

## ACTIVIDAD MICOBACTERICIDA DE 14 EXTRACTOS DE PLANTAS MESOAMERICANAS UTILIZADAS POPULARMENTE EN INFECCIONES PULMONARES

Quiñónez SP, Samayoa M, García V, Cáceres A, Matta V.

Escuela de Química Biológica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala.

### RESUMEN

La tuberculosis pulmonar es una enfermedad infecciosa, provocada en la mayor parte de casos por *Mycobacterium tuberculosis*, la cual se trasmite principalmente por contacto interpersonal íntimo a través de la inhalación de aire con partículas infectadas, rara vez se adquiere por ingestión o heridas cutáneas. Su comienzo suele ser insidioso, manifestando síntomas inespecíficos como malestar general, pérdida de peso, tos y sudoración nocturna. El diagnóstico se basa en las manifestaciones clínicas, radiológicas y de anatomía patológica las que son muy inespecíficas y en la confirmación mediante técnicas bacteriológicas y serológicas. Su tratamiento se fundamenta en la asociación de los fármacos para evitar la selección de resistencia y la necesidad de tratamientos prolongados para poder matar a todos los bacilos en sus diferentes fases de crecimiento.

En este estudio se determinó la actividad micobactericida de catorce plantas utilizadas popularmente en infecciones pulmonares. Los extractos etanólicos utilizados fueron *Cecropia obtusifolia* Bartolini (guarumo), *Bursera simaruba* (palo jiote), *Guazuma ulmifolia* (caulote), *Byrsonima crassifolia* (nance), *Hymenaea courbaril* (guapinol), *Sida rhombifolia* (escobillo), *Senecio salignus* (chilca), *Solanum torvum* (lavaplatos), *Dorstenia contrajerva* (contrahierba), *Bougainvillea glabra* (bougainvillea), *Sambucus mexicana* Presl. (saúco), *Acacia farnesiana* Willd. (subin), *Litsea guatemalensis* Mez. (laurel) y *Liquidambar styraciflua* L. (liquidámbar).

La evaluación se realizó por medio del bioensayo colorimétrico de bromuro 3-(4.5-dimetiltiazol-2-y 1)-2,5-difenil tetrazolio (MTT), en el cual el cambio de coloración de los pozos permite establecer la presencia de la actividad micobactericida de los extractos, así como la concentración en la que se presenta. Se determinó que ninguna de las plantas evaluadas presentó actividad contra *M. tuberculosis* ATCC H37Rv en un rango de concentración de 100 µg/ml a 6.52 µg/ml. *B. simaruba* presentó una concentración mínima inhibitoria de 50 µg/ml y los extractos de *S. mexicana*, *C. obtusifolia*, *A. farnesiana*, *L. guatemalensis* y *L. styraciflua* de 25 µg/mL contra *M. smegmatis* ATCC 607.

### INTRODUCCION

La tuberculosis es una enfermedad infecciosa, transmisible que es provocada por la bacteria *Mycobacterium tuberculosis*. Este es un bacilo ácido-alcohol resistente, aerobio, no esporulador, de crecimiento lento y resistente al frío, congelación y desecación, muy sensible al calor, luz solar y ultravioleta. La vía principal de infección es la inhalación de aire con partículas infectadas que alcanzan la vía aérea terminal, donde son ingeridos por los macrófagos alveolares, los bacilos comienzan a multiplicarse y destruyen las células fagocíticas. Su sintomatología es inespecífica por lo que no permite tomar las medidas necesarias iniciales para su tratamiento (1-4).

El diagnóstico es bacteriológico y se basa principalmente en la baciloscopía y en casos más difíciles es el cultivo. Son importantes los signos característicos de la tuberculosis como la hemoptisis y dolor torácico y se complementa con exámenes de gabinete como las radiografías que muestra lesiones en placas, principalmente en zonas apicales posteriores (5-8).

La tuberculosis es una de las principales enfermedades crónicas y oportunistas en Guatemala, según la Organización Mundial de la Salud (OMS). Esta infección, es la segunda causa de morbilidad en la población guatemalteca. El tratamiento de la tuberculosis se fundamenta en dos grandes bases bacteriológicas, la asociación de los fármacos para evitar la selección de

resistencia y la necesidad de tratamientos prolongados para poder matar a todos los bacilos en sus diferentes fases de crecimiento. Los fármacos de primera línea para el tratamiento de la tuberculosis son isoniazida, rifampicina, pirazinamida, etambutol y estreptomina, los cuales se administran durante 6 a 8 meses (10,11).

El objetivo de este es curar la infección, para lo cual se prescriben dosis orales diarias de drogas múltiples hasta que los resultados de los cultivos y las pruebas de susceptibilidad ayuden a orientar la selección de las drogas a utilizar ya que el uso de una única droga es de baja prescripción, aumentando el apareamiento de cepas mutantes multiresistentes (1,2). La resistencia bacteriana a uno o más de los medicamentos antituberculosos constituye un factor limitante para obtener la curación de cada paciente individualmente y por ende para erradicar la enfermedad de la comunidad; en términos prácticos, este factor debe ser considerado en relación con otros, que intervengan en la erradicación de la enfermedad con el objetivo de determinar su importancia relativa y la magnitud de recursos necesarios para resolver el problema (12).

La incidencia y rapidez del surgimiento de cepas multiresistentes a drogas especialmente a la isoniazida y rifampicina ha creado una emergencia contra la tuberculosis a nivel mundial y urge tomar las medidas necesarias para tratar los casos de tuberculosis y evitar que siga propagándose la variante farmacorresistente de esta enfermedad (13).

Debido la importancia de esta enfermedad se han buscado tratamientos alternativos como la fitoterapia por lo que se han reportado varios estudios sobre nuevas alternativas fitoterapéuticas. En Guatemala, Manrique y cols. en 1992 determinaron la acción antimicobacteriana *in vitro* por el método de proporción de seis plantas medicinales concluyendo que ninguna de las seis plantas mostraba una actividad micobactericida *in vitro*, sin embargo estadísticamente *Sida acuta* Burn f., *Eucalyptus globulus* Labill. y *Achillea millefolium* L. presentaron actividad bacteriostática *in vitro* a una concentración de 400 mg/ml. Figueroa en 2000, determinó la actividad antimicobacteriana de extractos de varias plantas, concluyendo que *Piper auritum* HBK, *Stachytarpheta cayennensis* Rich. y *Enterolobium cycloscarpum* Jacq. son capaces de inhibir el crecimiento de cepas multiresistentes de *M. tuberculosis in vitro* a una concentración de 2 mg/ml.

Mazariegos y cols. en 2004 determinaron la actividad micobactericida *in vitro* por el micrométodo MTT de las plantas *Quercus crasifolia* Humb & Bonpl. y *E. cycloscarpum* contra *M. tuberculosis* con concentración mínima inhibitoria de 25 µg/ml y 50 µg/ml respectivamente (14 -16).

El presente estudio investigó la actividad micobactericida de los 14 extractos etanólicos de las plantas mesoamericanas que son utilizadas popularmente en infecciones pulmonares frente al crecimiento de *M. tuberculosis* y *M. smegmatis*. Esta evaluación se realizó por medio de un bioensayo para determinar su actividad *in vitro*, con base a la concentración inhibitoria mínima (CIM), para lo cual se utilizó el reactivo cromóforo 3-(4,5dimetiltiazol-2-y1)-2,5-difenil bromuro de tetrazolio (MTT) como indicador de actividad contra estas bacterias. Siendo el propósito principal el de encontrar alternativas terapéuticas accesibles, seguras y eficaces para combatir la tuberculosis, ya que los extractos de las plantas que presenten una menor CIM podrán ser de interés para realizar futuros estudios químicos a fin de dilucidar los compuestos responsables de la actividad contra éstas micobacterias.

### Materiales y Métodos.

Por conveniencia se seleccionaron las plantas *B. simaruba*, *G. ulmifolia*, *B. crassifolia*, *H. courbaril*, *S. rhombifolia*, *S. salignus*, *S. torvum*, *D. contrajerva*, *B. glabra*, *S. mexicana* Presl., *C. obtusifolia* Bartolini, *A. farnesiana* Willd., *L. guatemalensis* Mez. y *L. styraciflua* L. que son utilizadas popularmente en el tratamiento de infecciones respiratorias según encuesta existente en el Departamento de Citohistología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala (Tabla 1).

Se llevó a cabo la colecta, secado, extracción y concentración por rotavapor, del extracto etanólico de la flor de *B. glabra* y las hojas de *S. mexicana*, *C. obtusifolia*, *A. farnesiana*, *L. guatemalensis*, mientras los otros extractos fueron proporcionados por el Departamento de Citohistología.

Los extractos fueron preparados por medio de extracción con etanol al 95% posteriormente se realizó un proceso de concentración en el rotavapor y por ultimo la desecación.

Tabla 1. Plantas usadas en el estudio

Nombre científico	Nombre común	Parte de la planta usada
<i>Bursera simaruba</i>	Palo jiote	Hoja
<i>Guazuma ulmifolia</i>	Caulote	Hoja
<i>Byrsonimia crassifolia</i>	Nance	Hoja
<i>Hymenaea courboril</i>	Guapinol	Hoja
<i>Sida rhombifolia</i>	Escobillo	Corteza
<i>Senecio salignus</i>	Chilca	Hoja
<i>Solanun torvum</i>	Lavaplatos	Hoja
<i>Dorstenia contrajerva</i>	Contrahierba	Hoja
<i>Bougainvillea glabra</i>	Bougavilla	Flor
<i>Sambucus mexicana</i> Presl.	Sáuco	Hojas
<i>Cecropia obtusifolia</i> Bartolini	Guarumo	Hojas
<i>Acacia farnesiana</i> Willd.	Subin	Hojas
<i>Litsea guatemalensis</i> Mez.	Laurel	Hojas
<i>Liquidambar styraciflua</i> L.	liquidámbar	Hojas

Se utilizó el micrométodo colorimétrico MTT para determinar la actividad bactericida de *M. tuberculosis* H37RV y de *M. smegmatis* ATCC607. La lectura se realizó de manera visual, definiéndose la CIM como la menor concentración del extracto donde el sustrato no cambio de color y cuya intensidad fue igual o menor a la obtenida en el control.

El tipo de estudio fue experimental con diseño al azar. La variable a estudiar fue la inhibición del crecimiento de *M. tuberculosis* y *M. smegmatis* producido por los extractos de plantas usadas a distintas concentraciones (100, 50, 25, 12.5 y 6.25 µg/ml). De acuerdo a la tabla de la función de distribución acumulada de la probabilidad binomial, el número mínimo de réplicas realizadas debe ser 5 para un nivel  $\alpha = 0.05$  con cada concentración de ambas bacterias, comparando los resultados con un control que no contendrá ningún tipo de extracto y un control de rifampicina.

### Resultados

En el estudio se realizó la evaluación *in vitro* de la actividad de extractos etanólicos de las plantas en contra las cepas de *M. tuberculosis* H37Rv y *M. smegmatis* ATCC 607.

Las cinco repeticiones de los ensayos con *M. tuberculosis* y de *M. smegmatis* y cada una de los extractos, se incubaron cinco y siete días respectivamente, obteniendo la misma repetibilidad en los resultados, para luego consolidarlos y obtener un único resultado (Fig. 1).

Figura 1. Distribución de los reactivo dentro de las microplacas

FILAS	COLUMNAS											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Clave de la Figura No. 1

	Celdas con 200µg/ml de agua
	100µg/ml de extracto + 100µg/ml de medio + 100µg/ml de estándar
	Celdas con control positivo, medio de cultivo y Estándar de MacFarland

Se determinó la CIM para *M. smegmatis* en donde se encontró que *B. simaruba* y *S. rhombifolia* presentaron una CIM de 50 µg/ml, los extractos de *S. mexicana*, *C. obtusifolia*, *A. farnesiana*, *L. guatemalensis* y *L. styraciflua* presentaron una CIM de 25 µg/mL. En los demás extractos no se encontró actividad con respecto al crecimiento de *M. smegmatis*, como se puede observa en la tabla 2.

Posteriormente, se determinó la CIM para *M. tuberculosis* H37Rv, no se observó inhibición en los extractos en ninguna de las concentraciones de 100, 50, 25, 12.5 y 6.25 µg/ml.

La validación del método se realizó analizando los resultados a través de un estudio de prueba binomial en donde se determinó que los extractos presentan una  $p \leq 0.5$  con un  $\alpha = 0.05$ , dando un resultado confiable de los extractos contra *M. tuberculosis* y *M. smegmatis*. Al mismo tiempo, la rifampicina que fue el control positivo, no presentó crecimiento bacteriano mientras que en el control negativo sí presentó crecimiento bacteriano mostrando el mismo comportamiento en las cinco repeticiones.

Por último, se comparó la actividad bactericida de los extractos las plantas en estudio contra *M. smegmatis* y *M. tuberculosis*, encontrando que los resultados obtenidos no correlacionaron entre si para ambas micobacterias.

Tabla 2. Concentración Mínima Inhibitoria para *M. smegmatis* ATCC 607

Planta	Concentración µg/ml						Rifampi -cina	Medio + micobacteria
	100	50	25	12.5	6.25			
<i>Bursera simaruba</i>	-	-	+	+	+	-	+	
<i>Guazuma ulmifolia</i>	+	+	+	+	+	-	+	
<i>Byrsonima crassifolia</i>	+	+	+	+	+	-	+	
<i>Hymenaea courbaril</i>	+	+	+	+	+	-	+	
<i>Bougainvillea glabra</i>	+	+	+	+	+	-	+	
<i>Senecio salignus</i>	+	+	+	+	+	-	+	
<i>Solanum torvum</i>	+	+	+	+	+	-	+	
<i>Dorstenia contrajerva</i>	+	+	+	+	+	-	+	
<i>Sida rhombifolia</i>	-	-	+	+	+	-	+	
<i>Litsea guatemalensis</i>	-	-	-	+	+	-	+	
<i>Sambucus mexicana</i>	-	-	-	+	+	-	+	
<i>Cecropia obtusifolia</i>	-	-	-	+	+	-	+	
<i>Liquidambar styraciflua</i>	-	-	-	+	+	-	+	
<i>Acacia farnesiana</i>	-	-	-	+	+	-	+	

Fuente: datos experimentales. (-) = No hubo crecimiento bacteriano (+) = Crecimiento bacteriano

## DISCUSION

Existen factores que han favorecido el incremento de la prevalencia de tuberculosis en el mundo; como el aumento de la pobreza en países en vía de desarrollo, crecimiento de los niveles de desnutrición, la falta de apego al tratamiento, el descuido de la vigilancia epidemiológica, la escasez de recursos humanos y económicos para su control, el surgimiento del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) y de cepas multiresistentes a las drogas. Es clara la necesidad de contar con metodologías que permitan realizar estudios que determinen la sensibilidad o resistencia a las drogas antituberculosas, para evitar la instauración de tratamientos empíricos que quizás no sólo resulten inefectivos sino que, tal vez, favorezcan la propagación de cepas resistentes a las drogas.

El género *Mycobacterium* tiene una pared celular compleja, rica en lípidos y un esqueleto de peptidoglucano con moléculas de arabinogalactanimicolato, lo que le da

una gran resistencia a muchos de los antibióticos, por lo que es necesario utilizar un régimen óptimo de tratamiento para cepas *M. tuberculosis* no resistentes, el cual consiste en un coctel de tres, cuatro o cinco agentes de primera línea, según la categoría clínica, radiológica y bacteriológica del paciente. Entre las que se encuentran rifampicina (RIF), isoniazida (INH), pirazinamida (PZA), etambutol (ETB) y estreptomycin (SM) administradas diariamente por seis meses hasta un año o más, dependiendo de la gravedad del paciente, combinación generalmente efectiva, aún si la micobacteria es resistente a una de las drogas usadas.

Es importante mencionar que a excepción de la RIF, inhibidor de la ARN polimerasa procariótica, y SM, inhibidor de la síntesis de proteínas, los demás quimioterapéuticos usados actúan sobre la síntesis de los ácidos grasos complejos de las micobacterias. Los mecanismos de resistencia a estas drogas involucran genes cromosomales, por lo que su determinación no es tan fácil, ya que se realiza por métodos moleculares y depende de la

cantidad de genes cromosomales implicados y de la comprensión del rol celular de los mismos (17,18).

En la población guatemalteca el uso de plantas medicinales es una práctica popular y muy común, por lo que es necesario validar científicamente el uso de estos recursos naturales como tratamientos alternativos para erradicar las enfermedades.

Es por ello que se realizó el presente estudio, eligiendo plantas que son popularmente utilizadas para el tratamiento de las afecciones respiratorias en Guatemala, siendo estas *B. simaruba*, *G. ulmifolia*, *B. crassifolia*, *H. courbaril*, *S. rhombifolia*, *S. salignus*, *S. torvum*, *D. contrajerva*, *B. glabra*, *S. mexicana*, *C. obtusifolia*, *B. obtusifolia*, *A. farnesiana*, *L. guatemalensis* y *L. styraciflua* con el fin de encontrar tratamientos alternativos contra la tuberculosis y ayudar en un futuro a los pacientes que padecen de esta enfermedad (19-23).

Al determinar la concentración mínima inhibitoria de los extractos con *M. smegmatis* ATCC 607 se observó que *B. simaruba* y *S. rhombifolia* poseen una inhibición de 50 µg/mL y *S. mexicana*, *C. obtusifolia*, *A. farnesiana*, *L. guatemalensis* y *L. styraciflua* la presentan a 25 µg/mL como se observa en la tabla 2.

*S. rhombifolia* en infusión se usa para aliviar amigdalitis, gripe, tos, catarro y *B. simaruba*, según estudios etnobotánicos, es utilizada en Cuba para afecciones respiratorias como el catarro, lo cual constituye un valioso aporte (10). En República Dominicana el estudio sobre el análisis fitoquímico sobre algunas plantas mostró que *B. simaruba* posee inhibición solamente en algunos bacilos Gram-positivo y en Guatemala la decocción de la corteza y las hojas se usa para tratar afecciones respiratorias. El efecto bactericida mostrado por esta planta posiblemente se debió a la sustancia activa que posee, aunque puede no depender de una estructura en común, ya que hay que considerar que las drogas antituberculosas usadas comercialmente constituyen un grupo heterogéneo por sus principios activos (19, 24-25).

Ninguno de los extractos evaluados presentaron actividad inhibitoria contra *M. tuberculosis* H37Rv pudiéndose deber a que es una bacteria con estructura compleja que contiene ácido micólico que le confiere la formación de barreras impermeables impidiendo el acceso

de sustancias hidrofílicas y fármacos y a la resistencia a diferentes drogas debido a las mutilaciones al azar (26-27).

Se ha observado en estudios anteriores, que algunos de los extractos estudiados más efectivos que han presentado actividad contra micobacterias son los obtenidos con el diluyente metanol, sin dejar atrás a los clorofórmicos, hexánicos y etanólicos, para extraer los componentes químicos presentes en las plantas, siendo estos principalmente alcaloides, cumarinas, flavonoides los cuales se encontraron en las plantas estudiadas (28,29). Al no utilizar en esta investigación, otros disolventes, solamente etanol, limita la extracción completa de estos compuestos químicos, presentes en baja cantidad en algunas de las plantas estudiadas. Así mismo el estudio de otras de las partes de las plantas, las cuales pueden ser más ricas en estas sustancias.

Se concluye en este estudio que ninguno de los extractos etanólicos evaluados evidenció efecto inhibitorio significativo contra *M. tuberculosis*. Mientras que para *M. smegmatis*, *B. simaruba* y *S. rhombifolia* presentaron una inhibición en las cinco repeticiones a una CIM de 50 µg/mL y *S. mexicana*, *C. obtusifolia*, *A. farnesiana*, *L. guatemalensis* y *L. styraciflua* la presentaron a 25 µg/mL por lo que si tienen efecto inhibitorio significativo con un  $\pm=0.05$  y una confiabilidad del 95% (26).

Se validó el micrométodo colorimétrico de MTT empleando cepas ATCC para su utilización en posteriores estudios, para ello se obtuvo el mismo resultado en las cinco repeticiones. Se utilizó el control positivo de rifampicina a una concentración de 1 mg/ml con 100% de inhibición debido a que es una de las drogas más efectivas, previene la aparición de cepas emergentes resistentes y tiene una acción bactericida en todas las fases del crecimiento. Al mismo tiempo que es la droga de elección en Guatemala para el tratamiento de la tuberculosis. En el control negativo no se observó un cambio de color debido al crecimiento de las micobacterias (10).

Al comparar los resultados obtenidos con *M. smegmatis* y *M. tuberculosis* no se correlacionan entre sí por lo que *M. smegmatis* no podría sustituir a *M. tuberculosis* en posteriores estudios para obtener resultados de manera más rápida.

Se recomienda seguir realizando estudios *in vitro* para

determinar la actividad inhibitoria de extractos de plantas utilizados por la población guatemalteca para tratar las infecciones respiratorias. Así como identificar el principio activo para utilizar dicha planta en tratamientos alternativos e inhibición de otras bacterias. Además, sería conveniente realizar extractos de las mismas plantas que se utilicen en enfermedades respiratorias, utilizando diferentes solventes y partes de éstos.

#### Agradecimientos:

Al Laboratorio de Bioensayos del Departamento de Citohistología y al Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, USAC. Este trabajo se realizó dentro del marco del Subprograma X: Química Farmacéutica. Proyecto X.11 Búsqueda y evaluación de agentes naturales antituberculosis (PIBATUB) del CYTED.

#### REFERENCIAS

1. Caminero JA, *et al.* Tratamiento de la tuberculosis. Paris: UICTER, 2002. 1250-1258
2. Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social. Manual de técnicas y procedimientos de bacteriología de la tuberculosis. 2ed. Guatemala. 2001
3. Murray P, *et al.* Microbiología Médica. Editorial Mosby-Doyma S.A. España. 1992, 218-225
4. Clancy E. Transmisibilidad de la tuberculosis. Boletín de la Unión Internacional contra la Tuberculosis y Enfermedades Respiratorias. 1990.
5. Comité Nacional de Neumología. Criterios de diagnóstico y tratamiento de la tuberculosis infantil. 2002 159-178
6. Arias A. Lepra. Rev Med IMSS 1998; 42 (4): 343-344 MG
7. Arrison P, *et al.* Principios de Medicina Interna. 16 ed. Chile 2006. pp1062-1068
8. Petersdorf N, *et al.* Principios de medicina interna. 6ed. 1982. 1419-1425
9. Mendez A. *et al.* Controlling multidrug-resistant tuberculosis and access to expensive drugs: a rational framework 2002. 489-449
10. Koklik WK, Willey HP y Amos DN. Zinsser Microbiología. 17ª ed. Buenos Aires, Argentina: Editorial Médica Panamericana. 1983 685-717
11. Cañigueral S, Vila R. La Fitoterapia racional. 4ª Ed. Barcelona 2003:15-27.
12. Grange J. Resistencia a drogas y eliminación de la tuberculosis. Boletín de la Unión Internacional contra la tuberculosis y Enfermedades respiratorias. 1990, 65:63-66.
13. Blomberg B. *et al.* The rationale for recommending fixed-dose combination tablets for treatment of tuberculosis. Bulletin of the World Health Organization, 2001, 79(1):61-67
14. Manrique S. Acción antimicobacteriana *in vitro* de seis plantas medicinales usadas en el tratamiento de tuberculosis. Guatemala: Universidad de San Carlos, (Tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 1992 42p. (p.14-20)
15. Figueroa L. Determinación de la actividad contra *Mycobacterium smegmatis* y *Mycobacterium tuberculosis* de extractos de plantas de uso medicinal en Guatemala. Guatemala: Universidad de San Carlos, (Tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 2000 56p. (34-40)
16. Mazariegos A., *et al.* Actividad micobactericida de extractos de plantas popularmente usados para infecciones pulmonares en Guatemala. Guatemala: Universidad de San Carlos, (Informe final de curso de Investigación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 2004 22p.
17. Quiroz. E. Bases moleculares de resistencia de *Mycobacterium tuberculosis*. Temas de Actualidad. Madrid. Revista Diagnóstico Biológico. 2001,50:4
18. Dulger, B. *et al.* Antimicrobial studies on three *Hypericum* species from Turkey. South African Journal of Botany 2002,68:90-93

19. Argueta V, *et al.* Atlas de las plantas de la medicina mexicana tradicional. Instituto Nacional Indigenista México 1994;3:9-10.
20. Cáceres A. Plantas de uso medicinal en Guatemala. Ed. Universitaria. Guatemala 1999 191-193, 280-281.
21. Standley PC, Steyermark JA. Flora of Guatemala. Fieldiana: Botany 1946 24:5;531, 670
22. Weniger L. Elements for a caribbean pharmacopeia. Cuba. 1998. pp318
23. Núñez E. Plantas medicinales de Puerto Rico. Ed. Universidad de Puerto Rico. 1992. pp 498
24. Ramón S. Plantas medicinales de uso tradicional en Pinar del Río. Rev Cubana Farm. 1998 32
25. Bauer C. Velos A. Rodriguez E. A preliminary phytochemical analysis of *Guaiacum officinale*, *Guaiacum sanctum* (Zygophyllaceae), and *Bursera simaruba* (Burseraceae). J. Ethnophar 2002 129-133
26. Rodríguez. *et al.* Resistencia primaria a fármacos en la tuberculosis y comparación de pacientes con un tratamiento previo en dos centros mayores de referencia y una clínica privada en la ciudad de Guatemala, 1998. Revista de RECCAVIR 2002;14-20
27. Gorocica P, *et al.* Componentes glicosilados de la envoltura de *Mycobacterium tuberculosis* que intervienen en la patogénesis de la tuberculosis. Rev. Inst. Nal Resp Mex 2005 18:142-153
28. Wayne D. Bioestadística. Base para el análisis de las ciencias de la salud. Editorial Noriega. México 1998: 245-345.
29. Dulger, B. *et al.* Antimicrobial studies on three *Hypericum* species from Turkey. South African Journal of Botany 2002,68:90-93