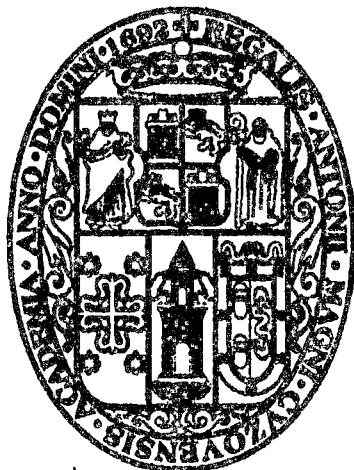


**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO  
ABAD DEL CUSCO**

**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD  
ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA**



**"ACTIVIDAD ANTITUBERCULOSA IN VITRO DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS Y AGLICONAS  
DE FLAVONOIDES DE LAS ESPECIES: *Grindelia boliviana* Rusby (Ch'iri ch'iri) Y  
*Chenopodium incisum* Poir (Arq'a palqo) SOBRE CEPAS DE *Micobacterium tuberculosis*  
H<sub>37</sub>Rv"**

**Tesis presentada por:**

**BR. Verónica HUALLPACUNA QQUECCAÑO**

**BR. Juadelin Ilanna BERRIO GOMEZ**

**Para optar al Título Profesional de:**

**QUÍMICO FARMACÉUTICO**

**Asesora:**

**MCs. Magaly VILLENA TEJADA**

**Co – Asesores:**

**Qco. Jorge CHOQUENAIRA PARI**

**Blga. Mary Luz PEREA QUISPE**

**"TESIS FINANCIADA POR LA UNSAAC"**

**CUSCO – PERÚ  
2015**

# ÍNDICE

RESUMEN.....	I
ABSTRACT .....	III
INTRODUCCIÓN .....	V
ABREVIATURAS UTILIZADAS .....	VI
DEDICATORIA.....	VIII
AGRADECIMIENTOS.....	X
1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:.....	1
1.2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA: .....	2
1.3. OBJETIVOS.....	2
1.3.1. OBJETIVO GENERAL.....	2
1.3.4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	2
1.4. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO .....	3
1.5. HIPÓTESIS.....	5
CAPÍTULO II.....	6
2.1. ANTECEDENTES:.....	6
2.1.1. ANTECEDENTES LOCALES:.....	6
2.1.2. ANTECEDENTES NACIONALES:.....	7
2.1.3. ANTECEDENTES INTERNACIONALES: .....	9
2.2. ESTADO DE LA CUESTIÓN.....	11
2.3. BASES TEÓRICO – CIENTÍFICAS: .....	13
2.3.1. DESCRIPCIÓN DE LA ESPECIE VEGETAL EN ESTUDIO: .....	13
2.3.1.1. CH’IRI CH’IRI .....	13
2.3.1.2. ARQ’A PAIQO .....	14
2.3.2. FLAVONOIDES. ....	16
2.3.2.1. BIOSÍNTESIS DE LOS FLAVONOIDES:.....	17
2.3.2.2. CLASIFICACIÓN DE FLAVONOIDES .....	19
2.3.2.3. AGLICONAS DE FLAVONOIDES:.....	20
2.3.2.4. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN .....	20
2.3.2.5. REACCIONES DE COLOR .....	20

2.3.2.6. MÉTODOS DE DETECCIÓN DE FLAVONOIDES .....	20
2.3.2.6.1. CROMATOGRAFÍA: .....	20
2.3.2.7. ACCIONES FARMACOLÓGICAS .....	23
2.3.3. TUBERCULOSIS: .....	23
2.3.3.1. TRANSMISIÓN .....	24
2.3.3.2. PATOGENIA .....	25
2.3.4.3. CUADRO CLÍNICO: .....	28
2.3.3.4. DIAGNÓSTICO .....	29
2.3.3.5. TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO: .....	29
2.3.3.6. MEDICAMENTOS ANTITUBERCULOSIS.....	30
2.3.3.6.1. MEDICAMENTOS ANTITUBERCULOSIS DE PRIMERA LÍNEA.....	30
2.3.3.6.2. MEDICAMENTOS ANTITUBERCULOSIS DE SEGUNDA LÍNEA.....	36
2.3.3.6.3. OTROS FÁRMACOS.....	38
2.3.4. MICOBACTERIUM TUBERCULOSIS .....	41
2.3.4.1. CARACTERES MORFOLÓGICOS .....	41
2.3.4.2. CONSTITUCIÓN QUÍMICA .....	42
2.3.4.3. FISIOLOGÍA Y METABOLISMO: .....	43
2.3.4.4. RESISTENCIA A LOS AGENTES FÍSICOS Y QUÍMICOS .....	43
2.3.4.5. <i>MICOBACTERIUM TUBERCULOSIS</i> H <sub>37</sub> RV: .....	43
2.3.5. MÉTODO PROPORCIONAL DE CANETTI, RIST Y GROSSET:.....	43
2.3.6. DEFINICIÓN DE TÉRMINOS BÁSICOS:.....	45
MATERIALES Y MÉTODOS .....	47
3.1. MATERIAL BOTÁNICO: .....	47
3.2. MATERIAL BIOLÓGICO: .....	47
3.3. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS: .....	47
3.3.1. MATERIALES DE CAMPO: .....	47
3.3.2. MATERIALES DE LABORATORIO:.....	47
3.3.3. MEDIOS DE CULTIVO:.....	48
3.3.4. REACTIVOS: .....	48
3.3.5. FÁRMACOS:.....	49
3.3.6. EQUIPOS E INSTRUMENTOS: .....	49

3.3.7. OTROS: .....	49
3.4. DISEÑO METODOLÓGICO: .....	50
3.4.1. DISEÑO METODOLÓGICO DE LA INVESTIGACIÓN PARA LA ACTIVIDAD ANTITUBERCULOSA.....	50
3.4.2. DISEÑO METODOLÓGICO DE LA CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN .....	50
3.5. IDENTIFICACIÓN, DEFINICIÓN Y OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES. ....	55
3.5.1. VARIABLES IMPLICADAS.....	55
3.5.1.1. VARIABLE INDEPENDIENTE. ....	55
3.5.1.2. VARIABLES DEPENDIENTES .....	56
3.5.2. VARIABLES NO IMPLICADAS.....	56
3.5.2.1. VARIABLES INTERVINIENTES .....	56
3.6. CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN: .....	59
3.6.1. DEL MATERIAL VEGETAL: .....	59
3.6.2. DE LA BACTERIA EN EXPERIMENTACIÓN: .....	59
3.7. PROCEDIMIENTO.....	62
3.7.1. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA:.....	62
3.7.1.1. RECOLECCIÓN. ....	62
3.7.1.3. MOLIENDA: .....	62
3.7.2. OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS AL 70%. ....	62
3.7.2.1. DETERMINACIÓN DE LA HUMEDAD:.....	63
3.7.2.2. PRUEBAS DE SOLUBILIDAD: .....	63
3.7.2.3. ANÁLISIS FITOQUÍMICO CUALITATIVO: .....	63
3.7.3. OBTENCIÓN DE AGLICONAS DE FLAVONOIDES .....	65
3.7.3.1. EXTRACCIÓN ETANÓLICA AL 30%: .....	65
3.7.3.2. HIDRÓLISIS ÁCIDA CON HCL 6N. ....	65
3.7.3.3. PURIFICACIÓN DE LAS AGLICONAS DE FLAVONOIDES:.....	67
3.8. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTITUBERCULOSA DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS Y AGLICONAS DE FLAVONOIDES FRENTE A CEPAS DE: <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H <sub>37</sub> Rv. ....	70
3.9. TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS.....	77
3.10. TÉCNICAS PARA EL ANÁLISIS Y PROCESAMIENTO DE DATOS .....	77

4.1 DE LA DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE HUMEDAD .....	78
4.2. DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE RENDIMIENTO.....	79
4.4 ANÁLISIS FITOQUÍMICO .....	80
4.5. DE LA CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA .....	82
4.6. DE LA CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN HPLC .....	82
4.6.1. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN HPLC del Ch'iri ch'iri. ....	83
4.6.2. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN HPLC del <i>Chenopodium incisum</i> Poir (Arq'a paiqo) .....	86
4.7. DE LA ACTIVIDAD ANTITUBERCULOSA SOBRE <i>Micobacterium tuberculosis</i> .....	89
4.7.1. CONTEO DEL NÚMERO DE COLONIAS EN LAS DIFERENTES CONCENTRACIONES DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE <i>Grindelia boliviana</i> Rusby (CH'IRI CH'IRI) SOBRE CEPAS DE <i>Micobacterium tuberculosis</i> H <sub>37</sub> Rv. ....	89
4.7.1.1. ANÁLISIS ESTADÍSTICO:.....	91
4.7.2. CONTEO DEL NÚMERO DE COLONIAS EN LAS DIFERENTES CONCENTRACIONES DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE <i>Chenopodium incisum</i> Poir (ARQ'A PAIQO) SOBRE CEPAS DE <i>Micobacterium tuberculosis</i> H <sub>37</sub> Rv. ....	95
4.7.2.1. ANÁLISIS ESTADÍSTICO:.....	97
4.7.3. CONTEO DEL NÚMERO DE COLONIAS EN LAS DIFERENTES CONCENTRACIONES DEL EXTRACTO DE AGLICONAS DE FLAVONOIDES DE <i>Grindelia boliviana</i> Rusby (CH'IRI CH'IRI) SOBRE CEPAS DE <i>Micobacterium tuberculosis</i> H <sub>37</sub> Rv. ....	101
4.7.3.1. ANÁLISIS ESTADÍSTICO:.....	103
4.7.4. CONTEO DEL NÚMERO DE COLONIAS EN LAS DIFERENTES CONCENTRACIONES DE AGLICONAS DE FLAVONOIDES DE LAS ESPECIES: <i>Chenopodium incisum</i> Poir (ARQ'A PAIQO) SOBRE CEPAS DE <i>Micobacterium tuberculosis</i> H <sub>37</sub> Rv.....	106
4.7.4.1. ANÁLISIS ESTADÍSTICO: AL NÚMERO DE COLONIAS CONTABILIZADAS EN CADA UNA DE LAS CONCENTRACIONES EMPLEADAS DE AGLICONAS DE FLAVONOIDES DE LA ESPECIE: <i>Chenopodium incisum</i> Poir (ARQ'A PAIQO) FRENTE A <i>Micobacterium tuberculosis</i> H <sub>37</sub> Rv. ....	108
4.8. ANÁLISIS COMPARATIVO DE LA ACTIVIDAD ANTITUBERCULOSA DE LOS EXTRACTOS ETANOLICOS Y AGLICONAS DE FLAVONOIDES DE LAS ESPECIES: <i>Grindelia boliviana</i> Rusby (CH'IRI CH'IRI) Y <i>Chenopodium incisum</i> Poir (ARQ'A PAIQO) FRENTE A <i>Micobacterium tuberculosis</i> H <sub>37</sub> Rv.....	112
4.8.1. ANÁLISIS COMPARATIVO DE LA ACTIVIDAD ANTITUBERCULOSA DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS DE <i>Grindelia boliviana</i> Rusby (Ch'iri ch'iri) y <i>Chenopodium incisum</i> Poir (Arq'a paiqo) FRENTE A <i>Micobacterium tuberculosis</i> H <sub>37</sub> Rv. ....	112

4.8.2. ANÁLISIS COMPARATIVO DE LA ACTIVIDAD ANTITUBERCULOSA DE AGLICONAS DE FLAVONOIDES DE LAS ESPECIES: <i>Grindelia boliviana</i> Rusby (CH'IRI CH'IRI) Y <i>Chenopodium incisum</i> Poir (ARQ'A PAIQO) FRENTE A <i>Micobacterium tuberculosis</i> H <sub>37</sub> R <sub>v</sub>	114
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	119
<b>ANEXOS</b>	129

### ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

<b>FOTOGRAFÍA N° 01:</b> <i>Grindelia boliviana</i> Rusby "CH'IRI- CH'IRI"	13
<b>FOTOGRAFÍA N° 02:</b> <i>Chenopodium incisum</i> "ARQ'A PAIQO"	15
<b>FOTOGRAFÍA N° 03:</b> CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA DE LAS AGLICONAS DE FLAVONOIDES DE <i>Grindelia boliviana</i> Rusby (CH'IRI CH'IRI) Y <i>Chenopodium incisum</i> Poir (ARQ'A PAIQO) COMPARADOS CON EL ESTÁNDAR DE KAEMPFEROL.	82

### ÍNDICE DE FIGURAS

<b>FIGURA N° 01:</b> ESTRUCTURA BASE DE UN FLAVONOIDE	16
<b>FIGURA N° 02:</b> BIOSÍNTESIS DE FLAVONOIDES	18
<b>FIGURA N° 03:</b> TRANSMISIÓN DE TBC	24
<b>FIGURA N° 04:</b> TRANSMISIÓN DE TBC	24
<b>FIGURA N° 05:</b> PATOGENIA DE LA TUBERCULOSIS	25
<b>FIGURA N° 07:</b> MEDICAMENTOS ANTITUBERCULOSIS	30
<b>FIGURA N° 08:</b> CROMATOGRAMA DE AGLICONAS DE FLAVONOIDES DE <i>Grindelia boliviana</i> Rusby	83
<b>FIGURA N° 09:</b> ESPECTROS UV – VIS DE LAS AGLICONAS DE FLAVONOIDES DE <i>Grindelia boliviana</i> Rusby (CH'IRI CH'IRI)	84
<b>FIGURA N° 10:</b> CROMATOGRAMA DE AGLICONAS DE FLAVONOIDES DE <i>Chenopodium incisum</i> POIR (ARQ'A PAIQO)	86
<b>FIGURA N° 11:</b> COMPARACIÓN DE LOS PERFILES CROMATOGRÁFICOS Y TIEMPOS DE RETENCIÓN DEL PICO 3 DE LA AGLICONA DE FLAVONOIDE OBTENIDA DE LA ESPECIE <i>Chenopodium incisum</i> CON EL ESTÁNDAR DE KAEMPFEROL	86
<b>FIGURA N° 12:</b> ESPECTROS UV - VIS DE LOS PICOS DE LAS AGLICONAS DE FLAVONOIDES DE <i>Chenopodium incisum</i> Poir	87

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>CUADRO N° 01:</b> MEDICAMENTOS ANTITUBERCULOSOS DE PRIMERA LÍNEA CARACTERÍSTICAS CLÍNICO FARMACOLÓGICAS .....	36
<b>CUADRO N° 02:</b> MEDICAMENTOS ANTITUBERCULOSOS DE SEGUNDA LÍNEA PARA EL MANEJO TUBERCULOSIS RESISTENTE A DROGAS “CARACTERÍSTICAS CLÍNICO FARMACOLÓGICAS” .....	40
<b>CUADRO N° 03:</b> ANÁLISIS FITOQUÍMICO CUALITATIVO.....	63
<b>CUADRO N° 04:</b> RESULTADOS DEL PORCENTAJE DE HUMEDAD DE LAS ESPECIES EN ESTUDIO .....	78
<b>CUADRO N° 05:</b> RESULTADOS DE PORCENTAJES DE RENDIMIENTOS DE LOS EXTRACTOS SECOS DE LAS ESPECIES <i>Grindelia boliviana</i> Rusby Y <i>Chenopodium incisum</i> Poir.....	79
<b>CUADRO N° 06:</b> PRUEBAS DE SOLUBILIDAD DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS DE <i>Grindelia boliviana</i> Rusby Y <i>Chenopodium incisum</i> Poir.....	79
<b>CUADRO N° 07:</b> RESULTADOS DEL ANÁLISIS FITOQUÍMICO CUALITATIVO DE <i>Grindelia boliviana</i> Rusby Y <i>Chenopodium incisum</i> Poir .....	80

## ÍNDICE DE FLUJOGRAMAS

<b>FLUJOGRAMA N° 01:</b> OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS AL 70% DE LAS PLANTA <i>Grindelia boliviana</i> Rusby (CH’IRI CH’RIRI) Y <i>Chenopodium incisum</i> Poir (ARQ’A PAIQO) .....	64
<b>FLUJOGRAMA N° 02:</b> EXTRACCIÓN DE AGLICONAS DE FLAVONOIDES .....	66
<b>FLUJOGRAMA N° 03:</b> PURIFICACIÓN DE LAS AGLICONAS DE FLAVONOIDES EN MICROCOLUMNA: FASE ESTACIONARIA: OCTADECIL SILANO Y FASE MÓVIL: METANOL ASISTIDA POR BOMBA AL VACIO .....	69
<b>FLUJOGRAMA N° 04:</b> DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTITUBERCULOSA DE LOS EXTRACTOS .....	76

## INDICE DE TABLAS

<b>TABLA N° 01:</b> LOTE 1 LECTURA DEL N° DE COLONIAS A LOS 42 DIAS DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE CH’ICHI –CH’IRI .....	89
<b>TABLA N° 02:</b> LOTE 2 LECTURA DEL N° DE COLONIAS A LOS 42 DIAS DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE CH’ICHI –CH’IRI .....	89
<b>TABLA N° 03:</b> ANÁLISIS DE VARIANZA PARA LA DILUCIÓN $10^{-3}$ DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE CH’IRI-CH’IRI .....	91
<b>TABLA N° 04:</b> ANÁLISIS DE VARIANZA PARA LA DILUCIÓN $10^{-5}$ DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE CH’IRI-CH’IRI .....	91

<b>TABLA N° 05:</b> ANÁLISIS DE VARIANZA PARA LA DILUCIÓN 10 <sup>-6</sup> DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE CH'IRI-CH'IRI .....	91
<b>TABLA N° 06:</b> COMPARACIONES MÚLTIPLES DE TUKEY DEL PROMEDIO DE LA ACTIVIDAD ANTITUBERCULOSA DE LAS DIFERENTES CONCENTRACIONES DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE GRINDELIA BOLIVIANA RUSBY (CH'IRI CH'IRI) SOBRE <i>Micobacterium tuberculosis</i> H <sub>37</sub> RV .....	92
<b>TABLA N° 07:</b> LOTE 1 LECTURA DEL N° DE COLONIAS A LOS 42 DIAS DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE ARQ'A PAIQO .....	95
<b>TABLA N° 08:</b> LOTE 2 LECTURA DEL N° DE COLONIAS A LOS 42 DIAS DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE ARQ'A PAIQO .....	95
<b>TABLA N° 09:</b> ANÁLISIS DE VARIANZA PARA LA DILUCIÓN 10 <sup>-3</sup> DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE ARQ'A PAIQO .....	97
<b>TABLA N° 10:</b> ANÁLISIS DE VARIANZA PARA LA DILUCIÓN 10 <sup>-5</sup> DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE ARQ'A PAIQO .....	97
<b>TABLA N° 11:</b> ANÁLISIS DE VARIANZA PARA LA DILUCIÓN 10 <sup>-6</sup> DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE ARQ'A PAIQO .....	97
<b>TABLA N° 12:</b> COMPARACIONES MÚLTIPLES DE TUKEY DEL PROMEDIO DE LA ACTIVIDAD ANTITUBERCULOSA DE LAS DIFERENTES CONCENTRACIONES DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE <i>Chenopodium incisum</i> POIR (ARQ'A PAIQO) SOBRE MICOBACTERIUM TUBERCULOSIS H <sub>37</sub> RV .....	98
<b>TABLA N° 13:</b> LOTE 1 LECTURA DEL N° DE COLONIAS A LOS 42 DIAS DE LAS AGLICONAS DE FLAVONOIDES CH'IRI CH'IRI.....	101
<b>TABLA N° 14:</b> LOTE 2 LECTURA DEL N° DE COLONIAS A LOS 42 DIAS DE LAS AGLICONAS DE FLAVONOIDES CH'IRI CH'IRI.....	101
<b>TABLA N° 15:</b> ANÁLISIS DE VARIANZA PARA LA DILUCIÓN 10 <sup>-3</sup> DE LAS AGLICONAS DE FLAVONOIDES DE CH'IRI CH'IRI .....	103
<b>TABLA N° 16:</b> ANÁLISIS DE VARIANZA PARA LA DILUCIÓN 10 <sup>-5</sup> DE LAS AGLICONAS DE FLAVONOIDES DE CH'IRI CH'IRI .....	103
<b>TABLA N° 17:</b> ANÁLISIS DE VARIANZA PARA LA DILUCIÓN 10 <sup>-6</sup> DE LAS AGLICONAS DE FLAVONOIDES DE CH'IRI CH'IRI .....	103
<b>TABLA N° 18:</b> COMPARACIONES MÚLTIPLES DE TUKEY DEL PROMEDIO DE LA ACTIVIDAD ANTITUBERCULOSA DE AGLICONAS DE FLAVONOIDES DE <i>Grindelia boliviana</i> (CH'IRI CH'IRI) DE LAS DIFERENTES CONCENTRACIONES SOBRE <i>Micobacterium tuberculosis</i> H <sub>37</sub> RV. ....	104
<b>TABLA N° 19:</b> LOTE 1 LECTURA DEL N° DE COLONIAS A LOS 42 DIAS DE LAS AGLICONAS DE FLAVONOIDES DE ARQ'A PAIQO.....	106
<b>TABLA N° 20:</b> LOTE 2 LECTURA DEL N° DE COLONIAS A LOS 42 DIAS DE LAS AGLICONAS DE FLAVONOIDES DE ARQ'A PAIQO.....	106
<b>TABLA N° 21:</b> ANÁLISIS DE VARIANZA PARA LA DILUCIÓN 10 <sup>-3</sup> DE LAS AGLICONAS DE FLAVONOIDES DE ARQ'A PAIQO.....	108



<b>TABLA N° 22: ANÁLISIS DE VARIANZA PARA LA DILUCIÓN 10<sup>-5</sup> DE LAS AGLICONAS DE FLAVONOIDES DE ARQ' A PAIQO.....</b>	<b>108</b>
<b>TABLA N° 23: ANÁLISIS DE VARIANZA PARA LA DILUCIÓN 10<sup>-6</sup> DE LAS AGLICONAS DE FLAVONOIDES DE ARQ' A PAIQO.....</b>	<b>108</b>
<b>TABLA N° 24: COMPARACIONES MÚLTIPLES DE TUKEY DEL PROMEDIO DE LA ACTIVIDAD ANTITUBERCULOSA DE AGLICONAS DE FLAVONOIDES DE <i>Chenopodium incisum</i> POIR (ARQ' A PAIQO) DE LAS DIFERENTES CONCENTRACIONES SOBRE <i>Micobacterium tuberculosis</i> H<sub>37</sub>RV .....</b>	<b>109</b>

## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>ANEXO N° 1: UBICACIÓN GEOGRÁFICA DEL LUGAR DE RECOLECCIÓN .....</b>	<b>130</b>
<b>ANEXO N° 2: CERTIFICACIÓN DE LA CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE <i>Grindelia boliviana</i> (Ch'iri ch'iri) y <i>Chenopodium incisum</i> Poir (Arq'a paiqo).....</b>	<b>131</b>
<b>ANEXO N° 3: CERTIFICACIÓN DEL LABORATORIO DE REFERENCIA REGIONAL AREQUIPA AREA DE MICOBACTERIAS .....</b>	<b>132</b>
<b>ANEXO N° 4: ANÁLISIS FITOQUÍMICO CUALITATIVO .....</b>	<b>133</b>
<b>ANEXO N° 5: FICHAS DE RECOLECCIÓN DE DATOS .....</b>	<b>134</b>
<b>ANEXO N° 6: FICHA DE RECOLECCIÓN DE LOS RESULTADOS DE LA LECTURA DE LA ACTIVIDAD ANTITUBERCULOSA.....</b>	<b>136</b>
<b>ANEXO N° 7: FLUJOGRAMA PARTE PRELIMINAR DE LA EXTRACCIÓN DE LAS AGLICONAS DE FLAVONOIDES.....</b>	<b>140</b>
<b>ANEXO N° 8: CROMATOGRAMAS HPLC DE LA PARTE PRELIMINAR.....</b>	<b>141</b>
<b>ANEXO N° 9: FOTOGRAFÍAS DE LOS PROCEDIMIENTOS .....</b>	<b>142</b>
<b>ANEXO N° 10: DE LA PRUEBA PRELIMINAR, RESULTADOS DEL CONTEO DE LA ACTIVIDAD ANTITUBERCULOSA SOBRE <i>Micobacterium tuberculosis</i> H<sub>37</sub>Rv DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS Y AGLICONAS DE FLAVONOIDES DE <i>Grindelia boliviana</i> Rusby (CH'IRI CH'IRI) Y <i>Chenopodium incisum</i> Poir (ARQ' A PAIQO).....</b>	<b>151</b>
<b>ANEXO N° 11: FOTOGRAFÍAS DE LOS RESULTADOS DEL CONTEO DE COLONIAS DE LAS CEPAS DE <i>Micobacterium tuberculosis</i> H<sub>37</sub>Rv EN LOS EXTRATOS ETANOLICOS Y AGLICONAS DE FLAVONOIDES DE LAS ESPECIES: <i>Grindelia boliviana</i> Rusby Y <i>Chenopodium incisum</i> Poir.....</b>	<b>157</b>

## RESUMEN

El presente trabajo de investigación fue realizado con el propósito de determinar la actividad antituberculosa in vitro de los extractos etanólicos y agliconas de flavonoides de las especies *Grindelia boliviana* Rusby (Ch'iri ch'iri) y *Chenopodium incisum* Poir (Arq'a paiqo) frente a la cepa de *Micobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv.

La investigación inicia con la recolección de las plantas, secado y molienda de las partes aéreas (hojas, tallos, flores y semillas) para luego ser extraída con solución de etanol al 70% por baño ultrasónico. Los extractos obtenidos se filtran y se depositan en un balón para ser concentrados, en el rotavapor a 40 °C individualmente, posteriormente se realizaron las pruebas de solubilidad, identificación cualitativa de los metabolitos secundarios y porcentaje de extracción.

Para la extracción de agliconas de flavonoides se tomó material vegetal seco de cada especie, realizándose la extracción con alcohol al 30% en baño ultrasónico, luego se filtró y centrifugó obteniéndose la fase acuosa de interés, los extractos así obtenidos fueron sometidos a una hidrólisis ácida con HCl 6N a la temperatura de 100°C a ebullición. El precipitado obtenido fue purificado en una columna de C-18, obteniéndose las agliconas de flavonoides los cuales fueron identificados por cromatografía líquida de alta resolución.

Utilizando el método de proporciones de CANETTI, RIST Y GROSSET 1963, se procedió a comprobar la actividad antituberculosa in vitro de los extractos etanólicos y las agliconas de flavonoides, los cuales fueron incorporados al medio Lowenstein Jensen (MLJ) partiendo desde una concentración mínima hasta una concentración máxima. Luego se realizó el sembrado de las diluciones 10<sup>-3</sup> mg/mL, 10<sup>-5</sup> mg/mL y 10<sup>-6</sup> mg/mL de *Micobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv, a los tubos con los medios de Lowenstein Jensen de los extractos etanólicos, como de las agliconas de flavonoides. Finalmente se lleva a la incubadora a 37 °C y se espera los 42 días para hacer las lecturas respectivas.

Los resultados mostraron:

**Para los extractos etanólicos.** El extracto etanólico de *Grindelia boliviana* Rusby (Ch'iri ch'iri) presentó una buena actividad antituberculosa a partir de la concentración de 33 mg/mL que sería la CMI, respecto al *Chenopodium incisum* Poir (Arq'a paiqo) presentó una mejor actividad antimicobacteriana con una CMI de 29 mg/mL, lo cual le confiere una significativa actividad antituberculosa.

**Para las agliconas de flavonoides.** Las agliconas de flavonoides de *Grindelia boliviana* Rusby (Ch'iri ch'iri) presentó una CMI de 2.8 mg/MI, dicha actividad podría deberse a la presencia de las agliconas de flavonoides que no fueron identificadas.

Respecto a las agliconas de *Chenopodium incisum* Poir (Arq'a paiqo) también presentó una CMI en 2.8 mg/mL. En el análisis por HPLC se logró identificar la aglicona de flavonoide (kaempferol) por comparación con su respectivo estándar, probablemente este metabolito secundario sería el responsable de la actividad antituberculosa.

A partir de los resultados presentados se realizó la prueba estadística de ANOVA y POS ANOVA (TUKEY) teniendo como variable independiente las diferentes concentraciones de los extractos y como variable dependiente la actividad antituberculosa cuya significancia es 0.00, el cual indica que existe una diferencia significativa entre las distintas concentraciones.

**Palabras claves:** *Grindelia boliviana* Rusby, *Chenopodium incisum* Poir, agliconas de flavonoides, *Micobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv, actividad antituberculosa.

## ABSTRACT

This research was conducted in order to determine the in vitro antituberculosis activity of ethanol extracts and flavonoids aglycones species *Grindelia Boliviana* Rusby (Ch'irich'iri) and *Chenopodium incisum* Poir (Arq'apaiqo) versus strain *Micobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv.

The research begins with the collection of plants, drying and milling of the aerial parts (leaves, stems, flowers and seeds) before being extracted with a solution of 70% ethanol by ultrasonic bath. The extracts obtained are filtered and placed in a balloon to be concentrated on the rotary evaporator at 40 °C individually, subsequently were performed solubility tests, qualitative identification of secondary metabolites and percentage of extraction.

In order to extract flavonoid aglycone, dried plant material of each species was taken, performing the extraction with 30% alcohol in an ultrasonic bath, then filtered and centrifuged to obtain the aqueous phase of interest, the extracts thus obtained were subjected to acid hydrolysis with 6N HCl at boiling point (100 °C). The precipitate obtained was purified on a C-18 column, obtaining flavonoid aglycones which were identified by high resolution liquid chromatography.

Using the method of proportions of Canetti, RIST AND GROSSET, proceeded to check tuberculosis in vitro activity of the ethanol extracts and flavonoids aglycones, which were incorporated into the medium Lowenstein Jensen (MLJ) starting from a low concentration to a concentration maximum. Seeding dilutions 10<sup>-3</sup> mg/mL, 10<sup>-5</sup> mg/mL and 10<sup>-6</sup> mg /mL of *Micobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv was performed, the tubes of Lowenstein Jensen media of ethanolic extracts, as the flavonoid aglycones. Finally taken into the incubator at 37 °C then 42 days are required to make the respective readings.

The results showed:

For the ethanol extracts. The ethanol extract of *Grindelia Boliviana* Rusby (Ch'irich'iri) showed good anti-TB starting from concentration of 33 mg/mL, being this the CMI, on the other hand *Chenopodium incisum* Poir (Arq'a paiqo) presented a better antimycobacterial activity with CMI 29 mg /mL, which gives a significant anti-TB activity.

For flavonoid aglycones. Flavonoid aglycones *Grindelia Boliviana* Rusby (Ch'irich'iri) provided an CMI of 2.8 mg/mL such activity could be due to the presence of flavonoid aglycones that were not identified.

Regarding *Chenopodium incisum* Poir aglycones (Arq'apaiqo) also presented an CMI 2.8 mg /mL. In HPLC analysis were identified flavonoid aglycone (kaempferol), compared with

their respective standard. Probably this secondary metabolite would be responsible for TB activity.

From the results presented, statistical ANOVA and POST ANOVA test was performed, taking as independent variable the different concentrations of the extracts and the dependent variable the anti-TB activity, whose significance is 0.00, which indicates a significant difference between different concentrations.

Keywords: *Grindelia Boliviana* Rusby, *Chenopodium incisum* Poir, flavonoid aglycone, *Micobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv, antituberculosis activity.

## INTRODUCCIÓN

Las plantas han sido usadas como fuente de medicina a través de la historia y continúan siendo la base de muchos fármacos empleados actualmente. A inicios de los años noventa, la Organización Mundial de la Salud identificó que el 80% de la población mundial recurre a la medicina tradicional para asistir problemas de salud. <sup>(1)</sup>

En la actualidad existen muchos esfuerzos orientados a realizar estudios en plantas medicinales, con fines terapéuticos, motivados de un lado por el interés de la farmacología en disponer de nuevas moléculas, con elevada efectividad para el tratamiento de determinadas enfermedades y de otro lado, por la necesidad de la industria farmacéutica en la producción de fitofármacos con menos efectos adversos y/o tóxicos. Por lo que, investigaciones que tengan como objetivo el estudio y procesamiento de plantas medicinales con fines terapéuticos se consideran estratégicas e importantes. <sup>(2)</sup> Según el uso popular, *Chenopodium incisum* Poir "Arq'a paiqo" presenta propiedades medicinales, antidiarreico, abscesos dentales, gastritis, cólicos, resfriado, diurético, expectorantes, tos, asma, antibiótico, antitusígeno, y antituberculoso. <sup>(3,4)</sup> y la especie *Grindelia boliviana* Rusby de nombre común "Ch'iri - ch'iri" de uso medicinal contra la bronquitis, contusiones, inflamaciones y asma <sup>(3,5,6)</sup>; pero la actividad antimicobacteriana de estas especies no está debidamente estudiada por eso se desea realizar una investigación de los extractos etanólicos y agliconas de flavonoides de dichas plantas.

La Tuberculosis (TB) es una enfermedad prevenible y curable provocada por el *Micobacterium tuberculosis* el cual afecta principalmente los pulmones, de ahí que a través de la respiración esta enfermedad sea fácilmente transmisible y continúa siendo una de las infecciones de mayor transmisión en el mundo. Anualmente, alrededor de ocho millones de individuos son diagnosticados con tuberculosis, mientras que dos millones mueren por esta enfermedad, lo que explica el 2,5% de la carga mundial de enfermedad. La TBC ocupa el séptimo lugar en la clasificación mundial de causas de muerte y se estima que de no darse cambios certeros en su tratamiento y atención, esta situación podría mantenerse hasta el 2020. <sup>(7)</sup>

El panorama de la tuberculosis es aún más preocupante debido a la aparición de cepas multirresistentes a los agentes quimioterapéuticos usados comúnmente en el tratamiento de la enfermedad, por lo tanto es urgente el descubrimiento y desarrollo de una nueva generación de sustancias antituberculosas que combatan de forma más efectiva al bacilo y sus formas resistentes. Para esto las plantas han demostrado ser un enorme reservorio a partir del cual se ha encontrado una gran diversidad de sustancias antimicrobianas que pueden servir para el desarrollo de nuevos medicamentos. <sup>(8)</sup>

En el presente trabajo se busca verificar la actividad antituberculosa de las especies vegetales, *Chenopodium incisum* poir (Arq'a paiqo) y *Grindelia boliviana* rusby (Ch'iri ch'iri).

**ABREVIATURAS UTILIZADAS**

<b>TBC</b>	:	Tuberculosis
<b>MT</b>	:	<i>Micobacterium tuberculosis</i>
<b>OMS</b>	:	Organización Mundial De La Salud
<b>HPLC</b>	:	Cromatografía líquida de alta resolución
<b>CCF</b>	:	Cromatografía en capa fina
<b>RP</b>	:	Fase reversa
<b>UV</b>	:	Ultravioleta
<b>Rf</b>	:	Factor de retención.
<b>Vis</b>	:	Visible
<b>Nm</b>	:	Nanómetros
<b>mL</b>	:	Mililitros
<b>G</b>	:	Gramos
<b>R</b>	:	Rifampicina
<b>H</b>	:	Isoniacida
<b>Z</b>	:	Pirazinamida
<b>E</b>	:	Etambutol
<b>Km</b>	:	Kanamicina
<b>Am</b>	:	Amikacina
<b>Cm</b>	:	Capreomicina
<b>S</b>	:	Estreptomina
<b>Lfx</b>	:	Levofloxacino
<b>Mfx</b>	:	Moxifloxacino
<b>Cx</b>	:	Ciprofloxacino
<b>Eto</b>	:	Etionamida
<b>PAS</b>	:	Ácido paramino salicílico
<b>Cs</b>	:	Cicloserina
<b>Cf</b>	:	Clofazimine
<b>Amx/Clv</b>	:	Amoxicilina /ácido clavulámico
<b>Clr</b>	:	Claritromicina
<b>E</b>	:	Etambutol
<b>Imp/Cln</b>	:	Imipenem / cilastatina
<b>H</b>	:	Isoniazida
<b>ZD</b>	:	Linezolid
<b>Mp</b>	:	Meropenem

<b>Z</b>	:	Pirazinamida
<b>DOTS</b>	:	Tratamiento acortado estrictamente supervisado
<b>TB</b>	:	Tuberculosis
<b>MDR</b>	:	Multidrogoresistencia
<b>XDR</b>	:	Extremadamente resistente
<b>BCG</b>	:	Bacilo de Calmette y Guérin. La vacuna BCG es una preparación de bacterias vivas atenuadas.
<b>INEI</b>	:	Instituto Nacional de Estadística e Informática
<b>CMI</b>	:	Concentración Mínima Inhibitoria
<b>GC</b>	:	Cromatografía de Gases
<b>DCM</b>	:	Diclorometánico
<b>SPE</b>	:	Sample purification and concentration
<b>MLJ</b>	:	Medio Lowenstein Jensen



## DEDICATORIA

*Dedico esta página, A Dios Por haberme permitido hacer de este sueño una realidad y darme salud, sabiduría y fortaleza en todo momento, y por regalarme una familia maravillosa. A mis padres Juan Cancio y Odelinda, Por su infinito amor y apoyo incondicional es para ustedes esta tesis en agradecimiento por todo su amor. A mis hermanas Rahama y Areli, Por formar parte importante de mi vida a ustedes por siempre mi corazón y mi agradecimiento. A mis amigos a los que me han enseñado que tenemos algo muy importante para ofrecernos unos a otros. A mi gran amiga verónica que gracias a nuestra amistad hicimos de esta experiencia una de las más especiales. A la Universidad de San Antonio Abad del Cusco Por la educación que me fue inculcada durante mis años de carrera.*

*ILANNA*

## DEDICATORIA

A Dios Todopoderoso por iluminarme el camino a seguir y que siempre está conmigo en los buenos y sobre todo en los malos momentos.

A mi Mamá: Paulita digna de ejemplo de trabajo, constancia y admiración, quien ha brindado todo el apoyo necesario para alcanzar mis metas y sueños, y ha estado presente cada día de mi vida, compartiendo los buenos y los malos ratos. La quiero mucho y gracias por ser mi ángel de la guarda.

A mi abuelita Felicitas, que aunque ya no esté siempre tendrá un espacio en mi corazón, donde se mantendrá viva en mis recuerdos.

A mis tíos Tomas y Escolástica, porque creyeron en mí y porque en gran parte gracias a ustedes, hoy puedo ver alcanzada mi meta, va por ustedes, por lo que valen, porque admiro su fortaleza y por lo que han hecho de mí.

A mis tíos Valentin, Carlos y mi primo Vladimir gracias por sus consejos y enseñanzas y brindarme su apoyo incondicional.

A mi prima: Evelyn por ser siempre una inspiración para seguir esforzándome y ser de cada día mejor que ayer.

A mi prima Gianda por hacer que mis días estén llenos de alegría.

A mis grandes amigos, que han sido más que una familia para mí, con los cuales he compartido tantos momentos, y sé que puedo contar con ellos al igual que ellos conmigo, Jhanet, Carol, Cesar, Ilanna, Brígida, aunque ya no estemos tan juntos como antes, siempre estarán en mi corazón y se, que sin su apoyo y compañía estos años no hubiesen sido lo mismo.

**VERONICA**

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Nacional de San Antonio Abad de Cusco y a la Carrera Profesional de Farmacia y Bioquímica, por habernos brindado los conocimientos necesarios y la oportunidad de formarnos como profesionales, impartiéndonos sus enseñanzas para llevar a cabo nuestros objetivos personales y académicos .

Al Laboratorio de Referencia Regional Área de Micobacterias – Arequipa y a todo el personal que labora en dicho laboratorio ya que fueron tan amables al ofrecernos su apoyo.

A nuestros docentes quienes nos impartieron sus conocimientos y sus enseñanzas de vida a lo largo de nuestra etapa universitaria

Nuestra gratitud a quienes nos otorgaron su apoyo y cooperación incondicional para la realización del presente estudio:

Nuestro más profundo y sincero Agradecimiento A la Mgt: Magaly Villena Tejada por su asesoría, orientación y la supervisión continúa de nuestro trabajo de investigación, pero sobre todo por la motivación y el apoyo recibido.

Queremos expresar también nuestro más sincero agradecimiento al Qco. Jorge Choquenaira Pari por su importante aporte y participación activa en el desarrollo de esta tesis que ha enriquecido el trabajo realizado.

Un agradecimiento muy especial merece la comprensión, paciencia y el ánimo recibidos de nuestra familia y amigos. A todos ellos, muchas gracias. Y a todas aquellas personas que de una u otra forma, colaboraron o participaron en la realización de esta investigación, hacemos extensivo nuestro más sincero agradecimiento.

## CAPITULO I

### ASPECTOS GENERALES

#### 1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:

##### DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA.

La tuberculosis, sigue constituyendo un problema de salud pública a nivel mundial particularmente en los países en vías de desarrollo como el nuestro. <sup>(6)</sup>

Uno de los aspectos más importantes y fascinantes en relación a la tuberculosis, es que es una enfermedad 100% curable y prevenible, sin embargo se ha convertido en la infección trasmisible más importante en los seres humanos. Múltiples factores explican esta situación, sobre todo factores demográficos y socioeconómicos que favorecen las migraciones, la presencia de determinantes sociales y estilos de vida inadecuados, la escasa atención prestada al control de la tuberculosis en muchos países y la peligrosa comorbilidad con la epidemia del VIH, además que algunas de las fuentes de contagio con frecuencia quedan sin ser diagnosticadas y sin recibir tratamiento, pero lo más grave aún es el hecho que cuando lo reciben, la prescripción inadecuada y la falta de adherencia al tratamiento, favorece un aumento de la tuberculosis (TB) y la tuberculosis multidrogoresistente (MDR). <sup>(9)</sup>

La OMS informó que actualmente un tercio de la población mundial está infectada de tuberculosis y en el año 2010 se estimó que, a nivel mundial, existían 8.8 millones de nuevas personas infectadas de tuberculosis, representando una incidencia de 128 por 100,000 habitantes. <sup>(10)</sup>

En nuestro país, se ha estimado para el año 2011, una tasa de morbilidad por tuberculosis de 126 por cada 100,000 habitantes y se muestra un incremento de casos de tuberculosis multidrogoresistente (MDR) y extremadamente resistente (XDR). Según informes preliminares, Perú y Brasil son los países en donde se concentran el mayor porcentaje de Tuberculosis MDR y XDR de la región. <sup>(10)</sup>

Según la DIRESA Cusco, los casos reportados de tuberculosis hasta el año 2010 fueron de 750, los que corresponden mayoritariamente a la red de Quillabamba, Quimbiri y Pichari, en cuanto a los casos reportados de Tuberculosis Multidrogo Resistentes (MDR) son de 16, que son provenientes de las redes de Quillabamba, Canchis y Cusco. <sup>(11)</sup>

Es por ello que se han propuesto diversas alternativas en el control de la enfermedad, siendo una de ellas la utilización de metabolitos secundarios obtenidos de las plantas; ya sean puros o en extractos crudos. <sup>(12)</sup>

La presencia de flavonoides en la naturaleza y sus potenciales beneficios en la salud humana han concitado un creciente interés en su estudio prueba de ello son las numerosas publicaciones que hay sobre la actividad biológica de estos componentes <sup>(13)</sup>. Investigaciones realizadas reportan que las agliconas de los flavonoides parecen ser mas activas que sus glicósidos <sup>(14,15,16)</sup>. Los estudios fitoquímicos, cuantitativos por métodos espectrométricos y cromatográficos han apoyado el estudio riguroso de los compuestos

químicos, específicamente su estructura y función presentes en plantas que pueda tener un potencial farmacéutico. <sup>(17)</sup>

La medicina tradicional reporta que las especies *Chenopodium incisum* Poir (Arq'a Paiqo) y *Grindelia boliviana* Rusby (Ch'iri ch'iri) son utilizadas como tratamiento natural desde épocas antiguas hasta la actualidad, para mitigar las diferentes enfermedades entre ellas las infecciones de las vías respiratorias y tratamiento de la tuberculosis los efectos terapéuticos están relacionados a la presencia de metabolitos secundarios sintetizados, que incluyen flavonoides, aceites esenciales, taninos y triterpenos <sup>(3, 5,18,19,20)</sup>

Por ello la búsqueda de nuevos agentes antimicrobianos, con diversas estructuras químicas y nuevos mecanismos de acción constituyen un tema permanente de investigación.

## 1.2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA:

- ¿Presentarán actividad antituberculosa in vitro los extractos etanólicos y agliconas de flavonoides las especies: *Grindelia boliviana* Rusby (Ch'iri ch'iri) y *Chenopodium incisum* Poir (Arq'a paiqo) sobre cepas de *Micobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv?

## 1.3. OBJETIVOS

### 1.3.1. OBJETIVO GENERAL

- Determinar la actividad antituberculosa in vitro de los extractos etanólicos al 70 % y agliconas de flavonoides de las especies: *Grindelia boliviana* Rusby (Ch'iri ch'iri) y *Chenopodium incisum* Poir (Arq'a paiqo) sobre cepas de *Micobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv.

### 1.3.4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Obtener el extracto seco etanólico al 70% de los tallos, hojas y flores de *Grindelia boliviana* Rusby (Ch'iri ch'iri) y *Chenopodium incisum* Poir (Arq'a paiqo), determinar su porcentaje de humedad, porcentaje de rendimiento, establecer su solubilidad y análisis fitoquímico cualitativo.
2. Obtener las agliconas de flavonoides, por el método: Extracción con solventes, hidrólisis ácida y purificación, de los tallos, hojas y flores de *Grindelia boliviana* Rusby (Ch'iri ch'iri) y *Chenopodium incisum* Poir (Arq'a paiqo).
3. Identificar por el método de HPLC con detector Uv- vis, la presencia de las agliconas de flavonoides de las especies: *Grindelia boliviana* Rusby (Ch'iri ch'iri) y *Chenopodium incisum* Poir (Arq'a paiqo).

4. Determinar la actividad antituberculosa in vitro del extracto etanólico de las especies: *Grindelia boliviana* Rusby (Ch'iri ch'iri) y *Chenopodium incisum* Poir (Arq'a paiqo), sobre cepas de *Micobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv, comparado con el patrón rifampicina, por el método de las proporciones de Canetti, Rist y Grosset de 1963.
5. Determinar la actividad antituberculosa in vitro de las agliconas de flavonoides de las especies: *Grindelia boliviana* Rusby (Ch'iri ch'iri) y *Chenopodium incisum* Poir (Arq'a paiqo) sobre cepas de *Micobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv, comparado con el patrón rifampicina, por el método de las proporciones de Canetti, Rist y Grosset de 1963.

#### 1.4. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

##### Justificación teórica

**Prioridad:** El presente trabajo es un estudio in vitro, teniendo como finalidad predecir cómo actúa las agliconas de flavonoides sobre las cepas de *Micobacterium tuberculosis*. Estudios realizados sugieren que las agliconas de flavonoides presentan una fuerte actividad antimicrobiana por lo tanto este trabajo puede servir como fuente de información para su posterior evaluación. Esto implicaría que la absorción de las agliconas es un factor importante, que debe ser confirmado en otros estudios de predicción. Existen investigaciones que indican que los flavonoides a menudo están glicosilados, lo que dificulta la absorción en el intestino delgado, por lo tanto, requieren de la microbiota intestinal para liberar la aglicona y permitir la absorción en el colon. Otro estudio indica que La forma del flavonoide parece influir en la velocidad de absorción. Hollman y Katan sugirieron que las formas glicosiladas de la quercetina son absorbidos más fácilmente que las formas de aglicona; sin embargo, esto ha sido cuestionado por otros investigadores, por el hecho de que la catequina, que no está glicosilada en la naturaleza, se absorbe con relativa eficiencia. El objetivo principal de esta iniciativa es añadir valor a los resultados de investigación con moléculas de alto potencial farmacológico como los flavonoides.

Debido a ello es necesario analizar y estudiar los efectos terapéuticos de las plantas para conocer los principios activos responsables de cortar, aliviar o curar las enfermedades, separarlos de las plantas que lo contienen, determinar sus estructuras químicas, procurar su síntesis, proponer modificaciones estructurales en busca de una mayor actividad.

En la actualidad, el estudio e investigación de las especies vegetales que presentan propiedades medicinales es de creciente interés con la finalidad de verificar su actividad medicamentosa lo cual constituye un avance para validar un recurso natural y culturalmente accesible para los pobladores.

Sin ser ajenos a esta realidad y con el afán de contribuir al uso tradicional con fines medicinales de las especies *Chenopodium incisum* Poir (Arq'a paiqo) y *Grindelia boliviana* Rusby (Ch'iri ch'iri) utilizadas en nuestra región por sus propiedades antimicrobianas

frente a una gran variedad de bacterias que causan diversas enfermedades respiratorias como la tuberculosis, es importante su estudio para demostrar experimentalmente las propiedades que presentan estas especies tal como refiere la medicina tradicional, esto proporcionará las bases científicas para posteriores estudios.

La tuberculosis es una de las principales enfermedades crónicas y oportunistas en el Perú, siendo su agente causal *Micobacterium tuberculosis*. Enfermedad reemergente que afecta a los pacientes inmunocomprometidos. Su virulencia se eleva por factores físicos, ambientales, por el estado inmunológico del paciente, el uso incorrecto de los antibióticos, el fracaso en el tratamiento no supervisado y al manejo inapropiado de los programas de control. Por otro lado, la diversidad biológica del Perú ha permitido el uso de los recursos naturales para el tratamiento tradicional de diferentes enfermedades.

Estudios previos han informado sobre el aislamiento y la identificación de flavonoides que poseen actividad antibacteriana puesto que la capacidad de los flavonoides de interactuar con las membranas puede afectar en gran medida sus bioactividades, la actividad antibacteriana de los flavonoides se puede atribuir a su modo de acción común sobre las membranas por lo tanto es importante para caracterizar la relación entre la actividad antibacteriana de los flavonoides y la interacción de la membrana. <sup>(15)</sup>

Investigaciones realizadas reportan que las agliconas de flavonoides y sus glucósidos, tienen propiedades antibacterianas, antivirales, antifúngicas y antiprotozoarios. Mandalari G., et al. (2013)<sup>(14)</sup> evaluaron las propiedades antimicrobianas de fracciones de Bergamota ricos en flavonoides y la influencia de la desglicosilación enzimática en la actividad antimicrobiana contra bacterias Gram negativas, Gram positivas y levaduras, demostrando que su potencia antimicrobiana aumentó después de la desglicosilación enzimática.

La aglicona (kaempferol) y sus glucósidos también pueden actuar sinérgicamente con antibióticos (por ejemplo, rifampicina, vancomicina, meticilina, eritromicina y clindamicina), contra las bacterias resistentes a los antibióticos <sup>(21)</sup>, agliconas de los flavonoides parecen ser más activas que sus glicósidos debido a que son compuestos lipófilos, que al interactuar con las membranas lipídicas, afectan la fluidez de la membrana <sup>(16) (22) (23)</sup>.

### **Justificación práctica**

Los extractos y productos derivados provenientes de las plantas en estudio pueden ser utilizados para desarrollar fitomedicamentos destinados a combatir la tuberculosis.

En el uso popular de plantas medicinales en el tratamiento de la tuberculosis pulmonar se reportan, especies como *Grindelia boliviana* Rusby (Ch'iri ch'iri) y *Chenopodium incisum* Poir (Arq'a paiqo), atribuyéndose el efecto a los metabolitos secundarios con acción antimicrobiana; que sin embargo no a sido investigada científicamente. <sup>(3-24)</sup>

La importancia del presente proyecto se debe, a la necesidad de validar la utilización de tratamientos naturales para la tuberculosis. <sup>(4)</sup>

### **1.5. HIPÓTESIS**

Los extractos etanólicos al 70 % y las agliconas de flavonoides de *Grindelia boliviana* Rusby (Ch'iri ch'iri) y *Chenopodium incisum* Poir (Arq'a paiqo) presentan actividad antituberculosa in vitro sobre cepas de *Micobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv.



## CAPITULO II

### 2.1. ANTECEDENTES:

#### 2.1.1. ANTECEDENTES LOCALES:

- **Moscoso Castilla, Mariano “Secretos Medicinales de la Flora Peruana y guía de la maternidad” Cusco, (1997) página 34.** Refiere que el cocimiento de *Grindelia boliviana* Rusby “Ch’iri ch’iri” es muy útil para la Tuberculosis a quienes se les suministra en cantidades muy pequeñas. <sup>(4)</sup>
- **Guevara Ochoa, Laura; Dueñas Corrido Gloria “Plantas medicinales trece fichas completas” Centro de Estudios Regionales Andinos Bartolomé de las Casas Cusco, (2001).** Refiere que *Chenopodium ambrosioides* “Paico” presenta propiedades medicinales expectorantes, tos, asma, antibiótico, antitusígeno, y antituberculoso. <sup>(5)</sup>
- **Oviedo Licon, Asunción Yovana; Aiquipa Huaman, Katy, En su tesis “Estudio Comparativo In Vitro de la Actividad Antibacteriana de los Extractos Secos Hidroalcohólicos al 70 % de las hojas de *Psidium guajava* (Sahuinto) y *Chenopodium ambrosioides* (Paico) frente a bacterias que causan infecciones de las vías Respiratorias y determinación de la Toxicidad Aguda en Animales de Experimentación”, Universidad De San Antonio Abad del Cusco. Facultad de Farmacia y Bioquímica. (2011)** Se determinó la actividad antibacteriana in vitro de las especies vegetales Sahuinto y Paico sobre cepas ATCC. EL Paico presentó una CMI de 25 mg / pozo frente a *staphylococcus aureus* ATCC 29523; 75mg/pozo frente a *streptococcus pneumoniae* ATCC 49136. 10 mg/pozo frente a *streptococcus pyogenes* ATCC 19615. Considerándose al paico un antibacteriano de capacidad intermedia frente a estas bacterias; en el caso de *S. pyogenes* presentó 99.36% demostrándose una buena actividad antibacteriana. Datos que se obtuvieron al comparar con el fármaco patrón penicilina G sódica (100%). <sup>(25)</sup>
- **Maquera Cueva, Luz Eliana; Menacho Duran Emily July. En su tesis “Actividad Antituberculosa in vitro del Extracto Etanólico de *Spergularia stenocarpa* (phillipi) IM Johnston (choquetakarp) y Evaluación de la Toxicidad Aguda”. Universidad Nacional De San Antonio Abad del Cusco. Facultad de Farmacia y Bioquímica. (2011).** Los resultados mostraron: Para *Micobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv: El extracto etanólico de las raíces de la especie en estudio presentó una buena actividad inhibitoria sobre todo a partir de la concentración de 50 mg/mL donde existió una total inhibición del crecimiento micobacteriano lo cuál le confiere una significativa actividad antituberculosa. Respecto al extracto de la parte aérea, es el que mejor actividad inhibitoria presentó frente al microorganismo en estudio, se observó que a concentraciones superiores de 20 mg/mL presenta una total inhibición del crecimiento micobacteriano. Para *Micobacterium tuberculosis* multidrogoresistente (MDR): El extracto etanólico de las raíces de la especie en estudio mostró una débil actividad inhibitoria frente a

*Micobacterium tuberculosis* multidrogo resistente y con concentraciones menores (14 mg/mL, 20 mg/mL, 26 mg/mL, 32 mg/mL y 38 mg/mL) no presentó ninguna actividad inhibitoria significativa comparado con el grupo control. No siendo así con el extracto de la parte aérea, demostrándose la mayor actividad inhibitoria con todas las concentraciones empleadas frente al microorganismo ensayado por ende se demostró la actividad antituberculosa *in-vitro* de la especie vegetal en estudio.<sup>(26)</sup>

### 2.1.2. ANTECEDENTES NACIONALES:

- **Mendocilla, Moises; Villar Lopez, Marta. Manual de Fitoterapia en el capítulo VII Monografía de Plantas Medicinales, (1998) página 251.** Refiere que la especie *Chenopodium ambrosioides* (Paico) presenta propiedades medicinales para la tuberculosis.<sup>(27)</sup>
- **Brack Egg Antonio. Diccionario enciclopédico de plantas útiles del Perú. Centro de Estudios Regionales Andinos Bartolomé de las Casas, 1999. Pág.229.** Refiere que la especie *Grindelia Boliviana* de nombre común Ch'iri - ch'iri, de la familia asteráceas, distribuida en la sierra desde los 2500 a 4000 msnm, de usos medicinal contra la bronquitis, tomar la infusión de flores y frutos.<sup>(3)</sup>
- **Brack Egg Antonio. Diccionario enciclopédico de plantas útiles del Perú. Centro de Estudios Regionales Andinos Bartolomé de las Casas, 1999. Pág.130.** Menciona que la especie *Chenopodium ambrosioides* de nombre común Paico, de la familia quenopodiáceas, distribuida en la costa sierra y selva, situación; hierba silvestre y cultivada y de uso medicinal como antitusígenos tomar el cocimiento de las hojas, y para la pulmonía, tomar el cocimiento de las hojas con miel. <sup>(3)</sup>  
Presenta compuestos químicos: Principalmente ascaridol de propiedades vermífugas y otros monoterpenos, alcaloides, ácido butírico, salicilato de metilo, sesquiterpenos, triterpenos, lípidos, flavonoides (camferol – 7 – ramnósido, ambosidio, quercetina) aminoácidos, ácidos orgánicos, alcanfor, pectina, taninos, terpenos, carveno, anethole y santonina.
- **Luis Ayala, Rosario; Machaca Cañasaire, Miguel Ángel. En su tesis “Estudio Farmacognóstico y Determinación de la Actividad Antituberculosa de *Spergularia media* (L.) Griseb Choquetacarp”, (2007) Se hacen estudios de caracterización morfológica e histológica, en el estudio farmacognóstico se identificaron carbohidratos, alcaloides, esteroides, glicósidos, saponinas y sapogeninas; respecto a la evaluación de la actividad antituberculosa se comprobó la actividad antituberculosa del extracto de saponinas (33.33 mg/mL y 66.66 mg/mL) y del extracto de sapogeninas (4 mg/mL y 12 mg/mL) presentes en la raíz frente a las cepas de *Mycobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv. El ensayo toxicológico realizado la clasifica como especie atóxica.<sup>(28)</sup>**

- **Alvarado Jimmy, Vásquez Hilda, Delgado Guillermo E, Trevisan Dalva, Horna Oscar, Pereira Jurandir y Rojas Consuelo “Actividad Inhibitoria de Plantas In Vitro de *Drosera capillaris* sobre *Mycobacterium tuberculosis*”. Facultad de Ciencias Biológicas UNMSM (2010).** El objetivo del trabajo fue demostrar la actividad inhibitoria de plantas *in vitro* de *Drosera capillaris* (Droseraceae) sobre *Mycobacterium tuberculosis*. Las plantas de *D. capillaris* fueron propagadas en cultivos *in vitro* a partir de plántulas y hojas adultas. Se utilizó metanol como solvente de extracción y el sistema de cromatografía de gas en la determinación de los metabolitos secundarios. El medio de cultivo Lowenstein-Jensen, suplementado con las concentraciones 1,25; 2,5 y 5 mg/mL de la fracción clorofórmica del extracto crudo metanólico, fue utilizado en la evaluación del crecimiento de cinco cepas de *M. tuberculosis*. Las plantas de 3 – 5 cm de altura fueron obtenidas después de 10 – 12 meses de cultivo *in vitro*. La naftoquinona plumbagina fue determinada por comparación con el tiempo de retención del patrón correspondiente, así como de otros compuestos hidrocarbonados similares de cadena larga. El crecimiento de *M. tuberculosis* fue inhibido en un rango de 40 – 93,1% en los tratamientos 2,5 y 5 mg/mL. La concentración inhibitoria mínima (CIM) fue 1,25, mg/mL. Se demostró la acción antibacteriana del extracto metanólico de plantas *in vitro* de *D. capillaris*, probablemente por acción de la plumbagina y de los otros metabolitos secundarios detectados. <sup>(29)</sup>
  
- **Moncada Ascencio, Natali; Farcio Villarreal, Manuel; rojas Idrogo, Consuelo; Trevisan Ferreira, Dalva; Horna Dávila, Oscar; Pereira Jurandir y Delgado Paredes, Guillermo. “Actividad biológica de *Plumbago scandens* I. sobre cepas multidrogoresistente de *mycobacterium tuberculosis*” Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas. (2011).** En el presente trabajo se determinó el efecto inhibitorio de los extractos crudos metanólico (MeOH) y de acetato de etilo (AcOEt), expresados como concentración mínima inhibitoria (CMI) de plantas silvestres y plántulas *in vitro* de *Plumbago scandens* L. (Plumbaginaceae) sobre cepas multidrogoresistente (MDR) de *Mycobacterium tuberculosis*. El material vegetal estuvo constituido por raíces de plantas silvestres, en tanto que las plántulas *in vitro* fueron obtenidas de semillas y micropropagadas en medio de cultivo Murashige y Skoog (MS). El material microbiológico, constituido por una cepa control y dos cepas resistentes a isoniacida (INH) y rifampicina (RIF), fue cultivado en medio de cultivo Lowenstein-Jensen. Los valores CMI variaron entre 0,65 y 1,3 mg/mL, mostrándose más sensibles las cepas bacterianas frente al extracto crudo de AcOEt de plantas silvestres. El análisis cromatografía de gases (GC) determinó la presencia de la naftoquinona plumbagina y otros compuestos aromáticos. En conclusión, los extractos crudos de MeOH y AcOEt de raíces de plantas silvestres y extracto crudo de MeOH de plántulas *in vitro* de *P. scandens* ejercieron una fuerte acción inhibitoria sobre cepas MDR de *M. tuberculosis*. <sup>(12)</sup>

### 2.1.3. ANTECEDENTES INTERNACIONALES:

- **Salinas Gonzales, Noe Rafael en su tesis “Análisis de la Actividad de extractos Crudos de *Juglans Regia* L, *Juglan Mollis* y *Carya Illinoensis* contra *Mycobacterium Tuberculosis*” (2004).** El objetivo de este trabajo fue evaluar la actividad anti-micobacteriana de extractos crudos de hoja y corteza de *Juglans regia* (nogal de Castilla), *Juglans mollis* (nogal encarcelado) y *Carya illinoensis* (nogal pecanero). Los extractos hexánico, metanólico, etanólico y acuoso de hoja o corteza, obtenidos de cada planta, se probaron contra *M. tuberculosis* cepa H<sub>37</sub>Rv mediante el método en microplaca de Azul de Alamar (EMMAA), utilizándose isoniacida como control positivo de inhibición de crecimiento. Los extractos probados que presentaron la mejor actividad fueron: los hexánicos de corteza de *C. illinoensis*, *J. mollis* y *J. regia* con una concentración mínima inhibitoria (CMI) de 31.25, 50 y 100 ug/mL respectivamente, así como también el etanólico de corteza de *J. mollis* con una CMI de 100 ug/mL. Los restantes extractos de *C. illinoensis* y *J. mollis*, con excepción de los acuosos presentaron una CMI de 125 ug/mL, así como el metanólico de *J. regia*. La identificación parcial (grupos químicos) de los componentes de los extractos reveló que los extractos con mayor actividad antimicobacteriana (hexánicos de corteza de *C. illinoensis*, *J. mollis* y *J. regia*) contienen compuestos no polares, con presencia de triterpenos. <sup>(30)</sup>
  
- **Suksamrarn A, Poomsing P, Aroonrerk N, Punjanon T, Suksamrarn S, Kongkun S. “Flavonas Antimicobacterianos y Antioxidantes de *Limnophila geoffrayi*”. (2003).** El extracto de cloroformo de la parte aérea de *Limnophila geoffrayi* mostró actividades antimicobacterianos y antioxidantes. El fraccionamiento guiado por bioensayo ha conducido al aislamiento de las flavonas nevadensin (5,7-dihidroxi-6, 8,4'-trimethoxyflavone, (1) y isothymusin (6,7-dimetoxi-5, 8,4'-trihidroxi-flavona, (2). Ambos compuestos 1 y 2 exhiben actividad de inhibición contra *Mycobacterium tuberculosis*, con valor igual CMI de 200 ug / mL. <sup>(18)</sup>
  
- **Ferreres Federico, Grossob Clara, Gil-Izquierdo Ángel, Valentão Patricia, Azevedo Carolina, Andrade Paula B. “Análisis por HPLC-DAD-ESI / MSN de compuestos fenólicos para el control de calidad de *Grindelia robusta* Nutt. Y bioactividades” Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis (2013)** Reportan un estudio del extracto hidrometanólico obtenido de *Grindelia robusta* Nutt. Que fue estudiado por HPLC-DAD-ESI / MSN. Donde se detectaron treinta y seis flavonoides y ácidos hidroxicinámicos, a partir de los cuales se describen treinta por primera vez en esta especie. La Cuantificación por HPLC-DAD mostró que diosmetina-7-O-glucurónido-3'-O-pentoside + apigenina-7-O-glucurónido-4 'O-pentoside, apigenina-7-O-glucurónido + diosmetina-7-O ácido glucurónido y 3,5- ácido dicafeoilquínico + 3,4-dicafeoilquínico fueron los principales compuestos. <sup>(20)</sup>

- **Song K, Wang HQ, Liu C, Kang J, Li BM, Chen RY. "Constituyentes Químicos de *Chenopodium ambrosioides*" PubMed - Medline.** Doce compuestos fueron aislados de la hierba de *Chenopodium ambrosioides*, y sus estructuras fueron identificados por métodos espectroscópicos como kaempferol-7-O-alfa-L-ramnopiranosido (1), kaempferol-3,7-di-O-alfa-L-ramnopiranosido (2), patuletin (3), quercetina-7-O-alfa-L-ramnopiranosido (4), cetona saltamontes (5), 2-ciclohexen-4-hidroxi-4-metil-1-ona (6), syringaresinol (7), bencilo beta-D-glucopiranosido (8), dendranthemoside B (9), N-trans-feruloyl tiramina (10), N-trans-feruloyl de 4'-O-metildopamina (11), y 4-hidroxi-N- [2- (4-hidroxifenil) etil] benzamida (12). Entre ellos, los compuestos 3, 6-8,10, y 12 fueron aislados del género *Chenopodium* por primera vez, y compuestos 2-12 se aislaron de esta planta por primera vez. <sup>(19)</sup>
  
- **Mandalar G I, Bennett R N, Bisignano G, Trombetta D, Saija A, Faulds C B, Gasson M J and Narbad A. "Actividad antimicrobiana de flavonoides extraídos de la Bergamota (*Citrus bergamia* Risso) peel, un subproducto de la industria del aceite esencial "Departamento de Farmacobiología de la Universidad de Messina, Italia, (2007).** Fracciones etanólicas de Bergamota fueron probados contra bacterias Gram negativas (*Escherichia coli*, *Pseudomonas putida*, *Salmonella enterica*), y Bacterias Gram-positivas (*Listeria innocua*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Lactococcus lactis*) y la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Se encontró que eran activas contra todas las bacterias Gram negativas ensayadas, y algunas Gram positivas, su potencia antimicrobiana aumentó después de la desglicosilación enzimática. La concentración mínima inhibitoria de los flavonoides Y agliconas: neohesperidina, hesperetina (aglicona), neoeriocitrin, eriodictiol (aglicona), y naringina naringenina (aglicona), se encuentra en el rango de (200 a 800 ug/mL). <sup>(14)</sup>
  
- **Camacho Corona María del Rayo, Gonzales Santiago Omar, Garza Gonzales Elvira, Delgado Lamas Guillermo, Luna Herrera Julieta. "Actividad Antimicobacteriana de algunos alcaloides, flavonoides, terpenos y quinonas. Facultad de Ciencias Químicas, Universidad autónoma de nuevo león. España (2007).** En previas investigaciones se aislaron 29 compuestos de plantas medicinales utilizadas como antisépticos en la medicina tradicional, los 29 productos naturales se evaluaron en contra de *Micobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv, dentro de los resultados se demostró que la flavanona pinostrobin presentó una CMI de 12.5 ug/mL. <sup>(31)</sup>
  
- **Rosella, María Adelaida; Rojas Duran Rosario, Aquila Silvia V, Spegazzini, Etile Dolores y Debenetti, Silvia Laura. "Actividad Antimicobacteriana in vitro de *Gaillardia cabreræ* y *G. megapotamica* var. *Scabiosioides* (asteraceae)". Latin American Journal of Pharmacy, vol 29-05. Argentina (2010).** Se ensayó la actividad antimicobacteriana in vitro de los extractos diclorometanico (DCM) y metanólico (MeOH) de *G cabreræ* y *G megapotamica* var. *Scabiosioides* frente a dos cepas de *Micobacterium tuberculosis* (H<sub>37</sub>Rv y MDR), por medio del test colorimétrico TEMA, determinandose la concentración mínima inhibitoria (CMI) en ug extracto/mL. Los extractos DCM de ambas especies de *Gaillardia* y el extracto (MeOH) de *G*

*cabreræ* exhibiendo actividad antimicobacteriana frente a ambas cepas con CMI de 50- 100 µg/mL de las fracciones obtenidas a partir del extracto metanólico de *G cabreræ* presentaron actividad antimicobacteriana. El screening fitoquímico de las fracciones activas reveló la presencia de sesquiterpenlactonas, flavonoides glicosilados y sus aglicones como componentes mayoritarios. <sup>(32)</sup>

- **Jozwik Z; Trytek J. "Efecto de Extractos de Propóleos que Contienen Compuestos Flavonoides en Bacilos Ácido resistentes. Instituto de la universidad Minufiya Egipto (1985).** Estudiaron la inhibición del crecimiento de 5 especies de micobacterias, utilizando extractos etanólicos de propóleos de polonia encontrando que la inhibición del crecimiento de las micobacterias era proporcional a la concentración de flavonoides constituyentes de la fracción. <sup>(33)</sup>

## 2.2. ESTADO DE LA CUESTIÓN.

Según la OMS La tuberculosis es la segunda causa mundial de mortalidad, después del sida, causada por un agente infeccioso, el año 2012 8.6 millones de personas enfermaron de tuberculosis y 1.3 millones murieron por esta causa, más del 95% de las muertes por tuberculosis ocurrieron en países de ingresos bajos y medianos. La tuberculosis multirresistente se ha encontrado en casi todos los países estudiados.

Aunque lentamente, está disminuyendo el número anual estimado de personas que enferman de tuberculosis; ello quiere decir que el mundo está en camino de cumplir el objetivo de Desarrollo del Milenio consistente en detener la propagación de esta enfermedad, la tasa de mortalidad por tuberculosis disminuyó un 45% entre 1990 y 2012 gracias a las estrategias DOTS y Alto a la Tuberculosis recomendadas por la OMS. <sup>(34)</sup>

En el Perú hay una situación hiperendémica de tuberculosis sensible donde se observa un descenso a nivel nacional, aunque en algunas áreas del país se ha observado un incremento como en: Ucayali, Loreto y Madre de Dios. Lo mismo se observa en la mortalidad y letalidad, aunque Apurímac y Huancavelica, tienen un incremento importante inclusive más alto que Lima y Callao, lo cual llama la atención por ser zonas andinas y con un número reducido de casos aunque poca capacidad de respuesta de los servicios de salud. Ante el inicio de una nueva epidemia de tuberculosis resistente (MDR, XDR), que demanda cambiar las estrategias de control generalizadas en todo el país. Es necesario, ser creativos e innovadores para enfrentar este problema nuevo. Donde lo más importante son las medidas de reducción de la transmisión en la comunidad y reducir los potenciales reservorios. <sup>(35)</sup>

Nuestro país, según la información provista del INEI, ha mejorado en los últimos años en cuanto a la incidencia de TBC. En el 2003 se contabilizaron 121.9 casos reportados de TBC por cada 100,000 habitantes, mientras que en 2010, solo se reportaron 79.9. La mejora es significativa, pero aún insuficiente. Es decir, la TBC sigue siendo una gran carga para la sociedad peruana. No obstante, hay que resaltar la mejora a nivel regional en la incidencia de casos de TBC. Tacna, Madre de Dios, Lima y Callao son las regiones con mayor reducción de casos reportados de TBC por cada 100,000 habitantes; sin embargo, la cantidad de casos aún sigue siendo elevada. <sup>(36)</sup>

Según la Dirección Regional de Salud Cusco, la tasa de morbilidad para el 2013 fue de 53.55 % y la incidencia fue de 37.61% por cada 100.000 habitantes, confirmada bacteriológicamente, ello sugiere la estandarización de cultivos y pruebas de sensibilidad y el fortalecimiento de los laboratorios, por otro lado ha aumentado el ingreso de casos de tuberculosis no confirmados en las zonas de La Convención Kimbiri y Pichari, lo que indirectamente indica la necesidad de mejorar el entrenamiento de personal médico, fortalecer la estrategia regional de tuberculosis y mejorar las competencias técnicas del personal de salud. <sup>(37)</sup>

Los flavonoides están ampliamente distribuidos en el reino vegetal y presentan una amplia gama de actividades biológicas incluyendo antibacterianos y antifúngicos. Jozwik y Trytek <sup>(33)</sup> determinaron la inhibición del crecimiento de 5 especies de micobacterias, utilizando extractos etanólicos de propóleos de Polonia encontrando que la inhibición del crecimiento de las micobacterias era proporcional a la concentración de flavonoides constituyentes de la fracción. En otra investigación se aislaron 29 compuestos de plantas medicinales utilizadas como antisépticos en la medicina tradicional, los 29 productos naturales se evaluaron en contra de *Micobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv, dentro de los resultados se demostró que la flavanona pinostrobin presento una CMI de 12.5 ug/mL. <sup>(31)</sup> Por otro lado se ensayo la actividad antimicobacteriana in vitro de los extractos diclorometanico (DCM) y metanólico (MeOH) de *Gaillardia cabreræ* y *Gaillardia megapotamica* var. *Scabiosoides* frente a dos cepas de *Micobacterium tuberculosis* (H<sub>37</sub>Rv y MDR), determinandose la concentración inhibitoria mínima (MIC) en ug extracto/mL. Los extractos DCM de ambas especies de *Gaillardia* y el extracto (MeOH) de *G cabreræ* exhibiendo actividad antimicobacteriana frente a ambas cepas con MICs de 50- 100 ug/mL de las fracciones obtenidas apartir del extracto metanólico de *Gaillardia cabreræ* presentaron actividad antimicobacteriano. El screening fitoquímico de las fracciones activas reveló la presencia de sesquiterpenlactonas, flavonoides glicosilados y sus aglicones como componentes mayoritarios. <sup>(32)</sup>

Muchos estudios han demostrado que el kaempferol y algunos glucósidos de kaempferol tienen actividades farmacológicas extensas, incluyendo antioxidante, antiinflamatorio, anticancerígeno, antimicrobiano, cardioprotector, neuroprotector, antidiabético, antiosteoporótico, estrogénica, antiestrogénico, ansiolíticos, analgésicos y actividades antialérgicos. Donde se demostró que la actividad de la aglicona (kaempferol) es mayor que sus respectivos glucósidos, por mostrar una mayor lipofilia y capacidad para penetrar en las bicapas lipídicas para ejercer esta actividad. <sup>(16,22)</sup>

## 2.3. BASES TEÓRICO – CIENTÍFICAS:

### 2.3.1. DESCRIPCIÓN DE LA ESPECIE VEGETAL EN ESTUDIO:

*Grindelia boliviana* Rusby “Ch’iri ch’iri” y de *Chenopodium incisum* Poir “Arq’a paiqo”.

#### 2.3.1.1. CH’IRI CH’IRI

Sinonimia del nombre común: “Ch’iri – Ch’iri”, “Cuca ch’iri”, “Flor de chiri”, “Lichi ch’iri”.

#### a.- CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA.

La clasificación taxonómica fue realizada en el herbario Vargas (CUZ) perteneciente a la facultad de Ciencias Biológicas de la UNSAAC, por el M.Cs. Blgo. Alfredo Tupayachi Herrera, la planta fue diagnosticada utilizando bibliografía especializada y claves dicotómicas, cuyas posiciones taxonómicas de acuerdo a Cronquist (1981). ANEXO N° 02

**Reino:** vegetal

**División:** Magnoliophyta (=Angiospermas)

**Clase:** Magnoliopsida = tricolpados (eudicotiledóneas).

**Sub clase:** Asteridae

**Super orden:** Asteranae

**Orden:** Asterales

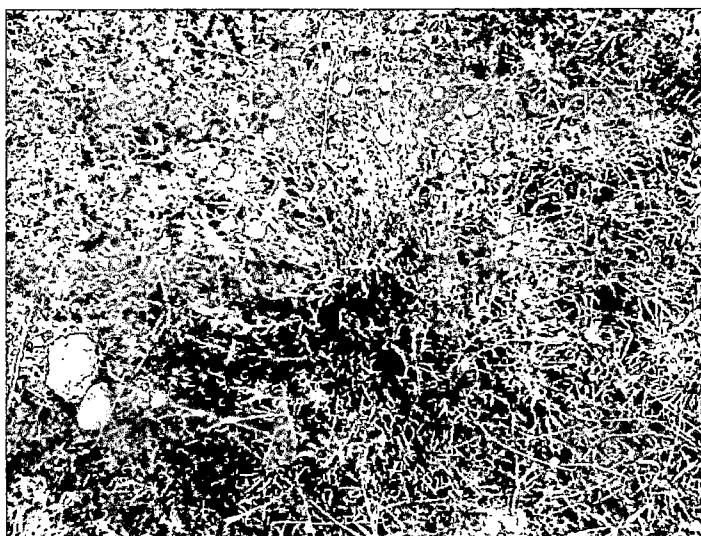
**Familia:** Asteraceae

**Género:** *Grindelia*

**Especie:** *Grindelia boliviana* Rusby

**Fuente:** Herbario Vargas Cusco.

**FOTOGRAFÍA N° 01:** *Grindelia boliviana* Rusby “CH’IRI- CH’IRI”



**Fuente:** Berrío J y Huallpacuna V. Tinta – Canchis – Cusco (2013)



### **b.- DESCRIPCIÓN BOTÁNICA:**

**Planta:** Perenne y erecta, con tallo bastante ramificado y estriado que mide más o menos de 60 a 80 cm de altura. <sup>(3)</sup>

**Hojas:** Sus hojas alternas son ovaladas, las de abajo son espatuladas, las de arriba son lanceoladas oblongadas, de color verde claro. <sup>(3)</sup>

**Flores:** Las flores son tubulares de color amarillo fuerte, radiadas, grandes, solitarias y terminales. <sup>(3)</sup>

**Fruto:** Los frutos son aquenios cuadrangulares. <sup>(3)</sup>

**c.- PROPIEDADES MEDICINALES:** El cocimiento de esta yerba es muy útil para la tuberculosis a quienes se les suministra en cantidades muy pequeñas. <sup>(9)</sup>

Es comunmente empleada en emplastos de hojas, para el tratamiento de artritis y para aliviar dolores musculares y asociados a golpes, también se usa en forma tópica en afecciones de los huesos, contusiones, dislocaduras, luxaciones, torceduras, fracturas desgarro de tendones y músculos, dolores reumáticos y alergias a la piel; algunas referencias de uso en hemorragias internas, inflamación del hígado, afecciones de las vías respiratorias, para la vía interna es utilizada la masticación de las hojas en forma idéntica a la coca en afecciones broncopulmonares como resolutivo y expectorante afecciones urinarias, asma y tratamiento de la tuberculosis <sup>(3, 6)</sup>

### **2.3.1.2. ARQ'A PAIQUO**

**Sinonimia del nombre común:** "Arq'a paiqo", "Ayara paiqo", "Aya paiqo", "Gentilpa paiqon", "soq'a paiqo".

### **a.- CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA.**

La clasificación taxonómica fue realizada en el herbario Vargas (CUZ) perteneciente a la facultad de Ciencias Biológicas de la UNSAAC, por el M.Cs. Blgo. Alfredo Tupayachi Herrera, la planta fue diagnosticada utilizando bibliografía especializada y claves dicotómicas, cuyas posiciones taxonómicas de acuerdo a Cronquist (1981). ANEXO N° 02

**Reino:** vegetal

**División:** Magnoliophyta (=Angiospermas)

**Clase:** Magnoliopsida = tricolpados (eudicotiledóneas).

**Sub clase:** Caryophyllidae

**Super orden:** Cariophyllanae

**Orden:** Cariophyllales

**Familia:** Amaranthaceae (= Chenopodioaceae)

**Género:** Chenopodium

**Especie:** *Chenopodium incisum* Poir

**Fuente:** Herbario Vargas Cusco

**FOTOGRAFÍA N° 02: *Chenopodium incisum* "ARQ'A PAIQO"**



**Fuente:** Berrio J y Huallpacuna V (Tinta – Canchis – Cusco - 2013)

**b.- DESCRIPCIÓN BOTÁNICA:**

**Planta:** Herbácea erecta olorosa, perenne o anual muy ramificada en la base, de 50 a 60 cm de altura pudiendo llegar a un metro, usualmente rojiza o verde presenta pubescencia glandular. <sup>(3)</sup>

**Hojas:** Numerosas alternas, son más largas que anchas, de color verde a púrpura las inferiores generalmente ovoides y lanceoladas con bordes dentados o profundamente sinuosos, de 5 a 8 cm de largo y 1 a 3 cm de ancho. Pecíolo de pluma; las superiores son más pequeñas, lanceoladas y de bordes enteros. <sup>(3)</sup>

**Flores:** Hermafroditas, pequeñísimas, agrupada en glomérulo, reunidas en panícula que sale de la axila de las hojas; cáliz con 5 sépalos, apetaladas de color verde amarillentas. <sup>(3)</sup>

**Fruto:** Globuloso envuelto en los restos de cáliz de 1.5 a 2 mm de diámetro, pericarpio delgado. <sup>(3)</sup>

**Semilla:** Lenticular bruma o negra, brillante y lisa de 0.5 mm de espesor. <sup>(3)</sup>

**c.- SITUACIÓN GEOGRÁFICA:** Distribuido en las zonas cálidas y templadas de todo el país en la costa sierra y selva. <sup>(3)</sup>

**d.- PROPIEDADES MEDICINALES:**

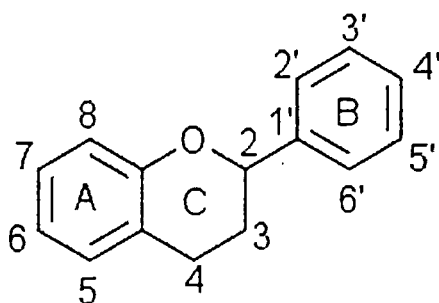
Contra dolores de estómago y cólicos tomar el té de las hojas, como purgante bebida de las hojas machacadas con jugo de limón y sal, como antidiarreico pediátrico tomar la infusión de las ramitas, contra los abscesos hacer un baño en hojas crudas o cocidas, como antitusígeno tomar el cocimiento de las hojas, como antihelmíntico (áscaris, oxiuros) tomar el jugo crudo proveniente de exprimir las hojas machacadas con limón,

contra la gastritis tomar la infusión de las hojas, contra la hinchazón frotamiento con las hojas machacadas, contra el resfriado tomar el cocimiento de las hojas, para curar enfermedades de la piel realizar lavados con el cocimiento de la planta, para la pulmonía tomar la infusión de las hojas con miel y como contraceptivo tomar el cocimiento de las raíces y hojas. <sup>(3,4)</sup>

### 2.3.2. FLAVONOIDES.

Los flavonoides están ampliamente presentes en el reino vegetal que presenta una amplia gama de actividades biológicas, incluyendo antibacterianos, antifúngicos, antivirales, anti-alérgica, anti-inflamatorio, antiproliferativo y actividades antioxidantes. <sup>(15)</sup>

Flavonoides es el nombre genérico de un grupo de moléculas generadas por el metabolismo secundario de los vegetales. Los flavonoides son compuestos fenólicos diaril-propánicos, es decir, su estructura es del tipo C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, con dos anillos aromáticos unidos entre sí por una cadena de 3 carbonos ciclada a través de un oxígeno, se forman biogenéticamente a través de la ruta del shikimato y del acetato malonato, siendo la chalcona el flavonoide inicialmente formado, y apartir del cual se derivan las otras clases por posteriores modificaciones que ocurren en varias etapas <sup>(38, 39)</sup>



**FIGURA N° 01:** ESTRUCTURA BASE DE UN FLAVONOIDE

**FUENTE:** Castillo David, 2009.

Los Flavonoides son pigmentos naturales presentes en los vegetales y que protegen al organismo del daño producido por agentes oxidantes como los rayos ultravioleta, la polución ambiental, etc. El organismo humano no puede producir estas sustancias químicas protectoras, por lo que deben obtenerse mediante la alimentación o en forma de suplementos. Están ampliamente distribuidos en plantas, frutas, verduras y representan componentes sustanciales de la parte no energética de la dieta humana. <sup>(27)</sup> La solubilidad depende de la forma en que se encuentren y el número y clase de sustituyentes presentes. Los glicósidos, las antocianidinas y los sulfatos son solubles en agua y alcohol. Los glicósidos flavonoides son sólidos amorfos, mientras que las correspondientes agliconas son sólidos cristalinos. <sup>(38)</sup>

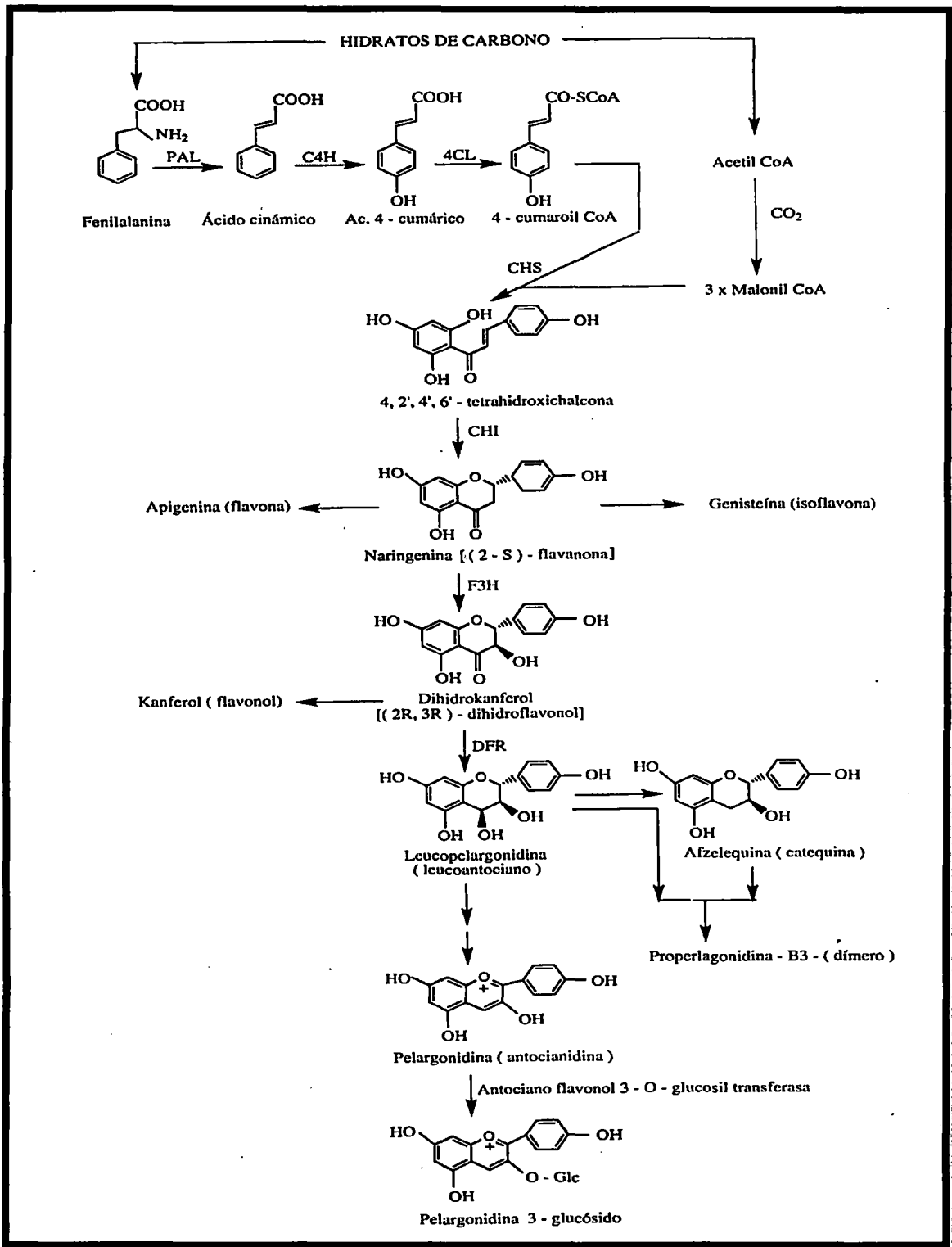
Los flavonoides poseen propiedades muy apreciadas en medicina, como antimicrobianos, anticancerígenos, disminución del riesgo de enfermedades cardíacas, entre otros efectos. Aún queda mucho por investigar de los flavonoides, de su valor medicinal, y de su impacto en la nutrición y la salud humana y de los animales, es necesario continuar la investigación de su estructura, su metabolismo y su biodisponibilidad, por lo que se esperan importantes progresos en este campo <sup>(40)</sup>

### **2.3.2.1. BIOSÍNTESIS DE LOS FLAVONOIDES:**

Todos los flavonoides derivan sus esqueletos carbonados, de dos compuestos básicos procedentes del metabolismo de los hidratos de carbono: Malonil CoA y un ester del CoA, con un ácido hidroxicinámico (generalmente, 4-cumaroil CoA). Su formación tiene lugar por condensación de 3 moléculas de Malonil CoA con el 4- cumaroil CoA, catalizado por una chalcona sintetasa. El compuesto resultante (4,2',4',6'- tetrahidrohidroxichalcona) constituye el intermediario común a todos los flavonoides. La acción estereoespecífica de una chalcona isomerasa da lugar al primer flavonoide, una (2s)-flavanona. El mecanismo que conduce a la transformación de las flavanonas en flavonas e isoflavonas no está claramente establecido. <sup>(39)</sup>

Los dihidroflavonoles son originados por hidroxilación directa de flavanonas en posición 3 en presencia de la dioxigenasa, flavanona 3- hidroxilasa. Estos dihidroflavonoles son intermediarios biosintéticos en la formación de flavonoles, leucoantocianidinas, catequinas, proantocianidinas y antocianidinas. <sup>(39)</sup>

**FIGURA N° 02: Biosíntesis de flavonoides**



Biosíntesis de flavonoides. PAL (fenil alanina amonio – lipasa), C4H (cinamato 4 – hidroxilasa), 4CL (4 – cumarato CoA lipasa), CHS (chalcona sintetasa), CHI (chalconaisomerasa), F3H (flavonona 3 – hidroxilasa), DFR (dihidroflavonol 4 – reductasa).

Fuente: villar del Fresno A., 1999.

### 2.3.2.2. CLASIFICACIÓN DE FLAVONOIDES

Los flavonoides se clasifican a partir de sus variaciones estructurales. Dentro del grupo de los flavonoides propiamente dicho, los más destacables por su interés farmacológico son las flavonas, flavonoles, flavanonas y sus correspondientes heterósidos. <sup>(38)</sup>

En función de sus características estructurales se pueden clasificar en:

- a) **Flavanos.** O flavan 3 oles como la catequina, con un grupo hidroxilo en la posición 3. <sup>(41)</sup>
- b) **Flavonoles.** Poseen un grupo carbonilo en posición 4, un grupo hidroxilo en posición 3 y un doble enlace entre los carbonos 2 y 3 del anillo C. suelen ser incoloros o amarillos y se encuentran en las hojas y en muchas flores. Los más importantes son tres: quercetina, es el flavonol amarillo del polen, la miricetina, presente en la uva; y kaempferol, está presente en las inflorescencias y las protege de la luz ultravioleta. <sup>(38,41)</sup>
- c) **Flavonas.** Como la diosmetina, apigenina, luteolina y crisina, que poseen un grupo carbonilo en posición 4 y un doble enlace entre los carbonos 2 y 3 del anillo C. pero carecen del grupo hidroxilo en posición 3. Las flavonas son amarillas y pueden estar en algunas flores, dándoles un color amarillo a sus pétalos, o en frutos, como en la piel de las uvas. <sup>(38,41)</sup>
- d) **Isoflavonas.** Como la genisteina y la daidzeina, que poseen el anillo b en posición 3 (iso). <sup>(41)</sup>
- e) **Flavanonas.** Se caracterizan por tener saturado el anillo C del grupo flavonoide. Las flavanonas son precursores de otros flavonoides más complejos, pero se encuentran como tales en altas concentraciones en los cítricos. <sup>(41)</sup>
- f) **Antocianidinas.** Las antocianidinas, que tienen unido el grupo -OH en posición 3 pero además poseen un doble enlace entre los carbonos 3 y 4 del anillo C. Las antocianinas, son los pigmentos hidrosolubles presentes en el líquido vacuolar de las células responsables de la mayoría de las coloraciones rojas, azules y violetas de las flores y hojas. <sup>(38,41)</sup>
- g) **Chalconas.** Se caracteriza por contener un grupo -OH en la posición 2. Las chalconas están implicadas en la estimulación de la polinización gracias a que inducen el desarrollo de colores en el espectro de lo visible y en el UV que atraen a insectos (mariposas y abejas). <sup>(38,41)</sup>
- h) **Auronas.** Las auronas son compuestos amarillos brillantes particularmente comunes en miembros de las familias de las compuestas y contribuyen en la coloración de las flores. Se caracterizan por su estructura llamada benzacumarina. <sup>(38,41)</sup>

### 2.3.2.3. AGLICONAS DE FLAVONOIDES:

Las agliconas de flavonoides vegetales (es decir, flavonoides sin azúcares ligados) se producen en una variedad de formas estructurales. Sin embargo, todas contienen 15 átomos de carbono en su núcleo de base y están dispuestos en una configuración C6-C3-C6, que son dos anillos aromáticos enlazados por una unidad de tres carbonos que pueden formar o no un tercer anillo. <sup>(42)</sup> Las agliconas flavonoides altamente hidroxiladas son solubles en, (etanol, metanol y n-butanol), mientras que las poco hidroxiladas lo son en solventes como éter etílico, acetato de etilo y acetona. Las agliconas flavonoides altamente metoxiladas son solubles en solventes menos polares como el éter de petróleo y el cloroformo. <sup>(23)</sup> las agliconas obtenidas deben guardarse en la oscuridad para evitar transformaciones. <sup>(43)</sup>

### 2.3.2.4. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN

Los solventes empleados en la extracción de estos compuestos son muy variados y pueden ser desde muy polares como agua y etanol para glicósidos o agliconas muy hidroxiladas, hasta menos polares como éter y cloroformo para flavonas altamente metoxiladas. Es recomendable emplear una sucesión de dos o más solventes, usualmente en el orden de lipofílico a hidrofílico; ejemplo éter de petróleo, benceno, éter etílico, acetato de etilo, alcoholes y finalmente agua; por otro lado, podrían ser extraídos otros compuestos de alto peso molecular que usualmente interfieren en las subsiguientes etapas de purificación del flavonoide. <sup>(23)</sup>

### 2.3.2.5. REACCIONES DE COLOR

la reacción más usual para la detección de los flavonoides en un extracto de planta es la reacción de Shinoda: al extracto alcohólico incoloro o ligeramente amarillo se le coloca un pequeño trozo de magnesio y unas pocas gotas de HCl concentrado, el desarrollo inmediato de coloración es indicativo de la presencia de: flavonas (amarillo a rojo), flavanonoles (rojo a magnetita), flavanonas (rojo, magenta, violeta, azul), isoflavonas (amarillo); isoflavanonas, chalconas y auronas no dan coloración. <sup>(23)</sup>

### 2.3.2.6. MÉTODOS DE DETECCIÓN DE FLAVONOIDES

#### 2.3.2.6.1. CROMATOGRAFÍA:

Es un método físico de separación, en los que los compuestos a separar se distribuyen entre dos fases, una estacionaria (fase estacionaria) y otra que se mueve (fase móvil) en una dirección definida. La fase estacionaria suele estar en una columna, pero puede tener otras formas, como una fase plana (una hoja por ejemplo). Las técnicas cromatográficas han sido más valiosas que cualquier otra en la separación y el análisis de mezclas muy complejas. <sup>(44)</sup>

Los dos tipos principales de cromatografía son la cromatografía de gases (GC) y la cromatografía de líquidos (LC). En la cromatografía de gases se separan sustancias gaseosas con base en su absorción o partición en una fase estacionaria a partir de una

fase gaseosa. La cromatografía de líquidos comprende técnicas como la de exclusión de tamaño (separación basada en el tamaño molecular), de intercambio iónico (separación basada en cargas eléctricas) y de cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC, high – performance liquid chromatography), basada en la adsorción o separación de una fase líquida.<sup>(44)</sup>

### a) CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA (TLC)

La cromatografía en capa fina al igual que otras técnicas cromatográficas se basa en la retención y elución debido a la diferente interacción del analito entre una fase sólida y otra líquida. Los dos adsorbentes (fase estacionaria) más ampliamente utilizados son la gel de sílice (SiO<sub>2</sub>) y la alúmina (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), ambas de carácter polar. La alúmina anhidra es el más activo de los dos, es decir, es el que retiene con más fuerza a los compuestos; por ello se utiliza para separar compuestos relativamente apolares. El gel de sílice, por el contrario, se utiliza para separar sustancias más polares. El proceso de adsorción se debe a interacciones intermoleculares de tipo dipolo-dipolo o enlaces de hidrógeno entre el soluto y el adsorbente.<sup>(45)</sup>

El orden de elución de un compuesto se incrementa al aumentar la polaridad de la fase móvil o eluyente. Este puede ser un disolvente único o dos miscibles de distinta polaridad. En el siguiente recuadro se recoge por orden creciente de fuerza eluyente los disolventes más comúnmente empleados.<sup>(45)</sup>

Hexano < tetraclorometano < cloroformo < diclorometano < acetato de etilo < acetona < 2-propanol < metanol < agua

En general, estos disolventes se caracterizan por tener bajos puntos de ebullición y viscosidad, lo que les permite moverse con rapidez. Raramente se emplea un disolvente más polar que el metanol. Usualmente se emplea una mezcla de dos disolventes en proporción variable; la polaridad de la mezcla será el valor promediado en función de la cantidad de cada disolvente empleada.<sup>(45)</sup>

La retención se puede explicar en base a la competencia que se establece entre el soluto a separar y la fase móvil por adsorberse a los centros activos polares de la fase estacionaria. Así, las moléculas de soluto se encuentran adsorbidas en la fase estacionaria y a medida que se produce la elución van siendo desplazadas por la fase móvil. La retención y la selectividad en la separación dependen de los valores respectivos de las constantes de los diferentes equilibrios químicos que tienen lugar, que están en función de: - la polaridad del compuesto, determinada por el número y naturaleza de los grupos funcionales presentes. Los solutos más polares quedarán más retenidos puesto que se adsorben más firmemente a los centros activos de la fase estacionaria, mientras que los no polares se eluirán con mayor facilidad.

Naturaleza del disolvente. Así, para un mismo compuesto, un aumento en la polaridad del disolvente facilita su desplazamiento en la placa.<sup>(45)</sup>

La relación entre las distancias recorridas por el soluto y por el eluyente desde el origen de la placa se conoce como R<sub>f</sub>, y tiene un valor constante para cada compuesto en unas condiciones cromatográficas determinadas (adsorbente, disolvente, tamaño de la cubeta,



temperatura, etc.). Debido a que es prácticamente imposible reproducir exactamente las condiciones experimentales, la comparación de una muestra con otra debe realizarse eluyendo ambas en la misma placa. <sup>(45)</sup>

## **b) CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)**

Es una técnica utilizada para separar los componentes de una mezcla basándose en diferentes tipos de interacciones químicas entre las sustancias analizadas y la columna cromatográfica. La HPLC, representa una de las herramientas más empleadas en el laboratorio analítico moderno. La cromatografía es un método, usado primariamente para la separación de los componentes de una muestra, en la cual los componentes se distribuyen en dos fases.

**Fase estacionaria:** Las separaciones se logran por procesos de partición, adsorción o intercambio iónico, según el tipo de fase estacionaria empleada. Las fases estacionarias más comúnmente usadas son la sílice modificada o las microperlas de polímero. <sup>(44)</sup>

**Columna cromatográfica:** El término columna incluye columnas de acero inoxidable, con recubrimiento interno y polimérica, rellenas en una fase estacionaria. La longitud y el diámetro de las columnas afectan la separación.

**Fase móvil:** La fase móvil es un disolvente o mezcla de disolventes, según se define en la cromatografía individual.

**Aparato:** Un cromatógrafo de líquidos consta de un recipiente que contiene la fase móvil, una bomba para forzar el paso de la fase móvil a través del sistema a alta presión, un inyector para introducir la muestra en la fase móvil, una columna cromatográfica un detector y recolector de datos. <sup>(44)</sup>

**Elución en gradiente:** Se denomina elución en gradiente o programación del disolvente a la técnica de cambiar continuamente la composición del disolvente durante la cromatografía. <sup>(44)</sup>

En la HPLC, el compuesto pasa por la columna cromatográfica a través de la fase estacionaria (normalmente, un cilindro con pequeñas partículas redondeadas con ciertas características químicas en su superficie. Esto lo hace mediante el bombeo de líquido (fase móvil) a alta presión a través de la columna. La muestra a analizar es introducida en pequeñas cantidades y sus componentes se retrasan diferencialmente dependiendo de las interacciones químicas o físicas con la fase estacionaria a medida que adelantan por la columna. El grado de retención de los componentes de la muestra depende de la naturaleza del compuesto, de la composición de la fase estacionaria y de la fase móvil.

El tiempo que tarda un compuesto a ser eluido de la columna se denomina tiempo de retención y se considera una propiedad identificativa característica de un compuesto en una determinada fase móvil y estacionaria. <sup>(44)</sup>

### 2.3.2.7. ACCIONES FARMACOLÓGICAS

Sus efectos en los humanos pueden clasificarse en:

- **Propiedades anticancerosas:** Muchos han demostrado ser tremendamente eficaces en el tratamiento del cáncer. Se sabe que muchos inhiben el crecimiento de las células cancerosas. <sup>(40,43)</sup>
- **Propiedades cardiotónicas:** Tienen un efecto tónico sobre el corazón, potenciando el músculo cardíaco y mejorando la circulación. Atribuidas fundamentalmente al flavonoide quercetina aunque aparece en menor intensidad en otros como la genisteína y la luteolina. Los flavonoides disminuyen el riesgo de enfermedades cardíacas. <sup>(40)</sup>
- **Fragilidad capilar:** Mejoran la resistencia de los capilares y favorecen el que éstos no se rompan, por lo que resultan adecuados para prevenir el sangrado. Los flavonoides con mejores resultados en este campo son la hesperidina, la rutina y la quercetina.
- **Propiedades antitrombóticas:** La capacidad de estos componentes para impedir la formación de trombos en los vasos sanguíneos posibilita una mejor circulación y una prevención de muchas enfermedades cardiovasculares. <sup>(38,39,41)</sup>
- **Disminución del colesterol:** Poseen la capacidad de disminuir la concentración de colesterol y de triglicéridos. <sup>(47)</sup>
- **Protección del hígado:** Algunos flavonoides han demostrado disminuir la probabilidad de enfermedades en el hígado. Fue probado en laboratorio que la silimarina protege y regenera el hígado durante la hepatitis. Junto con la apigenina y la quercetina, son muy útiles para eliminar ciertas dolencias digestivas relacionadas con el hígado, como la sensación de plenitud o los vómitos.
- **Protección del estómago:** Ciertos flavonoides, como la quercetina, la rutina y el kaempferol, tienen propiedades antiulcéricas al proteger la mucosa gástrica. <sup>(40)</sup>
- **Antiinflamatorios y analgésicos:** La hesperidina por sus propiedades antiinflamatorias y analgésicas, se ha utilizado para el tratamiento de ciertas enfermedades como la artritis. <sup>(41)</sup>
- **Antimicrobianos:** Isoflavonoides, furanocumarinas y estilbenos han demostrado tener propiedades antibacterianas, antivirales y antifúngicas. <sup>(43, 47)</sup>
- **Propiedades antioxidantes:** En las plantas los flavonoides actúan como antioxidantes, especialmente las catequinas del té verde. Al limitar la acción de los radicales libres (que son oxidantes), los flavonoides reducen el riesgo de cáncer, mejoran los síntomas alérgicos y de artritis, aumentan la actividad de la vitamina C, bloquean la progresión de las cataratas y la degeneración macular, evitan bochornos y combaten otros síntomas. <sup>(47)</sup>

### 2.3.3. TUBERCULOSIS:

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecto-contagiosa, transmisible, curable, usualmente crónica, de presentación clínica variable, producida por el complejo *Mycobacterium tuberculosis*. Habitualmente la enfermedad se localiza en los pulmones, pero puede afectar prácticamente a cualquier órgano del cuerpo humano.

La enfermedad de TB no sólo implica un sufrimiento individual para la persona que la padece, sino que la comunidad circundante también puede afectarse. Es por ello que el

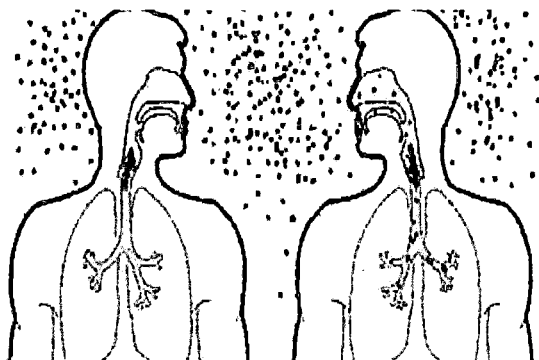
manejo de esta enfermedad debe ser exclusivamente individualizado; desde un punto de vista de salud pública. <sup>(46)</sup>

### 2.3.3.1. TRANSMISIÓN

El mecanismo de transmisión más importante, que causa la casi totalidad de los contagios es la vía aérea. El *M. tuberculosis* se transmite a través de las microgotas (gotitas de Pflüege) aerosolizadas que se producen cuando una persona con TB del tracto respiratorio (pulmonar y/o laríngea) las elimina al toser, estornudar, hablar, cantar y/o reír. Se ha calculado que un enfermo con baciloscopía positiva es capaz de contagiar alrededor de 10-15 personas por año. <sup>(46)</sup>

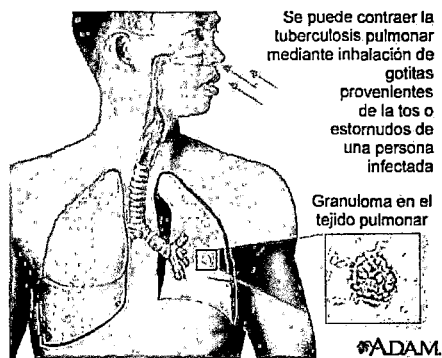
Para que el agente infeccioso sea transmisible por vía aérea, debe permanecer suspendido en el aire. Las gotas grandes (por su peso) caen rápidamente y llegan al suelo sin experimentar evaporación. Las gotas que permanecen en el aire se evaporan disminuyen su tamaño, transformándose en núcleos de gotitas contagiosos, que permanecen en el aire ambiental por un tiempo prolongado. Estos núcleos de gotitas constituyen la principal fuente de transmisión de *M. tuberculosis*. El éxito de la transmisión requiere de estas microgotitas cargadas de bacilos de un tamaño lo suficientemente pequeño como para que puedan llegar a los pulmones. Las partículas más grandes (> de 10 micrómetros) si son inhaladas, son atrapadas por las barreras de defensa del árbol traqueobronquial, barridas y luego tragadas, por lo tanto no son infecciosas. Algunas microgotas aerosolizadas, con un tamaño de 5-10 micrómetros, alcanzan las vías aéreas más proximales, sin que aquí encuentre el bacilo las condiciones idóneas para su multiplicación. Las microgotas infecciosas tienen un diámetro de aproximadamente 1 a 5 micras, (contienen aproximadamente de 1 a 5 bacilos/microgota) la corriente de aire normal puede mantenerlas en suspensión y transportarlas en el aire durante días; son las realmente infecciosas al poder llegar y depositarse en los alvéolos. Se considera que debe llegar un mínimo de 10 a 200 microgotas para que tenga lugar la infección. <sup>(46)</sup>

FIGURA N° 04: Transmisión de TBC



FUENTE: Echazarreta A., 2012. <sup>(48)</sup>

FIGURA N° 03: transmisión de TBC



FUENTE: Gómez Ayala Adela. E., 2007. <sup>(49)</sup>

### Mayores Transmisores de TB:

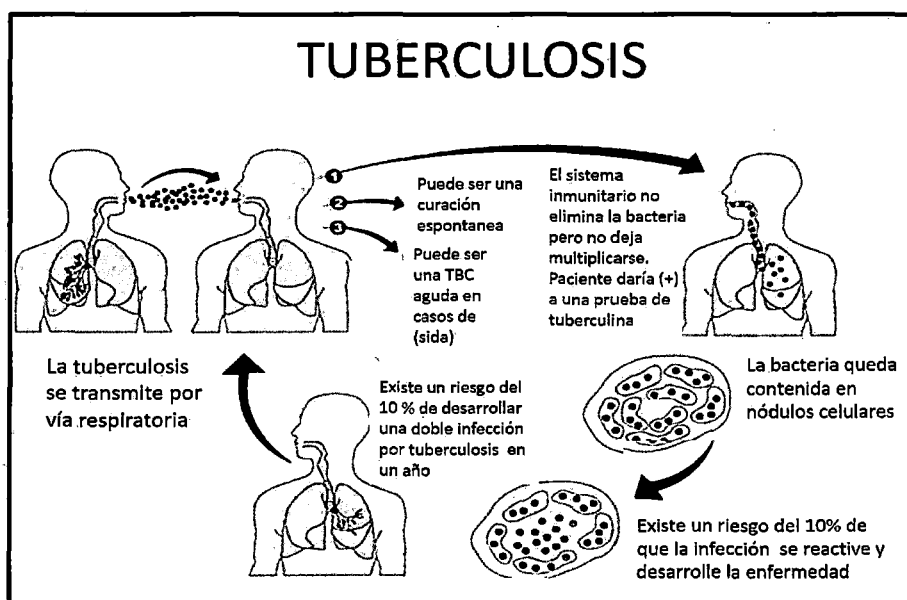
- Personas que más tosen. Con baciloscopía de esputo positiva (tales personas generalmente tosen con mayor frecuencia y en forma más violenta).
- Pacientes sin tratamiento (continúan expectorando bacilos).
- Enfermos que acaban de iniciar el tratamiento específico. A efectos prácticos se admite que el enfermo deja de contagiar aproximadamente cuando lleva 2 semanas de tratamiento, aunque no se puede confirmar con seguridad hasta que las baciloscopias sean negativas.

Además de la vía aerógena existen otros infrecuentes mecanismos de transmisión como son la vía digestiva (fundamentalmente en la enfermedad por *M. bovis*), la vía urogenital, la vía cutánea - mucosa y la vía transplacentaria (produciendo la denominada TB congénita).<sup>(46)</sup>

### 2.3.3.2. PATOGENIA

La infección inicial por el bacilo de la tuberculosis se transmite por el aire, como *Mycobacterium tuberculosis* no contiene enzimas que le permitan penetrar por el moco, los microorganismos deben encontrarse en partículas de tamaño suficientemente pequeño (menos de 5µm), para penetrar en la zona alveolar, sitio en el que no hay moco. Aunque no se conoce la dosis infecciosa mínima de *Mycobacterium tuberculosis* para el hombre, estos microorganismos, serán ingeridos por los macrófagos alveolares, como estos se encuentran inactivados, los monocitos recién llegados al sitio no podrán matar a *Mycobacterium tuberculosis* intracelular, que se duplicará dentro de los macrófagos y aumentará en número con rapidez. Se cree que las tensiones tisulares elevadas de oxígeno son un factor de gran importancia en la localización y crecimiento de *M. tuberculosis*.<sup>(50)</sup>

FIGURA N° 05: Patogenia de la tuberculosis



### a.- TUBERCULOSIS PRIMARIA O PRIMO-INFECCIÓN:

Cuando los bacilos incluidos en los núcleos de las gotitas de Pflügge superan los mecanismos de defensa bronco-pulmonares, llegan a los alvéolos del pulmón. Se depositan generalmente en los alvéolos de los lóbulos inferiores, en general en aquellos ubicados inmediatamente por debajo de la pleura. Esta invasión desencadena una reacción inespecífica, compuesta por leucocitos polimorfonucleares (fagocitos), líquido de edema y fibrina, es decir exudado. Por lo tanto el cambio observado en primer término luego de la llegada de los bacilos al alvéolo, es una no específica de tipo exudativo. Esta lesión inicial tiene dos posibilidades evolutivas: la cicatrización o la progresión. La progresión a su vez puede hacerse hacia la necrosis del tejido invadido, o, más comúnmente, a la formación de una lesión histológica que da nombre a la enfermedad: el *granuloma tuberculoso: tubérculo*. Este granuloma tiene a su vez dos posibilidades evolutivas: la *cicatrización* o la *progresión*. La cicatrización puede hacerse por formación de tejido fibroso (fibrosis) a la cual puede agregarse la calcificación, es decir el depósito a ese nivel de sales de calcio. Durante esta primera etapa, la multiplicación de los bacilos tuberculosos se efectúa sin mayor interferencia de los mecanismos defensivos del organismo del huésped. Es así que desde el foco inicial sub-pleural son transportados por los vasos linfáticos pulmonares a los ganglios ubicados en el hilio pulmonar y el mediastino; estos ganglios se agrandan produciendo adenomegalias hiliares y mediastinales. El foco primario sub-pleural (llamado chancro de inoculación), los vasos linfáticos que conducen los bacilos y se inflaman (es decir se produce una linfangitis) y el agrandamiento de los ganglios regionales (adenitis hiliares y/o mediastinales) conforman el llamado complejo primario. Al alcanzar los ganglios regionales, los bacilos tuberculosos pueden irrumpir en la circulación sanguínea y de ahí distribuirse por todo el organismo. La diseminación sanguínea se conoce con el nombre de *bacilemia*. A través de esta diseminación los bacilos tuberculosos acceden a todo el organismo, aunque se implantan con mayor frecuencia en algunos órganos, en especial en los vértices pulmonares. En esta localización constituyen focos metastáticos conocidos como *focos de Simon*. Otros órganos comprometidos preferentemente son: cerebro y sus cubiertas de envoltura (meninges), riñones y huesos en crecimiento. Se sostiene que la tuberculosis extrapulmonar se origina en la implantación de los bacilos en la etapa de diseminación generalizada. <sup>(51)</sup>

**a.1 LAS REACCIONES DEL HUÉSPED** - Luego de 4 a 8 semanas de la infección inicial, el organismo pone en juego una serie de mecanismos por los cuales adquiere una resistencia e hipersensibilidad específicas. En consecuencia, como ha sido demostrado experimentalmente, el número de bacilos disminuye notoriamente en este período. El estado de hipersensibilidad específica puede objetivarse con la prueba tuberculínica, la cual pasa de ser negativa a positiva. Este cambio del resultado se conoce como viraje tuberculínico. Debe aclararse especialmente que la hipersensibilidad específica actualmente es considerada como un fenómeno vinculado aunque diferente a la resistencia específica.

La positividad de la prueba tuberculínica es la traducción de la hipersensibilidad específica y no necesariamente de la resistencia del organismo al bacilo tuberculoso. La evolución de la infección primaria resulta del predominio del bacilo tuberculoso sobre las defensas del huésped, o de éstas sobre el bacilo. Cuando el bacilo se impone sobre los mecanismos

de defensa, la enfermedad sigue su curso; si ocurre lo contrario, el huésped puede dominar la infección primaria. La mayor parte de las veces ocurre esto último y la evolución es hacia la cicatrización, tanto del complejo primario como de los focos metastáticos de implantación bacilar ocurridos en la bacilemia. La tuberculosis primaria o de primo-infección puede originar complicaciones locales y/o sistémicas. <sup>(51)</sup>

**1. COMPLICACIONES LOCALES:** El foco sub-pleural (chancro de inoculación) primeramente da lugar a un proceso inflamatorio pleural reducido, sin derrame detectable. Al aparecer la hipersensibilidad específica, si los bacilos tuberculosos alcanzan la cavidad pleural, aún en muy pequeñas cantidades, puede producirse líquido que se acumula en la cavidad pleural lo cual se conoce con el nombre de pleuresía. Por su aspecto similar al suero sanguíneo y su alto contenido en fibrina, esta pleuresía recibe el nombre de pleuresía sero-fibrinosa. <sup>(51)</sup>

Otra complicación local de la primo-infección puede ocurrir a punto de partida del agrandamiento de los ganglios regionales. Por su proximidad con los bronquios, los ganglios pueden comprimir la vía aérea e incluso perforar su pared, vertiendo su contenido en el árbol bronquial. Estas complicaciones pueden originar una obstrucción por compresión o una diseminación del contenido de los ganglios por el árbol bronquial (diseminación broncogena).

El crecimiento excesivo del chancro de inoculación y su vaciamiento en la luz de un bronquio da lugar a la formación de una cavidad, esta complicación se conoce como la evolución tísica de la primo-infección tuberculosa. <sup>(51)</sup>

**2. COMPLICACIONES SISTÉMICAS:** La multiplicación excesiva de bacilos en el foco primario y el consiguiente crecimiento del mismo, permiten la llegada de los gérmenes a la circulación general en grandes cantidades. Este proceso genera lesiones del tamaño de pequeños granos en distintos órganos, constituyendo la llamada tuberculosis miliar (por recordar a los granos de mijo) o granulía. Una localización de estas lesiones de particular gravedad es la cerebro-meníngea, sin duda la forma más grave de la tuberculosis. Sin embargo, debe destacarse que el compromiso cerebro-meníngeo puede producirse por otro mecanismo distinto al de la diseminación hematogena. Otras complicaciones sistémicas frecuentes son la tuberculosis de la columna (Mal de Pott) y la renal. La tuberculosis primaria o de primo-infección se produce en sujetos que no habían contactado previamente con el bacilo tuberculoso. Este tipo de tuberculosis puede ocurrir a cualquier edad, pero por lo general es más frecuente en los niños. En realidad ello depende en gran medida de la prevalencia de fuentes de contagio en una comunidad. Cuando la prevalencia es alta, las posibilidades de contraer la infección son mayores. En esta situación la más alta frecuencia de tuberculosis primaria se da en las edades menores. Cuando la prevalencia de fuentes de infección es baja, la enfermedad ocurre a edades cada vez mayores. <sup>(51)</sup>

#### **b.- TUBERCULOSIS DE TIPO ADULTO:**

Los bacilos tuberculosos tienen la propiedad de sobrevivir durante largos años en las localizaciones pulmonares y extrapulmonares. Por lo tanto, el huésped puede desarrollar una tuberculosis pulmonar o extrapulmonar, años después de ocurrida la infección

primaria. Las localizaciones extrapulmonares que aparecen en el adulto tienen su origen, por lo general, en focos inactivos durante muchos años que resultaron del implante bacilar en la etapa de bacilemia de la primo-infección. La tuberculosis de tipo "adulto" es sin duda la forma patogénica que presenta expresión clínica más frecuentemente y a la que nos referimos en general cuando hablamos de tuberculosis. Por el contrario, según se estableció anteriormente, la primo-infección es controlada por el organismo en la gran mayoría de los casos, más del 95%. Sin embargo, es necesario destacar que la tuberculosis de tipo "adulto" también puede ocurrir en adolescentes e incluso en niños que presentaron previamente una primo-infección. En la tuberculosis tipo "adulto" se distinguen: la tuberculosis post-primaria, la tuberculosis por reinfección endógena y la tuberculosis por reinfección exógena. <sup>(51)</sup>

**1. TUBERCULOSIS POST-PRIMARIA:** Se define como aquella que se presenta dentro de los cinco primeros años siguientes a la primo-infección. Existen estudios epidemiológicos que han demostrado, dentro de ese lapso, un mayor riesgo de desarrollar una tuberculosis luego del primer contacto con el bacilo. A su vez durante el primer año se da el mayor porcentaje de casos, el cual desciende hasta el quinto año; la probabilidad de enfermar persiste, aunque en menor magnitud, el resto de la vida del sujeto primo-infectado. <sup>(51)</sup>

**2. REINFECCIÓN ENDÓGENA:** Este tipo de tuberculosis se desarrolla a expensas de la reactivación de un foco latente, formado muchos años atrás en el curso de una siembra en la etapa de bacilemia de la tuberculosis primaria. <sup>(51)</sup>

**3. REINFECCIÓN EXÓGENA:** La tuberculosis por reinfección exógena puede producirse en un sujeto previamente infectado, que al ser contagiado nuevamente por otro individuo, puede a su vez enfermar desarrollando una tuberculosis de tipo "adulto". El predominio de las distintas formas de tuberculosis de tipo "adulto" depende en gran medida de la prevalencia de fuentes de contagio. En las comunidades que presentan alta prevalencia de infección, los tipos más frecuentes son la tuberculosis post-primaria y la reinfección exógena. Por el contrario, en las comunidades con baja prevalencia, es más frecuente la tuberculosis por reactivación endógena. Las diferentes formas de tuberculosis de tipo "adulto" son indistinguibles desde el punto de vista clínico y radiológico. Es sólo a través de una cuidadosa investigación del contexto epidemiológico lo que posibilita plantear, con relativa certeza, la forma que presenta un determinado paciente. Actualmente los modernos estudios de biología molecular permiten distinguir si la cepa que causa la enfermedad es la misma que causó la primo-infección (infección endógena) o si proviene de un nuevo caso (infección exógena). <sup>(51)</sup>

#### **2.3.4.3. CUADRO CLÍNICO:**

La clínica de la enfermedad tuberculosa es insidiosa y poco expresiva en la mayor parte de los casos, llamando especialmente la atención la alta frecuencia con la que pasa desapercibida la infección primaria (primoinfección) y la persistencia de la sintomatología en la secundaria. <sup>(52)</sup>

#### 2.3.3.4. DIAGNÓSTICO

El diagnóstico de certeza de la TB sólo puede conseguirse con técnicas microbiológicas, que lamentablemente no son sensibles al 100%, por lo que en alrededor de un 10-15% de los casos todas estas técnicas serán negativas, a pesar de que se corresponderán con TB. En estos casos, el diagnóstico se basará en la clínica, la epidemiología y las técnicas de imagen. <sup>(53)</sup>Todas las técnicas microbiológicas son muy específicas, pero su sensibilidad irá estrechamente ligada a la calidad y el procesamiento de la muestra recogida.

**Diagnóstico microbiológico convencional de la tuberculosis:** El diagnóstico microbiológico convencional de la TBC se sustenta en las siguientes técnicas: baciloscopia, cultivo, identificación de especie y antibiograma o pruebas de susceptibilidad. <sup>(53)</sup>

#### 2.3.3.5. TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO:

Actualmente en el Perú, el tratamiento de la tuberculosis se realiza de acuerdo a la “Norma técnica de salud para el control de la tuberculosis” la cual fue elaborada con el fin de consolidar estrategias que fortalezcan la eliminación de la tuberculosis en el país, así como uniformizar criterios técnicos empleados en la promoción, prevención, diagnóstico y tratamiento de esta enfermedad. <sup>(54,55)</sup>

El tratamiento de la tuberculosis se basa en regímenes de terapia combinada (varios medicamentos), teniendo en cuenta tres propiedades fundamentales de los medicamentos antituberculosis: capacidad bactericida, capacidad esterilizante, y capacidad para prevenir la resistencia. <sup>(54,55)</sup>

Nos enfrentamos a su vez a fenómenos biológicos relacionados a la presencia de enfermedades como el VIH/SIDA o la Diabetes Mellitus, que favorecen a la presencia de la TB, además los fenómenos de resistencia a las drogas, la Multidrogoresistencia y la Extrema Resistencia, y por lo tanto a escenarios mucho más complejos para el control de la tuberculosis en el país. <sup>(54,55)</sup>

El tratamiento farmacológico de la tuberculosis sensible a las drogas considera dos fases, ambas supervisadas. <sup>(54,55)</sup>

**1. PRIMERA FASE** de inducción o bactericida: De administración diaria, sirve para reducir rápidamente la población bacilar de crecimiento y multiplicación rápida (lográndose destruir al 90 % de la población bacteriana en los primeros 10 días) y para prevenir la resistencia y con ello el fracaso al tratamiento. <sup>(54,55)</sup>

**2. SEGUNDA FASE** de mantenimiento o esterilizante: de administración intermitente. En este momento la población bacteriana se multiplica una vez por semana o menos frecuentemente, de manera que ya no requiere tratamiento diario, incluye menor número de medicamentos, suficientes para conseguir la eliminación de los bacilos persistentes y evitar así las recaídas. <sup>(54,55)</sup>



## FUNDAMENTOS DEL TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO

El tratamiento farmacológico acertado ha demostrado ser la intervención sanitaria más eficaz en el control de la tuberculosis, teniendo en consideración los siguientes fundamentos básicos:

- Tratamiento con asociación de medicamentos (terapia combinada) de alta eficacia que prevenga la selección de bacilos resistentes, evitando así los fracasos de tratamiento.
- Tiempo suficiente de tratamiento, con un número de tomas que asegure el mínimo porcentaje de recaídas.
- Reacciones adversas mínimas.

Administración de medicamentos en boca directamente observado por el personal de salud durante la ingesta del medicamento y que garantice la adherencia y con ello el cumplimiento de la terapia. (54,55)

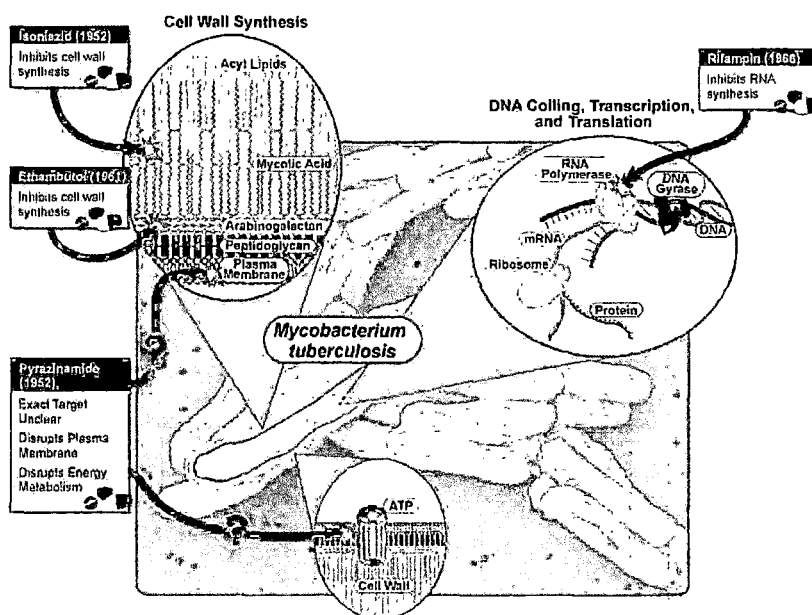
### 2.3.3.6. MEDICAMENTOS ANTITUBERCULOSIS

#### 2.3.3.6.1. MEDICAMENTOS ANTITUBERCULOSIS DE PRIMERA LÍNEA.

Los medicamentos de primera línea se utilizan en pacientes nuevos, recaídas y abandonos recuperados, son altamente eficaces y de buena tolerancia para el paciente.

Los fármacos de primera línea en el tratamiento de la infección tuberculosa, es decir, los medicamentos con los que en principio debe comenzarse el tratamiento son: isoniazida, rifampicina, etambutol, estreptomycin y pirazinamida. (54,55)

**FIGURA N° 06: Medicamentos antituberculosis**



FUENTE: Gomez Ayala Adela., 2007. (49)

## a) ISONIAZIDA

La isoniazida es la hidrazida del ácido isonicotínico descubierta tras la observación de que la nicotinamida poseía actividad tuberculostática. Su actividad es específica frente a las micobacterias tuberculosas, careciendo de acción contra otros microorganismos. Es altamente eficaz frente a *M. tuberculosis* (CMI: 0,025-0,5 µg/mL) y *M. bovis*; Se comporta como altamente bactericida contra los bacilos en fase de crecimiento rápido, tanto extracelulares como intracelulares; en cambio, es bacteriostática contra los bacilos en estado de reposo. Continúa siendo el mejor compuesto antimicobacteriano, analizado de manera individual, por su índice eficacia/riesgo, bajo costo, facilidad de administración y aceptación por parte de los pacientes; por ello constituye la base de los diversos regímenes de administración. Sin embargo, y por la frecuencia con que pueden aparecer resistencias a la isoniazida, nunca se administra sola salvo en las pautas profilácticas. La resistencia aparece indefectiblemente in vivo en el curso de un tratamiento con isoniazida sola y se debe a la selección natural de cepas resistentes, a medida que van desapareciendo las sensibles. Pero cada vez es más frecuente la existencia de resistencias primarias; esta frecuencia es pequeña (2-5 %) en las poblaciones en las que suelen cumplirse bien las normas de tratamiento, pero puede aumentar hasta el 15 y el 20 % en poblaciones o circunstancias en las que los tratamientos son incorrectos o pobremente cumplidos. <sup>(56,57)</sup>

**1. MECANISMO DE ACCIÓN:** La isoniazida afecta numerosas funciones biológicas del bacilo, pero su acción primaria es la de inhibir la síntesis de los ácidos micólicos, que son componentes lipídicos específicos e importantes de las membranas de las micobacterias. La primera acción que se observa en presencia de isoniazida es su capacidad para interferir en el bacilo el alargamiento de un ácido graso de 26 carbonos con lo que inhibe la síntesis de ácidos grasos de cadena muy larga, que son los precursores de los ácidos micólicos de la membrana. La desestructuración de la membrana implica la incapacidad del bacilo para crecer y dividirse, y la pérdida de viabilidad. El tiempo de contacto de la isoniazida con el bacilo es importante ya que, si es pequeño, el bacilo recupera la capacidad de sintetizar ácido micólico, pero si dura varias horas, la inhibición se hace irreversible. <sup>(56,57)</sup>

**2. CARACTERÍSTICAS FARMACOCINÉTICAS:** Se absorbe muy bien por vía oral; los valores de biodisponibilidad son hasta del 90 %, pero puede haber un fenómeno de primer paso; el T<sub>máx</sub> es de 1-2 horas. Excepcionalmente y en casos críticos se puede administrar por vía parenteral. Apenas se une a proteínas y difunde con facilidad a todos los tejidos, material caseoso, líquidos ascítico y pleural; en el LCR, la concentración es el 20 % de la plasmática, pero en caso de afectación meníngea, la permeabilidad aumenta y los niveles en el líquido se aproximan a los plasmáticos. La isoniazida es metabolizada casi en su totalidad en el hígado, mediante procesos de acetilación e hidroxilación. Existe heterogeneidad de carácter genético en la capacidad de acetilar la isoniazida, lo que repercute en la semivida del fármaco; en los acetiladores rápidos, la semivida de la isoniazida es de 80 min mientras que en los lentos es de unas 3 horas, pero en la práctica esto no suele tener repercusión ni en la eficacia terapéutica ni en el riesgo de toxicidad, porque la dosis diaria proporciona niveles sanguíneos que se encuentran en el intervalo terapéutico; 4 mg/kg proporcionan niveles de más de 0,8 mg/mL en los acetiladores

lentos y 0,2-0,4 mg/mL en los rápidos. Sólo en los inactivadores lentos que tengan insuficiencia renal asociada puede haber una acumulación que ofrezca mayor incidencia de reacciones tóxicas. Pasa a la leche en el 20 %.<sup>(56,57)</sup>

**3. REACCIONES ADVERSAS E INTERACCIONES:** La isoniazida puede considerarse un fármaco poco tóxico y ello ha contribuido a su actual posición en la terapéutica antituberculosa. Sin embargo, deben vigilarse con especial cuidado los signos de alteración hepática y de alteración neurológica. La alteración hepática no es frecuente, pero puede llegar a provocar hepatitis entre las 4 y las 8 semanas de tratamiento y necrosis. La incidencia de la hepatitis aumenta con la edad: es infrecuente en personas menores de 25 años, del 1 % entre los 25 y los 49 años, y llega al 2,5 % después de los 50. La incidencia aumenta en pacientes alcohólicos o en los que toman asociadamente otros fármacos hepatotóxicos, como la rifampicina y la pirazinamida. El hecho de que aumenten las transaminasas no significa que se vaya a desarrollar una hepatitis; las enzimas aumentan durante los primeros meses en algo más del 10 % de los pacientes pero suelen descender espontáneamente sin necesidad de suspender la medicación; no obstante, si no descienden o si alcanzan un valor de 5 veces el normal, es mejor suspenderla. Lógicamente, el riesgo aumenta en los enfermos que padecen insuficiencia hepática. Las alteraciones neurológicas abarcan el sistema periférico y el central; guardan relación con la depleción de piridoxina, por lo que se aconseja asociar esta vitamina de manera sistemática. La isoniazida se combina con el piridoxal y su fosfato, e inhibe su capacidad de actuar como coenzima. Produce neuritis periférica, neuritis óptica con atrofia, sacudidas musculares, convulsiones, ataxia, mareo, parestesias, encefalopatía tóxica y alteraciones mentales de diverso tipo, incluidas las de carácter psicótico. A pesar de ello, no está contraindicada en pacientes epilépticos y psiquiátricos, pero la isoniazida inhibe el metabolismo de la fenitoína, por lo que aumenta sus niveles plasmáticos y puede llegar a ocasionar intoxicación fenitoínica.<sup>(56,57)</sup>

Otras reacciones son: erupciones, fiebre, trastornos hematológicos (agranulocitosis, eosinofilia y anemia), vasculitis, síndromes artríticos y molestias gástricas. Algunos desarrollan anticuerpos antinucleares y síndromes del tipo lupus de carácter reversible.

## b) RIFAMPICINA

La rifampicina es un derivado semisintético de un antibiótico complejo macrocíclico, la rifampicina B, obtenida de *Streptomyces mediterranei*.<sup>(56,57)</sup>

**1. ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA:** Es un antibiótico de amplio espectro ya que inhibe el crecimiento de numerosas micobacterias, tanto típicas como atípicas, y de bacterias grampositivas y gramnegativas.

Es bactericida contra formas intracelulares y extracelulares de *M. tuberculosis*, *M. bovis* y casi todas las cepas de *M. kansasii*; además son susceptibles algunas cepas de micobacterias atípicas (tipo II o escotocromógenas: *M. scrofulaceum*; tipo III o no fotocromógenas: *M. avium intracellulare*). Es activa también frente a diversas cepas de *Staphylococcus aureus*, *Neisseria meningitidis*, *Legionella*, *Haemophilus influenzae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas*, *Proteus* y *Klebsiella*.<sup>(56,57)</sup>

**2. MECANISMO DE ACCIÓN:** La rifampicina se fija de manera específica a la subunidad β de la ARN-polimerasa dependiente del ADN de los bacilos y las bacterias, inhibe su

actividad y suprime la iniciación de la formación de las cadenas de ARN. Esta acción no se lleva a cabo en la ARN-polimerasa del núcleo células eucariotas y sólo a grandes concentraciones en la polimerasa mitocondrial. Desaparecen los ribosomas de los bacilos. Aparece resistencia con rapidez in vitro e in vivo tanto en micobacterias como en otras bacterias (*Neisseria meningitidis*), en particular si se administra sola; esta aparición se demora considerablemente cuando se administra en asociación con isoniazida, etambutol, estreptomina u otros fármacos antimicobacterianos. La resistencia se debe a modificaciones en la ARN polimerasa que impiden la fijación del antibiótico <sup>(56,57)</sup>

**3. CARACTERÍSTICAS FARMACOCINÉTICAS:** La rifampicina por vía oral tiene una biodisponibilidad superior al 90 %; dosis de 600 mg proporcionan un nivel máximo de 7-8 mg/mL, pero la administración repetida induce la enzima desacetilante hepática e incrementa el aclaramiento biliar. El alimento interfiere en la velocidad y la intensidad de la absorción. Difunde libremente a los tejidos y líquidos corporales, atraviesa la placenta y la BHE; en personas normales, la concentración en el LCR es mínima, pero si existe inflamación meníngea, la concentración llega a ser el 50 % de la plasmática. Sufre desacetilación en el hígado y se transforma en 2,5-o-desacetilrifampicina, también activa, eliminándose en gran parte por la bilis; pero hasta el 50 % de la forma original lo hace por el riñón y la bilis, con lo que se alcanzan concentraciones terapéuticas en estos líquidos. En el intestino entra en la circulación enterohepática. Debido a la inducción enzimática de sus propias enzimas (acopladas al citocromo P-450), la administración acelera el aclaramiento, de forma que la semivida desciende de 2-5 horas a menos de 2 horas a las 2 semanas.

La probenecida reduce su excreción al bloquear la captación hepática. La isoniazida incrementa la semivida de la rifampicina en los acetiladores lentos al interferir en su metabolismo. A su vez, la rifampicina acelera el metabolismo de otros fármacos por inducción enzimática. <sup>(56,57)</sup>

**4. REACCIONES ADVERSAS E INTERACCIONES:** La inmensa mayoría de los pacientes toleran bien la rifampicina; puede producir inicialmente algunas molestias digestivas, erupción cutánea, algias musculares y articulares y calambres en las extremidades, pero la reacción más frecuente e importante es de carácter hepático. En las primeras semanas puede aparecer una ictericia asintomática de tipo colestásico, que al parecer se debe a fenómenos de competencia entre la captación de bilirrubina y el fármaco en la célula hepática y que se resuelve en pocos días. Independientemente pueden aparecer signos de disfunción hepática, con aumento de la SGPT, más precoces que en el caso de la isoniazida; esta disfunción es más frecuente en alcohólicos, en enfermos hepáticos, en quienes reciben isoniazida simultáneamente y en los niños. La lesión celular es más difusa que en el caso de la hepatitis por isoniazida y con menos grado de inflamación periportal. <sup>(56,57)</sup>

Se han descrito también síntomas de tipo neurológico: fatiga, somnolencia, cefalea, mareo, ataxia, desorientación, falta de concentración y parestesias.

A veces ocurre una reacción de tipo inmunológico, más frecuente según algunos si la administración es intermitente. Consiste en un síndrome de carácter gripal con disnea, sibilancias, a veces púrpura con trombocitopenia y leucopenia; rara vez pueden aparecer hemólisis con hematuria y hemoglobinuria e insuficiencia renal. En estos casos se debe reducir la dosis y si no basta, suspender la rifampicina.

Debe indicarse a los pacientes que la orina, las heces, la saliva, el sudor, el semen y las lágrimas pueden teñirse de rojo o naranja. <sup>(49,56,57)</sup>

**5. INTERACCIONES:** La rifampicina acelera el metabolismo de los esteroides corticales, anticonceptivos esteroideos, anticoagulantes orales, hipoglucemiantes orales, metadona, digitoxina, quinidina, propranolol, ketoconazol; en consecuencia, disminuye la actividad de estos fármacos a menos que se aumenten sus dosis. En el caso de las dicumarinas, su actividad permanece disminuida hasta 5-7 días después de suspendida la rifampicina. La probenecida incrementa los niveles de rifampicina.

**6. APLICACIONES TERAPÉUTICAS:** Está indicada en la tuberculosis, en ciertas micobacteriosis atípicas y en la lepra. En asociación con vancomicina se puede emplear en infecciones por *S. aureus* resistentes a meticilina y en infecciones por *Legionella*, en asociación con eritromicina.

**OTROS DERIVADOS:** La **rifabutina** (ansamicina) es un derivado de la rifampicina que posee gran actividad contra micobacterias, incluida *M. tuberculosis*, el complejo *M. avium-intracellulare* y *M. fortuitum*. En la tuberculosis experimental murina ha mostrado mayor actividad que la rifampicina, incluso en cepas resistentes a ésta. Se caracteriza por poseer gran afinidad por los tejidos, donde alcanza concentraciones 5-10 veces mayores que en plasma. Su semivida de eliminación es de unas 16 horas. En la actualidad se encuentra en fase clínica de investigación, particularmente en infecciones por micobacterias atípicas. La dosis es de 150-300 mg en una sola toma al día. Hasta el momento no se ha apreciado capacidad para inducir enzimas. <sup>(49,56,57)</sup>

### c) ETAMBUTOL

**1. ACTIVIDAD ANTITUBERCULOSA:** El etambutol es un fármaco sintético que actúa exclusivamente sobre las micobacterias en fase de crecimiento: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, la mayoría de las cepas de *M. kansasii* y algunas atípicas del grupo III (no fotocromógenas). Su acción es bacteriostática, incluso sobre cepas resistentes a la isoniazida y la rifampicina.

**2. MECANISMO DE ACCIÓN:** El mecanismo no está aún bien definido; a la concentración de 1 mg/mL parece que inhibe la síntesis de ARN u otro material intracelular. La resistencia al etambutol se produce lentamente y su incorporación al tratamiento tiene el gran valor de demorar la aparición de resistencias a otros tuberculocidas. <sup>(56,57)</sup>

### 3. CARACTERÍSTICAS FARMACOCINÉTICAS

Se absorbe por vía oral con una biodisponibilidad de casi el 80 % y un  $t_{m\acute{a}x}$  de 2-4 horas; 15 mg/kg proporcionan una concentración plasmática de 5 mg/kg. Se fija a proteínas en el 40 % y se excreta principalmente por riñón, en su mayor parte sin metabolizar, por mecanismos de filtración y secreción; la semivida es de 3 - 4 horas. <sup>(56,57)</sup>

**4. REACCIONES ADVERSAS:** A las dosis recomendadas es muy poco tóxico; en ocasiones puede producir algunas reacciones de hipersensibilidad, con fiebre, artralgia, erupciones cutáneas y prurito, molestias gastrointestinales, cefalea, mareo, desorientación y

alucinaciones. Por encima de los 15 mg/kg y de forma dosis-dependiente puede provocar neuritis retrobulbar con reducción de la agudeza visual y del campo visual, alteración de la percepción de colores y escotomas; de ahí la conveniencia de hacer una exploración visual antes de iniciar el tratamiento y prevenir a los pacientes para que informen de cualquier alteración que perciban en la visión, ya que la alteración es generalmente reversible. Puede producir hiperuricemia por competir con la secreción tubular de ácido úrico. <sup>(56,57)</sup>

**5. APLICACIONES TERAPÉUTICAS:** En el tratamiento de tuberculosis y otras infecciones micobacterianas, de forma asociada. Su eficacia es grande en casos de recaídas y también cuando hay probabilidad de que las cepas hayan desarrollado resistencia a isoniazida y rifampicina. <sup>(49)</sup>

#### d) ESTREPTOMICINA

**1. ESPECTRO DE ACCIÓN:** Fue el primer tuberculostático que redujo la mortalidad de la tuberculosis. In vitro es bactericida frente al *M. tuberculosis* a concentraciones entre 0,4 y 10 mg/mL, pero in vivo su acción es sólo bacteriostática y actúa exclusivamente sobre los bacilos de localización intracelular.

Desarrolla resistencia con gran rapidez cuando se administra como fármaco único, porque la proporción de bacilos primariamente resistentes es alta (1 de cada 106), localizados en las lesiones pulmonares cavitarias. Es frecuente que un paciente que muestra resistencia primaria a la isoniazida también la presente para la estreptomina.

La eficacia de este fármaco en los primeros meses de tratamiento está ampliamente confirmada, administrada por vía parenteral en asociación con otros fármacos antituberculosos. <sup>(49,56,57)</sup>

#### e) PIRAZINAMIDA

**1. ACTIVIDAD ANTITUBERCULOSA:** Es un análogo de la nicotinamida que muestra actividad tuberculicida sólo en medio ácido, de ahí que su eficacia sea máxima frente a los bacilos de localización intracelular dentro de los macrófagos, a la concentración de 12,5 mg/mL. Inicialmente se la consideró un fármaco de segunda línea, pero su papel ha aumentado al incorporarla a los tratamientos modernos de duración corta, en asociación con la isoniazida y la rifampicina. Utilizada como fármaco único, se desarrollan resistencias con rapidez. Se desconoce su mecanismo de acción.

**2. CARACTERÍSTICAS FARMACOCINÉTICAS:** Se absorbe bien por vía oral con un tiempo máximo de unas 2 horas (45 mg/mL con dosis de 1 g). Se distribuye por los tejidos y penetra en el LCR. Es metabolizada por hidrólisis, seguida de hidroxilación, siendo excretados los metabolitos por orina. La semivida de eliminación es de 10-16 horas.

**3. REACCIONES ADVERSAS:** La más importante es la hepatotoxicidad, que guarda relación con la dosis. A la dosis de 3 g/día en asociación con isoniazida, la incidencia de lesiones hepáticas alcanza el 14 %, llegando a ser mortal en ocasiones; pero a las dosis más habituales de hasta 30 mg/kg/día, la incidencia de hepatotoxicidad es pequeña, sobre todo si la administración no supera los 2 meses. En cualquier caso, es necesario vigilar la

función hepática. Produce rutinariamente hiperuricemia que puede llegar a los 12-14 mg/dL, por inhibir la secreción de ácido úrico; si provoca síntomas de gota, se aconseja asociar alopurinol. En ocasiones provoca malestar, artralgias, fiebre, molestias digestivas, erupción cutánea y fotosensibilidad. (49,56,57)

**CUADRO N° 01:** Medicamentos antituberculosos de primera línea características clínico farmacológicas

MEDICAMENTO	ACTIVIDAD CONTRA <i>Micobacterium tuberculosis</i>	ABSORCIÓN	METABOLISMO	EXCRECIÓN
Rifampicina (R)*	Bactericida con poder esterilizante	Absorción retardada por alimentos	hepático	Mayor parte en heces 20 – 30 % por riñón
Isoniazida (H)*	Altamente bactericida	Mejor absorción en ayunas	hepático	Renal
Pirazinamida (Z)*	Bactericida en medio ácido	Efecto de alimentos en biodisponibilidad es mínimo	hepático	70 % por riñón
Etambutol (E)*	Bacteriostático (probablemente bactericida a altas dosis).	Efecto de alimentos en biodisponibilidad es mínimo	Renal y hepático	80% por riñón
Estreptomina (S)*	Bactericida en población extracelular	parenteral	Distribución amplia en tejidos y líquidos corporales	50 – 60 % por riñón y pequeña cantidad por bilis

Fuente: Norma Técnica de Salud para el Control de la Tuberculosis., 2010. (55)

### 2.3.3.6.2. MEDICAMENTOS ANTITUBERCULOSIS DE SEGUNDA LÍNEA

Los medicamentos de segunda línea se utilizan en pacientes con tuberculosis resistente a antibióticos. Estos fármacos suelen tener efectos más tóxicos, y su acción terapéutica requiere de uso prolongado para alcanzar la curación. En el caso de Multidrogorresistencia se recomienda de al menos 18 meses de tratamiento. (55,56)

**a) ETIONAMIDA:** Es la tioamida del ácido isonicotínico, que presenta actividad bacteriostática a la concentración de 0,6-2,5 mg/mL frente al *M. tuberculosis*, y a la concentración de 10 mg/mL frente a micobacterias fotocromógenas. Su utilidad en la clínica humana se halla limitada por sus abundantes y frecuentes reacciones adversas. Se absorbe bien por vía oral y se distribuye ampliamente por todo el organismo, atravesando la BHE hasta alcanzar concentraciones en el LCR similares a las plasmáticas. Es ampliamente metabolizada en el hígado; su semivida plasmática es algo inferior a la de la

isoniazida, pero permite administrarla cada 12 horas. Produce con gran frecuencia molestias digestivas, con irritación gastrointestinal, náuseas, pirosis, vómitos y anorexia. Ello obliga a reducir la dosis a la mitad en el 50 % de los pacientes, con la consiguiente reducción en la eficacia. Causa también molestias de tipo neurológico, que comprenden desde neuropatías periféricas hasta alteraciones psiquiátricas. Provoca hepatotoxicidad en el 5% de pacientes y en ocasiones puede desencadenar reacciones de hipersensibilidad.<sup>(56)</sup>

**b) CICLOSERINA:** Es un antibiótico inicialmente producido por *Streptomyces orchidaceus* y actualmente sintetizado, análoga la D-serina. In vitro tiene actividad bacteriostática frente a *M. tuberculosis* a la concentración de 5-20 mg/mL. Su acción se debe a la capacidad de competir con la D-serina en la síntesis de la pared bacteriana.

Se absorbe bien por vía oral, con un tmáx de 3-4 horas, alcanzando concentraciones de 50 mg/mL. Se distribuye por todos los tejidos y atraviesa bien la BHE. Se metaboliza en un tercio y el resto es excretado de forma original por la orina donde alcanza concentraciones terapéuticas elevadas; en caso de insuficiencia renal se acumula. Su semivida es de 8-12 horas. Las reacciones adversas principales implican al SNC; las reacciones neurológicas consisten en sacudidas musculares, temblores, hiperreflexia, alteraciones visuales, crisis convulsivas y ausencias; las psiquiátricas comprenden somnolencia, aturdimiento, confusión, nerviosismo, irritabilidad, reacciones psicóticas, depresivas y paranoides; los episodios psicóticos ocurren en el 10 % de los pacientes. Está contraindicada en epilépticos. La mayor parte de estas reacciones se pueden evitar si se controlan los niveles plasmáticos.

La dosis inicial es de 250 mg cada 12 horas durante 2 semanas, para aumentar después 250 mg/día durante varios días, según la tolerancia.<sup>(56)</sup>

**c) CAPREOMICINA:** Es un antibiótico polipeptídico producido por *Streptomyces capreolus*. Las cepas susceptibles de *M. tuberculosis* son susceptibles a concentraciones de 1-50 µg/mL (en general, 10 mg/mL). Las concentraciones máximas plasmáticas son de unos 30 mg/mL. Su uso queda reservado para cepas resistentes. Se administra por vía parenteral. Puede producir acufenos, pérdida de audición, proteinuria, cilindruria y retención de nitrógeno y eosinofilia.<sup>(56)</sup>

**d) ÁCIDO PARAAMINO SALICÍLICO:** Es un derivado del ácido salicílico y análogo del ácido para-aminobenzoico que se emplea como sal sódica o cálcica. Su acción se limita a ser bacteriostática débil, exclusivamente frente al *M. tuberculosis*, a concentraciones de 1 mg/mL.

Solo es de escasa utilidad por su baja actividad, pero, en asociación con isoniazida y estreptomycin, retrasa la aparición de resistencias. La necesidad de que las dosis sean altas y la frecuencia de molestias que origina contribuyeron a su sustitución por el etambutol; sin embargo, su bajo coste continúa favoreciendo su empleo en países de bajo desarrollo.

El mecanismo de acción es similar al de las sulfamidas y consiste en competir con el ácido para-aminobenzoico en la síntesis de folatos.

Se absorbe bien por vía oral, con un tmáx de 1,5-2 horas, y se distribuye ampliamente por todos los tejidos y líquidos orgánicos, aunque apenas atraviesa la BHE. Se metaboliza en el 50 % por acetilación siendo excretados por orina los metabolitos y el PAS con rapidez;



la semivida es de alrededor de 1 hora, aumentando algo en caso de insuficiencia renal. La probenecida retrasa la excreción del compuesto.

Las reacciones adversas son frecuentes y aunque en general no resultan graves, son lo bastante molestas para perturbar seriamente el cumplimiento terapéutico (20 %). Aparecen molestias gastrointestinales de índole muy diversa y cuadros de hipersensibilidad con manifestaciones variadas (fiebre, malestar, dermatitis, agranulocitosis, etc.)<sup>(56,57)</sup>

### 2.3.3.6.3. OTROS FÁRMACOS

**a) AMIKACINA:** Es el antibiótico aminoglucósido más activo frente al *M. tuberculosis* y otras micobacterias. Si no suplanta a la estreptomina, se debe a su mayor costo y a su mayor toxicidad, pero ha de tenerse en cuenta como sustituto válido en casos de recaídas y de resistencias a otros fármacos<sup>(56,57)</sup>

**b) KANAMICINA:** Es menos activa, pero más barata que la amikacina. También sirve para casos de recaídas.

**c) ciprofloxacino y el ofloxacino** inhiben el crecimiento de varias micobacterias, incluidas *M. tuberculosis* y *M. avium-intracellulare*. Pueden utilizarse en la tuberculosis resistente a otros fármacos, especialmente en pacientes con inmunodeficiencia adquirida, acompañados de otros agentes para evitar resistencias.<sup>(56,57)</sup>

**d) CLARITROMICINA:** Algunas cepas de *M. tuberculosis* son susceptibles a Claritromicina. Algunas investigaciones han mostrado que revierte la resistencia a RMP lo que ha llevado a que se investigue el uso de la familia de eritromicinas en TB.

Dosis: 500 mg c/12h o 1g/día (en presentación de liberación sostenida). Puede tomarse con o sin alimentos. No debería usarse en gestante a menos que sea imprescindible.<sup>(54,55)</sup>

**e) LINEZOLID:** Es un antibiótico sintético del grupo de las oxazolidinonas. Es bactericida frente al *Micobacterium tuberculosis* incluso en aquellas cepas MDR o XDR. Sólo se ha reportado menos del 1% de resistencia al Linezolid. La dosis de inicio de tratamiento es de 600 mg EV o VO cada 12 horas por las 4 a 8 primeras semanas o hasta la negativización sostenida del esputo o hasta la aparición de reacciones adversas y luego se puede reducir a 600 mg EV o VO al día por el resto de la duración del tratamiento. La dosis Podría ser de 300 mg una vez al día luego de las 8 primeras semanas de tratamiento (para pacientes de menos de 45 Kg). Puede tomarse con o sin alimentos. No indicado en gestantes. No se requiere ajuste en insuficiencia renal ni hepática. Reacciones adversas: mielosupresión, diarrea, náusea, neuropatía óptica y periférica.<sup>(54,55)</sup>

**f) CLOFAZIMINE:** Activo in vitro contra *M. tuberculosis*. Dosis: 100-200 mg vía oral. Se ha usado anteriormente en Perú en TB MDR. RAFA más frecuente: coloración rosado salmón de la piel, conjuntiva, cornea y fluidos corporales.<sup>(54,55)</sup>

**g) IMIPENEM/CILASTATINA:** Junto con algunas drogas del grupo de las penicilinas ha demostrado actividad bactericida. Debe considerarse el tratamiento con Imipenem

siempre en presencia de por lo menos otras 2 drogas nuevas. La dosis se recomienda que sea dos veces al día utilizando la mayor concentración posible y tolerada. <sup>(54,55)</sup>

**h) THIORIDAZINA:** Es un antipsicótico con potente acción bactericida frente al *Micobacterium tuberculosis*. Utilizado en enfermedades psiquiátricas originalmente. Se concentra varias veces más en el nivel intracelular. El inicio de la terapia debe ser luego de una evaluación cardiológica y el aumento de la dosis debe ser progresivo. Su uso debe ser en conjunto con el especialista en Psiquiatría. <sup>(54,55)</sup>

**CUADRO N° 02: Medicamentos Antituberculosos de Segunda Línea para el manejo Tuberculosis Resistente a Drogas "Características clínico farmacológicas"**

MEDICAMENTO	ACTIVIDAD CONTRA TB	ABSORCION	METABOLISMO	EXCRECION
Kanamicina (Km)	Bactericida	Parenteral	Distribución amplia en tejidos líquidos corporales y	Renal
Amikacina (Am)	Bactericida	Parenteral		
Capreomicina (Cm)	Bactericida	Parenteral		
Estreptomina (S)	Bactericida	Parenteral		
Levofloxacin (Lfx) <sup>a</sup>	Bactericida	Administrar dos horas después en caso de haber ingerido alimentos lácteos, antiácidos, u otra medicación conteniendo Fe, Mg, Ca, Zn, vitaminas, didanosido, sucralfato.	Renal	Renal
Moxifloxacin (Mfx) <sup>a</sup>	Altamente bactericida	Su absorción es casi total tras la administración oral y no se ve afectada por la ingesta de alimentos incluida lácteos.	Hepático	Bilis y renal
Ciprofloxacino (Cx)	Bactericida	Efecto de alimentos en biodisponibilidad es mínimo. Sin embargo su absorción se reduce en presencia de alimentos con alto contenido de calcio (lácteos) y otros iones.	Hepático	80% renal
Etionamida (Eto)	Débilmente bactericida	Absorción enteral.	Hepático	Renal
Acido paramino salicilico (PAS)	Bacteriostático	60 a 65 % absorción oral	Hepático	Renal
Cicloserina (Cs)	Bacteriostático	Oral	Muy buena penetración en el SNC	Renal
Clofazimine (Cf) <sup>a</sup>	Bacteriostático	45 a 62 % de la dosis oral	Hepático	Renal
Amoxicilina /acido clavulamico (Amx/Clv)	Bactericida in vitro	Gástrica y enteral	Hepático	Renal
Claritromicina (Clr)	Probable bacteriostático, efecto de sinergia con E	Gástrica, leve alteración con los alimentos.	Hepático	Hepático
Etambutol (E)*	Bacteriostático	Gástrica no afectado por	Hepático	Renal

	tico. Probable bactericida a dosis altas	alimentos		
<b>Imipenem cilastatina (Imp/Cln)</b>	Bactericida in vitro	Parenteral	Hepático	Renal
<b>Isoniazida dosis altas) (H)</b>	Bactericida potente en cepas sencibles	Gástrico y enteral	Hepático	Hepático
<b>Linezolid (LZD)<sup>a</sup></b>	Bactericida en cepas MDR/XDR	Enteral y parenteral casi completa	Hepático	Hepático y renal
<b>Meropenem (Mp)</b>	Bactericida in vitro	Parenteral completa	Hepático	Hepático y renal
<b>Pirazinamida (Z)*</b>	Bactericida intracelular	Enteral y gástrico	Hepático	Hepático y renal
*son drogas de primera línea pero si la PS indica que son sencibles pueden ser usados en el manejo de TB MDR.				
a) no se encuentran en el petitorio único nacional de medicamentos, sin embargo la ESN PCT puede gestionar ante la DIGEMID la autorización para la adquisición según las normas vigentes.				

Fuente: Norma Técnica de Salud para el Control de la Tuberculosis., 2010. <sup>(55)</sup>

### 2.3.4. MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS

*Mycobacterium tuberculosis* es el agente causal de la tuberculosis, una de las enfermedades infectocontagiosas más letales y antiguas que afecta al ser humano y que posee una amplia distribución en el mundo, produciendo cada año la muerte de alrededor de 2 millones de personas.

En la actualidad la tuberculosis constituye una enfermedad reemergente como consecuencia de la aparición de cepas multirresistentes a los fármacos tradicionalmente empleados en el tratamiento de la enfermedad, ya que representa la primera causa de muerte en pacientes con VIH/SIDA.

Desafortunadamente aún no se conoce con claridad cuáles son los principales factores de virulencia de *M. tuberculosis* involucrados en el desarrollo de la patogenicidad de este microorganismo. Esto se debe a que *M. tuberculosis* no tiene los factores de virulencia clásicos que poseen otras bacterias patógenas, Por esta razón muchas investigaciones han estado encaminadas a tratar de encontrar una definición precisa de la virulencia de *M. tuberculosis* mediante la búsqueda de factores que sean importantes para la progresión de la enfermedad.<sup>(58)</sup>

#### 2.3.4.1. CARACTERES MORFOLÓGICOS

El género *Mycobacterium* está integrado por bacilos largos de 3 a 5µm de longitud o curvos en forma de maza, inmóviles, no esporulados, con abundantes gránulos

citoplasmáticos, La morfología característica suele ser bacilar, ligeramente curvada, siendo la observable en frotis provenientes de cultivo más regular que la que se observa en frotis de materiales patológicos, que poseen una resistencia mayor a la tinción por los colorantes comunes, pero una vez teñidos son resistentes a la decoloración con una mezcla de alcohol ácido.

Desde el punto de vista de los requerimientos atmosféricos algunos son aerobios y otros microaerófilos. En cuanto a la velocidad de crecimiento algunas especies son de crecimiento rápido y otras lentas. Se destaca en su estructura una gran riqueza en lípidos (20-60%). El género comprende 50 especies, entre ellas patógenos primarios, oportunistas y saprofitas. La especie tipo es *Mycobacterium tuberculosis* (*M.tuberculosis*), la cual vamos a utilizar como modelo al referirnos a las principales características del género. <sup>(58)</sup>

#### 2.3.4.2. CONSTITUCIÓN QUÍMICA

**a) Naturaleza de la envoltura de *M. tuberculosis*:** La envoltura bacteriana provee protección y soporte a las bacterias y también poseen mecanismos que en el intercambio de sustancias entre la bacteria y el medio ambiente.

La envoltura consiste en dos partes principales: la membrana plasmática y alrededor de ella, la pared celular. La primera le otorga a la célula protección osmótica y transporte de iones y moléculas, en tanto que la segunda le brinda soporte mecánico y protección.

**Pared celular:** La pared celular está constituida por tres capas. Con tinciones convencionales su apariencia es:

- **capa interna** moderadamente electrón-densa, compuesta por el peptidoglicano cuya estructura es similar a la de otras bacterias.
- **capa media** más ancha que la anterior y electrón-transparente, compuesta por polisacárido, el arabinogalactano, cuyos extremos distales están esterificados con ácidos grasos de alto peso molecular, los ácidos micólicos, de tamaño y estructura única para las *Mycobacterias* (70-90 átomos de Carbono).
- **capa externa** de grosor variable, electrón-opaca, de la cual no puede conocerse con las técnicas actuales, su exacta composición, aunque se le atribuye una estructura glucolípida.

Además de los componentes anteriores existen proteínas asociadas a la pared, algunas con función enzimática (necesarias para la construcción y reconstrucción de los polímeros de la pared durante el proceso de división celular y crecimiento), otros recientemente descubiertos con función de porina.

Estas últimas, encontradas en bajo número, lo que está de acuerdo con la baja permeabilidad de las *Micobacterias* a las moléculas hidrofílicas.

**b) Membrana citoplásmica:** La membrana plasmática de las *Micobacterias* aparece en cortes ultrafinos como una membrana biológica trilaminar clásica, es decir, dos capas electrón-densas separadas por una capa transparente. Sin embargo, tiene como

característico la presencia de moléculas de lipopolisacáridos, lipoarabinomananos (LAM), lipomananos y fosfatidil-inositol-manósidos. <sup>(58)</sup>

#### 2.3.4.3. FISIOLÓGÍA Y METABOLISMO:

Metabolismo de las Mycobacterias es muy variable, encontrándose las Mycobacterias de crecimiento rápido que crecen en menos de tres días en medios simples, así como Mycobacterias que crecen lentamente y necesitan medios más ricos, hasta *M. leprae* que aún no ha podido ser cultivada en medios sin células.

Los medios de cultivo pueden ser sólidos o líquidos, dependiendo de su uso. Los medios sólidos pueden ser en base de agar o en base de huevos (Lowenstein- Jensen), siendo este último el más usado. Entre 3 a 5 semanas se observa el desarrollo de colonias para las Mycobacterias de crecimiento lento (por Ej.: *M. tuberculosis*).

Desde el punto de vista de los requerimientos atmosféricos *M. tuberculosis* y la mayoría de las micobacterias, son aerobios estrictos, excepto *M. bovis* que es microaerófilo. El crecimiento es favorecido con una atmósfera de 5-10% de CO<sub>2</sub>.

La temperatura óptima de crecimiento es variable; *M. tuberculosis* lo hace a 37°C con un rango entre 30 y 42°C. <sup>(58)</sup>

#### 2.3.4.4. RESISTENCIA A LOS AGENTES FÍSICOS Y QUÍMICOS

Las Mycobacterias son altamente resistentes a la desecación y permanecen viables en el esputo desecado de 6 a 8 meses cuando están protegidas de la luz solar directa. Son, en general, más resistentes a los agentes desinfectantes que otras formas vegetativas, pero son destruidos por procedimientos de pasteurización. <sup>(58)</sup>

#### 2.3.4.5. *Mycobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv:

En el laboratorio la cepa de *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv fue originalmente aislada de un paciente en el Laboratorio de Trudeau, Nueva York en 1905 y posteriormente disociadas en un virulento y una variante atenuada (H<sub>37</sub>Ra) en 1934. Las cepas de *Mycobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv y H<sub>37</sub>Ra son los controles más comúnmente usados para la identificación de *M. tuberculosis* en la clínica y el laboratorio de investigación. Desde entonces, estas cepas y varios derivados experimentales resistentes a las drogas se han mantenido tanto por el Instituto Trudeau y la American Type Cell Culture ATCC). H<sub>37</sub>Rv /Ra y sus derivados resistentes a las drogas se han convertido en el estándar de referencia y cepas de control utilizados por los laboratorios clínicos. <sup>(59)</sup>

#### 2.3.5. MÉTODO PROPORCIONAL DE CANETTI, RIST Y GROSSET:

a) **FUNDAMENTO:** Este método se fundamenta en la determinación de la sensibilidad de *Mycobacterium tuberculosis*, frente a las diferentes drogas antituberculosas. El Método Proporcional de Canetti, Rist y Grosset fue descrito en 1963 y en la actualidad es una prueba de referencia (método de oro) recomendada por la OMS para monitorear la quimioterapia de la tuberculosis. <sup>(60)</sup>

Consiste en determinar la proporción de bacilos resistentes a una determinada droga, que existe en la población bacteriana inicial (cepa) para ello se dispone de una serie de tubos con medios de Lowenstein Jensen y las diversas drogas, incorporadas a unas

concentraciones previamente establecidas, se inoculan dos series de tubos, con diluciones de una suspensión bacilar, así como unos tubos testigo sin drogas incorporadas.

En los tubos testigo se obtiene el crecimiento correspondiente al total de la población bacteriana inoculada, las colonias crecidas en los tubos que contienen droga indicarán el número de bacilos resistentes a dicha droga en la población analizada. <sup>(60)</sup>

La suspensión bacteriana se prepara a partir de cepas de referencia, en agua destilada estéril hasta obtener una turbidez equivalente a la proporcionada por una suspensión de BCG de 1 mg/ml. equivalente a unos 10 millones de bacilos viables. A partir de aquí se preparan las diluciones seriadas al 1/10 desde la suspensión madre hasta  $10^{-6}$ , de esta serie se siembra las diluciones  $10^{-3}$ ,  $10^{-5}$  y  $10^{-6}$  sobre el medio lowenstein Jensen que contienen las drogas antibacilares y también sobre los tubos controles correspondientes a cada dilución, la dilución  $10^{-6}$  se siembra a fin de aumentar la precisión en el recuento de los bacilos viables existentes en el inóculo utilizado; esas diluciones están elegidas de tal manera que satisfacen a dos exigencias, por una parte contener un número de bacilos suficientes para permitir un análisis exacto de la cepa y por otra parte suministrar con una u otra dilución, tanto sobre los medios sin antibióticos como sobre los medios con antibióticos, colonias en número contable.

#### **b) HECHOS BÁSICOS CONCERNIENTES A LA METODOLOGÍA:**

Dos cuestiones son de una importancia crucial para la validez y la utilidad del método de las proporciones. La primera cuestión es saber si el empleo de dos diluciones bacilares elegidas a priori permite llegar regularmente a ese resultado. De no ser así, sería necesario ensayar en cada caso para llegar a diluciones útiles, y el método sería demasiado complicado. La segunda cuestión es saber si varias pruebas hechas sobre la misma cepa dan siempre los mismos resultados, es decir la misma proporción de bacilos resistentes, ya que si hubiese sobre esto variaciones importantes, debidas sea a las cepas, o a los medios de cultivo, el método sería demasiado infiel para ser adoptado. Las investigaciones que siguen están consagradas a estos dos problemas, que conciernen en algún modo a la eficacia y la fidelidad del método. <sup>(60)</sup>

#### **c) PROBLEMAS RELATIVOS A LAS DILUCIONES BACILARES SEMBRADAS Y A SU TENOR EN BACILOS VIABLES**

En el caso de una prueba de resistencia indirecta, la siembra se obtiene de dos diluciones bacilares preparadas a partir del primocultivo; en el caso de una prueba de resistencia directa, él se obtiene de dos diluciones preparadas a partir de los esputos (o, eventualmente, de otros productos tuberculosos). Es necesario examinar separadamente estas dos eventualidades.

1.- Pruebas indirectas: La suspensión bacilar inicial preparada a partir del primocultivo es normalizada a 1mg/mL, por comparación de su turbidez a la de un testigo conteniendo 1mg/mL de BCG. Diluciones decimales son preparadas a partir de esta suspensión madre. Las dos diluciones utilizadas para la prueba de resistencia son  $10^{-3}$  mg/mL y  $10^{-5}$  mg/mL, la siembra es de dos 0.2 mL por tubo de medio.

2.- Pruebas directas: Número de bacilos viables contenidos en las diluciones de esputos, en función del número de bacilos viables al examen directo. Una prueba directa no da bacilos: el examen microscópico del producto coloreado, con Ziehl-Neelsen, es entonces un tiempo obligatorio antes de toda prueba directa. En el método de las proporciones, las diluciones de esputo a sembrar son elegidas según el número de bacilos vistos al examen directo. <sup>(60)</sup>

### 2.3.6. DEFINICIÓN DE TÉRMINOS BÁSICOS:

1. **ÁCIDO-ALCOHOL RESISTENCIA:** Es la propiedad física de algunas bacterias a la resistencia de la decoloración de la fucsina básica (rojo) la cual penetra en la célula por acción del fenol y el calor. Las bacterias ácido-alcohol resistentes no pueden ser clasificados según la tinción de Gram, la cual es la técnica más común en la microbiología contemporánea, sin embargo puede ser teñido con algunas tinciones concentradas combinadas con calor. Una vez teñida tiene la capacidad de resistir la decoloración de una combinación de alcohol-ácido, el cual es el decolorante más común en los protocolos de tinción de bacterias. <sup>(61)</sup>
2. **AGITACIÓN ULTRASÓNICA.** Sirven como un medio bien controlable para la desintegración de la célula. Para ello, los efectos mecánicos del ultrasonido proporcionan más rápido y más completa penetración del solvente en materiales celulares y mejoran la transferencia de masa. El ultrasonido logra mayor penetración del disolvente en un tejido de la planta y mejora a la transferencia de masa la ondas de ultrasonido generando cavitación interrumpen las paredes celulares y facilitan la liberación de componentes de la matriz. <sup>(62)</sup>
3. **ANTÍGENO:** Sustancia generalmente proteica, que da lugar a la síntesis de un anticuerpo y reacciona específicamente con el mismo. <sup>(63)</sup>
4. **CEPA:** Es una variante genotípica de una especie. <sup>(63)</sup>
5. **CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA (CIM):** Concentración de fármaco necesaria para neutralizar al 90% de los microorganismos del inóculo.
6. **CONCENTRACIÓN BACTERICIDA MÍNIMA (CBM):** Concentración de fármaco necesaria para asegurar la muerte de todos lo microorganismos del inóculo.
7. **COMPLEJO DE GHON:** Combinación de granulomas o cicatrices curadas de la superficie pleural en el lóbulo medio del pulmón junto con granulomas de ganglios linfáticos hiliares. El complejo es una prueba de que el caso de tuberculosis primaria a curado. <sup>(63)</sup>
8. **ESCALA DE Mc FARLAND:** Es establecer una relación entre una precipitación química y una suspensión bacteriana. La utilidad de la escala es poder realizar suspensiones bacterianas ajustadas a un patrón, generalmente se suele usar el 0,5Mc Farland, para esto se toma una muestra de nuestra bacteria y la inoculamos



en un tubo con solución salina, en el momento en que se produzca un poco de turbidez ya estamos en el 0,5 (de forma visual). <sup>(64)</sup>

- 9. INMUNIDAD CELULAR:** Mecanismo de inmunidad adquirida caracterizado por el papel predominante de los linfocitos T, como en la defensa frente a enfermedades infecciosas, en reacciones de hipersensibilidad retardada, resistencia al cáncer, enfermedades autoinmunes, rechazo de injertos y ciertas alergias. <sup>(63)</sup>
- 10. NECROSIS CASEOSA:** Necrosis que transforma el tejido en una masa seca parecida al queso. <sup>(63)</sup>
- 11. REACTIVACIÓN DE LA TUBERCULOSIS:** Forma de tuberculosis secundaria que ocurre como consecuencia de la activación de una infección endógena larvada. Las causas de la reactivación pueden ser pérdida de inmunidad, cambios hormonales y nutrición deficiente. <sup>(63)</sup>
- 12. UFC:** Unidad formadora de colonias, es un valor que indica el grado de contaminación microbiológica de un ambiente. <sup>(65)</sup>

## CAPITULO III

### MATERIALES Y MÉTODOS.

#### 3.1. MATERIAL BOTÁNICO:

La especie vegetal, *Grindelia boliviana* Rusby (Ch'iri ch'iri) y *Chenopodium incisum* Poir (Arq'a paiq'o) fueron recolectadas en el Distrito de Tinta, Provincia de Canchis y Departamento del Cusco a 3600 m.s.n.m. (Anexo n° 01)

#### 3.2. MATERIAL BIOLÓGICO:

**Muestra microbiológica:** Cepa tipificada de *Micobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv. Proporcionado por el Instituto Nacional de Salud – Lima, al Laboratorio de Referencia Regional Arequipa.

#### 3.3. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS:

##### 3.3.1. MATERIALES DE CAMPO:

- Bolsas de papel kraft.
- Bolsas de polietileno.
- Cuaderno de apuntes.
- Pico de jardinería.
- Tijeras de podar.

##### 3.3.2. MATERIALES DE LABORATORIO:

- Baguetas de vidrio.
- Embudos de vidrio.
- Fiola de 25mL y 50mL.
- Frascos ámbar grandes y pequeños.
- Frascos de 25mL con tapa rosca.
- Goteros.
- Gradilla de metal.
- Matraz Erlenmeyer de 50, 250, 300 y 500 mL.
- Membranas de filtración de 0.45µm.
- Micropipetas de 5µL, 10µL, 50µL, 100µL, 1mL y 5mL.
- Morteros.
- Peras de decantación de 250mL
- Pinzas.
- Pipetas de 1, 2, 5 y 10 mL.
- Pipetas Pasteur.
- Pizetas.
- Placas Petri de 100 x 15 mm.
- Probetas de 100, 250 y 1000 mL.

- Tubos de 20 x 150 mm.
- Tubos con tapa rosca de 20 x 150 mm.
- Una espátula de acero quirúrgico estéril.
- Vasos de precipitado de 150, 250 y 500 mL.
- Viales de 20 mL.
- Cromatofolios silica gel
- Cámara cromatográficas.
- Dispensador de medios de cultivo.
- Mechero Bunsen.

### 3.3.3. MEDIOS DE CULTIVO:

- Agar Lowenstein- Jensen

### 3.3.4. REACTIVOS:

- Acetato de Etilo 100%.
- Acetona 99%.
- Ácido clorhídrico concentrado.
- Ácido fórmico.
- Ácido sulfúrico concentrado
- Agua destilada.
- Anhídrido Acético
- Bencina.
- Bicarbonato de sodio
- Butanol.
- Cloroformo 100%.
- Cloruro férrico
- Diclorometano 100%.
- Etanol 96°.
- Etanol 70°.
- Éter 100%.
- Estándar Kaempferol 98+% Alfa Aesa.
- Fenol 100%.
- Fosfato monopotásico (sólido).
- Glicerina.
- Hexayodo platinato de Potasio
- L – Asparagina
- Magnesio Metálico
- Metanol grado HPLC (Fisher scientific)
- n – Hexano grado HPLC
- 2-aminoetil difenilborato NP
- Reactivo de Benedict.
- Reactivo de Dragendorff.
- Reactivo de Liebermann - Burchard.

- Reactivo de Shinoda.
- Reactivo de Tricloruro de Hierro 5%.
- Sulfato de magnesio (sólido).
- Verde malaquita al 2%.

### **3.3.5. FÁRMACOS:**

- Rifampicina Lote: 003k0705 Marka Sigma.

### **3.3.6. EQUIPOS E INSTRUMENTOS:**

- Autoclave Balanza Analítica sensible al 0.001g Ohaus
- Balanza de Precisión sensible al 0.001g.
- Baño maría.
- Baño ultrasónico marca Branson.
- Bomba de vacío
- Cabina de Flujo Laminar Vertical
- Cabina desecadora.
- Cámara Cromatográfica.
- Cartucho de separación en fase sólida C18 de 500 mg Accubond.
- Centrifuga Power Spin LX 4000 rpm.
- Coagulador
- Cocinilla eléctrica.
- Cromatógrafo Líquido HPLC - DAD Agilent 1200
- Cromatofolio MERCK Sílica Gel 60F254
- Cronómetro.
- Estufa Fisherbrand
- Incubadora Marca Mert
- Lámpara Uv 365 y 254 nm
- Molino de granos.
- Patrón turbidimétrico, Escala de McFarland.
- Refrigeradora Goldex.
- Rotavapor Buchi.

### **3.3.7. OTROS:**

- Algodón.
- Cinta maskin.
- Desinfectantes.
- Huevos.
- Mascarillas.
- Mechero.
- Papel aluminio.
- Papel filtro.
- Plumón marcador.

### **3.4. DISEÑO METODOLÓGICO:**

#### **3.4.1. DISEÑO METODOLÓGICO DE LA INVESTIGACIÓN PARA LA ACTIVIDAD ANTITUBERCULOSA**

El presente trabajo es un estudio cuasi experimental, de series cronológicas con múltiples grupos sin pre prueba y grupos control positivo y negativo, debido a que los sujetos de experimentación no son asignados al azar a los grupos, ni emparejados, sino que dichos grupos ya estaban establecidos antes del experimento, son grupos intactos.

##### **TIPO DE ESTUDIO:**

Para la realización del presente trabajo de investigación se realizó un estudio correlacional ya que se establece una relación entre el efecto antituberculoso de los extractos etanólicos y agliconas de flavonoides de las especies analizadas, *Grindelia boliviana* Rusby (Ch'iri ch'riri) y de *Chenopodium insisum* Poir (Arq'a paiqo) sobre cepas de *Micobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv

#### **3.4.2. DISEÑO METODOLÓGICO DE LA CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN**

Esta parte de la investigación es un estudio de tipo no experimental, descriptivo por que no se modifica ninguna variable independiente

##### **TIPO DE ESTUDIO:**

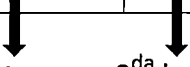
Es transversal o transeccional descriptivo, debido a que se mide la presencia de la variable "agliconas de flavonoides" de las especies de *Grindelia boliviana* Rusby (Ch'iri ch'riri) y *Chenopodium incisum* Poir (Arq'a paiqo)

## DISEÑO DE LAS SERIES CRONOLÓGICAS CON MÚLTIPLES GRUPOS SIN PRE PRUEBA Y GRUPOS CONTROL

### Actividad antituberculosa in - vitro sobre *Micobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv

#### SERIE 01: Extracto etanólico de *Grindelia boliviana* Rusby (Ch'iri ch'iriri)

G <sub>1</sub>	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	O <sub>1</sub>	O <sub>2</sub>
G <sub>2</sub>	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	O <sub>3</sub>	O <sub>4</sub>
G <sub>3</sub>	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	O <sub>5</sub>	O <sub>6</sub>
G <sub>4</sub>	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	O <sub>7</sub>	O <sub>8</sub>
G <sub>5</sub>	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	O <sub>9</sub>	O <sub>10</sub>
G <sub>6</sub>	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	O <sub>11</sub>	O <sub>12</sub>
G <sub>7</sub>	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	O <sub>13</sub>	O <sub>14</sub>
G <sub>8</sub>	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	O <sub>15</sub>	O <sub>16</sub>
G <sub>9</sub>	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	O <sub>17</sub>	O <sub>18</sub>
G <sub>10</sub>	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	O <sub>19</sub>	O <sub>20</sub>
G <sub>11</sub>	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	O <sub>21</sub>	O <sub>22</sub>
G <sub>12</sub>	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	O <sub>23</sub>	O <sub>24</sub>

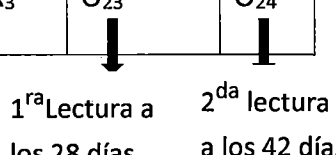
  
 1<sup>ra</sup>Lectura a      2<sup>da</sup> lectura  
 los 28 días      a los 42 días

En donde:

- G<sub>1</sub>:** Grupo control negativo formado por 6 tubos de ensayo con la cepa de *Micobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv en medio Lowenstein Jensen (MLJ).
- G<sub>2</sub>:** Grupo control positivo formado por 1 tubo de ensayo con el Fármaco Patrón Rifampicina.
- G<sub>3</sub>:** 25mg/mL del extracto etanólico de *Grindelia boliviana* Rusby en MLJ
- G<sub>4</sub>:** 26mg/mL del extracto etanólico de *Grindelia boliviana* Rusby en MLJ
- G<sub>5</sub>:** 27mg/mL del extracto etanólico de *Grindelia boliviana* Rusby en MLJ
- G<sub>6</sub>:** 28mg/mL del extracto etanólico de *Grindelia boliviana* Rusby en MLJ
- G<sub>7</sub>:** 29mg/mL del extracto etanólico de *Grindelia boliviana* Rusby en MLJ
- G<sub>8</sub>:** 30mg/mL del extracto etanólico de *Grindelia boliviana* Rusby en MLJ
- G<sub>9</sub>:** 31mg/mL del extracto etanólico de *Grindelia boliviana* Rusby en MLJ
- G<sub>10</sub>:** 32mg/mL del extracto etanólico de *Grindelia boliviana* Rusby en MLJ
- G<sub>11</sub>:** 33mg/mL del extracto etanólico de *Grindelia boliviana* Rusby en MLJ
- G<sub>12</sub>:** 34mg/mL del extracto etanólico de *Grindelia boliviana* Rusby en MLJ
- X<sub>1</sub>:** Dilución 10<sup>-3</sup> de la cepa *Micobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv.
- X<sub>2</sub>:** Dilución 10<sup>-5</sup> de la cepa *Micobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv.
- X<sub>3</sub>:** Dilución 10<sup>-6</sup> de la cepa *Micobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv.
- O<sub>n</sub>:** 1<sup>ra</sup> y 2<sup>da</sup> lectura a los 28 y 42 días.

**SERIE 02: Extracto etanólico de *Chenopodium incisun* Poir (Arq'a paiqo)**

G <sub>1</sub>	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	O <sub>1</sub>	O <sub>2</sub>
G <sub>2</sub>	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	O <sub>3</sub>	O <sub>4</sub>
G <sub>3</sub>	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	O <sub>5</sub>	O <sub>6</sub>
G <sub>4</sub>	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	O <sub>7</sub>	O <sub>8</sub>
G <sub>5</sub>	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	O <sub>9</sub>	O <sub>10</sub>
G <sub>6</sub>	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	O <sub>11</sub>	O <sub>12</sub>
G <sub>7</sub>	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	O <sub>13</sub>	O <sub>14</sub>
G <sub>8</sub>	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	O <sub>15</sub>	O <sub>16</sub>
G <sub>9</sub>	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	O <sub>17</sub>	O <sub>18</sub>
G <sub>10</sub>	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	O <sub>19</sub>	O <sub>20</sub>
G <sub>11</sub>	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	O <sub>21</sub>	O <sub>22</sub>
G <sub>12</sub>	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	O <sub>23</sub>	O <sub>24</sub>

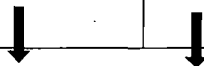


En donde:

- G<sub>1</sub>:** Grupo control negativo formado por 6 tubos de ensayo con la cepa de *Micobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv en medio Lowenstein Jensen (MLJ).
- G<sub>2</sub>:** Grupo control positivo formado por 1 tubo de ensayo con el Fármaco Patrón Rifampicina.
- G<sub>3</sub>:** 25 mg/mL del extracto etanólico *Chenopodium incisun* Poir en MLJ
- G<sub>4</sub>:** 26mg/mL del extracto etanólico *Chenopodium incisun* Poir en MLJ
- G<sub>5</sub>:** 27mg/mL del extracto etanólico *Chenopodium incisun* Poir en MLJ
- G<sub>6</sub>:** 28mg/mL del extracto etanólico *Chenopodium incisun* Poir en MLJ
- G<sub>7</sub>:** 29mg/mL del extracto etanólico *Chenopodium incisun* Poir en MLJ
- G<sub>8</sub>:** 30 mg/mL del extracto etanólico *Chenopodium incisun* Poir en MLJ
- G<sub>9</sub>:** 31mg/mL del extracto etanólico *Chenopodium incisun* Poir en MLJ
- G<sub>10</sub>:** 32mg/mL del extracto etanólico *Chenopodium incisun* Poir en MLJ
- G<sub>11</sub>:** 33mg/mL del extracto etanólico *Chenopodium incisun* Poir en MLJ
- G<sub>12</sub>:** 34mg/mL del extracto etanólico *Chenopodium incisun* Poir en MLJ
- X<sub>1</sub>:** Dilución 10<sup>-3</sup> de la cepa *Micobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv.
- X<sub>2</sub>:** Dilución 10<sup>-5</sup> de la cepa *Micobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv.
- X<sub>3</sub>:** Dilución 10<sup>-6</sup> de la cepa *Micobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv.
- O<sub>n</sub>:** 1<sup>ra</sup> y 2<sup>da</sup> lectura a los 28 y 42 días.

**SERIE 03: Agliconas de flavonoides de *Grindelia boliviana* Rusby (Ch'iri ch'iri)**

G <sub>1</sub>	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	O <sub>1</sub>	O <sub>2</sub>
G <sub>2</sub>	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	O <sub>3</sub>	O <sub>4</sub>
G <sub>3</sub>	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	O <sub>5</sub>	O <sub>6</sub>
G <sub>4</sub>	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	O <sub>7</sub>	O <sub>8</sub>
G <sub>5</sub>	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	O <sub>9</sub>	O <sub>10</sub>
G <sub>6</sub>	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	O <sub>11</sub>	O <sub>12</sub>
G <sub>7</sub>	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	O <sub>13</sub>	O <sub>14</sub>
G <sub>8</sub>	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	O <sub>15</sub>	O <sub>16</sub>



1<sup>ra</sup> Lectura a      2<sup>da</sup> lectura  
 los 28 días      a los 42 días

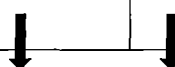
En donde:

- G<sub>1</sub>:** Grupo control negativo formado por 6 tubos de ensayo con la cepa de *Micobacterium Tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv en medio Lowenstein Jensen (MLJ).
- G<sub>2</sub>:** Grupo control positivo formado por 1 tubo de ensayo con el Fármaco Patrón Rifampicina.
- G<sub>3</sub>:** 1.2mg/mL de agliconas de flavonoides en MLJ
- G<sub>4</sub>:** 2.0mg/mL de agliconas de flavonoides en MLJ
- G<sub>5</sub>:** 2.8 mg/mL de agliconas de flavonoides en MLJ
- G<sub>6</sub>:** 3.6mg/mL de agliconas de flavonoides en MLJ
- G<sub>7</sub> :** 4.4mg/mL de agliconas de flavonoides en MLJ
- X<sub>1</sub>:** Dilución 10<sup>-3</sup> de la cepa *Micobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv en MLJ
- X<sub>2</sub>:** Dilución 10<sup>-5</sup> de la cepa *Micobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv en MLJ
- X<sub>3</sub>:** Dilución 10<sup>-6</sup> de la cepa *Micobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv en MLJ
- O<sub>n</sub>:** 1<sup>ra</sup> y 2<sup>da</sup> lectura a los 28 y 42 días.



**SERIE 04: Agliconas de flavonoides de *Chenopodium incisum* Poir (Arq'a paiqo)**

G <sub>1</sub>	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	O <sub>1</sub>	O <sub>2</sub>
G <sub>2</sub>	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	O <sub>3</sub>	O <sub>4</sub>
G <sub>3</sub>	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	O <sub>5</sub>	O <sub>6</sub>
G <sub>4</sub>	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	O <sub>7</sub>	O <sub>8</sub>
G <sub>5</sub>	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	O <sub>9</sub>	O <sub>10</sub>
G <sub>6</sub>	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	O <sub>11</sub>	O <sub>12</sub>
G <sub>7</sub>	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	O <sub>13</sub>	O <sub>14</sub>



1<sup>ra</sup> Lectura a los 28 días      2<sup>da</sup> lectura a los 42 días

En donde:

- G<sub>1</sub>:** Grupo control negativo formado por 6 tubos de ensayo con la cepa de *Micobacterium Tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv en medio Lowenstein Jensen (MLJ).
- G<sub>2</sub>:** Grupo control positivo formado por 1 tubo de ensayo con el Fármaco Patrón Rifampicina.
- G<sub>3</sub>:** 1.2mg/mL de agliconas de flavonoides en MLJ.
- G<sub>4</sub>:** 2.0mg/mL de agliconas de flavonoides en MLJ.
- G<sub>5</sub>:** 2.8 mg/mL de agliconas de flavonoides en MLJ.
- G<sub>6</sub>:** 3.6mg/mL de agliconas de flavonoides en MLJ.
- G<sub>7</sub> :** 4.4 mg/mL de agliconas de flavonoides en MLJ.
- X<sub>1</sub>:** Dilución 10<sup>-3</sup> de la cepa *Micobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv.
- X<sub>2</sub>:** Dilución 10<sup>-5</sup> de la cepa *Micobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv.
- X<sub>3</sub>:** Dilución 10<sup>-6</sup> de la cepa *Micobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv.
- O<sub>n</sub>:** 1<sup>ra</sup> y 2<sup>da</sup> lectura a los 28 y 42 días.

### 3.5. IDENTIFICACIÓN, DEFINICIÓN Y OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES.

#### 3.5.1. VARIABLES IMPLICADAS

##### 3.5.1.1. VARIABLE INDEPENDIENTE.

**Extractos etanólicos al 70 % obtenidos de las plantas:** *Grindelia boliviana* Rusby (Ch'iri ch'iri) y *Chenopodium incisum* Poir (Arq'a paiqo).

**Definición conceptual.** Se define como preparado concentrado de drogas vegetales obtenido mediante remoción de los constituyentes activos de dichas drogas, con métodos apropiados y evaporación del solvente. <sup>(63)</sup>

**Definición operacional.**

Indicador: concentración de los extractos etanólicos al 70%.

**Operacionalización.**

- **Naturaleza:** Cuantitativa.
- **Forma de medición:** Directa.
- **Escala de medición:** Razón.
- **Procedimiento:** Se procedió a pesar la cantidad necesaria en mg y se diluyeron en mL del medio de cultivo Lowenstein Jensen, para las diferentes concentraciones.
- **Instrumento:** Balanza analítica de precisión de 0.001 g.
- **Expresión final:** mg/mL.

**Agliconas de flavonoides obtenido de la planta:** *Grindelia boliviana* Rusby (Ch'iri ch'iri) y *Chenopodium incisum* Poir (Arq'a Paiqo).

**Definición conceptual.** Es el resultado de la hidrólisis de la fracción etanólica al 30 % con HCl, para separar el azúcar de los glicósidos permitiendo el aislamiento de la aglicona libre, que posteriormente se purifica. <sup>(66)</sup>

**Definición operacional.**

Indicador: Concentración de agliconas de flavonoides.

**Operacionalización.**

**Naturaleza:** Cuantitativa.

**Forma de medición:** Directa.

**Escala de medición:** Razón.

**Procedimiento:** Se procedió a pesar la cantidad necesaria en mg y se diluyeron en mL del medio de cultivo Lowenstein Jensen, para las diferentes concentraciones.

**Instrumento:** Balanza analítica de precisión de 0.001 g.

**Expresión final:** mg/mL.

### 3.5.1.2. VARIABLES DEPENDIENTES

- Actividad Antituberculosa in vitro.

**Definición conceptual:** Es la capacidad inherente de una sustancia de origen sintético o natural de inhibir o matar al *Micobacterium tuberculosis*.<sup>(67)</sup>

**Operacionalización:**

**Naturaleza:** Cualitativa.

**Forma de medición:** Directa.

**Escala de medición:** Nominal.

**Procedimiento:** Se observó la presencia o ausencia de la formación de colonias micobacterianas en cada uno de los tubos de ensayo con medio Lowenstein Jensen correspondientes a todas las concentraciones estudiadas.

**Instrumento:** Fichas estructuradas.

**Expresión final:** Presencia o ausencia de colonias.

**INDICADOR:** Inhibición del crecimiento de colonias de la cepa de *Micobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv.

**Definición conceptual:** Ausencia de la formación de colonias de la cepa de *Micobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv.<sup>(67)</sup>

**Operacionalización:**

**Naturaleza:** Cuantitativa.

**Forma de medición:** Directa.

**Escala de medición:** Razón.

**Procedimiento:** Se cuentan las colonias micobacterianas formadas tanto en los tubos control como en los experimentales.

**Instrumento:** Fichas estructuradas.

**Expresión final:** Número de colonias.

### 3.5.2. VARIABLES NO IMPLICADAS

#### 3.5.2.1. VARIABLES INTERVINIENTES

**De la bacteria:** Cepa bacteriana

**Definición conceptual:** Variante fenotípica de una especie bacteriana o, incluso, de taxón inferior, usualmente propagada clonalmente, a su vez, comparten al menos una característica.<sup>(67)</sup>

**INDICADOR:** Cepa H<sub>37</sub>Rv

**Definición conceptual:** Cepa originalmente aislada de un paciente en el laboratorio de Trudeau, Nueva York en 1905 y posteriormente disociada en un virulento y variante atenuada en 1934.<sup>(59)</sup>

**Definición operacional:**

- **Naturaleza:** Cualitativa
- **Forma de medición:** Directa
- **Escala de medición:** Nominal
- **Procedimiento:** Se adquirió y se uso la Cepa de *Micobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv para las pruebas de investigación.
- **Expresión final:** *Micobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv

**De la planta: Recolección de la especie vegetal.**

**Definición conceptual:** Las plantas medicinales contienen principios activos cuyas características dependen de varios factores. La determinación del momento óptimo de recolección se hace teniendo en cuenta, principalmente el mayor contenido de principios activos. <sup>(39)</sup>

**INDICADOR: Procedencia de la especie**

**Definición conceptual:** Denominación que se le otorga al área o región geográfica en el que se ubica y se recolectó las especies vegetales en estudio.

**Operacionalización:**

- **Naturaleza:** Cualitativa
- **Forma de medición:** Directa
- **Escala de medición:** Nominal
- **Procedimiento:** Se recolectó la planta en el distrito de Tinta, en la provincia de Canchis.
- **Expresión final:** Tinta

**INDICADOR: Temporada de recolección:**

**Definición conceptual:** Mes y año en el cual se recolectó las plantas

- **Naturaleza:** Cualitativa
- **Forma de medición:** Directa
- **Escala de medición:** Nominal
- **Procedimiento:** Las especies *Grindelia boliviana* Rusby (Ch'iri ch'iri) y *Chenopodium incisum* Poir (Arq'a paiqo) se recolectaron en el mes de octubre del año 2012
- **Expresión final:** Octubre

**De la humedad de la planta:**

**Definición conceptual:** Se entiende por humedad el agua libre que contiene el material vegetal. <sup>(39)</sup>

**Operacionalización:**

- **Naturaleza:** Cuantitativa
- **Forma de medición:** Indirecta
- **Escala de medición:** Razón
- **Procedimiento:** Obtención del porcentaje de humedad
- **Expresión final:** %

**De la solubilidad de la planta:**

**Definición conceptual:** Es la máxima cantidad de soluto que se puede disolver en una cantidad de disolvente a una temperatura determinada. <sup>(68)</sup>

**Operacionalización:**

- **Naturaleza:** Cualitativa
- **Forma de medición:** Directa
- **Escala de medición:** Nominal
- **Procedimiento:** Pruebas de solubilidad con solventes de diferente polaridad
- **Expresión final:**
  - Totalmente soluble
  - Parcialmente soluble
  - Poco soluble
  - Insoluble

**Del análisis fitoquímico cualitativo de la planta:**

**Definición conceptual:** Son ensayos de tipo cualitativo que comprenden reacciones de identificación (coloreadas, de precipitación) que permiten detectar determinados constituyentes o sustancias químicas características de una planta. <sup>(23)</sup>

**Operacionalización:**

- **Naturaleza:** Cualitativa
- **Forma de medición:** Directa
- **Escala de medición:** Nominal
- **Procedimiento:** Ensayos de identificación
- **Expresión final:**
  - Ausencia de metabolito
  - Leve presencia del metabolito
  - Moderada presencia del metabolito
  - Intensa presencia del metabolito

### **3.6. CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN:**

#### **3.6.1. DEL MATERIAL VEGETAL:**

**Se incluyeron:** las partes aéreas de *Grindelia boliviana* Rusby (Ch'iri ch'iriri) y *Chenopodium incisum* Poir (Arq'a paiqo), que no presente daño evidente, recolectadas en floración.

**Se excluyeron:** Plantas dañadas que hayan sufrido el ataque de hongos, plagas etc.

#### **3.6.2. DE LA BACTERIA EN EXPERIMENTACIÓN:**

**Se incluyeron:** Cepas tipificadas de *Micobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv.

**Se excluyeron:** Cepas de *Micobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv, mantenidas bajo condiciones inadecuadas de almacenamiento.

VARIABLES IMPLICADAS							
Variables	Definición Conceptual	Naturaleza Forma de medición Escala de medición	Proceso de medición	Indicador	Instrumento	Expresión final	
INDEPENDIENTES	Extractos etanólicos al 70 % obtenidos de las partes aéreas de la planta <i>Grindelia boliviana</i> Rusby (Ch'iri ch'iri) y <i>Chenopodium incisum</i> Poir (Arq'a paiqo)	Cualitativa Directa Razón	Se procedió a pesar la cantidad necesaria en mg y se diluyo en mL del medio de cultivo Lowenstein Jensen, para las diferentes concentraciones.	Concentración de los extractos.	Balanza analítica de precisión 0.001gr	mg/mL	
	Agliconas de flavonoides Obtenidas de: <i>Grindelia boliviana</i> Rusby (Ch'iri ch'iri) y <i>Chenopodium incisum</i> Poir (Arq'a paiqo)	Cualitativa Directa Razón	Se procedió a pesar la cantidad necesaria en mg y se diluyo en mL del medio de cultivo Lowenstein Jensen, para las diferentes concentraciones	Concentración de las agliconas de flavonoides	Balanza analítica de precisión 0.001gr	mg/mL	
DEPENDIENTES	Actividad antituberculosa in vitro	Cualitativa Directa Nominal	Se observó la presencia o ausencia de la formación de colonias mycobacterianas en cada uno de los tubos de ensayo con medio Lowenstein Jensen correspondientes a todas las concentraciones estudiadas.	Inhibición del crecimiento de colonias de <i>Micobacterium tuberculosis</i> H <sub>37</sub> RV	Fichas estructuradas	Presencia o ausencia de colonias	

VARIABLES NO IMPLICADAS						
VARIABLES INTERVINIENTES	Variables	Definición conceptual	Naturaleza Forma de medición Escala de medición	Proceso de medición	Indicador	Expresión final
	DE LA CEPA BACTERIANA	Variante fenotípica de una especie bacteriana o, incluso, de taxón inferior, usualmente propagada clonalmente, a su vez, comparten al menos una característica.	Cualitativa Directa Nominal	Se adquirió y se usó la Cepa de <i>Micobacterium tuberculosis</i> H <sub>37</sub> Rv para las pruebas de investigación	Cepa H <sub>37</sub> Rv	<i>Micobacterium tuberculosis</i> H <sub>37</sub> Rv
	DE LA ESPECIE VEGETAL	Las plantas medicinales contienen principios activos cuyas características dependen de varios factores. La determinación del momento óptimo de recolección se hace teniendo en cuenta, principalmente el mayor contenido de principios activos.	Cualitativa Directa Nominal	Se recolectó la planta en el distrito de Tinta, en la provincia de Canchis.	Procedencia de la especie	Tinta
			Cualitativa Directa Nominal	Las especies <i>Grindelia boliviana</i> (Ch'iri ch'iri) y <i>Chenopodium incisum</i> (Arq'a païqo) se recolectaron en el mes de octubre del año 2012	Temporada de recolección	Octubre
	DE LA SOLUBILIDAD	Es la máxima cantidad de soluto que se puede disolver en una cantidad de disolvente a una temperatura determinada.	Cualitativa Directa Nominal	Pruebas de solubilidad con solventes de diferente polaridad	---	-Totalmente soluble -Parcialmente soluble -Poco soluble -insoluble
	DE LA HUMEDAD	Se entiende por humedad el agua libre que contiene el material vegetal.	Cuantitativa Indirecta Razón	Obtención del porcentaje de humedad	---	%
	DEL ANALISIS FITOQUIMICO	Son ensayos de tipo cualitativo que comprenden reacciones de identificación (coloreadas, de precipitación) que permiten detectar determinados constituyentes o sustancias químicas características de una planta.	Cualitativa Directa Nominal	Ensayos de identificación	---	-Ausencia de metabolito -Leve presencia del metabolito -Moderada presencia del metabolito -Intensa presencia del metabolito



### 3.7. PROCEDIMIENTO

#### 3.7.1. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA:

Las plantas fueron colectadas en octubre del 2012, en el Distrito de Tinta, Provincia de Canchis, Departamento del Cusco, ubicada a la altitud de 3600 msnm a 500 km al norte de la ciudad del Cusco

#### PLANTAS UTILIZADAS:

ESPECIE	NOMBRE COMUN	LUGAR DE RECOLECCION
<i>Grindelia boliviana</i> Rusby	CH'IRI - CH'RI	Cusco – Canchis – Tinta
<i>Chenopodium incisum</i> Poir	ARQ'A PAIQUO	Cusco – Canchis – Tinta

#### 3.7.1.1. RECOLECCIÓN.

Se recolectaron las especies vegetales en bolsas polietileno, con alcohol de 70° para luego transportarlas en bolsas de papel kraft.

#### 3.7.1.2. SECADO:

Las plantas se secaron en estufa a 40°C, picadas en pequeños fragmentos.

#### 3.7.1.3. MOLIENDA:

Luego las plantas se seleccionaron para proceder a la molienda en un molino de granos y posteriormente son tamizadas.

#### 3.7.2. OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS AL 70%.

Se sometieron por separado las plantas pulverizadas a maceración en etanol al 70% con agitación ultrasónica hasta agotamiento, luego se filtró. Luego de ser filtrados por separado los extractos etanólicos se concentraron a sequedad en el rotavapor a 40°C. Con los extractos secos obtenidos se realizaron las pruebas de solubilidad, análisis fitoquímico y la actividad antituberculosa.

Se procedió a determinar el porcentaje de extracción según la siguiente relación:

$$\% \text{ Extracción} = \text{Pf} / \text{Pi} \times 100$$

Dónde:

Pf: Peso final (Extracto seco)

Pi: Peso inicial (Muestra pulverizada)

**3.7.2.1. DETERMINACIÓN DE LA HUMEDAD:**

La determinación de la humedad se realizó, trozando la especie vegetal en piezas de 1cm aproximadamente, se introdujo a la estufa a temperatura de 40°C hasta peso constante para luego determinar el % de humedad mediante la siguiente relación:

$$\%H = \frac{M1 - M2}{M1}$$

**Dónde:**

%H: Porcentaje de la humedad

M1: Peso de muestra fresca

M2: Peso de muestra seca

**3.7.2.2. PRUEBAS DE SOLUBILIDAD:**

Las pruebas de solubilidad se realizaron tomando 100 mg. De los extractos secos de ambas plantas, en diferentes tubos de ensayo y se le agregó a cada uno 1mL de los solventes de diferente polaridad como sigue: Agua, solución salina fisiológica, metanol, etanol al 70% y 96%, acetona, acetato de etilo, éter etílico, cloroformo, bencina y hexano.

**3.7.2.3. ANÁLISIS FITOQUÍMICO CUALITATIVO:**

Se determinó cualitativamente la presencia de los principales grupos de metabolitos secundarios en los extractos secos.

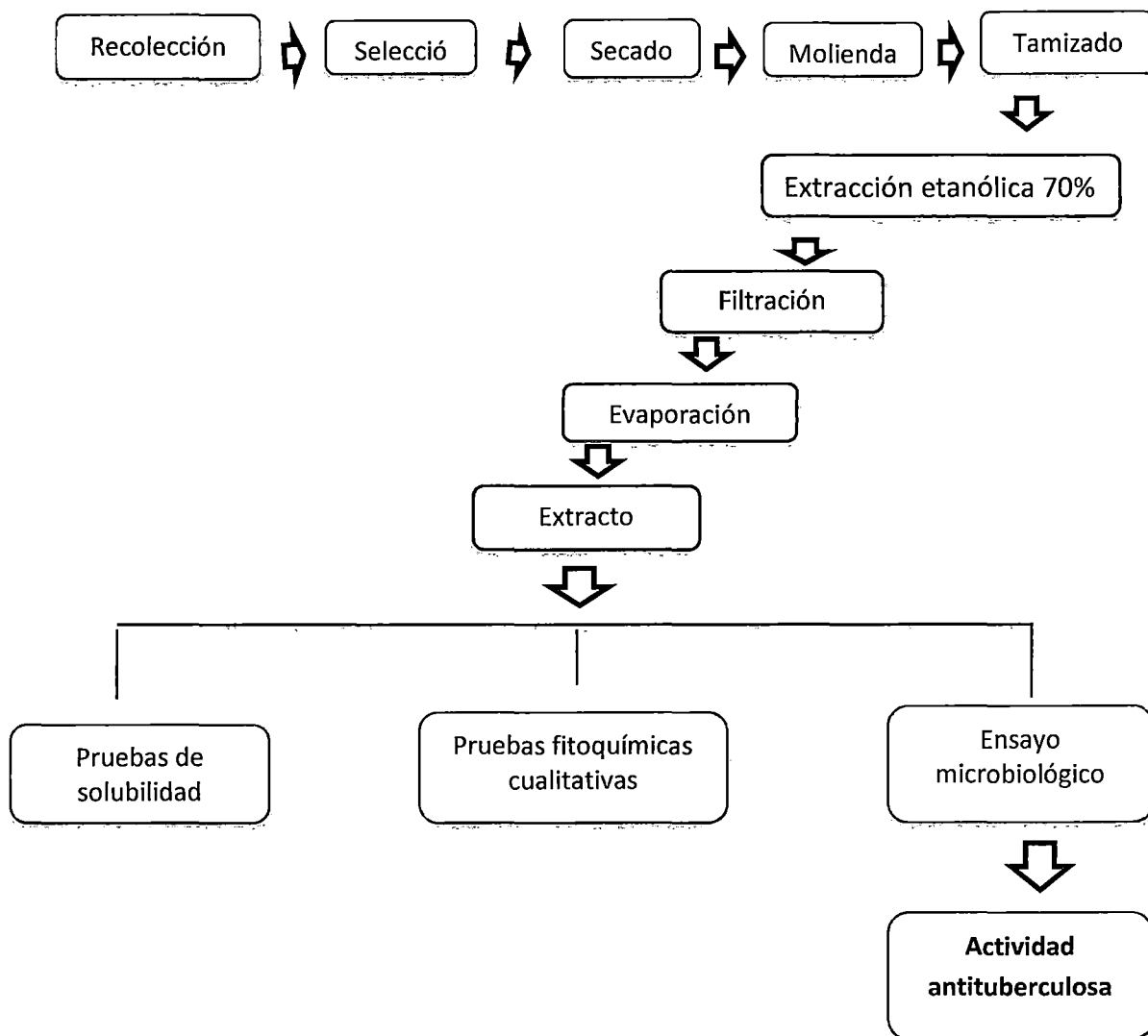
**CUADRO N° 03: Análisis fitoquímico cualitativo**

ENSAYOS	METABOLITOS
Shinoda	Flavonoide
Baljet	Lactonas
Dragendorf	Alcaloides
Mayer	Alcaloides
Platino	Alcaloides
Acetato de cobre	Resinas
Ácido sulfúrico concentrado	Quinonas
Cloruro férrico 1 % / agua	Compuestos fenólicos
Benedic	Azúcares reductores
Espuma	Saponinas
Ácido clorhídrico e hidróxido de sodio y Benedic	Glicósidos
Cloruro férrico 1 %	Taninos

Fuente: Lock Olga, Investigación Fitoquímica (1994) <sup>(23)</sup>

keesse R, Muller R K. Métodos de laboratorio para la Química Orgánica (1990) <sup>(6)</sup>

**FLUJOGRAMA N° 01:** Obtención de los extractos etanólicos al 70% de las planta *Grindelia boliviana* Rusby (Ch'iri ch'iriri) y *Chenopodium incisum* Poir (Arq'a paiaq)



Fuente: elaboración propia

### 3.7.3. OBTENCIÓN DE AGLICONAS DE FLAVONOIDES

Para determinar las condiciones de extracción de las agliconas de flavonoides se realizó una parte preliminar donde se decidió las condiciones de extracción, así mismo se realizaron cromatogramas de los extractos obtenidos antes y después de la hidrólisis. Antes de la hidrólisis los picos del extracto etanólico al 30% son abundantes y representan metabolitos secundarios como flavonoides con azúcares y ácidos fenólicos. Sin embargo, después de la hidrólisis ácida estos compuestos fueron alterados significativamente obteniendo agliconas de tal modo que los picos correspondientes a los glicosidos flavonoides crecieron para dar lugar a una mayor concentración de agliconas siendo los principales subproductos de la hidrólisis (**anexo n° 08**).

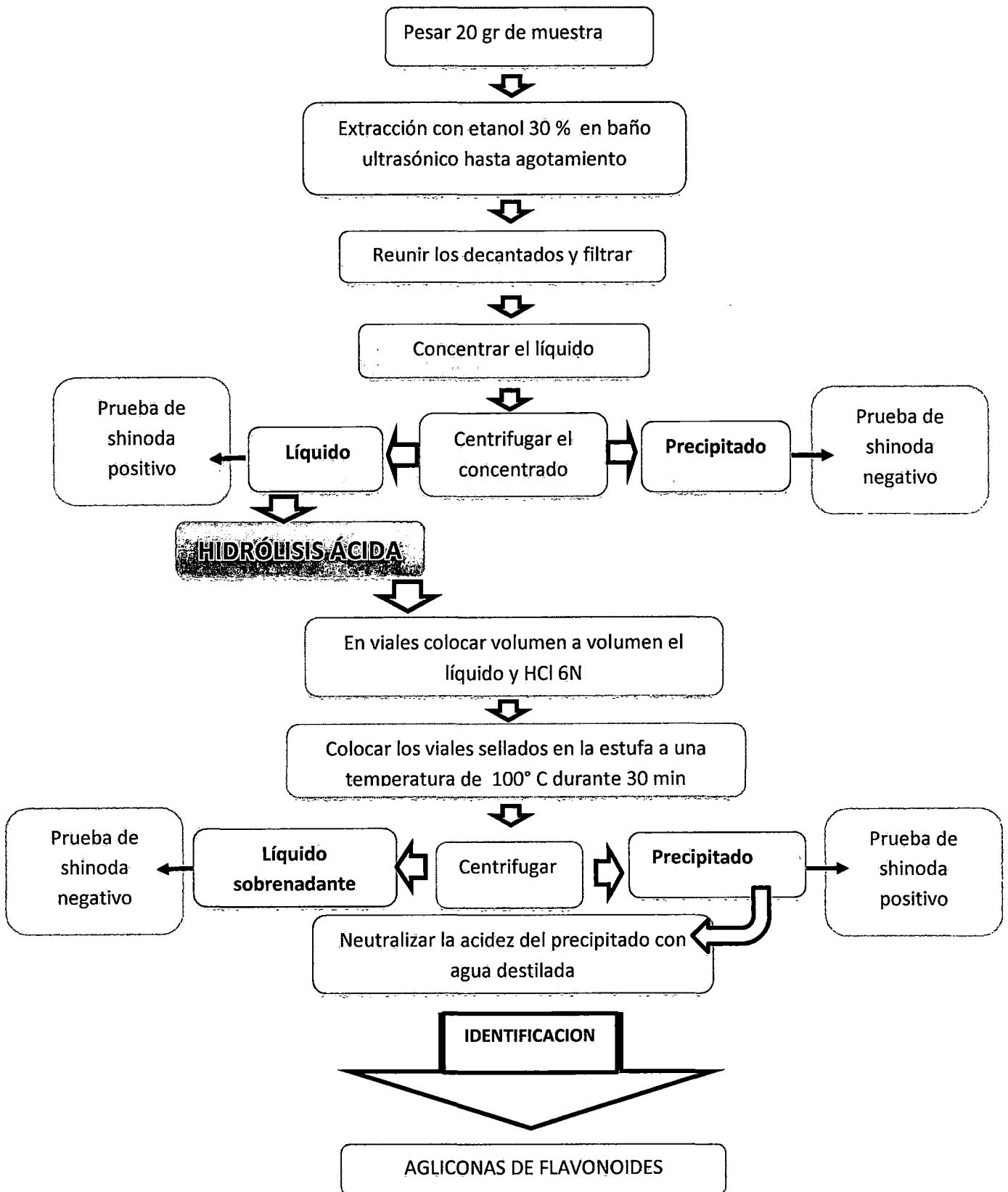
#### 3.7.3.1. EXTRACCIÓN ETANÓLICA AL 30%:

- Se pesaron 20 gramos de muestra secas y molidas, se colocaron en un frasco de 250 mL, para la extracción con etanol al 30%, asistido por baño ultrasónico durante 1 hora hasta agotamiento, se filtró y se concentró en un rotavapor, luego se centrifugó obteniéndose un sobrenadante que será usado para la hidrólisis.

#### 3.7.3.2. HIDRÓLISIS ÁCIDA CON HCl 6N.

- Con el sobrenadante del centrifugado obtenido se realiza la Hidrólisis ácida con HCl 6N en la proporción 1:1, durante 30 min a 100°C en viales herméticamente cerrados.
- El resultado del proceso de hidrólisis ácida con HCl 6N es centrifugada obteniendo el precipitado de agliconas de flavonoides.
- El precipitado se disolvió en metanol para realizar la prueba de shinoda y ver la presencia de flavonoides. (**Ver anexo n° 09**)

**FLUJOGRAMA N° 02: EXTRACCIÓN DE AGLICONAS DE FLAVONOIDES**



**Fuente:** Elaboración propia a partir de: Marston A, Hostettmann K. 2006 <sup>(69)</sup>; waksmundzka Hajnos M. 2010<sup>(66)</sup>

### 3.7.3.3. PURIFICACIÓN DE LAS AGLICONAS DE FLAVONOIDES:

En microcolumna, fase estacionaria: Octadecil silano y fase móvil: Metanol asistida por bomba al vacío.

- Previamente la microcolumna de octadecil silano C18 (fase estacionaria) se humedece con metanol (fase móvil).
- Disolver en metanol el precipitado obtenido del proceso de hidrólisis, para pasar por la microcolumna asistida por una bomba al vacío luego enjuagar con agua, y finalmente hacer pasar metanol que arrastra las agliconas de flavonoides, las cuales precipitaron al adicionarle agua estas fueron secadas en una cabina desecadora e identificadas en HPLC.

#### FUNDAMENTO:

**1. Extracción de flavonoides.** La extracción de flavonoides de *Grindelia boliviana* Rusby (Ch'iri - ch'iri) y *Chenopodium insisum* Poir (Arq'a paiqo), se partió usando como disolventes alcohol y agua, reportados por otros investigadores, según bibliografía Oyvind M, Kenneth R Markham, en el libro chemistry, biochemistry and applications indican que los flavonoides glicósidos más polares se extraen con alcohol o con mezclas de alcohol – agua y las soluciones alcohólicas acuosas son adecuadas. <sup>(69,70)</sup>

Los solventes empleados en la extracción de estos compuestos son muy variados y pueden ser desde muy polares desde agua y etanol para glicósidos o agliconas muy hidroxiladas. <sup>(23)</sup>

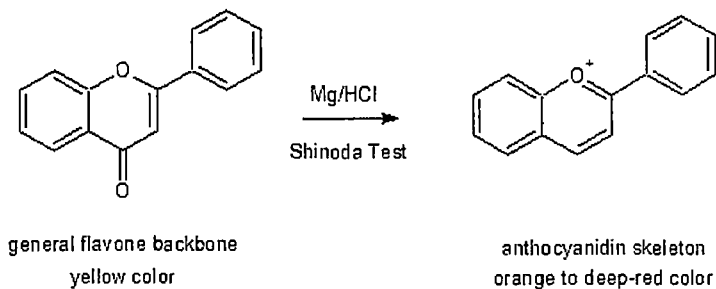
**2. Hidrólisis de flavonoides:** Waksmundzka Hajnos Monika, menciona que pueden existir flavonoides en la planta como agliconas o glicósidos libres, para obtener agliconas se realiza por lo general hidrólisis química. Dos procedimientos principales para escindir el enlace glicósido, son reportados en la literatura: hidrólisis ácida y enzimática. Más a menudo, la hidrólisis ácida de glicósidos flavonoides es generalmente con ácido clorhídrico o ácido fórmico a temperaturas elevadas (80 - 100 ° C). Estos compuestos se hidrolizan con metanol acuoso y ácido clorhídrico (1:1) a 100 ° C durante 1 h en un vial cerrado herméticamente. <sup>(66)</sup>

Es tomando en cuenta estas consideraciones, donde los flavonoides polares se extraen con soluciones alcohólicas acuosas que se realiza una parte preliminar utilizando para la extracción etanol al 30% y 50% los que pasaron por un proceso de hidrólisis ácida para romper los enlaces glucosídicos y obtener las agliconas de flavonoides y finalmente se realizó la prueba de Shinoda, en base a este resultado se eligió la concentración de etanol al 30 % y la concentración de ácido clorhídrico 6N

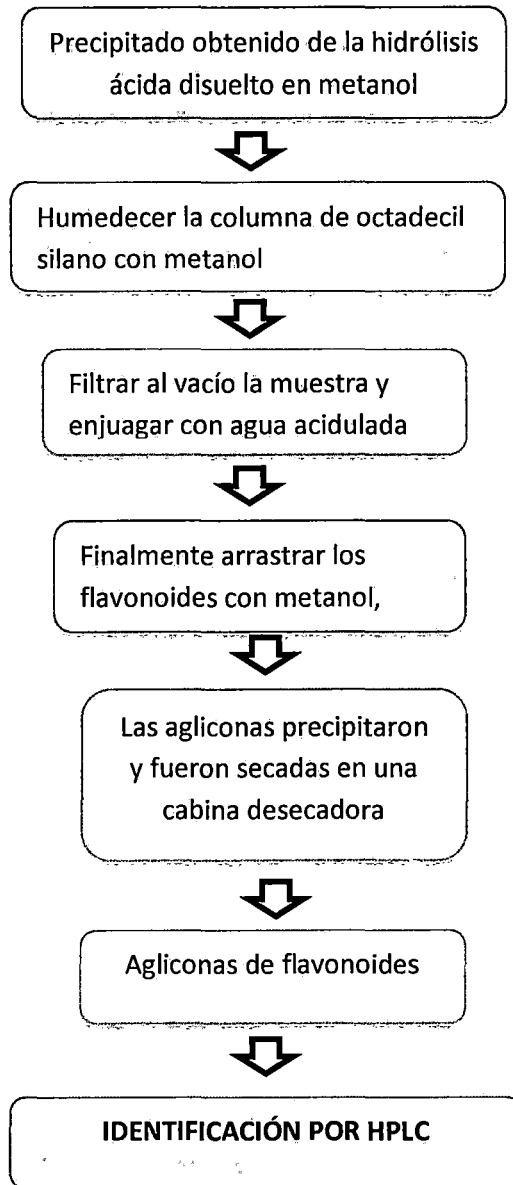
**3. Purificación de agliconas de flavonoides:** Según Waksmundzka Hajnos Monika. El método "sample purification and concentration" (SPE) se utiliza muy a menudo en el tratamiento previo de la muestra para HPLC, en la mayoría de los casos el sorbente está unida a C18 de sílice, y la solución de disolventes es por lo general ligeramente acidificada para prevenir la ionización de los agliconas de flavonoides, lo que reduciría su retención. El método SPE, ha sido desarrollado para la purificación de flavonoides, (utilizando

sorbente C18 y metanol o metanol acuoso como disolvente, este método se caracteriza por una alta repetibilidad. <sup>(66)</sup>

Se utilizó el precipitado de la hidrólisis debido a que las agliconas de flavonoides precipitan por su baja polaridad quedando los azúcares en el líquido lo cual se verificó realizando una prueba de shinoda. Tanto al líquido como al precipitado obteniendo una coloración roja en el precipitado el cual es indicativo de la presencia de las agliconas de flavonoides. En esta prueba el magnesio metálico es oxidado por el HCl concentrado, hasta el desprendimiento de hidrógeno produciendo la aparición de coloración rojiza, violeta o naranja, se considera positivo para compuestos con el núcleo de la  $\gamma$ -benzopirona (flavonas, flavonoles, flavanonas, flavanonoles, isoflavonoides). <sup>(71)</sup> En investigaciones realizadas por T J Mabri y K R Markhan <sup>(72)</sup> indican que la aglicona a menudo precipita de la mezcla de hidrólisis enfriada y puede ser obtenido por filtración, la elución de la columna con unos pocos mililitros de agua elimina los azúcares, y la aglicona puede entonces ser eluido con metanol. Otro estudio indica que las agliconas se extraen de la solución de hidrólisis por fraccionamiento líquido-líquido utilizando éter dietílico, mientras que los azúcares liberados permanecen en la fase acuosa. <sup>(73)</sup>



**FLUJOGRAMA N° 03:** Purificación de las agliconas de flavonoides en microcolumna: fase estacionaria: Octadecil silano y fase móvil: Metanol asistida por bomba al vacío



**Fuente:** Elaboración propia a partir de: Marston A, Hostettmann K. 2006 <sup>(69)</sup>; waksmundzka Hajnos M, 2010 <sup>(66)</sup>



### 3.8. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTITUBERCULOSA DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS Y AGLICONAS DE FLAVONOIDES FRENTE A CEPAS DE: *Micobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv.

**PROTOCOLO EXPERIMENTAL:** Los extractos etanólicos y agliconas de flavonoides de ambas plantas, son preparadas en diferentes concentraciones, luego incorporados al medio Lowenstein Jensen para que solidifiquen juntas. Se realiza el sembrado de las diluciones bacilares ( $10^{-3}$ ,  $10^{-5}$  y  $10^{-6}$  mg/mL) de *Micobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv al medio Lowenstein Jensen respectivamente, se deja incubar por un periodo de 42 días antes de la lectura.

#### MATERIAL BIOLÓGICO:

Se utilizaron las cepas *Micobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv

#### FÁRMACO PATRÓN:

Para valorar la actividad antituberculosa de las diferentes concentraciones de los extractos frente a *Micobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv se utilizó el fármaco antituberculoso Rifampicina por ser el fármaco patrón utilizado en estudios previos de plantas medicinales, pudiendose utilizar también los otros fármacos antituberculosos.

#### PREPARACIÓN DEL PATRÓN:

Se disolvió en agua destilada la cantidad necesaria del fármaco Rifampicina para llegar a la concentración de 40.0 mcg/mL según el método.

#### 3.8.1. PROCEDIMIENTO:

##### 3.8.1.1. PREPARACIÓN DEL MEDIO LOWENSTEIN JENSEN.

COMPOSICIÓN	
Fosfato monopotásico	2.4 g
Sulfato de Magnesio	0.24 g
Citrato de Magnesio	0.6 g
L- Asparagina	3.6 g
Glicerina	12 mL
Agua destilada	c.s.p 600 mL
Huevo	1000 mL
Verde de Malaquita 2%	20 mL

### PREPARACIÓN DE SALES:

- Disolver las 3 primeras sales y la asparagina en 300 ml de agua destilada en un Erlenmeyer de 2000 mL, calentar en baño María hasta la disolución de la asparagina, completar a 600 mL con agua destilada, agregar 12 mL de glicerina.
- Esterilizar en baño María por 30 min o autoclavar a 121 °C por 15 min y dejar enfriar a temperatura ambiente. (Ver anexo N° 09 )

### PREPARACIÓN DEL MEDIO

- Lavar los huevos con agua y jabón, dejar secar y limpiar con algodón empapado en alcohol al 70%, dejar secar romper uno por uno los huevos en un vaso de precipitado y observar si se encuentran frescos, vaciar en un vaso de precipitado de 200 mL y homogenizar con una bagueta la clara y yema de huevo.
- Filtrar en un vaso de precipitado de 1000mL, utilizando gasa estéril de 4 capas
- Agregar la solución acuosa de verde de malaquita al 2% a la solución de sales
- Agregar la suspensión de huevos homogenizados y mezclar suavemente con movimientos circulares
- Dejar reposar el medio preparado por 30 minutos para que desaparezcan las burbujas, cubrir con una franela de color oscuro para proteger de la luz.

### DISPENSAR

- Distribuir 5 mL de medio a tubos de 20 x 125 mm tapa rosca evitando la formación de burbujas dispensando el medio por las paredes del tubo.
- Dispensar las concentraciones utilizadas de los extractos etanolicos y agliconas de flavonoides de las especies: Grindelia boliviana Rusby y Chenopodium incisum Poir en los tubos con el medio Lowenstein Jensen
- Colocar los tubos con el medio en el coagulador a 85°C por 45 minutos con las tapas ligeramente flojas, retirar los tubos y dejar enfriar al medio ambiente.
- Ajustar las tapas

**Nota:** el coagulador debe de haberse encendido previamente hasta lograr la temperatura de 85°C.

### CONTROL DE ESTERILIDAD:

- Colocar los medios en la estufa a 37 °C por 24 horas.
- Revisar los tubos para observar si existe contaminación.

### ALMACENAMIENTO:

- Conservar los medios en refrigeración a 4 °C, en una bolsa de plástico.
- Los medios pueden ser usados dentro del mes de su preparación.

### FUENTES:

- MINISTERIO DE SALUD. EL LABORATORIO DE SALUD PÚBLICA.
- Ganetti., Rist N. Y Groset J. Medida de Sensibilidad del Bacilo Tuberculoso a las Drogas Antibacilares por el Metodo de Proporciones.

### 3.8.1.2. DETERMINACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES ANTITUBERCULOSAS

Las concentraciones utilizadas para realizar la parte experimental fueron obtenidas de la parte preliminar realizada. **(Ver anexo N° 10)**

Se utilizó el extracto seco etanólico de las plantas preparándose 10 concentraciones, para los extractos etanólicos tomando en cuenta el procedimiento de la tesis Actividad Antituberculosa del Choquetacarpo y 5 concentraciones para las agliconas de flavonoides ya que se obtuvo en pequeñas cantidades, en Medio Lowenstein Jensen respectivamente: el Metodo de Canetti, Rist y Groset no establece la cantidad de tubos a usar.

#### a. PARA LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS:

Para la determinación de las concentraciones mínimas aplicables se realizó una prueba preliminar. Cuyas concentraciones se obtuvieron de la tesis “Estudio Comparativo In Vitro de la Actividad Antibacteriana de los Extractos Secos Hidroalcohólicos al 70 % de las hojas de *Psidium guajava* (Sahuinto) y *Chenopodium ambrosioides* (Paico) frente a Bacterias que causan infecciones de las vías Respiratorias y determinación de la Toxicidad Aguda en Animales de Experimentación”, Universidad De San Antonio Abad del Cusco. Facultad de Farmacia y Bioquímica. (2011). Donde EL Paico presento una CMI de 25 mg / pozo frente a *staphylococcus aureus*.

#### b. PARA LAS AGLICONAS DE FLAVONOIDES:

Para la determinación de las concentraciones mínimas aplicables, se realizó una prueba preliminar. Cuyas concentraciones se obtuvieron del Artículo: “Antimicrobial activity of flavonoids extracted from bergamot (*Citrus bergamia* Risso) peel, a byproduct of the essential oil industry” donde las Agliconas de flavonoides presentaron una CMI en un rango de 800 a 1000 ug/mL para bacterias Gram positivas.

**MUESTRA 01:** Extracto Etanólico de *Grindelia boliviana* Rusby ( Ch’iri ch’iri)

**Se utilizó el Extracto Seco Etanólico (EOH) preparándose 10 concentraciones en Medio Lowenstein Jensen.**

Se pesó 750 mg de EOH en 30 mL de medio Lowenstein Jensen	C <sub>1</sub> =25 mg/mL
Se pesó 780mg de EOH en 30mL de medio Lowenstein Jensen	C <sub>2</sub> =26mg/mL
Se pesó 810mg de EOH en 30mL de medio Lowenstein Jensen	C <sub>3</sub> =27mg/mL
Se pesó 840mg de EOH en 30mL de medio Lowenstein Jensen	C <sub>4</sub> =28mg/mL
Se pesó 870mg de EOH en 30mL de medio Lowenstein Jensen	C <sub>5</sub> =29mg/mL
Se pesó 900mg de EOH en 30mL de medio Lowenstein Jensen	C <sub>6</sub> =30mg/mL
Se pesó 930mg de EOH en 30mL de medio Lowenstein Jensen	C <sub>7</sub> =31mg/mL
Se pesó 960mg de EOH en 30mL de medio Lowenstein Jensen	C <sub>8</sub> =32mg/mL
Se pesó 990mg de EOH en 30mL de medio Lowenstein Jensen	C <sub>9</sub> =33mg/mL
Se pesó 1020 mg de EOH en 30 mL de medio Lowenstein Jensen	C <sub>10</sub> =34mg/mL

**MUESTRA 02:** Extracto Etanólico de *Chenopodium incisum* Poir (Arq'a Paiqo)

Se utilizó el Extracto Seco Etanólico (EOH) preparándose 10 concentraciones en Medio Lowenstein Jensen.

Se pesó 750 mg de EOH en 30 mL de medio Lowenstein Jensen	C <sub>1</sub> = 25mg/mL
Se pesó 780mg de EOH en 30 mL de medio Lowenstein Jensen	C <sub>2</sub> = 26mg/mL
Se pesó 810mg de EOH en 30mL de medio Lowenstein Jensen	C <sub>3</sub> = 27mg/mL
Se pesó 840mg de EOH en 30mL de medio Lowenstein Jensen	C <sub>4</sub> = 28mg/mL
Se pesó 870mg de EOH en 30mL de medio Lowenstein Jensen	C <sub>5</sub> = 29mg/mL
Se pesó 900mg de EOH en 30mL de medio Lowenstein Jensen	C <sub>6</sub> = 30mg/mL
Se pesó 930mg de EOH en 30mL de medio Lowenstein Jensen	C <sub>7</sub> = 31mg/mL
Se pesó 960mg de EOH en 30mL de medio Lowenstein Jensen	C <sub>8</sub> = 32mg/mL
Se pesó 990mg de EOH en 30mL de medio Lowenstein Jensen	C <sub>9</sub> = 33mg/mL
Se pesó 1020mg de EOH en 30 mL de medio Lowenstein Jensen	C <sub>10</sub> =34mg/mL

**MUESTRA 03:** Agliconas de flavonoides de *Grindelia boliviana* Rusby a (Ch'iri ch'riri)

Se utilizó las agliconas de flavonoides, (AF) preparándose 5 concentraciones en Medio Lowenstein Jensen.

Se pesó 21.6 mg de AF en 18 mL de medio Lowenstein Jensen	C <sub>1</sub> = 1.2mg/mL
Se pesó 36 mg de AF en 18 mL de medio Lowenstein Jensen	C <sub>2</sub> = 2 mg/mL
Se pesó 50.4 mg de AF en 18 mL de medio Lowenstein Jensen	C <sub>3</sub> = 2.8mg/mL
Se pesó 64.8 mg de AF en 18 mL de medio Lowenstein Jensen	C <sub>4</sub> = 3.6 mg/mL
Se pesó 79.2 mg de AF en 18 mL de medio Lowenstein Jensen	C <sub>5</sub> = 4.4mg/mL

**MUESTRA 04:** Extracto de agliconas de flavonoides de *Chenopodium incisum* Poir (Paiq'o)

Se utilizó Agliconas de flavonoides, (FAFT) preparándose 5 concentraciones en Medio Lowenstein Jensen.

Se pesó 21.6 mg de AF en 18 mL de medio Lowenstein Jensen	C <sub>1</sub> = 1.2 mg/mL
Se pesó 36 mg de AF en 18 mL de medio Lowenstein Jensen	C <sub>2</sub> = 2 mg/mL
Se pesó 50.4 mg de AF en 18 mL de medio Lowenstein Jensen	C <sub>3</sub> = 2.8 mg/mL
Se pesó 64.8 mg de AF en 18 mL de medio Lowenstein Jensen	C <sub>4</sub> = 3.6mg/mL
Se pesó 79.2 mg de AF en 18 mL de medio Lowenstein Jensen	C <sub>5</sub> = 4.4 mg/mL

Las concentraciones determinadas se usaron sobre cepas de *Micobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv. El procedimiento se realizó en una Cabina de Bioseguridad Tipo II

Las agliconas de flavonoides se obtuvieron en el laboratorio de cromatografía de la universidad nacional de San Antonio Abad del Cusco, y se traslado a la ciudad de Arequipa en cadena de frio y mantenidas en oscuridad para evitar transformaciones.<sup>(70)</sup>

**a) PREPARACIÓN DE LA SUSPENSIÓN BACILAR:**

1. Distribuir 3 mL de agua destilada estéril en tubos de prueba de 20 x 150 mm estéril, con tapón de algodón.
2. Extraer las colonias de la cepa en estudio con una espátula, cogiendo el mayor número posible.
3. Colocar las colonias en la pared interna del tubo, humedecer éstas con el agua. Triturar las colonias con ayuda de una bagueta esmerilada estéril, hasta lograr homogenizarlas.
4. Mezclar suavemente con la ayuda de la bagueta, hasta obtener una suspensión homogénea.
5. Dejar reposar la suspensión por unos minutos hasta sedimentar.
6. Tomar el sobrenadante y ajustar la turbidez de la suspensión (suspensión madre comparando con el patrón de turbidez Mc Farland que contiene 1mg/mL (Concentración aproximada de  $10^6$  a  $10^8$  UFC/mL) de masa bacilar, equivalente a unos 10 millones de bacilos viables.

**b) PREPARACIÓN DE DILUCIONES:**

1. Distribuir 9 mL de agua destilada estéril a cada uno de los 6 tubos (20x150 mm).
2. Previamente esterilizados y rotularlos del 1 al 6.
3. Preparar diluciones al décimo de 10 mg/mL a 10 mg/mL.
4. Con una pipeta aspirar 1 mL del sobrenadante de la suspensión madre agregar al tubo rotulado con  $10^{-1}$  mg/mL, cambiar de pipeta y mezclar bien para homogenizarlo.
5. Tomar 1 mL de la dilución 10 mg/mL y agregar al tubo rotulado con 10 mg/mL, y homogenizar bien. Continuar con las diluciones así sucesivamente hasta llegar al tubo rotulado con  $10^{-6}$  mg/mL.
6. Es importante cambiar de pipeta en cada dilución.
7. Las diluciones  $10^{-1}$  y  $10^{-2}$  se descartan por que contienen mucha carga bacteriana.
8. Por método separar los tubos  $10^{-3}$ mg/mL,  $10^{-5}$  mg/mL y  $10^{-6}$  mg/mL.

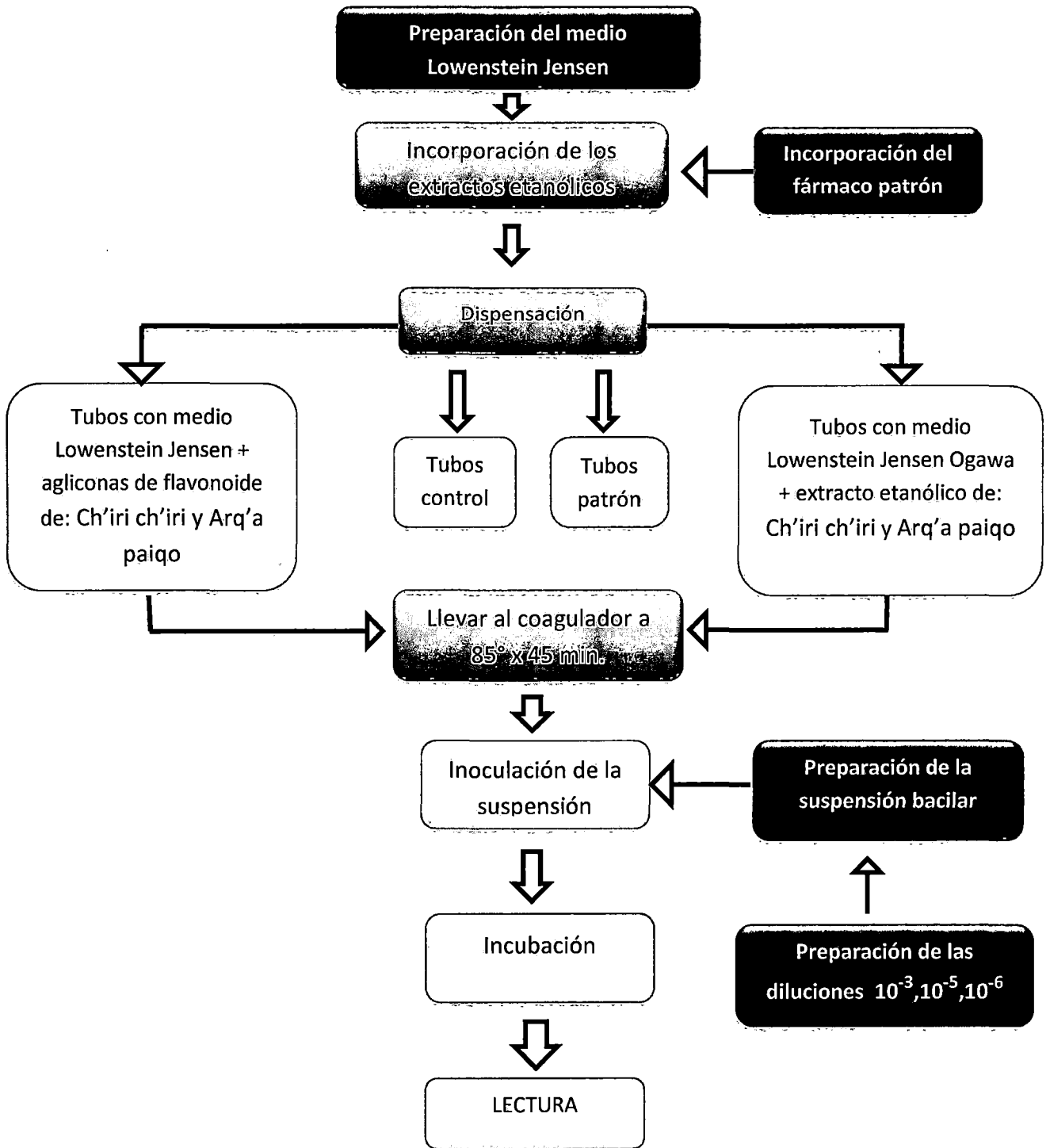
**c) SIEMBRA:**

1. Antes de la siembra verificar si los medios contienen líquido de condensación, el cual debe eliminarse.
2. Una vez sembradas los lotes, se toma cada tubo por sus extremos manteniéndolo en posición horizontal y haciéndolo rotar suavemente para que la suspensión sembrada se distribuya sobre toda la superficie del medio.
3. Los tubos se colocan en una bandeja de fondo inclinado para mantenerlos en posición horizontal. La bandeja se lleva a la incubadora a 37°C, cuidando que los tubos no roten, pues si esto sucede las colonias se desarrollarán en el borde del medio y no podrán ser contadas.
4. Los tubos que se utilizan para el medio de cultivo tienen tapa rosca, éstas deben mantenerse sueltas durante las primeras 48 horas o hasta que se evapore la parte líquida de la siembra, después de lo cual se ajustarán fuertemente.

**d) LECTURA:**

1. Se realizaron dos lecturas para las cepas: 1ra. lectura a las 4 semanas (28 días) 2da. lectura a las 6 semanas (42 días) y esta última lectura es la que se reporta como resultado final. (Anexo N° 13).
2. Se contaron cuidadosamente las colonias desarrolladas en los tubos controles, luego se cuentan las colonias desarrolladas en cada uno de los tubos con los extractos.

**FLUGOGRAMA N° 04: DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTITUBERCULOSA DE LOS EXTRACTOS**



Fuente: Elaboración propia apartir de: Canetti G, Rist N y Grosset. 1963<sup>(60)</sup>.

### 3.9. TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS

#### Técnicas para la recolección de datos

- Observación laboratorial para obtener las lecturas del crecimiento micobacteriano.

#### Instrumentos para la recolección de datos

- Ficha para la recolección de datos de las pruebas de solubilidad, porcentaje de rendimiento y análisis fitoquímico. (Anexo 05)
- Ficha o formato estructurado para la presentación de resultados del crecimiento micobacteriano (Anexo N° 06)
- HPLC para la identificación de las agliconas de flavonoides.

### 3.10. TÉCNICAS PARA EL ANÁLISIS Y PROCESAMIENTO DE DATOS

Para el análisis estadístico de los datos en la determinación de la “Actividad antituberculosa in vitro de los extractos etanólicos de las agliconas de flavonoides de las especies: *Grindelia boliviana* Rusby (Ch’iri ch’iri) y *Chenopodium incisum* Poir (Arq’a paiqo) sobre cepas de *Micobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv” se usó el paquete estadístico Statistical Package for Social Sciences (SPSS) ver. 22, en el cual se realizó la distribución ordenada de los datos para procesar información sin errores. Para la obtención de las gráficas se usó el software Microsoft Excel 2013.



## CAPÍTULO IV

## ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

## 4.1 DE LA DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE HUMEDAD

CUADRO N° 04: resultados del porcentaje de humedad de las especies en estudio

ESPECIE EN ESTUDIO	<i>Grindelia boliviana</i> Rusby (Ch'iri Ch'iri)			<i>Chenopodium incisum</i> Poir (Arq'a paiqo)		
	1	2	3	1	2	3
N° de determinaciones	1	2	3	1	2	3
Peso de muestra fresca (g)	30	30	30	30	30	30
Peso de muestra seca (g)	8.1401	8.1298	8.1405	6.5986	6.6904	6.5488
Porcentaje de humedad (%H)	72.87%	72.90%	72.87%	78.00%	77.70%	78.17%
<b>Porcentaje promedio de humedad</b>	<b>72,88%</b>			<b>77.95%</b>		

Fuente: Datos experimentales

## ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN

El porcentaje de humedad de las drogas vegetales frescas varía entre el 60% y el 80 %. <sup>(74)</sup> según el cuadro N°04, las especies en estudio (*Grindelia boliviana* Rusby y *Chenopodium incisum* Poir) presentan un porcentaje de humedad que está dentro de este.

El porcentaje de humedad es un parámetro indicador de que las especies en mención presentan una cantidad relativa de agua, sustancia que participa en los procesos de degradación de los metabolitos, con acción de enzimas, como las B- glucosidasas endógenas de la planta que intervienen en los procesos de hidrólisis, de las formas glicosiladas, acetil glicosiladas y malonil glicosiladas a sus formas agliconas (Kao et al., 2004)<sup>(75)</sup> lo que favorece los procesos bioquímicos del sistema, lo que a su vez en muchas oportunidades perjudica el análisis de los metabolitos secundarios, por ello es necesario retirar el agua, para así detener el proceso y obtener mejores resultados.

El promedio del porcentaje de humedad de la parte aérea de *Grindelia boliviana* Rusby (Ch'iri ch'iri) fue de 72.88% y para la parte aérea *Chenopodium incisum* Poir (Arq'a paiqo) fue de 77.95 %. Observándose que las partes aéreas del Arq'a paiqo presentaron un mayor porcentaje de humedad frente a las partes aéreas del Ch'iri ch'iri, en ambos casos este porcentaje es alto por lo que hace propensas a las muestras a un mayor riesgo de contaminación bacteriana. Esta determinación permite tomar las precauciones necesarias de acondicionamiento y elección del medio para el proceso de secado a la sombra y buena ventilación.

#### 4.2. DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE RENDIMIENTO.

**CUADRO N° 05:** Resultados de porcentajes de rendimientos de los extractos secos de las especies *grindelia boliviana* rusby y *chenopodium incisum* poir.

ESPECIE EN ESTUDIO	<i>Grindelia boliviana</i> Rusby (Ch'iri ch'iri)			<i>Chenopodium incisum</i> Poir (Arq'a paiqo)		
	1	2	3	1	2	3
N° de determinaciones						
Peso de muestra molida (g)	10	10	10	10	10	10
Peso del extracto seco (g)	1.6344	1.6291	1.6012	1.4034	1.3989	1.4125
Porcentaje de rendimiento (% R)	16.344	16.291	16.012	14.034	13.989	14.125
<b>Porcentaje promedio de rendimiento</b>	16.216%			14.049%		

Fuente: Datos experimentales

#### ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN

Al determinar los porcentajes de rendimiento de los extractos etanólicos de: *Grindelia boliviana* Rusby y *Chenopodium incisum* Poir, se obtuvieron: 16.216% y 14.049% respectivamente, observando que el extracto etanólico del *Grindelia boliviana* Rusby presenta un porcentaje de rendimiento ligeramente mayor frente al extracto etanólico de *Chenopodium incisum* Poir

#### 4.3. PRUEBAS DE SOLUBILIDAD

**CUADRO N° 06:** Pruebas de solubilidad de los extractos etanólicos de *grindelia boliviana* rusby y *chenopodium incisum* poir.

SOLVENTE	EXTRACTO SECO	
	<i>Grindelia boliviana</i> Rusby	<i>Chenopodium incisum</i> Poir
Hexano	-	-
Bencina	-	-
Cloroformo	-	-
Éter	-	-
Acetato de etilo	-	-
Acetona	-	-
Butanol	-	-
Etanol 96°	+++	+++
Etanol 70°	++++	++++
Metanol	+-	+-
Solución salina fisiológica	+	+
Agua	+++	++++

Leyenda:

- ++++ = totalmente soluble
- +++ = parcialmente soluble
- +- = muy poco soluble
- = insoluble

Fuente: keesse R. 1990.

## ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN

Como se observa en el cuadro N° 06, los resultados para la especie *Grindelia boliviana* Rusby (Ch'iri ch'iri) el extracto es totalmente soluble en agua y en solventes polares como metanol, etanol de 70 ° y 96° e insoluble en solventes apolares como acetona, acetato de etilo, éter, cloroformo, bencina y hexano.

Para la especie de *Chenopodium insisum* (Arq'a paiqo) el extracto resulto ser muy soluble en agua y solventes polares como etanol, y parcialmente soluble en metanol siendo insoluble en los compuestos apolares como acetona, acetato de etilo, éter, cloroformo bencina y hexano. Oviedo Licon A y Aiquipa Huaman K, realizaron un estudio en la especie de *Chenopodium ambrosioides* donde reportan que esta especie es muy soluble en agua, etanol y metanol, ligeramente soluble en acetona, éter, cloroformo, hexano y bencina esta diferencia podría deberse a que se trata de otra especie y el lugar de recolección de la muestra.

Los resultados de la prueba de solubilidad de los extractos etanólicos al 70% de *Grindelia boliviana* Rusby y *Chenopodium incisum* Poir comprobaron la naturaleza polar de los componentes presentes en el extracto, siendo la solubilidad del extracto superior en agua y etanol, y por el contrario mínima en solventes apolares.

## 4.4 ANÁLISIS FITOQUÍMICO

**CUADRO N° 07:** Resultados del análisis fitoquímico cualitativo de *Grindelia boliviana* Rusby y *Chenopodium incisum* Poir

METABOLITOS SECUNDARIOS	REACTIVO	RESULTADOS	
		<i>Grindelia boliviana</i> Rusby	<i>Chenopodium incisum</i> Poir
Alcaloides	Draguendorf	-	+
	Mayer	-	-
	Reactivo de platino	-	-
Azúcares reductores	Benedict	++	++
Compuestos fenólicos	Cloruro férrico 1%	+++	+++
Flavonoides	Reacción de Shinoda	+++	+++
Lactonas	Reactivo de Baljet	-	-
Quinonas	Ácido sulfúrico concentrado	-	-
Taninos	Gelatina-sal	-	-
Saponinas	Prueba de la espuma	-	+

**FUENTE:** Elaboracion propia de los datos experimentales

### Leyenda:

+++ = Abundante cantidad

++ = Moderada cantidad

+ = Escasa cantidad

- = Negativo

**Fuente:** Keesse R .1990. <sup>(68)</sup>

## ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN.

En el análisis fitoquímico para la determinación de los metabolitos secundarios se utilizaron diferentes reactivos. La detección de metabolitos secundarios se realizó mediante reactivos de identificación específicos para cada familia de compuestos, los resultados se observaron mediante las reacciones de coloración o precipitación dando como resultado:

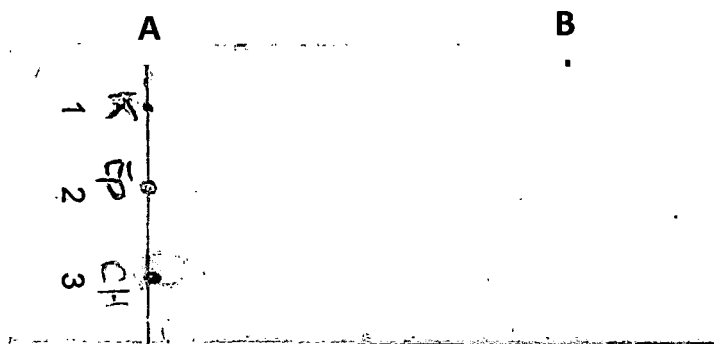
Para el caso de *Grindelia boliviana* Rusby (ch'iri ch'iri) se determinó la presencia en abundante cantidad compuestos fenólicos, flavonoides y en moderada cantidad azúcares reductores, no presentan alcaloides, taninos, saponinas, quinonas y lactonas. A la presencia de flavonoides y compuestos fenólicos se le atribuye la actividad antimicobacteriana. Los hallazgos en la marcha fitoquímica preliminar son concordantes con los reportados por Arcos Reyes Delia <sup>(75)</sup> donde menciona que la planta completa de *Grindelia boliviana* Rusby (Ch'iri ch'iri) presenta: fenoles, flavonoides, taninos, aminoácidos, cardenólidos y alcaloides. Los resultados difieren debido a que en este caso se trabajo con la planta completa y puede variar por el lugar de recolección de la muestra. <sup>(76)</sup>

Para el caso de *chenopodium incisum* (Arq'a paiqo), se determinó la presencia en abundante cantidad de compuestos fenólicos y flavonoides, moderada cantidad de azúcares reductores y escasa cantidad de saponinas, no presentan lactonas, quinonas taninos y alcaloides. Oviedo Licon Y, Aiquipa Huaman K Mencionan que *Chenopodium ambrosioides* (Paico) presenta una mezcla de varios componentes tales como: compuestos fenólicos, flavonoides, alcaloides, quinonas y taninos, los resultados obtenidos son parecidos, presentando diferencia debido a que se trata de otra especie y el lugar de recolección de la muestra. <sup>(25)</sup>

Por otro lado la química del *chenopodium incisum* ha sido poco estudiada y de hecho solo existe un trabajo realizado por investigadores mexicanos, en el se describe la presencia en las partes aéreas de, sesquiterpeno, criptomeridiol, su dervado alfa - acetoxilado y el hidroxí – elenol; los flavonoides crisina, pinosembrina y pinostrobina; los esteroides daucosterol, estigmasterol y elestigmas y el monoterpeno acetato de geraniol. <sup>(77)</sup>

#### 4.5. DE LA CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA

**FOTOGRAFÍA N° 03:** Cromatografía en capa fina de las agliconas de flavonoides de *Grindelia boliviana* Rusby (*Ch'iri ch'iri*) y *Chenopodium incisum* Poir (*Arq'a paiqo*) comparados con el estándar de kaempferol.



Cromatoplaqa previa exposición a vapores de (cloroformo 60% y acetato de etilo 40%) y revelado con: 2-aminoetil difenilborato NP

**A:** lugar de siembra de la fracción de agliconas de flavonoides

1 muestra del patrón kaempferol

2 muestra de aglicona de flavonoides de *Arq'a paiqo*

3 muestra de aglicona de flavonoide de *Ch'iri ch'iri*.

**B:** lugar de lectura de los flavonoides

RF (1 Y 2) = 0.75

RF (3) = 0.78

**ANÁLISIS Y DISCUSIÓN:** En la fotografía N° 03 se aprecia los resultados del análisis cualitativo por TLC de las agliconas de flavonoides de *Grindelia boliviana* Rusby y *Chenopodium incisum* Poir, donde se evidencia la migración del patrón y las muestras obtenidas, además se puede visualizar las manchas amarillas que son indicativas de la presencia de flavonoides. En la cromatoplaqa se aprecia la presencia de aglicona de flavonoide del *Arq'a paiqo*  $R_f = 0.75$ ; el cual es comparable con el valor del estándar kaempferol  $R_f = 0.75$ , para el caso del *Ch'iri ch'iri* se observa también una mancha amarilla tenue con  $R_f = 0.78$  que corresponderían a agliconas de flavonoides.<sup>(45)</sup>

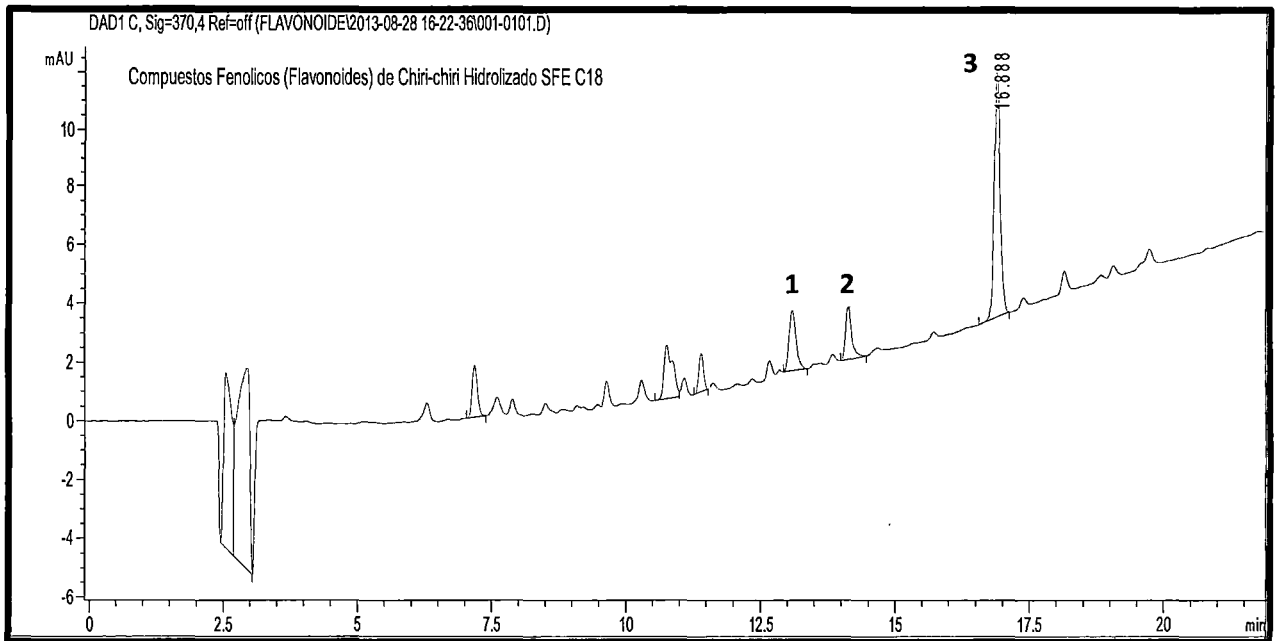
#### 4.6. DE LA CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN HPLC

**ANÁLISIS DE AGLICONAS DE FLAVONOIDES:** El análisis se realizó utilizando un cromatógrafo líquido de alta resolución, "Agilent Technologies 1200 series", sistema de HPLC equipado con un muestreador automático y de diodos, detector (DAD). Las separaciones se realizaron en una columna Zorbax SB-C18 (250 mm x 4,6 mm ID, 5 micras). La temperatura se ajustó a 40°C. La fase móvil consistió en un solvente A

constituido por agua con ácido fórmico al 0.1%, la fase móvil B compuesta por acetonitrilo con ácido fórmico al 0.1 %.

El gradiente comienza con 10% de solvente B en 0 min hasta 30 min 100% del solvente B a un flujo de 1 mL/min.

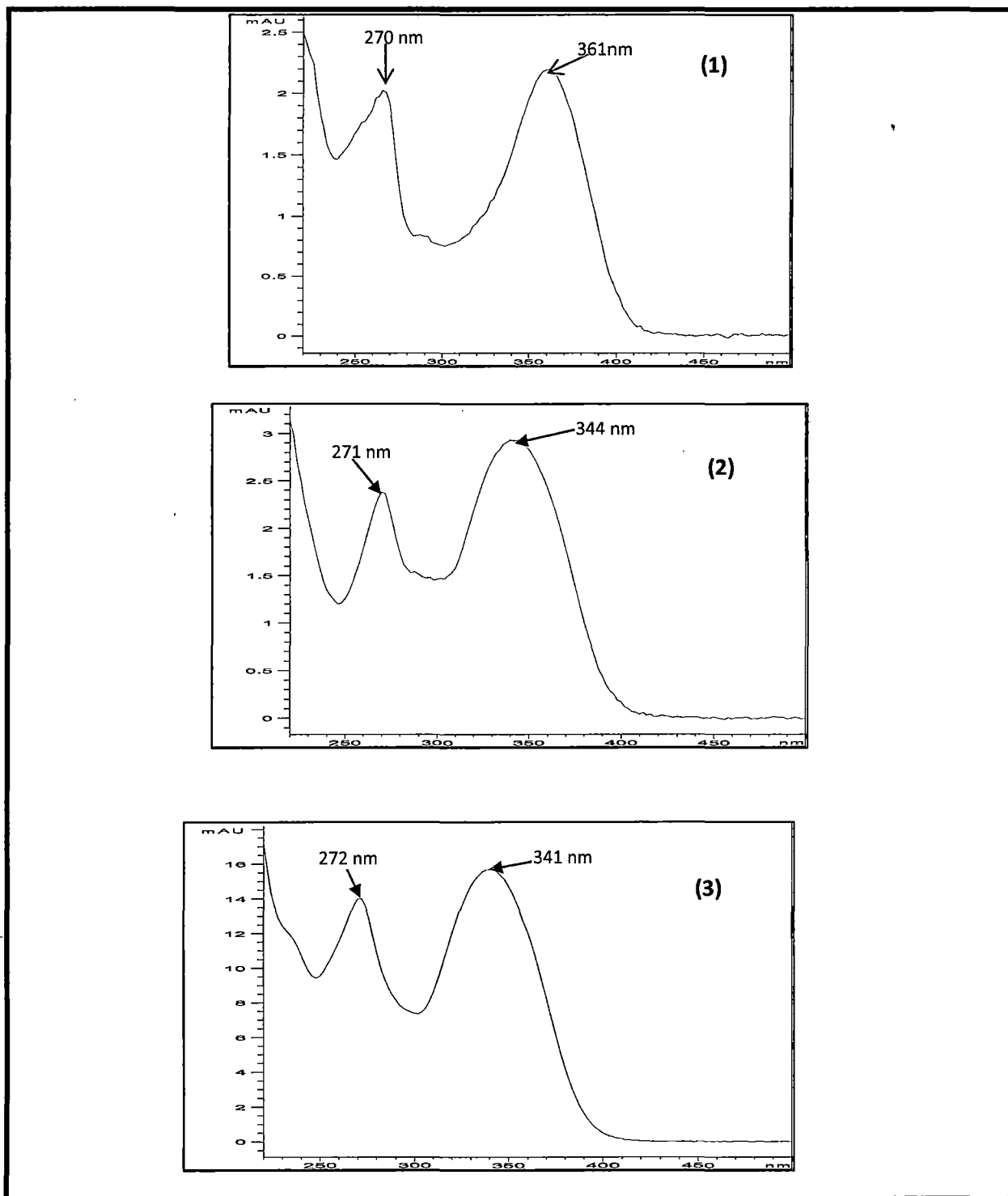
#### 4.6.1. Cromatografía líquida de alta resolución HPLC del Ch'iri ch'iri.



**FIGURA N° 07:** Cromatograma de agliconas de flavonoides de *Grindelia boliviana* Rusby (Ch'iri-ch'iri): **(1)** Tr =13.090min; **(2)** Tr = 14.129min; **(3)** Tr = 16.888min.

Leyenda:

Tr = tiempo de retención



**FIGURA N° 08: ESPECTROS UV – Vis DE LAS AGLICONAS DE FLAVONOIDES DE *Grindelia boliviana* Rusby (ch'iri ch'iri)**

Donde: **(1):  $\lambda_{max}$  = 361 nm; (2):  $\lambda_{max}$  = 344 nm; (3):  $\lambda = 341$ nm**

Fuente: datos experimentales

Legenda:  $\lambda_{max}$  = longitud de onda máximo, % = porcentaje

## ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

**En la figura N° 08:** Se observa el cromatograma obtenido por HPLC de: *Grindelia boliviana* (Ch'iri ch'iri) el análisis reveló 3 picos claramente diferenciados, que corresponderían a las agliconas de flavonoides, donde el componente más polar es el primero que eluye, sus tiempos de retención, indican la posición de cada molécula según su polaridad. <sup>(44, 78)</sup>

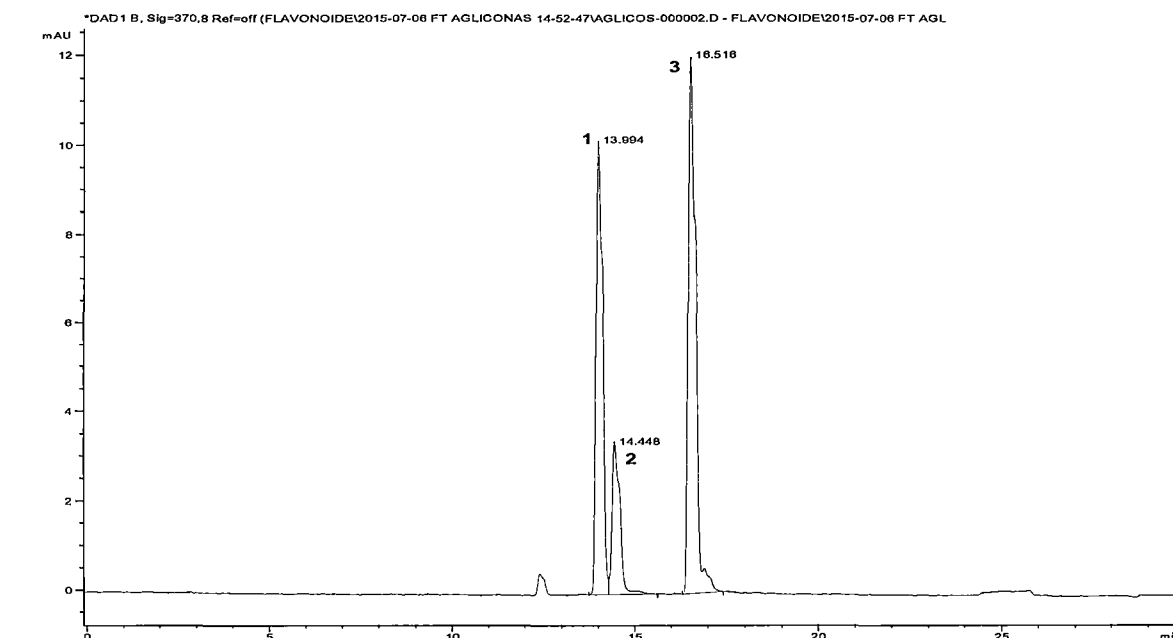
**En la figura N° 09:** Observamos los espectros UV-Vis que corresponde a lo obtenido al realizar la caracterización por HPLC, en dicho espectro se observa la presencia de 3 picos de fuerte absorción, guardando correlación con el tipo de espectro esperado para los flavonoides, ubicadas a longitudes de onda en 361 nm, 344nm y 341nm, para las bandas 1, 2 y 3 respectivamente. Comportamiento que se asemeja a las aproximaciones experimentales determinadas por Mabry et al 1999 <sup>(72)</sup> para los flavonoles cuya ubicación en las bandas corresponde generalmente en 240- 280 nm para la banda 2 y 300- 380 nm para la banda 1. <sup>(72)</sup>

No se encontraron reportes bibliográficos acerca del contenido de agliconas de flavonoides en la especie *Grindelia boliviana* Rusby. Sin embargo Ferreressa F. et. al. <sup>(20)</sup> 2014, reportan un estudio del extracto hidrometanólico obtenido de *Grindelia robusta* Nutt, que fué estudiado por HPLC-DAD-ESI / MSN, donde se detectaron treinta y seis flavonoides y ácidos hidroxicinámicos, a partir de los cuales se describen treinta por primera vez en esta especie. La Cuantificación por HPLC-DAD mostró que diosmetina-7-O-glucurónido-3'-O-pentoside + apigenina-7-O-glucurónido-4 'O-pentoside, apigenina-7-O-glucurónido + diosmetina-7-O ácido glucurónido y 3,5-dicafeoilquínico ácido + 3,4-dicafeoilquínico fueron los principales compuestos. <sup>(20)</sup>

Por lo que los resultados presentados, serán de mucha utilidad como fuente de consulta para estudios futuros de la misma especie.

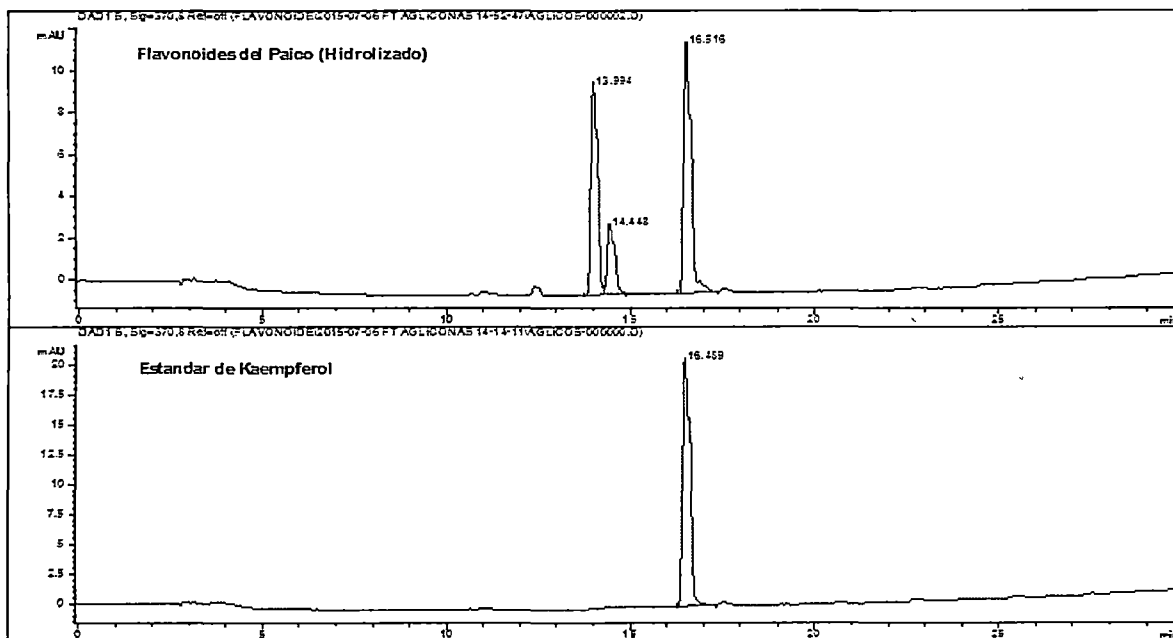


#### 4.6.2. Cromatografía líquida de alta resolución HPLC del *Chenopodium incisum* Poir (Arq'a paiqo)

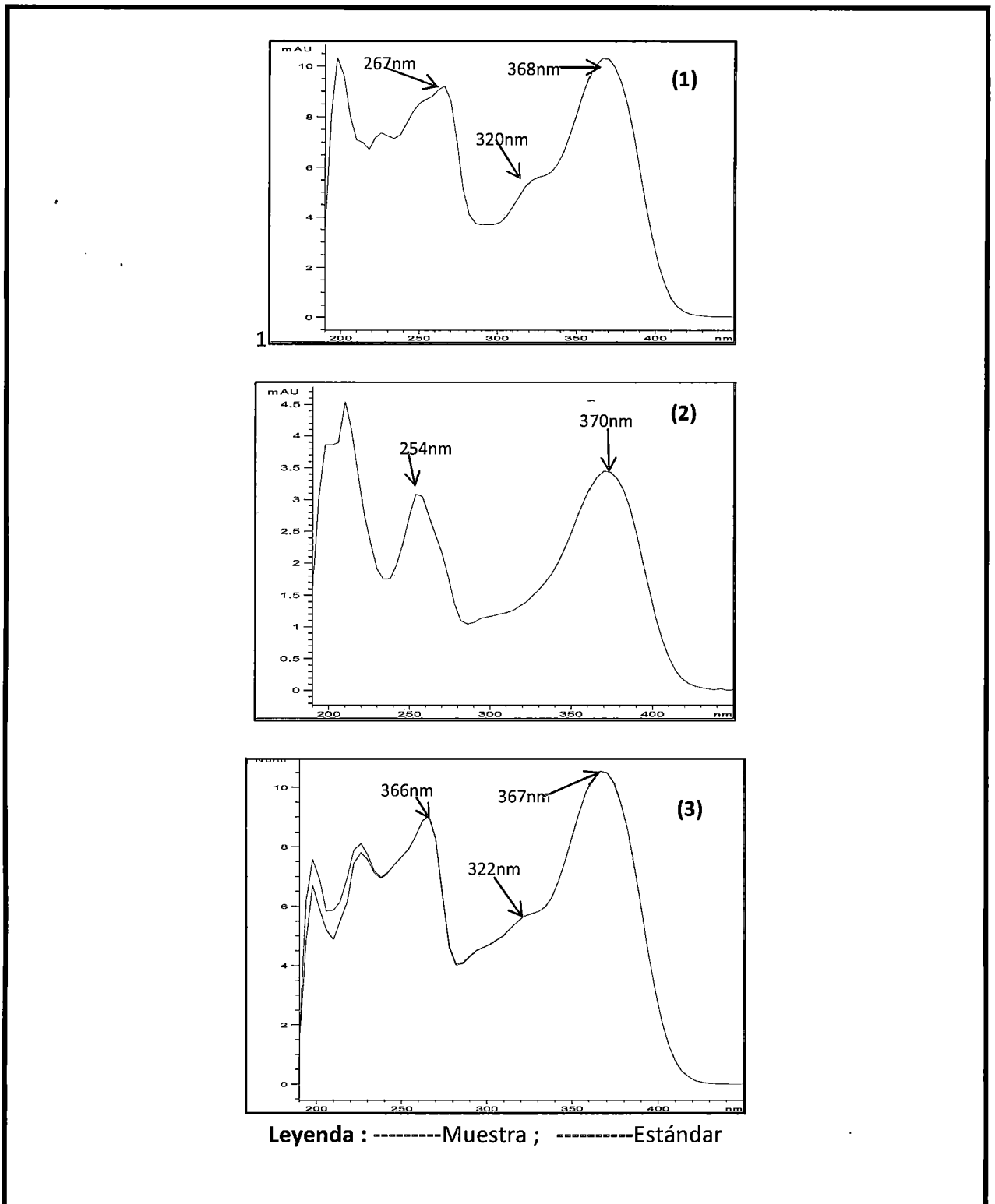


**FIGURA N° 9:** Cromatograma de agliconas de flavonoides de *Chenopodium incisum* Poir (Arq'a paiqo):

donde: (Tr **(1)**) = 13.994 min; Tr **(2)**) = 14.448 min; Tr **(3)**) = 16.516 min



**FIGURA N° 10:** Comparación de los perfiles cromatográficos y tiempos de retención del pico 3 de la aglicona de flavonoide obtenida de la especie *chenopodium incisum* (Tr = 16.516 min) con el estándar de kaempferol (Tr = 16.489 min)



**FIGURA N° 11:** Espectros UV - Vis de los picos de las agliconas de flavonoides de *Chenopodium incisum* Poir (1):  $\lambda_{max} = 368\text{nm}$ ; (2):  $\lambda_{max} = 370\text{nm}$ ; (3): comparación del espectro UV - vis de la muestra con el estándar de kaempferol:  $\lambda_{max} = 367\text{nm}$ . Fuente: datos experimentales.

## ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

**En la figura N° 10:** El análisis cromatográfico por HPLC de *Chenopodium incisum* Poir (Arq'a paiqo) mostró 3 picos claramente diferenciados que corresponderían a las agliconas de flavonoides donde el componente más polar es el primero que eluye. <sup>(78)</sup> El pico de interés fue el tercero correspondiendo a la aglicona kaempferol con un tiempo de retención de 16.516 min. Algo muy importante es la aparición de dos picos que no corresponden al estándar kaempferol; uno encontrado a un tiempo de retención de 13.994 min y el segundo 14.448 min los cuales corresponden a otras agliconas de flavonoides no identificadas.

**En la figura N° 11:** Se observan los cromatogramas de la muestra y el estándar de kaempferol que fueron obtenidos bajo exactamente las mismas condiciones de temperatura, gradiente y flujo. Mediante la comparación de los tiempos de retención obtenidos de la muestra  $T_r = 16.516$  con la del estándar se logró confirmar la presencia de la aglicona de kaempferol  $T_r = 16.489$  min.

**En la figura N° 12:** Observamos los espectros UV-Vis correspondientes a las agliconas de flavonoides de las cuales (1) y (2) no fueron identificadas presentando longitudes de onda máxima en 368nm y 370nm respectivamente, comportamiento que se asemeja a las aproximaciones experimentales determinadas por T.J. Mabry et al, 1970 <sup>(72)</sup> para los flavonoles cuya ubicación de las bandas corresponde generalmente en 240- 280 nm para la banda 2 y 300- 380 nm para la banda 1. <sup>(72)</sup>

**En la figura 12 (3):** Se efectúa la comparación mediante una superposición de los dos perfiles UV-vis obtenidos, estándar y muestra de aglicona, donde ambos espectros muestran longitudes de onda en 367, 322 y 366 nm. T.J Mabry et al, 1970. <sup>(72)</sup> menciona que la aglicona de flavonoide kaempferol muestra una longitud de onda en 367 nm, lo cual indica la presencia de la aglicona kaempferol en la especie *Chenopodium incisum*.

La química de *Chenopodium incisum* ha sido poco estudiada, existe un trabajo realizado por investigadores mexicanos, en el se describe en las partes aéreas, la presencia de los flavonoides crisina, pinosembrina y pinostrobina. <sup>(77)</sup> los que podrían corresponder a los picos no identificados. Camacho C, Gonzales S. et al, 2007. <sup>(31)</sup> Aislaron 29 compuestos de plantas medicinales y se evaluaron contra *Micobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv, dentro de los resultados se demostró que la flavanona pinostrobina presentó una CMI de 12.5 ug/ml. <sup>(31)</sup>

Por otro lado doce compuestos fueron aislados de la especie *Chenopodium ambrosioides*, y sus estructuras fueron identificados por métodos espectroscópicos como kaempferol-7-O-alfa-L-ramnopiranosido (1), kaempferol-3,7-di-O-alfa-L-ramnopiranosido (2), patuletin (3), quercetina-7-O-alfa-L-ramnopiranosido (4), cetona saltamontes (5), 2-ciclohexen-4-hidroxi-4-metil-1-ona (6), syringaresinol (7), bencilo beta-D-glucopiranosido (8),

dendranthemoside B (9), N-trans-feruloyl tiramina (10), N-trans-feruloyl de 4'-O-metildopamina (11), y 4-hidroxi-N- [2- (4-hidroxifenil) etil] benzamida (12).<sup>(19)</sup>

#### 4.7. DE LA ACTIVIDAD ANTITUBERCULOSA SOBRE *Micobacterium tuberculosis*

##### 4.7.1. CONTEO DEL NÚMERO DE COLONIAS EN LAS DIFERENTES CONCENTRACIONES DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE *Grindelia boliviana* Rusby (CH'IRI CH'IRI) SOBRE CEPAS DE *Micobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv.

**TABLA N° 01: LOTE 1 LECTURA DEL N° DE COLONIAS A LOS 42 DIAS DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE CH'ICHI –CH'IRI**

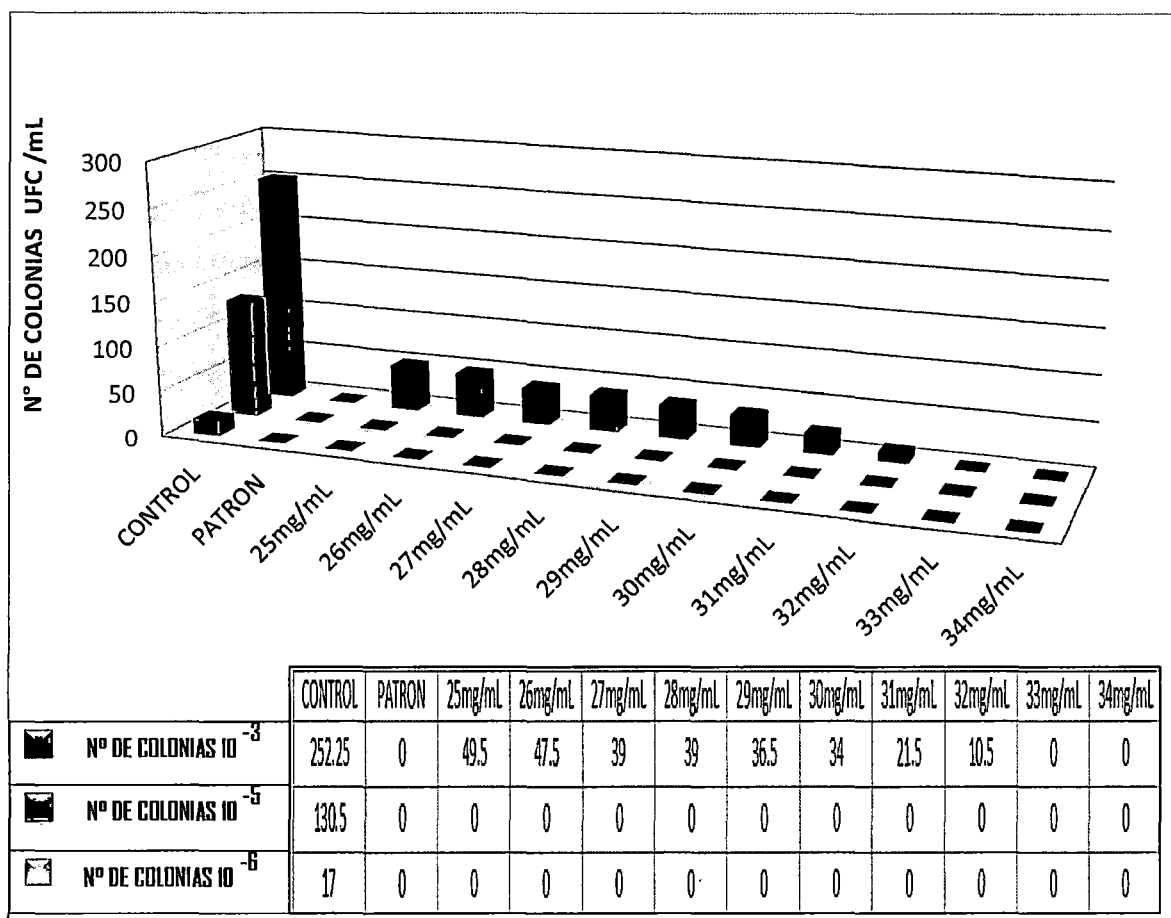
DILUCIONES	CONTROL		PATRON	CONCENTRACIONES (mg/mL)									
	C1	C2	P	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10
				25	26	27	28	29	30	31	32	33	34
10 <sup>-3</sup> mg/mL	239	251	0	50	45	37	39	37	35	24	11	0	0
10 <sup>-5</sup> mg/mL	128	146	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10 <sup>-6</sup> mg/mL	20	17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

**TABLA N° 02: LOTE 2 LECTURA DEL N° DE COLONIAS A LOS 42 DIAS DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE CH'ICHI –CH'IRI**

DILUCIONES	CONTROL		PATRON	CONCENTRACIONES (mg/mL)									
	C1	C2	P	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10
				25	26	27	28	29	30	31	32	33	34
10 <sup>-3</sup> mg/mL	277	242	0	49	50	41	39	36	33	19	10	0	0
10 <sup>-5</sup> mg/mL	118	130	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10 <sup>-6</sup> mg/mL	16	15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

**Leyenda:**

- C1:** Control 1 formado por 3 tubos de ensayo con la cepa de *Micobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv. En medio Lowenstein Jensen
- C2:** Control 2 formado por 3 tubos de ensayo con la cepa de *Micobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv. En medio Lowenstein Jensen
- P:** Patrón formado por un tubo de ensayo con la cepa de *Micobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv en medio Lowenstein Jensen más el fármaco Rifampicina.



**GRÁFICO N° 01:** ACTIVIDAD ANTITUBERCULOSA DE LAS DIFERENTES CONCENTRACIONES DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE *Grindelia boliviana* Rusby (CH'IRI CH'IRI) SOBRE *Micobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv.

**ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN.**

Las tablas N° 01, N° 02 y el gráfico N° 01, representan los resultados obtenidos de la actividad antituberculosa del extracto etanólico de *Grindelia boliviana* Rusby (Ch'iri ch'iri) frente a *Micobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv, demostrándose así la inhibición del crecimiento de colonias micobacterianas en casi todas las concentraciones empleadas.

Cabe destacar que a partir de la concentración de 33 mg/mL de la dilución de  $10^{-3}$  mg/mL existe una total inhibición del crecimiento bacteriano, por lo que podríamos denominarle a esta concentración como la concentración mínima inhibitoria (CMI).

Adicionalmente se ha observado que en poblaciones menos densas ( $10^{-5}$ mg/mL y  $10^{-6}$  mg/mL) la actividad antituberculosa de las diferentes concentraciones presenta una total inhibición de las colonias micobacterianas, lo cual es corroborado con el patrón rifampicina (sigma).

**4.7.1.1. ANÁLISIS ESTADÍSTICO:**

**ANÁLISIS DE VARIANZA UNIFACTORIAL (ANOVA) DE LA ACTIVIDAD ANTITUBERCULOSA DE LAS DIFERENTES CONCENTRACIONES DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE *Grindelia boliviana* Rusby (CH'IRI CH'IRI) SOBRE *Micobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>RV.**

**TABLA N° 03: ANÁLISIS DE VARIANZA PARA LA DILUCIÓN 10<sup>-3</sup> DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE CH'IRI-CH'IRI**

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	182190,385	12	15182,532	247,025	,000
Dentro de grupos	799,000	13	61,462		
Total	182989,385	25			

**LEYENDA:**

GL = Grados de libertad

F = Distribución Fisher

Sig = Significancia

Sig > 0.05 no existe diferencia significativa entre las concentraciones empleadas en el estudio realizado

Sig ≤ 0.05 existe diferencia significativa entre las concentraciones empleadas en el estudio realizado.

**TABLA N° 04: ANÁLISIS DE VARIANZA PARA LA DILUCIÓN 10<sup>-5</sup> DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE CH'IRI-CH'IRI**

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	57865,846	12	4822,154	352,180	,000
Dentro de grupos	178,000	13	13,692		
Total	58043,846	25			

**LEYENDA:**

GL = Grados de libertad

F = Distribución Fisher

Sig = Significancia

Sig > 0.05 no existe diferencia significativa entre las concentraciones empleadas en el estudio realizado

Sig ≤ 0.05 existe diferencia significativa entre las concentraciones empleadas en el estudio realizado.

**TABLA N° 05: ANÁLISIS DE VARIANZA PARA LA DILUCIÓN 10<sup>-6</sup> DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE CH'IRI-CH'IRI**

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	982,154	12	81,846	106,400	,000
Dentro de grupos	10,000	13	,769		
Total	992,154	25			

**LEYENDA:**

GL = Grados de libertad

F = Distribucion Fisher

Sig = Significancia

Sig > 0.05 no existe diferencia significativa entre las concentraciones empleadas en el estudio realizado

Sig ≤ 0.05 existe diferencia significativa entre las concentraciones empleadas en el estudio realizado.

**ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN.**

En el análisis de varianza (ANOVA) de las Tablas N° 03, 04, y 05 se observa que para todas las diluciones evaluadas el valor de significancia está por debajo de 0.05 por lo que se afirma que existen diferencias significativas de la inhibición del crecimiento de *Micobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv, sometida a cada una de las concentraciones empleadas.

Además como el análisis de varianza (ANOVA) dio diferencias significativas, para saber cuál de las concentraciones obtendrá la mejor actividad antituberculosa se realizó la prueba de Tukey.

**TABLA N° 06: COMPARACIONES MÚLTIPLES DE TUKEY DEL PROMEDIO DE LA ACTIVIDAD ANTITUBERCULOSA DE LAS DIFERENTES CONCENTRACIONES DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE *Grindelia boliviana* Rusby (CH'IRI CH'IRI) SOBRE *Micobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv**

MUESTRA	N	SUBCONJUNTO PARA ALFA= 0.05									
		DILUCIÓN 10 <sup>-3</sup> MG/ML				DILUCIÓN 10 <sup>-5</sup> MG/ML			DILUCIÓN 10 <sup>-6</sup> MG/ML		
		1	2	3	4	1	2	3	1	2	
PATRON	2	,0000				,0000				,0000	
33 mg/ml	2	,0000				,0000				,0000	
34 mg/ml	2	,0000				,0000				,0000	
32 mg/ml	2	10,5000				,0000				,0000	
31 mg/ml	2	21,5000				,0000				,0000	
30 mg/ml	2		34,0000			,0000				,0000	
29 mg/ml	2		36,5000			,0000				,0000	
27 mg/ml	2		39,0000			,0000				,0000	
28 mg/ml	2		39,0000			,0000				,0000	
26 mg/ml	2			47,5000		,0000				,0000	
25 mg/ml	2			49,5000		,0000				,0000	
Control 2	2				246,5000		123,0000				16,0000
Control 1	2				258,0000			138,0000			18,0000
	Sig.	,327	,087	,096	,941	1,000	1,000	1,000	1,000		,561

Se muestra las medias para los grupos en subconjuntos homogéneos.  
a. Usa el tamaño muestral de la media armonica = 2,000

**ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN**

Según la tabla N°06 se puede apreciar que se obtuvieron 9 subgrupos (4 para la dilución 10<sup>-3</sup>, 3 para la dilución 10<sup>-5</sup> y 2 para la dilución 10<sup>-6</sup>) al comparar las medias de los promedios del número de colonias contabilizadas en las diferentes concentraciones de las diluciones 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-5</sup> y 10<sup>-6</sup>.

En el análisis de comparaciones múltiples existen diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones de los extractos etanólicos de *Grindelia boliviana* Rusby (Ch'iri ch'iri) empleadas frente a las diluciones ( $10^{-3}$  mg/mL,  $10^{-5}$  mg/mL y  $10^{-6}$  mg/mL) de *Micobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv. El subgrupo ideal para la dilución  $10^{-3}$  mg/mL es el N° 1, que considera las concentraciones de 33mg/mL y 34mg/mL que se asemejan a la inhibición del crecimiento de colonias micobacterianas efectuadas por el patrón empleado, lo que significa que cualquiera de estas concentraciones se puede utilizar para demostrar la actividad antituberculosa del extracto etanólico de *Grindelia boliviana* Rusby (Ch'iri ch'iri) frente a *Micobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv.

En Cambio en los subgrupos N°2 observamos que las concentraciones de 30 mg/mL, 29 mg/mL, 27 mg/mL, 28 mg/mL, demuestran una leve inhibición de crecimiento de colonias micobacterianas, en el subgrupo N°3 observamos que a las concentraciones de 26 mg/mL y 25mg/mL también presenta una leve inhibición y finalmente en el subgrupo N°4 no demuestra ninguna actividad antituberculosa puesto que esta corresponde al grupo control.

En la dilución  $10^{-5}$  mg/mL el subgrupo N°1 se observa que todas las concentraciones empleadas presentan una similar actividad antituberculosa con respecto al patrón rifampicina (sigma).

El subgrupo N°2 y N°3 no demuestran ninguna actividad antituberculosa puesto que corresponden al grupo control.

En la dilución  $10^{-6}$  mg/mL el subgrupo N°1 se observa que todas las concentraciones empleadas presentan una similar actividad antituberculosa con respecto al patrón rifampicina (sigma).

El subgrupo N°2 no demuestran ninguna actividad antituberculosa puesto que corresponden al grupo control.

## DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Según el análisis estadístico realizado las pruebas de ANOVA, comparaciones múltiples y Tukey de las diferentes concentraciones utilizadas, se observa que para la dilución  $10^{-3}$  mg/mL las concentraciones de 33 mg/mL y 34 mg/mL del extracto etanólico de *Grindelia boliviana* Rusby (Ch'iri ch'iri) presentan una total inhibición del crecimiento de colonias micobacterianas, lo que nos demostraría que este extracto de la especie en estudio presenta actividad antituberculosa, lo que no ocurre con las concentraciones de 25 mg/mL, 26 mg/mL, 27 mg/mL, 28 mg/mL, 29 mg/mL, 30 mg/mL, 31 mg/mL y 32 mg/mL.

Se han publicado numerosos ensayos de extractos crudos de plantas medicinales con actividad antimicrobiana en la que se concluye que diferentes metabolitos secundarios



son los responsables de estas actividades, como la presencia de flavonoides, alcaloides, taninos, compuestos fenólicos, saponinas, terpenos, etc. <sup>(12)</sup>

De acuerdo a los resultados del análisis fitoquímico del presente trabajo se logró determinar metabolitos secundarios, que nos orientan hacia los compuestos fenólicos y flavonoides en cuanto al grupo orgánico responsable de la actividad antimicrobiana encontrada en los extractos etanólicos. Según la literatura revisada de los autores D. Domingo y M. Lopez Brea (2003).<sup>(79)</sup> En su publicación plantas con acción antimicrobiana nos refiere que los compuestos fenólicos son los compuestos fitoquímicos más simples y consisten en un anillo fenólico sustituido, los lugares y número de grupos hidroxilo (OH) en el anillo parece que están relacionados directamente con la toxicidad frente a los microorganismos, de forma que un aumento en la hidroxilación está ligado a una mayor toxicidad.<sup>(79)</sup>

El uso de los flavonoides contra infecciones bacterianas tiene como objetivo matar las células de los microorganismos o dificultar los efectos de difusión de las toxinas bacterianas (Manrique A, santana W., 2009).<sup>(80)</sup> Gracias a las propiedades de los polifenoles y a su fuerte actividad biológica como agentes antimicrobianos, en los últimos años a crecido el interés en la cuantificación y uso de estos polifenoles con el propósito de emplearlos en las industrias farmacéuticas, varios autores han estudiado la relación entre el contenido de polifenoles y la actividad antimicrobiana, encontrando asociación directa entre ellos en diferentes extractos de plantas y frutas. <sup>(81)</sup>

No se encontraron reportes bibliográficos que hayan demostrado una actividad antimicrobiana, del extracto etanólico de Ch'iri ch'iri, por lo que los resultados presentados serán de mucha utilidad como fuente de consulta para estudios futuros de la misma especie, sin embargo existe un estudio del *Grindelia boliviana* Rusby sobre la actividad antimicrobiana cuya CMI es de 320 mg para *Staphilococcus aureus* y 160 mg para *Staphilococcus pyogenes*. <sup>(82)</sup>

**4.7.2. CONTEO DEL NÚMERO DE COLONIAS EN LAS DIFERENTES CONCENTRACIONES DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE *Chenopodium incisum* Poir (ARQ'A PAIQO) SOBRE CEPAS DE *Micobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv.**

**TABLA N° 07: LOTE 1 LECTURA DEL N° DE COLONIAS ALOS 42 DIAS DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE ARQ'A PAIQO**

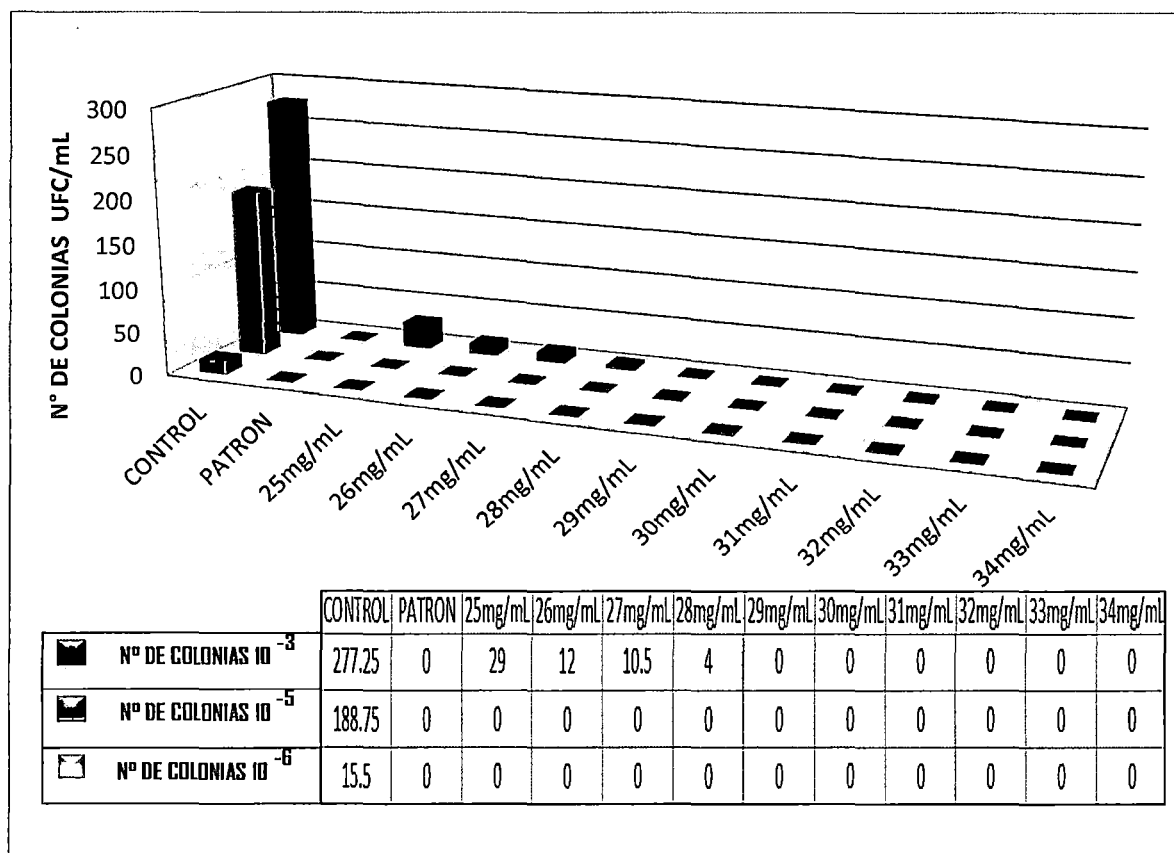
DILUCIONES	CONTROL		PATRON	CONCENTRACIONES (mg/mL)									
	C1	C2	P	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10
				25	26	27	28	29	30	31	32	33	34
10 <sup>-3</sup> mg/mL	284	291	0	28	10	12	4	0	0	0	0	0	0
10 <sup>-5</sup> mg/mL	149	153	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10 <sup>-6</sup> mg/mL	23	16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

**TABLA N° 08: LOTE 2 LECTURA DEL N° DE COLONIAS ALOS 42 DIAS DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE ARQ'A PAIQO**

LECTURA DEL N° DE COLONIAS ALOS 42 DIAS													
DILUCIONES	CONTROL		PATRON	CONCENTRACIONES (mg/mL)									
	C1	C2	P	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10
				25	26	27	28	29	30	31	32	33	34
10 <sup>-3</sup> mg/mL	263	271	0	30	14	9	4	0	0	0	0	0	0
10 <sup>-5</sup> mg/mL	169	184	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10 <sup>-6</sup> mg/mL	11	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

**Legenda:**

- C1: Control 1** formado por 3 tubos de ensayo con la cepa de *Micobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv. En medio Lowenstein Jensen
- C2: Control 2** formado por 3 tubos de ensayo con la cepa de *Micobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv. En medio Lowenstein Jensen
- P: Patrón** formado por un tubo de ensayo con la cepa de *Micobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv en medio Lowenstein Jensen más el fármaco Rifampicina.



**GRÁFICO N° 02:** ACTIVIDAD ANTITUBERCULOSA DE LAS DIFERENTES CONCENTRACIONES DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE *Chenopodium incisum* Poir (ARQ'A PAIQO) SOBRE *Micobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv.

**ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN.**

Las tablas N° 07, N° 08 y el gráfico N° 02, representan los resultados obtenidos de la actividad antituberculosa del extracto etanólico de *Chenopodium incisum* Poir (Arq'a paiqo) frente a *Micobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv,

Pudiendose observar buenos resultados en la mayoría de las concentraciones empleadas exceptuando las concentraciones de (25, 26, 27 Y 28 mg/mL) demostrándose así la inhibición del crecimiento de la dilución  $10^{-3}$ .

Se aprecia también apartir de la concentración de 29mg/mL, tanto para la dilución  $10^{-3}$  y  $10^{-5}$  mg/mL una total inhibición del crecimiento micobacteriano por lo que le denominamos a esta concentración como la CMI, capaz de inhibir el 99% de la población bacteriana, según el examen fitoquímico realizado , se muestra la presencia en cantidades mayoritarias de metabolitos secundarios como flavonoides y compuestos fenólicos a los que se podría atribuir su marcada acción biológica frente a los microorganismos en estudio. Finalmente se concluye que *Micobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv es sensible a casi todas las concentraciones aplicadas, comprobandose de este modo, la actividad antituberculosa del extracto.

**4.7.2.1. ANÁLISIS ESTADÍSTICO:****ANÁLISIS DE VARIANZA UNIFACTORIAL (ANOVA) DE LA ACTIVIDAD ANTITUBERCULOSA DE LAS DIFERENTES CONCENTRACIONES DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE *Chenopodium incisum* Poir (ARQ'A PAIQO) SOBRE *Micobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv.****TABLA N° 09: ANÁLISIS DE VARIANZA PARA LA DILUCIÓN 10<sup>-3</sup> DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE ARQ'A PAIQO**

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	252502,846	12	21041,904	628,839	,000
Dentro de grupos	435,000	13	33,462		
Total	252937,846	25			

**LEYENDA:**

GL= GRADOS DE LIBERTAD

F=DISTRIBUCION FISHER

Sig = SIGNIFICANCIA

Sig &gt; 0.05 no existe diferencia significativa entre las concentraciones empleadas en el estudio realizado

Sig ≤ 0.05 existe diferencia significativa entre las concentraciones empleadas en el estudio realizado.

**TABLA N° 10: ANÁLISIS DE VARIANZA PARA LA DILUCIÓN 10<sup>-5</sup> DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE ARQ'A PAIQO**

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	90845,538	12	7570,462	144,623	,000
Dentro de grupos	680,500	13	52,346		
Total	91526,038	25			

**LEYENDA:**

GL= GRADOS DE LIBERTAD

F=DISTRIBUCION FISHER

Sig = SIGNIFICANCIA

Sig &gt; 0.05 no existe diferencia significativa entre las concentraciones empleadas en el estudio realizado

Sig ≤ 0.05 existe diferencia significativa entre las concentraciones empleadas en el estudio realizado.

**TABLA N° 11: ANÁLISIS DE VARIANZA PARA LA DILUCIÓN 10<sup>-6</sup> DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE ARQ'A PAIQO**

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	822,154	12	68,513	11,133	,000
Dentro de grupos	80,000	13	6,154		
Total	902,154	25			

**LEYENDA:**

GL= GRADOS DE LIBERTAD

F=DISTRIBUCION FISHER

Sig = SIGNIFICANCIA

Sig &gt; 0.05 no existe diferencia significativa entre las concentraciones empleadas en el estudio realizado

Sig ≤ 0.05 existe diferencia significativa entre las concentraciones empleadas en el estudio realizado.

### ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN.

En el análisis de varianza (ANOVA) de las Tablas N° 09, 10 y 11 se observa que para todas las diluciones evaluadas el valor de significancia está por debajo de 0.05 por lo que se afirma que existen diferencias significativas de la inhibición del crecimiento de *Micobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv, sometida a cada una de las concentraciones empleadas.

Además como el análisis de varianza (ANOVA) dio diferencias significativas, para saber cuál de las concentraciones obtendrá la mejor actividad antituberculosa se realizó la prueba de Tukey

**TABLA N° 12: COMPARACIONES MÚLTIPLES DE TUKEY DEL PROMEDIO DE LA ACTIVIDAD ANTITUBERCULOSA DE LAS DIFERENTES CONCENTRACIONES DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE *Chenopodium incisum* Poir (ARQ'A PAIQU) SOBRE *Micobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv**

MUESTRA	N	SUBCONJUNTO PARA ALFA= 0.05						
		DILUCIÓN 10 <sup>-3</sup> MG/ML			DILUCIÓN 10 <sup>-5</sup> MG/ML		DILUCIÓN 10 <sup>-6</sup> MG/ML	
		1	2	3	1	2	1	2
PATRON	2	,0000			,0000		,0000	
29 mg/ml	2	,0000			,0000		,0000	
30 mg/ml	2	,0000			,0000		,0000	
31 mg/ml	2	,0000			,0000		,0000	
32mg/ml	2	,0000			,0000		,0000	
33 mg/ml	2	,0000			,0000		,0000	
34 mg/ml	2	,0000			,0000		,0000	
28 mg/ml	2	4,0000			,0000		,0000	
27 mg/ml	2	10,5000			,0000		,0000	
26 mg/ml	2	12,0000			,0000		,0000	
25 mg/ml	2		29,0000		,0000		,0000	
Control 2	2			273,5000		159,0000		14,0000
Control 1	2			281,0000		168,0000		17,0000
	Sig.	,677	,172	,974	1,000	,971	1,000	,984
Se muestra las medias para los grupos en subconjuntos homogéneos. b. Usa el tamaño muestral de la media armonica = 2,000								

### ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN

Según la tabla N°12 se puede apreciar que se obtuvieron 7 subgrupos (3 para la dilución 10<sup>-3</sup>, 2 para la dilución 10<sup>-5</sup> y 2 para la dilución 10<sup>-6</sup>) al comparar las medias de los promedios del número de colonias contabilizadas en las diferentes concentraciones de las diluciones 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-5</sup> y 10<sup>-6</sup>.

En el análisis de comparaciones múltiples existen diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones de los extractos etanólicos de *Chenopodium incisum* Poir (Arq'a paiqo) empleadas frente a las diluciones ( $10^{-3}$  mg/ml,  $10^{-5}$  mg/ml y  $10^{-6}$  mg/ml) de *Micobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv.

El subgrupo ideal para la dilución  $10^{-3}$  mg/mL es el N° 1, por que casi todas las concentraciones empleadas se asemejan a la inhibición del crecimiento de colonias micobacterianas efectuadas por el fármaco patrón, lo que nos indica que a estas concentraciones el extracto presenta una actividad antituberculosa.

En Cambio en el subgrupo N°2 observamos que la concentración de 25 mg/mL muestra una leve inhibición de crecimiento de colonias micobacterianas y finalmente el subgrupo N°3 no demuestra ninguna actividad antituberculosa puesto que corresponde al grupo control.

En la dilución  $10^{-5}$  mg/mL, el subgrupo N°1 se observa que todas las concentraciones empleadas presentan una similar actividad antituberculosa con respecto al patrón rifampicina (sigma) lo que significa que cualquiera de estas concentraciones se pueda utilizar para demostrar la actividad antimicobacteriana y el subgrupo N°2 no demuestran ninguna actividad antituberculosa puesto que corresponden al grupo control.

En la dilución  $10^{-6}$  mg/ml, el subgrupo N°1 se observa que todas las concentraciones empleadas presentan una similar actividad antituberculosa con respecto al patrón rifampicina (sigma) y el subgrupo N°2 no demuestran ninguna actividad antituberculosa puesto que corresponden al grupo control.

## DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Según el análisis estadístico realizado las pruebas de ANOVA, comparaciones múltiples y TUKEY de las diferentes concentraciones utilizadas, se observa que La actividad antituberculosa del extracto etanólico de *Chenopodium incisum* Poir frente a cepas de *Micobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv fue similar para la dilución  $10^{-3}$  a las concentraciones de 29mg/mL, 30mg/mL, 31mg/mL, 32mg/mL, 33mg/mL y 34mg/mL en la mayoría de los extractos con excepción de las concentraciones: 28mg/mL, 27mg/mL, 26mg/mL, 25mg/mL que presentan crecimiento micobacteriano. Se determino la CMI=29mg/mL, teniendo en cuenta la concentración mas baja del extracto, capaz de inhibir el crecimiento visible de *Micobacterium tuberculosis*. Asi mismo los resultados también mostraron que en los tratamientos del control, el crecimiento bacteriano fue al 100%.

Los efectos antibacterianos del extracto de *Chenopodium incisum* Poir pueden estar relacionados con la presencia de flavonoides y compuestos fenólicos, metabolitos secundarios normalmente sintetizados en esta especie, que fueron identificados en el análisis fitoquímico cualitativo.

Respecto a la acción del extracto crudo de *Chenopodium incisum* Poir sobre *Micobacterium tuberculosis* considerando la presencia de flavonoides y compuestos fenólicos. En la actualidad, algunos otros mecanismos de apoyo han surgido para indicar el papel de flavonoides con actividad antibacteriana; estos mecanismos incluyen daños a la membrana citoplasmática mediante la generación de peróxido de hidrógeno, la inhibición de la síntesis de ácido nucleico y la inhibición de la ATP sintasa sugerimos que los compuestos fenólicos y flavonoides naturales (polifenoles) son principalmente responsable de la actividad antimicobacteriana, citotóxica y mutagénica, estos complejos fuertes pueden alterar el metabolismo de organismo de las micobacterias.<sup>(83)</sup>

Estudios recientes han examinado las plantas y la eficacia de sus diferentes tipos de extractos. La investigación avanzada en la estructura y relaciones de actividad entre los flavonoides presentes en la naturaleza producirán una mayor comprensión de su farmacocinética y efectos sobre el metabolismo de micobacterias de acuerdo a su estructura. Es de gran importancia para determinar los mecanismos de acción de los flavonoides en *M. tuberculosis*.<sup>(83)</sup>

Lall y Meyer en 1999<sup>(84)</sup> evaluaron la actividad antimicobacteriana de *Chenopodium ambrosioides*, por método radiométrico, presentando actividad contra cepas H<sub>37</sub>Rv a una concentración mínima de 0.1 mg/mL lo cual no se relaciona con nuestro estudio ya que se obtuvo una inhibición total a la concentración de 29 mg/mL, esta diferencia puede deberse a la procedencia, época de cosecha, etapa de desarrollo, técnica de extracción tratamiento de la planta fresca o seca también a la metodología utilizada en las pruebas de susceptibilidad bacteriana.<sup>(84)</sup>

Para el caso de los compuestos fenólicos, los lugares y el número de grupos hidroxilo (OH) en el anillo, parece que esta relacionado directamente con la toxicidad frente a microorganismos se realizó un estudio bastante extenso sobre la actividad antibacteriana y el modo de acción de 30 fenoles flavonoideos frente a cepas de *Proteus vulgaris* y *Staphylococcus ureus*. Se examinó la relación estructura – actividad de dichos compuestos, comprobando que los flavonoides que mostraban actividad poseían un grupo hidroxilo libre sobre el anillo A y sobre el B, mientras que los flavonoides que carecían de tales hidroxilos libres no mostraban actividad.<sup>(84)</sup>

Por otro lado es necesario realizar un fraccionamiento de los extractos que presentaron actividad para identificar plenamente al o los compuestos responsables de la actividad encontrada.<sup>(30)</sup>

**4.7.3. CONTEO DEL NÚMERO DE COLONIAS EN LAS DIFERENTES CONCENTRACIONES DEL EXTRACTO DE AGLICONAS DE FLAVONOIDES DE *Grindelia boliviana* Rusby (CH'IRI CH'IRI) SOBRE CEPAS DE *Micobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv.**

**TABLA N° 13: LOTE 1 LECTURA DEL N° DE COLONIAS A LOS 42 DIAS DE LAS AGLICONAS DE FLAVONOIDES CH'IRI CH'IRI**

DILUCIONES	CONTROL		PATRON	CONCENTRACIONES (mg/mL)					
	C1	C2		P	R1	R2	R3	R4	R5
					1.2	2	2.8	3.6	4.4
10 <sup>-3</sup> mg/mL	239	251	0	50	21	0	0	0	
10 <sup>-5</sup> mg/mL	128	146	0	12	0	0	0	0	
10 <sup>-6</sup> mg/mL	20	17	0	0	0	0	0	0	

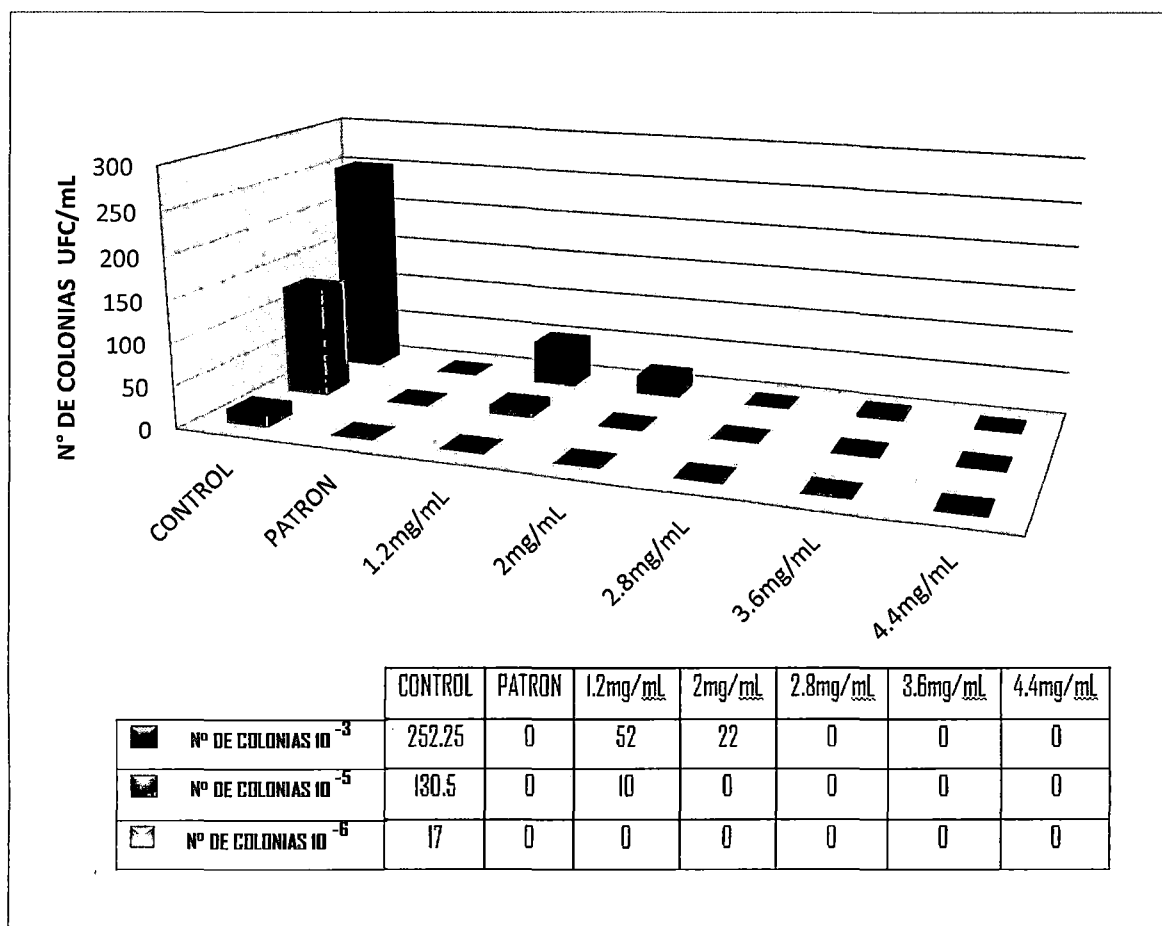
**TABLA N° 14: LOTE 2 LECTURA DEL N° DE COLONIAS A LOS 42 DIAS DE LAS AGLICONAS DE FLAVONOIDES CH'IRI CH'IRI**

LECTURA DEL N° DE COLONIAS A LOS 42 DIAS									
DILUCIONES	CONTROL		PATRON	CONCENTRACIONES (mg/mL)					
	C1	C2		P	R1	R2	R3	R4	R5
					1.2	2	2.8	3.6	4.4
10 <sup>-3</sup> mg/mL	277	242	0	54	23	0	0	0	
10 <sup>-5</sup> mg/mL	118	130	0	8	0	0	0	0	
10 <sup>-6</sup> mg/mL	16	15	0	0	0	0	0	0	

**Legenda:**

- C1:** Control 1 formado por 3 tubos de ensayo con la cepa de *Micobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv. En medio Lowenstein Jensen
- C2:** Control 2 formado por 3 tubos de ensayo con la cepa de *Micobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv. En medio Lowenstein Jensen
- P:** Patrón formado por un tubo de ensayo con la cepa de *Micobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv en medio Lowenstein Jensen más el fármaco Rifampicina.





**GRÁFICO N° 03:** ACTIVIDAD ANTITUBERCULOSA DE LAS DIFERENTES CONCENTRACIONES DE LAS AGLICONAS DE FLAVONOIDES DE *Grindelia boliviana* Rusby (CH'IRI CH'IRI) SOBRE *Micobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>RV.

#### ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN.

Las tablas N° 13, N° 14 y el gráfico N° 03, representan los resultados obtenidos de la actividad antituberculosa de las agliconas de flavonoides de *Grindelia boliviana* Rusby (Ch'iri ch'iri) frente a *Micobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv, la inhibición en el crecimiento bacteriano fue modulada por los factores cepa bacteriana y concentración de las agliconas, conforme se incrementó la concentración del extracto el porcentaje de inhibición también se incrementó, registrándose la CMI = 2.8 mg/mL, a la dilución de  $10^{-3}$  mg/mL, indicándonos que el crecimiento micobacteriano fue inhibida a esta concentración.

Adicionalmente se ha observado que en poblaciones menos densas ( $10^{-5}$  mg/mL) a la concentración de 1.2 mg/mL presenta un leve crecimiento de colonias micobacterianas y a la  $10^{-6}$  mg/mL la actividad antituberculosa de las diferentes concentraciones presenta una total inhibición de las colonias de micobacterias.

**4.7.3.1. ANÁLISIS ESTADÍSTICO:**

**ANÁLISIS DE VARIANZA UNIFACTORIAL (ANOVA) DE LA ACTIVIDAD ANTITUBERCULOSA DE LAS DIFERENTES CONCENTRACIONES DE AGLICONAS DE FLAVONOIDEOS DE *Grindelia boliviana* Rusby (CH'IRI CH'IRI) FRENTE A *MICOBACTERIUM TUBERCULOSIS* H<sub>37</sub>Rv.**

**TABLA N° 15: ANÁLISIS DE VARIANZA PARA LA DILUCIÓN 10<sup>-3</sup> DE LAS AGLICONAS DE FLAVONOIDEOS DE CH'IRI CH'IRI**

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	177362,938	7	25337,563	262,395	,000
Dentro de grupos	772,500	8	96,563		
Total	178135,438	15			

**LEYENDA:**

GL= GRADOS DE LIBERTAD

F=DISTRIBUCION FISHER

Sig = SIGNIFICANCIA

Sig > 0.05 no existe diferencia significativa entre las concentraciones empleadas en el estudio realizado

Sig ≤ existe diferencia significativa entre las concentraciones empleadas en el estudio realizado.

**TABLA N° 16: ANÁLISIS DE VARIANZA PARA LA DILUCIÓN 10<sup>-5</sup> DE LAS AGLICONAS DE FLAVONOIDEOS DE CH'IRI CH'IRI**

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	50185,750	7	7169,393	308,361	,000
Dentro de grupos	186,000	8	23,250		
Total	50371,750	15			

**LEYENDA:**

GL= GRADOS DE LIBERTAD

F=DISTRIBUCION FISHER

Sig = SIGNIFICANCIA

Sig > 0.05 no existe diferencia significativa entre las concentraciones empleadas en el estudio realizado

Sig ≤ existe diferencia significativa entre las concentraciones empleadas en el estudio realizado.

**TABLA N° 17: ANÁLISIS DE VARIANZA PARA LA DILUCIÓN 10<sup>-6</sup> DE LAS AGLICONAS DE FLAVONOIDEOS DE CH'IRI CH'IRI**

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	871,000	7	124,429	99,543	,000
Dentro de grupos	10,000	8	1,250		
Total	881,000	15			

**LEYENDA:**

GL= GRADOS DE LIBERTAD

F=DISTRIBUCION FISHER

Sig = SIGNIFICANCIA

Sig > 0.05 no existe diferencia significativa entre las concentraciones empleadas en el estudio realizado

Sig ≤ existe diferencia significativa entre las concentraciones empleadas en el estudio realizado.

## ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN

En el análisis de varianza (ANOVA) de las Tablas N° 15, 16, y 17 se observa que para todas las diluciones evaluadas el valor de significancia está por debajo de 0.05 por lo que se afirma que existen diferencias significativas de la inhibición del crecimiento de *Micobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv, sometida a cada una de las concentraciones empleadas.

Además como el análisis de varianza (ANOVA) dio diferencias significativas, para saber cuál de las concentraciones obtendrá la mejor actividad antituberculosa se realizó la prueba de Tukey

**TABLA N° 18:** COMPARACIONES MÚLTIPLES DE TUKEY DEL PROMEDIO DE LA ATIVIDAD ANTITUBERCULOSA DE AGLICONAS DE FLAVONOIDES DE *Grindelia boliviana* (CH'IRI CH'IRI) DE LAS DIFERENTES CONCENTRACIONES SOBRE *Micobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv.

MUESTRA	N	SUBCONJUNTO PARA ALFA= 0.05							
		DILUCIÓN 10 <sup>-3</sup> MG/ML			DILUCIÓN 10 <sup>-5</sup> MG/ML		DILUCIÓN 10 <sup>-6</sup> MG/ML		
		1	2	3	1	2	1	2	
PATRON	2	,0000			,0000		,0000		
2.8 mg/ml	2	,0000			,0000		,0000		
3.6mg/ml	2	,0000			,0000		,0000		
4.4mg/ml	2	,0000			,0000		,0000		
2 mg/ml	2		22,0000		,0000		,0000		
1.2 mg/ml	2		52,0000		10,0000		,0000		
Control 2	2			246,0000		123,0000			16,0000
Control 1	2			258,0000		138,0000			18,0000
	Sig.	,418	,159	,920	,495	,147	1,000		,643
Se muestra las medias para los grupos en subconjuntos homogéneos. a. Usa el tamaño muestral de la media armonica = 2,000									

## ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN

Según la tabla N°18 en el análisis de comparaciones múltiples se observa que existen diferencias estadísticamente significativas, entre las diferentes concentraciones de las agliconas de flavonoides de *Grindelia boliviana* Rusby, en la dilución 10<sup>-3</sup> se puede apreciar que se obtuvieron 3 subgrupos, para la dilución 10<sup>-5</sup> 2 subgrupos y para la dilución 10<sup>-6</sup> 2 subgrupos, al comparar las medias de los promedios del número de colonias contabilizadas en las diferentes concentraciones a las diferentes diluciones.

El subgrupo ideal para la dilución 10<sup>-3</sup> mg/mL es el N° 1, que considera las concentraciones de 2.8 mg/mL, 3.6 mg/mL y 4.4 mg/mL que se asemejan a la inhibición del crecimiento de colonias micobacterianas efectuadas por el patrón empleado, lo que significa que cualquiera de estas concentraciones se puede utilizar para demostrar la

actividad antituberculosa de las agliconas de flavonoides de *Grindelia boliviana* Rusby (Ch'iri ch'iri) frente a *Micobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv.

En Cambio en los subgrupos N°2 observamos que a las concentraciones de 1.2 mg/mL y 2mg/mL demuestra una leve inhibición de crecimiento de colonias micobacterianas y finalmente en el subgrupo N°3 no demuestra ninguna actividad antituberculosa por que, corresponde al grupo control.

En la dilución 10<sup>-5</sup> mg/mL el subgrupo N°1 se observa que casi todas las concentraciones empleadas exceptuando la concentración de 1.2 mg/mL presentan una actividad antituberculosa similar al fármaco patrón rifampicina (sigma). El subgrupo N°2 no demuestran ninguna actividad antituberculosa puesto que corresponden al grupo control.

En la dilución 10<sup>-6</sup> mg/mL el subgrupo N°1 se observa que todas las concentraciones empleadas presentan una actividad antimicobacteriana similar al fármaco patrón rifampicina (sigma). El subgrupo N° 2 no demuestran ninguna actividad antituberculosa puesto que corresponden al grupo control.

## DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Según el análisis estadístico realizado las pruebas de ANOVA, comparaciones múltiples y TUKEY de las diferentes concentraciones utilizadas, se observa que en medio de la dilución 10<sup>-3</sup> mg/mL las concentraciones de 2.8 mg/mL, 3.6 mg/mL y 4.4 mg/mL de las agliconas de flavonoides de *Grindelia boliviana* Rusby (Ch'iri ch'iri) sometidas a *Micobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv presentan una total inhibición del crecimiento de colonias de micobacterias; lo que nos demostraría que este extracto presenta actividad antituberculosa, lo que no ocurre al utilizar las concentraciones de 1.2mg/mL y 2mg/mL.

En el análisis por HPLC se pudo observar tres picos correspondientes a las agliconas de flavonoides de *Grindelia boliviana* Rusby (Ch'iri ch'iri) los cuales no han podido ser identificados a las que se le atribuirían la actividad antimicobacteriana y serán motivo de posteriores investigaciones.

Madalarin et al, 2014. Encontró que las fracciones de Bergamota eran activos contra bacterias Gram-negativas y Gram positivas y su potencia antimicrobiana aumentó después de la desglicosilación enzimática. Los Glucósidos polifenoles son relativamente hidrófilas y no se difunden a través de membranas biológicas, mientras glucósidos flavonoides simples pueden ser absorbidos en las células y agliconas son absorbidos por difusión pasiva. Encontrándose una CMI en un rango de 800 a 1000 ug/mL para bacterias Gram positivas, estos resultados difieren del nuestro, <sup>(14)</sup> esto podría ser explicado por el hecho de que *M. tuberculosis* está constituido por una pared celular rica en estructuras lipídicas conocidas como ácidos micólicos. Esta pared celular compleja que rodea a la membrana celular es parecida a la pared de las bacterias Gram positivas con la diferencia de poseer una capa de lípidos (esteres micolatos) los cuales están estructurados para formar una barrera de permeabilidad a las moléculas polares. La pared celular debe ser penetrada como requisito para lograr que cualquier molécula dirigida a lograr acción antimicobacteriana logre llegar a los sitios vulnerables del bacilo. <sup>(30)</sup>

Por lo que parece que la aglicona de flavonoide ejerce un efecto sobre la pared celular micobacteriana debido a su alta lipofilidad, sin embargo varios autores consideran que aún existe escasa información disponible concerniente a la actividad de compuestos naturales contra *Micobacterium tuberculosis*.

No se reportan estudios sobre la actividad antimicobacteriana de agliconas de flavonoides en la especie *Grindelia boliviana* Rusby.

#### 4.7.4. CONTEO DEL NÚMERO DE COLONIAS EN LAS DIFERENTES CONCENTRACIONES DE AGLICONAS DE FLAVONOIDES DE LAS ESPECIES: *Chenopodium incisum* Poir (ARQ'A PAIQO) SOBRE CEPAS DE *Micobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv.

**TABLA N° 19: LOTE 1 LECTURA DEL N° DE COLONIAS A LOS 42 DIAS DE LAS AGLICONAS DE FLAVONOIDES DE ARQ'A PAIQO**

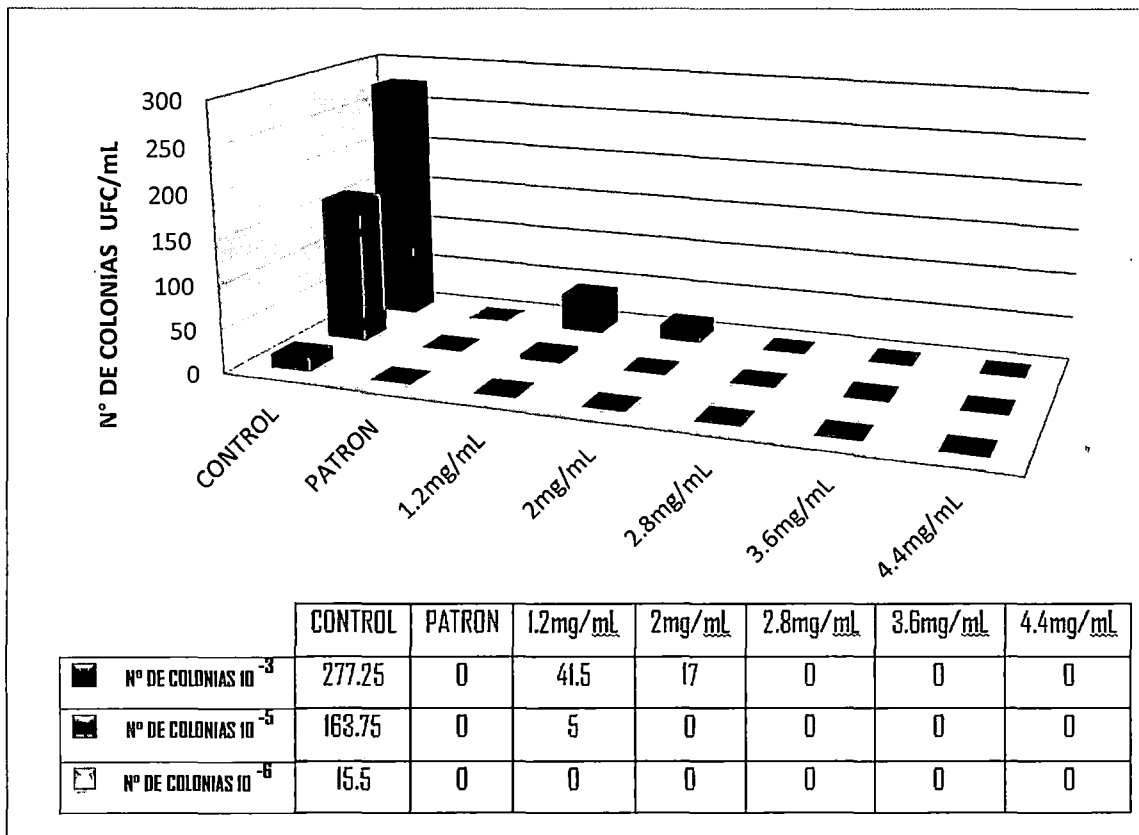
DILUCIONES	CONTROL		PATRON	CONCENTRACIONES (mg/mL)				
	C1	C2	P	R1	R2	R3	R4	R5
				1.2	2	2.8	3.6	4.4
10 <sup>-3</sup> mg/mL	284	291	0	40	15	0	0	0
10 <sup>-5</sup> mg/mL	149	153	0	4	0	0	0	0
10 <sup>-6</sup> mg/mL	23	16	0	0	0	0	0	0

**TABLA N° 20: LOTE 2 LECTURA DEL N° DE COLONIAS A LOS 42 DIAS DE LAS AGLICONAS DE FLAVONOIDES DE ARQ'A PAIQO**

DILUCIONES	CONTROL		PATRON	CONCENTRACIONES (mg/mL)				
	C1	C2	P	R1	R2	R3	R4	R5
				1.2	2	2.8	3.6	4.4
10 <sup>-3</sup> mg/mL	263	271	0	43	18	0	0	0
10 <sup>-5</sup> mg/mL	169	184	0	6	0	0	0	0
10 <sup>-6</sup> mg/mL	11	12	0	0	0	0	0	0

**Legenda:**

- C1:** Control 1 formado por 3 tubos de ensayo con la cepa de *Micobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv. En medio Lowenstein Jensen
- C2:** Control 2 formado por 3 tubos de ensayo con la cepa de *Micobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv. En medio Lowenstein Jensen
- P:** Patrón formado por un tubo de ensayo con la cepa de *Micobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv en medio Lowenstein Jensen mas el fármaco Rifampicina.



**GRÁFICO N° 04:** ACTIVIDAD ANTITUBERCULOSA DE LAS DIFERENTES CONCENTRACIONES DE LAS AGLICONAS DE FLAVONOIDES DE *Chenopodium incisum* Poir (ARQ'A PAIQU) SOBRE *Micobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>RV.

**ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN.**

Las tablas N° 19, N° 20 y el gráfico N° 04, representan los resultados obtenidos de la actividad antituberculosa de las agliconas de flavonoides de *Chenopodium incisum* Poir (Arq'a paiqu) frente a *Micobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv, demostrándose así la inhibición del crecimiento de colonias micobacterianas en casi todas las concentraciones empleadas.

Cabe destacar que a partir de la concentración de 2.8 mg/mL de la dilución de 10<sup>-3</sup> mg/mL existe una total inhibición del crecimiento bacteriano, por lo que podríamos denominarle a esta concentración como la concentración mínima inhibitoria (CMI).

Adicionalmente se ha observado que en poblaciones menos densas (10<sup>-5</sup> mg/mL) a la concentración de 1.2 mg/mL presenta un leve crecimiento de colonias micobacterianas. Y a la dilución 10<sup>-6</sup> mg/mL la actividad antituberculosa de las diferentes concentraciones presenta una total inhibición de las colonias de micobacterias, lo cual es corroborado con el patrón rifampicina (sigma).

**4.7.4.1. ANÁLISIS ESTADÍSTICO: AL NÚMERO DE COLONIAS CONTABILIZADAS EN CADA UNA DE LAS CONCENTRACIONES EMPLEADAS DE AGLICONAS DE FLAVONOIDES DE LA ESPECIE: *Chenopodium incisum* Poir (ARQ'A PAIQO) FRENTE A *Micobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv.**

A continuación se muestran los cuadros correspondientes al análisis estadístico. Analisis de varianza unifactorial (ANOVA) de la actividad antituberculosa de las diferentes concentraciones de agliconas de flavonoides de *chenopodium incisum* Poir (arq'a paiqo) frente a *micobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv.

**TABLA N° 21: ANÁLISIS DE VARIANZA PARA LA DILUCIÓN 10<sup>-3</sup> DE LAS AGLICONAS DE FLAVONOIDES DE ARQ'A PAIQO**

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	217726,438	7	31103,777	579,349	,000
Dentro de grupos	429,500	8	53,688		
Total	218155,938	15			

LEYENDA:

GL= GRADOS DE LIBERTAD

F=DISTRIBUCION FISHER

Sig = SIGNIFICANCIA

Sig > 0.05 no existe diferencia significativa entre las concentraciones empleadas en el estudio realizado

Sig <= existe diferencia significativa entre las concentraciones empleadas en el estudio realizado.

**TABLA N° 22: ANÁLISIS DE VARIANZA PARA LA DILUCIÓN 10<sup>-5</sup> DE LAS AGLICONAS DE FLAVONOIDES DE ARQ'A PAIQO**

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	79431,938	7	11347,420	131,469	,000
Dentro de grupos	690,500	8	86,313		
Total	80122,438	15			

LEYENDA:

GL= GRADOS DE LIBERTAD

F=DISTRIBUCION FISHER

Sig = SIGNIFICANCIA

Sig > 0.05 no existe diferencia significativa entre las concentraciones empleadas en el estudio realizado

Sig <= existe diferencia significativa entre las concentraciones empleadas en el estudio realizado.

**TABLA N° 23: ANÁLISIS DE VARIANZA PARA LA DILUCIÓN 10<sup>-6</sup> DE LAS AGLICONAS DE FLAVONOIDES DE ARQ'A PAIQO**

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	729,750	7	104,250	10,425	,002
Dentro de grupos	80,000	8	10,000		
Total	809,750	15			

LEYENDA:

GL= GRADOS DE LIBERTAD, F=DISTRIBUCION FISHER

Sig = SIGNIFICANCIA

Sig > 0.05 no existe diferencia significativa entre las concentraciones empleadas en el estudio realizado

Sig <= existe diferencia significativa entre las concentraciones empleadas en el estudio realizado.

### ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN.

En el análisis de varianza (ANOVA) de las Tablas N° 21, 22, y 23, se observa que para todas las diluciones evaluadas el valor de significancia está por debajo de 0.05 por lo que se afirma que existen diferencias significativas de la inhibición del crecimiento de *Micobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv, sometida a cada una de las concentraciones empleadas.

Además como el análisis de varianza (ANOVA) dio diferencias significativas, para saber cuál de las concentraciones obtendrá la mejor actividad antituberculosa se realizó la prueba de Tukey.

**TABLA N° 24:** COMPARACIONES MÚLTIPLES DE TUKEY DEL PROMEDIO DE LA ATIVIDAD ANTITUBERCULOSA DE AGLICONAS DE FLAVONOIDES DE *chenopodium incisum* Poir (ARQ' A PAIQO) DE LAS DIFERENTES CONCENTRACIONES SOBRE *Micobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>RV

MUESTRA	N	SUBCONJUNTO PARA ALFA= 0.05						
		DILUCIÓN 10 <sup>-3</sup> MG/ML			DILUCIÓN 10 <sup>-5</sup> MG/ML		DILUCIÓN 10 <sup>-6</sup> MG/ML	
		1	2	3	1	2	1	2
PATRON	2	,0000			,0000		,0000	
2.8 mg/ml	2	,0000			,0000		,0000	
3.6mg/ml	2	,0000			,0000		,0000	
4.4mg/ml	2	,0000			,0000		,0000	
2 mg/ml	2	16,5000			2,0000		,0000	
1.2 mg/ml	2		41,5000		5,0000		,0000	
Control 2	2			273,5000		159,0000		14,0000
Control 1	2			281,0000		168,5000		17,0000
	Sig.	,412	,100	,957	,999	,957	1,000	,971

Se muestra las medias para los grupos en subconjuntos homogéneos.  
b. Usa el tamaño muestral de la media armonica = 2,000

### ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN

Según la tabla N°24 se puede apreciar que se obtuvieron 7 subgrupos (3 para la dilución 10<sup>-3</sup>, 2 para la dilución 10<sup>-5</sup> y 2 para la dilución 10<sup>-6</sup>) al comparar las medias de los promedios del número de colonias contabilizadas en las diferentes concentraciones de las diluciones 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-5</sup> y 10<sup>-6</sup>.

En el análisis de comparaciones múltiples existen diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones de las agliconas de flavonoides de *Chenopodium insisum* Poir (Arq'a paiqo) empleadas frente a las diluciones (10<sup>-3</sup> mg/mL, 10<sup>-5</sup> mg/mL y 10<sup>-6</sup> mg/mL) de *Micobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv.

El subgrupo ideal para la dilución 10<sup>-3</sup> mg/mL es el N° 1, que considera las concentraciones de 2.8 mg/mL, 3.6 mg/mL y 4.4 mg/mL que se asemejan a la inhibición del crecimiento de colonias micobacterianas efectuadas por el patrón empleado, lo que significa que cualquiera de estas concentraciones se puede utilizar para demostrar la



actividad antituberculosa de las agliconas de flavonoides de *Chenopodium insisum* Poir (Arq'a paiqo) frente a *Micobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv.

En Cambio en los subgrupos N°2 observamos que la concentración de 1.2 mg/mL demuestra una leve inhibición de crecimiento de colonias micobacterianas y finalmente en el subgrupo N°3 no demuestra ninguna actividad antituberculosa puesto que esta corresponde al grupo control.

En la dilución 10<sup>-5</sup> mg/mL el subgrupo N°1 se observa que casi todas las concentraciones empleadas exceptuando la concentración de 2 mg/mL y 1.2 mg/mL, presentan una similar actividad antituberculosa con respecto al patrón rifampicina (sigma).

El subgrupo N°2 no demuestra ninguna actividad antituberculosa puesto que corresponden al grupo control.

En la dilución 10<sup>-6</sup> mg/mL el subgrupo N°1 se observa que todas las concentraciones empleadas presentan una similar actividad antituberculosa con respecto al patrón rifampicina (sigma).

El subgrupo N°2 no demuestran ninguna actividad antituberculosa puesto que corresponden al grupo control.

## DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Según el análisis estadístico realizado las pruebas de ANOVA, comparaciones múltiples y Tukey de las diferentes concentraciones utilizadas, se observa que en medio de la dilución 10<sup>-3</sup> mg/mL las concentraciones de 2.8 mg/mL, 3.6 mg/mL y 4.4 mg/mL de las agliconas de flavonoides de *Chenopodium insisum* Poir (Arq'a paiqo) sometidas a *My SPE cobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv presentan una total inhibición del crecimiento de colonias de micobacterias; lo que nos demostraría que este extracto presenta actividad antituberculosa, lo que no ocurre al utilizar las concentraciones de 1,2 mg/mL y 2mg/mL.

Las agliconas de flavonoides de *Chenopodium insisum* Poir (Arq'a paiqo) fue analizado por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) donde se pudo observar la presencia de 3 picos que corresponderían a las agliconas, de las cuales dos no se logró identificar y la tercera correspondería a la aglicona de kaempferol el que fue comparado con el estándar de kaempferol mediante sus tiempos de retención y espectros Uv-vis. A las cuales se les atribuiría la actividad antimicobacteriana. Si bien en la bibliografía consultada no se encontraron informes que muestren datos sobre la actividad antimicobacteriana de agliconas de flavonoides de *Chenopodium insisum* Poir; nuestros resultados mostraron que fueron efectivas para inhibir el crecimiento micobacteriano a las concentraciones que hemos utilizado.

Estudios previos realizados por Ting W. et al. 2013<sup>(15)</sup> Informaron sobre el aislamiento y la identificación del flavonoide kaempferol ,que poseen actividad antibacteriana, puesto que la capacidad de los flavonoides de interactuar con las membranas puede afectar en gran medida sus bioactividades, la actividad antibacteriana de las agliconas de flavonoides se puede atribuir a su modo de acción común sobre las membranas. Se ha informado de que la aglicona Kaempferol demostró actividad antibacteriana mediante la reducción de la fluidez de membrana. Un estudio también demostró que galangin causó

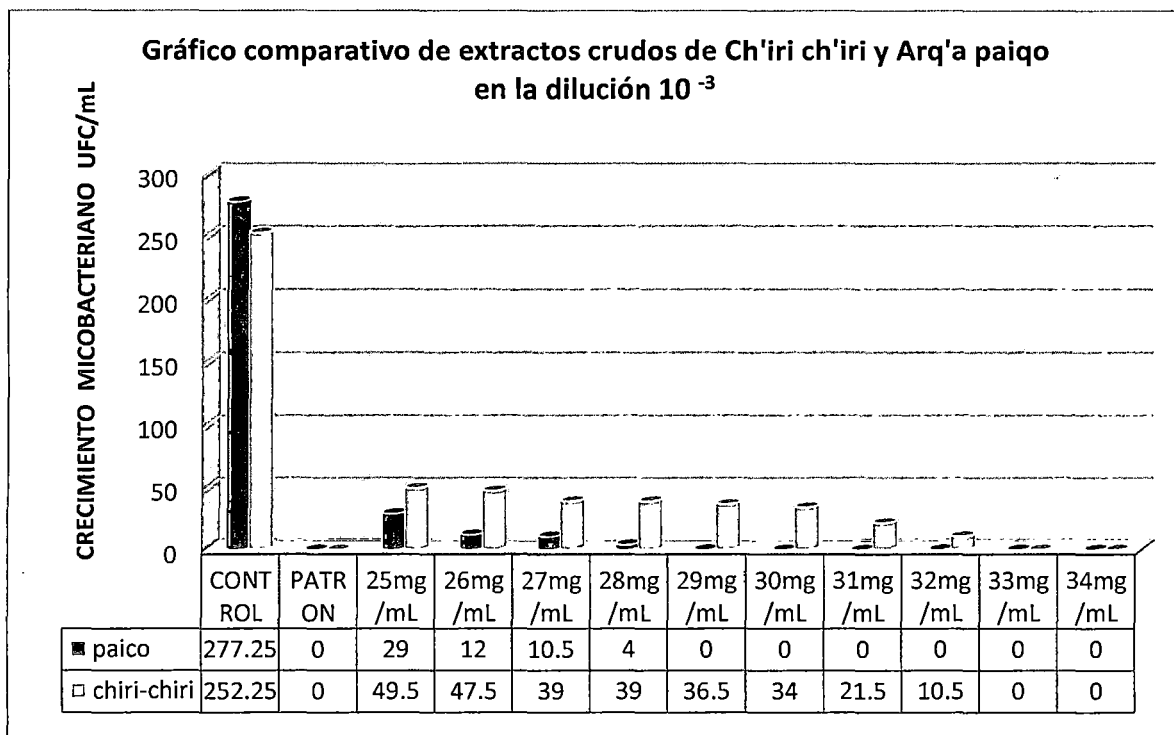
un aumento significativo en la pérdida de potasio a partir de células de *Staphylococcus aureus*, que pueden ser atribuidos a un daño directo a la membrana citoplasmática o daño indirecto efectuado a través de la autólisis, debilitamiento de la pared celular y la consiguiente lisis osmótica. También investigaron las actividades inhibitoras de 11 flavonoides disponibles comercialmente contra *Escherichia coli*, uno de los patógenos más comunes. Los efectos de la interacción de la membrana de flavonoides fueron influenciados por el número y la posición de los grupos hidroxilo. El grupo hidroxilo en C-3 en el anillo C es importante para la disminución de la fluidez de membrana, con la potencia de ser kaempferol > crisina y quercetina > luteolina. Este resultado corrobora un estudio anterior que concluyó el grupo hidroxilo en C-3 es el principal determinante para la interacción con la membrana. <sup>(84)</sup>

El resultado de la inhibición de las agliconas de flavonoides del Arq'a paiko probablemente sea debido a la presencia mayoritaria de la aglicona kaempferol, debido a su alta lipofilia, condición que contribuiría a *degradar* la fracción lipídica de la pared celular del microorganismo, sin embargo, varios autores consideran que aún existe escasa información disponible concerniente a la actividad de compuestos naturales contra *Micobacterium tuberculosis*.

Mandalari G et al. 2014. <sup>(14)</sup> Demostraron que los tratamientos enzimáticos en glucósidos de flavonoides produce derivados lipófilos incrementando su actividad antimicrobiana. Muchos de los efectos de los flavonoides en células bacterianas podrían ocurrir específicamente en presencia de agliconas, que son conocidos por ser transportados fácilmente a través de las membranas celulares por difusión pasiva. Encontrándose una CMI en un rango de 800 a 1000 ug/ mL para bacterias Gram positivas, estos resultados difieren del nuestro, <sup>(14)</sup> que presento una CMI de 2.8 mg/mL. Esto podría ser explicado por el hecho de que *Micobacterium tuberculosis* esta constituido por una pared celular rica en estructuras lipídicas conocidos como ácidos micólicos, esta pared celular compleja que rodea la membrana celular es parecida a la pared de las bacterias Gram positivas con la diferencia de poseer una capa de lípidos (ésteres micolatos) los cuales están estructurados para formar una barrera de permeabilidad a las moléculas polares, la pared celular debe ser penetrada como requisito para lograr que cualquier molécula dirigida a lograr acción antimicobacteriana logre llegar a los sitios vulnerables del bacilo. <sup>(30)</sup>

**4.8. ANÁLISIS COMPARATIVO DE LA ACTIVIDAD ANTITUBERCULOSA DE LOS EXTRACTOS ETANOLICOS Y AGLICONAS DE FLAVONOIDES DE LAS ESPECIES: *Grindelia boliviana* Rusby (CH'IRI CH'IRI) Y *Chenopodium incisum* Poir (ARQ'A PAIQO) FRENTE A *Micobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv.**

**4.8.1. Análisis comparativo de la actividad antituberculosa de los extractos etanolicos de *Grindelia boliviana* Rusby (Ch'iri ch'iri) y *Chenopodium incisum* Poir (Arq'a paiqo) frente a *Micobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv.**

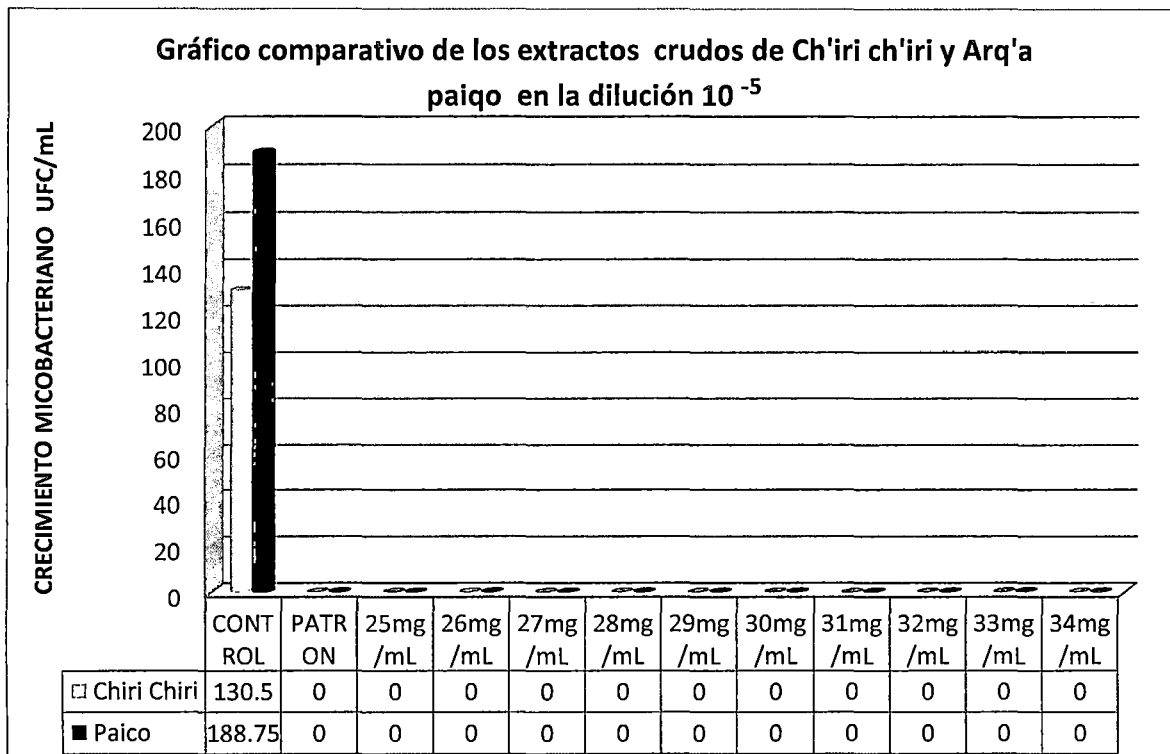


**GRÁFICO N° 05:** Análisis comparativo de la actividad antituberculosa de los extractos etanólicos de *Grindelia boliviana* Rusby (Ch'iri ch'iri) y *Chenopodium incisum* Poir (Arq'a paiqo) frente a *Micobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv

**INTERPRETACION DE RESULTADOS**

El GRÁFICO N° 05, representa la media del número de colonias contabilizadas en las diferentes concentraciones utilizadas del extracto etanólico de *Grindelia boliviana* Rusby (Ch'iri ch'iri) Y *Chenopodium incisum* Poir (Arq'a paiqo) frente a cepas de *Micobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv en la dilución 10<sup>-3</sup> comparando ambos extractos etanólicos (Ch'iri ch'iri y Paiqo) frente a *Micobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv se puede observar que el extracto etanólico de paiqo es el que posee mayor actividad antituberculosa comparado con el Ch'iri ch'iri debido probablemente a la presencia de una mayor concentración de flavonoides.

En conclusión *Micobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv presenta sensibilidad variable frente a las diferentes concentraciones de los extractos etanólicos de Ch'iri ch'iri y Arq'a paiqo.



**GRÁFICO N° 06:** Análisis comparativo de la actividad antituberculosa de los extractos etanólicos de *Grindelia boliviana* Rusby (Ch'iri ch'iri) y *Chenopodium incisum* Poir (Arq'a paiqo) frente a *Micobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv a la dilución de 10<sup>-5</sup>

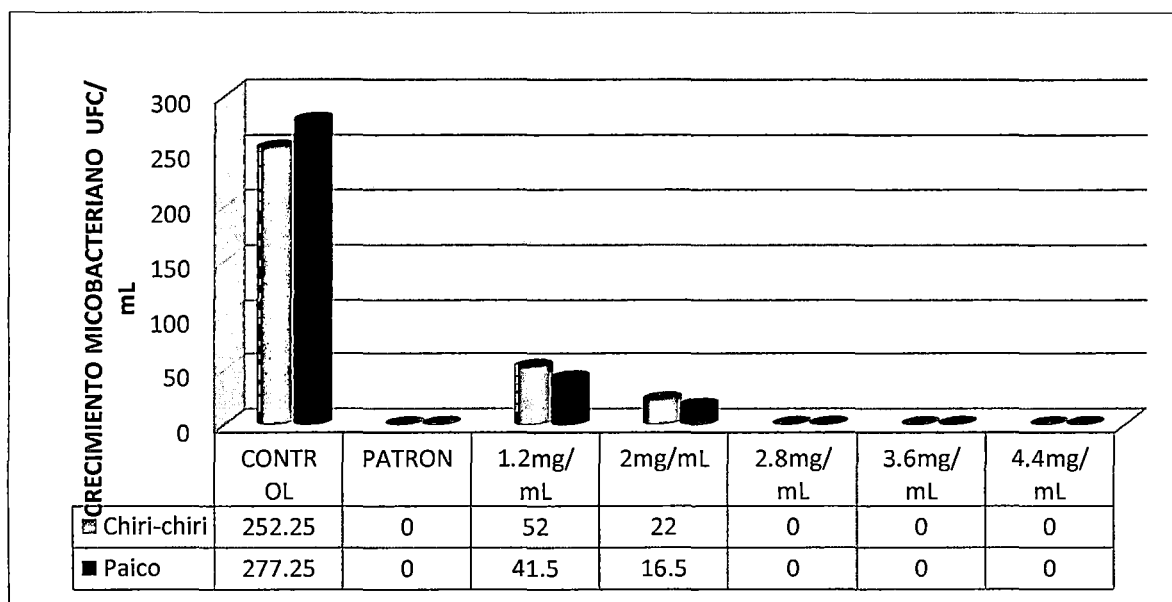
### INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

EL GRÁFICO N° 06, representa la media del número de colonias contabilizadas en las diferentes concentraciones utilizadas del extracto etanólico de *Grindelia boliviana* Rusby (Ch'iri ch'iri) Y *Chenopodium incisum* Poir (Arq'a paiqo) frente a cepas de *Micobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv en la dilución 10<sup>-5</sup>.

Comparando ambos extractos etanólicos (Ch'iri ch'iri y Arq'a Paiqo) frente a *Micobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv se puede observar que tanto el extracto etanólico de Arq'a paiqo y Ch'iri ch'iri a la dilución de 10<sup>-5</sup> presentan una actividad antituberculosa similar a la del fármaco patrón Rifampicina (sigma)

En conclusión *Micobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv presenta sensibilidad variable frente a las diferentes concentraciones de los extractos etanólicos de Ch'iri ch'iri y Arq'a paiqo.

#### 4.8.2. ANÁLISIS COMPARATIVO DE LA ACTIVIDAD ANTITUBERCULOSA DE AGLICONAS DE FLAVONOIDES DE LAS ESPECIES: *Grindelia boliviana* Rusby (CH'IRI CH'IRI) Y *Chenopodium incisum* Poir (ARQ'A PAIQO) FRENTE A *Micobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv



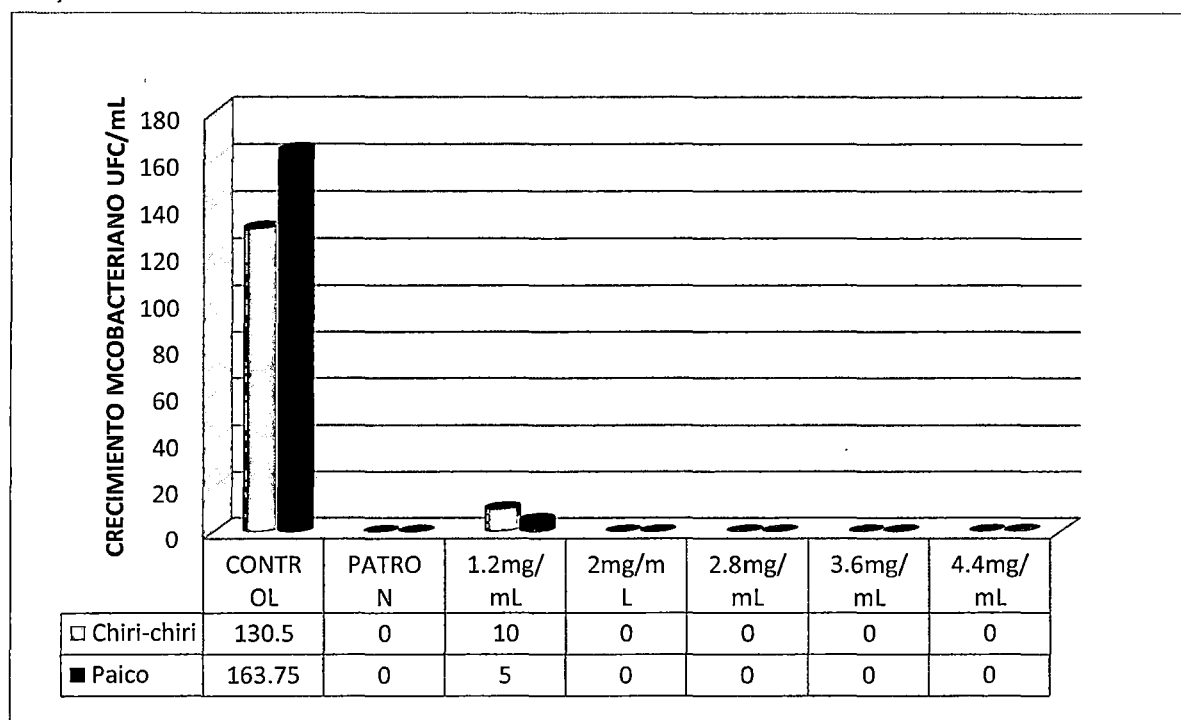
**GRÁFICO N° 07:** Análisis comparativo de la actividad antituberculosa de las agliconas de flavonoides de *Grindelia boliviana* Rusby (Ch'iri ch'iri) y *Chenopodium incisum* Poir (arq'a paiqo) frente a *Micobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv.

#### INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

El GRÁFICO N° 07, representa la media del número de colonias contabilizadas en las diferentes concentraciones utilizadas de las agliconas de flavonoides de *Grindelia boliviana* Rusby (Ch'iri ch'iri) Y *Chenopodium incisum* Poir (Arq'a paiqo) frente a cepas de *Micobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv en la dilución 10<sup>-3</sup>.

Comparando ambos resultados de las agliconas de flavonoides de (Ch'iri ch'iri y Arq'a paiqo) frente a *Micobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv se puede observar que las agliconas de flavonoides de Arq'a paiqo es la que posee mejor actividad antituberculosa comparado con el Ch'iri ch'iri.

En conclusión *Micobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv presenta sensibilidad variable frente a las diferentes concentraciones de agliconas de flavonoides de Ch'iri ch'iri y Arq'a paiqo



**GRÁFICO N° 08:** Análisis comparativo de la actividad antituberculosa de las agliconas de flavonoides de *Grindelia boliviana* Rusby (Ch'iri ch'iri) y *Chenopodium incisum* Poir (Arq'a paiqo) frente a *Micobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv a la dilución de 10<sup>-5</sup>

#### INTERPRETACION DE RESULTADOS

El gráfico N° 08 representa la media del número de colonias contabilizadas en las diferentes concentraciones utilizadas de las agliconas de flavonoides de *Grindelia boliviana* Rusby (Ch'iri ch'iri) Y *Chenopodium incisum* Poir (Arq'a paiqo) frente a cepas de *Micobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv en la dilución 10<sup>-5</sup>.

Comparando ambos resultados de las agliconas de flavonoides de (Ch'iri ch'iri y Arq'a paiqo) frente a *Micobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv se puede observar que tanto para las agliconas de flavonoides del Arq'a paiqo y Ch'iri ch'iri a la dilución de 10<sup>-5</sup> presentan una actividad antituberculosa similar a la del fármaco patrón Rifampicina (sigma).

En conclusión *Micobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv presenta sensibilidad variable frente a las diferentes concentraciones de las agliconas de flavonoides de Ch'iri ch'iri y Arq'a paiqo.

#### DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En la comparación de la actividad antimicrobacteriana, de los extractos de la fracción de flavonoides, *Chenopodium incisum* Poir presentó el mejor resultado sobre la inhibición de *Micobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv, este resultado se explicaría por la presencia de una mayor concentración de aglicona Kaempferol, al que le atribuimos la actividad antimicrobacteriana, esto debido a que en su estructura presenta un grupo hidroxilo en el carbono 3 de anillo C, que según estudios reportados por Ting w et al. 2013<sup>(15)</sup> aumentaría la actividad antibacteriana.

## CONCLUSIONES.

1. Se determinó la actividad antituberculosa in vitro de los extractos etanólicos al 70% y de agliconas de flavonoides de *Grindelia boliviana* Rusby (Ch'iri ch'iri) Y *Chenopodium insisum* Poir (Arq'a paiqo) sobre cepas de *Micobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv.  
 Los extractos etanólicos tanto de Ch'iri ch'iri Y Arq'a paiqo presentaron actividad antituberculosa frente a *Micobacterium tuberculosis* a las concentraciones de 25 mg/mL, 26 mg/mL, 27 mg/mL, 28 mg/mL, 29 mg/mL, 30 mg/mL, 31 mg/mL, 32 mg/mL, 33 mg/mL, 34 mg/mL. Para ambos extractos, lo dicho anteriormente se demostró con la inhibición del crecimiento de colonias de micobacterias. Las agliconas de flavonoides tanto de Ch'iri ch'iri y Arq'a paiqo presentaron actividad antituberculosa frente a *Micobacterium tuberculosis* a las concentraciones de 1.2 mg/mL, 2 mg/mL, 2.8 mg/mL, 3.6 mg/mL, y 4.4 mg/mL, indistintamente para ambos extractos, lo dicho anteriormente se demostró con la inhibición del crecimiento de colonias de micobacterias.
2. Se obtuvo el extracto seco etanólico al 70 % de las partes aéreas de *Grindelia boliviana* Rusby (Ch'iri ch'iri), el cual tubo un 72.88% de porcentaje de humedad, 16.216% de porcentaje de rendimiento, presenta mayor solubilidad frente a solventes polares, en el análisis fitoquímico se identificaron en abundante cantidad flavonoides y compuestos fenólicos, en moderada cantidad azúcares reductores y ausencia de alcaloides, lactonas, quinonas, taninos y saponinas, para el *Chenopodium insisum* Poir (Arq'a paiqo) se obtuvo el extracto seco etanólico al 70% de las partes aéreas, el cual tubo un 77.95% de porcentaje de humedad, 14.049% de porcentaje de rendimiento, presenta mayor solubilidad frente a solventes polares, en el análisis fitoquímico se identificaron, flavonoides y compuestos fenólicos en abundante cantidad, azúcares reductores en moderada cantidad, alcaloides, saponinas en escasa cantidad y ausencia de lactonas, quinonas y taninos.
3. Se obtuvo agliconas de flavonoides por el método de extracción con solventes, hidrólisis ácida y purificación de *Grindelia boliviana* Rusby (Ch'iri ch'iri) y *Chenopodium incisum* Poir (Arq'a paiqo).
4. Se identificó por el método de HPLC con detector UV-Vis, la presencia de agliconas de flavonoides de las especies: *Grindelia boliviana* Rusby (Ch'iri ch'iri) y *Chenopodium incisum* Poir (Arq'a paiqo).
5. Se determinó la actividad antituberculosa in vitro de los extractos etanólicos de *Grindelia boliviana* Rusby (Ch'iri ch'iri) Y *Chenopodium incisum* Poir (Arq'a paiqo) por el método de CANETTI, RIST Y GROSSET 1963; los que presentaron actividad frente a las cepas de *Micobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv causante de la tuberculosis y se demostró que el extracto etanólico de *Chenopodium incisum* Poir (Arq'a

paiqo) presentó una buena actividad inhibitoria sobre todo a partir de la concentración de 29 mg/mL donde existe una total inhibición del crecimiento bacteriano. Respecto al extracto de *Grindelia boliviana* Rusby (Ch'iri ch'iri) presentó una actividad antimicobacteriana a la concentración de 33mg/mL.

6. Se determinó la actividad antituberculosa in vitro de las agliconas de flavonoides presentes en los extractos hidrolizados y purificados de *Grindelia boliviana* Rusby (Ch'iri ch'iri) Y *Chenopodium incisum* Poir (Arq'a paiqo) por el método de CANETTI, RIST Y GROSSET 1963; los que presentaron actividad frente a las cepas de *Micobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv causante de la tuberculosis y se demostró que las agliconas de flavonoides de *Chenopodium incisum* Poir (Arq'a paiqo) presentó una buena actividad inhibitoria sobre todo a partir de la concentración de 2.8 mg/mL donde existe una total inhibición del crecimiento bacteriano.



## SUGERENCIAS Y RECOMENDACIONES

### **A los investigadores de la escuela profesional de Farmacia y Bioquímica.**

1. Para la identificación y cuantificación de metabolitos secundarios es necesario que nuestra escuela profesional de Farmacia y Bioquímica cuente con un stock de estándares para facilitar la identificación de metabolitos secundarios.
2. Debido a la gran importancia de estas especies vegetales en el tratamiento de la tuberculosis se debería continuar con su estudio utilizando otros sistemas de evaluación *in vitro* a fin de confirmar su actividad antituberculosa.
3. Estudiar nuevas especies vegetales que desde la perspectiva etnomédica han demostrado tener propiedades antimicobacterianas, a fin de potenciar el aprovechamiento de los recursos naturales en beneficio de la salud y el bienestar de la población.
4. Motivar a los estudiantes a continuar con los estudios a futuro en la fase clínica teniendo como antecedentes los estudios previos realizados en plantas medicinales.
5. Este trabajo aporta la introducción de dos plantas al campo de la investigación dirigida a encontrar nuevos productos naturales contra la tuberculosis.
6. Utilizar fármacos antituberculosos relacionados estructuralmente a los principios activos encontrados en las plantas medicinales en estudio.
7. Analizar y estudiar los efectos terapéuticos de las plantas para conocer los principios activos responsables de cortar, aliviar o curar las enfermedades, separarlos de las plantas que lo contienen, determinar sus estructuras químicas, procurar su síntesis, proponer modificaciones estructurales en busca de una mayor actividad.

### **A las autoridades y docentes.**

1. Implementar los laboratorios de la escuela profesional de Farmacia y bioquímica, con equipos dedicados a la investigación científica para facilitar la ejecución de los trabajos de investigación y su respectiva capacitación.

## BIBLIOGRAFÍA

- 1 Organización Mundial de la Salud (OMS), Directrices sobre la conservación de plantas medicinales [serie en internet]. 1998 mar [acceso 21 oct 2013]: 4-5. disponible en: [http://www.urosario.edu.co/urosario\\_files/57/571bf298-6ad8-4b7f-b43226a6fb78e6de.pdf](http://www.urosario.edu.co/urosario_files/57/571bf298-6ad8-4b7f-b43226a6fb78e6de.pdf)
- 2 Daza Pérez R.M. Resistencia bacteriana a antimicrobianos: su importancia en la toma de decisiones en la práctica diaria. Información Terapéutica del Sistema Nacional de Salud [serie en internet] 1998 Marz [acceso 18 oct 2013] 22 (3). Disponible en: <http://www.isciii.es/htdocs/pdf/resistencia.pdf>
- 3 Brack Egg Antonio. Diccionario enciclopédico de plantas útiles del Perú. 1999. Centro de Estudios Regionales Andinos Bartolomé de las Casas. Pág. 130-229.
- 4 Moscoso Castilla, Mariano. Secretos Medicinales de la Flora Peruana y Guía de la Maternidad; Cusco. Editorial ALPHA - 4 Ed. 1997 Pág. 34.
- 5 Guevara Ochoa, Laura; Dueñas Corrido Gloria Centro de Estudios Regionales Andinos Bartolomé de las Casas Cusco "plantas medicinales trece fichas completas. 2001.
- 6 Arcos Reyes, Delia Infantas "Actividad anti-inflamatoria de *Grindelia boliviana* (Ch'iri ch'iri) en ratas". [Tesis de pregrado]. Lima. Publicación de La Universidad Nacional Agraria La Molina (EDITORIAL AGRARIA); 2003. Disponible en: <http://www.lamolina.edu.pe/Investigacion/web/anales/pdfanales/LIII%20A.pdf>
- 7 Ministerio de Salud/Documento técnico: Impacto Socioeconómico de la Tuberculosis en el Perú 2010. Estrategia Sanitaria nacional de Prevención y Control de Tuberculosis (ESN-PCTB) [serie en internet]. 2012 Feb. [Acceso 12 oct 2013]: 1 ed: 15-16. Disponible en: <http://bvs.minsa.gob.pe/local/minsa/1820.pdf>.
- 8 Baquero E, Benavides J, Sepúlveda L, Quiñones W, Torres F, Cardona D, Et al. Actividad antimicrobacteriana de algunas plantas de la flora Colombiana. Scientia Et Technica. [Serie en internet]. 2007 May. [Acceso 02 oct 2013]: 13 (33):134-135. Disponible en: <http://www.google.com.pe/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0CBoQFjAA&url=http%3A%2F%2Frevistas.utp.edu.co%2Findex.php%2Frevistaciencia%2Farticle%2Fdownload%2F6157%2F3215&ei=cCUzVNq5JcW4ggSF2YGwCw&usq=AFQjCNFIiamHNA2erJuK6ND2lqlwcASYw&bvm=bv.76802529,bs.1,d.eXY>
- 9 Bonilla Asalde, Cesar. Estrategia Sanitaria Nacional de Control y Prevención de la

Tuberculosis del Ministerio de Salud (MINSA). [serie en internet].2008 Set [acceso 14 octubre 2013 ] 2-3 Disponible en:

[http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S172859172008000300009&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S172859172008000300009&script=sci_arttext)

- 10 Vidal A, García R, Alcántara P, Seclén Y, Ávalos A, Castañeda Y, et al. Situación de la tuberculosis. Bol Epi Es Salud. [Serie en internet].2012 Mar. [Acceso 29 Nov 2013]: Ed 3°. 1-3 Disponible en:  
[http://www.essalud.gob.pe/noticias/boletinepidem\\_2012\\_3.pdf](http://www.essalud.gob.pe/noticias/boletinepidem_2012_3.pdf)
- 11 DIRESA Cusco. Análisis de la situación de salud Cusco 2008. [serie en internet] 2008 May [acceso 18 oct 2013]Disponible en  
<http://www.diresacusco.gob.pe/inteligencia/epidemiologia/asis/Asis%202008/asis2008.htm>
- 12 Moncada N, Farsio M, Rojas C, Trevisan D, Horna O, Pereyra J, Delgado G. Actividad Biológica de *Plumbago Scandens L.* sobre Cepas Multidrogo resistente de *Mycobacterium tuberculosis*. Bol Latinoam Caribe Plant Med y Aromat. [Serie en internet]. 2011 22 Mar [acceso 28oct 2013]: 10(3): 243 -244 disponible en:  
<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=85618379007>
- 13 Hernández Nancy E, Tereschuk M L, Abdala L.R. Antimicrobial activity of flavonoids in medicinal plants from Tafi del Valle. Universidad Nacional de Tucuman. Argentina. Journal of Ethnopharmacology [Serie en internet].2000 Junio. [Acceso 20 Feb 2014]: 73 (2000) 317 – 322 Disponible en:  
[http://www.researchgate.net/publication/12299003\\_Antimicrobial\\_activity\\_of\\_flavonoids\\_in\\_medicinal\\_plants\\_from\\_Tafi\\_del\\_Valle\\_\(Tucuman\\_Argentina\)](http://www.researchgate.net/publication/12299003_Antimicrobial_activity_of_flavonoids_in_medicinal_plants_from_Tafi_del_Valle_(Tucuman_Argentina))
- 14 Mandalari G, Bennett R N, Bisignano G, Trombetta D, Saija A, Faulds C.B, Gasson M J, and Narbad A. "Antimicrobial activity of flavonoids extracted from bergamot (*Citrus bergamia* Risso) peel, a byproduct of the essential oil industry". Department of Pharmacobiology, University of Messina, Messina, Italy. Journal of Applied Microbiology ISSN 1364-5072. [Serie en internet]. 2014 June [acceso 28 oct 2014]: vol 94: 163–172 disponible en:  
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2672.2007.03456.x/epdf>
- 15 Ting W, Mengying É, Xixi Z, Ying Z, Tianfu Q, Siyi P, Xiaoyun X. A structure–activity relationship study of flavonoids as inhibitors of *E. coli* by membrane interaction effect. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes [Serie en internet]. 2013 noviembre [acceso 28 oct 2014]: 1828(11), 2751–2756pdisponible en:  
[http://ac.els-cdn.com/S0005273613002757/1-s2.0-S0005273613002757main.pdf?tid=35fe007c-2aa7-11e5-8c00-0000aacb362&acdnat=1436933515\\_bc612a2a56a2d5f7a2d5598da77e1bee](http://ac.els-cdn.com/S0005273613002757/1-s2.0-S0005273613002757main.pdf?tid=35fe007c-2aa7-11e5-8c00-0000aacb362&acdnat=1436933515_bc612a2a56a2d5f7a2d5598da77e1bee)
- 16 Natasa Poklar Ulriha, Maja Maričić, Ajda Ota, Marjeta Šentjunc, Veronika Abrama. Kaempferol and quercetin interactions with model lipid membranes. Department of Food Science and Technology. Food Research International [Serie en internet]. 2014

Diciembre [acceso 28 abril 2015]: 71 (2015) 146–154. Disponible en:  
[http://www.sciencedirect.com/science?\\_ob=ShoppingCartURL&method=add&eid=1-s2.0-S0963996915001076&originContentFamily=serial&origin=article&ts=1436934619&md5=13d635c561e4caaba9d34d90a6c398ec](http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ShoppingCartURL&method=add&eid=1-s2.0-S0963996915001076&originContentFamily=serial&origin=article&ts=1436934619&md5=13d635c561e4caaba9d34d90a6c398ec)

- 17 Kao T.H., Lu Y.F., Hsieh H. C., Chen B. H., estabilidad de glicosidos de isoflavona durante el procesado de leche de soya y tofu. Departamento de ciencia de alimentos y nutrición. Universidad de Taipei- Taiwan. Rev. Food Research international 2004; 37: 891-900
- 18 Suksamrarn A, Poomsing P, Aroonrerk N, Punjanon T, Suksamrarn S, Kongkun S. Antimycobacterial and antioxidant flavones from *Limnophila geoffrayi*. US National Library of Medicine National Institutes of Health. [Serie en internet]. 2003 Oct. [Acceso 19 junio del 2014]: 26(10):816-20. Disponible en:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14609129>
- 19 Song K, Wang HQ, Liu C, Kang J, Li BM, Chen RY. “Constituyentes Químicos de *Chenopodium ambrosioides*”. PubMed – Medline.
- 20 Ferrares F, Grosso CI, Izquierdo A G, Valentão P, Azevedo, Andrade P. “Análisis por HPLC-DAD-ESI / MSN de compuestos fenólicos para el control de calidad de *Grindelia robusta* Nutt. Y bioactividades”. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis . [Serie en internet]. 2013 junio [Acceso 19 julio del 2014]: Volume 94. 163–172. Disponible en:  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0731708514000831>
- 21 Otsuka, N, Liu M H, Shiota S, Ogawa W, Kuroda T, Hatano T, Tsuchiya T. Anti-methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) compounds isolated from *Laurus nobilis*. *Biol. Pharm. Bull.* [Serie en internet]. 2008 Setiembre [Acceso 19 Diciembre del 2013]: 31(9):1794-1797. Disponible en:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18758079>
- 22 Garion Villers, yves Fougere. Kaempferol chemistry, natural occurrences and health benefits. Biochemistry research trends. *Published by Nova Science Publishers, Inc. New York.* [Serie en internet]. 2013. [Acceso 19 diciembre del 2013]: 978. 1-62618-516-6. 1- 249 p Disponible en:  
<http://www.aktinchem.com/product/18/kaempferol279.html?gclid=CKGRidyv3MYCFVGAaQod3GoBBA>
- 23 Lock de Ugaz O. Investigación Fitoquímica, Método en el estudio de productos Naturales. Pontificia universidad católica del Perú. Fondo editorial - 2 Ed. 1994 Pág. 91-136
- 24 Lacuta Huanqui, Carlos Giraldo. “Determinación del contenido total de polifenoles - Flavonoides y Actividad Antibacteriana del Extracto seco hidroalcohólico al 70% de las hojas de la especie vegetal *Populus nigra linnaeus* “Álamo negro” sobre cepas ATCC de *Propionibacterium acnés* y *staphylococcus aureus* causantes principales de

acné"[Tesis para optar el título de químico farmacéutico].Cusco: Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco. 2012.

- 25 Oviedo Licon, Asunción Yovana; Aiquipa Huaman Katy. "Estudio Comparativo in Vitro de la Actividad Antibacteriana de los Extractos Secos Hidroalcohólicos al 70 % de las hojas de *Psidium guajava* (Sahuinto) y *Chenopodium ambrosioides* (Paico) frente a Bacterias que causan infecciones de las vías Respiratorias y determinación de la Toxicidad Aguda en Animales de Experimentación. [Tesis para optar el título de químico farmacéutico]. Cusco: Universidad San Antonio Abad del Cusco; 2011.
- 26 Maquera Cueva, Luz Eliana; Menacho Duran Emily July. "Actividad Antituberculosa in vitro del Extracto Etanólico de *Spergularia stenocarpa* (phillipi) JM Johnston "choquetakarpu" y Evaluación de la Toxicidad Aguda. [Tesis para optar el título de químico farmacéutico].Cusco: Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco. 2011.
- 27 Mendocilla, Moises; Villar Lopez, Marta, Manual de Fitoterapia, Monografías de plantas medicinales (capítulo VII). [Serie en internet]. 1998. [acceso 29 Nov 2013]: pag 251. Disponible en:  
<http://www.bvsde.paho.org/texcom/manualesMEC/fitoterapia/cap7.pdf>
- 28 Luis Ayala Rosario; Machaca Cañasaire Miguel Ángel. Estudio Farmacognóstico y Determinación de la Actividad Antituberculosa de *Spergularia media* (L.) Griseb "Choquetacarp". [Tesis para optar el título de Químico Farmacéutico] Lima. Programa Cybertesis PERÚ. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 2007. Disponible en:  
[http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/cybertesis/1500/1/machaca\\_cm.pdf](http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/cybertesis/1500/1/machaca_cm.pdf)
- 29 Alvarado J, Vásquez H, Delgado G, Rojas C, Trevisan D, Horna O, Pereyra J. Actividad inhibitoria de plantas in vitro de *Drosera capillaris* sobre *mycobacterium tuberculosis*. Rev. Perú. Biol. UNMSM [Serie en internet].2010 Dic. [acceso setiembre 2014]: 17 (3): 357 -358 disponible en:  
<http://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/rpb/article/view/10>
- 30 Salinas Fonzales Noe Rafael (2004). Análisis de la Actividad de extractos Crudos de *Juglans Regia L* , *Juglan Mollis* y *Carya Illinoensis* contra *Mycobacterium Tuberculosis*, "[Tesis para optar el título de Maestro en Ciencias con especialidad en Química de productos naturales]. San Nicolas de los Garza. Universidad Autónoma de Nuevo León. 2004. Disponible en:  
<http://eprints.uanl.mx/1584/1/1020150253.PDF>
- 31 Camacho Corona Maria del Rayo, Gonzales Santiago Omar, Garza Gonzales Elvira, Delgado Lamas Guillermo, Luna Herrera Julieta. "Actividad antimicobacteriana de algunos alcaloides, flavonoides, terpenos y quinonas. Facultad de Ciencias Químicas, Universidad autónoma de nuevo león. España (2007).

- 32 Rosella, Maria Adelaida; Rojas Duran Rosario, Aquila Silvia V, Spegazzini, Etile Dolores y Debenetti, Silvia Laura. "Actividad Antimicobacteriana in vitro de Gaillardia cabrerae y G. megapotamica var. Scabiosoides (asteraceae)". Latin American Journal of Pharmacy, vol 29-05. Argentina (2010).
- 33 Jozwik Z, Trytek J. Efecto de extractos de propóleos que contienen compuestos flavonoides en bacilos ácido resistente. Instituto de la Universidad Minufiya Egipto Asian Pacific Journal. [serie en internet]: 1985. [acceso 10 oct 2013]: vol. 7. 2006. Disponible en:  
<http://tesis.uson.mx/digital/tesis/docs/21766/Antecedentes.pdf>
- 34 Organización Mundial de la Salud. Tuberculosis. Centro de prensa de la OMS [serie en internet ] 2214 Mar, [acceso 02 oct 2014]: 22 (2): Disponible en:  
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/es/>
- 35 Munayco C. Situación Epidemiológica de la tuberculosis en el Perú. Bol Epidemiol (Lima). [serie en internet ] 2010 Mar [acceso 02 oct 2014]: 19(12): 210 - 211: Disponible en:  
<http://www.dge.gob.pe/boletines/2010/12.pdf>
- 36 Instituto Peruano de economía. Cero TBC en el Perú, aún falta. [Serie en internet]. 2012. [acceso 08 oct 2014]: Disponible en:  
<http://ipe.org.pe/content/cero-tbc-en-el-peru-aun-falta>
- 37 Salas Serrano Berta. Respira Vida, juntos contra la tuberculosis. Estrategia sanitaria de prevención y control de la tuberculosis [serie en internet]. 2014 Feb. [acceso 09 oct 2014]: Disponible en:  
[http://es.slideshare.net/respirandovida/avances-y-desafos-en-la-respuesta-a-la-tb-cusco?next\\_slideshow](http://es.slideshare.net/respirandovida/avances-y-desafos-en-la-respuesta-a-la-tb-cusco?next_slideshow)
- 38 Castillo castilla David, woolrich zavaleta Nallely Lisbeth. Identificación química de compuestos fenólicos por cromatografía de HPLC con detector Uv de extractos etanólicos de propóleos recolectados en la zona córdoba - Orizaba [Tesis para optar título de Químico Industrial].Veracruz. [Serie en internet]. 2009 Feb. [Acceso 08 oct 2010]: pag23 -35. Disponible en:  
<http://cdigital.uv.mx/bitstream/123456789/31069/1/CastilloGarciaYWoolrichGarcia.pdf>
- 39 Villar del Fresno A. farmacognosia general. España. Editorial síntesis S.A :1999
- 40 Aldana Cerna F D. Detección y cuantificación de flavonoides en *Polypodium triseriale swartz*, *Phlebodium decumanum* (willd.) j. sm. Y *Phlebodium pseudoaureum* (cav.) lellinger; tres especies de calahuala nativas de Guatemala. [Tesis de Maestría en Cs. Químicas y farmacia]. Guatemala. Universidad de San Carlos de Guatemala. 2007. Disponible en:  
[http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/06/06\\_2615.pdf](http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/06/06_2615.pdf)

- 41 Ballester Espigares I M. "Relacion etructura actividad de los flavonoides como agentes antiinflamatorios intestinales" [Tesis para optar el grado de Doctor].España. Universidad de Granada. 2006.
- 42 Wallace R, Burong w. Extraccion de Flavonoides .oficina Española de patentes y marcas. [serie en internet ] 2006, [acceso 15 may 2015]: 75 (2): p. 1-2.
- 43 Vidal Mas D. Estudio de flavonoides en líneas de selección de "Dianthus caryophylus l" [Tesis para optar el grado de Doctor en Biología]. España. Universidad de Barcelona. 1973. .
- 44 Skoog D, West D, Holler F. Fundamentos de química analítica, Vol. 2. 4 Ta ed. Barcelona: Editorial Reverte S.A; 1997.pag.710-719.
- 45 Rubinson J.F, Rubinson K.A. Química Analítica Contemporanea 2000, <http://es.slideshare.net/Sandyvb78/cromatografia-aspectos-generales>
- 46 Coni Emilio, Chaben Mario, Malbrán Carlos. Epidemiología etiológica. Asociación Alemana de Asistencia al Enfermo con Lepra y Tuberculosis [serie en internet]: 2007. [acceso 22 oct 2013] disponible en: <https://es.scribd.com/doc/209863212/Tuberculosis>
- 47 Hidalgo Polet V. Caracterización y clasificación estructural, aplicaciones y funciones generales de los taninos y flavonoides. [Tesis para optar el título de Bioquímico Clínico].Ecuador. Universidad Central del Ecuador. 2009. Disponible en: <http://qorganicauce.wikispaces.com/file/view/UNIVERSIDAD+CENTRAL+DEL+ECUAD+ORo2pdf.pdf>
- 48 Echazarreta Alberto. La Tuberculosis en Nuestro Tiempo. Asociación argentina de medicina respiratoria. Rev. A tu salud. [serie en internet ] : 2012 set: [acceso 20 oct 2013]: Disponible en: [http://mariananisebe.blogspot.com/2012\\_09\\_01\\_archive.html](http://mariananisebe.blogspot.com/2012_09_01_archive.html)
- 49 Gómez Ayala Adela Emilia. Tuberculosis. Abordaje farmacoterapéutico. Rev. Offarm. [serie en internet ] : 2007 Nov. [acceso 17 oct 2013]: 26 (10): pag 88-96: Disponible en: [http://zl.elsevier.es/es/revista/offarm-4/tuberculosis-abordaje-farmacoterapeutico-13112894-ambito\\_farmaceticofarmacoterapia-2007](http://zl.elsevier.es/es/revista/offarm-4/tuberculosis-abordaje-farmacoterapeutico-13112894-ambito_farmaceticofarmacoterapia-2007)
- 50 Liceaga Eduardo. Tuberculosis pulmonar. Guías diagnósticas de neumología Hospital General de México. [serie en internet ] : 2010 [acceso 20 oct 2013]: 4-5 Disponible en: [http://www.hgm.salud.gob.mx/interior/area\\_medica/neumo/guias.html](http://www.hgm.salud.gob.mx/interior/area_medica/neumo/guias.html)

- 51 Rodríguez Jorge. Comisión honoraria para la lucha antituberculosa y enfermedades prevalentes – CHLA-EP departamento de tuberculosis. [serie en internet]: 2007. [acceso 22 oct 2013] disponible en:  
<http://www.chlaep.org.uy/descargas/publicaciones/definicion-y-patogenia.pdf>
- 52 Medina Gallardo J F, Calero Acuña C, Álvarez Gutiérrez F.J y Romero Falcón A. Tuberculosis pulmonar. Hospital Universitario Virgen del Rocío. Sevilla. [serie en internet]: 2010. [acceso 08 oct 2014] 10(67): 4588 - 4589 : disponible en:  
[http://www.medicineonline.es/medicine/ctl\\_servlet? f=70&idsec=13002802](http://www.medicineonline.es/medicine/ctl_servlet? f=70&idsec=13002802)
- 53 Manzano J R, Blanquer R, Calpe J L, Caminero J A, Cayla J, Dominguez J L, et al. Diagnóstico y tratamiento de la tuberculosis. Normativa Cepar. [serie en internet ] :2008 [acceso 20 oct 2013]: 44(10) : 551-556 , Disponible en:  
<http://www.cedepap.tv/GPC14.pdf>
- 54 Norma técnica de salud para el control de la tuberculosis / Ministerio de Salud. Dirección General de Salud de las Personas. Estrategia Sanitaria Nacional de Prevención y Control de la Tuberculosis. Lima: Ministerio De Salud; 2006,[serie en internet]:2006 Abr. [acceso 22 oct 2013]:1°ed. 272 p. disponible en:  
<ftp://ftp2.minsa.gob.pe/descargas/dgsp/ESNtuberculosis/normaspublicaciones/NTST BC.pdf>
- 55 Modificación del Tratamiento de la Norma técnica de Salud para el Control de la tuberculosis, Aprobada según Resolución ministerial N° 579-2010/MINSA. Lima 16 de julio del 2010. [serie en internet]: 2010, Jul. [acceso 22 oct 2013]: pag 35. disponible en:  
<ftp://ftp2.minsa.gob.pe/normaslegales/2010/RM579-2010-MINSA.pdf>
- 56 Florez Jesus. Farmacología Humana. Farmacología de las infecciones por micobacterias 3° ed. España 1997 Mason s. a. pág. 115- 1127.
- 57 Godman y Gilman. las bases farmacológicas de la terapéutica. Antibioticoterapia de la Tuberculosis. 11° ed. méxico df. mcgraw-hill interamericana. volumen 2 .pag. 1203-1210
- 58 Borrero Reinier, Álvarez Nadine, Reyes Fátima, Sarmiento María Elena, Acosta Armando. Mycobacterium tuberculosis: factores de virulencia. Instituto Finlay. Centro de Investigación. Rev. VacciMonitor. [serie en internet]:2011. [acceso 22 oct 2013]: 20(1):34-38. Disponible en:  
<http://www.finlay.sld.cu/publicaciones/vaccimonitor/Vm2011/a6.pdf>
- 59 Bifani JP, Kurepina N, Musser JM, Kreiswirth BN. 1998 Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. *Mycobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv/Ra share similar IS6110 DNA fingerprint patterns with clustered clinical strains. [serie en internet]: 1998 Sep. [acceso 29 oct 2013]: 24-27; 38: 92. New Cork.: Disponible en:  
<http://gateway.nlm.nih.gov/MeetingAbstracts/ma?f=102187994.html>



- 60 Canetti G., Rist N. y Grosset J. Medida de Sensibilidad del Bacilo Tuberculoso a las Drogas Antibacilares por el Método de Proporciones. Revista Tuberculose Pneumologie Vol. 27 Pag. 217-272, del Instituto Pasteur de Paris, 1963.
- 61 Wikipedia la Enciclopedia Libre 2009 (Actualizado el 15 jun 2011, a las 11:51) Ácido-alcohol resistencia. [publicación en línea] Disponible desde internet en: <[http://es.wikipedia.org/wiki/%C3%81cido-alcohol\\_resistencia](http://es.wikipedia.org/wiki/%C3%81cido-alcohol_resistencia)> [con acceso el 10 - 2012]
- 62 Hielscher Thomas. Preservación y extracción Ultrasonica. Tecnología de ultrasonidos. Hielscher Ultrasonics GmbH. [serie en internet]:2013. [acceso 24 oct 2014]:. Disponible en: [http://www.hielscher.com/es/extraction\\_01.htm](http://www.hielscher.com/es/extraction_01.htm)
- 63 Mosby 2000. Diccionario de Medicina Enfermería y Ciencias de la Salud Ediciones Harcourt, S.A. 5ta Edición Copyright © MCMXCVIII.
- 64 Domínguez Cano, Samuel 2006. Escala de Mc Farland. Madrid. [publicación en línea] Disponible desde internet en: <<http://perso.wanadoo.es/microdominguez/c.htm>> [con acceso el octubre 2012]
- 65 Wikipedia la Enciclopedia Libre. Unidades Formadoras de Colonias. [serie en línea].2013 [acceso 22 oct 2013]:. Disponible en: [http://es.wikipedia.org/wiki/Unidad\\_formadora\\_de\\_colonias](http://es.wikipedia.org/wiki/Unidad_formadora_de_colonias).
- 66 Waksmundzka Hajnos M, mieczystaw Hajnos A, Oniszczyk T. High performance liquid chromatography in phytochemical analysis. "HPLC of Flavonoids" Chromatographyc science series vol. 102. 2010. Pag 535.
- 67 Litter Manuel. (2001) Compendio de Farmacología. 5ta ed. Editorial el ateneo. Argentina.
- 68 Keesse R, Muller R. K. Métodos de laboratorio para la química orgánica 1990.
- 69 Marston A, Hostettmann K. Flavonoid's chemistry, biochemistry and applications. "Separation and cuantification of flavonoids". 13 ed. United states. Taylor &Francis group: 2006.
- 70 Oyvind M Andersen, Kenneth R Markhan. Flavonoids. 13 ed. United states. Taylor &Francis group: 2006.
- 71 Carvajal R L, Hata U Y, Sierra M N, Rueda N D. Análisis Fitoquímico Preliminar de hojas, tallos y semillas de cupatá (*strychnos schultesiaana krukoff*).Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá. Revista Colombia Forestal / [serie en internet]: diciembre 2009. [acceso 27 Julio 2015] Vol. 12: 161-170.Disponible en:

<http://www.scielo.org.co/pdf/cofo/v12n1/v12n1a11>

- 72 T.J Mabry, K.R. Markham y M.b.Thomas.The Systematic Identification of Flavonoids. Springer Vwrlag. New York. Heidelberg. Nerlin 1970.
- 73 Leo M L, Nollet F T. Handbook of Analysis of Active Compounds in Functional Foods. United states. Taylor &Francis group. [serie en internet]: Diciembre 2000. [acceso 27 Julio 2015] pag 295. Disponible en:  
<https://books.google.com.co/books?id=9yLrG9OgfM8C&pg=PA294&lpg=PA294&dq=flavonoid+aglycones+obtained+by+acid+hydrolysis&source=bl&ots=S-9mQuWRBc&sig=B-wgChhANlpkcz9-sD2zWwX2wkA&hl=es&sa=X&ved=0CDoQ6AEwBGoVChMIwNad7uXFxwIVipyACh11IlgOR#v=onepage&q=flavonoid%20aglycones%20obtained%20by%20acid%20hydrolysis&f=false>
- 75 Sharapin N.; Materias primas vegetales para la industria de productos fitoterapéuticos. Fundamentos de Tecnología de productos fitoterapeucos, bogota-Colombia: Publicado por convenio Andres Bello. [serie en internet]:2000. [acceso 07 oct2014];pag 24.Disponible en:  
[http://books.google.com.pe/books?id=XH2HzSIJPywC&pg=PA2&lpg=PA2&dq=\(sharapin+N.;+Fundamentos+de+Tecnologia+de+productos+fitoterap%3%A9uticos,+bogota+Colombia:+cyted,+convenio+Andres+Belli;+2000.&source=bl&ots=iTorFXPDyn&sig=lq1TdO0oiNj6RII k12\\_5WT45A&hl=es&sa=X&ei=rXE8VODolbaKsQT0oYDQCA&ved=0CCgQ6AEwAg#v=onepage&q=\(sharapin%20N.%3B%20Fundamentos%20de%20Tecnologia%20de%20productos%20fitoterap%3%A9uticos%2C%20bogota%20Colombia%3A%20cyted%2C%20convenio%20Andres%20Belli%3B%202000.&f=false](http://books.google.com.pe/books?id=XH2HzSIJPywC&pg=PA2&lpg=PA2&dq=(sharapin+N.;+Fundamentos+de+Tecnologia+de+productos+fitoterap%3%A9uticos,+bogota+Colombia:+cyted,+convenio+Andres+Belli;+2000.&source=bl&ots=iTorFXPDyn&sig=lq1TdO0oiNj6RII k12_5WT45A&hl=es&sa=X&ei=rXE8VODolbaKsQT0oYDQCA&ved=0CCgQ6AEwAg#v=onepage&q=(sharapin%20N.%3B%20Fundamentos%20de%20Tecnologia%20de%20productos%20fitoterap%3%A9uticos%2C%20bogota%20Colombia%3A%20cyted%2C%20convenio%20Andres%20Belli%3B%202000.&f=false)
- 76 KAO T. H. , Lu Y. F ., Hsieh H.C., Chenb. H. Estabilidad de Glucosidos de isoflavyonas durante el procesado de leche de soya y tofu. Departamento de ciencia de alimentos y nutrición. Universidad de taipei- Taiwan. Rev. Food résearch international. 2004.- 37:891-900.  
<http://bibliotecavirtual.unl.edu.ar:8180/tesis/bitstream/1/64/4/tesis.pdf>
- 77 Brako M, zaruchi J L. Catalogue of the flowering plant and gymnosperms of peru, monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard. 45: i- XI, 1 – 1286 1993.  
<http://naturalista.conabio.gob.mx/taxa/287748-Chenopodium-incisum>
- 78 Arcos Reyes D. Actividad antiinflamatoria de Grindelia boliviana (Ch'iri ch'iri). Publicacion de la Universidad Nacional Agraria La Molina. Ed. Agraria .[serie en internet].2003 [acceso setiembre 2014]: 53(A): disponible en:  
[http://www.lamolina.edu.pe/Investigacion/web/anales/pdf\\_anales/LIII%20A.pdf](http://www.lamolina.edu.pe/Investigacion/web/anales/pdf_anales/LIII%20A.pdf)
- 79 Primo Y E. Química Orgánica Básica y aplicada de la molécula a la industria. Tomo II. España: Editorial Reverte, 2007.
- 80 Domingo D y López Brea M. Plantas con acción antimicrobiana. Rev Esp

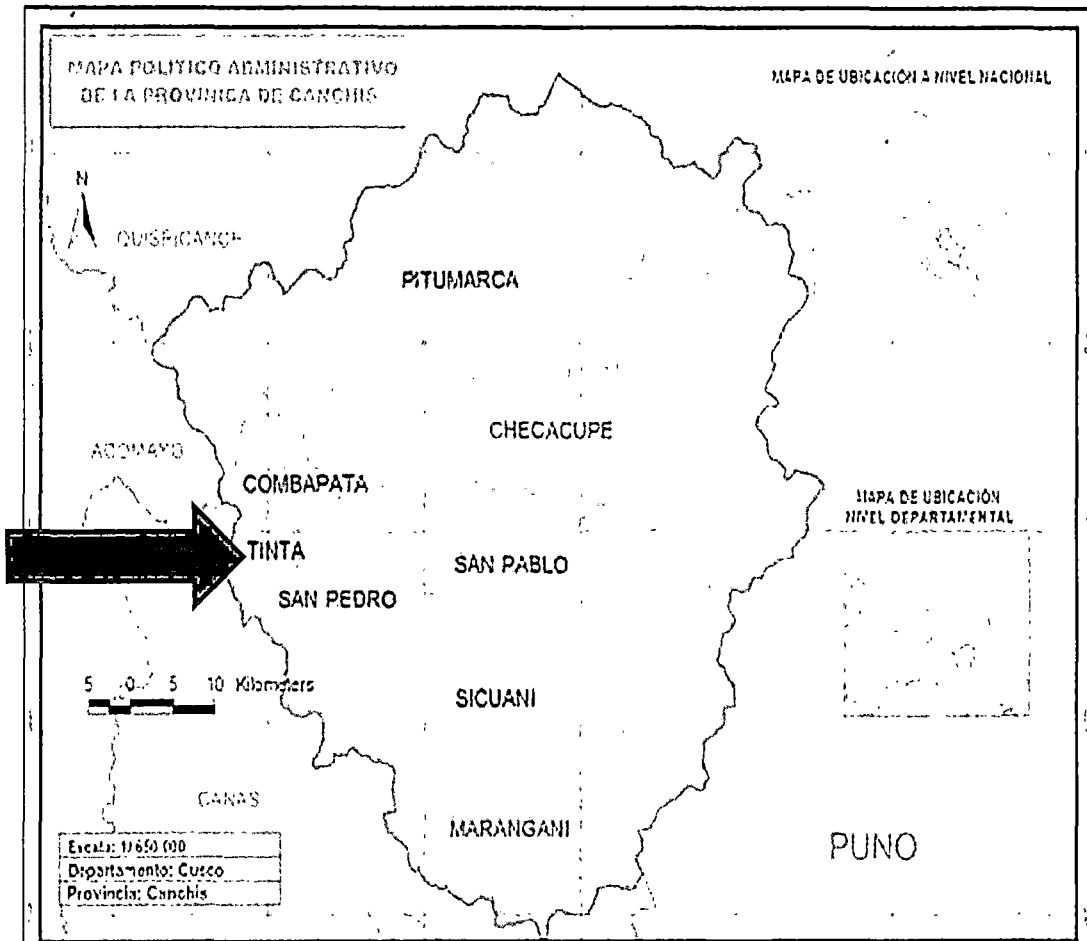
Quimioterap.[serie en internet].2003 Dic [acceso setiembre 2014]:16(4):388 -389 disponible en:

<http://www.seq.es/seq/0214-3429/16/4/385.pdf>

- 81** Manrique Antonio J, Santana Weyder C. Flavonoides, actividades antibacteriana y antioxidante de propóleos de abejas sin aguijón, *Melipona quadrifasciata*, *Melipona compressipes*, *Tetragonisca angustula* y *Nannotrigona* sp. de Brasil y Venezuela. *Zootecnia Trop. Rev. Scielo*. [serie en internet]:2009 Jun. [acceso 04 oct 2014]: 26(2):34-38. Disponible en:  
<http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:cfGLmGlXwE0J:www.scielo.org.ve/scielo.php%3Fpid%3DS079872692008000200010%26script%3Dsciarttext+%&cd=1&hl=es&ct=clnk&gl=pe>
- 82** Sotelo Indira, Casas Nidia, Camelo Gustavo. Borojó (*Borojoa patinoi*): fuente de polifenoles con actividad antimicrobiana. *Vitae*, rev. De la facultad de química farmacéutica [serie en internet]: 2010 feb. [acceso 22 oct 2013]: 17(3): págs. 329-336: disponible en:  
<http://aprendeenlinea.udea.edu.co/revistas/index.php/vitae/article/viewFile/7442/6865>
- 83** Vengoa Figueroa Rosa Ines; Tagle Carbajal Gustavo. "Actividad antibacteriana in vitro de la *Grindelia boliviana* Rusby EN CEPAS DE *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes*". [serie en internet]: Febrero 2000 . [acceso 22 oct 2013] 15(8): disponible en:  
[http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/situa/2000\\_n15/actividad.htm](http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/situa/2000_n15/actividad.htm)
- 84** Tulin Askun, Gulendam Tumen, Fatih Satil, Seyma Modanlioglu and Onur Yalcin Balikesir University Turkey. Antimycobacterial Activity Some Different Lamiaceae Plant Extracts Containing Flavonoids and Other Phenolic Compounds. Understanding tuberculosis – new approaches to fighting against drug resistance. Pag 310  
<http://cdn.intechopen.com/pdfs-wm/28845.pdf>
- 85** Lall N, Meyer J. In vitro Inhibition of drug-resistant and drug-sensitive strains of *Mycobacterium tuberculosis* by Ethnobotanically selected South African plants. *Journal of Ethnopharmacology*. Rev. Elsevier [serie en internet]:1999 Set. [acceso 22 oct 2013]: (66)(3): 347-354p: Disponible en:  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874198001858>
- 86** Maestro-Durán R, León R, Ruiz Gutiérrez V. Los compuestos fenólicos en la autodefensa de los vegetales. Consejo Superior de Investigaciones Científicas [serie en internet]:2011. [acceso 12 oct 2014]:44(6).1993.366-367. Disponible en:  
<file:///C:/Users/User/Downloads/1070-1073-1-PB.pdf>

# **ANEXOS**

## ANEXO N° 1: UBICACIÓN GEOGRÁFICA DEL LUGAR DE RECOLECCIÓN



FUENTE: <https://www.google.com.pe/search?q=MAPA+DE+CUSCO+CANCHIS+TINTA&espv=2&tbn=isch&tbo=u&source=univ&sa=X&ei=tQ0qVNTsAu>

**ANEXO N° 2: CERTIFICACIÓN DE LA CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE *Grindelia boliviana* (Ch'iri ch'iri) y *Chenopodium incisum* Poir (Arq'a paiqo).**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO**

- APARTADO POSTAL N° 921 - Cusco - Perú
- FAX: 238156 - 238173 - 222512
- RECTORADO Calle "Tigre" N° 127 Teléfonos: 222271 - 224891 - 224181 - 254398
- CIUDAD UNIVERSITARIA Av. De la Cultura N° 733. Teléfonos: 228661 - 222512 - 242370 - 232375 - 232226
- CENTRAL TELEFÓNICA: 232398 - 252210 243935 - 243936 - 243937 - 243938
- LOCAL CENTRAL Plaza de Armas s/n Teléfonos: 227571 - 225721 - 224045
- MUSEO INKA Cuesta del Almirante N° 103 - Teléfono: 237389
- CENTRO AGRONÓMICO KAYWA San Jerónimo s/n Cusco - Teléfonos: 277145 - 277246
- COLEGIO "FORTUNATO L. HERRERA" Av. De la Cultura N° 721 "Estado Universitario" - Teléfono: 227192

EL QUE SUSCRIBE, PROFESOR INVESTIGADOR ASOCIADO AL HERBARIO VARGAS (CUZ)

**CERTIFICA:**

Que las Señoritas, Juadella Ilanna Berrío Gómez y Verónica Huallpacuna Quececaño, Bachilleres de la Carrera Profesional de Farmacia y Bioquímica de la Facultad de Ciencias Físicas Químicas, Matemáticas, Farmacia e Informática de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco; han solicitado a la Dirección del Herbario Vargas (CUZ), la determinación taxonómica de dos muestras vegetales herborizadas, las que al ser diagnosticadas utilizando bibliografía especializada y claves dicotómicas, corresponden a las especies; *Chenopodium incisum* y *Grindelia boliviana*, cuyas posiciones taxonómicas de acuerdo a Cronquist (1981), compatibilizada con el Grupo del Sistema Filogenético de las Angiospermas (Angiosperm Phylogeny Group, APG III (2009), es la siguiente:



División	Magnoliophyta (=Angiospermas)
Clase	Magnoliopsida = Tricolpados (Eudicotiledóneos).
Subclase	Caryophyllidae
Super orden	Caryophyllanae
Orden	Caryophyllales
Familia	Amaranthaceae (=Chenopodiaceae)
Género	<i>Chenopodium</i>
Especie	<i>Chenopodium incisum</i> Poir.

**Sinonimias:** *Chenopodium graveolens* Lag. & Rodr., *Ch. incisum* fo. *rotundifolium* Aellen, *Ch. incisum* var. *banglii* Murr., *Dysphania graveolens* (Willd.) Mosyakin.

**Nombres comunes:** "Arq'a paiqo", "Ayara paiqo", "Aya paiqo", "Gentilpa paiqon", "Soq'a paiqo".

División	Magnoliophyta (=Angiospermas)
Clase	Magnoliopsida = Tricolpados (Eudicotiledóneos).
Subclase	Asteridae
Super orden	Asterales
Orden	Asterales
Familia	Asteraceae
Género	<i>Grindelia</i>
Especie	<i>Grindelia boliviana</i> Rusby

**Sinonimias:** No presenta.

**Nombres comunes:** "Ch'iri - ch'iri", "Cuca ch'iri", "Flor de chiri", "Lichi ch'iri".

Se expide la presente certificación, para los fines de investigación de las recurrentes.

Cusco, 10 de abril del 2014.

## ANEXO N° 3: CERTIFICACIÓN DEL LABORATORIO DE REFERENCIA REGIONAL AREQUIPA AREA DE MICOBACTERIAS

### LABORATORIO DE REFERENCIA REGIONAL AREQUIPA AREA DE MICOBACTERIAS

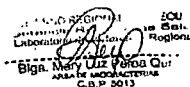
Bfga: Mary Luz Perea Quispe, encargada del área de Micobacterias del  
Laboratorio de Referencia Regional Arequipa

#### HACE CONSTAR QUE:

Las bachilleres Juadelin Ilanna Berrio Gomez y Veronica Huallpacuna Queccaño de la Carrera Profesional de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, realizaron la parte laboratorial de la tesis intitulada: "ACTIVIDAD ANTITUBERCULOSA IN VITRO DE LOS EXTRACTOS ETANOLICOS Y FRACCION DE AGLICONAS DE FLAVONOIDES TOTALES DE, *Grindelia boliviana* (CHIRI CHIRI) Y *Chenopodium incisum* (ARQ'A PAICO) SOBRE CEPAS DE *Mycobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv", en instalaciones del laboratorio de referencia regional Arequipa en el Area de Micobacterias, desde el 11 de noviembre del 2013 hasta el 25 de abril del 2014, donde se determinó la concentración mínima inhibitoria de *Mycobacterium tuberculosis* con cepas catalogadas como H<sub>37</sub>Rv,

Se expide el presente documento a petición de las interesadas para los fines pertinentes

Arequipa, Marzo del 2014



**ANEXO N° 4: ANÁLISIS FITOQUÍMICO CUALITATIVO**

- 1. Azúcares reductores:** **Prueba de Benedict:** A 0.5 ml de la solución del extracto sólido, agregar 0.2 ml del reactivo de Benedict, calentar en baño María a ebullición y se deja enfriar. La formación de un precipitado de color rojo ladrillo, indica prueba positiva.
- 2. Glicósidos:** A algunos mg del extracto se le agrega 2 mL de ácido clorhídrico al 1%, refluja por 5 minutos, enfriar neutralizar con hidróxido de sodio al 1%, luego tratar con carbón activado y filtrar, con porciones de 0.5 mL de la solución, realizar la prueba de Benedict. La formación de un precipitado de color rojo ladrillo, indica prueba positiva.
- 3. Compuestos Fenólicos:** A 0.5 mL de extracto agregar 1 a 2 gotas de cloruro férrico al 1% en solución acuosa. La presencia de precipitados o coloraciones azuladas o verdosas indican prueba positiva.
- 4. Flavonoides:** **Reacción de Shinoda:** A 0.5 mL del extracto, agregar algunas partículas de magnesio metálico y 2 a 3 gotas de ácido clorhídrico concentrado; indican prueba positiva coloraciones rojizas, tendientes a amarillo o azuladas. Las chalconas, auronas, catequina e isoflavonas no dan prueba positiva.
- 5. Alcaloides:** Solubilizar 0.5g del extracto seco de ácido clorhídrico al 5%, filtrar y realizar: **Reacción de Dragendorff:** A 0.5 mL de la solución ácida agregar 2 a 3 gotas del reactivo de Dragendorff. La formación de un precipitado anaranjado o marrón indican la presencia de alcaloides.
- 6. Quinonas:** A 0.2 mL del extracto agregar 0.4 mL de ácido sulfúrico concentrado, coloraciones rojizas indican prueba positiva.
- 7. Taninos:** **Reacción de gelatina:** En tres tubos de ensayo colocar 0.5 ml de la muestra, al primer tubo agregar 3 a 5 gotas de una solución de cloruro de sodio al 5%, al segundo agregar 3 a 5 gotas de una solución de gelatina al 1% y al tercero agregar 3 a 5 gotas de el reactivo gelatina - sal. La precipitación en este último o en todos es indicativa de taninos. Si solo ocurre con el primer tubo el test es falso.
- 8. Saponinas:** **Prueba de la espuma:** Se solubiliza aproximadamente 0.1g del extracto en 5 mL de agua o etanol al 40%, filtrar si fuera necesario, dicho filtrado agitar vigorosamente por 30 segundos. La formación de espuma persistente por 30 minutos indica presencia de saponinas.
- 9. Lactonas:** **Prueba de Baljet:** Poner en contacto algunos mg del extracto con 2 a 3 gotas del reactivo de Baljet (mezcla de ácido pícrico al 1% en etanol y hidróxido de potasio al 10%); una coloración anaranjada o roja oscura indican prueba positiva.

**Fuentes:** Lock de Ugaz O. Investigación Fitoquímica (1994)



**ANEXO N° 5: FICHAS DE RECOLECCIÓN DE DATOS****ANÁLISIS FITOQUÍMICO CUALITATIVO**

LUGAR \_\_\_\_\_

FECHA \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ HORA \_\_\_\_\_

METABOLITOS SECUNDARIOS	REACTIVO	RESULTADOS	
		<i>Grindelia boliviana</i>	<i>Chenopodium incisum Poir</i>
ALCALOIDES	DRAGUENDORF		
AZÚCARES REDUCTORES	BENEDICT		
COMPUESTOS FENÓLICOS	CLORURO FÉRRICO 1%		
FLAVONOIDES	REACCIÓN DE SHINODA		
LACTONAS	REACTIVO DE BALJET		
QUINONAS	ÁCIDO SULFÚRICO CONCENTRADO		
TANINOS	GELATINA-SAL		
SAPONINAS	PRUEBA DE LA ESPUMA		

FUENTE: Elaboración propia de los datos experimentales

Leyenda:

+++ = Abundante cantidad

++ = Moderada cantidad

+ = Escasa cantidad

- = Negativo

Fuente: Keesse R .1990.

OBSERVACIONES \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

## PRUEBAS DE SOLUBILIDAD

LUGAR \_\_\_\_\_

FECHA \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ HORA \_\_\_\_\_

SOLVENTE	EXTRACTO SECO	
	<i>Grindelia boliviana</i> Rusby	<i>Chenopodium incisum</i> Poir
HEXANO		
BENCINA		
CLOROFORMO		
ÉTER		
ACETATO DE ETILO		
ACETONA		
BUTANOL		
ETANOL 96°		
ETANOL 70°		
METANOL		
SOLUCIÓN SALINA FISIOLÓGICA		
AGUA		

**Leyenda:**

- ++++ = totalmente soluble
- +++ = parcialmente soluble
- + = muy poco soluble
- = insoluble

Fuente: keesse R – Muller R. K. Métodos de laboratorio para la química orgánica 1990.

OBSERVACIONES \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

## ANEXO N° 6: FICHA DE RECOLECCIÓN DE LOS RESULTADOS DE LA LECTURA DE LA ACTIVIDAD ANTITUBERCULOSA

- Resultados de la lectura del N° de colonias del extracto etanolico de *Grindelia boliviana* (Ch'iri ch'iri) SOBRE *Micobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv.

### LOTE 1

LECTURA DEL N° DE COLONIAS ALOS 42 DIAS													
DILUCIONES	CONTROL		PATRON	CONCENTRACIONES (mg/mL)									
	C1	C2	P	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10
				25	26	27	28	29	30	31	32	33	34
10 <sup>-3</sup> mg/mL													
10 <sup>-5</sup> mg/mL													
10 <sup>-6</sup> mg/mL													

### LOTE 2

LECTURA DEL N° DE COLONIAS ALOS 42 DIAS													
DILUCIONES	CONTROL		PATRON	CONCENTRACIONES (mg/mL)									
	C1	C2	P	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10
				25	26	27	28	29	30	31	32	33	34
10 <sup>-3</sup> mg/mL													
10 <sup>-5</sup> mg/mL													
10 <sup>-6</sup> mg/mL													

#### Leyenda:

- C1:** Control 1 formado por 3 tubos de ensayo con la cepa de *Mycobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv. En medio Lowenstein Jensen
- C2:** Control 2 formado por 3 tubos de ensayo con la cepa de *Mycobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv. En medio Lowenstein Jensen
- P:** Patrón formado por un tubo de ensayo con la cepa de *Mycobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv en medio Lowenstein Jensen mas el fármaco Rifampicina.

- Resultados de la lectura del N° de colonias del extracto etanólico de *Chenopodium incisum* Poir (Arqá paiqo) SOBRE *Micobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv.

## LOTE 1

LECTURA DEL N° DE COLONIAS A LOS 42 DIAS													
DILUCIONES	CONTROL		PATRON	CONCENTRACIONES (mg/mL)									
	C1	C2	P	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10
				25	26	27	28	29	30	31	32	33	34
10 <sup>-3</sup> mg/mL													
10 <sup>-5</sup> mg/mL													
10 <sup>-6</sup> mg/mL													

## LOTE 2

LECTURA DEL N° DE COLONIAS A LOS 42 DIAS													
DILUCIONES	CONTROL		PATRON	CONCENTRACIONES (mg/mL)									
	C1	C2	P	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10
				25	26	27	28	29	30	31	32	33	34
10 <sup>-3</sup> mg/mL													
10 <sup>-5</sup> mg/mL													
10 <sup>-6</sup> mg/mL													

## Leyenda:

- C1:** Control 1 formado por 3 tubos de ensayo con la cepa de *Micobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv. En medio Lowenstein Jensen
- C2:** Control 2 formado por 3 tubos de ensayo con la cepa de *Micobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv. En medio Lowenstein Jensen
- P:** Patrón formado por un tubo de ensayo con la cepa de *Micobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv en medio Lowenstein Jensen mas el fármaco Rifampicina.

- Resultados de la lectura del N° de colonias de las agliconas de flavonoides de *Grindelia boliviana* (Ch'iri ch'iri) SOBRE *Micobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv.

LOTE 1

LECTURA DEL N° DE COLONIAS A LOS 42 DIAS								
DILUCIONES	CONTROL		PATRON	CONCENTRACIONES (mg/mL)				
	C1	C2	P	R1	R2	R3	R4	R5
				1.2	2	2.8	3.6	4.4
10 <sup>-3</sup> mg/mL								
10 <sup>-5</sup> mg/mL								
10 <sup>-6</sup> mg/mL								

LOTE 2

LECTURA DEL N° DE COLONIAS A LOS 42 DIAS								
DILUCIONES	CONTROL		PATRON	CONCENTRACIONES (mg/mL)				
	C1	C2	P	R1	R2	R3	R4	R5
				1.2	2	2.8	3.6	4.4
10 <sup>-3</sup> mg/mL								
10 <sup>-5</sup> mg/mL								
10 <sup>-6</sup> mg/mL								

**Leyenda:**

- C1:** Control 1 formado por 3 tubos de ensayo con la cepa de *Mycobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv. En medio Lowenstein Jensen
- C2:** Control 2 formado por 3 tubos de ensayo con la cepa de *Mycobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv. En medio Lowenstein Jensen
- P:** Patrón formado por un tubo de ensayo con la cepa de *Mycobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv en medio Lowenstein Jensen mas el fármaco rifampicina.

- Resultados de la lectura del N° de colonias de las agliconas de flavonoides de *Chenopodium incisum* Poir (Arqá paiqo) SOBRE *Micobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv.

## LOTE 1

LECTURA DEL N° DE COLONIAS A LOS 42 DIAS								
DILUCIONES	CONTROL		PATRON	CONCENTRACIONES (mg/mL)				
	C1	C2	P	R1	R2	R3	R4	R5
				1.2	2	2.8	3.6	4.4
10 <sup>-3</sup> mg/mL								
10 <sup>-5</sup> mg/mL								
10 <sup>-6</sup> mg/mL								

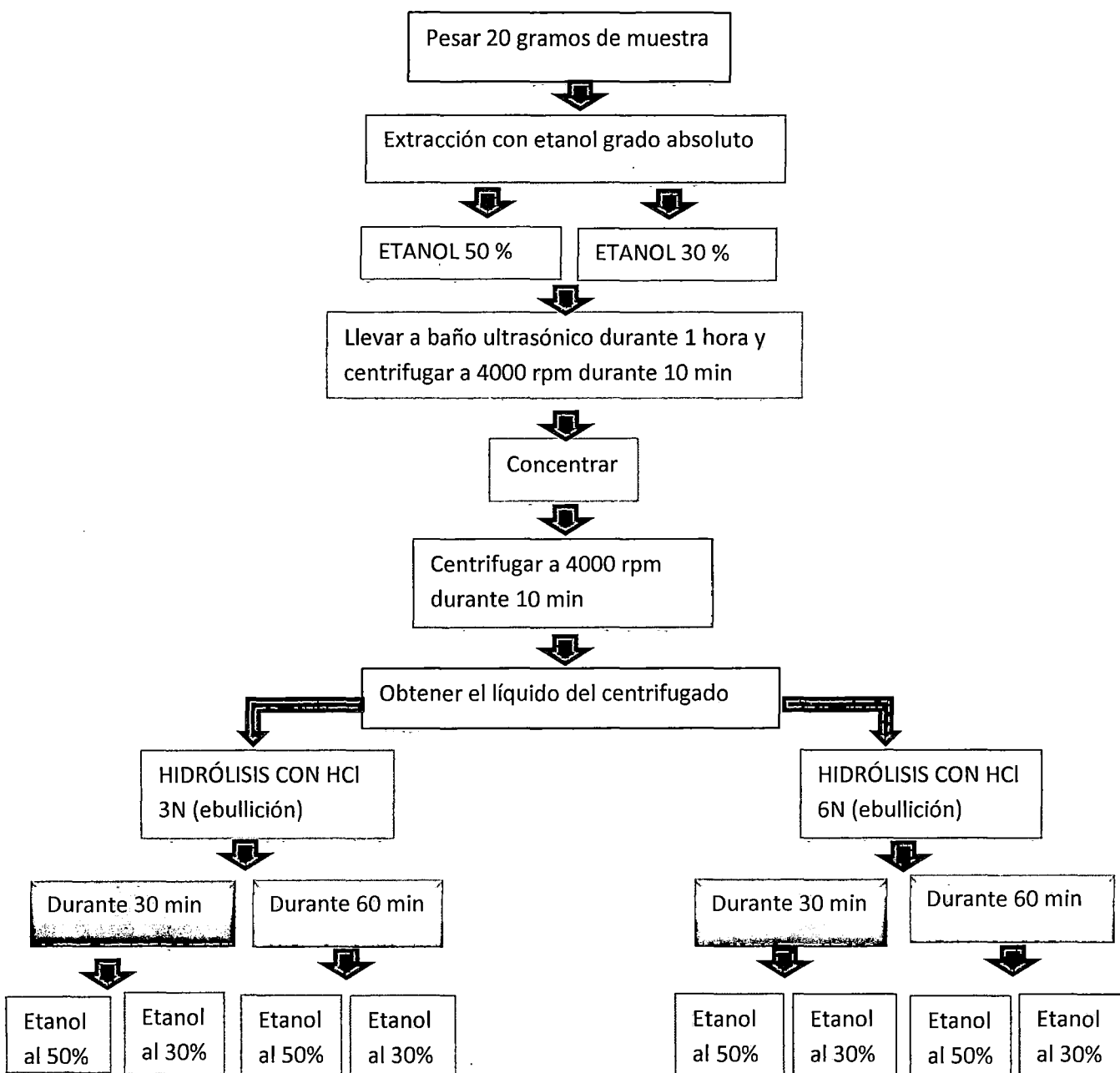
## LOTE 2

LECTURA DEL N° DE COLONIAS A LOS 42 DIAS								
DILUCIONES	CONTROL		PATRON	CONCENTRACIONES (mg/mL)				
	C1	C2	P	R1	R2	R3	R4	R5
				1.2	2	2.8	3.6	4.4
10 <sup>-3</sup> mg/mL								
10 <sup>-5</sup> mg/mL								
10 <sup>-6</sup> mg/mL								

## Leyenda:

- C1:** Control 1 formado por 3 tubos de ensayo con la cepa de *Mycobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv. En medio Lowenstein Jensen
- C2:** Control 2 formado por 3 tubos de ensayo con la cepa de *Mycobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv. En medio Lowenstein Jensen
- P:** Patrón formado por un tubo de ensayo con la cepa de *Mycobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv en medio Lowenstein Jensen mas el fármaco rifampicina.

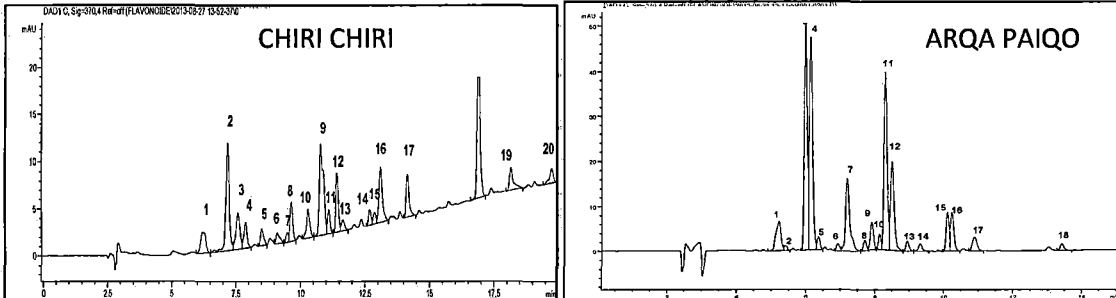
### ANEXO N° 7: FLUJOGRAMA PARTE PRELIMINAR DE LA EXTRACCIÓN DE LAS AGLICONAS DE FLAVONOIDES



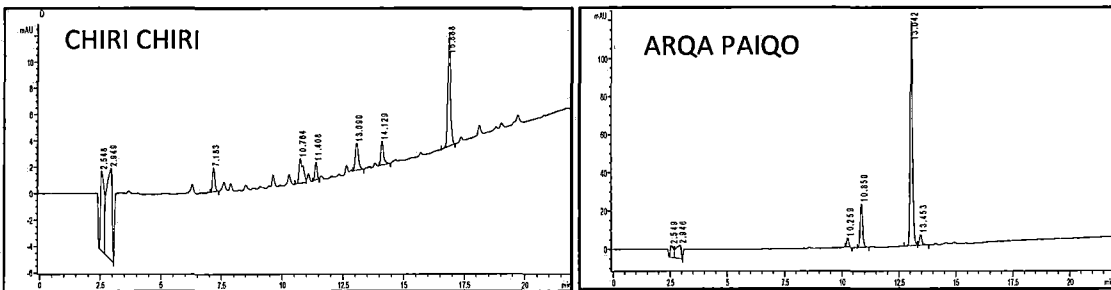
Fuente: Elaboración propia a partir de: Marston A, Hostettmann K. 2006 <sup>(69)</sup>; Hajnos W, Hajnos M. 2010 <sup>(66)</sup>

## ANEXO N° 8: CROMATOGRAMAS HPLC DE LA PARTE PRELIMINAR

Cromatogramas HPLC antes de la hidrólisis de las especies *Grindelia boliviana* Rusby (Chiri chiri) y *Chenopodium incisum* Poir (Arq'a paiqo)



Cromatogramas HPLC despues de la hidrólisis de las especies *Grindelia boliviana* Rusby (Chiri chiri) y *Chenopodium incisum* Poir (Arq'a paiqo)



### ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN

En la parte superior se evidencian los cromatogramas HPLC, realizadas antes de la hidrólisis, para las dos especies en estudio, los picos del extracto etanólico al 30% son abundantes y corresponderían a los diferentes metabolitos secundarios como los flavonoides con azúcares, de los cuales se observó los espectro UV de los picos más representativos, observando las absorbancias que se asemejan a las aproximaciones experimentales determinadas por Mabry et al 1970 para los flavonoides cuya ubicación en las bandas corresponde generalmente en 240- 280 nm para la banda 2 y 300- 380 nm para la banda 1. (72)

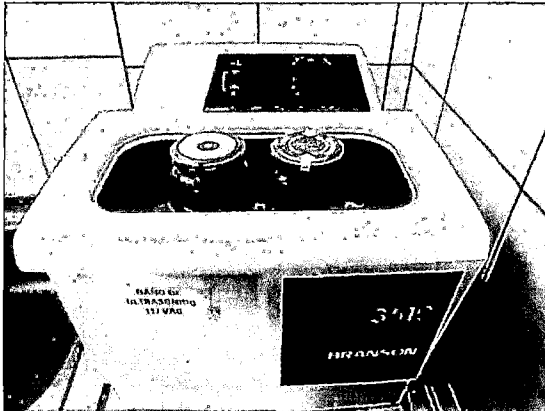
En la parte inferior se evidencian los cromatogramas HPLC, realizadas despues de la hidrólisis ácida con HCl 6N durante 30 min para las dos especies en estudio estos compuestos fueron alterados significativamente obteniendo agliconas de tal modo que los picos correspondientes a los glicósidos flavonoides crecieron para dar lugar a una mayor concentración de agliconas siendo los principales subproductos de la hidrólisis, observándose una reducción en el número de picos, los que se identificarón mediante sus espectros ultravioleta.



## ANEXO N° 9: FOTOGRAFÍAS DE LOS PROCEDIMIENTOS

### 1.- PROCEDIMIENTO: OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS ETANOLICOS AL 70%:

FOTOGRAFÍA N° 04



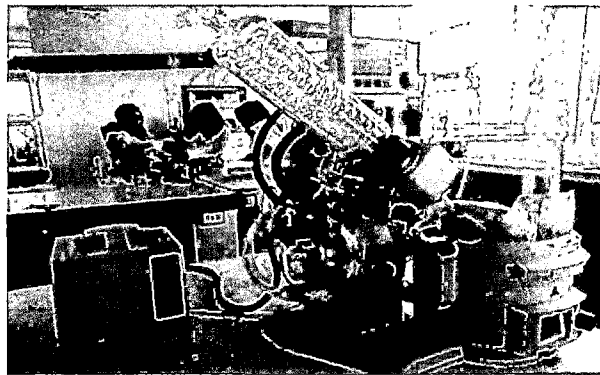
*Extracción ultrasónica*

FOTOGRAFÍA N° 05



*Filtrando por separado los extractos etanólicos*

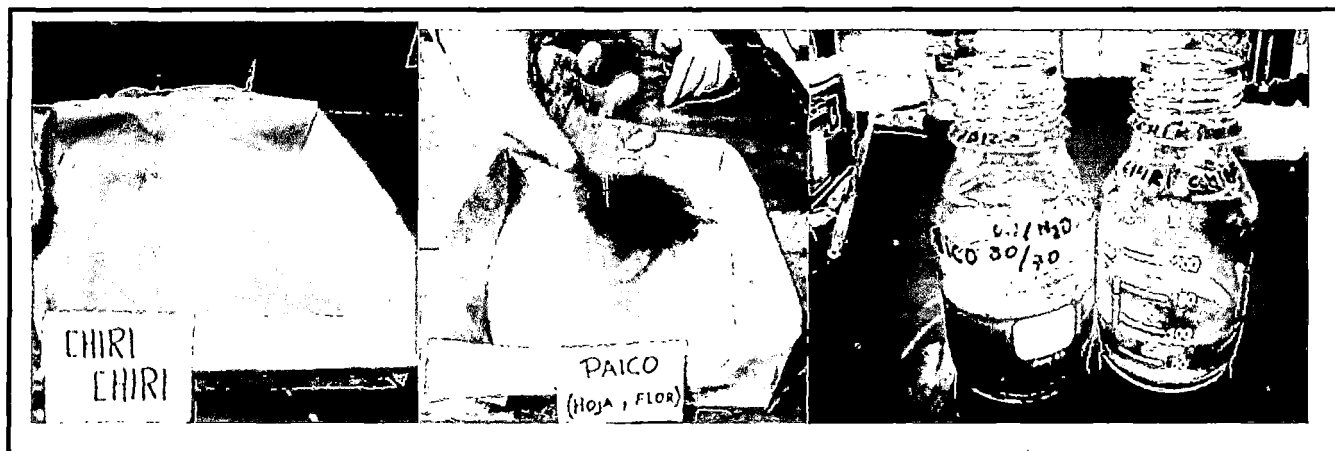
FOTOGRAFÍA N° 06



*Obtención de los extractos concentrados en el Rotavapor*

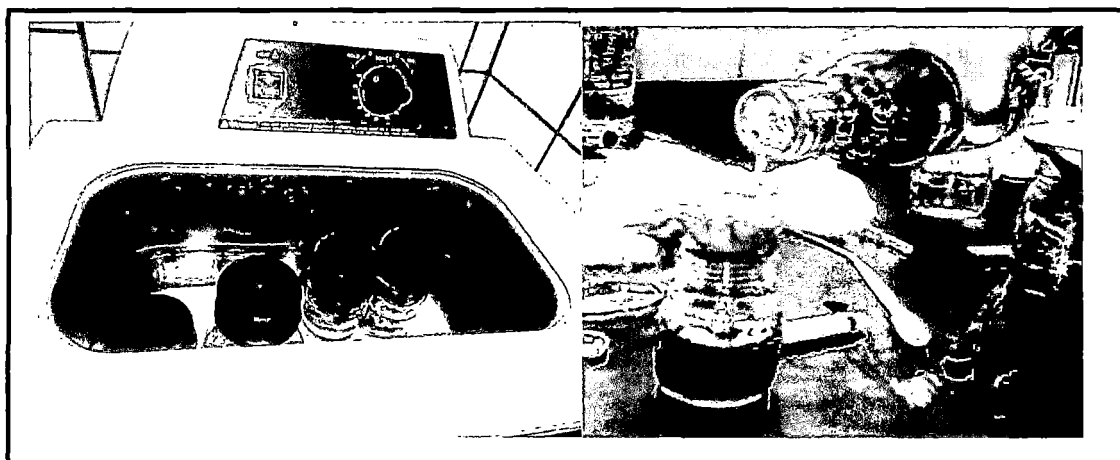
**2.- PROCEDIMIENTO: EXTRACCIÓN ETANÓLICA AL 30%, HIDRÓLISIS ÁCIDA CON HCL 6N Y PURIFICACIÓN DE AGLICONAS DE FLAVONOIDES.**

**FOTOGRAFÍA N° 07**



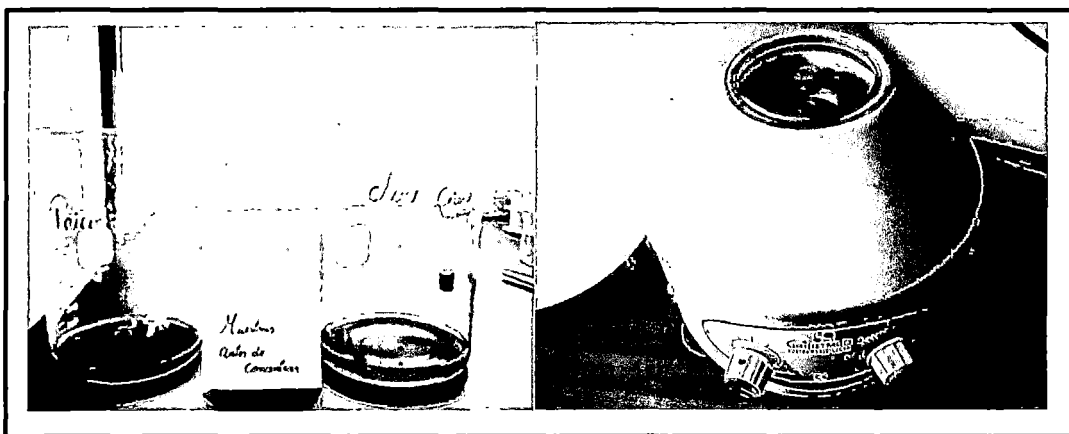
*Las muestras solidas en polvo son pesadas para la extracción con etanol al 30%*

**FOTOGRAFÍA N° 08**



*Proceso de extracción asistido por baño ultrasónico durante 1 hora hasta agotamiento y filtración de las muestras*

FOTOGRAFÍA N° 09



*Realizar el concentrado y luego el centrifugado de las muestras*

FOTOGRAFÍA N° 10



*Con el líquido del centrifugado obtenido se realiza la Hidrolisis ácida con HCl 6N en la proporción 1:1, durante 30 min a 100°C.*

FOTOGRAFÍA N° 11



*Resultado del Proceso de hidrólisis ácida HCl 6N. Para luego ser centrifugada*

FOTOGRAFÍA N° 12



*Precipitado de flavonoides*

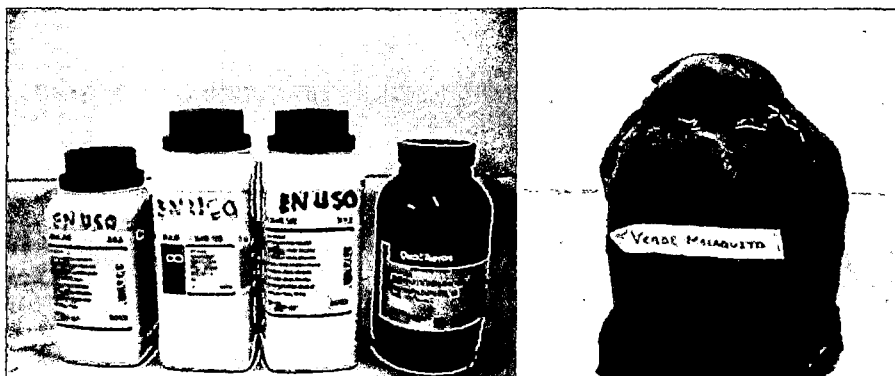
FOTOGRAFÍA N° 13



*Purificación de las agliconas de flavonoides en microcolumna: fase estacionaria: Octadecil silano y fase móvil: Metanol asistida por bomba al vacío.*

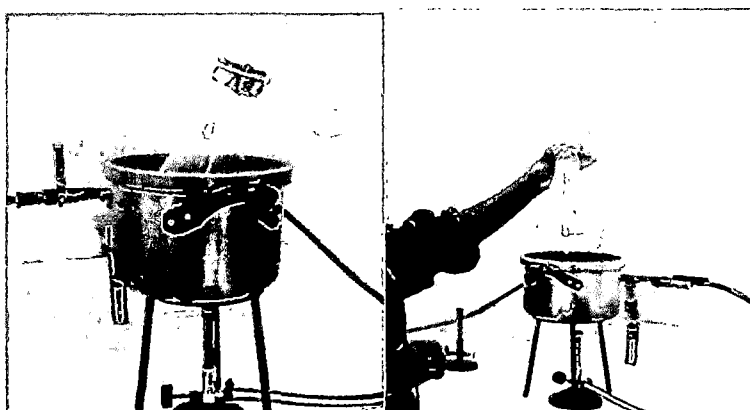
### 3.- PROCEDIMIENTO: PREPARACIÓN DEL MEDIO LOWENSTEIN JENSEN

FOTOGRAFÍA N° 14



COMPOSICIÓN	
Fosfato monopotásico	2.4 g
Sulfato de Magnesio	0.24 g
Citrato de Magnesio	0.6 g
L-Asparagina	3.6 g
Glicerina	12 mL
Agua destilada	c.s.p 600 mL
Huevo	1000 mL
Verde de Malaquita 2%	20 mL

FOTOGRAFÍA N° 15



*Preparación de sales:*

**PREPARACIÓN DEL MEDIO**

**FOTOGRAFÍA N° 16**



*Lavado de los huevos*

**FOTOGRAFÍA N° 17**



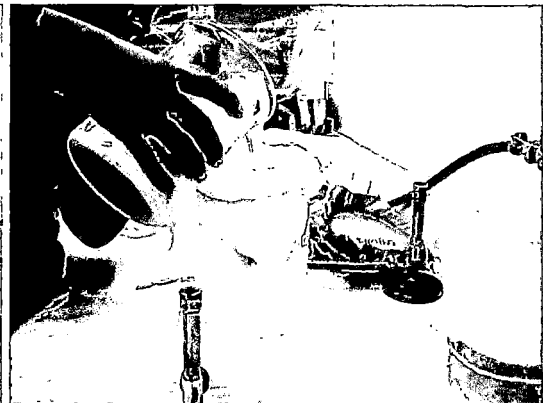
*Selección de los huevos frescos*

**FOTOGRAFÍA N° 18**



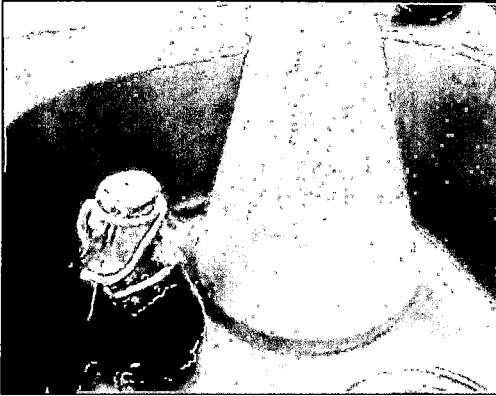
*Homogenización de la clara y yema de los huevos.*

**FOTOGRAFÍA N° 19**



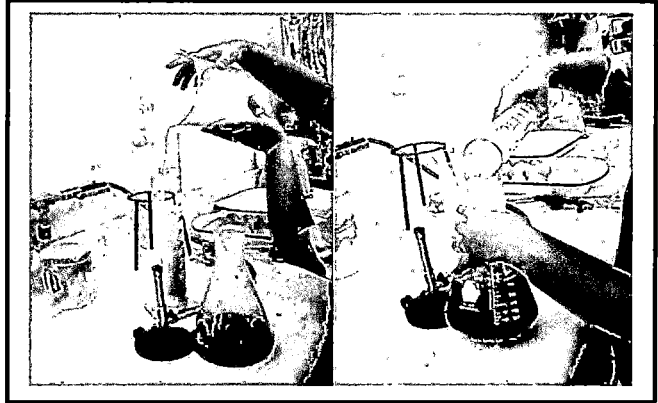
*Filtrado del homogenizado de huevos*

**FOTOGRAFÍA N° 20**



*Agregar la solución acuosa de verde de malaquita al 2% a la solución de sales*

**FOTOGRAFÍA N° 21**



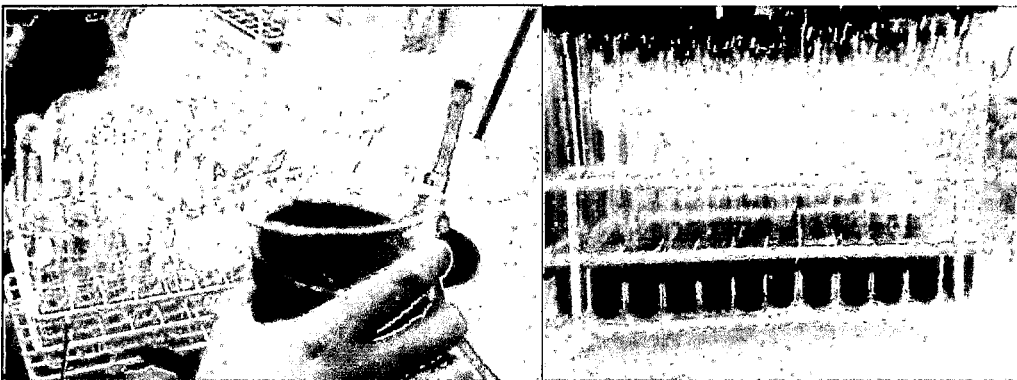
*Agregar la suspensión de huevos homogenizados, Mezclar suavemente con movimientos circulares*

**FOTOGRAFÍA N° 22**



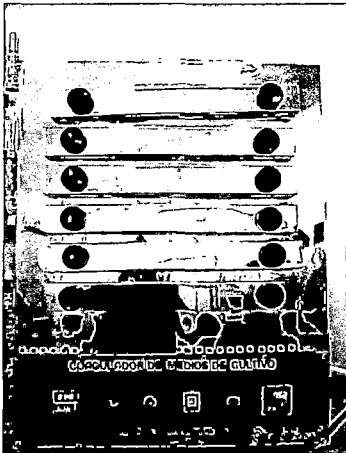
*Proteger de la luz*

**FOTOGRAFÍA N° 23**



*Distribución de 5 ml de medio a los tubos*

FOTOGRAFÍA N° 24



*Colocar los tubos con el medio en el coagulador*

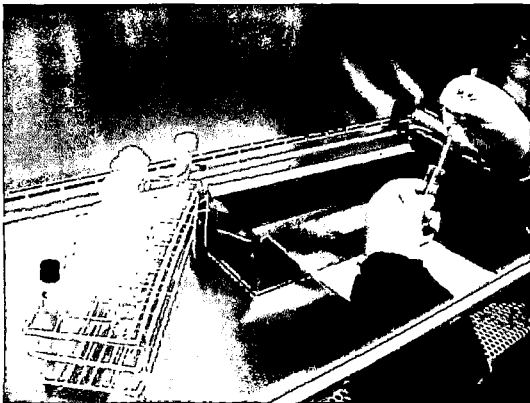
FOTOGRAFÍA N° 25



*Retirar los tubos y dejar enfriar al medio ambiente.  
Ajustar las tapas*

**PREPARACIÓN DE LA SUSPENSIÓN BACILAR:**

FOTOGRAFÍA N° 26



*Preparación de la suspensión bacilar*

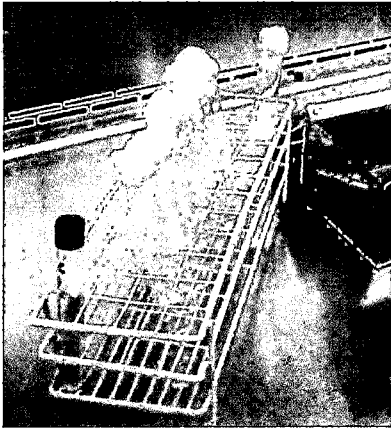
FOTOGRAFÍA N° 27



*Triturando las colonias de *Micobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv hasta lograr homogenizarlas.*

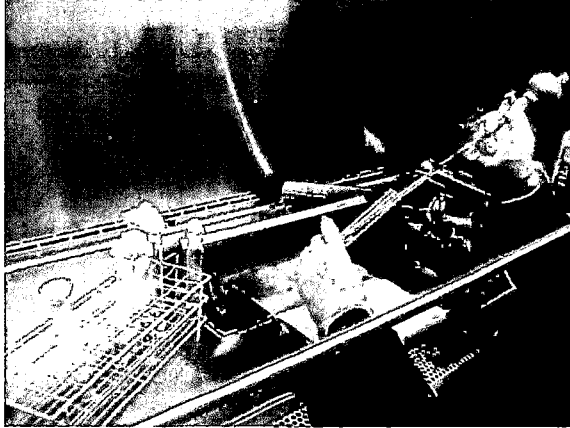


FOTOGRAFÍA N° 28



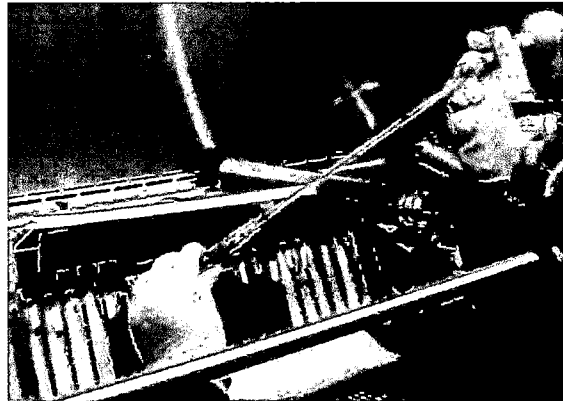
*Reposo de la suspensión bacil*

FOTOGRAFÍA N° 29



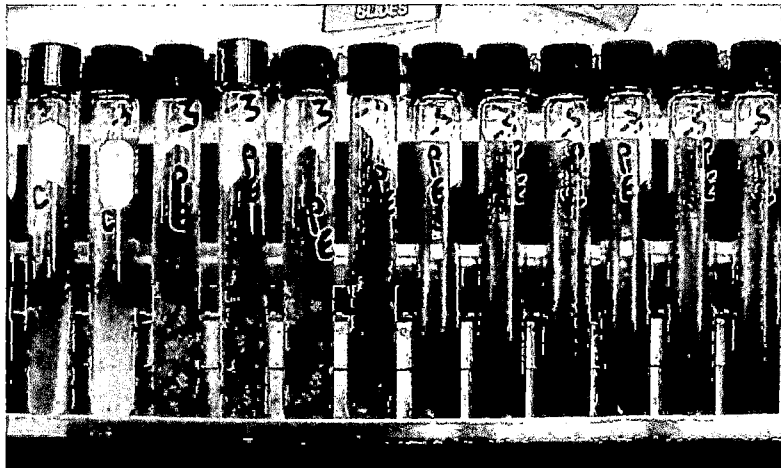
*Preparando las diluciones al decimo de  $10^{-1}$  mg/mL a  $10^{-6}$  mg/mL*

FOTOGRAFÍA N° 30



*Siembra de *Mycobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv al MLJ con el extracto obtenido.*

FOTOGRAFÍA N° 31



*Conteo de *Mycobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv.*

**ANEXO N° 10:** DE LA PRUEBA PRELIMINAR, RESULTADOS DEL CONTEO DE LA ACTIVIDAD ANTITUBERCULOSA SOBRE *Micobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS Y AGLICONAS DE FLAVONOIDES DE *Grindelia boliviana* Rusby (CH'IRI CH'IRI) Y *Chenopodium incisum* Poir (ARQ'A PAIQO).

**1.- CONTEO DEL NÚMERO DE COLONIAS EN LAS DIFERENTES CONCENTRACIONES DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE *Grindelia boliviana* Rusby (CH'IRI CH'IRI) SOBRE CEPAS DE *Micobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv.**

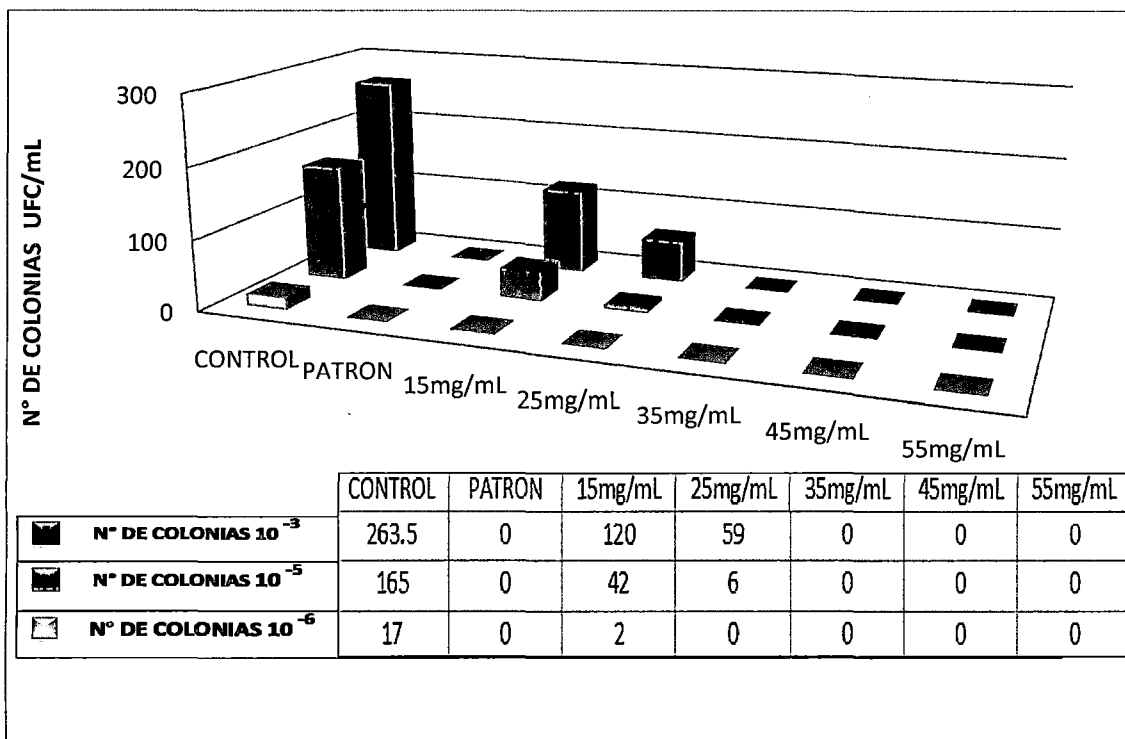
**TABLA N° 25**

**Resultados del número de colonias contabilizadas en las diferentes concentraciones del extracto etanólico de *Grindelia boliviana* Rusby (Ch'iri ch'iri) SOBRE *Micobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv**

LECTURA DEL N° DE COLONIAS A LOS 42 DIAS								
DILUCIONES	CONTROL		PATRON	CONCENTRACIONES (mg/mL)				
	C1	C2	P	T1	T2	T3	T4	T5
				15	25	35	45	55
10 <sup>-3</sup> mg/mL	273	254	0	120	59	0	0	0
10 <sup>-5</sup> mg/mL	165	165	0	42	6	0	0	0
10 <sup>-6</sup> mg/mL	17	17	0	2	0	0	0	0

**Leyenda:**

- C1:** Control 1 formado por 3 tubos de ensayo con la cepa de *Micobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv. En medio Lowenstein Jenssen.
- C2:** Control 2 formado por 3 tubos de ensayo con la cepa de *Micobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv. En medio Lowenstein Jenssen.
- P:** Patrón formado por un tubo de ensayo con la cepa de *Micobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv en medio Lowenstein Jenssen más el fármaco Rifampicina.



**GRÁFICO 09:** ACTIVIDAD ANTITUBERCULOSA DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE *Grindelia boliviana* Rusby (CH'IRI CH'IRI) SOBRE *Micobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv.

**ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN:**

La TABLA N° 25 Y EL GRAFICO N°09 representan los resultados obtenidos de la parte preliminar de la Actividad antituberculosa del extracto etanólico de *Grindelia boliviana* rusby (Ch'iri ch'iri) frente a cepas de *Micobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv, demostrándose así la inhibición total del crecimiento de colonias micobacterianas en las concentraciones de 35mg /mL, 45mg/mL y 55mg/mL los cuales presentan un efecto similar al patrón. Con estos resultados se determinó la concentración mínima inhibitoria tomando el intervalo de concentraciones de: 25 mg/mL a 34mg/mL.

**2.-CONTEO DEL NÚMERO DE COLONIAS EN LAS DIFERENTES CONCENTRACIONES DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE *Chenopodium incisum* Poir (ARQ'A PAIQU) sobre cepas de *Micobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv.**

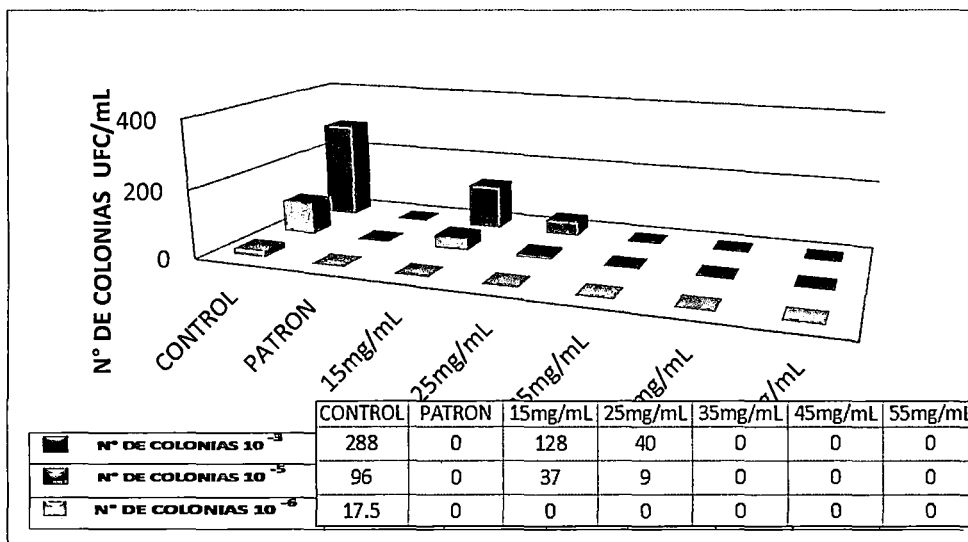
**TABLA N° 26**

**Resultados del número de colonias contabilizadas en las diferentes concentraciones de *Chenopodium incisum* Poir (Arq'a paiqu) SOBRE *Micobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv**

LECTURA DEL N° DE COLONIAS A LOS 42 DIAS								
DILUCIONES	CONTROL		PATRON	CONCENTRACIONES (mg/mL)				
	C1	C2	P	T1	T2	T3	T4	T5
				15	25	35	45	55
10 <sup>-3</sup> mg/mL	286	290	0	128	40	0	0	0
10 <sup>-5</sup> mg/mL	96	96	0	37	9	0	0	0
10 <sup>-6</sup> mg/mL	20	15	0	0	0	0	0	0

Leyenda:

- C1:** Control 1 formado por 3 tubos de ensayo con la cepa de *Micobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv. En medio Lowenstein Jensen.
- C2:** Control 2 formado por 3 tubos de ensayo con la cepa de *Micobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv. En medio Lowenstein Jensen.
- P:** Patrón formado por un tubo de ensayo con la cepa de *Micobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv en medio Lowenstein Jensen más el fármaco Rifampicina.



**GRAFICO 10: ACTIVIDAD ANTITUBERCULOSA DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE *Chenopodium incisum* Poir (ARQ'A PAIQU) SOBRE *Micobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv.**

**ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN:** la TABLA N° 26 Y EL GRÁFICO N°10 representan los resultados obtenidos de la parte preliminar de la Actividad antituberculosa del extracto etanólico de *Chenopodium incisum* Poir (Arq'a paiqu) frente a cepas de *Micobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv, demostrándose la inhibición total del crecimiento de colonias

micobacterianas en las concentraciones de 35mg/mL, 45mg/mL y 55mg/mL los cuales presentan un efecto similar al patrón.

Con estos resultados se determinó la concentración mínima inhibitoria tomando el intervalo de concentraciones de: 25 mg/mL a 34 mg/mL

**El GRÁFICO N° 10** representa la inhibición micobacteriana en cada una de las diluciones  $10^3$ ,  $10^{-5}$  y  $10^{-6}$  en la que observamos:

- Que el patrón presenta una inhibición total de las cepas micobacterianas
- Que las concentraciones de 35mg/mL, 45mg/mL y 55 mg/mL presentan una total inhibición a las diluciones de  $10^{-3}$ ,  $10^{-5}$  y  $10^{-6}$ , teniendo el mismo efecto del patrón.
- A la dilución de  $10^{-6}$  también presenta inhibición en las concentraciones de 15mg/mL y 25 mg/mL por tener una menor población de colonias.
- También observamos que cuanto mayor sea la dilución de las cepas mayor es el crecimiento micobacteriano.

### 3.- CONTEO DEL NÚMERO DE COLONIAS EN LAS DIFERENTES CONCENTRACIONES DE AGLICONAS DE FLAVONOIDES DE *Grindelia boliviana* Rusby (CH'IRI CH'IRI) sobre cepas de *Micobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv.

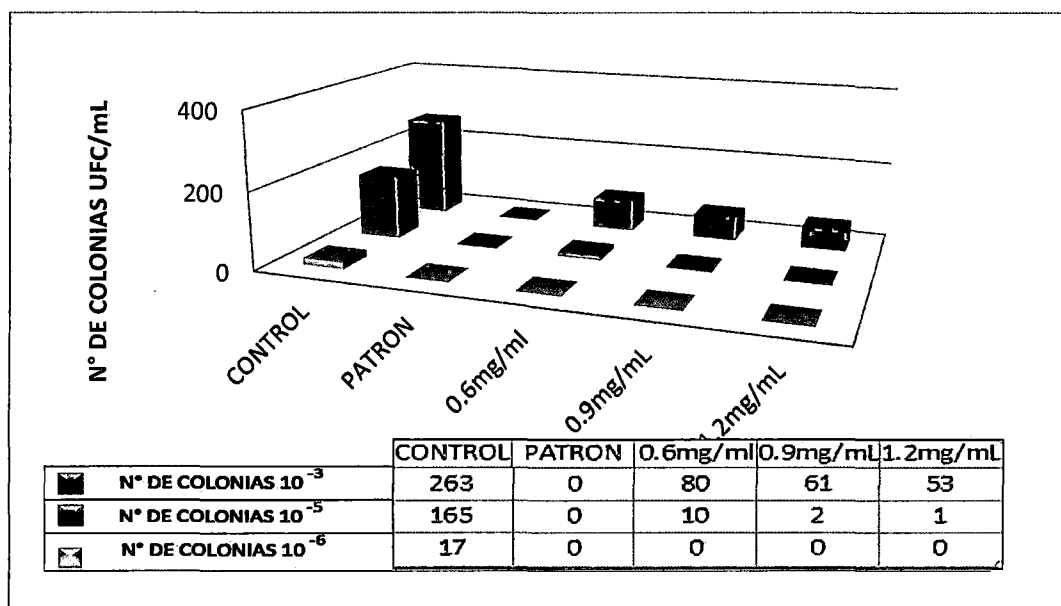
**TABLA N° 27**

**Resultados del número de colonias contabilizadas en las diferentes concentraciones de agliconas de flavonoides de *Grindelia boliviana* Rusby (Ch'iri ch'iri) SOBRE *Micobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv**

LECTURA DEL N° DE COLONIAS A LOS 42 DIAS						
DILUCIONES	CONTROL		PATRON	CONCENTRACIONES (mg/mL)		
	C1	C2	P	R1	R2	R3
				0.6	0.9	1.2
<b>10<sup>-3</sup>mg/mL</b>	273	253	0	80	61	53
<b>10<sup>-5</sup>mg/mL</b>	165	165	0	10	2	1
<b>10<sup>-6</sup> mg/mL</b>	17	17	0	0	0	0

Leyenda:

- C1: Control 1 formado por 3 tubos de ensayo con la cepa de *Micobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv. En medio Lowenstein jensen.
- C2: Control 2 formado por 3 tubos de ensayo con la cepa de *Micobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv. En medio lowenstein Jensen.
- P: Patrón formado por un tubo de ensayo con la cepa de *Micobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv en medio lowenstein jensen más el fármaco Rifampicina



**GRAFICO 11:** ACTIVIDAD ANTITUBERCULOSA DE AGLICONAS DE FLAVONOIDES DE *Grindelia boliviana* Rusby (Ch'iri ch'iri) SOBRE *Micobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv.

**ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN:**

La TABLA N° 27 Y EL GRÁFICO N°11 representan los resultados obtenidos de la parte preliminar de la Actividad antituberculosa de agliconas de flavonoides de *Grindelia boliviana* Rusby (Ch'iri ch'iri) frente a cepas de *Micobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv, demostrándose así la inhibición total del crecimiento de colonias micobacterianas en las concentraciones de 0.6 mg/mL, 0.9mg/mL y 1.2 mg/mL para la dilución de 10<sup>-6</sup> los cuales presentan un efecto similar al patrón. Presentando también una mínima inhibición en el crecimiento bacteriano para la dilución 10<sup>-5</sup>

Con estos resultado se determinó la concentración mínima inhibitoria tomando como referencia la concentración a partir de: 1.2 mg/MI

**4.- CONTEO DEL NUMERO DE COLONIAS EN LAS DIFERENTES CONCENTRACIONES DE AGLICONAS DE FLAVONOIDES DE *Chenopodium incisum* Poir (ARQ'A PAIQO) SOBRE *Micobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv.**

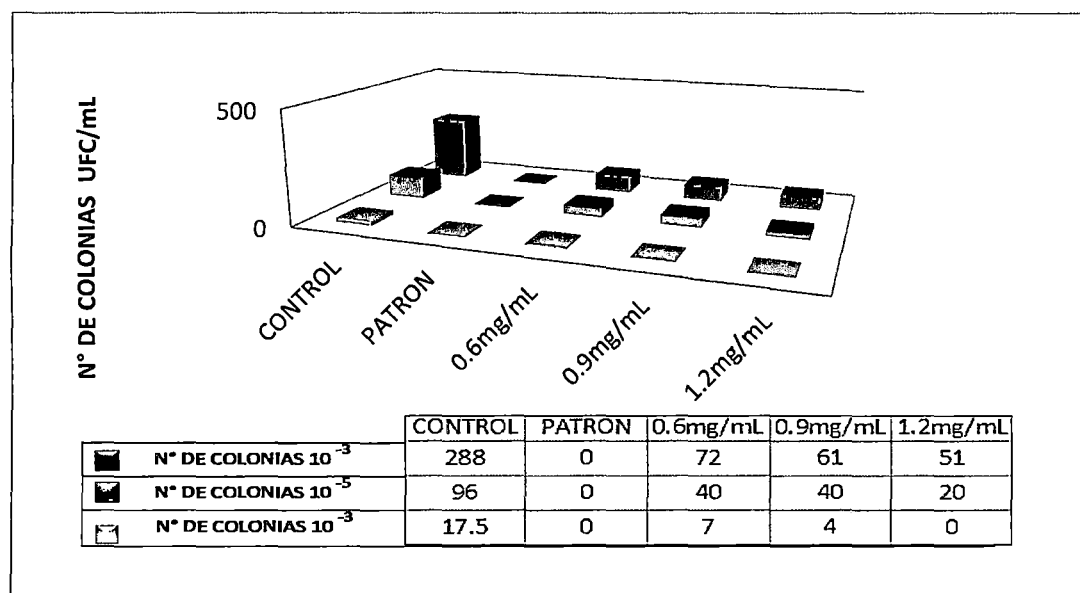
**TABLA N° 28**

**Resúltados del número de colonias contabilizadas en las diferentes concentraciones de agliconas de flavonoides de *Chenopodium incisum* Poir (Arq'a paiqo) sobre *Micobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv.**

LECTURA DEL N° DE COLONIAS A LOS 42 DIAS						
DILUCIONES	CONTROL		PATRON	CONCENTRACIONES (mg/mL)		
	C1	C2		R1	R2	R3
			P	0.6	0.9	1.2
10 <sup>-3</sup> mg/mL	286	290	0	72	61	51
10 <sup>-5</sup> mg/mL	96	96	0	40	40	20
10 <sup>-6</sup> mg/mL	20	15	0	7	4	0

**Leyenda:**

- C1: **Control 1** formado por 3 tubos de ensayo con la cepa de *Micobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv. En medio Lowenstein Jenson.
- C2: **Control 2** formado por 3 tubos de ensayo con la cepa de *Micobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv. En medio Lowenstein Jenson.
- P: **Patrón** formado por un tubo de ensayo con la cepa de *Micobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv en medio lowenstein Jenson más el fármaco Rifampicina.



**GRAFICO 12:** ACTIVIDAD ANTITUBERCULOSA DE LAS AGLICONAS DE FLAVONOIDES DE *Chenopodium incisum* Poir (ARQÁ PAIQU) SOBRE *Micobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv.

**ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN**

la TABLA N° 28 Y EL GRÁFICO N°12 representan los resultados obtenidos de la parte preliminar de la actividad antituberculosa de agliconas de flavonoides de *Chenopodium incisum* Poir (Arq'a paiqu) frente a cepas de *Micobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv. Demostrándose así la inhibición total del crecimiento de colonias micobacterianas en las concentraciones de 0.6 mg/mL, 0.9mg/mL y 1.2 mg/mL para la dilución de 10<sup>-6</sup> los cuales presentan un efecto similar al patrón. Presentando también una mínima inhibición en el crecimiento bacteriano para la dilución 10<sup>-5</sup> con estos resultado se determinó la concentración mínima inhibitoria tomando como referencia la concentración a partir de: 1.2 mg/mL.

**ANEXO N° 11: FOTOGRAFÍAS DE LOS RESULTADOS DEL CONTEO DE COLONIAS DE LAS CEPAS DE *Micobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv EN LOS EXTRATOS ETANÓLICOS Y AGLICONAS DE FLAVONOIDES DE LAS ESPECIES: *Grindelia boliviana* Rusby Y *Chenopodium incisum* Poir.**

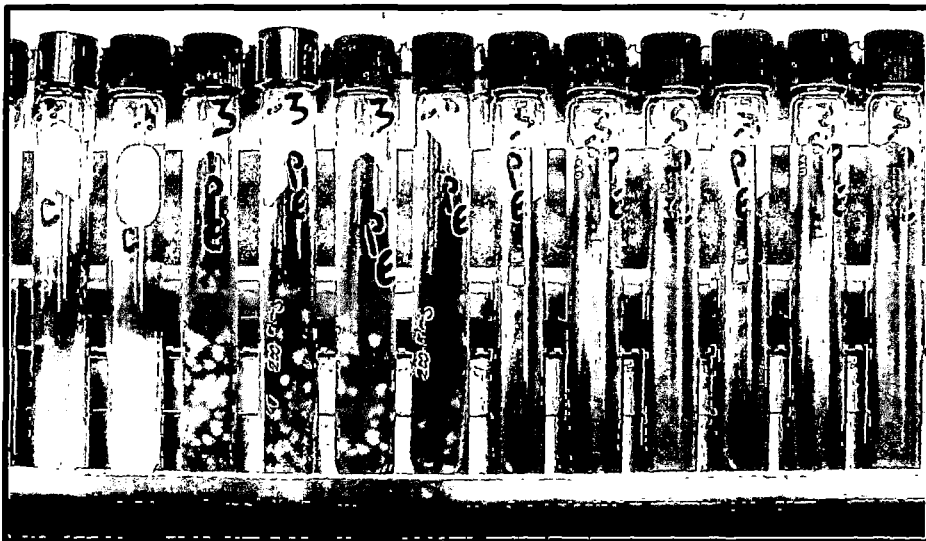
**FOTOGRAFÍA N° 32**

**Conteo de colonias de la cepa *Micobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv en el extracto etanólico de *Grindelia boliviana* Rusby (Ch'iri ch'iri).**



**FOTOGRAFÍA N° 33**

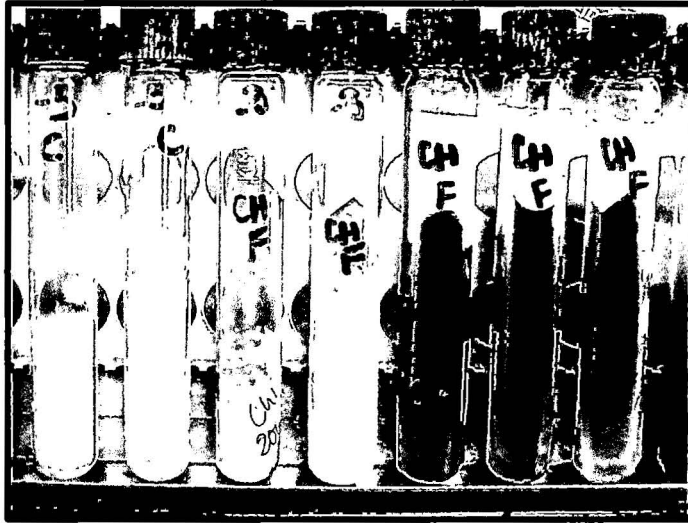
**Conteo de colonias de la cepa *Micobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv en el extracto etanólico *Chenopodium incisum* Poir (Arq'a paiqo).**





FOTOGRAFÍA N° 34

Conteo de colonias de la cepa *Micobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv en las agliconas de flavonoides de *Grindelia boliviana* Rusby (Ch'iri ch'iri).



FOTOGRAFÍA N° 35

Conteo de colonias de la cepa *Micobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv en las agliconas de flavonoides de *Chenopodium incisum* Poir (Arq'a paiqo).

