parcial en el intervalo de concentraciones ensayado y que el mismo no estan amplio para conseguir un efecto cuantal en una curva dosis respuesta. Asimismo, se observa que la actividad mostrada por CIFNM tiende a ser superada por la inhibición obtenida con CIH, razón por la cual se plantea que existe una sinergia entre los componentes del CIH lo que permite que esta muestra supere a la CIFNM. El análisis químico permitió determinar que en CIFM se observó la presencia de estigmasterol, β -sitosterol y sitostenona; y en la CIFNM β -sitosterol, α -amirina, sitostenona y α -amirenona. Si bien hay estudios que respaldan la actividad antituberculosa del ácido betulínico y β -sitosterol por separado, también encontramos literatura donde se corrobora la actividad con la sinergia de estos compuestos encontrados en los extractos de plantas. Un ejemplo de esta sinergismo es el trabajo desarrollado por Chen *et al.*, en el 2005,⁷³ donde se evaluó la actividad antituberculosa de varios compuestos aislados de *Cinnamomum kotoense*, así como de mezclas de los mismos, los resultados mostraron que existe una mayor actividad cuando los componentes se presentaban en mezcla.

Finalmente, cabe resaltar que no existen reportes de la presencia de ácido betulínico en la especie *C. illinoensis*, como se había mencionado anteriormente la actividad farmacológica de esta especie se le atribuye a juglona.⁷⁴⁻⁷⁵

Conclusiones

El extracto hexánico de corteza de *C. illinoensis* representa una potencial alternativa para el tratamiento quimioterapéutico de la tuberculosis debido a la actividad antituberculosa que posee. Se sugiere que la acción contra *M. Tuberculosis* se presenta con la sinergia de sus componentes ya que el fraccionamiento disminuye su actividad. Finalmente una vez evaluada su actividad antituberculosa, éste se analizó por GC-MS y se identificó la presencia de ácido betulínico, no reportado en esta especie, y β -sitosterol, moléculas a las cuales se les atribuye la actividad biológica que presenta el extracto.

Referencias

1. Kaufmann SH, McMichael AJ. Annulling a dangerous liaison: vaccination strategies against AIDS and tuberculosis. *Nat Med.* 2005; 11: S33-S44.
2. Hampton G. 10 datos sobre la tuberculosis. *Temas de Salud, Tuberculosis.* 2010.
<http://www.who.int/topics/tuberculosis/es/>.
3. World Health Organization. Treatment of tuberculosis: guidelines for national programmes. 3rd. Geneva World Health Organization, 2003.
4. Rivers EC, Mancera RI. New antituberculosis drugs in clinical trials with novel mechanism of action. *Drug Discov Today.* 2008; 13: 1090-1098.
5. Tomioka H, Namba K. Development of antituberculosis drugs: current status and future prospects. *Kekkaku.* 2006; 81:753-754.
6. Onyebujoh P, Zumla A, Ribeiro I, Rustomjee R, Mwaba P, Gomes M, Grange JM. Treatment of tuberculosis: present status and future prospects. *Bull WHO.* 2005; 83: 857-865.
7. Dye C. Global epidemiology of tuberculosis. *Lancet.* 2006; 367: 938-940.
8. Zager EM, McNeerney R. Multidrug-resistant tuberculosis. *BMC Infectious Diseases.* 2008; 8: 10.
9. Su WJ. Extensively drug-resistant tuberculosis (XDR-TB) raises challenges in TB control in Taiwan. *J Formos Med Assoc.* 2008; 107: 827-829.
10. Yew WW, Leung CC. Update in tuberculosis 2007. *Am J Respir Crit Care Med.* 2008; 177: 479-485.
11. O'Brien RJ, Spigelman M. New drugs for tuberculosis: current status and future prospects. *Clinics in Chest Medicine* 2005; 26: 327-340.
12. Lenaerts AJ, Bitting C, Woolhiser L, Gruppo V, Marietta KS, Johnson CM, Orme IM. Evaluation of a 2-pyridone, KRQ-10018, against *Mycobacterium tuberculosis* in vitro and in vivo. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008; 52: 1513-1515.
13. Shu YZ. Recent Natural Products Based Drug Development: A Pharmaceutical Industry Perspective. *J Nat Prod.* 1998; 61: 1053.
14. Kuehl FA, Peck RL, Hoffhine CE, Peel EW, Folkers K. Streptomycetes antibiotics. XIV. The position of the linkage of streptobiosamine to streptidine in streptomycin. *J Am Chem Soc.* 1947; 69: 1234.
15. Cron MJ, Fardig OB, Johnson DL, Schmitz H, Whitehead DF, Hooper IR, Lemieux RU. The chemistry of Kanamycin. *J Am Chem Soc.* 1958; 80: 2342.
16. Kawaguchi H, Naito T, Nakagawa S, Fujisawa K. BB-K 8, a new semisynthetic aminoglycoside antibiotic. *J Antibiot.* 1972; 25: 695.
17. Haskell TH, Fusari SA, Frohardt RP, Bartz QR. The chemistry of viomycin. *J Am Chem Soc.* 1952; 74: 599-602.
18. Nomoto S, Teshima T, Wakamiya T, Shiba T. Total synthesis of capreomycin. *Tetrahedron.* 1978; 34: 921-927.
19. Herr EB, Redstone MO. Chemical and physical characterization of capreomycin. *Ann NY Acad Sci.* 1966; 135:940.
20. Burman WJ, Gallicano K, Peloquin C. Comparative pharmacokinetics and pharmacodynamics of the rifamycin antibacterials. *Clin Pharmacokinet.* 2001; 40: 327-341.
21. Pape H, Rehm HJ. Microbial Products. In: Rehm HJ, Reed G. (eds.) *Biotechnology, VCH.* 1985; 436-457
22. Barry III CE, Slayden RA, Sampson AE, Lee RE. Use of genomics and combinatorial chemistry in the development of new antimycobacterial drugs. *Biochem Pharmacol.* 2000; 59:221-231.
23. Frame AD, Rios-Olivares E, De Jesus L, Ortiz D, Pagan J, Mendez S. Plants from Puerto Rico with anti-*Mycobacterium tuberculosis* properties. *Puerto Rico Health Sci J.* 1998; 17: 243-252.
24. Sindambiwe JB, Calomme M, Cos P, Totté J, Pieters L, Vlietinck A, Vanden Berghe D. Screening of seven selected Rwandan medicinal plants for antimicrobial and antiviral activities. *J Ethnopharm.* 1999; 65: 71-77.
25. Lall N, Meyer JJM. In vitro inhibition of drug-resistant and drug-sensitive strains of *Mycobacterium tuberculosis* by ethnobotanically selected South African plants. *J Ethnopharm.* 1999; 66: 347-354.
26. Newton SM, Lau C, Wright CW. A review of antimycobacterial natural products. *Phytother Res.* 2000; 14: 303-322.
27. Usha K, Saroja S. Antitubercular potential of selected plant materials. *J Med Aromat Plant Sci.* 2001; 22: 182-184.
28. Kristo TS, Terdy PP, Simandi B, Szoke E, Lemberkovic E, Kery A. Efficiency of supercritical fluid extraction for the production of non-volatile terpenoids from *Taraxaci radix*. *Acta Pharm Hung.* 2001; 71: 318-324.
29. Urech K, Scher JM, Hostanska K, Becker H. Apoptosis inducing activity of viscin, a lipophilic extract from *Viscum album L* *J Pharm Pharmacol.* 2005; 57: 101-109.
30. Brieskorn CH, Suss HP. Triterpenoids from the peels of pear and apple. *Arch Pharm (Weinheim Ger.).* 1974; 307: 949-960.
31. Daffe M, Draper P. The envelope layers of mycobacteria with reference to their pathogenicity. *Adv Microbiol Physiol.* 1988; 39: 131-203.
32. Einznhamer DA, Xu ZQ, *Drugs.* 2004; 7: 359-373.
33. Tolstikova TG, Sorokina IV, Tolstikov GA, Flekhter OB. Biological activity and pharmacological prospects of lupane terpenoids: I Natural lupane derivatives. *Russian J Bioorg Chem.* 2006; 32: 37-49.
34. Gu JQ, Wang Y, Franzblau SG, Montenegro G, Yang D, Timmerman BN, Antitubercular constituents of *Valeriana laxiflora*. *Planta Med.* 2004; 70: 509-514.

35. Pegel KH. The importance of sitosterol and sitosterolin in human and animal nutrition. *South African J Sc.* 1997; 93: 263-267.
36. Adlercreutz H, Mazur W. Phytoestrogens and western diseases. The Finnish Medical Society, DUODECIM. *Ann Med.* 1997; 29: 95-120.
37. Adlercreutz H. Epidemiology of phytoestrogens. *Baillière's Clinical Endocrin Metab.* 1998; 12: 605-623.
38. De Stefani E, Boffeta P, Ronco AL, Brennan P, Deneo-Pellegrini H, Carzoglio JC, Mendilaharsu M. Plant sterols and risk of stomach cancer: a case-control study in Uruguay. *Nutr Cancer* 2000; 37: 140-144.
39. Raicht RF, Cohen BI, Fazzini EP, Sarwal AN, Takahashi M. Protective Effect of Plant Sterols against Chemically Induced Colon Tumors in Rats. *Cancer Res.* 1980; 40: 403-405.
40. Awad AB, Finks CS, Williams H, Kim U. In vitro and in vivo (SCID mice) effects of phytosterols on the growth and dissemination of human prostate cancer PC-3 cells. *Eur J Cancer Prev.* 2001; 10: 507-513.
41. Awad AB, Downie A, Finks CS, Kim U. Dietary phytosterol inhibits the growth and metastasis of MDA-MB-231 human breast cancer cell grown in SCID mice. *Anticancer Res.* 2000; 20: 821-824.
42. Hanifa Moursi SA, Al-Khatib IM. Effect of Melia azedarach fruits on gipsing-restraint stress-induced ulcers in rats. *Jpn J Pharmacol.* 1984; 36: 527-533.
43. Breytenbach U, Clark A, Lamprecht J, Bouic P. Flow cytometric analysis of the Th1-Th2 balance in healthy individuals and patients infected with the human immunodeficiency virus (HIV) receiving a plant sterol/sterolin mixture. *Cell Biol Int.* 2001; 25: 43-49.
44. Bouic PJD. Immunomodulation of HIV/AIDS: The Tygerberg/Stellenbosch University experience. *AIDS Bull.* 1997; 6: 18-20.
45. Hung-Llamos HR, Falero-Morejon A, Perez-Bolaños C, Tirado-Morales S, Balcinde-Quñones Y, Pineda-Rodríguez M. Fitoesteroles Parte 1 Tendencias actuales y aplicaciones biomédicas. *Revista CENIC Ciencias Biológicas.* 2005; Vol. 36 (1): 23-30.
46. Donald PR, Lamprecht JH, Freestone M, Albrecht CF, Bouic PJD, Kotze D, Van Jaarsveld PP. A randomized placebo-controlled trial of the efficacy of beta-sitosterol and its glucoside as adjuvants in the treatment of pulmonary tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis.* 1997; 6: 518-522.
47. Bouic PJD. 2001. The role of phytosterols and phytosterolins in immunomodulation: a review of the past 10 years. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 4: 471-475.
48. Bouic PJD, Lamprecht JH. 1999. Plant sterols and sterolins: a review of their immunomodulating properties. *Altern Med Rev.* 4: 170-177.
49. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. La nuez pecanera Mexicana "La reina de las frutas secas". Fruta de temporada. 2010. <http://www.sagarpa.gob.mx/agricultura/productodetemporada/Paginas/Nuez.aspx>. Acceso 20 Jul 2011.
50. Comité Mexicano del Sistema Producto Nuez A.C. La nuez y el Nogal. Beneficios para la salud. 2010. <http://www.comenuez.org/> Acceso 20 Jul 2011.
51. Middleton E Jr. Effect of plant flavonoids on immune and inflammatory cell function. *Adv Exp Med Biol.* 1998; 439: 175-182.
52. Clark AM, Jurgens TM, Hufford CD. Antimicrobial activity of juglone. *Phytother Res.* 1990; 4: 11-14.
53. Pereira JA, Oliveira I, Sousa A, Valentão P, Andrade PB, Ferreira ICFR, Ferreres F, Bento A, Seabra R, Estevinho L. Walnut (*Juglans regia* L) leaves: phenolic compounds, antimicrobial activity and antioxidant potential of different cultivars. *Food Chem. Toxicol.* 2007; 45: 2287-2295.
54. Pereira JA, Oliveira I, Sousa A, Ferreira ICFR, Bento A, Estevinho L. Bioactive properties and chemical composition of six walnut (*Juglans regia* L.) cultivars. *Food Chem Toxicol.* 2008; 46: 2103-2111.
55. Van Hellemont J. Compendium de phytotherapie. Association Pharmaceutique Belge, Bruxelles 1986; 214-216.
56. Bruneton J. Pharmacogosie, phytochimie, plantes médicinales. *Tec. & Doc.* 1993; 348.
57. Wichtl M, Anton R. Plantes thérapeutiques. *Tec. & Doc.* 1999; 291-293.
58. Dzubak P, Hajduch M, Vydra D, Hustova A, Kvasnica M, Biedermann D, Markova L, Urban M, Sarek J. Pharmacological activities of natural triterpenoids and their therapeutic implications. *Nat Prod Rep.* 2006; 23: 394-411.
59. Cruz-Vega DE, Verde-Star MJ, Salinas-González N, Rosales-Hernández B, Estrada-García I, Mendez-Aragón P, Carranza-Rosales P, González-Garza MT, Castro-Garza J. Antimycobacterial activity of *Juglans regia*, *Juglans mollis*, *Carya illinoensis* and *Bocconia frutescens*. *Phytother Res.* 2008; 4:557-559.
60. Collins L, Franzblau SG. Microplate alamar blue assay versus BACTEC-460 system for high-throughput screening of compounds against *Mycobacterium tuberculosis* and *M. avium*. *Antimicrob Chemother.* 1997; 41: 1004-1009.
61. Yajko DM, Madje JJ, Lancaster MV, Sanders CA, Cawthon VL, Babst A, et al. Colorimetric method for determining MICs of antimicrobial agents for *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol.* 1995; 33 (9): 2324-2327.
62. Franzblau SG, Witzig RS, McLaughlin JC, Torres P, Madico G, Hernandez A, Degnan MT, Cook MB, Quenzer VK, Ferguson RM, Gilman RH. *J Clin Microbiol.* 1998; 36 (2): 262-366.

63. Furton KG, Perez MI. A sensual separation science experiment: Solvent extraction and chromatographic separation of menthol utilizing various consumer products. *J Chem Ed.* 1991; 68: 946-947.
64. Salinas G.N. Análisis de la actividad de extractos crudos de *Juglans regia* L, *Juglans mollis* y *Carya illinoensis* contra *Mycobacterium tuberculosis*. 2004. FCB, UANL.
65. Álvarez-Godoy E. Los extractivos del árbol. *Ecología social, Rebelión*, 2005. <http://www.rebelion.org/noticias/2005/1/10669.pdf>.
66. Orea-Igarza U, Cordero-Machado E, Perez-Díaz N, Gomez-Marín R. Composición química de la corteza de tres especies de Eucaliptos, a tres alturas del fuste comercial. Parte 1: *Eucalyptus citriodora* var. *Citriodora*. *Rev Forestal Venezolana.* 2006; 50 (1): 45-52.
67. Weber HA, Zart MK, Hodges AE, Molloy HM, O'brien BM, Moody LA, Clark AP, Roger KH, Overstreet JD, Smith CS. Chemical comparison of goldenseal (*Hydrastis canadensis* L.) root powder from three commercial suppliers. *J Agric Food Chem.* 2003, 51: 7352-7358.
68. Kim JK, Yoon SK, Ryu SY. Cytotoxic triterpenes from stem bark of *Physocarpus intermedius*. *Planta Med.* 2000, 66(5): 485-486.
69. Bankeu JJK, Mustafa SAA, Gojayev AS, Lenta BD, Nougouè DT, Ngouela SA, Asaad K, Choudhary MI, Prigge S, Guliyev AA, Nkengfack AE, Tsamo E, Shaiq Ali M. Ceramide and cerebroside from the steam bark of *Ficus mucosa* (Moraceae). *Chem Pharm Bull.* 2010; 58: 1661-1665.
70. Gutiérrez MC, Droguet M. La cromatografía de gases y la espectrometría de masas: Identificación de compuestos causantes de mal olor. *Boletín intexter.* 2002, 122: 35-41
71. Tanachatchairatana T, Bremner JB, Ratchanaporn C, Suksamrarn A. Antimycobacterial activity of cinnamate-based esters of the triterpenes betulinic, oleanolic and ursolic Acids. *Chem Pharm Bull.* 2008; 56: 194-198.
72. Saludes J, Garson MJ, Franzblau SG, Aguinaldo AM. Antitubercular constituents from the hexane fraction of *Morinda citrifolia* Linn. (Rubiaceae). *Phytother Res.* 2002; 16: 683-685.
73. Chen FC, Peng CF, Tsai IL, Chen IS. Antitubercular constituents from the stem wood of *Cinnamomum kotoense*. *J Nat Prod.* 2005; 68: 1318-1323.
74. Alkhawajah AM. Studies on the antimicrobial activity of *Juglans regia*. *Amer J Chin Med.* 1997, 25: 175-180.
75. Clark A. M., Jurgens T. M., Hufford C. D. Antimicrobial activity of juglone. *Phytother Res.* 1990, 4, 11-14.