

Actividad biológica de *Plumbago scandens* L. sobre cepas multidrogoresistente de *Mycobacterium tuberculosis*

[Biological activity of *Plumbago scandens* L. against multidrug-resistance strains of *Mycobacterium tuberculosis*]

Natali MONCADA ASCENCIO¹, Manuel FARCIO VILLARREAL¹, Consuelo ROJAS IDROGO¹, Dalva TREVISAN FERREIRA², Oscar HORNA DÁVILA³, Jurandir PEREIRA² y Guillermo E. DELGADO PAREDES^{1*}

¹Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Ciudad Universitaria, Juan XXIII N°391, Lambayeque - Perú.

²Departamento de Química, Centro de Ciências Exatas, Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brasil. ³Dirección Regional de Salud, Laboratorio de Referencia Regional en Salud Pública – Av. Salaverry N° 1610 – Chiclayo, Perú.

*Contactos / Contacts: Guillermo E. DELGADO PAREDES E-mail address: guidelg2001@yahoo.es

Abstract

Tuberculosis control is a high priority for the Ministry of Health from Peru. In the present work the inhibitory effect of both metanolic (MeOH) and ethyl acetate (AcOEt) crude extracts and the minimum inhibitory concentration (MIC) of both wild plants and *in vitro* plantlets of *Plumbago scandens* L. - Plumbaginaceae- against multidrug-resistance (MDR) strains of *Mycobacterium tuberculosis* were determined. The plant material was constituted by roots and seeds, collected in the Motupe (Lambayeque) area. The *in vitro* plantlets were obtained from seedlings and micropropagated by shoot tips and nodal segments in Murashige and Skoog (MS) culture medium. The microbiological material consisting of one control strain and two strains of *Mycobacterium tuberculosis* resistant to isoniazid (INH) and rifampicin (RIF) was cultivated using the Lowenstein-Jensen culture medium. The MIC values varied from 0,65 to 1,3 mg/mL. Bacterial strains showed more sensitivite to the AcOEt crude extract. The GC analysis of the plant material showed the presence of the naphtoquinone plumbagin and other aromatic compounds. In conclusion, the MeOH y AcOEt crude extracts from roots of the wild plants and MeOH crude extract of *in vitro* plantlets of *P. scandens* showed a strong inhibitory activity against MDR strains of *M. tuberculosis*.

Keywords: Antimicrobial activity, metanolic extract, plumbagin, tissue culture, tuberculosis

Resumen

El control de la tuberculosis es un objetivo de alta prioridad para el Ministerio de Salud del Perú. 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 isoniácida (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*.

Palabras Clave: Actividad antimicrobiana, cultivo de tejidos, extracto metanólico, plumbagina, tuberculosis .

Recibido | Received: 30 de Diciembre de 2010.

Aceptado en versión corregida | Accepted in revised form: 22de Marzo de 2011.

Publicado en línea | Published online: 30 de Mayo de 2010.

Este artículo puede ser citado como / This article must be cited as: Natali MONCADA ASCENCIO, Manuel FARCIO VILLARREAL, Consuelo ROJAS IDROGO, Dalva TREVISAN FERREIRA, Oscar HORNA DÁVILA, Jurandir PEREIRA, Guillermo E. DELGADO PAREDES. 2011. Actividad biológica de *Plumbago scandens* L. sobre cepas multidrogoresistente de *Mycobacterium tuberculosis*. . Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat 10(3): 233 – 245.

INTRODUCCIÓN

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecto-contagiosa causada por *Mycobacterium tuberculosis*, también conocido como bacilo de Koch que, por ser una bacteria aeróbica, se desarrolla principalmente en los pulmones; aunque puede atacar otras áreas del cuerpo humano. Es considerada la enfermedad más prevalente en el mundo y sólo en el 2006 se estimó en 9,2 millones (139 por 100.000 habitantes) los nuevos casos de infectados con TB, de los cuales 500.000 fueron multidrogo resistentes (resistentes a isoniacida y rifampicina); el número de muertes fue de 1,7 millones o 200 fallecidos por hora (WHO, 2008). Alrededor del 95% de los casos y 98% de muertes por TB se presentan en los países en vías de desarrollo, en tanto que el 75% de los casos que suceden en estos países están en el grupo de edad económicamente activa (de 15 a 50 años); en el Perú la tasa de morbilidad en el año 2007 alcanzó la cifra de 12,5 por 100.000 habitantes (Bonilla, 2008). La tuberculosis multidrogoresistente (TB MDR) es causada por el bacilo resistente por lo menos a los fármacos de primera línea más eficaces para el tratamiento de la TB: isoniacida (INH), rifampicina (RIF) y a otros como etambutol (ETB), piracinamida (PZA) y estreptomycin (STR) (Sanchoetene *et al.*, 2008). La TB MDR presenta tres características importantes que dificultan su manejo:

- (a) es difícil de detectar, requiriéndose un cultivo y acceso a pruebas finas de sensibilidad (Marchi *et al.*, 2008),
- (b) las estrategias de manejo son más complejas y requieren mayores recursos logísticos y económicos y
- (c) los tratamientos con múltiples fármacos presentan reacciones adversas al tener que administrarse por periodos largos de tiempo como seis meses para INH y RIF o una combinación de PZA y ETB o SRT, cuando es usado solamente en los dos primeros meses del tratamiento (NIAID, 2001).

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 sea puros o en extractos crudos (Gibbons, 2008); así como la utilización de una serie de nuevas sustancias promisorias para el tratamiento de la TB, aisladas de diferentes especies de *Streptomyces*, que han sido reportadas como inhibidoras de la translocasa I (De Souza *et al.*, 2010). En el Perú esta alternativa resulta muy privilegiada debido al alto número de especies y compleja

diversidad de su flora diseminada en variados ambientes ecológicos (Mostacero *et al.*, 2002).

La familia Plumbaginaceae presenta una docena de géneros y alrededor de 400 especies ampliamente distribuidas en diferentes partes del mundo, especialmente desde la región Mediterránea al Asia Central y Occidental, dependiendo de su hábitat, ya sea xerófito o marítimo (Cronquist, 1988). En el Perú se han reportado 4 especies de *Plumbago*: *P. capensis* Thunberg, *P. indica* Lamarck, *P. coerulescens* H.B.K. y *P. scandens* L.; *P. scandens* ésta última distribuida en los departamentos de Piura, Cajamarca, Lambayeque, San Martín y Huánuco (Brako y Zarucchi, 1993).

En cultivo de tejidos no se reportan trabajos realizados en *P. scandens* y son escasos los trabajos utilizando plantas silvestres; sin embargo, en medicina tradicional las especies de *Plumbago*: *P. zeylanica*, *P. auriculata*, *P. indica*, *P. pensonii*, *P. wisi* y *P. triste* son ampliamente utilizadas en algunas localidades de Java y África, en el tratamiento de enfermedades como la influenza, sífilis y lepra (Van der Vijver y Lötter, 1971) y *P. scandens* se ha usado tradicionalmente en el tratamiento de varias enfermedades, algunas de ellas causadas por bacterias (Duke y Beckstrom-Sternberg, 2002).

Por otro lado, se ha reportado que extractos clorofórmicos de *P. zeylanica* mostraron fuerte actividad inhibitoria sobre *Neisseria gonorrhoeae*. La actividad superior a la de penicilina G, se determinó mediante el método de difusión de disco (Gundidza y Manwa, 1990). En otros trabajos, Desta (1993) y Ahmad *et al.*, (1998), reportaron que extractos acuosos y alcohólicos de raíces de *P. zeylanica* mostraron actividad antibacteriana sobre *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Proteus vulgaris* y contra la levadura *Candida albicans*. Asimismo, extractos clorofórmicos, de raíces de *P. scandens*, ejercieron una actividad antimicrobiana sobre *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* y *Staphylococcus aureus* (Ribeiro de Paiva *et al.*, 2003). Un trabajo relevante sobre la flora del Perú fue realizado utilizando extracto metanólico de plántulas *in vitro* de *Drosera capillaris*, en el cual la plumbagina fue identificada por comparación con el tiempo de retención del patrón correspondiente, lográndose una tasa de inhibición en el crecimiento de *M. tuberculosis* de 40 y 93,1% en los tratamientos de 2,5 y 5 mg/mL, respectivamente (Alvarado *et al.*, 2011).

Los efectos terapéuticos de *Plumbago* pueden estar relacionados con la presencia de naftoquinonas, metabolitos secundarios normalmente sintetizados y acumulados en varias especies de Plumbaginaceae, Droseraceae, Ebenaceae, Nepenthaceae y Diacophyllaceae. Las naftoquinonas más importantes y mejor estudiadas son la plumbagina y la 7-metiljuglona, (Durand y Zenk, 1971).

Recientemente, se ha reportado un conjunto de productos naturales con actividad inhibitoria de la Translocasa I, una enzima que cataliza la reacción entre el pentapeptido UDP-MurNAc y el undecaprenilfosfato formando UMP y el Lípido I, que es el primer intermediario de la síntesis de las péptidoglicanas, productos naturales que constituyen una clase promisoría de compuestos contra la TB. Entre estos se encuentran las liposidomicinas, caprazamicinas, capuramicinas y pacidamicinas (De Souza et al., 2010).

El incremento en el número de casos de TB causado por cepas resistentes y TB MDR, la posibilidad de que determinados metabolitos secundarios, obtenidos de las plantas, puedan ser utilizados en su control, sin que ello signifique depredarlas en sus ambientes naturales al micropropagarlas en cultivo de tejidos, determinó que en el presente trabajo se estudie el efecto de los extractos crudos metanólico (MeOH) y de acetato de etilo (AcOEt) de raíces de plantas silvestres y extracto crudo de MeOH de plántulas *in vitro* de *P. scandens* sobre cepas multidrogeresistente (MDR) a INH y RIF de *M. tuberculosis*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Raíces y semillas de plantas silvestres de *Plumbago scandens* L., conocida con el nombre común de “pega-pega” fueron colectadas durante 2008, en la localidad de Motupe (Lambayeque, Perú), en tanto que las plántulas *in vitro* fueron obtenidas por germinación de semillas. La especie fue identificada por el Dr. Leopoldo Vásquez Núñez de la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo (UNPRG), Lambayeque. La muestra botánica fue herborizada y depositada en el Herbario Pedro Ruiz Gallo (HPRG) de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNPRG, Lambayeque (Perú).

Material microbiológico

Tres cepas de *M. tuberculosis*, se aislaron y codificaron en el Laboratorio de Micobacterias –

Laboratorio de Referencia de la Dirección Regional de Salud de Lambayeque. La cepa C1 o estándar (cepa H₃₇R_v) y las cepas C2 y C3 (MDR, código 364 y MDR, código 2202, respectivamente) multidrogeresistente (TB MDR), a INH y RIF, solamente.

Germinación de semillas y micropropagación

Una semana después de colectar semillas maduras en óptimas condiciones morfológicas, fisiológicas y fitosanitarias, se desinfectaron con alcohol etílico 70% e hipoclorito de sodio 5,25% (“Clorox”) para cultivarse en el medio MS (Murashige y Skoog, 1962), que consiste de tiamina.HCl 1 mg/L, m-inositol 100 mg/L y sacarosa 2%. En la micropropagación se utilizaron plántulas *in vitro* de 45 días de germinadas, que fueron seccionadas en ápices caulinares y segmentos nodales de 10 mm de longitud. Estos explantes fueron cultivados en el medio MS, las vitaminas, los reguladores de crecimiento ácido indol-3-acético (AIA) y ácido giberélico (AG₃) 0,02 mg/L, respectivamente, y sacarosa 2%. En ambos procesos el pH del medio de cultivo fue ajustado a $5,8 \pm 0,1$ con NaOH y HCl 0,5N, respectivamente, antes de la gelificación con agar 0,7%. Las condiciones ambientales de incubación fueron ajustadas a 24 – 28° C de temperatura, $5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-2}$ de irradiancia y 16/8 h (día/noche) de fotoperiodo.

Obtención del extracto

Las raíces de plantas silvestres y las plántulas *in vitro* de 45 días y de 8 - 10 meses de edad se secaron en estufa a 40 °C por 48 h, picadas en pequeños fragmentos y molidas en mortero mecánico y mortero de porcelana, respectivamente, hasta constituir un polvo fino. Las raíces, 30 y 250 g de masa seca fueron sometidas a extracción en frío con MeOH y AcOEt por tres veces consecutivas y después del filtrado, los extractos crudos fueron recuperados con los mismos solventes de extracción. En el caso de las plántulas *in vitro*, 54 g de masa seca, tanto de 45 días como de 8 - 10 meses de edad, se extrajo con MeOH por dos veces consecutivas y después del filtrado, el extracto crudo fue recuperado con MeOH.

Análisis por cromatografía de gases

Los extractos crudos de raíces de plantas silvestres y de plántulas *in vitro*, fueron analizados por CG en el Laboratorio de Química de la Universidad Estadual de Londrina, Paraná (Brasil), utilizando el sistema de cromatografía de gases bajo las siguientes condiciones: Shimadzu 17-D con detector FID, colum-

na HP-5, I inyector: 300° C, detector: 300° C, columna: 200° C/2 min, temperatura final: 320° C – 10° C/min, volumen de corrida: 2,7 mL/min, solvente: hexano, gas de arrastre: helio, tiempo de corrida: 30 min y estándar utilizado: plumbagina (5-hidroxi-2-metil-1,4-naftoquinona).

Determinación de la actividad antibacteriana de los extractos crudos de MeOH y de AcOEt de *P. scandens* (OPS, 1986)

Preparación de la suspensión bacilar y diluciones

El mayor número de colonias de las cepas en estudio fue tomado con una espátula esterilizada y colocado en la pared interna de los tubos de ensayo que contenían 5 mL de agua destilada esterilizada; se trituraron y mezclaron las colonias con una bagueta esmerilada esterilizada hasta obtener una suspensión homogénea; se dejó reposar durante 30 - 60 segundos hasta sedimentar y luego se tomó el sobrenadante y ajustó la turbidez de la suspensión (suspensión madre) comparando con el patrón de turbidez que contenía 1 mg/mL de masa bacilar. Se prepararon diluciones al décimo de 10^{-1} a 10^{-6} seleccionándose las diluciones 10^{-3} , 10^{-5} y 10^{-6} .

Preparación de soluciones de los extractos crudos y siembra de *M. tuberculosis*

En la preparación de soluciones se tomaron 156,25; 312,5; 625 y 1250 mg del extracto crudo correspondiente (MeOH o AcOEt) y se disolvieron en 10 mL. Cada solución fue agregada a 290 mL del medio de cultivo Lowenstein–Jensen (L-J), obteniéndose las concentraciones finales de 0,65; 1,3; 2,6 y 5,2 mg/mL, respectivamente; luego se dispensó en tubos de ensayo tapa rosca a razón de 5 mL por tubo de ensayo; se llevó al coagulador a 85° C por 45 minutos y finalmente a control de esterilización con las tapas ligeramente flojas a 37° C/24 h. En el caso de las plántulas *in vitro*, el proceso fue similar al anterior con la diferencia que se pesaron 200, 400 y 1600 mg del extracto obteniéndose las concentraciones de 0,65; 1,3 y 5,2 mg/mL, respectivamente.

El proceso de siembra de *M. tuberculosis* se realizó en una cámara de seguridad biológica tipo II clase A, estableciéndose tres series de dilución: 10^{-3} , 10^{-5} y 10^{-6} , eliminándose previamente el líquido

condensado en el medio de cultivo. En cada una de las diluciones indicadas, se sembró 0,2 mL de la dilución en los tubos de ensayo correspondientes, los que fueron inicialmente mantenidos en posición horizontal, con rotación suave para distribuir homogéneamente la suspensión en la superficie del medio de cultivo; luego se llevaron a estufa a 37° C.

Se establecieron dos controles, el primero correspondió a las cepas bacterianas inoculadas en 290 mL del medio de cultivo L-J suplementado únicamente con 10 mL del solvente (MeOH o AcOEt), para de esta manera descartar el efecto fitotóxico del solvente utilizado, y el segundo control correspondió a la cepa estándar C1, susceptible a INH y RIF, para verificar el grado de respuesta ante la acción del extracto crudo.

Lectura e interpretación de resultados

Las lecturas se realizaron a las 4 y 6 semanas de instalado el experimento. En el caso de los tubos de ensayo control la media de las colonias contadas indicó el número de bacilos sembrados. En el caso de los tubos de ensayo con extracto crudo se partió del hecho de que la suspensión madre de la cepa en estudio contenía 1 mg/mL de masa bacilar; sin embargo, la cantidad de bacilos en 1 mg de masa bacilar varió considerablemente de una cepa a otra, variación que pudo ser de uno – cien millones de gérmenes/mL, por lo que fue necesario sembrar las diluciones 10^{-3} y 10^{-5} . El procedimiento está resumido en la figura 1.

Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)

Se determinaron los valores CMI, teniendo en cuenta la concentración más baja del extracto crudo capaz de inhibir el crecimiento visible de *M. tuberculosis* después del periodo de incubación (Andrews, 2001).

Diseño experimental y análisis estadístico

Se utilizó el diseño de contrastación de hipótesis con estímulo creciente donde las cepas de *M. tuberculosis* son los grupos experimentales a las que se enfrentó diferentes concentraciones de los extractos crudos de MeOH y AcOEt de plantas silvestres y de extracto crudo de MeOH de plántulas *in vitro* de *P. scandens*.

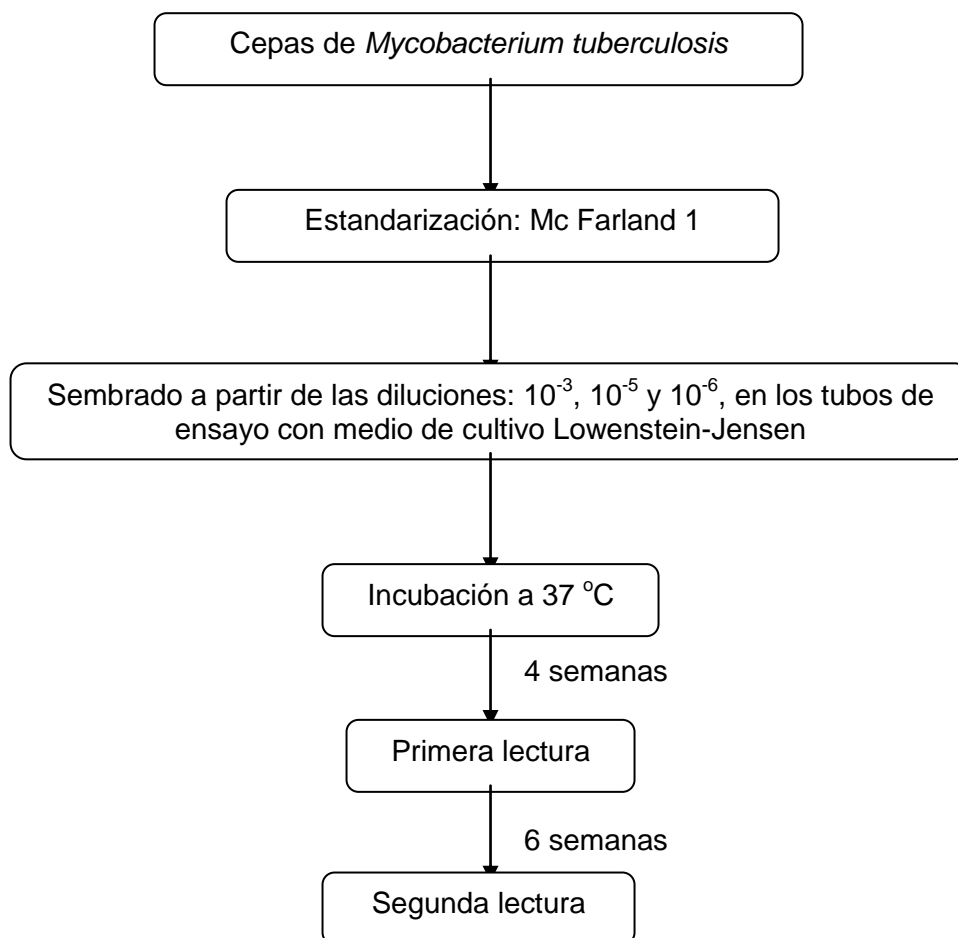


Figura 1. Flujograma en el proceso de siembra de *M. tuberculosis* en medio de cultivo Lowenstein-Jensen suplementado con diferentes concentraciones de los extractos crudos MeOH y AcOEt de raíces de plantas silvestres y extracto crudo MeOH de plántulas *in vitro* de *P. scandens*.

RESULTADOS

Germinación de semillas y micropropagación

Después de 45 días de iniciada la germinación de las semillas las plántulas alcanzaron una altura de 12 - 14 cm por lo que fueron subcultivadas por ápices caulinares y nudos en el medio de cultivo MS suplementado con AIA y AG₃ 0,02 mg/L, respectivamente, formando plántulas de 10 - 12 cm de altura en el lapso de 8 - 10 meses. En ambos casos las plántulas desarrollaron un óptimo sistema radicular.

Análisis fitoquímico

El análisis cromatográfico (CG) de los extractos crudos de MeOH y AcOEt de las raíces de plantas

silvestres mostró varios picos importantes con tiempos de retención 6,50 (silicato de metilo), 11,68 (contaminante común) y 22,01 min (pico de bajo índice indicativo de la presencia de plumbagina). Plumbagina (5-hidroxi-2-metil-1,4-naftoquinona), resultó con tiempo de retención de 12,72 min (Figura 2). En el análisis CG del extracto crudo de MeOH de plántulas *in vitro* de 45 días de edad no se detectó la presencia de plumbagina pero sí de cetonas, aldehidos, ácidos carboxílicos y alcoholes de cadena larga; sin embargo, en plántulas *in vitro* de 8 - 10 meses de edad en el perfil cromatográfico CG se detectó plumbagina con tiempo de retención de 17,83 min, además, de varios picos importantes con tiempos de retención de 19,81 (éster aromático) y 22,10 min (ácido carboxílico

de cadena larga) (Figura 3).

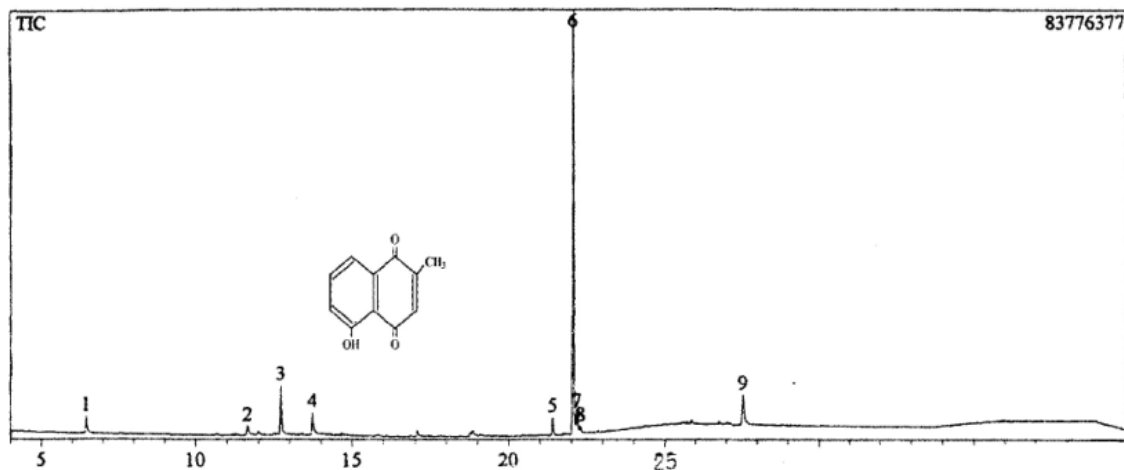


Figura 2. Perfil fitoquímico del extracto crudo de MeOH de raíces de plantas silvestres de *P. scandens*: Silicato de metilo (1), contaminantes que aparecen comúnmente (2), plumbagina (3), picos de bajo índice indicativo de la presencia de plumbagina (4, 5, 6, 7, 8 y 9).

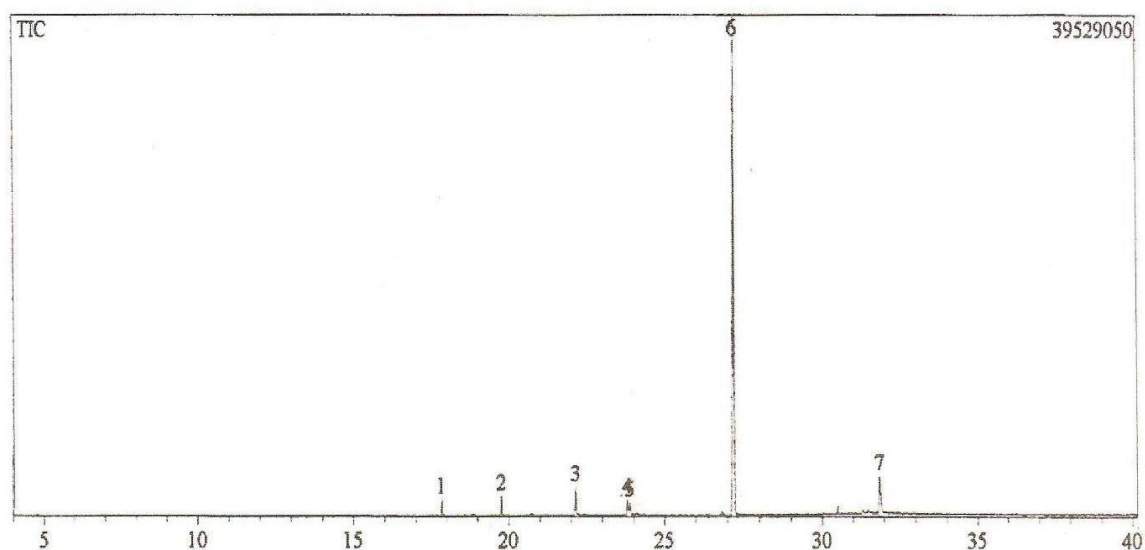


Figura 3. Perfil fitoquímico del extracto crudo de MeOH de plántulas *in vitro* de 8 – 10 meses de edad de *P. scandens*: Plumbagina (1), éster aromático (2), ácidos carboxílicos de cadena larga (3, 4 y 5), picos de bajo índice indicativo de la presencia de plumbagina (6 y 7).

Actividad antibacteriana

El resultado de la inhibición del extracto crudo de MeOH de plantas silvestres de *P. scandens* sobre *M. tuberculosis* se muestra en la tabla 1. La inhibición en el crecimiento bacteriano fue modulada por los factores cepa bacteriana y concentración del extracto.

En todas las cepas estudiadas (C1, C2 y C3) conforme se incrementó la concentración del extracto (1,3; 2,6 y 5,2 mg/mL) el porcentaje de inhibición también se incrementó, desde 31,6% en la concentración 1,3 mg/mL para la cepa C1 hasta 99,9% en la concentración 5,2 mg/mL para las cepas C2 y C3; sin

embargo, la cepa C2 fue la más sensible a la acción del extracto puesto que aún en la concentración más baja ensayada (1,3 mg/mL) la inhibición fue 93,2%. El resultado de la inhibición de los extractos de AcOEt de plantas silvestres de *P. scandens* sobre *M. tuberculosis*

se muestra en la tabla 2. En todas las cepas y concentraciones ensayadas la inhibición en el crecimiento bacteriano fue casi absoluta, es decir, 99,9%.

Tabla 1. Efecto inhibitorio del extracto crudo de MeOH de raíces de plantas silvestres de *P. scandens* sobre *M. tuberculosis*.

Cepas ¹	Tratamiento (mg/mL)	Promedio de colonias (N°)	Porcentaje (%)	
			Inhibición	Resistencia
C1	0,0	300		
	1,3	205	31,6	68,3
	2,6	185,5	38,2	61,8
	5,2	1	99,8	0,2
C2	0,0	195		
	1,3	13,2	93,2	6,8
	2,6	8,5	95,6	4,4
	5,2	0,0	99,9	0,0
C3	0,0	247,5		
	1,3	138	44,2	55,8
	2,6	98,5	60,2	39,8
	5,2	0,0	99,9	0,0

¹C1, cepa C1 o estándar (cepa H₃₇R_v), C2 (MDR, código 364) y C3 (MDR, código 2202)

Tabla 2. Efecto inhibitorio del extracto crudo de AcOET de raíces de plantas silvestres de *P. scandens* sobre *M. tuberculosis*.

Cepas ¹	Tratamiento (mg/mL)	Promedio de colonias (N°)	Porcentaje (%)	
			Inhibición	Resistencia
C1	0,0	220		
	1,3	0,0	99,9	0,0
	2,6	0,0	99,9	0,0
	5,2	0,0	99,9	0,0
C2	0,0	185,5		
	1,3	0,0	99,9	0,0
	2,6	0,0	99,9	0,0
	5,2	0,0	99,9	0,0
C3	0,0	247,5		
	1,3	0,0	99,9	0,0
	2,6	0,0	99,9	0,0
	5,2	0,0	99,9	0,0

¹C1, cepa C1 o estándar (cepa H₃₇R_v), C2 (MDR, código 364) y C3 (MDR, código 2202)

Tabla 3. Efecto inhibitorio del extracto crudo de MeOH de plántulas *in vitro* de *P. scandens* sobre *M. tuberculosis*.

Cepas	Tratamiento (mg/mL)	Promedio de colonias (N°)	Porcentaje (%)	
			Inhibición	Resistencia
C1	0,0	242,5		
	1,3	102	57,9	42,2
	5,2	65	73,2	26,8
C2	0,0	295,5		
	1,3	44,5	85,0	15,0
	5,2	0,0	99,9	0,0
C3	0,0	260,5		
	1,3	46	82,3	17,7
	5,2	33	87,3	12,7

¹C1, cepa C1 o estándar (cepa H₃₇R_v), C2 (MDR, código 364) y C3 (MDR, código 2202)

El resultado del extracto de MeOH de plántulas *in vitro* de *P. scandens* sobre *M. tuberculosis* se muestra en la tabla 3. La inhibición en el crecimiento bacteriano, al igual que en el caso del extracto de MeOH de plantas silvestres, también fue modulada por los factores cepa bacteriana y concentración del extracto. En todas las cepas estudiadas (C1, C2 y C3) conforme se incrementó la concentración del extracto (1,3 y 5,2 mg/mL) el porcentaje de inhibición también se incrementó, desde 57,9% en la concentración 1,3 mg/mL para la cepa C1 hasta 99,9% en la concentración 5,2 mg/mL para la cepa C2; sin embargo, la cepa C2 fue la más sensible a la acción del extracto puesto que aún en la concentración más baja ensayada (1,3 mg/mL) la inhibición fue 85,0%.

Los valores CMI de los extractos crudos de MeOH y AcOEt de plantas silvestres y de MeOH de plántulas *in vitro* de *P. scandens* sobre *M. tuberculosis* MDR se muestran en la tabla 4. En el caso del extracto crudo de MeOH de plantas silvestres se observó que la inhibición en el crecimiento bacteriano fue modulada por los factores cepa bacteriana y concentración del extracto, mostrándose más sensible la cepa C2 respecto a las cepas C1 y C3; en todos los cultivos bacterianos el promedio de colonias sembradas por

cepa fue 250 registrándose valores CMI 0,65 y 1,3 mg/mL, indicando estos últimos valores que el crecimiento bacteriano fue inhibido en tales concentraciones. En el caso del extracto crudo de AcOEt de plantas silvestres se observó que la inhibición en el crecimiento bacteriano fue igual en todas las cepas ensayadas; el promedio de colonias sembradas por cepa fue 220, alcanzándose el valor CMI 0,65 mg/mL, mostrándose las cepas bacterianas más sensibles al extracto crudo de AcOEt respecto al extracto crudo de MeOH. En el caso del extracto crudo de MeOH de plántulas *in vitro* se observó que la inhibición en el crecimiento bacteriano alcanzó valores CMI 0,65 y 1,3 mg/mL, en un promedio de 265 colonias sembradas por cepa, es decir, valores muy similares a lo observado con el extracto crudo de MeOH de plantas silvestres.

En general, en la mayoría de los tratamientos ensayados, tanto para los extractos crudos de plantas silvestres como de plántulas *in vitro*, los resultados mostraron que la actividad inhibitoria fue alrededor de 99,9%; asimismo, los resultados también mostraron que en los tratamientos control, sin suplemento del extracto crudo, el crecimiento bacteriano fue 100%, descartándose la ocurrencia de algún efecto tóxico del solvente MeOH o AcOEt.

Tabla 4. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) expresada en mg/mL, de los extractos crudos de MeOH y AcOEt de raíces de plantas silvestres y de MeOH de plántulas *in vitro* de *P. scandens* sobre *M. tuberculosis* MDR.

Cepas	Plantas silvestres (mg/L)		Plántulas <i>in vitro</i> (mg/L)
	MeOH	AcOEt	MeOH
C1 (cepa H ₃₇ R _v) (Control)	1,3	0,65	1,3
C2 (MDR, código 364)	0,65	0,65	0,65
C3 (MDR, código 2202)	1,3	0,65	0,65

DISCUSIÓN

Una de las aplicaciones más importantes y prácticas del cultivo de tejidos vegetales es la micropropagación cuyos fundamentos fueron establecidos tempranamente (Murashige, 1974). En el caso de *Plumbago scandens* la micropropagación de ápices caulinares y nudos, a partir de plántulas obtenidas de semillas germinadas *in vitro*, se realizó en el medio de cultivo MS suplementado con AIA y AG₃ 0,02 mg/mL, respectivamente (Delgado, 1999); la elongación del brote así como y el desarrollo de un óptimo sistema radicular, resultó fundamental si tenemos en cuenta que en plantas silvestres la casi exclusiva concentración de plumbagina se encuentra en las raíces (Durand y Zenk, 1971; Van der Vijver y Lötter, 1971; Gundidza y Manwa, 1990). Adicionalmente a la micropropagación, la utilización de otras técnicas del cultivo de tejidos, como la inducción de callos y el establecimiento de suspensiones celulares (Danelutte *et al.*, 2005), abren la posibilidad de inducir la producción en gran escala de determinados metabolitos secundarios no solamente conocidos sino también inéditos en condiciones naturales, sin necesidad de depredar la especie en su ambiente natural y más aún cuando se utilizan partes sensibles de la planta como en este caso la raíz.

Numerosos estudios fitoquímicos han demostrado que varias especies de *Plumbago* sintetizan dos grupos principales de metabolitos secundarios: naftoquinonas y flavonoides, además, de ácido fenólico o derivado (Durand y Zenk, 1971; Ribeiro de Paiva *et al.*, 2002), destacando la naftoquinona plumbagina, presente en grandes

cantidades en las raíces de *P. auriculata* y *P. scandens* (12 - 20% del extracto crudo de MeOH), lo que indicaría un desvío metabólico para su producción y representando una función bastante significativa en estas especies (Ribeiro de Paiva *et al.*, 2002). En el trabajo que se presenta, se detectó plumbagina en raíces de plantas silvestres y plántulas *in vitro* de 8 - 10 meses de edad más no en plántulas *in vitro* de 45 días de edad. En estudios similares, en plántulas *in vitro* adultas de *Piper solmsianum* se detectó la presencia de grandisina, en tanto que en plantas silvestres jóvenes dicha sustancia no se detectó (Vásquez *et al.*, 2011), y recientemente, sólo se detectó la presencia de plumbagina en plántulas *in vitro* adultas de *Drosera capillaris* más no en plántulas *in vitro* jóvenes (Alvarado *et al.*, 2010). Adicionalmente, si bien es cierto que en el trabajo que se presenta el interés principal fue la detección de plumbagina, puesto que no se contó con otros patrones de comparación, la literatura ha revelado la ocurrencia hasta de nueve quinonas en extractos de plantas de campo de *P. auriculata* y *P. scandens* (Ribeiro de Paiva *et al.*, 2002). Es posible que las cantidades de sustancias fenólicas, como en el presente trabajo las naftoquinonas, aumenten en plantas sujetas a altas tasas de irradiancia y temperatura y baja disponibilidad de nutrientes y como *P. scandens* es una especie característica del Bosque Estacionalmente Seco, ecosistema que presenta las condiciones ambientales indicadas, debería exhibir una mayor actividad metabólica, destacando los productos que puedan actuar como defensa de la radiación solar (Larsson *et al.*, 1986). Por otro lado, ha quedado

plenamente demostrada la actividad antibacteriana *in vitro* de la plumbagina, aislada de raíces de *P. scandens*, puesto que se estableció que 0,78 y 1,56 µg/mL, inhibieron el crecimiento de *Candida albicans* y *Staphylococcus aureus*, respectivamente (Ribeiro de Paiva et al., 2003). En éste trabajo, debido a que se utilizó extractos crudos y no sustancias puras, el valor más bajo de CMI fue 0,65 mg/mL.

M. tuberculosis tiene la habilidad de adquirir resistencia a múltiples antibióticos lo que conlleva a la ocurrencia de cepas multidrogoresistente (MDR-TB), ya sea como resultado de un tratamiento inconsistente o parcial a lo que se suma la escasa colaboración del paciente; ello determina la necesaria utilización de drogas de segunda línea anti-TB, tales como aminoglicósidos, polipéptidos, fluoroquinolonas, etionamida y ácido ρ -aminosalicílico (Gibbons, 2008). Desafortunadamente, ahora se tiene cepas con la categoría de extremadamente drogoresistente (XDR-TB) (Goldman et al., 2007), que ya han sido descritas por los Centros de Control de Enfermedades, en los Estados Unidos, como resistentes no solamente a INH y RIF (MDR-TB) sino también a alguna fluoroquinolona y por lo menos a una de las tres drogas inyectables utilizadas en el tratamiento de la TB, tales como capreomicina, kanamicina y amikacina (WHO, 2006); esto complica significativamente el tratamiento e incrementa la mortalidad.

Al respecto, estudios genéticos han demostrado que la resistencia a los fármacos antituberculosos se debe a mutaciones cromosómicas espontáneas en los genes que codifican la diana del fármaco o enzimas implicadas en la activación del fármaco (Somoskovi et al., 2001). En tal sentido, se ha descrito la ocurrencia de enzimas modificantes como las betalactamasas (Kwon et al., 1995) o sistemas de eflujo (Cole et al., 1998), derivados de plantas, entre las que podemos contar a *P. scandens*, que inhiben los mecanismos efluyentes de resistencia a los antibióticos bacterianos (Gibbons, 2008).

En este contexto, todo parece indicar que la susceptibilidad de *M. tuberculosis* estaría relacionada con la estructura química de la pared celular, la cual básicamente presenta la estructura de una bacteria Gram positiva, y que además del peptidoglicano presenta una capa de arabinogalactanos unida a una muy gruesa capa de ácidos micólicos y otra de ácido micocerósicos, así como una capa más externa formada por glucolípidos sulfatados (Walker, 2000). En el caso de la INH su acción requiere una activación *in vivo* que producirá un potente derivado, capaz de

oxidar o acilar grupos proteicos, que finalmente actuará en la síntesis de los ácidos micólicos de la pared de *M. tuberculosis*; estudios genéticos realizados sobre la actividad de los genes *katG* (Zhang et al., 1992) e *inhA* (Vilchère et al., 2000), así como sobre la síntesis del ARNm, en el caso de la RIF (McClure y Cech, 1978), parecen confirmar esta aseveración.

Respecto a la acción del extracto crudo de *P. scandens* sobre *M. tuberculosis*, se considera que la capa de lípidos de la pared celular es disuelta por la plumbagina, ingresando al citoplasma por difusión a través del peptidoglicano; asimismo, la eventual presencia de flavonoides (Budzianowsky et al., 1993), contribuiría a degradar los lípidos de la pared celular bacteriana, propiciando la formación de poros y alterando la permeabilidad de la misma, lo que facilitarí la entrada de la plumbagina al citoplasma y consecuentemente un ingreso desordenado de sustancias tóxicas y salida de sustancias necesarias para la célula. Adicionalmente, una vez en el interior, la plumbagina seguiría actuando sobre las enzimas de la célula al reaccionar con los radicales SH y NH₂, causando su completa inactivación y de esta manera obstaculizando su actividad enzimática (Walker, 2000). Un estudio reciente realizado para evaluar la actividad antituberculosa *in vitro* de 11 aceites esenciales provenientes de plantas medicinales que crecen en Colombia, determinó que los aceites esenciales provenientes de las plantas *Achyrocline alata* y *Swinglea glutinosa* fueron los más activos con concentraciones inhibitorias mínimas de 62,5 ± 0,01 y 100 ± 36 µg ml⁻¹, respectivamente y que carvacrol, timol, *p*-cymene, 1,8-cineole, limoneno, y β-pineno fueron los componentes mayoritarios identificados en los 11 aceites (Bueno-Sánchez et al., 2009); asimismo, en estudios previos se asumió que la actividad del aceite esencial de *A. alata* es probablemente consecuencia de la alta concentración de terpenoides (Billo et al., 2005), hipotizándose que la actividad antibacteriana de estos compuestos es debido a perturbaciones en la fracción lipídica de la membrana plasmática del microorganismo lo que resulta en alteraciones de la permeabilidad de la membrana y en pérdida de materiales intracelulares (Trombetta et al., 2005). Por otro lado, fue determinado el efecto de tres neolignan, licarina A, licarina B y eupomatenoid-7, obtenidas de *Aristolochia taliscana*, una planta usada en la medicina tradicional mexicana, demostrándose que licarina A fue el compuesto más activo sobre varias

cepas de *M. tuberculosis* MDR (León-Díaz et al., 2010). Asimismo, fueron evaluados 35 metabolitos secundarios, entre alcaloides, flavonoides, quinonas, triterpenos y diterpenos, derivados de algunas plantas contra cepas sensibles y MDR de *M. tuberculosis*, demostrándose que los aislados clínicos resistentes a multidrogas mostraron que 6-metoxi-dihidroquelirubina, obtenido de *Bocconia arborea*, fue el compuesto más activo con CMI: 12.5 µg/mL (Camacho-Corona et al., 2009), atribuyéndose a su alta condición lipofílica su capacidad para atravesar la membrana celular de la micobacteria; sin embargo, varios autores consideran que aún existe escasa información disponible concerniente a la actividad de compuestos naturales contra *M. tuberculosis* MDR (Newton et al., 2002; Gibbons et al., 2003; Luna-Herrera et al., 2007).

La utilización del extracto crudo de la planta tendría ciertas ventajas sobre la utilización de metabolitos secundarios puros puesto que se minimizaría el riesgo de inducir resistencia, además, que el uso de extractos heterogéneos de toda la biomasa de la planta podría inducir un efecto sinérgico sobre algún organismo específico (Leatemia e Isman, 2004). En tal sentido, estudios realizados sobre la actividad biocida de extractos crudos comparando con sustancias puras (piperamidas), obtenidas de *Piper tuberculatum*, han demostrado un efecto más potente del extracto crudo sobre *Aedes atropalpus* (Scott et al., 2002) y *Anticarsia gemmatilis* (Navickiene et al., 2007), respectivamente, que cuando se utilizaron sustancias puras, aún en combinaciones binarias, terciarias y cuaternarias.

CONCLUSIONES

Los extractos crudos de MeOH y AcOEt de raíces de plantas silvestres y extracto crudo de MeOH de plántulas *in vitro* de *Plumbago scandens*, mostraron una fuerte actividad antibacteriana sobre cepas de *Mycobacterium tuberculosis* multidrogaresistentes (MDR) a isoniácida y rifampicina. Los valores de CMI, tanto para plantas silvestres como plántulas *in vitro*, variaron desde 0,65 a 1,3 mg/mL. Estos resultados abren la posibilidad de utilizar especies del Bosque Estacionalmente Seco en el tratamiento de enfermedades infecto-contagiosas tan difíciles de erradicar como lo es la tuberculosis.

AGRADECIMIENTO

Al Br. Alexander Huamán Mera, por su asistencia técnica en la preparación del manuscrito y a la Bióloga Flor Rodríguez Pozo, por su contribución preliminar en la ejecución del trabajo, ambos de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo de Lambayeque.

REFERENCIAS

- Ahmad I, Mehmood Z, Mohammad F. 1998. Screening of some Indian medicinal plants for their antimicrobial properties. **J Ethnopharmacol** 62: 183 - 193.
- Alvarado J, Vásquez H, Delgado GE, Trevisan D, Horna O, Pereira J, Rojas C. 2010. Actividad inhibitoria de plantas *in vitro* de *Drosera capillaris* sobre *Mycobacterium tuberculosis*. **Rev Peru Biol** 17: 353 - 358.
- Andrews JM. 2001. Determination of minimum inhibitory concentrations. **J Antimicrob Chemother** 48: 5 - 16.
- Billo M, Cabalion P, Waikedre J, Fourneau C, Bouttier S, Hocquemiller R, Fournet A. 2005. Screening of some New Caledonian and Vanuatu medicinal plants for antimycobacterial activity. **J Ethnopharmacol** 96: 195 - 200.
- Bonilla C. 2008. Situación de La tuberculosis en el Perú. **Acta Med Per** 25: 163 - 170.
- Brako L, Zarucchi JL. 1993. **Catalogue of the Flowering Plants and Gymnosperms of Peru**. Missouri Botanical Garden, St. Louis, Missouri, pp. 925 - 926.
- Budzianowsky J, Skrypczak L, Kukulczanka K. 1993. Phenolic compounds of *Drosera intermedia* and *Drosera spathulata* from *in vitro* cultures. **Acta Hort** 330: 277 - 280.
- Bueno-Sánchez JG, Martínez-Morales JR, Stashenko EE, Ribón W. 2009. Anti-tubercular activity of eleven aromatic and medicinal plants occurring in Colombia. **Biomédica** 29: 51 - 60.
- Camacho-Corona, MR, Favela-Hernández JM, González-Santiago O, Garza-González E, Molina-Salinas GM, Said-Fernández S, Delgado, G, Luna-Herrera J. 2009. Evaluation of some plant-derived secondary metabolites against sensitive and multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. **J Mex Chem Soc** 53: 71 - 75.

- Cole ST, Brosh R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, Gordon SV, Eiglmeier K, Gas S, Barry 3rd CE, Tekaia F, Badcock K, Bashman D, Brown D, Chillingworth T, Connor R, Davies R, Devlin K, Feltwell T, Gentles S, Hamlin N, Holroyd S, Hornsby T, Jagels K, Krogh A, McLean J, Moule S, Murphy L, Oliver K, Osborne J, Quail MA, Rajandream MA, Rogers J, Rutter S, Seeger K, Skelton J, Squares R, Sulston JE, Taylor K, Whitehead S, Barel BG. 1998. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. **Nature** 393: 537 - 544.
- Cronquist A. 1988. **The Evolution and Classification of Flowering Plants**. Second Edition USA. New York Botanical Garden. 555 pp.
- Danelutte AP, Costantin MB, Delgado GE, Braz-Filho, R, Kato MJ. 2005. Divergence of secondary metabolism in cell suspension cultures and differentiated plants of *Piper cernuum* and *P. crassinervium*. **J Braz Chem Soc** 16: 1425 - 1430.
- Delgado GE. 1999. **Metabólitos secundários em cultura de tecidos de Piperaceae**. Projeto de Pós-Doutoramento. IQ/USP, FAPESP, São Paulo. 109 pp.
- De Souza MVN, Facchinetti V, Cardinot D, Gomes CRB. 2010. Produtos naturais com atividade inibitória da Translocase I, uma promissora classe de compostos contra tuberculose. **Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat** 9: 1 - 12.
- Desta B. 1993. Ethiopian traditional herbal drugs. Part II. Antimicrobial activity of 63 medicinal plants. **J Ethnopharmacol** 39: 129 - 139.
- Durand R, Zenk MH. 1971. Biosynthesis of plumbagin (5-hydroxy-2-methyl-1,4-naphthoquinone) via the acetate pathway in higher plants. **Tetrahedron Lett** 32: 3009 - 3012.
- Duke JA, Beckstrom-Sternberg SM. 2002. **Phytochemical Database**, USDA ARS AGRL, Beltsville Agricultural Research Center, Beltsville, Maryland.
- Gibbons S, Fallah F, Wright CW. 2003. Cryptolepine hydrochloride: a potent antimycobacterial alkaloid derived from *Cryptolepis sanguinolenta*. **Phytother Res** 17: 434 - 436.
- Gibbons S. 2008. Phytochemicals for bacterial resistance - strengths, weaknesses and opportunities. **Planta Medica** 74: 594 - 602.
- Goldman RC, Plumley KV, Laughon BE. 2007. The evolution of extensively drug resistant tuberculosis (XDR-TB): history, status and issues for global control. **Infect Disord Drug Targets** 7: 73 - 91.
- Gundidza M, Manwa G. 1990. Activity of chloroform extract from *Plumbago zeylanica* against *Neisseria gonorrhoeae*. **Fitoterapia** 61: 47 - 49.
- Kwon HH, Tomioka H, Saito H. 1995. Distribution and characterization of beta-lactamases of mycobacteria and related organisms. **Tuber Lung Dis** 76: 141 - 148.
- Larsson S, Wirén A, Lundgren L, Ericsson T. 1986. Effects of light and nutrient stress on leaf phenolic chemistry in *Salix dasyclados* and susceptibility to *Galerucella lineola* (Coleoptera). **Oikos** 47: 205 - 210.
- Leatemala J, Isman B. 2004. Toxicity and antifeedant activity of crude seed extract of *Annona squamosa* (Annonaceae) against lepidopteran pests and natural enemies. **Int J Trop Insect Sci** 24: 150 - 158.
- León-Díaz R, Meckes M, Said-Fernández S, Molina-Salinas GM, Vargas-Villarreal J, Torres J, Luna-Herrera J, Jiménez-Arellanes A. 2010. Antimycobacterial neolignans isolated from *Aristolochia taliscana*. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 105: 45 - 51.
- Luna-Herrera J, Costa MC, Gonzalez HG, Rodrigues AI, Castilho PC. 2007. Synergistic antimycobacterial activities of sesquiterpene lactones from *Laurus spp.* **J Antimicrob Chemother** 59: 548 - 552.
- Marchi AM, Juttel ID, Kawacubo EM, Dalmarco EM, Blatt SL, Córdova CMM. 2008. Evaluation of methods for detection and identification of *Mycobacterium* species in patients suspected of having pulmonary tuberculosis. **Braz J Microbiol** 39: 613 - 618.
- McClure WR, Cech CL. 1978. On the mechanisms of rifampicin inhibition of RNA synthesis. **J Biol Chem** 253: 8949 - 8956.
- Mostacero L, Mejía F, Gamarra O. 2002. **Taxonomía de las Fanerógamas Útiles del Perú**. Edit. Normas Legales SAC. Trujillo, Perú, 1350 pp.
- Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiol Plant** 15: 473 - 479.
- Murashige T. 1974. Plant propagation through tissue culture. **Ann Rev Plant Physiol** 25: 135 - 166.
- Navickiene HMD, Miranda JE, Bortoli SA, Kato MJ, Bolzani V da S, Furlan M. 2007. Toxicity of

- extracts and isobutyl amides from *Piper tuberculatum*: potent compounds with potential for the control of the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis*. **Pest Manag Sci** 63: 399 - 403.
- Newton SM, Lau C, Gurcha SS, Besra GS, Wright CW. 2002. The evaluation of forty-three plant species for *in vitro* antimycobacterial activities, isolation of active constituents from *Psoralea corylifolia* and *Sanguinaria canadensis*. **J Ethnopharmacol** 79: 57 - 67.
- NIAID (National Institute of Allergy and Infectious Diseases). 2001. **NIAID Global Health Research Plan for HIV/AIDS, malaria, and tuberculosis**. Bethesda: National Institute of Allergy and Infectious Diseases.
- OPS (Organización Panamericana de la Salud). 1986. **Manual de Normas y Procedimientos Técnicos para la Bacteriología de la Tuberculosis**. Nota Técnica N° 28. 42 p.
- Ribeiro de Paiva S, de Almeida L, Figueiredo MR, Mazzei JL, Kaplan MAC. 2002. Perfil cromatográfico de duas espécies de Plumbaginaceae: *Plumbago scandens* L. e *Plumbago auriculata* Lam. **Quím Nova** 25: 717 - 721.
- Ribeiro de Paiva S, Figueiredo MR, Aragão TV, Kaplan MAC. 2003. Antimicrobial activity *in vitro* of plumbagin isolated from *Plumbago* species. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 98: 959 - 961.
- Sanchotene KO, von Groll A, Ramos D, Scholante AB, Honscha G, Valença M, Scaini CJ, da Silva PEA. 2008. Comparative evaluation of the nitrate reductase assay and the resazurin microtitre assay for drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* against first line anti-tuberculosis drugs. **Braz J Microbiol** 39: 16 - 20.
- Scott IM, Puniani E, Durst T, Phelps D, Merali S, Assabgui RA, Sánchez-Vindas P, Poveda L, Philogene BJR, Arnason JT. 2002. Insecticidal activity of *Piper tuberculatum* Jacq. Extracts: synergistic interaction of piperamides. **Agr Forest Entomol** 4: 137 - 144.
- Somoskovi A, Parsons LM, Salfinger M. 2001. The molecular basis of resistance to isoniazide, rifampicin, and pyrazinamide in *Mycobacterium tuberculosis*. **Respir Res** 2: 164 - 168.
- Trombetta D, Castelli F, Sarpietro MG, Venuti V, Cristani M, Daniele C, Saija A, Mazzanti G, Bisignano G. 2005. Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. **Antimicrob Agents Chemother** 49: 2474 - 2478.
- Van der Vijver LM, Lötter AP. 1971. The constituents in the roots of *Plumbago auriculata* Lam. and *Plumbago zeylanica* L. responsible for antibacterial activity. **Planta Medica** 20: 8 - 13.
- Vásquez N, Kato MJ, Rojas C, Malquichagua K, Delgado GE. 2010. Tissue culture and production of secondary metabolites from micropropagated plants of *Piper solmsianum*. **Cienc Tecnol Humanid UNPRG-Lambayeque** (Perú) 1: 15 - 21.
- Vilchèze C, Morbidoni HR, Weisbrod TR, Iwamoto H, Kuo M, Sachettini JC, Jacobs Jr WR. 2000. Inactivation of the inhA-encoded fatty acid synthase II (FASII) enoyl-acyl carrier protein reductase induces accumulation of the FASI end products and cell lysis of *Mycobacterium smegmatis*. **J Bacteriol** 182: 4059 - 4067.
- Walker TS. 2000. **Microbiología**. Mc Graw-Hill Interamericana, México, 513 pp.
- WHO (World Health Organization). 2006. Extensively drug-resistant tuberculosis (XDR-TB): recommendations for prevention and control. **Weekly Epidemiol Record** 81: 430 - 432.
- WHO (World Health Organization). 2008. **World Health Organization, Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing**. WHO report 2008, Geneva. (WHO/HTM/TB/2008.393).
- Zhang Y, Heym B, Allen B, Young D, Cole S. 1992. The catalase-peroxidase gene and isoniazide resistance of *Mycobacterium tuberculosis*. **Nature** 358: 591 - 593.