

Trabajo científico

Actividad antimicobacteriana y antiprotozoaria de *Moussonia deppeana* (Schldl and Cham) Hanst

Antimycobacterial and antiprotozoal activities from *Moussonia deppeana* (Schldl and Cham) Hanst

María Adelina Jiménez-Arellanes,¹ Lilián Yépez-Mulia,² Julieta Luna-Herrera,³ Gabriel Alfonso Gutiérrez-Rebolledo,¹ Rosa Virginia García-Rodríguez⁴

¹Unidad de Investigación Médica en Farmacología, Hospital de Especialidades, Instituto Mexicano del Seguro Social

² Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias, Hospital de Pediatría, Instituto Mexicano del Seguro Social

³Lab. Inmunoquímica II. Depto de Inmunoquímica, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional

⁴Unidad de Servicios de Apoyo en Resolución Analítica, Universidad Veracruzana

Resumen

Moussonia deppeana es conocida como *tlachichinole*, *clachichinole*, etc. En la medicina tradicional de México se utiliza para tratar: padecimientos gastrointestinales, tos, úlceras estomacales y/o duodenales, infecciones renales y vaginales. Los extractos orgánicos fueron evaluados contra once cepas de micobacterias y tres parásitos. El extracto AcOEt resultó activo contra *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, H37Rv resistente a etambutol y contra el aislado clínico SIN4 (CMI = 12.5 µg/mL), contra MMDO mostró una CMI=25 µg/mL. El extracto Hex resultó moderadamente activo contra H37Rv resistente a etambutol y contra los aislados clínicos SIN4 y MMDO (CMI=25 µg/mL). Los extractos de Hex, ACOEt y EtOH resultaron inactivos contra las micobacterias no tuberculosas (CMI > 50 µg/mL) y contra *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica* y *Trichomonas vaginalis* mostrando IC₅₀ >200 µg/mL. *M. deppeana* biosintetiza compuestos con actividad antimicobacteriana.

Abstract

Moussonia deppeana is known as *tlachichinole*, *clachichinole*, etc. In Mexican traditional medicine is used to treat gastrointestinal disorders, cough, stomach and duodenal ulcers, kidney and vaginal infections. The organic extracts prepared by maceration were evaluated against 11 mycobacterial strains and three protozoal. The AcOEt extract was active against *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, etambutol-resistant of H37Rv, and the clinical isolate SIN4 showed MIC=12.5 µg/mL, and against MMDO showed an MIC = 25 µg/mL. The Hex extract resulted moderately active against ethambutol-resistant of H37Rv and clinical isolates SIN4 and MMDO (MIC = 25 µg/mL). The Hex, ACOEt, and EtOH extracts were inactive against non-tuberculous mycobacterium strains showed MIC >50 µg/mL and against *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica*, and *Trichomonas vaginalis* showed IC₅₀>200 µg/mL. *M. deppeana* biosynthesized compounds with antimycobacterial activity.

Palabras clave: *Mycobacterium tuberculosis*, actividad antiprotozoaria, *Moussonia deppeana*, planta medicinal .

Key words: *Mycobacterium tuberculosis*, antiprotozoal activity, *Moussonia deppeana*, medicinal plant.

Correspondencia:

Dra. María Adelina Jiménez Arellanes

UIM Farmacología

Hospital de Especialidades

Ed. CORSE, 2º piso, CMN Siglo XXI.

Av. Cuauhtémoc 330, Col. Doctores 06720, México D.F.

Tel. 55 56276900 ext 21367

E mail: adelinajim08@prodigy.net.mx

Fecha de recepción: 31 de octubre de 2012

Fecha de recepción de modificaciones: 09 de abril de 2013

Fecha de aceptación: 09 de mayo de 2013

Introducción

Moussonia deppeana (Schldl and Cham) Hanst (sin. *Kholeria deppeana*) pertenece a la familia Gesneriaceae y la infusión es emplea en la medicina tradicional de México para tratar padecimientos gastrointestinales, tos, úlceras estomacales y/o duodenales, enfermedades renales, infecciones vaginales y algunos tumores.¹⁻³ Comúnmente es conocida como tlachichinole, tlachichinolli, cacahuatillo, clachichinole, tochomi-tillo o valletilla, campanita.⁴⁻⁶

Se distribuye desde México (Chiapas, Hidalgo, Oaxaca, Puebla y Veracruz) hasta Panamá.^{5,7} En investigaciones fitoquímicas previas de las partes aéreas aislaron β -sitosterol, β -D-glucosilsitoste-rol, ácido ursólico, ácido oleanólico, ácido 2 β ,3 β -dihidroxiolean-12-en-28-oico, ácido 2 α ,3 α -dihidroxiolean-12-en-28-oico, 2-metil-antraquinona, cromanona y estigmasterol.^{8,9} Además, Domínguez-Ortiz et al.⁵ al realizar un análisis fitoquímico preliminar de las partes aéreas reporta que el extracto hexánico (Hex) resultó positivo para la prueba de quinonas y esteroles, el extracto de acetato de etilo (AcOEt) dio positivo a flavonoides, cumarinas, quinonas y esteroles, y el etanólico (EtOH) resultó positivo para flavonoides, saponinas y cumarinas.

Respecto a la actividad biológica, se ha descrito que el extracto metanólico (MeOH) de las hojas/tallo resultó activo contra *Helicobacter pylori* mostrando una concentración mínima inhibitoria (CMI) = 15.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y el extracto acuoso fue inactivo (CMI \geq 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$).² Por otro lado, el extracto MeOH de las partes aéreas resultó poco activo contra tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi* (CM₁₀₀ = 250-500 $\mu\text{g}/\text{mL}$).¹⁰

En un estudio posterior, se describe que el extracto de AcOEt de las partes aéreas mostró un importante actividad antioxidante *in vitro* con la prueba de inhibición del radical 2, 2-dipicrilhidrazina (DPPH), así como en la prueba de poder reductor del ión férrico (FRAP). El extracto Hex presentó una mejor actividad antiinflamatoria en el modelo de inflamación inducida con 13 acetato de tetradecanoilforbol (TPA) en la oreja del ratón y sólo el extracto de AcOEt generó un efecto antiinflamatorio parcial en el modelo de edema subplantar inducido con carragenina en ratón.⁵ Los autores atribuyen la actividad antiinflamatoria y antioxidante a la presencia de polifenoles.

Es importante mencionar que las enfermedades causadas por parásitos constituyen un problema de salud pública en países en vías de desarrollo, ya que disminuyen la calidad de vida de las personas infectadas. Entre estas enfermedades se encuentran las ocasionadas mayormente por *Giardia lamblia* y *Entamoeba histolytica*, las cuales están entre las infecciones parasitarias más viejas de los seres humanos y continua siendo una causa importante de morbi y mortalidad en todo el mundo.¹¹ En las últimas décadas y como resultado de la constante

migración de países en vías de desarrollo donde la presencia de enfermedades tropicales es endémica, se está occasionando que estas enfermedades aparezcan en los países del primer mundo, siendo las infecciones parasitarias las principales patologías.^{12,13} En México, en el año 2010 la Secretaría de Salud reportó que las infecciones gastrointestinales occasionadas por parásitos se encuentran dentro de las 20 principales causas de enfermedades transmisibles, siendo los grupos más vulnerables los niños en edad escolar y los ancianos.¹⁴ Es bien conocido que las fármacos disponibles para tratar estos padecimientos producen diversos efectos secundarios y existe un incremento alarmante de casos occasionados por parásitos que son resistentes a los fármacos actuales. *G. lamblia* y *E. histolytica* son dos de los parásitos clínicamente más importantes que causan la diarrea y recientemente, se ha descrito que aprox. 280 millones de personas están infectadas.¹⁵ Por otro lado, al año aparecen aprox. 10 millones de casos nuevos de tuberculosis (TB), mueren cerca de 2 millones de personas y una tercera parte de la población mundial está infectada con *Mycobacterium tuberculosis*. Los casos multifarmacoresistentes (MFR) y de resistencia extendida (XFR) van en aumento por lo que se requiere de nuevas alternativas de tratamiento que muestren mecanismos de acción diferente a los fármacos existentes, con menos efectos secundarios y que acorten el periodo de tratamiento. Datos epidemiológicos describen que de todos los casos MFR sólo se curan entre el 50 y 70% y entre el 5 y 6% de los casos MFR son XFR. Para el tratamiento de esta enfermedad se cuenta con fármacos de primera y segunda línea; sin embargo, los tratamientos son a base de multiterapia (de 4 a 8 fármacos) lo que occasionan diversos y severos efectos secundarios, son prolongados (hasta de 30 meses en casos de MFR), de elevado costo, lo cual incide en el poco apego y abandono de los mismos.¹⁶⁻¹⁸

Tomando en cuenta el grave problema de salud que representa la TB y las parasitosis, aunado al problema de farmacoresistencia, en la actualidad se realizan investigaciones sobre la flora medicinal mexicana con miras a encontrar fuentes alternas de moléculas bioactivas, las cuales pueden constituir prototipos estructurales para el desarrollo de nuevos fármacos. Continuando con la investigación de los extractos Hex, AcOEt y EtOH de *M. deppeana*, en este trabajo reportamos su actividad antimicobacteriana y antiprotozoaria *in vitro*.

Material y métodos

Colecta del material vegetal

M. deppeana fue colectada en Rancho Viejo-Cinco Palos, Municipio de Coatepec, Veracruz, México en Noviembre del 2010. La identificación taxonómica de la especie vegetal fue realizada por el Taxónomo Luis Hermann Bojórquez Galván y

un ejemplar de herbario (CIB8987) fue depositado en el Herbario del Instituto de Investigaciones Biológicas de la Universidad Veracruzana.

Preparación de los extractos crudos

Las hojas de *M. deppeana* (198.7 g) se secaron a temperatura ambiente, se cortaron en trozos pequeños y fueron sometidas a un proceso de maceración exhaustiva en la oscuridad con solventes de creciente polaridad (Sigma-Aldrich), de esta forma se obtuvieron tres extractos: Hex, AcOEt y EtOH, los cuales fueron concentrados en un rotaevaporador (Heidolph LABOROTA 4000) acoplado a una bomba de vacío (ShellLab). Los extractos crudos fueron almacenados en frascos ámbar a temperatura ambiente hasta su utilización.

Evaluación de la actividad antiprotozoaria

Para este ensayo, se empleó *Entamoeba histolytica* (HM1-IMSS) y *Trichomonas vaginalis* (GT9), estas cepas fueron cultivadas en un medio modificado TYI-S-33 complementado con 10% de suero bovino; además, se utilizó *Giardia lamblia* (IMSS:0989:1) que se mantuvo en un medio TYI-S-33 enriquecido con 10% de suero bovino y bilis bovina. Las pruebas de susceptibilidad *in vitro* fueron desarrolladas usando un método previamente descrito.¹⁹ Se incubaron 5×10^4 trofozoitos de *G. lamblia* a 37° C por 48 hrs con diversas concentraciones de los extractos a ensayar. Después de la incubación, los trofozoitos de *G. lamblia* fueron lavados y recultivados por otras 48 hrs en medio fresco solo. Para *E. histolytica* y *T. vaginalis*, se cultivaron 6×10^3 trofozoitos a 37° C por 72 hrs con concentraciones crecientes de los extractos. Los extractos a evaluar fueron solubilizados en dimetilsulfóxido (DMSO) y se incluyó metronidazol como control positivo y parásitos sin tratamiento como control negativo. Los trofozoitos de los tres microorganismos se contaron al finalizar el experimento y se calculó la concentración inhibitoria media (CI₅₀) mediante análisis Probit. Los experimentos se realizaron dos veces por triplicado.

Evaluación de la actividad antimicobacteriana

Se emplearon las siguientes cepa de micobacterias: *M. tuberculosis* H37Rv (ATCC 27294), cuatro cepas monoresistentes de *M. tuberculosis* H3Rv [resistente a isoniazida -INH- (ATCC 35822), resistente a estreptomicina -STR- (ATCC 35820), resistente a rifampicina -RIF- (ATCC 35838) y resistente a etambutol -EMB- (ATCC 35798)], dos aislados clínicos MFR de *M. tuberculosis* (SIN 4 y MMDO) y contra cinco cepas de micobacterias no tuberculosas: *M. avium*, *M. abscessus*, *M. fortuitum* y *M. smegmatis*. *M. tuberculosis* H37Rv es sensible a los cinco fármacos de primera línea (INH, RIF, EMB, STR y pirazinamida -PZ-), el aislado SIN4 es resistente a INH, RIF, EMB, STR, PZ, rifabutina, etionamida y ofloxacina y el aislado MMDO es resistente a INH y EMB.

La evaluación se determinó por el micrométodo colorimétrico de alamar azul (MABA) descrito previamente.^{19,20}

Las micobacterias se hicieron crecer en medio Middlebrook 7H9 enriquecido con 0.2% de glicerol y 10% de OADC (ácido oleico, albúmina, dextrosa y catalasa). La suspensión bacteriana ajustada al tubo No 1 del nefelómetro de McFarland, se diluyó 1:50 con el mismo medio para obtener 6×10^6 unidades formadoras de colonias (UFC)/mL. El ensayo se realizó en microplacas estériles de 96 pozos estériles y se incluyeron controles de microorganismo, de disolvente y de fármacos: rifampicina e isonizida (para cepas sensibles); rifampicina, isonizida, etambutol, estreptomicina y ofloxacina (para cepas MFR). La actividad antimicobacteriana se reporta como CMI y son activas las muestras que muestran una CMI $\leq 50 \mu\text{g/mL}$.

Resultados y discusión

Mediante proceso de maceración de las hojas se obtuvieron los extractos de polaridad creciente por separado y libre de solvente orgánico: 1.68 gr de extracto Hex (con rendimiento de 0.84%), 2.01 gr de extracto de AcOEt (con rendimiento de 1.01%) y 10 g de extracto EtOH (con rendimiento de 5.03%), los rendimientos están reportados respecto a la planta seca. Los resultados de la evaluación antimicobacteriana de los extractos se describen en la Tabla 1. El extracto de AcOEt resultó más activo contra la cepa de referencia (H37Rv), la cepa H37Rv resistente a EMB y contra el aislado clínico SIN4, mostrando una CMI = 12.5 $\mu\text{g/mL}$; este extracto también inhibió moderadamente el crecimiento del aislado clínico MMDO (CMI = 25 $\mu\text{g/mL}$).

El extracto Hex resultó moderadamente activo contra los dos aislados clínicos MFR (SIN4 y MMDO) y contra H37Rv resistente a EMB, mostrando una CMI = 25 $\mu\text{g/mL}$. Por el contrario, el extracto EtOH resultó inactivo contra todas las cepas de *M. tuberculosis* probadas y los tres extractos (Hex, AcOEt y EtOH) resultaron inactivos contra las cuatro cepas de micobacterias no tuberculosas (CMI >50 $\mu\text{g/mL}$). La actividad observada en los extractos poco polares (Hex y AcOEt) es de esperarse, ya que la mayoría de investigaciones realizadas para la obtención de compuestos antimicobacterianos se realizan en este tipo de extracto y los componentes responsables de la actividad son de naturaleza lipofílica principalmente.^{19-21,25,26,28-32}

La actividad que el extracto de AcOEt mostró contra el aislado clínico MFR SIN 4 es de gran importancia debido a que este aislado clínico es resistente a fármacos de primera y segunda línea (resistente a INH, RIF, EMB, STR, rifabutina, etionamida y ofloxacina). Los casos provocados por cepas MFR y XFR van en aumento (5.3 % de todos los casos de TB son MFR), son de difícil tratamiento y sólo se curan aprox. el 70% de estos;

aunado a que los tratamientos son prolongados (hasta de 30 meses), de alto costo y provocan severos efecto secundarios.^{17,18} Por lo que es urgente encontrar fuentes alternas para la obtención de compuestos antituberculosos y una de estas fuentes lo constituyen las plantas medicinales de nuestro país.^{19,20}

Tabla 1. Actividad antimicobacteriana de los extractos orgánicos de *M. deppeana*.

Muestra	CMI ($\mu\text{g/mL}$)						
	H37Rv	R-EMB	R-INH	R-RIF	R-STR	MMDO	SIN4
Ext Hex	>50	25	>50	>50	>50	25	25
Ext AcOEt	12.5	12.5	>50	>50	>50	25	12.5
Ext EtOH	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50
Rifampicina	0.06	0.06	0.06	>25	0.06	100	100
Isoniazida	0.06	0.06	>25	0.06	0.06	3.1	3.1
Estreptomicina	0.5	0.5	0.5	0.5	>8	>4	>4
Etambutol	2.0	>32	1.0	1.0	1.0	>16	>16
Ofloxacina	—	—	—	—	—	8.0	8.0

M. tuberculosis H37Rv: cepa sensible a isoniazida, rifampicina, etambutol, estreptomicina y pirazinamida; R-INH: resistente a isoniazida, R-STR: resistente a estreptomicina, R-RIF: resistente a rifampicina y R-EMB:resistente a etambutol; SIN 4: aislado clínico resistente a isoniazida, rifampicina, etambutol, estreptomicina, pirazinamida, rifabutina, etionamida y ofloxacina; MMDO: aislado clínico resistente a isoniazida y etambutol.

Por otro lado, trabajos previos describen que esta especie biosintetiza ácido ursólico y ácido oleanólico,⁸ por lo que estos dos compuestos pueden ser responsables de la actividad antimicobacteriana mostrada por los extractos Hex y AcOEt. Estos compuestos presentan una CMI $\leq 50 \mu\text{g/mL}$ contra *M. tuberculosis* H37Rv al ser evaluado por ensayo MABA.²¹⁻²⁷ Por análisis en cromatografía de capa fina de sílica gel (ccf, Merck) de los extractos activos (Hex y AcOEt) se detectó la presencia de estos triterpenos, mostrando un factor de referencia (R_f) igual al estándar comercial del ácido ursólico y del ácido oleanólico (Sigma) cuyo valor fue de 0.76 empleando como sistema de elución $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ 96:04, en estas mismas condiciones y en los mismos extractos se detectó también el β -sitosterol ($R_f = 0.8$) por comparación con un estándar comercial (Sigma). De manera adicional, por análisis en ccf del extracto EtOH se detectó un polifenol al revelar las placas con difenilboriloxietilamina en MeOH al 1% y polietilenglicol en etanol al 5% (NP/PEG, Sigma), presentando un $R_f = 0.18$ en el sistema AcOEt:EtOH:H₂O (100:13.5:10), está en proceso su aislamiento y posterior identificación. Por otro lado, se está realizando la investigación de tipo fitoquímico biodirigido para confirmar si estos triterpenos (ácido ursólico y ácido oleanólico) son los responsables de la actividad antimicobacteriana observada en los extractos de Hex y de AcOEt y si existen compuestos adicionales que contribuyen a la actividad biológica observada.

Los resultados obtenidos de la evaluación antiprotozoaria muestran que los tres extractos, resultaron inactivos contra *G. lamblia*, *E. histolytica* y *T. vaginalis*, mostrando una $\text{CI}_{50} > 200 \mu\text{g/mL}$ (Tabla 2). Cabe mencionar que el uso tradicional que se le atribuye a la especie para tratar padecimientos gastrointestinales,^{1,3} puede estar relacionada con infecciones provocadas por bacterias o virus y no por parásitos, por lo que se necesita evaluar el efecto antibacteriano y antiviral de estos extractos para confirmar el uso tradicional que se le atribuye a esta especie para padecimientos gastrointestinales. Cabe mencionar que el extracto MeOH de la partes aéreas de la especie fue activo contra *H. pilory* (CMI = 15.6 $\mu\text{g/mL}$),² por lo que es muy probable que los extractos evaluados en este trabajo muestren importante actividad antibacteriana.

Tabla 2. Actividad antiprotozoaria de los extractos orgánicos de *M. deppeana*

Protozoario	$\text{CI}_{50} (\mu\text{g/mL})$			
	Ext. Hex	Ext. AcOEt	Ext. EtOH	Metronidazol
<i>G. lamblia</i>	318.15	306.2	307.47	0.210
<i>E.histolytica</i>	297.58	253.65	229.80	0.06
<i>T.vaginalis</i>	365.83	325.17	310.70	0.037

IC_{50} : concentración inhibitoria media

Conclusiones

El extracto AcOEt y Hex de *M. deppeana* muestran principalmente actividad antimicobacteriana por lo que puede constituir una fuente importante de compuestos activos, sobre todo activos contra aislados clínicos de *M. tuberculosis* MFR. Ambos extractos resultaron inactivos contra los parásitos evaluados.

Referencias

- Bautista MR. Monografías de plantas utilizadas como anticancerígenas en la medicina tradicional hidalguense. 2007. Instituto de Ciencias de la Salud. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Trabajo de grado. Estado de Hidalgo, México.
- Castillo-Juárez I, González V, Jaime-Aguilar H, Martínez G, Linares E, Bye R, Romero I. Anti-*Helicobacter pylori* activity of plants used in Mexican traditional medicine for gastrointestinal disorders. J Ethnopharmacol. 2009; 122(2):402-5.
- Villavicencio MA, Pérez EBE. Plantas útiles del Estado de Hidalgo. 2006. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Trabajo de grado. Estado de Hidalgo, México.

4. BDMTM (Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana). Universidad Nacional Autónoma de México. Accesible en: <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/atlas.php>. Acceso el 30 Oct 2012.
5. Domínguez-Ortiz MA, Muñoz-Muñiz O, García-Rodríguez RV, Vázquez-Hernández M, Gallegos-Estudillo J, Cruz-Sánchez JS. Antioxidant and anti-inflammatory activity of *Moussonia deppeana*. Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat. 2009; (9):13-9.
6. Escalante LI. Notas sobre el Tlachichinole. 1998. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. Trabajo de grado. Distrito Federal, México.
7. Ramírez-Roa A. Flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. Fascículo 64. *Gesneriaceae*. 2008. Instituto de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. Distrito Federal, México.
8. Noguera B, Camacho MR, Mata R. Constituents of *Kholeria deppeana*. Fitoterapia. 1994; 65(2):182.
9. Reyes-Blas H. Estudio Fitoquímico de la raíz de *Kolheria deppeana*. 1995. Facultad de Química. Universidad Veracruzana. Veracruz, México.
10. Abe F, Shinya N, Masafumi O, Junei K, Hiroshige A, Tetsuya O, Martínez-Alfaro MA, Reyes-Chilpa R. Trypanocidal Constituents in Plants: Evaluation of Some Mexican Plants for Their Trypanocidal Activity and Active Constituents in the Seeds of *Persea americana*. Biol Pharm Bull. 2005; 28(7):1314-17.
11. Tanowitz HB, Weiss LM, Wittner M. Tapeworms. Curr Infect Dis Rep. 2001; 3(1):77-84.
12. Hotez PJ, Gurwith M. Europe's neglected infections of poverty. Int J Infect Dis. 2011; 15(9):611-19.
13. Hotez PJ. Neglected infections of poverty in the United States of America. PLoS Negl Trop Dis. 2008. doi: 10.1371/journal.pntd.0000256.
14. DGE (Dirección General de Epidemiología). Información Epidemiológica 2006-2009. Accesible en: www.dgepi.salud.gob.mx. Acceso 30 Oct 2012.
15. Lalle M. Giardiasis in the post genomic era: treatment, drug resistance and novel therapeutic perspectives. Infect Disord Drug Targets. 2010; 10(4):283-94.
16. García A, Bocanegra-García V, Palma-Nicolás JP, Rivera G. Recent advances in antitubercular natural products. Eur J Med Chem. 2012; (49):1-23.
17. Palomino JC, Ramos DF, da Silva PA. New anti-tuberculosis drugs: strategies, sources and new molecules. Curr Med Chem. 2009; 16(15):1898-904.
18. Zager EM, McNerney R. Multidrug-resistant tuberculosis. BMC Infect Dis. 2008; (8):10.
19. Jiménez-Arellanes A, León-Díaz R, Meckes M, Tapia A, Molina-Salinas GM, Luna-Herrera J, Yépez-Mulia L. Antiprotozoal and antimycobacterial activities of pure compounds from *Aristolochia elegans* rhizomes. Evid Based Complement Alternat Med. 2012. doi: 10.1155/2012/593403.
20. León-Díaz R, Meckes M, Said-Fernandez S, Molina-Salinas GM, Vargas-Villareal J, Torres J, Luna-Herrera J, Jimenez-Arellanes A. Antimycobacterial neolignans isolated from *Aristolochia taliscana*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2010; 105(1):45-51.
21. Cantrell C, Franzblau S, Fischer N. Antimycobacterial plant terpenoids. Planta Med. 2001; (67):685-694.
22. Gu JQ, Wang Y, Franzblau S, Montenegro G, Yang D, Timmermann B. Antitubercular constituents of *Valeriana laxiflora*. Planta Med. 2004; (70):509-14.
23. Gu JQ, Wang Y, Franzblau S, Montenegro G, Yang D, Timmermann B. Constituents of *Quinchama lummajus* with potential antitubercular activity. Z Naturforsch C. 2004; (59):797-802.
24. Higuchi C, Pavan F, Fujimura C, Sannomiya M, Vilegas W, de Andrade S, Sacramento L, Nakamura D. Triterpenes and antitubercular activity of *Byrsonima crassa*. Quim Nova. 2008; (31):1719-21.
25. Jiménez-Arellanes A, Martínez R, García R, León-Díaz R, Luna-Herrera J, Molina-Salinas G, Said-Fernández S. *Thymus vulgaris* as a potential source of antituberculous compounds. Pharmacologyonline. 2006; (3):569-74.
26. Jiménez-Arellanes A, Meckes M, Torres J, Luna-Herrera J. Antimycobacterial triterpenoids from *Lantana hispida* (Verbenaceae). J Ethnopharmacol. 2007; (111):202-05.
27. Watcher GA, Valcic S, Franzblau SG, Suarez E, Timmermann BN. Antitubercular activity of triterpenoids from *Lippia turbinata*. J Nat Prod. 2001; (64):37-41.
28. Camacho-Corona MR, Ramírez-Cabrera MA, Santiago OG, Garza-González E, Palacios IP, Luna-Herrera J. Activity against drug resistant-tuberculosis strains of plants used in Mexican traditional medicine to treat tuberculosis and other respiratory diseases. Phytother Res. 2008; (22):82-5.
29. Copp BR, Pearce A. Natural Product growth inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis*. Nat Prod Rep. 2007; 24(2):278-97.
30. Cruz-Vega DE, Verde-Star MJ, Salinas-González N, Rosales-Hernández B, Estrada-García I, Méndez-Aragón P, Carranza-Rosales P, Gonzalez-Garza MT, Castro-Garza J. Atimycobacterial activity of *Juglans regia*, *Juglans mollis*, *Carya illinoensis* and *Bocconia frutescens*. Phytother Res. 2008; (22):557-9.
31. Newton SM, Lau C, Wright CW. A review of antimycobacterial natural products. Phytother Res. 2000; (14):303-22.
32. Okunade AL, Elvin-Lewis MP, Lewis WH. Natural antimycobacterial metabolites: current status. Phytochem. 2004; (65):1017-32.