



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE  
MEXICO

---

FACULTAD DE QUIMICA

ESTUDIO FITOQUIMICO Y EVALUACION  
ANTIMICROBIANA DE *Tagetes lucida*  
(PERICON).

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUIMICO DE ALIMENTOS  
P R E N T A :  
EDGAR DANIEL OLVERA SANCHEZ



MEXICO, D.F.

2007



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **Jurado asignado:**

**Presidente Prof. MANUEL JIMENEZ ESTRADA**

**Vocal Prof. MARIA DEL CARMEN WACHER RODARTE**

**Secretario Prof. JOSE GUILLERMO AVILA ACEVEDO**

**1er. Suplente Prof. MARIA DEL CARMEN URZUA**

**HERNANDEZ**

**2do. Suplente Prof. JOSE GUADALUPE DE LA ROSA**

**CANALES.**

**El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Fitoquímica en la Unidad de Biotecnología y Prototipos (UBIPRO) de la FES Iztacala.**

**Asesor del tema**

---

**Dr. JOSE GUILLERMO AVILA ACEVEDO**

**Sustentante**

---

**EDGAR DANIEL OLVERA SANCHEZ**

## *AGRADECIMIENTOS*

- ♥ *UN ESPECIAL AGRADECIMIENTO AL GRANDIOSO EQUIPO DE INVESTIGADORES DEL LABORATORIO DE FITOQUIMICA (UBIPRO) DE LA FES IZTACALA, CONFORMADO POR EL Dr. GUILLERMO AVILA ACEVEDO, LA Dra. TZASNA HERNADEZ DELGADO, LA Dra. MARGARITA CANALES ACEVEDO Y LA M. en C. ANA M. GARCIA BORES, LOS CUALES ME ASESORARON EN LA REALIZACION DEL PRESENTE TRABAJO.*
  
- ♥ *AGRADEZCO A LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO, EN ESPECIAL A LA FACULTAD DE QUIMICA POR QUE GRACIAS A SUS INSTALACIONES Y PERSONAL ACADEMICO PUDE LLEVAR A CABO UNA META QUE ME PROPUSE EN LA VIDA.*

## *DEDICATORIAS*

*PRIMERAMENTE QUIERO DARLE GRACIAS A DIOS POR PONERME EN ESTE CAMINO, CON ESTO QUIERO AGRADECER A MIS PADRES ISABEL S. Y JOSE O., QUIENES ME HAN APOYADO INCONDICIONALMENTE, HAN SABIDO GUIARME PARA SER UN PERSONA QUE PUEDE VALERSE POR SI MISMA Y DE QUIENES HE APRENDIDO MUCHAS COSAS LAS CUALES ME HAN SERVIDO EN MI VIDA PERSONAL.*

*A MIS HERMANOS: CARLOS, ADRIAN Y HUGO, LOS CUALES ME HAN APOYADO EN LAS BUENAS Y EN LAS MALAS; DE QUIENES ESTOY ORGULLOSO.*

*A MIS FAMILIARES: ABUELOS, TIOS Y PRIMOS EN ESPECIAL PARA: TIA CAROLINA, TIOS ESTHER E HILARIO, A MI PRIMO IVAN, MONICA, MARIELA Y FAMILIA.*

*A CHRISTIAN B. UNA CHICA MARAVILLOSA, POR SUS CONSEJOS Y APOYO, PERO SOBRE TODO POR COMPARTIR MOMENTOS MARAVILLOSOS DE FELICIDAD, COMPAÑIA Y DIVERSION.*

*A MIS AMIGOS: VICTOR S., MARCO C., FRANCISCO C., OMAR E., OMAR R., EFREN, MAYELL S., CHRISTIAN, ULISES, JOSE L., NOE, NOEL, ENRIQUE, ERIK, GINA, OLGA, RAFAEL, ALI, PALEMON, LUIS F., ARUN, JORGE, YUKIKO, OSCAR, IBETTE, LAURA, SERGIO, LILIANA, LIZET Y REBECA, A LOS QUE APRECIO MUCHO Y CON LOS QUE HE PASADO GRANDES MOMENTOS DE MI VIDA. LES AGRADEZCO POR SU AMISTAD Y COMPAÑIA.*

*El saber no se obtiene por azar,  
hay que buscarlo con afán y  
alimentarlo con diligencia.*  
Abigail Adams

---

---

**INDICE GENERAL**

Indice general.....	I
Indice de cuadros.....	IV
Indice de figuras.....	VI
Abreviaturas utilizadas.....	VII
Resumen.....	IX
Introducción.....	1
Metabolismo secundario.....	3
Compuestos antimicrobianos de origen vegetal.....	5
Antifúngicos de origen vegetal.....	9
Desordenes gastrointestinales.....	14
Enfermedades infecciosas gastrointestinales de origen bacteriano en México	15
Enfermedades fúngicas.....	19
Descripción botánica de <i>Tagetes lucia</i> (pericón).....	21
Antecedentes.....	25
Justificación.....	27
Hipótesis.....	28
Objetivos.....	29
Objetivo general.....	29
Objetivos particulares.....	28
Diseño experimental.....	30
Material y Métodos.....	31
Fase I. Estudio Fitoquímico.....	31
1. Colecta de la planta.....	31
1.2 Extracción.....	31
1.2.2 Preparación de los extractos crudos.....	32
Fase II. Bioensayos preliminares de M1 y M2.....	32
2. Evaluación de la actividad antibacteriana de los extractos (M1 Y M2).....	33
2.1 Evaluación cualitativa de la actividad antibacteriana.....	33
2.1.2 Evaluación cuantitativa de la actividad antibacteriana.....	33
2.1.3 Bacterias utilizadas en los bioensayos.....	33
3. Evaluación antifúngica de los extractos (M1 Y M2).....	34
3.1 Evaluación cualitativa antifúngica.....	34

---

---

3.1.2 Evaluación cuantitativa antifúngica.....	34
3.1.3 Cepas de hongos utilizados en los bioensayos.....	34
Fase III. Aislamiento de compuestos puros, elucidación de la estructura química y la determinación de la actividad antibacteriana y antifúngica.....	35
4. Métodos cromatográficos.....	35
4.1. Fraccionamiento del extracto metanólico de hojas (M1).....	36
4.1.2 Fraccionamiento del extracto metanólico de inflorescencias (M2).....	37
5. Evaluación de la actividad antibacteriana de los compuestos puros.....	39
5.1. Evaluación cualitativa de la actividad antibacteriana.....	39
5.1.2. Evaluación cuantitativa de la actividad antibacteriana.....	39
6. Evaluación antifúngica de los compuestos puros.....	39
6.1. Evaluación cualitativa antifúngica.....	39
6.1.2. Evaluación cualitativa antifúngica.....	39
7. Curva de supervivencia y efecto sobre el crecimiento bacteriano.....	39
8. Pruebas estadísticas.....	40
9. Elucidación de los principios activos.....	40
Resultados y Análisis.....	41
Fase I. Estudio Fitoquímica.....	41
1. Extracción.....	41
2. Bioensayos preliminares de los extractos metanólicos M1 y M2.....	42
2.1 Evaluación cualitativa de la actividad antibacteriana.....	42
2.2 Evaluación cualitativa de la actividad antimicrobiana de los extractos metanólicos (M1 y M1).....	45
3. Evaluación de la actividad antimicrobiana de los compuestos aislados.....	46
3.1 Evaluación de la actividad antimicrobiana de los compuestos aislados...	46
3.2 Evaluación cualitativa de la actividad antibacteriana de los compuestos aislados.....	46
4. Evaluación cuantitativa de la actividad antibacteriana de los compuestos Aislados.....	48
5. Curva de supervivencia sobre el efecto del crecimiento bacteriano.....	50
6. Evaluación cualitativa de la actividad antifúngica de los extractos (M1 y M2).....	52

---

---

7. Evaluación cualitativa de la actividad antifúngica de los compuestos aislados.....	52
7.1. Evaluación cuantitativa de la actividad antifúngica del compuesto 2 activo.....	52
8. Elucidación de las estructuras.....	56
8.1 Elucidación de la estructura química del compuesto con actividad antimicrobiana (compuesto 2).....	56
8.1 Elucidación de la estructura química del compuesto con actividad antimicrobiana (compuesto 1).....	66
Discusión.....	67
Conclusiones.....	74
Perspectivas.....	75
Apéndices.....	76
Apéndice 1. Método de difusión en agar o de Kirby-Baüer.....	76
Apéndice 2. Método cualitativo de inhibición del crecimiento radial (Wang y Bun, 2002).....	79
Apéndice 3. Método cuantitativo de inhibición del crecimiento radial (Wang y Bun, 2002).....	81
Apéndice 4. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y de la concentración bactericida mínima (CBM).....	83
Apéndice 5. Curva letal (curva de supervivencia y efecto sobre el crecimiento	84
Apéndice 6. Espectros del compuesto 2 no elucidado.....	85
Apéndice 7. Estructuras de antimicrobianos de origen vegetal más comunes (Murphy, 1999).....	90
Bibliografía.....	91

## INDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b>	Plantas que contienen actividad antimicrobiana.....	12
<b>Cuadro 2.</b>	Enfermedades microbiológicas transmitidas por alimentos, patógeno causante.....	16
<b>Cuadro 3.</b>	Hongos de importancia médica y agronómica.....	20
<b>Cuadro 4.</b>	Bacterias utilizadas en los bioensayos.....	33
<b>Cuadro 5.</b>	Cepas de hongos.....	34
<b>Cuadro 6.</b>	Fraccionamiento del extracto metanólico de hojas (M1).....	36
<b>Cuadro 7.</b>	Características físicas del compuesto 1 aislado del extracto metanólico de hojas (M1).....	37
<b>Cuadro 8.</b>	Fraccionamiento del extracto metanólico de inflorescencias (M2).....	38
<b>Cuadro 9.</b>	Características físicas de los compuestos aislados del extracto metanólico de inflorescencias (M2).....	38
<b>Cuadro 10.</b>	Rendimiento de los extractos de la parte aérea de <i>Tagetes lucida</i> .	41
<b>Cuadro 11.</b>	Actividad antibacteriana de los extractos metanólicos de M1 y M2 de <i>Tagetes Lucida</i> .....	43
<b>Cuadro 12.</b>	Análisis de varianza de los extractos metanólicos (M1 y M2).....	44
<b>Cuadro 13.</b>	Evaluación cuantitativa de la actividad antibacteriana de los extractos (M1 y M2).....	45
<b>Cuadro 14.</b>	Evaluación cualitativa de la actividad antibacteriana de los compuestos aislados.....	47
<b>Cuadro 15.</b>	Análisis de varianza de los compuestos activos.....	48
<b>Cuadro 16.</b>	Concentración Mínima Inhibitoria y Concentración Bactericida Mínima de los compuestos aislados.....	48
<b>Cuadro 17.</b>	Comparación entre la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de los extractos metanólicos y los compuestos puros de <i>Tagetes lucida</i> .....	50
<b>Cuadro 18.</b>	Actividad antifúngica de los extractos metanólicos de M1 y M2.....	52
<b>Cuadro 19.</b>	Actividad antifúngica de los compuestos aislados.....	53

---

<b>Cuadro 20.</b>	Porcentaje de inhibición del crecimiento radial del compuesto 2 frente a <i>A. niger</i> .....	53
<b>Cuadro 21.</b>	Porcentaje de inhibición del crecimiento radial de la Ketaconazol (control positivo) en <i>Aspergillus niger</i> .....	54
<b>Cuadro 22.</b>	CF <sub>50</sub> y CFM del compuesto 2 vs. Ketaconazol.....	55
<b>Cuadro 23.</b>	Parámetros del compuesto activo puro obtenido de la planta <i>Tagetes lucida</i> .....	56
<b>Cuadro 24.</b>	Desplazamientos químicos observados en el espectro de RMN <sup>1</sup> H.....	60
<b>Cuadro 25.</b>	Desplazamientos químicos del espectro de RMN <sup>13</sup> C y DEPT del compuesto 2 aislado de <i>Tagetes lucida</i> .....	62

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1a.</b>	<i>Tagetes lucida</i> (pericón).....	21
<b>Figura 2.</b>	Distribución en México de la planta <i>Tagetes lucida</i> .....	22
<b>Figura 1b.</b>	<i>Tagetes lucida</i> (pericón).....	23
<b>Figura 3.</b>	Diseño experimental.....	30
<b>Figura 4.</b>	Obtención de los extractos de hojas e inflorescencias (M1 y M2).....	32
<b>Figura 5.</b>	Rendimiento de los extractos de la parte aérea de <i>Tagetes lucida</i> ...	41
<b>Figura 6.</b>	Halos de inhibición de los extractos metanólicos de Hojas (M1) e inflorescencias (M2) de <i>Tagetes lucida</i> .....	4
<b>Figura 7.</b>	Halos de inhibición de los extractos metanólicos (M1 y M2) de <i>Tagetes lucida</i> .....	44
<b>Figura 8.</b>	Halos de inhibición de los principios activos de <i>Tagetes lucida</i> .....	47
<b>Figura 9.</b>	Efecto del compuesto 1 aislado sobre la curva de crecimiento ( <i>Vibrio cholerae</i> aislada de un caso clínico).....	51
<b>Figura 10.</b>	Efecto del compuesto 2 sobre la inhibición del crecimiento radial de <i>Aspergillus niger</i> .....	53
<b>Figura 11.</b>	Efecto del Ketaconazol sobre la inhibición del crecimiento radial de <i>A. niger</i> .....	55
<b>Figura 12.</b>	Termograma del compuesto 2 aislado con actividad antimicrobiana aislado de <i>Tagetes lucida</i> .....	57
<b>Figura 13.</b>	Espectro UV del compuesto 2 con actividad antimicrobiana aislado de <i>Tagetes lucida</i> .....	58
<b>Figura 14.</b>	Espectro de resonancia magnética nuclear de protones (RMN <sup>1</sup> H) del compuesto 2 con actividad antimicrobiana aislado de <i>Tagetes lucida</i> .....	59
<b>Figura 15.</b>	Espectro de resonancia magnética nuclear de carbono 13 (RMN <sup>13</sup> C) del compuesto 2 con actividad antimicrobiana aislado de <i>Tagetes lucida</i> .....	61
<b>Figura 16.</b>	Espectro de resonancia magnética nuclear de protones DEPT del compuesto 2 aislado de <i>Tagetes lucida</i> .....	62

---

<b>Figura 17.</b>	Estructura química del compuesto 2 con actividad antifúngica obtenido de <i>Tagetes lucida</i> .....	63
<b>Figura 18.</b>	Espectro de masas del compuesto 2 con actividad antimicrobiana de <i>Tagetes lucida</i> .....	63
<b>Figura 19.</b>	Patrón de fragmentación del compuesto 7-metoxi-cumarina con actividad antimicrobiana aislado de la planta <i>Tagetes lucida</i> .....	64
<b>Figura 20.</b>	Estructura química del compuesto 2 con actividad antifúngica obtenido de <i>Tagetes lucida</i> .....	65
<b>Figura 21.</b>	Termograma del compuesto 1 con actividad antimicrobiana aislado de <i>Tagetes lucida</i> .....	66
<b>Figura 22.</b>	Espectro UV del compuesto 1 con actividad antimicrobiana aislado de <i>Tagetes lucida</i> .....	85
<b>Figura 23.</b>	Espectro de resonancia magnética nuclear de protones (RMN <sup>1</sup> H) del compuesto 1 con actividad antimicrobiana aislado de <i>Tagetes lucida</i> .....	86
<b>Figura 24.</b>	Espectro de IR del compuesto 1 con actividad antimicrobiana aislado antimicrobiana aislado de de <i>Tagetes lucida</i> .....	87
<b>Figura 25.</b>	Espectro de resonancia magnética nuclear de carbono 13 (RMN <sup>13</sup> C) del compuesto con actividad antimicrobiana aislado de <i>Tagetes lucida</i> .....	88
<b>Figura 26.</b>	Espectro de resonancia magnética nuclear de protones DEPT del compuesto 1 con actividad antimicrobiana aislado de <i>Tagetes lucida</i> .....	88
<b>Figura 27.</b>	Espectro de masas del compuesto 1 con actividad antimicrobiana aislado de <i>Tagetes lucida</i> .....	89

**ABREVIATURAS**

AcOEt	Acetato de Etilo
$^{\circ}\text{C}$	Grados centígrados
CBM	Concentración Bactericida Mínima
ccf	Cromatografía en placa fina
CFM	Concentración Fungicida Mínima
CF <sub>50</sub>	Concentración Fungicida Media
CH	Metino
CH <sub>2</sub>	Metileno
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
d	Doblete
DEPT	Distortionless anhancement by polarization transfer
M	Multiplete
NA	No Activo
ND	No Determinado
HPLC	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
INEGI	Instituto Nacional de Estadística Geográfica e Informática
IR	Infrarojo
MeOH	Metanol
mm	Milímetros
mg	Miligramos
mg/sensidisco	Miligramos por disco
m/z	Relación masa-carga
ppm y/o $\delta$	Partes por millón
RMN <sup>1</sup> H	Resonancia Magnética Nuclear de protones
RMN <sup>13</sup> C	Resonancia Magnética Nuclear de carbono trece
s	Singulete
UFC	Unidades Formadoras de colonias
UFC/ml	Unidades Formadoras de Colonias por mililitro
UV	Ultravioleta
$\mu\text{l}$	Microlitros
$\lambda_{\text{max}}$	Longitud de onda máxima
$\mu\text{g}$	Microgramos
$\mu\text{l}$	Microlitros
+	Activo
-	No Activo

---

---

## RESUMEN

En la medicina tradicional mexicana se usa una variedad rica de plantas para el tratamiento de enfermedades gastrointestinales, específicamente, infecciones del tracto digestivo, dichas enfermedades son de las más comunes causas de muerte en áreas rurales (INEGI, 1999). Las plantas producen una gran diversidad de sustancias que pueden ser activas en muchos campos (medicina y agronomía). Por lo tanto el objetivo de este trabajo fue evaluar el potencial antimicrobiano de la planta *Tagetes lucida*, la cual es usada para el tratamiento de infecciones causadas por enterobacterias (algunas molestias gástricas y diarreas etc.) y hongos patógenos (infecciones fúngicas etc.) en humanos (Caceres et. al., 1993; Linares et. al., 1992 y Céspedes et. al., 2006). Sobre la base de ésta información y la alta resistencia contra el ataque de insectos y patógenos que muestra la planta; fue llevado a cabo el estudio fitoquímico biodirigido con las partes aéreas de *T. lucida*, de esta se obtuvieron los extractos metanólicos, a los cuales se les determinó su actividad antimicrobiana mediante la técnica de difusión en agar, sobre 14 cepas de bacterias, una levadura y cinco hongos miceliados. A estos extractos se les determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración bactericida mínima (CBM), de acuerdo al método de dilución en caldo. El extracto metanólico de inflorescencias resultó ser más activo frente a cuatro cepas de *Vibrio cholerae*, una levadura (*Candida albicans*) y 3 bacterias Gram-positivas (*Sarcina lutea*, *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus*), además los dos extractos metanólicos mostraron actividad antifúngica en contra de *Aspergillus niger*. De los extractos metanólicos de hojas e inflorescencias se logró aislar dos metabolitos secundarios mediante métodos cromatográficos, a los cuales también se les determinó la CMI, CBM, la concentración fungicida media (CF<sub>50</sub>) y la concentración fungicida mínima (CFM), frente a las cepas de microorganismos las cuales mostraron ser sensibles a los extractos metanólicos de las partes aéreas. Mediante estudios espectroscópicos (UV, IR, RMN<sup>1</sup>H, RMN<sup>13</sup>C, experimentos bidimensionales como DEPT) y espectrometría de masas (EM), se logró determinar la estructura química de uno de los compuestos responsables de la actividad antimicrobiana siendo este la 7-metoxi-cumarina (compuesto 2). Resultando que el compuesto "1" (posible mezcla de dos compuestos), solo mostró actividad antimicrobiana frente a 5 cepas experimentales (4 cepas *Vibrio cholerae* y *Candida albicans*). Se realizó un experimento de desafío para obtener la curva de supervivencia de una cepa Gram-negativa (*Vibrio cholerae* aislada de un caso clínico) frente al compuesto "1" (posible mezcla de dos compuestos), el cual mostró un comportamiento bacteriostático con una cinética multiimpacto a dosis equivalentes a la CBM. La 7-metoxi-cumarina manifestó actividad antibacteriana y antifúngica (*Vibrio cholerae*, *Aspergillus niger* y *Candida albicans*). Se obtuvo la CMI y la CBM para cada cepa bacteriana, en donde los valores mostrados para las 4 cepas *Vibrio cholerae* se encuentran entre 0.5 mg/ml y 1.5 mg/ml respectivamente; se realizó un experimento para obtener el efecto de la 7-metoxi-cumarina sobre la inhibición del crecimiento radial de *Aspergillus niger*, en donde la CFM de este compuesto aislado se encuentra a concentraciones mayores de 3.0 mg/ml y mostrando a esta concentración un efecto bacteriostático; la CF<sub>50</sub> se presentó a una concentración de 1.02 mg/ml.

## INTRODUCCION

Las plantas han sido utilizadas por el ser humano para satisfacer necesidades como la alimentación y en especial para aliviar algunas enfermedades; así nuestros antepasados aprendieron a través del saber popular de generaciones anteriores a curar con éxito una gran cantidad de enfermedades (Nice, 1993).

Las plantas medicinales se han sometido a diversos estudios fitoquímicos y farmacológicos para verificar su efectividad, han demostrado tener propiedades terapéuticas gracias a ciertos compuestos llamados metabolitos secundarios o productos naturales (Murphy, 1999).

Históricamente, muchas sustancias bioactivas han sido productos naturales, y la prueba está en que estas continúan ofreciendo un ilimitado suministro de fármacos útiles para el tratamiento de diversas enfermedades, entre las que se incluyen las infecciosas. Se estima que existen alrededor de 250,000 especies de plantas superiores en nuestro planeta y que únicamente del 5-15% han sido investigadas por su valor terapéutico por lo que la gran mayoría permanece aún sin investigarse (Cutler y Farnsworth, 2001).

Aproximadamente el 60% de la población del mundo depende casi completamente de las plantas medicinales para el tratamiento de enfermedades y que los productos naturales han sido reconocidos como un importante fuente de recursos terapéuticos eficaces; estos son la más exitosa fuente de las principales drogas. De los 520 nuevos fármacos aprobados entre 1983 y 1994, el 39% fueron productos naturales o derivados de éstos y 60%-80% de las drogas antibacterianas y anticancerígenos fueron derivados de productos naturales. Por lo tanto, el uso de estas sustancias ha sido la única y más exitosa estrategia para el descubrimiento de nuevos medicamentos. Menos del 10% de la diversidad que hay en el mundo ha sido probada en cuanto a la actividad biológica. Miles de compuestos bioactivos tienen una aplicación comprobada en la farmacéutica, la medicina o nutraceutica. Los productos naturales pueden ser una fuente más económica de la diversidad química que la síntesis de cantidades equivalentes de diversas sustancias químicas (Harvey, 2000).

Los nuevos compuestos bioactivos están siendo encontrados continuamente usando la información basada en estudios etnobotánicos y usos indígenas. Un cálculo del uso de las plantas medicinales sugiere que más de 35,000 especies son usadas mundialmente (Cameron et al., 2005).

México es uno de los países que posee mayor diversidad biológica en el mundo y cuenta aproximadamente con 10% al 12% de las especies de plantas que habitan el planeta, ocupando el cuarto lugar en cuanto a riqueza florística (Rzedowski y Equihua, 1987; Soberon y Llorente, 1993).

La medicina tradicional ocupa un importante lugar en la realidad médica del país ya que la medicina alópata cubre sólo el 40 % de los servicios de salud (Eloff, 1998); de ahí la importancia de los estudios etnobotánicos como precursores de las investigaciones fitoquímicas y farmacológicas, que permitan encontrar nuevos fármacos contra diversas enfermedades (Hernández et al., 2003).

Desde tiempos antiguos la medicina tradicional mexicana ha sido utilizada, una amplia variedad de plantas han sido usadas para tratar desordenes gastrointestinales, tales como diarreas y parásitos intestinales, estas enfermedades prevalecen en áreas rurales del país. La información obtenida de medios escritos y orales es una buena opción para mejorar la salud humana en comunidades geográfica y culturalmente aisladas (McGaw et al., 2000 y Hernández et al., 2005).

Las plantas son un importante elemento de sistema medicinal indígena en México (Heinrich, 2000). Asteraceae es una familia botánica de enorme importancia en la medicina tradicional de los mexicanos (Heinrich et al., 1998). Hay cerca de 361 géneros con 3,021 especies de Asteraceae reconocidas en México (Villaseñor, 2003).

## METABOLITOS SECUNDARIOS Y SUS FUNCIONES

Las plantas son la principal fuente de obtención de los metabolitos secundarios y pueden funcionar como principios activos en la industria química, farmacéutica, agrícola y alimentaria, de los que se obtienen fármacos y otros productos químicos como colorantes, insecticidas, saborizantes, esencias y aditivos nutritivos (Azcon y Talon, 1993; Calva-Calva et al., 2002). Los productos naturales son típicamente metabolitos secundarios, producidos por los organismos en respuesta a estimulaciones externas tal como cambios nutricionales, infección y competencia. Los productos naturales son ampliamente reconocidos en la industria farmacéutica por su amplia diversidad estructural también por su amplio rango de actividades farmacológicas; muchos de los cuales son agentes antimicrobianos (antibacterianos, antifúngicos, antiparasitarios, insecticidas etc.) (William, 2000).

Dado que los metabolitos secundarios derivan biosintéticamente de los primarios, los dos tipos de metabolismo están interconectados. El metabolismo primario proporciona un número de pequeñas moléculas, entre las que destaca el ácido shiquímico, el acetato y los aminoácidos, que constituyen los materiales de partida para las rutas del metabolismo secundario. El ácido shiquímico da origen a muchos compuestos aromáticos, entre los que destacan los aminoácidos aromáticos, los ácidos cinámicos y ciertos polifenoles. El acetato es el precursor de los ácidos grasos y de los policétidos por la ruta del aceto-mevalonato. Los aminoácidos son precursores de los alcaloides (Azcon y Talon, 1993).

Se han aislado alrededor de 12, 000 metabolitos secundarios y se estima que estos constituyen menos del 10% del total (Cowan, 1999). Las implicaciones de los metabolitos secundarios en las interacciones ecológicas, es decir, en la relación de la planta productora con otros organismos de su ámbito natural, desempeñan funciones de defensa contra herbívoros y microbios, funciones de atracción de insectos para la polinización, tal función se exhibe principalmente por antocianinas, carotenoides y monoterpenos, que pueden ser atractivos de insectos en flores, pero son insecticidas antimicrobianos en hojas. Otros metabolitos secundarios presentan funciones fisiológicas, por ejemplo los esteroides constituyentes de las biomenbranas o el polímero estructural lignina, también funcionan

como iniciadores de señales que integran la diferenciación celular y el metabolismo en diferentes partes del organismo vegetal multicelular (Azcon y Talon, 1993). Así mismo, pueden funcionar como transportadores de nitrógeno tóxico y como protectores de radiación ultravioleta (Wink, 2000).

Los metabolitos secundarios pueden estar presentes de manera constitutiva en las plantas sanas llamados (fitoanticipinas) o pueden ser sintetizados en respuesta al ataque de patógenos (fitoalexinas) (Morrissey y Osbourn, 1999; Domingo y López-Brea, 2003). En el caso de que un metabolito constitutivo se produzca en grandes cantidades tras un ataque microbiano, su condición de fitoalexina dependería de si sus concentraciones constitutivas fueran o no capaces de eliminar el agente infeccioso, por otra parte algunos compuestos pueden ser fitoanticipinas en unas plantas y fitoalexinas en otras (Dixon, 2001).

De acuerdo a lo anterior, la defensa de los metabolitos secundarios contra herbívoros y microbios puede ser constitutiva o puede desencadenarse en horas o días después de la infección, ejemplos de estos compuestos son las isoflavonas, las furanocumarinas, las chalconas y los estilbenos. De esta manera la síntesis y acumulación de los metabolitos secundarios es regulada en espacio y tiempo (Wink, 2000), de acuerdo a estados específicos del desarrollo del organismo, de células especializadas y a periodos de estrés causados por el ataque de microorganismos, por cambio en las condiciones ambientales tales como intensidad de luz, estrés hídrico, contaminación, suministro de nutrientes (Azcon y Talon, 1993; Lambers et al., 1998). Estas sustancias se restringen a ciertas especies de plantas y ayudan de alguna forma a la interacción ecológica entre las plantas y su medio (Gros et al., 1985; Croteau et al., 2000). Entre las plantas la competencia puede ser principalmente por el suelo, la luz o los nutrientes, siendo liberados los metabolitos secundarios al ambiente por medio de la exudación de las raíces, lixiviación, volatilización y descomposición de los residuos (Kaufman et al., 1999). La interacción de una planta con microorganismos, herbívoros y otras especies de plantas puede ser un factor positivo, negativo o neutral, para la síntesis de los metabolitos secundarios como compuestos defensivos (antimicrobianos, inhibidores de la germinación, insecticidas, etc.), ante depredadores y patógenos (Vivanco et al., 2005; Kaufman et al., 1999).

## COMPUESTOS ANTIMICROBIANOS DE ORIGEN VEGETAL

Las plantas tienen una casi ilimitada habilidad para sintetizar sustancias aromáticas algunos de las cuales son fenoles o sus derivados sustituidos. Muchos otros son metabolitos secundarios; las cuales sirven como mecanismos de defensa en contra de ataques por microorganismos, insectos y herbívoros. Otros como los terpenos, dan a la planta su olor; las quinonas y taninos son responsables de la pigmentación de la planta. Algunos otros son responsables del sabor (terpenoides, “capsaisina” en chiles), y algunas de las mismas hierbas y especias usadas por los humanos para sazonar los alimentos son útiles por proporcionar compuestos medicinales Cuadro (1) (Murphy, 1999).

Los antimicrobianos de origen vegetal, pueden ser divididos dentro de varias categorías descritas de manera resumida a continuación y en el apéndice 7 se muestran algunas de las estructuras más comunes:

a) Compuestos fenólicos simples y ácidos fenólicos. Algunos de los más simples fitoquímicos bioactivos consisten de un simple anillo aromático sustituido. El ácido cinámico y el ácido cafeico son comúnmente responsables de un amplio grupo de compuestos derivados fenilpropanoides, los cuales están en su máximo estado de oxidación (quinonas, flavonoides, flavonas, taninos, cumarinas), terpenoides, aceites esenciales, alcaloides, lecitinas, polipéptidos y poliacetatos (Murphy, 1999).

b) Las quinonas son anillos aromáticos con dos sustituyentes cetónicos, altamente reactivos, son intermediarios en la ruta de síntesis de la melanina en la piel de los humanos. El potencial oxido-redox del par quinona-hidroquinona es muy importante en muchos sistemas biológicos (coenzima Q, el sistema de transporte de electrones). Su actividad antihemorrágica puede ser debido relacionado a su fácil oxidación en tejidos del cuerpo; las quinonas son conocidas por formar complejos irreversibles con proteínas, seguida de la inactivación de las mismas y la pérdida de la función, por esta razón, el efecto antimicrobiano de las quinonas es grande. Probablemente el blanco en las células microbianas son las adhesinas, polipéptidos de la pared celular, y enzimas unidas en membrana, alterando así su función (Murphy, 1999).

c) Las flavonas son estructuras que contienen un grupo carbonilo, la adición de un grupo 3-hidroxil produce un flavonol. Los flavonoides son también sustancias fenólicas hidroxiladas que se encuentran unidas en  $C_6-C_3$  un anillo aromático; son compuestos fenólicos los cuales contienen en su estructura química un número variable de grupos fenólicos. Estos son conocidos por ser sintetizados por las plantas en respuesta a infecciones microbianas, El mecanismo de acción de éstos frente a los microorganismos probablemente se debe a que forman complejos con las proteínas solubles y extracelulares, específicamente con los aminoácidos hidrofílicos, inactivando proteínas y anulando su función. Los flavonoides exhiben efectos inhibitorios en contra de múltiples virus. Las investigaciones acerca de este tipo de compuestos soportan la idea que su blanco microbiano es la membrana, además de que algunos investigadores han encontrado que entre más grupos hidroxilo es más grande la actividad antimicrobiana (Murphy, 1999). Por ello, desempeñan un papel esencial en la protección frente a los fenómenos de daño oxidativo. Se encuentran en vegetales, semillas, frutas y en bebidas como en el vino y la cerveza. Se han identificado más de 5, 000 diferentes, en las investigaciones que se han realizado en la mayor parte de éstas se han demostrado la existencia de otras funciones como antiinflamatorios, antivirales, y su papel protector frente a enfermedades cardiovasculares, cáncer y diversas patologías (Martínez, 2002).

Por otra parte, se ha reportado que los flavonoides hidrofóbicos pueden actuar dañando la función de la membrana o de la pared celular de los microorganismos, lo cual se ha corroborado con flavonoides prenilados obtenidos de diferentes especies vegetales sobre hongos (Sohn et al., 2004). También se ha documentado que la actividad antifúngica de los compuestos fenólicos como las flavonas está relacionado con los sitios y el número de grupos hidroxilo (OH) que presentan. Un aumento en la hidroxilación de la molécula se ha ligado a una mayor toxicidad, este mecanismo parece estar relacionado con la inhibición enzimática, posiblemente mediante reacciones de los grupos sulfhidrilo o por interacciones no específicas con las proteínas (Domingo y López-Brea, 2003).

d) Los taninos son un grupo de sustancias fenólicas poliméricas capaces de precipitar gelatina en solución. Son conocidos por su propiedad astringente; Estos se encuentran en casi todas las partes las plantas (Madera, hojas, frutas, y raíces), son

divididos dentro de dos grupos: los taninos hidrolizables y los condensados. Los taninos hidrolizables son derivados del ácido galico y del ácido elágico, usualmente como múltiples ésteres con D-glucosa, mientras los numerosos taninos condensados frecuentemente llamados proantocianinas, son derivados de monómeros flavonoides. Estos taninos pueden formarse por la condensación de derivados (flavonas). Alternativamente, los taninos pueden ser formados por la polimerización de unidades de quinonas. Los taninos hidrolizables tienen actividades fisiológicas como la estimulación de células fagocíticas, actividades antitumorales y actividades antimicrobianas. Su modo de acción antimicrobiana se debe a que probablemente actúen contra adhesinas, enzimas y proteínas de transporte en la membrana celular de la bacteria. En diversos estudios se han documentado las actividades inhibitorias en contra de hongos filamentosos, levaduras y bacterias (Murphy, 1999).

e) Las cumarinas son sustancias fenólicas sintetizadas mediante la fusión de benceno y anillos alfa-pirona. Desde 1996 han sido identificadas 1300, estos metabolitos han sido aislados de plantas. Dan un olor característico al heno fresco. Estos compuestos poseen en solución amoniacal, fluorescencia azul, azul-verde o violeta. Las cumarinas simples corresponden a estos compuestos hidroxilados y a sus éteres, no es raro que uno de los hidroxilos fenólicos esté unido a un enlace heterocíclico. Un elemento estructural frecuente en las cumarinas es la prenilación: se conocen cumarinas preniladas sobre un oxígeno fenólico o más frecuentemente sobre los carbonos 6 u 8 de las 7-hidroxi-cumarinas. La cadena isoprenilada (en C5 o en C10) al ser muy reactiva, podrá estar epoxidada, monohidroxilada, dihidroxilada, ciclada, sustituida, lo que explica el gran número de estructuras descritas (Wink, 1999). Las cumarinas han sido usadas en el tratamiento de cáncer, edemas, y muchos de sus derivados han mostrado actividad biológica. Los efectos biológicos observados incluyen antimicrobianos, vasodilatadores, antimutagénicos también actúan como inhibidores de enzimas como la lipoxigenasa y ciclooxigenasa. Un número de estudios recientes han señalado la actividad antimicrobiana de cumarinas naturales y derivados sintéticos (Bernadette et al., 2006). Los estudios in vitro de la actividad estructural de las cumarinas han mostrado que el carácter lípofílico y la estructura planar son requisitos para desarrollar actividades antimicrobianas (Ferrazzoli et al., 2004). Las cumarinas son inhibidores de la actividad de la ATPasa y de la DNA girasa por consiguiente tienen un buen potencial antimicrobiano (Laurin et al., 1999).

f) Terpenos y aceites esenciales: los aceites esenciales son metabolitos secundarios basados sobre una estructura de isopreno. Llamados terpenos, su estructura química general es  $C_{10}H_{16}$  y están presentes como diterpenos, triterpenos tetraterpenos ( $C_{20}$ ,  $C_{30}$  y  $C_{40}$ ), también como hemiterpenos ( $C_5$ ) y sesquiterpenos ( $C_{15}$ ). Cuando los compuestos contienen elementos adicionales, usualmente oxígeno, son llamados terpenoides. Los terpenos o terpenoides son activos en contra de bacterias, hongos, virus, y protozoarios. En 1997, fue reportado que el 60% de los aceites esenciales examinados, mostraron actividad antifúngica, mientras el 30% inhibió bacterias. El mecanismo de acción no es totalmente comprendido pero se cree que involucra el rompimiento de la membrana por los compuestos lipofílicos. Los científicos en alimentos han encontrado que los terpenoides presentes en aceites esenciales de plantas son útiles en el control de *Listeria monocytogenes* (Murphy, 1999). El interés por estos compuestos ha crecido por su utilidad comercial en la fabricación de perfumes y saborizantes. Pueden ser también antibacterianos, antifúngicos (Dey y Harborne, 1991; Croteau et al., 2000).

g) Lecitinas y polipéptidos: Los polipéptidos que inhiben el crecimiento de los microorganismos, fueron reportados en 1942, su mecanismo de acción radica en la formación de canales iónicos en la membrana microbiana o por la inhibición competitiva de adhesión de proteínas microbianas hacia los receptores polisacáridos del huésped. Las tioniinas son péptidos comúnmente encontrados en cebada y trigo, y consiste de 47 residuos de aminoácidos. Estas son tóxicas en contra de levaduras, bacterias Gram-negativas y Gram-positivas. Las tioniinas AX1 y la AX2 del azúcar de remolacha son activas en contra de hongos pero no en contra de bacterias (Murphy, 1999).

h) Los alcaloides son compuestos heterocíclicos nitrogenados, el primer ejemplo médicamente exitoso de un alcaloide fue la morfina, aislada en 1805, del opio. Los alcaloides diterpenoides, comúnmente aislados de las plantas de la familia Ranunculacea, muestran propiedades antimicrobianas. La solamargina un alcaloide de las bayas de *Salaniam khasianum*, y otros alcaloides pueden ser útiles en contra de infecciones intestinales. El mayor efecto antidiarreico es probablemente debido a sus efectos sobre el tiempo de tránsito de estos compuestos en el intestino delgado (Murphy, 1999). El mecanismo de acción de estos compuestos se debe o consiste en su estructura planar

cuaternaria, tal como la barbarina que es un representante importante de los alcaloides, su acción es atribuida por su capacidad para intercalarse con el DNA (Murphy, 1999).

### **ANTIFUNGICOS DE ORIGEN VEGETAL**

Las investigaciones sobre los productos naturales de plantas ahora están siendo intensificadas ya que es evidente que los fungicidas derivados de plantas tienen un enorme potencial para influir en las investigaciones modernas de agroquímicos. Además es difícil definir la significancia ecológica de muchos de los fungicidas sintéticos. Hay una buena razón para suponer que el metabolismo secundario de las plantas se desarrolló para protegerlas de ataques por microorganismos patógenos. Los extractos de plantas o sus constituyentes pueden proveer una alternativa del uso de los fungicidas sintéticos para controlar los hongos fitopatógenos (Young-Mi et. al., 2004).

A nivel mundial la incidencia de infecciones fúngicas ha sido observada también como el incremento de la resistencia de hongos a diferentes compuestos usados en la práctica de la medicina. El reto ha sido desarrollar estrategias efectivas para el tratamiento de candidiasis y otras enfermedades fúngicas (Abad et al., 2007).

A continuación se describen algunas sustancias fungicidas de manera resumida:

a) Los terpenoides: un gran número de estudios han sido hechos en recientes años sobre la actividad antifúngica de terpenoides de origen natural. Estos reportes se refieren principalmente a sesquiterpenos y a lactonas sesquiterpénicas. Los reportes sobre la actividad antifúngica de las lactonas sesquiterpénicas de origen natural se refieren principalmente a las aisladas de especies medicinales de la familia *Asteraceae*. Los resultados sugieren que una polaridad relativamente baja es uno de los requerimientos moleculares para la actividad antifúngica (Abad et al., 2007).

Se ha determinado el mecanismo de acción de algunos de estos metabolitos, de los cuales se conoce que inducen alteraciones en la permeabilidad celular por inserción entre las cadenas de acil-graso de los fosfolípidos de las membranas, lo que provoca un

incremento en la permeabilidad y fluidez de las mismas. Los grados de variación en fluidez corresponden a la posición de los terpenos dentro de la bicapa lipídica, cual depende de la hidrofobicidad del compuesto. Tal mecanismo de acción se ha determinado principalmente en monoterpenos y sesquiterpenos sobre *Candida albicans* y *C. glabrata*, utilizando el aceite esencial de *Melaleuca alternifolia*. Así mismo, se ha comprobado que los terpenos de esta especie inhiben la respiración de *Candida sp.*, lo que sugiere efectos adversos en mitocondria, lo cual ha sido demostrado con el sesquiterpeno poligodial dialdehído que inhibe la ATPasa mitocondrial de las levaduras (Hammer et al., 2004; Carson et al., 2006).

b) Compuestos fenólicos: en los años recientes varios estudios han sido realizados sobre la actividad antifúngica de compuestos fenólicos de origen natural (Flavonas, flavonoides glicosilados, cumarinas y antraquinonas). Algunos de estos compuestos fueron aislados por ensayos biodirigidos después de su previa evaluación antifúngica sobre la parte de la planta; tres nuevos compuestos fenólicos fueron aislados de las hojas de *Baseonema acuminatum*. Los compuestos mostraron actividad antifúngica en contra de dos casos clínicos de *Candida albicans*. Otro grupo es el de los flavonoides los cuales han sido reportados por ser compuestos antifúngicos de origen natural, principalmente aislados de especies de las familias Fabaceae y Moraceae. Algunos de estos flavonoides fueron aislados por ensayos biodirigidos (calchonas y flavonas). La actividad antifúngica de unas series de flavonoides prenilados fueron aislados y mostraron una buena actividad en contra de *Cladosporium cladosporioides* y *Candida albicans*; el flavonoide luteolol aislado de hojas de la planta *Blumea balsamifera* mostró una actividad moderada en contra de *Aspergillus niger*, *Trichophyton mentagrophytes* y *Candida albicans*. En las continuas investigaciones de compuestos antifúngicos obtenidos de plantas, la hidroxycumarina (escopoletina) fue aislada de semillas de *Melia azedarach* (familia Meliaceae), mostró actividad frente a *Fusarium verticillioides* y *Cladosporium cucumerinum*. Deng y Nicholson reportaron las propiedades antifúngicas de la surangina B, una cumarina que se encuentra en la planta *Mammea longifolia*, como un inhibidor del crecimiento micelial de *Rhizoctonia solani* y *Botrytis cinerea* (Abad et al., 2007).

c) Alcaloides, como la flindersina, la anhidroevoxina y la haplamina aislados de las partes aéreas de la planta *Haplophyllum sieversii* (familia Retaceae), han demostrado una alta actividad antifúngica en contra de *Colletotrichum fragariae*, *Colletotrichum gloeosporioides* y *Colletotrichum acutatum*. Un nuevo alcaloide, el 2-(3,4-dimetil-2,5-dihidro-1H-pirrol-2-il)-1-metiletil pentanona fue aislado de la planta Datura metel (familia Solanaceae) mostró actividad en contra de cepas de *Aspergillus* y *Candida* (Abad et al., 2007).

e) Aceites esenciales: el efecto antifungico de los aceites esenciales de la planta *Lavandula angustifolia* (familia Laminaceae) fue estudiado sobre el crecimiento de 55 casos clínicos aislados de *Candida albicans*, donde sus principales componentes del aceite fueron el linalool y el acetato de linalil, donde el linanool resultó el más efectivo en contra de *C. albicans* (cepas vecinales). El aceite esencial también fue efectivo en contra de *Rhizoctonia solani* y *Fusarium oxyporum*, y menos activo en contra de *Aspergillus flavus* (Abad et al., 2007).

**Cuadro 1. Plantas que contienen actividad antimicrobiana.**

Nombre común	Nombre científico	Compuesto	Tipo de compuesto	de Actividad
Alfalfa	<i>Medicago sativa</i>	?		Gram-positivas
Pimienta negra	<i>Piper nigrum</i>	Piperina	Alcaloide	Hongos, Lactobacillus, <i>Micrococcus</i> , <i>E. coli</i> , <i>E. faecalis</i> .
Árbol beal	<i>Aegle marmelos</i>	Aceites esenciales	Terpenoides	Hongos
Laurel	<i>Laurus nobilis</i>	Aceites esenciales	Terpenoides	Bacterias, hongos
Arándono	<i>Vaccinium spp.</i>	Fructuosa	Monosacárido	<i>E. coli</i>
Ranúnculo	<i>Ranunculus bulbosus</i>	Protoanemonin	Lactona	General
Alcaravea	<i>Carum carvi</i>		Cumarinas	Bacterias, hongos, virus
Cascara sagrada	<i>Rhamnus prusiana</i>	Taninos	Polifenoles	Virus, bacterias, hongos
Anacardo	<i>Anacardium pulsatilla</i>	Acido salicílico	Polifenoles	<i>P. acnes</i>
Té de canela	<i>Cunnamomun verum</i>	Aceites esenciales	Terpenoides y Taninos	General
Chamomilla	<i>Matricia chamomilla</i>	Acido antemico	Ácido fenólico	<i>M. tuberculosis</i> , <i>S. typhimurium</i> , <i>S. aureus</i> .
		-	Cumarinas	Virus
Chile pimiento	<i>Capsicum annum</i>	Capsina	Terpenoide	Bacterias
Clavo	<i>Syzygium aromaticum</i>	Eugenol	Terpenoide	General
Coca	<i>Erythroxylum coca</i>	Cocaina	Alkaloide	Gram.-positivas y negativas
Cilantro	<i>Coriandrum sativum</i>	?		Bacterias, hongos
Diente de león	<i>Taraxacum sfficinale</i>	?		<i>C. albicans</i> , <i>S. cerevisiae</i>
Eneldo	<i>Anethum graveolens</i>	Aceite esencial	Terpenoide	Bacterias
Eucalipto	<i>Eucalyptus globulus</i>	Tanino	Polifenol	Bacterias, virus
Ajo	<i>Allium sativum</i>	Allicina, ajoene	Sulfoxido, terpenoides sulfatados	Bacterias, virus
Ginseng	<i>Panax notoginseng</i>		Saponinas	<i>E. coli</i> , <i>Sporothrix schenckii</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Trichophyton</i>
Cascara de uva	<i>Citrus paradise</i>	?	Terpenoide	Hongos
Té verde	<i>Camellia sinensis</i>	Catechin	Flavonoide	General <i>Vibrio</i>
Jena	<i>Lawsonia inermes</i>	Acido galico	Fenólico	<i>S. aureus</i>

**Cuadro 1. Continúa.**

Nombre común	Nombre científico	Compuesto	Tipo de compuesto	de	Actividad
Hierba japonesa	<i>Rabdsia trichocarpa</i>	Trichorabdal A	Terpeno		<i>Helicobacter pylori</i>
Algodón	<i>Sontolina chamaecyparissus</i>	?			Gram-positivas, <i>Candida</i>
Regaliz	<i>Glycyrrhiza glabra</i>	Glabrol	Alcohol fenólico	.	
Cebolla	<i>Allinum cepa</i>	Alicina	Sulfoxido		Bacterias, <i>Candida</i>
Lantana	<i>Lawsonia</i>	Lawsona	Quinona		<i>M. tuberculosis</i>
Limón balsamo	<i>Melissa officinalis</i>	Taninos	Polifenoles		Virus
Limón verbena	<i>Aloysia tripillia</i>	Aceite esencial	Terpenoide ?		<i>Ascaris</i> <i>E. coli</i> , <i>M. tuberculosis</i> , <i>S. aureus</i> .
Cáscara de naranja	<i>Citrus sinensis</i>	?	Terpenoide		Hongos
Papaya	<i>Carica papaya</i>	Latex	Mezcla de terpenoides, ácidos organicos, alcaloides	de	General
Menta	<i>Mentha piperita</i>	Mentol	Terpenoide		General
Peyote	<i>Lophophora williamsii</i>	Mezcalina	Alkaloide		General
Amapola	<i>Papaver somniferum</i>	Opio	Alcaloides y otros	y	General
Romero	<i>Rosmarinus officinalis</i>	Aceite esencial	Terpenoide		General
Senna	<i>Cassia angustifolia</i>	Rhenin	Antraquinona		<i>S. aureus</i>
Tarragon	<i>Artemisa dracunculus</i>	Acido cafeico, taninos	Terpenoide polifenoles		Virus y protozoarios

General: denota la actividad en contra de múltiples tipos de microorganismos (bacterias, hongos y protozoarios), y " bacterias" denota la actividad en contra de Gram-positivas y Gram-negativas (Murphy, 1999).

## DESORDENES GASTROINTESTINALES

La causa de los desórdenes gastrointestinales puede ser ampliamente dividida dentro de dos grupos:

1. Por el consumo de alimentos y agua contaminados con microorganismos patógenos viables o de sus toxinas preformadas.
2. Por la ingestión de algas, parásitos, y sus toxinas preformadas a través del alimento.

Algunos de los factores incluidos en los dos grupos anteriores son:

1. Ingestión de toxinas naturalmente presentes en el alimento. Este incluye las setas (hongos), algunas frutas y vegetales, y algunos alimentos marinos.
2. Toxinas formadas en algunos alimentos. Ejemplos de estas son algunas aminas biológicas (Histamina) que se forman en algunos productos, platillos, quesos, y carnes fermentadas.
3. La presencia de sustancias químicas en alimentos contaminados y agua, tal como metales pesados y algunos pesticidas.
4. Alergias a algunos componentes naturales de un alimento.
5. La inhabilidad genética para metabolizar componentes normales del alimento. La inhabilidad de algunos individuos para hidrolizar la lactosa en el intestino delgado, debido a la falta de producción de la enzima lactasa, resulta en desordenes gastrointestinales (intolerancia a la lactosa).
6. Indigestión por comer demasiado u otras razones (Bibek, 2000).

## ENFERMEDADES INFECCIOSAS GASTROINTESTINALES DE ORIGEN BACTERIANO EN MEXICO

En México las infecciones gastrointestinales de origen bacteriano se encuentran dentro de las diez primeras causas de muerte dentro de la población indígena, y corresponden a un total del 1.11% del total de las causas de muerte. Los niños menores de un año son las más susceptibles y existe una gran mortalidad en este grupo cuando no son atendidos oportunamente. El mecanismo de transmisión fundamental es directo, a través de los alimentos y al agua. Estas infecciones provocan epidemias en lugares con condiciones de alta población y poca higiene (Claver et al., 2001; INEGI, 2001; Longanga et al., 2000; Sepúlveda, 1994; SSA, 1992; SSA DF, 2000; Castro et al., 2007).

Dentro de los organismos más comunes que causan las infecciones gastrointestinales se encuentran: *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Vibrio cholerae*, *Shigella spp.*, *Bacillus spp.* Y *Yersinia enterocolitica*. Los signos más característicos son gastroenteritis, diarrea, vómitos, fiebres, náuseas, deshidratación, sangrados con pus y enterocolitis (Mims, 1993).

Las causas de estos padecimientos van desde el consumo de alimentos; la cantidad ingerida de ellos, el estado de los mismos; debido a falta de higiene; la sensibilidad de cada organismo (Bye, 2003).

Diversos grupos humanos utilizan como alternativa para el tratamiento de estos padecimientos infusiones preparadas con plantas medicinales para el tratamiento de estos, acompañadas de algunas prácticas, rezos y ciertas reglas que deben observarse al coleccionar la planta. Algunas de las familias botánicas más frecuentemente utilizadas para estos padecimientos son: Asteraceae, Lauraceae, Cistaceae, Simaroubaceae, Chenopodiaceae, Urticaceae, Mytaceae, Brassicaceae, Plantaginaceae, Verbenaceae, Rosaceae, Urticaceae y Lamiaceae, por mencionar algunas (Bye op. cit; Nascimento et al., 2000).

Unas de las familias botánicas más importantes es la Asteraceae, debido a su contribución con un gran número de plantas para la farmacopea mexicana. Las razones de su importancia incluyen el gran número de especies distribuidas en México y su amplia gama de productos naturales que son útiles en el tratamiento de enfermedades que afligen a los habitantes del México rural. Sin embargo, sólo pocas de las especies utilizadas en la medicina tradicional para tratar estos padecimientos han sido evaluadas clínicamente o estudiadas química y biológicamente para identificar los compuestos activos y determinar sus índices terapéuticos (Heinrich et al., 1998, Longanga, 2000).

Las enfermedades transmitidas por medio de los alimentos se suelen dividir en dos clases principales: la primera comprende las enfermedades que son consecuencia de la presencia en los alimentos de microorganismos infectivos. Estos microorganismos son capaces de causar enfermedad por la invasión del hospedador o por la liberación de toxinas (infecciones alimentarias). La segunda clase de enfermedades transmitida por alimentos es consecuencia de la absorción intestinal de toxinas que ya estaban presentes en los alimentos antes de su ingestión (intoxicaciones). En el cuadro 2 se resumen algunas enfermedades transmitidas por los alimentos y algunos de sus síntomas que presentan (Mossel et al., 2003).

**Cuadro 2. Enfermedades microbiológicas transmitidas por alimentos, patógeno causante.**

Tipo de enfermedad	Microorganismo causante	Grupo microbiano	Tipo de síntoma (s)
<b>Intoxicación</b>			
<i>Staphylococcus aureus</i> Intoxicación estafilocócica	Cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> productores de enterotoxinas A y/o D	Bacteria Gram-positiva, no esporulado, no móvil, anaerobio facultativo	Su acción se ejerce sobre el sistema nervioso central (fiebre, dolores de cabeza, escalofríos y sudoración).
Botulismo	<i>Clostridium botulinum</i> tipos (A, B, C, D, E, F y G),	Bacteria Gram-positiva, anaerobio, esporulado	Es la enfermedad más letal con una alta mortalidad. Parálisis muscular y muerte por fallo respiratorio

Cuadro 2. Continúa

Tipo de enfermedad	Microorganismo causante	Grupo microbiano	Tipo de síntoma (s)
<i>Bacillus cereus</i>	Productor de 2 toxinas (cereúlina)	Bacteria Gram-positiva, con esporas centrales, aerobio y anaeróbico facultativo	Síndrome emético y diarreico.
Intoxicación: Micotoxinas (aflatoxinas B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , G <sub>1</sub> , y G <sub>2</sub> ) Acrotoxina A.	Micotoxinas producidas por cepas de hongos ej. <i>Aspergillus ssp</i> , <i>Penicillium ssp</i> .	Hongos	Lesiones hepáticas agudas, cirrosis, cancerígenas (hígado, teratogénicas inmunosupresoras, necrosis renal)
<b>Infección</b> Salmonelosis Tifoidea y paratifoidea	Más de 2000 serovariantes de <i>Salmonella</i> (excepto. <i>S. typha</i> y <i>S. paratyphi</i> )	Bacteria Gram-negativa anaerobio facultativo	Fiebre tifoidea, gastroenteritis (anorexia, dolor de cabeza, fiebre, diarrea sin sangre, dolor abdominal, vómito, náusea, etc.)
Campilobacteriosis, enteritis	<i>Campylobacter jejuni</i> y <i>C. coli</i>	Bacteria Gram-negativa no esporulado, microaerófilico	Colecistitis, endocarditis, meningitis, eritema nodoso, síndrome hemolítico-urémico, colon irritable, diarreas explosivas, aborto
Yersiniosis	Cepas patógenas de <i>Yersinia enterocolitica</i>	Bacteria Gram-negativa asporógeno, anaerobio facultativo	Gastroenteritis (Artritis, ritema nodoso, septicemia, abscesos hepáticos, etc.) adenitis mesenterica, peste bubónica.
<b>Enterohemorrágico</b> Enteritis, colitis hemorrágica	<i>Escherichia coli</i> 0157:H7 sero predominante,	Bacteria Gram-negativa	Colitis hemorrágica (diarrea sanguinolenta, fiebre, vómito, dolor abdominal). Síndrome de uremia hemolítica
<b>No hemorrágico</b> Colitis	Cepas <i>E.coli</i> (ETEC, EPEC, EHEC, EAEC, EIEC), toxinas Shiga-like (Verotoxinas)	Bacteria Gram-negativa	Diarreas, náusea, vómito, fiebre, dolor abdominal, diarreas acuosas, escalofríos.
Listeriosis	<i>Listeria monocytogenes</i> (13 serotipos patógenos), toxina "Shiga"	Bacteria Gram-positiva, no esporulado, anaerobio facultativo	Infección perinatal, septicemia, meningitis, artritis, endocarditis
Shigelosis	Cuatro especies de <i>Shigella</i> ej. <i>S. dysenteriae</i> , <i>S. flexneri</i>	Bacteria Gram-negativa anaerobio facultativo no móvil	Diarrea, dolor abdominal, vómito.

Cuadro 2. Continúa

Tipo de enfermedad	Microorganismo causante	Grupo microbiano	Tipo de síntoma (s)
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> gastroenteritis	Cepas patógenas de <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Bacteria Gram-negativa anaerobio facultativo, móvil	Gastrointestinal (diarrea, calambres, debilidad, náusea, vómito, escalofríos).
<i>Vibrio vulnificus</i> Infección enterica	Cepas <i>Vibrio vulnificus</i>	Bacteria Gram-negativa, móvil	Extrema virulencia (cuadro septicémico de letalidad alta).
<i>Vibrio cholerae</i> Cólera	Cepas <i>Vibrio cholerae</i> dos biotipos (01 y No-01)	Bacteria Gram-negativa, móvil anaerobio facultativo	Diarrea explosiva, deshidratante y potencialmente mortal, anorexia, malestar abdominal, vómito, diarrea acuosa Abortos en ganado.
Brucelosis Fiebres de Malta o ondulante Infecciones virales	<i>Brucella abortus</i> , <i>B. melitensis</i>  Virus patógenos entericos Ej. Virus de la <i>hepatitis A</i> y <i>E</i> .	Bacteria Gram-negativa  Virus	Anorexia, fiebre, malestar, náusea, vómito
<b>Toxicoinfección</b> <i>Clostridium perfringens</i> gastroenteritis <i>Bacillus cereus</i> gastroenteritis	Cepas <i>Clostridium perfringens</i>  Bacillus cereus	Bacteria Gram-negativa  Bacteria Gram-positiva, con esporas centrales, aerobio y anaeróbico facultativo	Gástrico  Síndrome emético y diarreico.
<i>E. coli</i> gastroenteritis	Enteropatogénico y enterotóxico Cepas de <i>E. coli</i>	Bacteria Gram-negativa	Diarreas, náusea, vómito, fiebre, dolor abdominal, diarreas acuosas, escalofríos
Cólera	Cepas patógenas de <i>Vibrio cholera</i>	Bacteria Gram-negativa, móvil anaerobio facultativo	Extrema virulencia (cuadro septicémico de letalidad alta).
<b>Gastroenteritis por patógenos oportunistas</b> <i>Aeromonas hydrophila</i> gastroenteritis	4 especies de <i>Aeromonas</i> : <i>A. hydrophila</i> , <i>A. salmonicida</i> , <i>A. caviae</i> , <i>A. Sobriae</i> .	Bacteria Gram-negativa Anaerobio facultativo, móvil.	Dos cuadros uno diarreico y disentérico (septicemias, infecciones del trato urinario, meningitis)
<i>Plesimonas shigelloides</i> Gastroenteritis	Cepas de <i>Plesimonas shigelloides</i>	Bacteria Gram-negativa	Gástrico

(Bibek, 2000; Mossel et al., 2003; Doyle, et al., 2001)

## ENFERMEDADES FUNGICAS

Las infecciones fúngicas se han incrementado en la última década así como la incidencia y severidad de las mismas, por el resultado en el incremento de los pacientes inmunodeprimidos (VIH) ó pacientes que han sido sometidos a transplantes de órganos, y por quimioterapias. Los agentes fúngicos más comunes son *Candida*, *Cryptococcus*, y *Aspergillus*. Las enfermedades fúngicas pueden ser clasificadas como: a) reacciones alérgicas a proteínas fúngicas, a) reacciones tóxicas debidas a toxinas presentes en ciertos hongos y c) infecciones (micosis) (Heitman, 2001). Evitar la proliferación de enfermedades fúngicas sigue siendo un ardua tarea del siglo XXI, es por ello que continúa el desarrollo de nuevos antifúngicos cada vez más potentes (Gregory, 2005).

Por otra parte, se estima que las enfermedades fúngicas en las plantas causan pérdidas en casi un 20%, en los cultivos alimenticios mundialmente. El resultado de las pérdidas en los cultivos ocurre como resultado de la muerte prematura de la planta y la infección en el almacenamiento, en donde el nivel del daño depende mucho de las condiciones ambientales de almacenamiento (humedad relativa y temperatura), con una reducción en la calidad y cantidad de los cultivos (Carpinella, et al., 2005).

Estas infecciones son difíciles de erradicar, particularmente en los habitantes de los países del tercer mundo, debido a la pobreza extrema y condiciones de sanidad de la población (Kuiate et al., 2006). Por otra parte, las micotoxinas que producen ciertas especies de hongos fitopatógenos han ocasionado enfermedades en animales y humanos por el consumo de forrajes y alimentos invadidos por hongos (Agrios, 1996). Otras pueden ser neurotóxicas, hepatotóxicas, nefrotóxicas y carcinogénicas (Albright, 2001); La presencia de estos hongos o sus toxinas es particularmente desventajosa en países en desarrollo, donde el maíz y los productos basados en este son el principal alimento para la mayoría de la población (Young-Mi, et al., 2004).

Esto ha conducido a los investigadores a buscar fungicidas alternativos, particularmente de plantas medicinales usadas empíricamente por sus propiedades antifúngicas. De estas fuentes naturales han sido encontradas una diversidad de sustancias con actividades antifúngicas en contra de diferentes cepas fúngicas, las cuales son de gran importancia para los humanos y plantas (Abad et al., 2007) (cuadro 3).

**Cuadro 3. Hongos de importancia médica y agronómica.**

Hongos	Importancia medica	Importancia agronómica
<i>Aspergillus niger</i>	Aspergilosis, trombosis e infarto cuando invade vasos sanguíneos, bloqueo parcial de la vía aérea, reacciones bronquio pulmonares y alergias (Myrvin & Weiser, 1991)	Invasión de embriones de la semilla, causa pudrición en algodón, cebolla y granos de maíz (Fich y Finch, 1974).
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	Dermatofito, causa tiña (pie de atleta) (Myrvin y Weiser, 1991).	
<i>Fusarium Sporotrichum</i>		Responsable de enfermedades en plantas, causando la pudrición de raíz en frijol y cacahuate, pudrición en tallo (clavel y crisantemo), así como la pudrición de bulbos, etc. (Agrios, 1996; Fich y Finch, 1974).
<i>Fusarium moniliforme</i>	Contiene una micotoxina llamada T <sub>2</sub> la cual afecta al cerdo.	
<i>Rhizoctonia solanii</i>		Causa el ahogamiento de plántulas, la pudrición en raíz (orquídeas), cancrisis del tallo, pudrición de los frutos, tizones, en diferentes plantas de importancia agronómica (Agrios, 1996).

### DESCRIPCIÓN BOTANICA DE *Tagetes lucida* (pericón).

**Nombre comunes:** pericón, periquillo, anisillo, flor de Santa María, curucumin, hierba anís, flor de tierradentro, caléndula anisada.



**Figura 1a.** *Tagetes lucida* (pericón).

#### **CLASIFICACIÓN**

Dominio: Eucaria

Reino: Plantae

División: Spermatophyata

Clase: Dicotiledoneae

Familia: Asterales

Tribu: Astereae

Género: *Tagetes*

Especie: *lucida*

Nombre científico: *Tagetes lucida*.

**Descripción botánica:** *Tagetes lucida* (pericón).

Planta herbácea perenne, erecta hasta de 80 cm de alto, con olor a anís al estrujarse; tallos generalmente varios o muchos partiendo de la base, más o menos ramificados, glabros; hojas simples, sésiles, lineares oblongas, elípticas u oblanceoladas, de 2 a 10cm de largo, de 0.5 a 2 cm de ancho, agudas redondeadas en el ápice, márgenes aserrados; cabezuelas en corimbos, sobre pedúnculos bracteados hasta 1 cm de largo; involucre cilíndrico de 4 a 12 mm de alto, sus brácteas 5 a 7, con los ápices tubulados; flores liguladas 3 ó 4, amarillas, sus láminas flabeladas o suborbiculares, de 3 a 6 mm de largo y de 4 ó 5 escamas romas de 1 a 2 mm de largo. “Pericón” Ampliamente distribuido en el valle de México en zonas montañosas, menos frecuente en la zona norte. Altitud de 2250-2900 m. pastizales y bosques de Quercus y de coníferas, preferentemente en condiciones de disturbio. Conocida de Sonora, Chihuahua y Nuevo León a Guatemala Figura 2, (Rzedowskik, 1979).



**Figura 2.** Distribución en México de la planta *Tagetes lucida* (Rzedowskik, 1979).

**Ecología:**

Es originaria de México, Guatemala y Honduras. Habita en climas cálido semicálido, seco, semiseco y templado, entre los 8 a los 850 m de altitud y de los 1000 hasta los 4000 m de altitud. Es común encontrarla en terrenos de cultivo abandonados o cerca de milpas, asociada a bosque tropical perennifolio, matorral xerófilo, pastizal. En ocasiones ocupa partes altas de laderas y montañas en bosque mesófilo de montaña, de encino, de pino, mixto de encino-pino y de junípero (Argueta, 1994).



**Figura 1b. *Tagetes lucida* (pericón).**

**Uso tradicional:**

En Guanajuato, Guerrero, Michoacán y Tlaxcala, el uso medicinal más frecuente que se le asigna a *Tagetes lucida* es para trastornos digestivos y principalmente como dolores estomacales, diarrea, disentería, empacho, tifoidea y vómito (Argueta, 1994).

Así mismo se recomienda en desórdenes ginecológicos como cólico menstruales, dismenorrea y cuando hay menstruación lechosa o blanca, “para expeler el flujo en baños de señora y poder tener hijos”. También para dolores en general como los de la espalda, de abdomen, cuerpo, huesos, muelas, riñones, dolores internos y de “aire” producidos por un cambio brusco de temperatura, enfriamiento localizado en cintura, oídos, cabeza y pecho. Dolor y tos de naturaleza reumática, al igual que para cólicos abdominales y “cólico de hombres “. Además en problemas de reumatismo, inflamación, várices, nubes de los ojos, insomnio, resfriado, asma y en menor proporción para el “susto”. Otras propiedades que se le atribuyen son como abortivo, carminativo, digestivo emenagogo, contra áscaris y el mal aliento. En el tratamiento de estos padecimientos se emplea, en general toda la planta, en cocimiento administrado por vía oral, para algunas molestias gástricas y diarreas mezclada con ruda, hinojo y clavo (Argueta, 1994).

### **Historia:**

La referencia más antigua se menciona en el Códice Florentino del siglo XVI en donde se comenta que sirve “para los que tienen cámaras (diarrea), los que escupen sangre y para la fiebre”.

A inicios del siglo XVIII; Juan de Esteyneffer la usa en conocimiento para las almorranas y para la detención de la orina, mal de madre y otros padecimientos.

En el siglo XX, Maximino Martínez la reporta como: antidisentérico, antiespasmódico, antipalúdismo, caquexia, carminativo, diaforético, diurético, emenagogo, emético, gastroenteritis y relajante. Finalmente como antipalúdismo, antiparásito (Argueta, 1994).

## ANTECEDENTES

En las revisiones de la literatura con respecto a los trabajos realizados de la especie *Tagetes lucida* (pericón), se cuenta con algunos registros, pero son muy pocos los relacionados a la actividad antimicrobiana, por lo tanto es de suma importancia el estudio de la misma.

Muchas propiedades son descritas a esta planta, en donde es usada como saborizante de sopas, salsas, platillos con pollo, etc. Sus hojas y inflorescencias son usadas para dolores de estomago, y tratamientos de diversas dolencias antiinflamatorias (Márquez, et al., 1999).

En cuanto a estudios químicos, se han reportado algunos de los compuestos encontrados en la especie son: los monoterpenos en los aceites esenciales, compuestos fenólicos, flavonoides y cumarinas (Gil et al., 2000; Calderón et al., 1976; Rios and Flores, 1976; Abdala, 1999; Cáceres et al., 1995; 1991; Aquino et al., 2002); Además *T. lucida* y *T. erecta* contienen sustancias similares a salvinorin A (*Salvia divinorum*).

El extracto metanólico muestra actividad antimicrobiana (Cáceres et al., 1993; Céspedes et al., 2006), la actividad inhibitoria de la ATPasa (Aoki and Cortes, 1994), contractibilidad del útero de rata (Jayme et al., 1998), y antioxidante (Aquino et al., 2002). Otras actividades tal como analgésico, anticonvulsionario, relajante muscular, prevención del cáncer, fungicidas, insecticidas, estimulantes de la regeneración del hígado, son mostradas por el metil-chavicol y eugenol aislado de esta planta.

Los principales compuestos del aceite y la planta completa son cumarinas y derivados los cuales tienen actividad espasmódica (Sheppard-Hanger, 1998), actividad citotóxica (Reutrakul, et al., 2003), actividad anti HIV-1 (Sunthitikawinsakul, et al., 2003), actividad herbicida (Lee et al., 2003), actividad antioxidante (Sanghyun et al., 2003), actividad anti-inflamatoria (YenMei et al., 2003), actividad fitoalexina (Dmitriev et al., 2003), actividad agregación antiplaquetaria (Kehshaw et al., 2003), actividad antimicrobiana

(Ngwendson et al., 2003; Schinkovitz et al., 2003), y actividad anticancerígena (Ito et al., 2003).

Algunas investigaciones en mecanismos de acción alelopática, reportan que diferentes compuestos fenólicos (isoprenoides y otros) son para inhibir el desarrollo de las planta (Einhellig, 1995; Harborne, 1999; Kozubek, 1999; Mucciarelli et al., 2001) y cumarianas que específicamente inhiben el crecimiento de las hierbas (Lee et al., 2003) y tienen prometedoras actividades alelopáticas (Vyvyan, 20003).

## JUSTIFICACION

En las últimas décadas, se ha observado un incremento en la resistencia de muchas cepas de agentes patógenos a los antimicrobianos actuales (antibióticos y agroquímicos). Además el impacto indeseable que tienen en lo económico y social (salud pública) las enfermedades causadas por estos microorganismos, por ejemplo en el caso de especies de *Fusarium*, son capaces de causar una variedad de enfermedades en cereales, incluyendo la putrefacción de tallos y hojas en plantas (putrefacción de las raíces del trigo, cebada, avena y centeno) por otro tienen la capacidad de causar infecciones oportunistas en humanos y animales (micóticas) (Matos, 1999), lo cual ha conducido a la búsqueda de nuevos agentes antimicrobianos de origen natural.

Además la necesidad que se tiene hoy en día en la aplicación de los metabolitos secundarios de plantas los cuales presentan la ventaja de ser biodegradables y probablemente presenten menos efectos secundarios que los compuestos químicos sintéticos. Los estudios fitoquímicos de *Tagetes lucida* han determinado la presencia de flavonoides y cumarinas que por su estructura química podrían ser capaces de presentar actividades antimicrobianas.

El presente proyecto de investigación pretende contribuir al estudio fitoquímico de la especie *Tagetes lucida*, así como el de identificar productos naturales biológicamente activos (antimicrobianos), con los que se puedan atacar problemas por atender en la alimentación, en la productividad agrícola, salud, en el cuidado y conservación del medio ambiente. Además no se ha evaluado la actividad de esta planta en bacterias enteropatógenas ni en hongos de importancia médica y agroquímica.

Nuestra pregunta esta dirigida a investigar si los metabolitos secundarios de la parte aérea de *Tagetes lucida* tienen actividad antimicrobiana al inhibir el crecimiento de algunos microorganismos, donde destacan bacterias patógenas y hongos fitopatógenos.

## HIPOTESIS

Si en *Tagetes lucida* se ha reportado la presencia de compuestos fenólicos como flavonas, flavonoides y cumarinas. Y además se tiene documentada la actividad antimicrobiana de este tipo de metabolitos secundarios en otras especies vegetales, y se sabe que la planta es utilizada en la medicina tradicional mexicana para aliviar tanto desórdenes gastrointestinales como infecciones de la piel, entonces es probable que la especie tenga compuestos químicos que presenten actividad sobre enterobacterias y sobre hongos de importancia médica y agrícola.

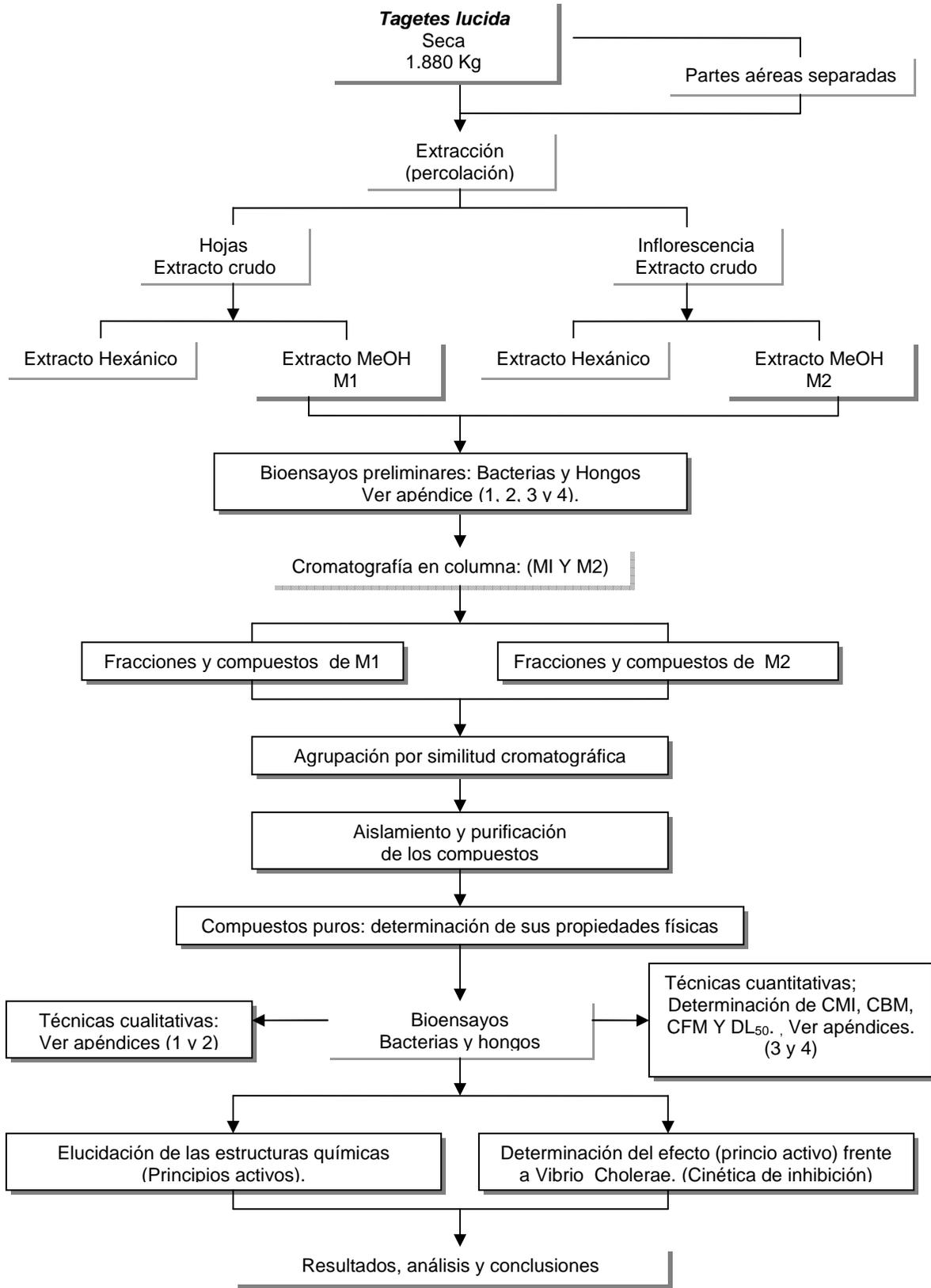
## OBJETIVOS

### Objetivos generales

- Determinar el potencial antimicrobiano de las partes aéreas de *Tagetes lucida*.
- Aislar el o los principios activos y elucidar su estructura.

### Objetivos particulares

- Obtener los extractos metanólicos y hexánico de *Tagetes lucida*
- Evaluar la actividad antimicrobiana del extracto metanólico de *Tagetes lucida*
- Separar mediante cromatografía de los extractos y obtener las fracciones correspondientes.
- Aislar, purificar y caracterizar, las sustancias o los compuestos activos mayoritarios puros mediante espectroscopias de (RMN, IR, UV, MS).
- Evaluar la actividad antimicrobiana (antibacteriana y antifúngica) de o los compuestos puros, usando el método de difusión en disco de Kiirby-Bauer (bacterias) e inhibición del crecimiento radical (hongos).
- Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), Concentración Bactericida Mínima (CBM), Concentración Fungicida Mínima (CFM) y Concentración Fungicida Media (CF<sub>50</sub>) de los compuestos que presenten actividad antimicrobiana mediante la microtécnica de dilución en caldo.
- Realizar un experimento de desafío (curva de supervivencia y efecto sobre el crecimiento) sobre la bacteria más sensible.



**Figura 3. Diseño experimental.**

## MATERIAL Y METODOS

La fase experimental de este trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de fitoquímica de la Unidad de Biotecnología y Prototipos (UBIPRO) de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM.

De acuerdo con los objetivos planteados, los resultados de este trabajo se dividen en tres fases, para cada una de ellas se desarrolló la metodología como se indica a continuación.

### Fase I Estudio Fitoquímico

#### 1. Colecta de la planta.

Para el estudio fitoquímico, el material vegetal de *Tagetes lucida* fue colectada en el mes de enero del 2005 en la carretera México-Oaxtepec, Col. A. Barona, Cuernavaca, una muestra fue llevada al Instituto de Biología para comprobar su identidad identificado por el M. en C. Francisco Ramos, Departamento de Botánica, Instituto de Biología UNAM.

#### 1.2 Extracción.

##### 1.2.1 Obtención de los extractos.

Para la obtención de los extractos herbales de la parte aérea de la planta, primeramente se separaron hojas, inflorescencias y ramas, posteriormente fueron secadas a la sombra a temperatura ambiente y se sometieron a un proceso de maceración para su extracción. Se colocaron 1 Kg de hojas y 1 Kg de inflorescencias secas por separado en un matraz de vidrio de 4 L. A cada uno se le agregó el solvente (metanol), se dejó reposar durante 3 días, posteriormente se filtró y se obtuvieron los extractos (extracción por exceso de disolvente), que fueron concentrados mediante destilación a presión reducida en un rotavapor. Finalmente éstos se colocaron en charolas de vidrio para completar la evaporación del solvente y el rendimiento de cada uno de los extractos se determinó con relación al peso seco de la planta.

### 1.2.2 Elaboración de los extractos.

Posteriormente a estos extractos se les realizó una partición 1:1 (MeOH/Hex.), se agregaron en un embudo de separación de 1000 ml, obteniendo dos fases, una no polar (hexano) y la otra polar (metanol) (figura 4). Las dos fracciones fueron separadas y el exceso de solvente se destiló a presión reducida, las particiones obtenidas se colocaron en charolas de vidrio para la evaporación total del solvente y finalmente se obtuvo el rendimiento de cada una de ellas mediante diferencia de peso entre las charolas y los extractos obtenidos.

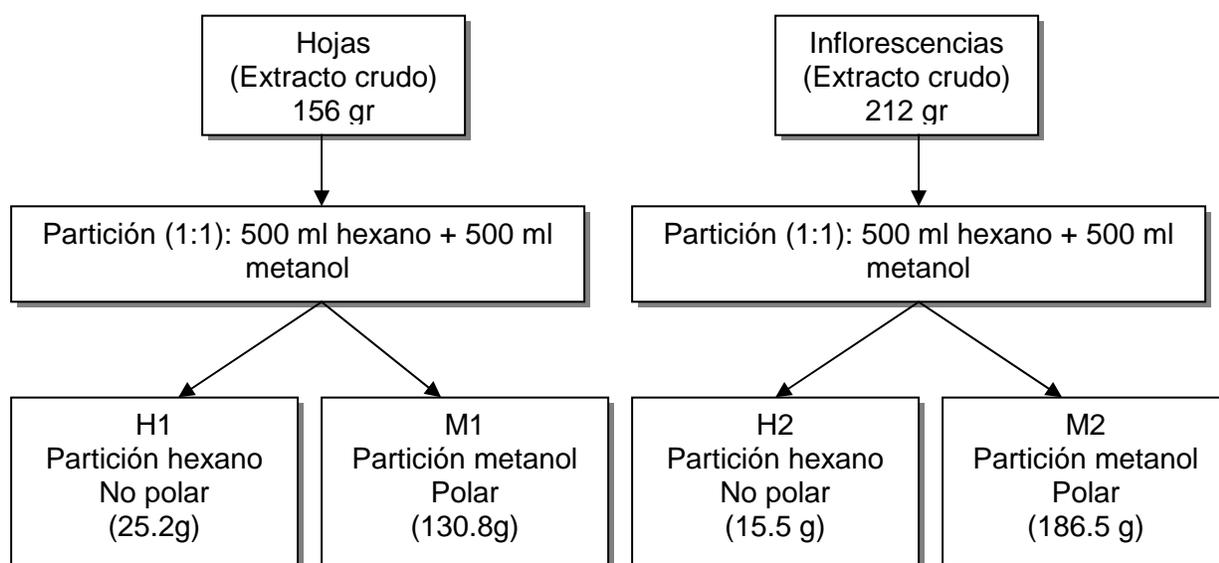


Figura 4. Obtención de los extractos de hojas e inflorescencias (M1 y M2).

## Fase II. Bioensayos preliminares de hojas e inflorescencias.

### 2. Evaluación de la actividad antibacteriana de los extractos (M1 Y M2).

#### 2.1 Evaluación cualitativa de la actividad antibacteriana.

La actividad antibacteriana se evaluó de acuerdo con el método de difusión en agar Kirby-Baüer (Van der Berghe y Vlietinck, 1991) (apéndice 1). Como control positivo se utilizaron sensidiscos de cloramfenicol (25 µg por disco). Los discos fueron impregnados con 2 mg del compuesto o extracto a evaluar. Como controles negativos se utilizaron sensidiscos con cada uno de los solventes empleados para evitar errores en los resultados y comprobar que los solventes no tienen ningún efecto sobre los microorganismos, dejando evaporar el solvente por 12 horas. Todos los bioensayos se realizaron por triplicado.

### 2.1.2. Evaluación cuantitativa de la actividad antibacteriana.

Para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la Concentración Bactericida Mínima (CBM) de los compuestos puros, se utilizó la microtécnica de dilución en caldo reportada por Jones et al., 1987 modificada por Hernández, 2004 (Apéndice 2). Las concentraciones que se evaluaron fueron 0.125, 0.25, 0.50, 0.75, 1.00, 1.50 y 2.00 mg/mL. Todos los bioensayos se realizaron por triplicado.

### 2.1.3. Bacterias utilizadas en los bioensayos.

En los ensayos se utilizaron 4 cepas bacterianas Gram-positivas y 8 cepas Gram-negativas, las cuales se muestran en el cuadro 1.

**Cuadro 4. Bacterias utilizadas en los bioensayos.**

BACTERIAS	GRAM
<i>Vibrio cholerae</i> No-01 <sup>a</sup>	-
<i>Vibrio cholerae</i> INDRE 206 <sup>b*</sup>	-
<i>Vibrio cholerae</i> aislada de un caso clínico	-
<i>Vibrio cholerae</i> CDC V12 <sup>*</sup>	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 <sup>b</sup>	-
<i>Enterobacter agglomerans</i> ATCC 27155 <sup>b</sup>	-
<i>Enterobacter aerogenes</i> <sup>b</sup>	-
<i>Salmonella typhi</i> ATCC 19430 <sup>c</sup>	-
<i>Yersinia enterocolitica</i> <sup>b</sup>	-
<i>Bacillus subtilis</i> <sup>c</sup>	+
<i>Sarcina lutea</i> <sup>c</sup>	+
<i>Staphylococcus aureus</i> ATTCC 12938 <sup>c</sup>	+
<i>Staphylococcus epidermidis</i> <sup>c</sup>	+

\*Aisladas de agua contaminada.

<sup>a</sup> aislada de un caso clínico (estas cepas corresponden al grupo 01, productor de enterotoxinas, serotipo Inaba).

<sup>b</sup> Donadas por el laboratorio de Análisis Clínicos de la CUSI de la FES Iztacala.

<sup>c</sup> Donada por el laboratorio de Microbiología de la FES Cuautitlán.

### 3. Evaluación antifúngica de los extractos metanólicos (M1 Y M2).

#### 3.1 Evaluación cualitativa antifúngica.

Se evaluó la actividad antifúngica de manera cualitativa por el método de inhibición del crecimiento radical del micelio. Se utilizaron como controles negativos sensidiscos con 10 µl del solvente empleado, como controles positivos sensidiscos con 7 µg de ketoconazol; El ensayo se llevó a cabo mediante el método de inhibición del crecimiento radial reportado por (Wang y Bun, 2002) (Apéndice 3). Cada bioensayo se realizó por triplicado.

#### 3.1.2 Evaluación cuantitativa antifúngica.

Para el análisis cualitativo se utilizó la técnica de difusión en agar (Apéndice 4) modificado por Ávila (1996) evaluando las concentraciones 2.00, 1.50, 1.00, 0.75, 0.50, 0.25, 0.125 mg/ml y usando como control positivo ketoconazol 7 µg/sensidisco.

#### 3.1.3 Cepas de hongos utilizados en los bioensayos.

Para los ensayos se utilizaron 5 cepas de hongos y una levadura, los cuales se muestran en el cuadro 5.

**Cuadro 5. Cepas de hongos.**

HONGOS
<i>Aspergillus niger</i> <sup>c</sup>
<i>Trichophyton mentagrophytes</i> <sup>c</sup>
<i>Fusarium sporotrichum</i> <sup>c</sup>
<i>Fusarium moniliforme</i> <sup>c</sup>
<i>Rhizoctonia solani</i> <sup>D</sup>
<i>Candida albicans</i> <sup>cd</sup>

<sup>c</sup> Donada por el laboratorio de fisiología vegetal.

<sup>cd</sup> Levadura.

### **Fase III. Aislamiento de los compuestos puros, determinación de la actividad antibacteriana, antifúngica y elucidación de la estructura química.**

El fraccionamiento primario se realizó únicamente a los 2 extractos metanólicos los cuales manifestaron actividad antibacteriana y antifúngica:

- Extracto MeOH de hojas (M1)
- Extracto MeOH de inflorescencias (M2)

#### **4. Métodos cromatográficos.**

Para la separación y el aislamiento del principio activo se utilizaron técnicas cromatográficas de columna y de placa fina, se usó como criterio de separación la actividad biológica. Para las cromatografías en columna se utilizó sílice 60 F<sub>254</sub> Merck (tamaño de partícula 0.063-0.200 mm, malla 70-230 ASTM) como fase estacionaria y como fase móvil se utilizó un gradiente de polaridad (empezando con hexano 100% y finalizando con metanol al 100%); para el análisis cualitativo en cromatografía en placa fina (ccf) se utilizaron cromatofolios de gel de sílice Merck (Kieselgel 60), la cromatografía en capa fina (ccf) permitió verificar el desarrollo de las cromatografías en columna abierta y comprobar la pureza de los compuestos obtenidos. Para la cromatografía en capa fina (ccf) se utilizaron placas de 20 x 20 Merck, gel de sílice 60 F<sub>254</sub> y la visualización de los componentes se hizo por fluorescencia con luz UV a dos longitudes de onda:  $\lambda = 254$  nm y  $\lambda = 366$  nm, para el aislamiento, la purificación y caracterización de él (o los) compuesto (s) puros obtenidos de cada parte aérea de la planta, las placas de ccf además fueron reveladas con una solución de sulfato cérico y posterior calentamiento sobre una placa calefactora a 100 °C durante dos minutos.

Posterior a las particiones descritas, se utilizaron técnicas cromatográficas de columna y placa fina, separando únicamente aquellas fracciones y/o compuestos que presentaron actividad antibacteriana y antifúngica (estudio biodirigido).

#### 4.1. Fraccionamiento del extracto metanólico de hojas (M1).

49 gr del extracto metanólico de hojas (M1) se fraccionaron en una columna cromatográfica abierta, utilizando como adsorbente 300 g de sílica gel. La columna se comenzó a correr con hexano al 100% y fue aumentando la polaridad en proporción de 10% con un gradiente de polaridad en la mayoría de los casos, hasta terminar con metanol al 100%. Se colectaron 388 fracciones de 250 ml cada una. Cada fracción se analizó por ccf y se juntaron todas aquellas por similitud cromatográfica, lo cual originó 15 fracciones indicadas en el cuadro 6; donde se logró aislar un compuesto que posteriormente se purificó (Compuesto 1).

**Cuadro 6. Fraccionamiento del extracto metanólico de hojas (M1).**

Eluyente	Proporción (%)	Fracciones reunidas	Clave de la fracción	Compuestos aislados
Hexano	100	1-24	H-1	
Hex-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	9:1	25-54	H-2	
Hex-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	8:2	55-70	H-3	
Hex-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	7:3	71-101	H-4	
Hex-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	6:4	102-134	H-5	
Hex-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	5:5	135-174	H-6	
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> - Hex	6:4	175-178	H-7	
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> - Hex	7:3	179-188	H-8	
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> - Hex	8:2	189-217	H-9	
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> - Hex	9:1	218-226	H-10	
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	100	227-246	H-11	Compuesto 1
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -AcOet	9:1	247-252	H-12	
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -AcOet	7:3	253-272	H-13	
AcOet -CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	9:1	273-300	H-14	
MeOH	100	301-305	H-15	

De la fracción H-11 rindió un peso de 0.7288 g, donde cristalizó una sustancia que se sometió a un proceso de purificación, mediante una cromatografía en capa fina preparativa, corrida con diferentes solventes. Esto permitió la purificación del compuesto el cual presentó las siguientes características (cuadro 7).

Se aisló un compuesto blanco cristalino con p.f 145-148°C, soluble en diclorometano, el cual mostró una sola mancha de color morado intenso en UV ( $\lambda_{\text{max}}=366$  nm); posteriormente se realizaron los estudios de UV, IR, RMN  $^1\text{H}$ , RMN  $^{13}\text{C}$ , para determinar la estructura química del compuesto (ver apéndice 6), los cuales no fueron suficientes para elucidar su estructura química.

**Cuadro 7. Características físicas del compuesto 1 aislado del extracto metanólico de hojas (M1).**

Características físicas	Rendimiento*		Fluorescencia (UV $\lambda_{\text{max}}=366$ nm)	Punto de Fusión ( $^{\circ}\text{C}$ )
	(g)	%		
Se obtuvo un compuesto blanco cristalino con la capacidad de formar estructuras rectangulares alargadas perfectamente definidas.	0.7288	0.467	Morado intenso	145-148 $^{\circ}\text{C}$

\*Referido a 156 g del extracto metanólico.

#### 4.1.2. Fraccionamiento del extracto metanólico de inflorescencias (M2).

55 gr de extracto metanólico de inflorescencias (M2) se fraccionaron en una columna cromatográfica, utilizando como adsorbente 350 g de sílica gel. El proceso de elución se realizó con hexano al 100%, y fue aumentando la polaridad en proporción de 10% MeOH, hasta terminar al 100%. Se colectaron 305 fracciones de 250 ml cada una. Cada fracción se analizó por ccf y se juntaron todas aquellas por similitud cromatográfica, lo cual originó 22 fracciones indicadas en la cuadro 8. Del fraccionamiento se obtuvieron dos sustancias, de la fracción F-11 se aisló una sustancia a la que se le realizó un análisis elemental resultando ser el compuesto 1 aislado de M1, y de la fracción F-13 cristalizó una sustancia (compuesto 2), en el cuadro 9 se describen sus características físicas; estas dos sustancias se purificaron mediante cromatografía en ccf preparativa, y se les determinaron sus propiedades físicas. Al compuesto 2 se le realizaron los estudios de UV, IR, RMN $^1\text{H}$ , RMN  $^{13}\text{C}$ , para determinar la estructura (Espectros: 11, 12, 13, 14, 15, 16).

**Cuadro 8. Fraccionamiento del extracto metanólico de inflorescencias (M2).**

<i>Eluyente</i>	<i>Proporción %</i>	<i>Fracciones reunidas</i>	<i>Clave de la fracción</i>	<i>Compuestos aislados</i>	
Hexano	100	1-32	F-1		
Hex-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	9:1	33-37	F-2		
Hex-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	8:2	38-44	F-3		
Hex-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	7:3	45-53	F-4		
Hex-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	6:4	54-65	F-5		
Hex-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	5:5	66-74	F-6		
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> - Hex	6:4	75-79	F-7		
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> - Hex	7:3	80-86	F-8		
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> - Hex	8:2	87-90	F-9		
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> - Hex	9:1	91-106	F-10		Compuesto 1
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	100	107-115	F-11		
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -AcOet	9:1	116-140	F-12		
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -AcOet	8:2	141-169	F-13		
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -AcOet	7:3	170-223	F-14		Compuesto 2
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -AcOet	6:4	224-255	F-15		
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -AcOet	5:5	256-284	F-16		
AcOet- MeOH	6:4	285-310	F-17		
AcOet -MeOH	7:3	311-364	F-18		
AcOet - MeOH	8:2	365-382	F-19		
AcOet - MeOH	9:1	383-388	F-20		
MeOH	100	389-421	F-21		

**Cuadro 9. Características físicas de los compuestos 2 aislados del extracto metanólico de inflorescencias (M2).**

Fracción	Rendimiento*		Fluorescencia (UV $\lambda_{\text{ex}}=366$ nm)	Punto de Fusión (° C)	Características físicas
	(g)	%			
F-10	0.7983	0.376	Mancha morado intenso	145-148 °C	Compuesto blanco cristalino
F-14	1.6254	0.766	Mancha azul intensa	115-119 °C	Cristales finos en forma de agujas, color blanco

\* Referido a 212 g del extracto metanólico de inflorescencias.

## **5. Evaluación de la actividad antibacteriana de los compuestos puros.**

### **5.1. Evaluación cualitativa de la actividad antibacteriana.**

La actividad antibacteriana de los dos compuestos puros medida cualitativamente se determinó utilizando los mismos métodos descritos en la fase anterior para los extractos metanólicos

#### **5.1.2. Evaluación cuantitativa de la actividad antibacteriana.**

La evaluación cuantitativa de la actividad antibacteriana de los dos compuestos puros se determinó utilizando los mismos métodos descritos en la fase anterior para los extractos metanólicos.

## **6. Evaluación antifúngica de los compuestos puros.**

### **6.1. Evaluación cualitativa de la actividad antifúngica.**

La evaluación cualitativa de la actividad antifúngica de los dos compuestos puros se determinó utilizando los mismos métodos descritos en la fase anterior para los extractos metanólicos.

#### **6.1.2. Evaluación cuantitativa de la actividad antifúngica.**

La evaluación cuantitativa de la actividad antifúngica de los dos compuestos puros se determinó utilizando los mismos métodos descritos en la fase anterior para los extractos metanólicos

## **7. Curva de supervivencia y efecto sobre el crecimiento bacteriano.**

La curva de supervivencia y el efecto sobre el crecimiento de las bacterias expuestas al compuesto con mayor actividad, se realizó de acuerdo al método propuesto por Kubo y colaboradores (Kubo *et al.*, 1993; citado en Ávila, 1996). La cepa bacteriana utilizada fue *Vibrio cholerae* aislada de un caso clínico. Las concentraciones empleadas fueron las obtenidas para  $\frac{1}{2}$  MIC, MIC Y CBM (Apéndice 4).

## 8. Análisis estadístico.

A los resultados obtenidos para los bioensayos de la actividad antibacteriana, se les realizó un análisis multifactorial (ANOVA), siendo los factores: a) compuestos aislados; b) bacteria (Gram-negativas), c) la interacción compuesto-bacteria. Se realizó para los extractos metanólicos como para los compuestos aislados.

## 9. Elucidación de los principios activos.

Para la determinación de la estructura química de los compuestos aislados, se utilizaron diferentes técnicas espectroscopias: espectrometría de masas, espectroscopía de IR, UV, resonancia magnética nuclear de protones (RMN<sup>1</sup>H) y resonancia magnética nuclear de carbono trece (RMN<sup>13</sup>C).

Para determinar el punto de fusión se utilizó un equipo Fisher-Jones (0-300° C). los espectros de Infrarrojo se obtubieron en un aparato de rejilla Perkin-Elmer modelo 599B y en un aparato Nicolet FT-5X, en pastilla de KBr.

Los espectros de resonancia magnética nuclear protónica (RMN<sup>1</sup>H) y de carbono-13 (RMN<sup>13</sup>C) fueron obtenidos en un equipo Varian Unity VXR-200s Y Jeol eclipse 300, los cuales se operaron a una frecuencia de 200 MHz respectivamente. Los espectros se obtuvieron usando cloroformo como disolvente. Los desplazamientos químicos se expresan en unidades de ppm ( $\delta$ ) con respecto al tetrametilsilano (TMS) que se usó como referencia interna.

Los espectros de ultravioleta se realizaron en un espectrofotómetro PerKin Elmer lambda 2S UV/VIS.

El espectro de masas se evaluó en un controlador de inserción directa Finnigan MAT modelo GCQ, una corriente inicial de 0 mA, manteniendo estas condiciones durante 30 segundos y despues aumento a 1000 mA. Rampa de corriente de 100 mA/segundo, manteniendo así por 30 segundos.

## RESULTADOS Y ANALISIS

### Fase I. Estudio Fitoquímico.

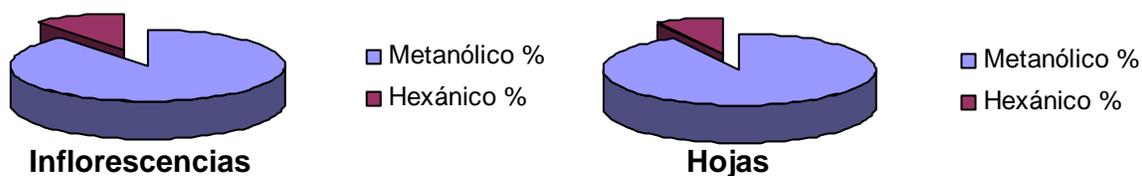
#### 1. Extracción.

Los rendimientos de los extractos metanólicos y hexánico de la parte aérea de la planta y solvente se muestran en la cuadro 10 y figura 5. Se observa que en ambos casos el mayor rendimiento con relación al peso seco de la planta lo presentan los extractos metanólicos destacando el de inflorescencias en donde se tuvo un rendimiento de 21.2%. Esto indica que en su mayoría la parte aérea de la planta está compuesta principalmente por compuestos polares los cuales fueron extraídos por el metanol.

**Cuadro 10. Rendimiento de los extractos de la parte aérea de *Tagetes lucida*.**

Rendimientos*				
	Metanol		Hexano	
	(g)	%	(g)	%
<b>Inflorescencias</b>	212	21.2	25.2	2.52
<b>Hojas</b>	156	17.60	15.5	1.55

\* Referidos a 1 Kg de hojas e inflorescencias de la planta.



**Figura 5. Rendimiento de los extractos de la parte aérea de *Tagetes lucida*.**

## 2. Bioensayos preliminares de los extractos metanólicos M1 y M2.

### 2.1 Evaluación cualitativa de la actividad antibacteriana.

De los extractos metanólicos de hojas (M1) e inflorescencias (M2), los datos obtenidos en los bioensayos mostraron que éstos presentaron actividad antibacteriana; El extracto (M2) fue el que presentó una mayor actividad frente a 9 de las catorce cepas usadas (siendo 4 Gram-negativas, 3 Gram-positivas y una levadura), además fue el que obtuvo los valores más grandes de halos de inhibición. En cuanto al extracto metanólico de hojas (M1), este fue activo frente a 3 cepas bacterianas y una levadura (3 Gram-negativas y una levadura), observándose para ambos casos que las bacterias Gram-negativas son las más sensibles. Los resultados se muestran en el cuadro 11, figuras 6 y 7.

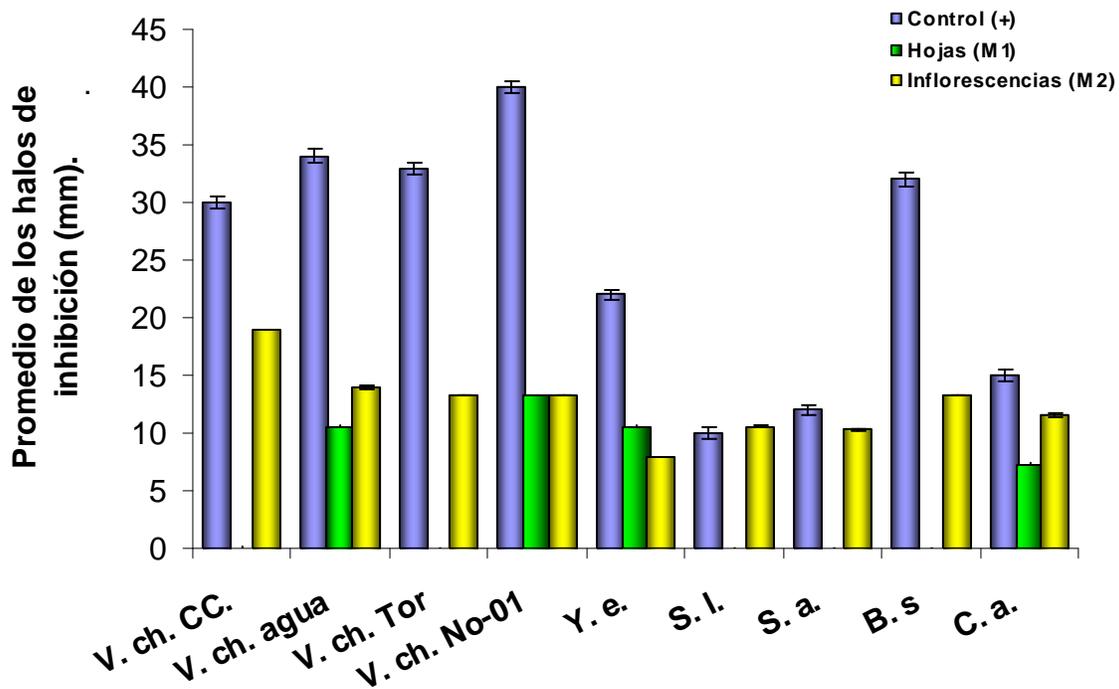
**Cuadro 11. Actividad antibacteriana de los extractos metanólicos de M1 y M2 de *Tagetes Lucida*.**

Bacteria	Halos de inhibición (mm)		
	Cloramfenicol	M1	M2
<i>Vibrio cholerae</i> . CC.	30.0 ± 0.50	-	19.0 ± 0.0
<i>Vibrio cholerae</i> agua	34.0 ± 0.58	10.6 ± 0.5	14.0 ± 0.5
<i>Vibrio cholerae</i> Tor	33.0 ± 0.50	-	13.3 ± 0.5
<i>Vibrio cholerae</i> No-01	40.0 ± 0.50	13.3 ± 0.6	13.3 ± 0.6
<i>Yersinia enterocolitica</i>	22.0 ± 0.50	10.6 ± 0.5	8.0 ± 0.0
<i>Salmonella tify</i> ATCC19430	20.0 ± 0.50	-	-
<i>Escherichia coli</i> ATTC 25922	18.5 ± 0.50	-	-
<i>Enterobacter agglomerans</i>	21.0 ± 0.58	-	-
<i>Enterobacter aerogenes</i>	18.0 ± 0.50	-	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	16.0 ± 0.50	-	-
<i>Sarcina lutea</i>	10.0 ± 0.50	-	10.6 ± 1.1
<i>Staphylococcus aureus</i>	12.0 ± 0.50	-	10.3 ± 0.6
<i>Bacillus subtilis</i>	32.0 ± 0.58	-	13.3 ± 0.6
<i>Candida albicans</i>	15.0 ± 0.50	7.3 ± 0.5	11.6 ± 1.1

Se utilizó una concentración de 2 mg por sensidisco, cada ensayo se hizo por triplicado. No hubo inhibición del crecimiento (-).

El control positivo consistió en sensidiscos de cloramfenicol 25 µl, para el caso de *Candida albicans* el control positivo consistió en sensidiscos de Ketaconazol 7 µg/sensidisco.

En la figura 6 se muestran los promedios de los halos de inhibición de los extractos metanólicos de hojas (M1) e inflorescencias (M2) frente a las cepas en las que mostraron actividad. Se puede observar que el extracto M2 fue significativamente más activo con respecto al extracto metanólico (M1) en contra de las bacterias *Vibrio cholerae* en especial la cepa aislada de un caso clínico (productor de enterotoxinas “serotipo Inaba”), además de presentar actividad frente a tres bacterias Gram-positivas. El extracto metanólico de hojas (M1) sólo mostró actividad en 4 cepas bacterianas de las 14 cepas experimentales, siendo las Gram-negativas las más sensibles al igual que M2.

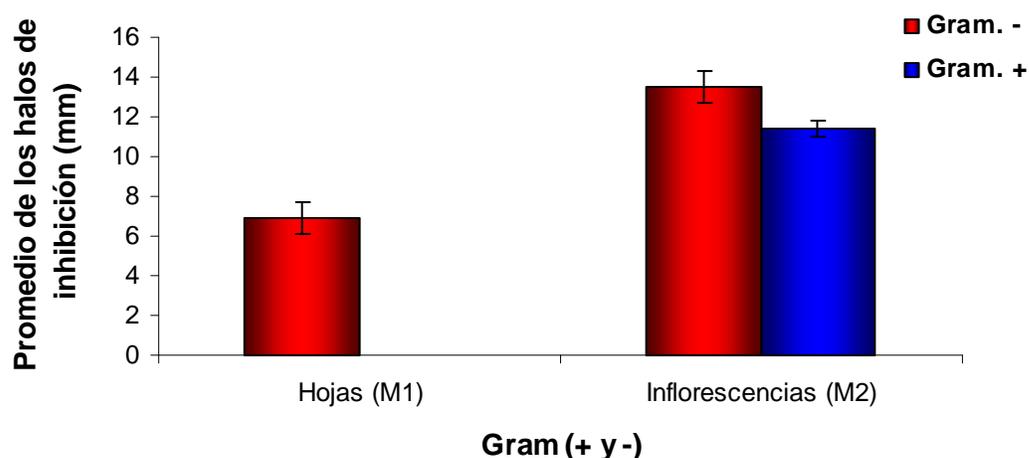


**Figura 6. Halos de inhibición de los extractos metanólicos de Hojas (M1) e inflorescencias (M2) de *Tagetes lucida*.**

A los resultados de los bioensayos se les realizó un análisis de varianza de dos factores, siendo éstos: extracto con 3 niveles (cloramfenicol, M1 y M2), y cepas con 11 niveles (ver cuadro 11), como lo muestra el cuadro 14 se puede afirmar que existe una diferencia significativa de la actividad de los extractos frente a las bacterias ( $p < 0.05$ ). Resultados (cuadro 12).

**Cuadro 12. Análisis de varianza de los extractos metanólicos (M1 y M2).**

ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Muestra	465.34	5	93.068	10.9224059	0.0003898	3.10587524
Columnas	115.281667	1	115.281667	13.5293888	0.00315903	4.74722534
Interacción	142.773333	5	28.5546667	3.35115892	0.03995861	3.10587524
Dentro del grupo	102.25	12	8.52083333			
Total	825.645	23				

**Figura 7. Halos de inhibición de los extractos metanólicos (M1 y M2) de *Tagetes lucida*.**

En la figura 6 se muestran los promedios de los halos de inhibición de los extractos (M1 y M2), frente al promedio de las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas en las cuales manifestaron actividad antibacteriana, donde se observa claramente que el extracto M2 fue más activo que el extracto M1, ya que M2 manifiesta los halos de inhibición más grandes frente a las bacterias Gram-negativas y también presentó actividad frente a bacterias Gram-positivas (*Sarcina lutea*, *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*), siendo las Gram-negativas las más sensibles para ambos casos. Para el caso de *Candida albicans* (figura 6), fue más sensible frente al extracto M2 ya que mostró los halos de inhibición más grandes.

## 2.2 Evaluación cuantitativa de la actividad antimicrobiana de los extractos metanólicos (M1 y M2).

A los dos extractos, que presentaron actividad antibacteriana medida cualitativamente se les determinaron los parámetros de CMI Y CBM. Los resultados se observan en el cuadro 13.

**Cuadro 13. Evaluación cuantitativa de la actividad antibacteriana de los extractos (M1 y M2).**

Bacteria	Testigo		Extracto (MeOH) (mg/ml)			
	Cloramfenicol (mg/ml)		Hojas (M1)		Inflorescencias (M2)	
	CMI	CBM	CMI	CBM	CMI	CBM
<i>Vibrio cholerae. cc.*</i>	0.001	0.002	NA	NA	0.5	1.0
<i>Vibrio cholerae agua*</i>	0.001	0.002	0.5	1.0	0.5	1.0
<i>Vibrio cholerae Tor*</i>	0.001	0.002	NA	NA	0.5	1.0
<i>Vibrio cholerae No-01*</i>	0.001	0.002	0.75	1.0	0.5	1.0
<i>Yersinia enterocolitica</i>	0.002	0.004	2.0	>2.0	2.0	>2.0
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.001	0.002	NA	NA	2.0	>2.0
<i>Bacillus subtilis</i>	0.002	0.004	NA	NA	2.0	>2.0
<i>Sarcina lutea</i>	0.001	0.002	NA	NA	2.0	>2.0
<i>Candida albicans</i>	ND	ND	2.0	>2.0	1.0	1.5

La CMI y la CBM están expresadas en mg/ml; los resultados son el promedio de tres experimentos. ND= indeterminado. \* Microorganismo más sensible. NA= no se determinó pues no presentó actividad.

Como se puede observar en el cuadro anterior las 4 cepas de *V. cholerae* presentaron una mayor sensibilidad frente a M2, ya que se requiere de 0.5 mg/ml para inhibir su crecimiento y de 1.0 mg/ml para obtener la CBM; Las cepas bacterianas más resistentes frente al extracto M2, fueron *Y. enterocolitica*, *B. subtilis*, *S. aureus* y *S. lutea*, que se requieren concentraciones mayores de 2.0 mg/ml para inhibir su crecimiento. Para el caso del extracto M1 las cepas más sensibles fueron 2 cepas de *Vibrio cholerae* (*V. agua* y *V. No-01*), donde la CMI que fue de 0.5 mg/ml y 0.75 mg/ml respectivamente; para este extracto (M1) las cepas más resistentes fueron *Y. enterocolitica* y *C. albicans* ya que para ambas se requieren de concentraciones mayores de 2.0 mg/ml para inhibir su crecimiento. Estos resultados muestran en general que el extracto metanólico M2 es el más activo ya

que muestra las CMI's más pequeñas, además de que las bacterias son más sensibles frente a éste, además de tener actividad frente algunas bacterias Gram-positivas en comparación con el extracto M1.

De acuerdo con los resultados de los bioensayos preliminares realizados a los dos extractos metanólicos de hojas e inflorescencias (M1 y M2), se procedió a la separación y purificación de los compuestos activos de ambos con la metodología y procedimientos anteriormente mencionados.

### **3. Bioensayos preliminares de los compuestos aislados.**

#### **3.1 Evaluación de la actividad antimicrobiana de los compuestos aislados.**

Una vez que se determinó la pureza de acuerdo con sus características físicas y sus datos espectroscópicos de los dos compuestos aislados, se procedió a evaluarles la actividad antibacteriana cualitativamente y cuantitativamente (Concentración Mínima Inhibitoria, Concentración Bactericida Mínima), así como la actividad antifúngica cualitativamente y cuantitativamente (CF<sub>50</sub> y CFM), al igual que con los extractos metanólicos, utilizando la metodología anteriormente mencionada.

#### **3.2 Evaluación cualitativa de la actividad antibacteriana de los compuestos activos.**

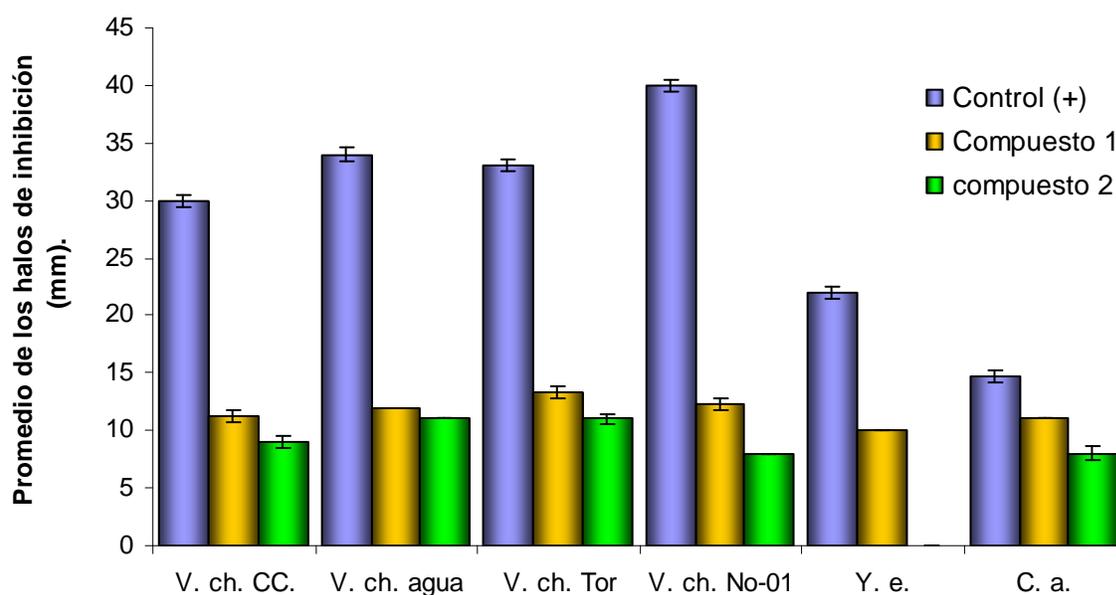
Los halos de inhibición de los compuestos puros aislados, se muestran en el cuadro 14 y figura 8.

Como se puede observar en el cuadro anterior tanto el compuesto 1 y compuesto 2 mostraron actividad antibacteriana, siendo el compuesto 1 el que presentó los mayores halos de inhibición frente a 6 cepas usadas (4 cepas *V. cholerae*, *Y. enterocolitica* y *C. albicans*); el compuesto 2 manifestó actividad frente a 5 cepas (4 cepas *V. cholerae* y *C. albicans*), se puede observar más claramente en la figura 8; en donde el compuesto 2 muestra los halos de inhibición más pequeños en todos los casos, además de no manifestar actividad frente a *Y. enterocolitica*.

**Cuadro 14. Evaluación cualitativa de la actividad antibacteriana de los compuestos aislados.**

Bacteria	Halo de inhibición (mm)		
	Cloramfenicol	*Compuesto 1	Compuesto 2
<i>Vibrio cholerae</i> . CC.	30.0 ± 0.50	11.3 ± 0.5	9.0 ± 0.5
<i>Vibrio cholerae</i> agua	34.0 ± 0.58	12.0 ± 0.0	11.0 ± 0.0
<i>Vibrio cholerae</i> Tor	33.0 ± 0.50	13.3 ± 0.5	11.0 ± 0.5
<i>Vibrio cholerae</i> No-01	40.0 ± 0.50	12.3 ± 1.5	8.0 ± 0.0
<i>Yersinia enterocolitica</i>	22.0 ± 0.50	10.0 ± 0.0	-
<i>Salmonella tiphy</i> ATCC19430	20.0 ± 0.50	-	-
<i>Escherichia coli</i> ATTC 25922	18.5 ± 0.50	-	-
<i>Enterobacter agglomerans</i>	21.0 ± 0.58	-	-
<i>Enterobacter aerogenes</i>	18.0 ± 0.50	-	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	16.0 ± 0.50	-	-
<i>Sarcina lutea</i>	10.0 ± 050	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	12.0 ± 0.50	-	-
<i>Bacillus subtilis</i>	32.0 ± 0.58	-	-
<i>Candida albicans</i>	15.0 ± 0.50	11 ± 0.0	8.0 ± 0.6

Se utilizó una concentración de 2 mg por sensidisco, cada ensayo se hizo por triplicado. No hubo inhibición del crecimiento (-). \* Compuesto aislado no se determino su estructura química. El control positivo consistió en sensidiscos de cloramfenicol 25 µl, para el caso de *Candida albicans* el control positivo consistió en sensidiscos de Ketaconazol 7 µg/sensidisco.



**Figura 8. Halos de inhibición de los compuestos activos de *Tagetes lucida*.**

A los resultados de estos bioensayos se les realizó un análisis de varianza de dos factores, siendo éstos: a) compuestos activos (Control positivo, Compuestos 1 y 2), y b) cepas con 6 niveles. Para verificar la existencia de diferencias significativas entre ellos. Los resultados obtenidos se pueden observar en el cuadro 15.

**Cuadro 15. Análisis de varianza de los compuestos activos.**

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Muestra	8	1	8	18.9349112	0.01214349	7.70864742
Columnas	14.045	1	14.045	33.2426036	0.0044908	7.70864742
Interacción	2	1	2	4.73372781	0.09519969	7.70864742
Dentro del grupo	1.69	4	0.4225			
Total	25.735	7				

El análisis estadístico bifactorial demostró que existen diferencias significativas con respecto a la sensibilidad de las diferentes cepas a los compuestos puros. Con base en los resultados mostrados en el cuadro 15 y como se observa en la figura 8, existen diferencias significativas entre la actividad antibacteriana de los dos compuestos aislados ( $P < 0.05$ ).

#### **4. Evaluación cuantitativa de la actividad antibacteriana de los compuestos aislados.**

Los resultados de la determinación de la CMI y CBM de los compuestos activos (1 y 2) se muestran en el cuadro 16. Donde se observa que las cepas de *V. cholerae* fueron las más sensibles frente al compuesto 1, ya que se necesita una concentración de 0.25 mg/ml para inhibir su crecimiento y 0.5 mg/ml para obtener la CBM, en contraste el compuesto 2 presentó una menor actividad sobre las cuatro cepas de *V. cholerae*, ya que necesita concentraciones más altas para obtener los efectos bacteriostático y bactericida, lo mismo se evidencia para el caso de la levadura *C. albicans*, en la cual se necesita de valores de 0.75 mg/ml para inhibir su crecimiento y valores de 2mg/ml para alcanzar la CBM. Ninguno de los dos compuestos aislados presentó actividad frente a las bacterias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* y *Sarcina lutea*).

**Cuadro 16. Concentración Mínima Inhibitoria y Concentración Bactericida Mínima de los compuestos activos.**

Bacteria	Testigo Cloramfenicol		Compuestos activos			
	CMI	CBM	*Compuesto 1		Compuesto 2	
	CMI	CBM	CMI	CBM	CMI	CBM
<i>Vibrio cholerae. CC.</i>	0.001	0.002	0.25	0.5	1.0	1.5
<i>Vibrio cholerae agua</i>	0.001	0.002	0.25	0.5	0.5	0.75
<i>Vibrio cholerae Tor</i>	0.001	0.002	0.25	0.5	0.5	1.0
<i>Vibrio cholerae No-01</i>	0.001	0.002	0.25	0.5	0.5	1.0
<i>Yersinia enterocolitica</i>	0.002	0.004	0.5	0.75	NA	NA
<i>Candida albicans</i>	ND	ND	0.5	0.75	0.75	2.0

La CMI y la CBM están expresadas en mg/ml; los resultados son el promedio de tres experimentos. ND= indeterminado. NA= no se determinó pues no presento actividad. \*Estructura no determinada.

Cabe mencionar que los resultados preliminares de la actividad antibacteriana evaluada cuantitativamente a los extractos metanólicos, guardan una relación con los resultados obtenidos cualitativa y cuantitativamente para el caso de los compuestos puros donde se evidencia que las cepas bacterianas más sensibles fueron las cuatro cepas de *Vibrio cholerae*.

En el cuadro 17 se observa que en la mayoría de las cepas sensibles (*Vibrio cholerae*) se necesitaron menores concentraciones del compuesto 1, a diferencia de los extractos M1, M2 y del compuesto 2, esto puede deberse que en los extractos metanólicos, el compuesto o los compuestos responsables de la actividad antimicrobiana estén menos concentrados, ya que en estos extractos existen un gran cantidad de sustancias químicas (ver apéndice 7), las cuales pueden presentar un sinergismo o antagonismo entre los diversos compuestos presentes en ambos extractos metanólicos; posiblemente por eso se requieren de concentraciones de 0.5 mg/ml para inhibir el crecimiento de las 4 cepas de *V. cholerae*. El extracto M2 manifiesta actividad frente a 9 cepas usadas, 5 Gram-negativas (*Vibrio cholerae cc.*, *Vibrio cholerae agua*, *Vibrio cholerae Tor*, *Vibrio cholerae No-01*, *Yersinia enterocolitica*), 3 Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* y *Sarcina lutea*) y una levadura *C. albicans*, por lo que tiene el mayor rango de actividad en comparación con el extracto M1, el cual solo manifiesta actividad frente a 4 cepas (*V. cholerae agua*, *V. cholerae No-01*, *Y. enterocolitica* y *C. albicans*) teniendo un menor rango de actividad. Las diferencias que se observan en las CMI para el caso de los compuestos 1 y 2, posiblemente se deba a sus

estructuras químicas las cuales sean diferentes, ya que las CMI para 3 cepas de *V. cholerae* (*Vibrio cholerae* *agua*, *Vibrio cholerae* *Tor* y *Vibrio cholerae* *No-01*) frente al compuesto 1, se requiere de 0.25 mg/ml para inhibir su crecimiento y para el compuesto 2 las CMI son del doble para lo lograr el mismo efecto (0.5 mg/ml) frente a las mismas cepas.

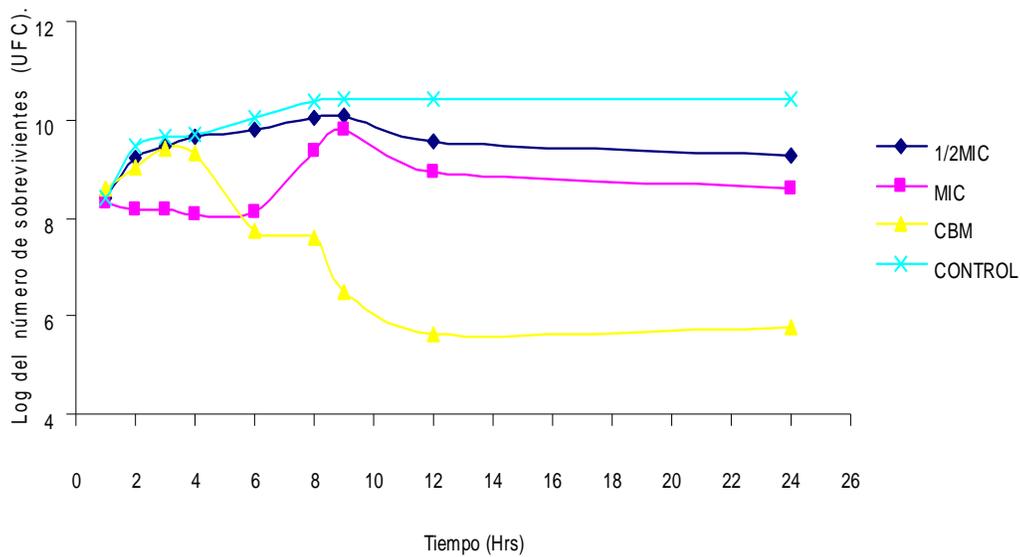
**Cuadro 17. Comparación entre la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de los extractos metanólicos y los compuestos activos de *Tagetes lucida*.**

Bacteria	CMI (mg/ml)			
	Extracto M1	Extracto M2	*Compuesto 1	Compuesto 2
<i>Vibrio cholerae</i> cc.	NA	0.5	0.25	1.0
<i>Vibrio cholerae</i> <i>agua</i>	0.5	0.5	0.25	0.5
<i>Vibrio cholerae</i> <i>Tor</i>	NA	0.5	0.25	0.5
<i>Vibrio cholerae</i> <i>No-01</i>	0.75	0.5	0.25	0.5
<i>Yersinia enterocolitica</i>	2.0	2.0	0.5	NA
<i>Candida albicans</i>	2.0	1.0	0.5	0.75
<i>Staphylococcus aureus</i>	NA	2.0	NA	NA
<i>Bacillus subtilis</i>	NA	2.0	NA	NA
<i>Sarcina lutea</i>	NA	2.0	NA	NA

\* Estructura no determinada. NA = no se determinó pues no presento actividad.

## 5. Curva de supervivencia sobre el efecto del crecimiento bacteriano.

Una vez establecidos los parámetros CMI y CBM se procedió a determinar el efecto del compuesto (1), con mayor actividad antimicrobiana sobre el crecimiento de una bacteria Gram-negativa. Esta bacteria se escogió debido a su sensibilidad al compuesto aislado y la importancia que tiene referente a los problemas gastrointestinales que genera (*Vibrio cholerae* aislada de un caso clínico, productora de enterotoxinas “serotipo Inaba”). Este bioensayo se realizó utilizando las concentraciones de 0.125 mg/ml (1/2 MIC), 0.25 mg/ml (MIC) y 0.5 mg/ml para la CBM. El compuesto 1 fue adicionado a cada cultivo experimental. Cada experimento se realizó por triplicado y se llevó a cabo de acuerdo a las condiciones descritas en la metodología (ver apéndice 5). El número de supervivientes se calculó mediante el método cuenta en placa.



**Figura 9. Efecto del compuesto 1 sobre la curva de crecimiento (*Vibrio cholerae* aislada de un caso clínico).**

En la figura 9 se muestra el efecto del compuesto 1 sobre la población de *Vibrio cholerae*. Este experimento mostró que el compuesto 1 a una concentración de  $\frac{1}{2}$  MIC (0.125 mg/ml) no hay una disminución significativa, tampoco a concentraciones mayores; es decir, a 0.25 mg/ml (MIC), el efecto que se tuvo tampoco fue significativo en cuanto a la disminución del crecimiento poblacional bacteriano. Donde sí se manifiesta un efecto significativo es a una concentración de 0.5 mg/ml (CBM) con la cual se observa un efecto bacteriostático (se mantiene la población con relación al tiempo de exposición al compuesto 1), Además de que a la concentración de 0.5 mg/ml manifiesta una curva de múltiples impactos (Dulbecco, 1990), en la cual antes de hacerse lineal se inclina cerca del origen, debido a que en cada microorganismo viable deben producirse varias alteraciones (impactos), los cuales dan origen a la inactivación del microorganismo. Para determinar el número de impactos necesarios para que se produzca la inactivación, se prolonga la zona lineal de la curva de supervivientes hasta su intersección que el eje de las ordenadas (extrapolando se observa que la cinética es de aproximadamente 12 impactos o de impactos múltiples para la cepa de *V. cholerae* aislada de un caso clínico).

## 6. Bioensayos preliminares de la actividad antifúngica.

### 6.1 Evaluación cualitativa de la actividad antifúngica de los extractos (M1, M2).

Los resultados de los bioensayos cualitativos sobre la actividad antifúngica de los extractos metanólicos de hojas e inflorescencias de *Tagetes lucida*, se muestran en el cuadro 18. Donde se observa que los dos extractos metanólicos de hojas (M1) e inflorescencias (M2), provocan inhibición del crecimiento radial sólo en una de las cinco especies de hongos filamentosos (*Aspergillus niger*).

**Cuadro 18. Actividad antifúngica de los extractos metanólicos de M1 y M2.**

Hongo	Control (+)	Extracto	
		Hojas (M1)	Inflorescencias (M2)
<i>Aspergillus niger</i>	+	+	+
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	+	-	-
<i>Fusarium sporotrichum</i>	+	-	-
<i>Fusarium moniliforme</i>	+	-	-
<i>Rhizoctonia solani</i>	+	-	-

Los extractos se evaluaron con una concentración de 2 mg/sensidisco. (-) No mostró actividad, (+), Si mostró actividad. Control (+), Ketaconazol 7 µg/sensidisco.

## 7. Evaluación cualitativa de la actividad antifúngica de los compuestos aislados.

Los resultados cualitativos de la actividad antifúngica de los compuestos aislados (1 y 2), se muestran en el cuadro 19, donde se observa que sólo el compuesto 2 provocó inhibición del crecimiento radial sobre uno de los cinco hongos filamentosos evaluados (*Aspergillus niger*).

**Cuadro 19. Actividad antifúngica de los compuestos aislados.**

Hongo	Compuestos		
	Control (+)	*Compuesto 1	Compuesto 2
<i>Aspergillus niger</i>	+	-	+
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	+	-	-
<i>Fusarium sporotrichum</i>	+	-	-
<i>Fusarium moniliforme</i>	+	-	-
<i>Rhizoctonia solani</i>	+	-	-

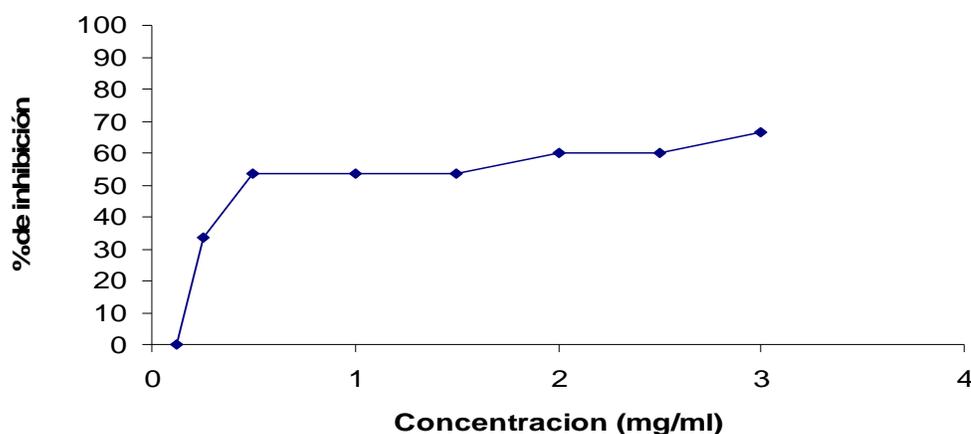
Los extractos se evaluaron con una concentración de 2 mg/sensidisco. Control (+) fue Ketaconazol 7 µg/sensidisco. Cada experimento se realizo por triplicado. (+) Activo, (-) No activo, \* Estructura no elucidada.

### 7.1. Evaluación cuantitativa de la actividad antifúngica del compuesto 2 activo.

Los resultados del porcentaje de inhibición del compuesto 2, se muestran en el cuadro 20 y figura 10.

**Cuadro 20. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial del compuesto 2 frente a *Aspergillus niger*.**

Concentración (mg/ml)	Hongo (%) <i>Aspergillus niger</i>
0.125	0.00 ± 0.00
0.25	33.33 ± 0.00
0.50	53.33 ± 0.10
1.0	53.33 ± 0.00
1.50	53.33 ± 0.00
2.0	60.00 ± 0.00
2.5	60.00 ± 0.00
3.0	66.00 ± 0.00



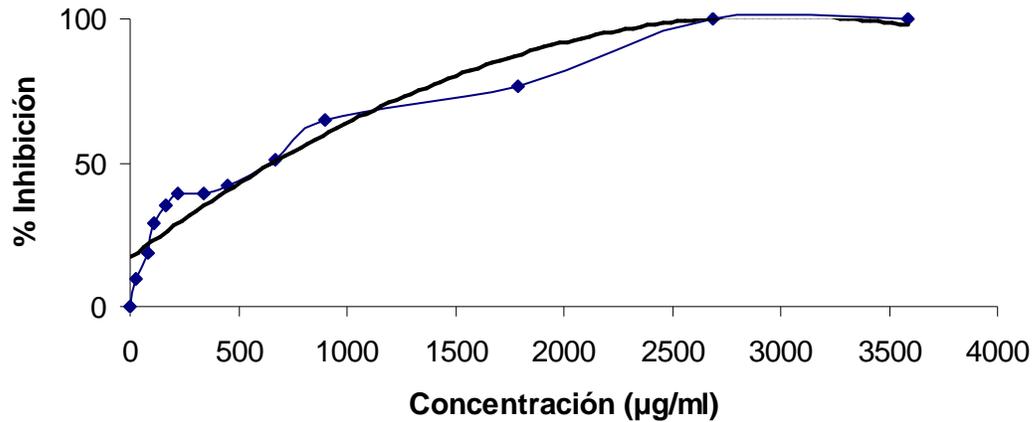
**Figura 10. Efecto del compuesto 2 sobre la inhibición del crecimiento radial de *A. niger*.**

Como se puede observar en el cuadro 20 así como en la figura 10, se requiere concentraciones mayores de (3.0 mg/ml) del compuesto 2 para alcanzar el 100% de inhibición, ya que con esta concentración sólo se alcanzó un 66.66% de inhibición, lo cual nos indica que este compuesto manifiesta una actividad fungistática. La CFM del compuesto aislado se encuentra a concentraciones mayores a 3.0 mg/ml y la CF<sub>50</sub> se presentó a una concentración de 1.02 mg/ml.

Los resultados mostrados para *Aspergillus niger* frente al control positivo (ketaconazol) cuadro 19 y figura 10, se observa que se necesita de una concentración de 2.6 mg/ml para alcanzar el 100% de inhibición, por consiguiente se puede decir que esta cepa es muy resistente, ya que requiere de concentraciones muy altas de este agente fungicida.

**Cuadro 21. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial de la Ketaconazol (control positivo) en *Aspergillus niger*.**

Concentración ( $\mu\text{g/ml}$ )	Hongo (%) <i>Aspergillus niger</i>
0	0 $\pm$ 0.00
28	10.00 $\pm$ 0.00
84	18.60 $\pm$ 0.00
112	28.68 $\pm$ 2.68
168	34.88 $\pm$ 0.00
224	39.53 $\pm$ 0.00
336	39.53 $\pm$ 0.00
448	41.86 $\pm$ 0.00
672	51.16 $\pm$ 0.00
896	65.11 $\pm$ 0.00
1792	76.74 $\pm$ 0.00
2688	100 $\pm$ 0.00
3584	100 $\pm$ 0.00



**Figura 11. Efecto del Ketaconazol sobre la inhibición del crecimiento radial de *A. niger*.**

Los resultados obtenidos para la determinación de la CF<sub>50</sub> y CFM se muestran en el cuadro 22, donde se observa que se requieren de concentraciones más altas, casi del doble (compuesto 2 [1.02 mg/ml]), para alcanzar el 50 % de inhibición sobre *Aspergillus niger* con respecto a las concentraciones que se requiere para el fungicida Ketaconazol (0.415 mg/ml), las cuales son mucho menores.

**Cuadro 22. CF<sub>50</sub> y CFM del compuesto 2 vs. Ketaconazol.**

Hongo	ketaconazol		Compuesto 2	
	CF <sub>50</sub> (µg/ml)	CFM (µg/ml)	CF <sub>50</sub> (mg/ml)	CFM (mg/ml)
<i>Aspergillus niger</i>	415.1	2688	1.02	> 3.0

CFM es definida como la más baja concentración proporcionando la completa inhibición del crecimiento micelial

## 8. Elucidación de las estructuras.

### 8.1 Elucidación de la estructura química del compuesto con actividad antifúngica (compuesto 2).

Para confirmar si la fracción activa estaba pura, se corrió una cromatografía en placa fina, usando como fase móvil diclorometano: AcOEt (9.5:0.5). Al observar bajo luz UV a 320 nm, se detectó una sola mancha, de forma ligeramente ovalada y que presentaba fluorescencia de color azul muy intenso. La placa al revelarse sólo apareció una mancha, esto indicó que el compuesto estaba puro (Domínguez, 1980).

Posteriormente se realizaron los siguientes estudios físicos y espectroscópicos: punto de fusión, espectro de absorción en el ultravioleta, resonancia magnética nuclear de protones (RMN<sup>1</sup>H), resonancia magnética nuclear de carbono 13 (RMN<sup>13</sup>C) e infrarrojo (IR).

En el cuadro 23 se muestran los datos de algunos parámetros evaluados del compuesto activo.

**Cuadro 23. Parámetros del compuesto activo puro obtenido de la planta *Tagetes lucida*.**

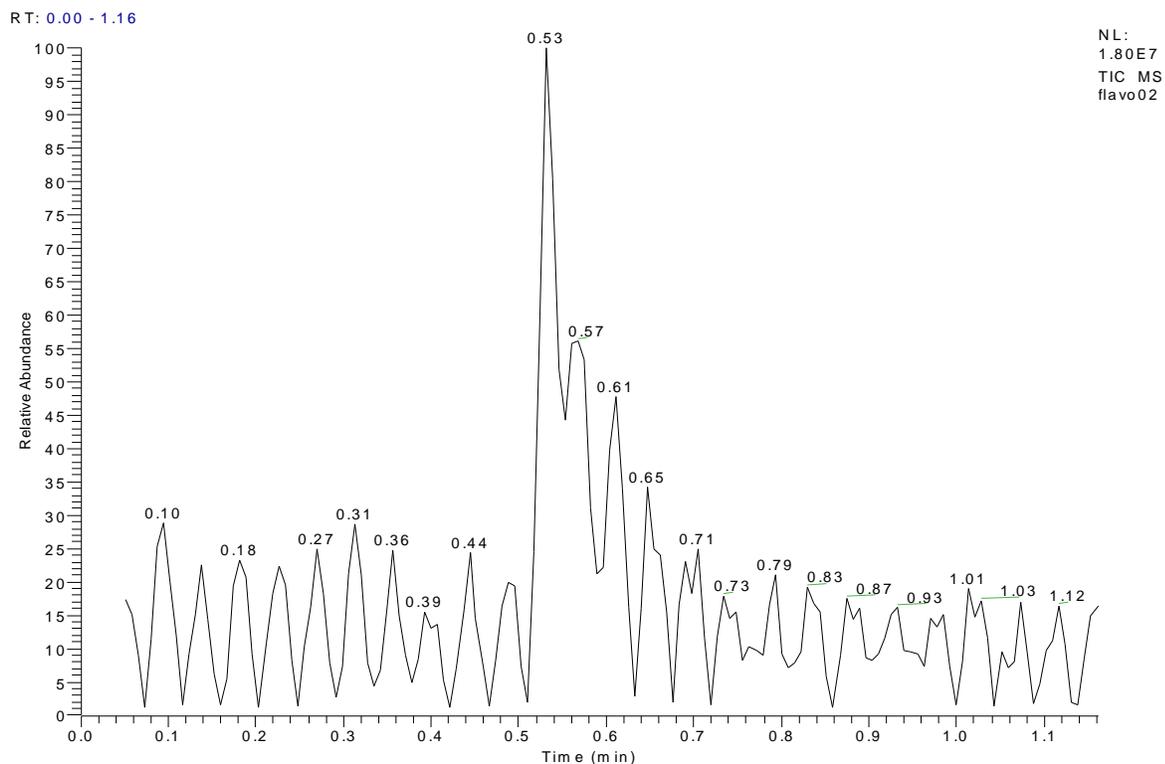
Rendimiento*	2.31g (0.231%)
Rf (CPF, Sílica gel 60 F 254 $\mu$ ; fase móvil cloroformo)	0.55
Fluorescencia UV 366 nm	Azul intenso
Punto de fusión	115-119 °C

\*Referidos a 1000 Kg de inflorescencias.

Como se observa en los resultados anteriores, el rendimiento que se tuvo del compuesto 2 es escaso pero suficiente para poder llevar a cabo los estudios de la bioactividad frente a las cepas experimentadas así como para realizar los estudios de espectrometría. Al correr el compuesto en ccf, con una fase móvil de cloroformo se determinó el Rf de 0.55, el color azul intenso observado bajo luz a 320 nm indicó que el compuesto posiblemente estaba formado por anillo aromático conjugado (cromóforo). Al evaluar el punto de fusión se observó que éste fue de 115-119 °C.

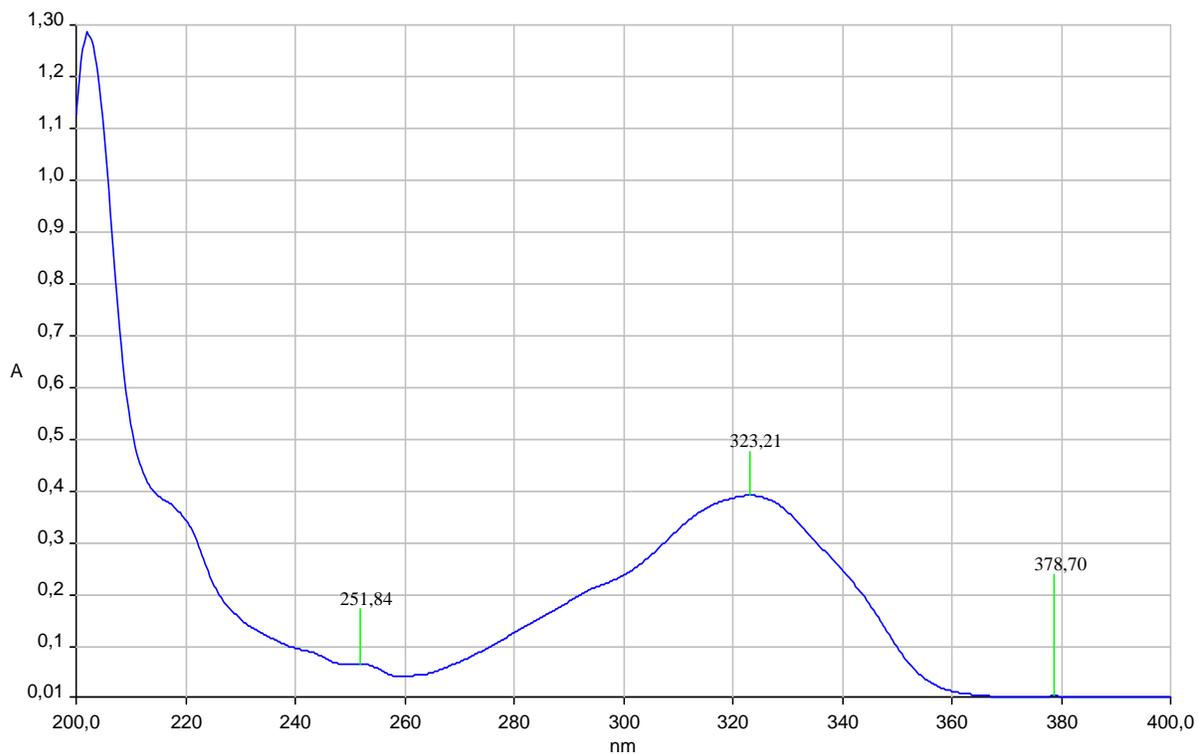
Lo anterior muestra que el compuesto tiene un grado de pureza aceptable. (Domínguez, 1999).

Los resultados obtenidos de los espectros son los siguientes:



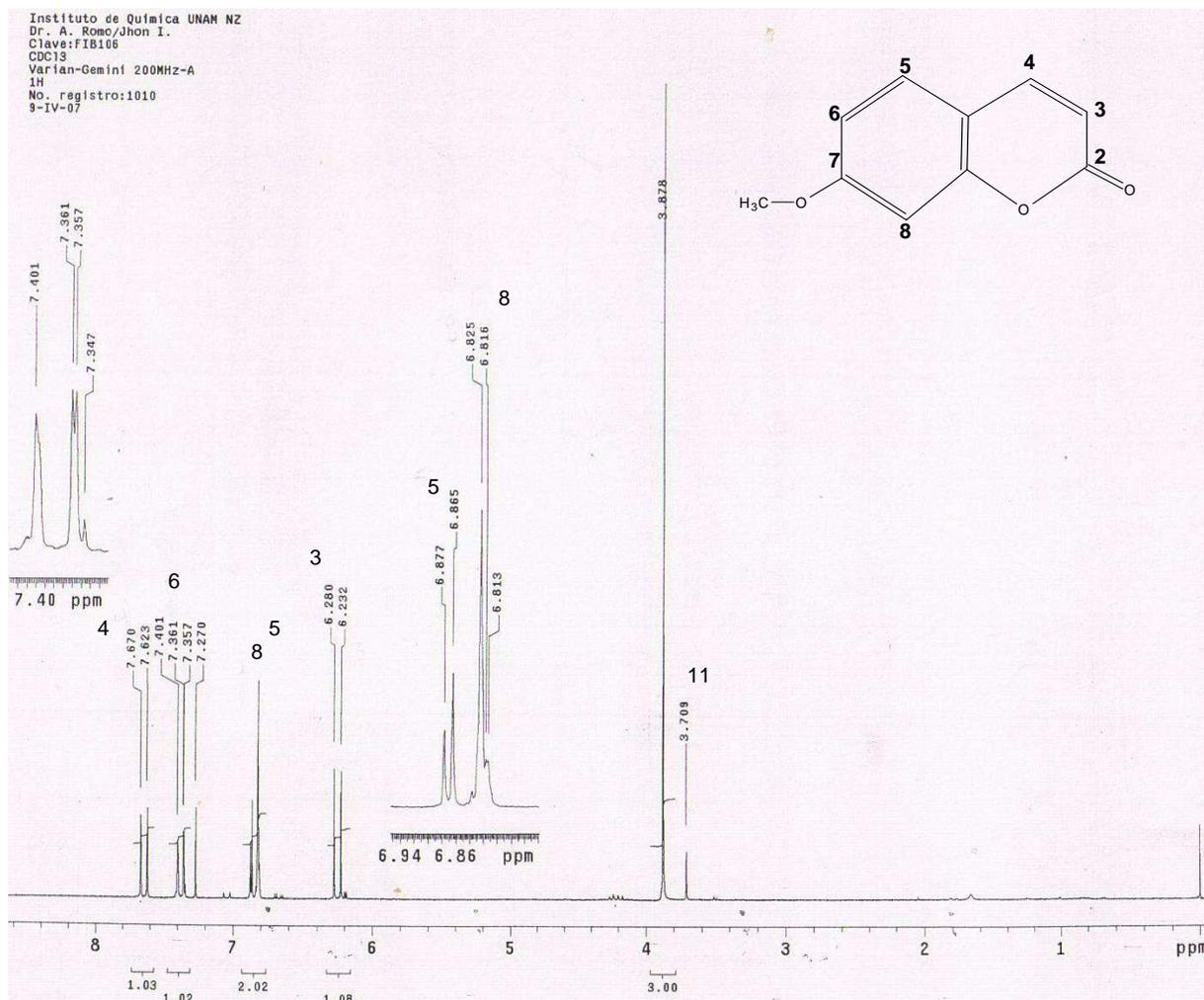
**Figura 12. Termograma del compuesto 2 con actividad antimicrobiana aislado de *Tagetes lucida*.**

En la figura 12 se muestra el termograma del compuesto 2 con actividad antibacteriana y antifúngica aislada de *Tagetes lucida*, en donde se observan algunas impurezas, las cuales no interfirieron en la elucidación de la estructura química.



**Figura 13. Espectro UV del compuesto 2 con actividad antimicrobiana aislado de *Tagetes lucida*.**

En el espectro de absorción de UV (figura 13), se observa un máximo de absorción en  $\lambda_{\text{Máx.}} = 323 \text{ nm}$ , lo cual sugirió que se trataba de un compuesto aromático, probablemente un cumarina pues éstas absorben a alrededor de 320 nm en luz ultravioleta (Murray, 1979; Harbone, 1989).



**Figura 14. Espectro de resonancia magnética nuclear de protones (RMN<sup>1</sup>H) Del compuesto 2 con actividad antimicrobiana aislado de *Tagetes lucida*.**

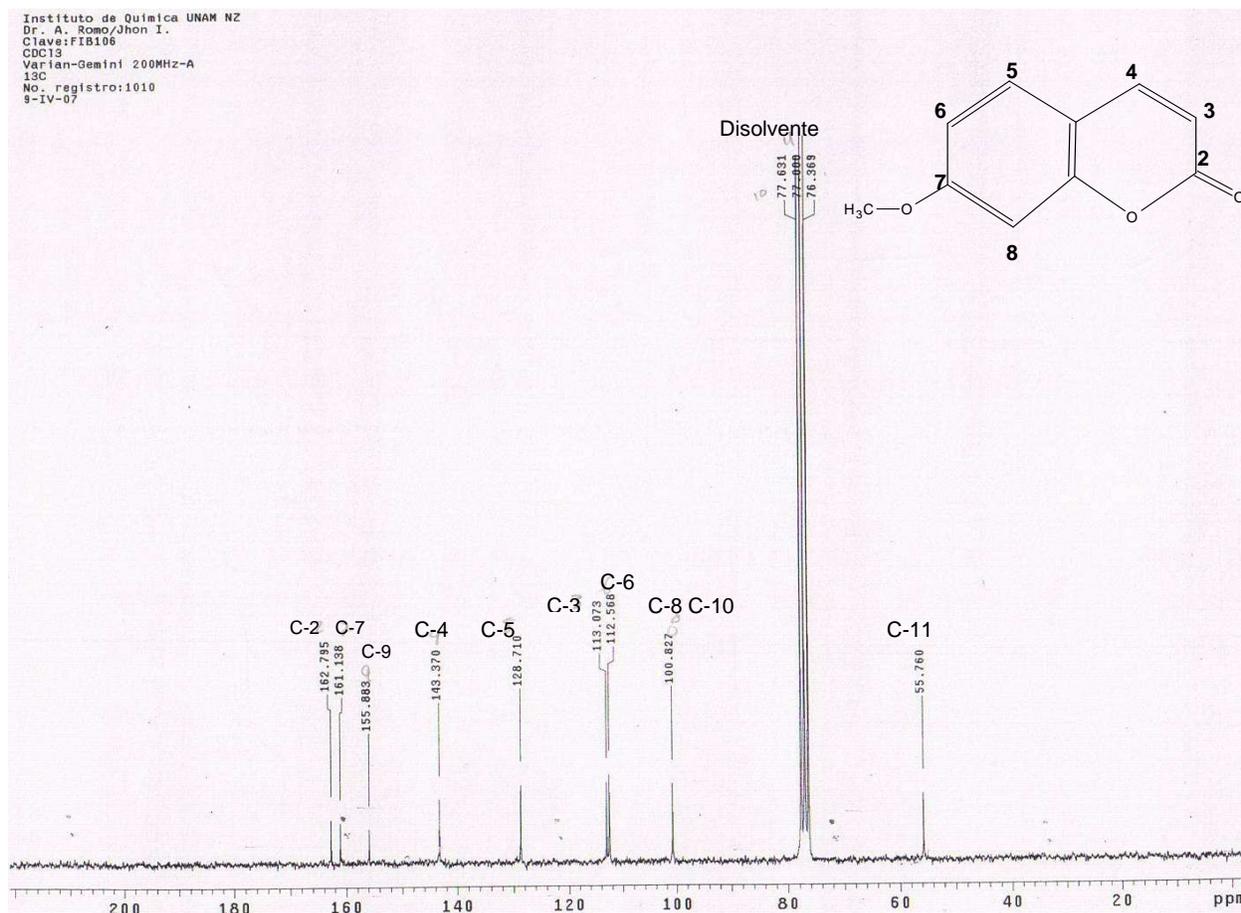
Es espectro de RMN<sup>1</sup>H (figura 14), se registró utilizando tetrametil-silano como referencia interna. En 3.709 ppm, se observa un singulete que integra para tres protones, característico de grupo metoxilo (CH<sub>3</sub>O-). En 6.256 ppm se tiene un doblete, señal del protón vinílico del hidrógeno del C-3. Entre 6.800 ppm a 6.945 ppm, se puede observar un multiplete que es el resultado de los protones de los hidrógenos de los carbonos C-5 y C-8, aunque el hidrógeno del C-5 es parte del anillo bencénico, su señal se separa de los hidrógenos de los carbonos seis y ocho, debido a que el oxígeno del grupo metoxilo tienen un efecto inductor y por lo tanto se desplaza a campo alto.

Finalmente en 7.335 ppm aparece la señal del protón del hidrógeno del C-6 que se observa como un doblete al igual que en 7.646 ppm señal del protón del hidrógeno del C-4, estos dos protones corresponden a señales de campos bajos puesto que son protones desprotegidos, por lo que presentan una densidad electrónica menor, ya que en el benceno los electrones  $\pi$  están deslocalizados alrededor del anillo y bajo la influencia de un campo magnético externo, estos electrones  $\pi$  son inducidos a circular alrededor del anillo, originando la denominada corriente de anillo que desprotege a los protones adyacentes a grupos atrayentes de electrones y por lo tanto llevar a resonancia a dichos protones requiere de un campo menor. Con los desplazamientos obtenidos, se realizó el cálculo de las constantes de acoplamiento ( $J$ ), obteniendo que los protones de los hidrógenos del C-5 Y C-8 están acoplados ya que ambos presentan una  $J = 10.4$ ; mientras que los protones de los hidrógenos del C-4 presenta una  $J = 9.4$  y el C-3 presenta un valor de  $J = 9.6$ . En el cuadro 24 se resumen todos los desplazamientos químicos y las asignaciones del espectro de RMN<sup>1</sup>H.

**Cuadro 24. Desplazamientos químicos observados en el espectro de RMN<sup>1</sup>H.**

Protón (asociado al carbono)	Desplazamiento (ppm)	Integración	Acoplamiento $J$	Multiplicidad	Grupo
3	6.256	1H	9.6	d	Vinílico
4	7.646	1H	9.4	d	Vinílico
6	7.335	1H	8.0	d	aromático
8 y 5	6.872	2H	10.4	d	aromático
11	3.709	3H		s	CH <sub>3</sub> O-

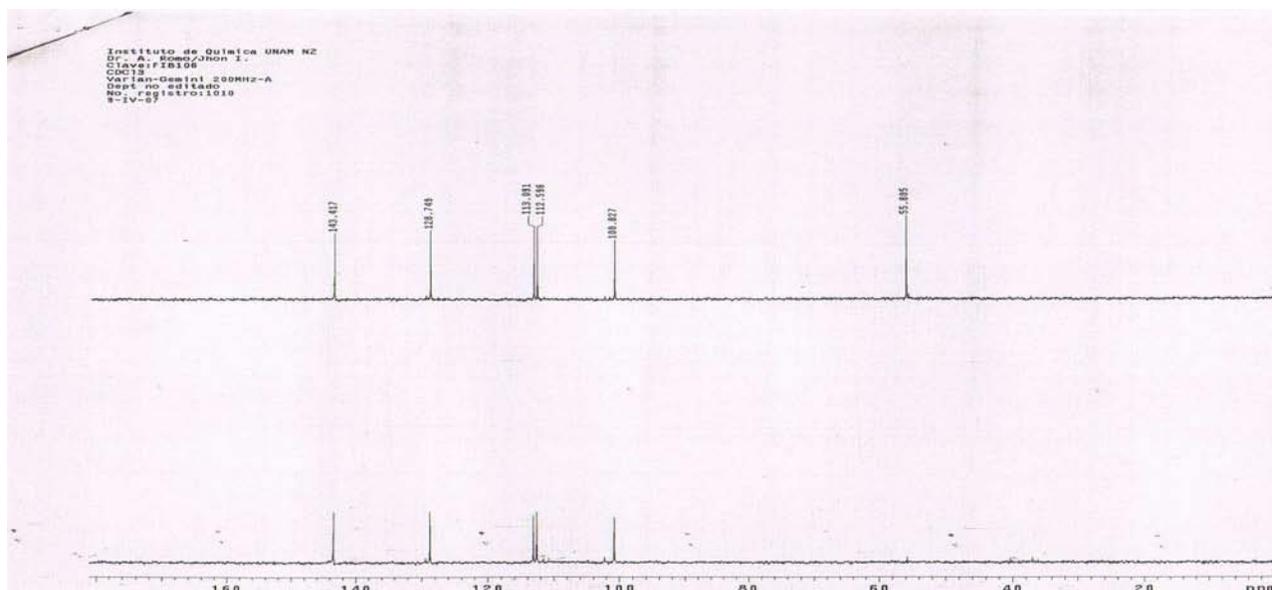
Los valores de los desplazamientos químicos de los protones en las posiciones de los carbonos 3, 4, 6, 5 y 8 son los promedios de los datos obtenidos en el espectro de RMN<sup>1</sup>H del compuesto 2.



**Figura 15. Espectro de resonancia magnética nuclear de carbono 13 (RMN<sup>13</sup>C) del compuesto 2 con actividad antimicrobiana aislado de *Tagetes lucida***

En cuanto al espectro de RMN<sup>13</sup>C del compuesto 2 (figura 15), se asignaron las señales a los carbonos según el modelo propuesto por Harbone, 1989. Como se puede observar en este espectro el compuesto está formado por diez átomos de carbono. Entre 76.369 a 77.000 ppm se localiza la señal del solvente utilizado (diclorometano); C-2 162.686 ppm, C-3 113.073 ppm, C-4 143.370 ppm, C-5 128.710 ppm, C-6 112.568 ppm, C-7 161.138 ppm, C-8 y C-10 100.827, C-9 155.883 ppm y C-11 55.760 ppm.

Para comprobar los datos anteriores se determinó la resonancia magnética nuclear de protones (DEPT) (figura 15) del compuesto 2, donde se observan los siguientes resultados: un grupo metoxilo (-OCH<sub>3</sub>) y cinco grupos metinos (CH).



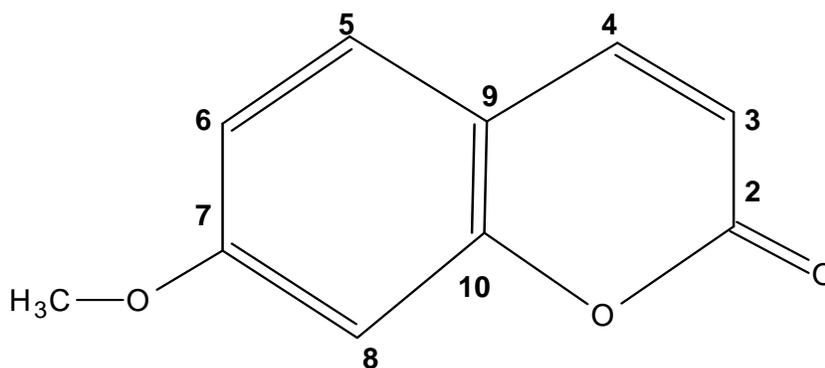
**Figura 16. Espectro de resonancia magnética nuclear de protones DEPT del compuesto 2 con actividad antimicrobiana aislado de *Tagetes lucida*.**

En el cuadro 25, se observan los desplazamientos químicos del espectro de RMN<sup>13</sup>C, donde puede observar que las diferencias entre las asignaciones de Harbone, 1989, las reportadas por Canales et, al., 2005 y las del espectro del compuesto 2 con actividad antimicrobiana aislado de *Tagetes lucida* son mínimas.

**Cuadro 25. Desplazamientos químicos del espectro de RMN<sup>13</sup>C y DEPT del compuesto 2 con actividad antimicrobiana aislado de *Tagetes lucida*.**

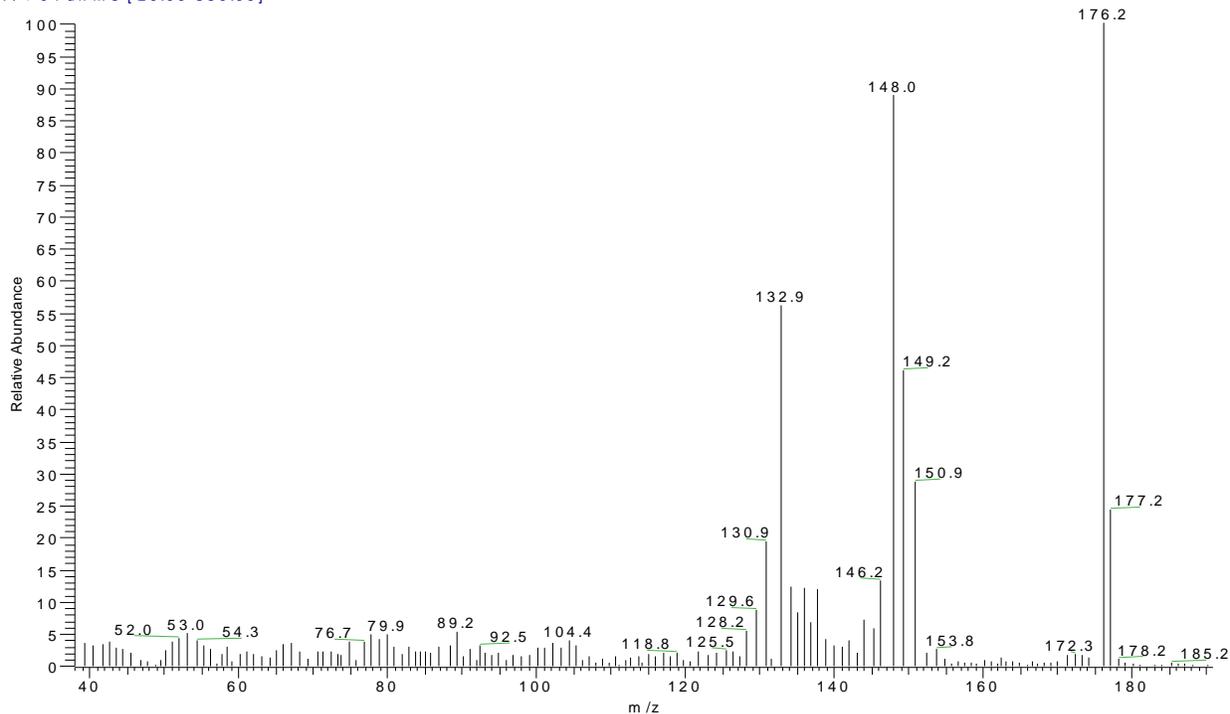
Carbono	Asignación por <sup>13</sup> C	Harbone, 1989 (ppm)	Asignación por DEPT	Canales et al., 2005
2	162.686	160.8	C	164.68
3	113.073	112.7	CH	113.80
4	143.370	143.3	CH	145.71
5	128.710	128.7	CH	130.37
6	112.568	112.1	CH	113.32
7	161.138	162.6	C	163.35
8	100.827	100.6	CH	101.73
9	155.883	155.6	C	157.145
10	100.827	104.3	C	111.93
11	55.760		CH <sub>3</sub> O	56.41

La asignación de las señales se hizo de acuerdo al modelo de Harbone, 1989.



**Figura 17. Estructura propuesta del compuesto 2 aislado de *Tagetes lucida* responsable de la actividad antimicrobiana.**

flavo02 #62 RT: 0.50 AV: 1 SB: 7 0.38-0.42 NL: 2.66E5  
T: + c Full ms [ 20.00-350.00]



**Figura 18. Espectro de masas del compuesto 2 con actividad antimicrobiana aislado de *Tagetes lucida*.**

En el espectro de masas (figura 18) se observa que el ion molecular del compuesto es de 176 e/z, el cual coincide con el de la 7-metoxi-cumarina ( $C_{10}H_8O_3$ ) (figura 17). Con los datos que se obtuvieron de este espectro se propone el patrón de fragmentación (figura 19), donde se puede observar que el fragmento 148 e/z ( $C_9H_8O_2$ ) se origina por la pérdida de M-28 del pico base (176 e/z). Dicha pérdida corresponde al monóxido de carbono (CO)

; el fragmento 133 e/z ( $C_8H_5O_2$ ) se produce por la pérdida de M-43 ( $CH_3-O=C$ ) del pico base; el fragmento 105 e/z ( $C_7H_5O$ ) se forma por la pérdida de M-28 (CO) del fragmento 133 e/z ( $C_8H_5O_2$ ), finalmente el fragmento 77 e/z ( $C_6H_5$ ) se produce por la pérdida de M-28 (CO) del fragmento 105 e/z ( $C_7H_5O$ ).

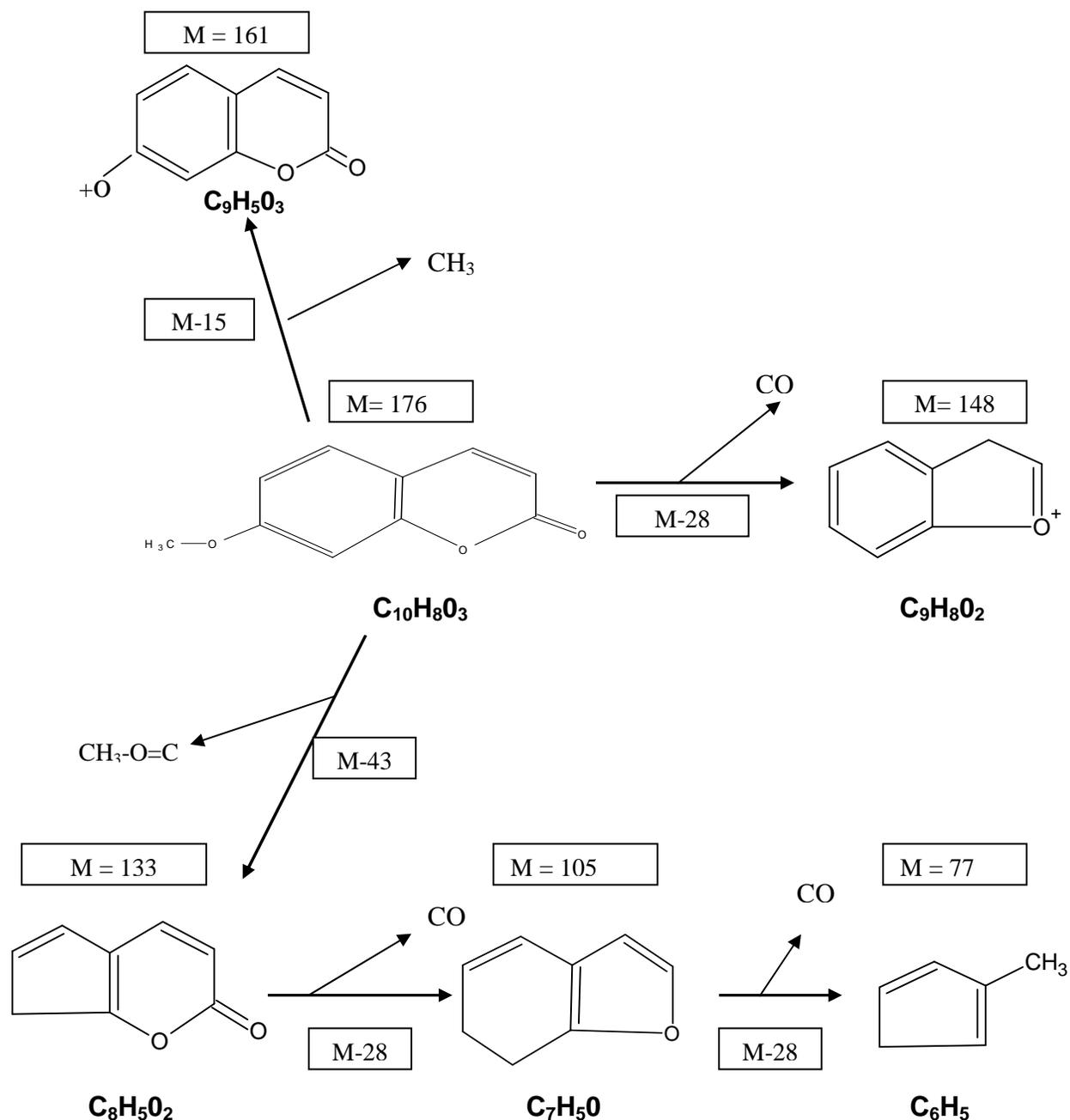
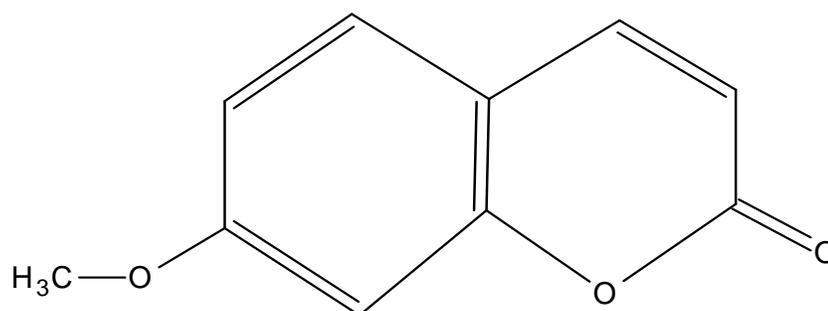


Figura 19. Patrón de fragmentación del compuesto 7-metoxi-cumarina con actividad antimicrobiana aislado de la planta *Tagetes lucida*.

Con las constantes espectroscópicas registradas con los espectros de UV, RMN<sup>1</sup>H, RMN<sup>13</sup>C y de masas, se llegó a la determinación de la estructura química del compuesto 2 con actividad antimicrobiana, resultado ser la 7-metoxicumarina cuya fórmula se muestra en la figura 20.



**7-metoxicumarina**

**Figura 20. Estructura química del compuesto 2 con actividad antifúngica obtenido de *Tagetes lucida***

## 8.2. Elucidación de la estructura química del compuesto 1 con actividad antibacteriana aislado de *Tagetes lucida*.

En primer lugar se determinó que la pureza del compuesto aislado por cromatografía en placa fina, usando diversas fases móviles. Los cromatogramas mostraron una sola mancha de color morado intenso pero como se muestra en la figura 21, el termograma realizado al compuesto 1 se nota la presencia de dos picos indicando que en la muestra no tenía un grado de pureza aceptable o posiblemente el compuesto 1 sufrió alguna descomposición durante el tiempo en que se tardó en realizar los estudios para elucidar la estructura del compuesto con actividad antibacteriana, ya que este estudio fue el último en realizarse por lo que no se logró elucidar su estructura química con los parámetros espectroscópicos (espectro de absorción en el UV, IR, resonancia magnética nuclear de protones, resonancia magnética nuclear de carbono 13 y protones, experimento en dos dimensiones para  $^{13}\text{C}$  con ángulos de relajación diferencial "DEPT" y espectrometría de masas) (ver apéndice 6).

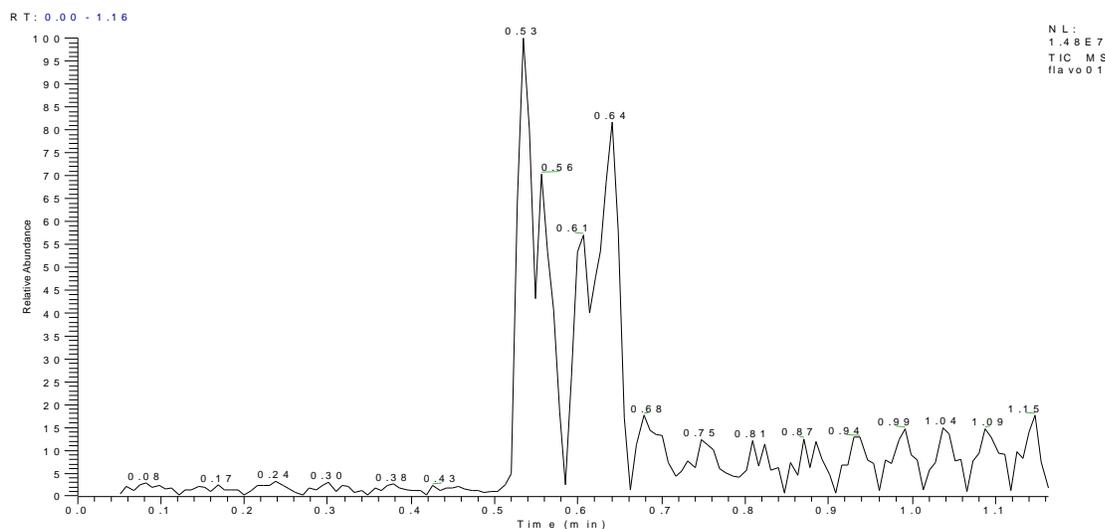


Figura 21. Termograma del compuesto 1 con actividad antimicrobiana aislado de *Tagetes lucida*.

## DISCUSION

Con base en la literatura de estudios previos y en las pruebas preliminares realizados en este trabajo, se encontró que *T. lucida* mostró actividad antifúngica y antibacteriana. Sobre la base de esta información y la alta resistencia de esta planta contra el ataque de patógenos se llevó a cabo un estudio fitoquímico biodirigido.

La susceptibilidad antimicrobiana de cada extracto metanólico obtenido de las partes aéreas de la planta *T. lucida* se muestran en el cuadro 11. Los extractos metanólicos M1 y M2 inhibieron el crecimiento de cepas bacterianas enteropatógenas y una levadura; para el caso de M2 las cepas susceptibles fueron: *Vibrio cholerae* aislada de un caso clínico, *Vibrio cholerae* aislada de agua contaminada, *Vibrio cholerae Tor*, *Vibrio cholerae No-01*, *Yersinia enterocolitica*, *Sarcina lutea*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* y *Candida albicans*. El extracto M1 mostró actividad en contra de *V. cholerae agua*, *V. cholerae No-01*, *Y. enterocolitica* y *C. albicans*, de acuerdo con nuestros resultados el extracto M2 fue el que mostró un amplio espectro antibacteriano (9 de 14 cepas usadas fueron sensibles a este extracto), algunas de estas cepas causan infecciones gastrointestinales a los seres humanos y son comúnmente transmitidas en los alimentos, los síntomas clínicos más característicos son: gastroenteritis, diarrea, vómitos, fiebres, náuseas, deshidratación, sangrados con pus y enterocolitis (Mins, 1993). Las cepas de *Vibrio cholerae* fueron las más sensibles en contra de los dos extractos ya que manifestaron los halos más grandes (figura 6). Del extracto M1 y M2 fueron aislados dos sustancias (1 y 2), la primera resultó una mezcla de dos compuestos. La pureza del compuesto a evaluar es de suma importancia, puesto que es conocido que puede ocurrir un sinergismo entre los compuestos que están presentes y por consiguiente puedan variar ampliamente su actividad biológica. Se determinó la estructura química del compuesto aislado del extracto M2. De acuerdo con los estudios espectrométricos el compuesto activo fue la 7-metoxicumarina (figura 20). La actividad antimicrobiana de los compuestos aislados se llevó a cabo de igual forma que los extractos en contra de bacterias Gram-negativas y Gram-positivas y una levadura; la 7-metoxicumarina sólo mostró actividad frente a 5 cepas (*V. cholerae cc.*, *V. cholerae agua*, *V. cholerae tor*, *V. cholerae NO-01* y *C. albicans*); la mezcla fue activa en contra de

6 cepas (*V. cholerae* cc., *V. cholerae* agua, *V. cholerae* Tor, *V. cholerae* No-01, *Y. enterocolitica* y *C. albicans*), siendo para ambos las cepas de *V. cholerae* las más sensibles, ya que manifestaron los halos de inhibición más grandes (cuadro 14) (figura 8).

A los resultados de los bioensayos se les realizó un análisis de varianza de dos factores, siendo éstos: a) extractos con tres niveles (cloramfenicol, M1 y M2), y b) cepas con 11 niveles (ver cuadro 11), como muestra el cuadro 14 se puede afirmar que existe una diferencia significativa entre la actividad de los extractos y el control positivo ( $p < 0.05$ ) (cuadro 12). Al igual que para los extractos se realizó un análisis de varianza de dos factores para las sustancias aisladas, siendo éstos: (a) compuestos activos (control positivo, compuestos 1 y 2) y (b) cepas con 6 niveles; el análisis estadístico bifactorial demostró que existían diferencias significativas, con base a los resultados mostrados en el cuadro 15 y como se observa en la figura 8, existen diferencias significativas en cuanto a la actividad antibacteriana de los compuestos aislados y el cloramfenicol ( $p < 0.05$ ).

#### Determinación de CMI y CBM.

Se evaluó la concentración mínima inhibitoria y la concentración bactericida mínima de los extractos y compuestos activos. Los resultados en los cuadros 13 y 16, muestran que las cepas de *V. cholerae* son las más sensibles; ya que se requiere de 0.5 mg/ml del extracto M2 y 0.25 mg/ml de la mezcla aislada, para inhibir su crecimiento respectivamente; la mezcla fue la más activa cuantitativamente (cuadro 17). En recientes años la incidencia de gastroenteritis implicando a la bacteria del género *Vibrio* se ha incrementado, los casos reportados han sido atribuidos al consumo de alimentos marinos crudos o no cocinados, o a la ingestión de agua contaminada. Junto al patógeno clásico de *Vibrio cholerae*, otras especies incluyendo *V. cholerae* No-01, *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus*, las cuales normalmente producen menos síntomas graves han sido reportados por causar gastroenteritis, septicemia e infecciones en heridas (Baffone et. al., 2003). Los alimentos de origen marino constituyen un riesgo especial, por que en algunas zonas *V. cholerae* ha llegado a ser parte del medio marino normal. Además, estudios más recientes han indicado que este microorganismo es capaz de crecer perfectamente en una

diversidad de alimentos cocidos, a 22° C, 30° C y a 37° C, especialmente en alimentos con pH elevado por ejemplo en los huevos duros y mejillones cocidos; *V. cholerae* Tor fue capaz de sobrevivir durante tiempos muy prolongados en los alimentos marinos congelados. Algunas hortalizas crudas, por ejemplo rábano y el hinojo, también mantuvieron el crecimiento de *V. cholerae*. Además se ha demostrado la transmisión de *V. cholerae* No-01 por alimentos marinos contaminados y por platos muy manipulados, como entremeses, por mecanismos similares a los de propagación de *V. cholerae*. Por consiguiente siempre existe la posibilidad de que *V. cholerae* sea transmitido a zonas del mundo en las que no es endémico por medio de los manipuladores de alimentos o por los propios alimentos y comunidades donde no existe un nivel adecuado de higiene (Mossel et al., 2003).

En la figura 9 se puede observar que el efecto de la mezcla sobre el crecimiento de *Vibrio cholerae* (cepa aislada de un caso clínico), es de un agente bacteriostático a concentraciones de 0.5 mg/ml (CBM), y a esta misma concentración manifiesta una curva de múltiples impactos (Dulbecco, 1990), en la cual antes de hacerse lineal se inclina cerca del origen, debido a que en cada microorganismo viable deben producirse varias alteraciones en alguna o algunas vías metabólicas (impactos); extrapolando se observa que la cinética es de aproximadamente 12 impactos o de impactos múltiples.

Actividad antifúngica.

Los extractos M1, M2 y las dos sustancias aisladas (la mezcla y la 7-metoxicumarina) fueron también evaluadas contra de *Aspergillus niger*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Fusarium sporotrichum*, *Fusarium moniliforme*, *Rhizoctonia solani* (ver cuadros 19 y 20). Ambos extractos mostraron actividad frente a una de las cinco cepas fúngicas (*Aspergillus niger*). Con respecto a las sustancias aisladas solo la 7-metoxicumarina inhibió el crecimiento de *Aspergillus niger*. La actividad antifúngica de la 7-metoxicumarina, a una concentración de de 2.0 mg/ml manifiesta una actividad fungistática, ya que solo se alcanzó un 66.66% de inhibición (cuadro 19 y figura 10). La CFM del compuesto aislado se encuentra a concentraciones mayores a 3.0 mg/ml y la CF<sub>50</sub> se

presentó a una concentración de 1.02 mg/ml, que comparado con el control positivo (Ketaconazol) es menos activa (ver cuadro 20).

Los resultados obtenidos en este trabajo, muestran que el uso tradicional de *Tagetes lucida* en varias localidades de México, tiene un soporte fitoquímico, además de revelar que los extractos actúan sobre bacterias y hongos. Esto podría indicar que esta planta puede jugar un papel importante en la preservación de alimentos y preparación de los mismos como un excelente especia. Los extractos de plantas son ampliamente utilizados en alimentos, industrias farmacéuticas y cosméticas. Las plantas contienen un amplio rango de compuestos tales como lípidos, saborizantes, pigmentos, fragancias, nutraceuticos y fármacos. Estos compuestos bioactivos y nutraceuticos podrían ser usados en la prevención, control y hasta el manejo de enfermedades tales como el cáncer, estrés oxidativo, enfermedades cardiovasculares, osteoporosis y otras enfermedades degenerativas (Kanu et. al., 2007). Se están encontrando nuevos compuestos bioactivos usando la información basada en estudios etnobotánicos y usos indígenas. Muchas sustancias naturales de plantas pueden jugar un fundamental papel en los alimentos como compuestos antimicrobianos y antioxidantes (Cameron et, al., 2005).

Un nutraceutico es definido como cualquier sustancia que puede ser considerada un alimento o parte de un alimento y también provee de beneficios a la salud incluyendo el tratamiento y prevención de enfermedades. Los nutraceuticos pueden clasificarse como nutrientes simples, suplementos alimenticios, y metabolitos secundarios (Céspedes et al., 2006). Según Oleszek, 2003, dentro de estas sustancias, encontramos compuestos que han sido ampliamente estudiados durante la última década, como: carotenoides, fitoestrógenos, isoflavonas, lignanos, flavonas, flavonoles, antocianinas, estilbenos, tocoferoles, ácido linoleico, glucosinolatos, alcaloides, ácido fólico, ácido lipoico, cumarinas, oligosacáridos, fructanos entre otros.

Los recientes estudios han resaltado la actividad antimicrobiana de los derivados naturales y sintéticos de las cumarinas. Estas han sido usadas en el tratamiento de cáncer, edemas y muchos de sus derivados también han demostrado actividades biológicas. Los

efectos biológicos observados incluyen inhibición de enzimas, como la lipoxigenasa y ciclooxigenasa, actividad antitrombótica, vasodilatadora, antimutagénica, antitumoragénica y antimicrobiana (Bernadette et, al., 2006). Lo anterior está en concordancia con la actividad observada en la 7-metoxicumarina en contra de 4 cepas bacterianas (*V. cholerae*) y una levadura (*C. albicans*) (cuadro 17). Ya que las cumarinas pueden inhibir la DNA girasa y la DNA topoisomerasa IV, que son enzimas esenciales para la replicación del material genético en procariontes (Laurin et, al., 1999).

Por otro lado, las cumarinas (benzo- $\alpha$ -pironas), son compuestos naturales encontradas en una variedad de plantas, incluyendo canela y pimienta, las cuales son usadas como resaltadores del aroma en muchos productos de consumo. El uso de las cumarinas como un aditivo alimenticio fue prohibido por la FDA (Food and Drug Administration) en 1954, basado en reportes de hepatotoxicidad en ratas. Debido a su efecto potencial hepatotóxico en humanos, la Comisión Europea (European Directive 88/388/EEC, Anex II) limitó las cumarinas naturales como un aditivo alimenticio a 2 mg/kg de alimento/día, con excepción de las bebidas con altos niveles de alcohol, caramelos, chicles y ciertos alimentos tradicionales. En octubre del 2004, la European Food Safety Authority (EFSA, 2004) examinó a la cumarina para establecer una tolerancia diaria aceptable (TDI) en alimentos. EFSA emitió una opinión indicando que la cumarina no es genotóxica y recomendando un TDI de 0-0.1 mg/Kg de alimento/día. Falter et al., 2006, en base a la investigación enfocada sobre el conocimiento de los mecanismos de la toxicidad y cancerinogenesis de la cumarina concluyen basados en el NOEL (el nivel de efecto no observado) de la cumarina de 16 mg/Kg/día en ratas hembras y aplicando un factor de incertidumbre de 25 resultó en una dosis de referencia ADI (Ingestión diaria aceptable) de la cumarina de 0.64 mg/Kg/día. Enfatizando que este valor de riesgo es protector para la salud incluyendo la prevención del cáncer y otras enfermedades, basados en datos clínicos sugieren que muchos humanos pueden tolerar altas exposiciones hacia las cumarinas sin mostrar ningún efecto adverso; el beneficio potencial de la cumarina a la salud es su actividad anticancerígena (Oleszek, 2003). Por otro lado las investigaciones de nuevos productos naturales para controlar enfermedades humanas y en cultivos es una prometedora área de investigación. Los compuestos naturales producidos por el metabolismo secundario de las plantas son un potencial importante de fuentes de nuevos

tipos de nutraceuticos (Matos et, al., 1999).

El presente trabajo evidencia las propiedades inhibitorias de los extractos metanólicos y principios activos (7-metoxicumarina) en contra de *Aspergillus niger*. Lo que indica la importancia científica y económica que puede tener *T. lucida* en el área médica y agronómica. *A. niger* además de causar algunas enfermedades en humanos (aspirgilosis, trombosis e infarto, bloque parcial de vías nasales y alergias) es responsable de grandes pérdidas de cultivos; ocasiona el deterioro de semillas invadiendo sus embriones, por lo que disminuye notablemente el porcentaje de germinación de éstas, también causa la pudrición en algodón, cebollas y granos de maíz (Agrios, 1996). Estas infecciones son difíciles de erradicar, particularmente en los habitantes de los países del tercer mundo, debido a la pobreza extrema y condiciones de sanidad de la población (Kuiate et al., 2006). Por otra parte, las micotoxinas que producen ciertas especies de hongos fitopatógenos ocasionan enfermedades en animales y humanos por el consumo de forrajes y alimentos invadidos por hongos (Agrios, 1996.); La presencia de estos hongos o sus micotoxinas es particularmente desventajosa en países en desarrollo, donde el maíz y los productos basados en este son el principal alimento para la mayoría de la población (Young-Mi, et. al., 2004).

De acuerdo a los estudios espectroscópicos, uno de los compuestos activos fue la 7-metoxicumarina (figura 19), ambos parámetros físicos y espectroscópicos de este compuesto coinciden con los reportados por Harbone (1989), y Canales et al., (2005).

La mezcla (compuesto 2) aislada con actividad antimicrobiana, muestra en los espectros RMN<sup>1</sup>H RMN<sup>13</sup>C, DEPT y en el termograma (ver figura 19), la presencia de impurezas. Al realizar las cromatografías en placa fina reveladas solo mostraron una sola mancha perfectamente definida, el punto de fusión del compuesto manifestó un intervalo corto de temperatura (145-148° C) (ver cuadro7) estos estudios espectroscópicos no fueron capaces de revelar la impureza o la posible presencia de dos compuestos con características muy similares. La impureza de la sustancia 1 activa en contra de bacterias fue detectada en los estudios espectrosmétricos debido a la sensibilidad de los mismos. La

presencia del compuesto contaminante puede deberse a varios factores, por ejemplo, el compuesto activo sufrió alguna alteración durante el proceso de purificación o tal vez se trate de un isómero, el cual presenta propiedades muy semejantes, y no se logró separar por cromatografías preparativas; por lo que se requiere de técnicas más especializadas como HPLC con una columna preparativa para separar la mezcla.

## CONCLUSION

- Los resultados obtenidos en este trabajo, muestran que el uso tradicional de *Tagetes lucida* (pericón) en varias localidades de México tienen un soporte fitoquímico.
- Los resultados revelan que *Tagetes lucida* actúa sobre bacterias enteropatógenas y hongos fitopatógenos.
- Los extractos de *Tagetes lucida* en bajas concentraciones pueden ser útiles como agentes antimicrobianos para prevenir el deterioro por bacterias y hongos de algunos alimentos almacenados.
- Los compuestos aislados de *Tagetes lucida* presentaron actividad antimicrobiana en contra de bacterias Gram-negativas.
- El compuesto responsable de la actividad antifúngica fue la 7-metoxi-cumarina.

## PERSPECTIVAS

- Es necesario realizar otros estudios para elucidar la estructura química del compuesto (1) con actividad antimicrobiana aislado de *Tagetes lucida*.
- Es necesario evaluar los demás extractos y fracciones ya que esta planta es una prometedora fuente de compuestos activos en contra de bacterias enteropatógenas y hongos fitopatógenos.
- Los laboratorios de todo el mundo han encontrado literalmente cientos de fitoquímicos, los cuales tienen efectos inhibitorios sobre todo tipo de microorganismos in vitro. Muchos de esos compuestos deberían ser sujetos a estudios en animales y humanos, para determinar sus efectividad en los sistemas de todo el organismo, incluyendo en particular estudios toxicológicos, también como una investigación de sus efectos sobre la flora normal microbiológica. Lo que podría ser ventajoso para estandarizar métodos de extracción y pruebas in vitro así las investigaciones podrían ser más sistemáticas y la interpretación de los resultados podría ser más facilitada (Cowan, 1999).

## APENDICE 1.

### **Método de difusión en agar o de Kirby-Baüer:**

(Van der Berghe y Vlietinck, 1991).

Este método se utiliza para evaluar cualitativamente la actividad antibacteriana de los extractos, compuestos puros y de fracciones obtenidas de las separaciones cromatográficas, la metodología es la siguiente:

### **Medio de cultivo**

Se utiliza como medio de cultivo estándar el agar Müller-Hinton (Bioxon 110-1), ya que promueve el desarrollo de la mayoría de los aislamientos bacterianos clínicamente significativos, para el caso de los hongos se utilizará agar Czapek (Sigma). Es importante que el medio alcance en la placa un espesor uniforme de 4 mm. Si es más fino, los antibióticos tienden a difundir más en dirección lateral aumentando el tamaño de las zonas de inhibición; un agar de más de 4 mm de espesor produce una mayor difusión del antibiótico hacia abajo, con tendencia a estrechar artificialmente las zonas de inhibición.

### **Inóculo**

Con un asa de siembra estéril se tocan las superficies convexas de 4 o 5 colonias del microorganismo a ensayar (*Escherichia coli*, *Salmonella Typha*, etc.). Se sumerge el asa en 10 ml de caldo Müller-Hinton (Bioxon 260), se enjuaga bien el líquido para descargar todo el material y luego se retira el asa de siembra. Se incuba el tubo de cultivo a 37 °C durante aproximadamente 24 horas, o hasta que la turbidez del medio sea equivalente al estándar Nº 0.5 de MacFarland. Esto equivale a una concentración de aproximadamente  $1.5 \times 10^8$  bacterias/ml (este procedimiento se realiza por cada microorganismo a desafiar). El estándar 0.5 de MacFarland se prepara añadiendo 0.5 ml de cloruro de bario a 99.5 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.36 N (Hendrickson, 1987, citado por Ávila, 1996). La comparación de turbidez entre el estándar y el caldo con los organismos en estudio se puede efectuar observándolos contra una cartulina blanca con líneas negras

horizontales, o en su defecto con un espectrofotómetro (Spectronic 21 Milton Roy) a 660 nm. Si la suspensión de organismos es más turbia que el estándar, se añade solución salina al 0.9 % hasta igualarlas. Una vez logrado esto, se sumerge un segundo hisopo de poliéster, estéril y seco en la suspensión bacteriana, y antes de retirarlos se elimina el exceso de líquido haciendo rotar el hisopo contra la pared interna del tubo. Con este hisopo se inocula la superficie de una placa de agar de Müller-Hinton (Bioxon 110-1). Previamente, se deja que la placa alcance temperatura ambiente; es aconsejable mantener la tapa entreabierta para permitir la evaporación de cualquier exceso de humedad de la superficie del agar. Finalmente, se siembra mediante estría en por lo menos tres direcciones, dando vueltas a la placa en ángulos de aproximadamente 60° luego de cada estría. Una vez seco el inóculo, la placa de Müller-Hinton está lista para la aplicación de las muestras a las que se les evaluará su actividad antibacteriana.

### **Aplicación de sustancias**

Se utilizarán sensidiscos de 5 mm de diámetro hechos de papel whatman del N° 5 (los sensidiscos se utilizarán para evaluar biológicamente los extractos, fracciones y los compuestos puros separados mediante cromatografía). En todos los casos se harán las diluciones necesarias para que los sensidiscos lleven la cantidad deseada de producto (2 mg por sensidisco).

Para llevar a cabo la prueba de susceptibilidad, los discos impregnados con las sustancias a evaluar se colocan manualmente sobre la superficie del agar, utilizando una pinza estéril.

### **Preparación de muestras:**

Para el bioensayo el vehículo será agua destilada. En cuanto a la evaluación de las fracciones, los sensidiscos se impregnarán con las soluciones valoradas de la muestra hasta llegar a la concentración deseada de sustancia (2 mg) por disco; en este caso se utilizarán solventes como el etanol y el cloroformo para solubilizar los compuestos, para posteriormente impregnar los discos dejando evaporar el solvente durante 12 horas.

### **Controles negativos**

Para los bioensayos preliminares se utilizaron sensidiscos con 10  $\mu$ l de los diferentes solventes (metanol y cloroformo) dejándolos evaporar durante 12 horas. Al igual que los experimentales.

### **Control positivo**

Se evaluará la sensibilidad de las cepas experimentales en sensidiscos con 25  $\mu$ g de Cloramfenicol para el caso de bacterias y ketoconazol (7  $\mu$ g) en el caso de la levadura y hongos.

### **Incubación**

Una vez preparadas convenientemente las placas para la prueba de susceptibilidad. Se colocan en una incubadora a 37 °C, sin mayor tensión de CO<sub>2</sub>. Es preciso evitar presión de CO<sub>2</sub> debido a que se puede formar ácido carbónico en la superficie humedecida de agar, provocando un descenso del pH. El desarrollo de algunos microorganismos es inhibido a pH ácido, lo cual tiende a estrechar falsamente la zona de inhibición. Asimismo, la actividad de diversos antibióticos puede aumentar o disminuir con la caída del pH, produciéndose diferencias en las velocidades de difusión y alteraciones de las zonas de inhibición. Se incuban siempre placas con discos sin sustancias a evaluar como control (control negativo).

### **Interpretación de resultados**

Las zonas de inhibición se miden con una regla de calibración en milímetros. En todos los casos, la prueba se hace por triplicado y se reportan los valores promedio en mm.

## APENDICE 2.

### **Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y de la concentración bactericida mínima (CBM).**

**Método de macrodilución en caldo** (Jones *et al.*, 1987, citado y modificado por Ávila, 1996).

#### **Preparación de reactivos y diluciones.**

La solución antimicrobiana de trabajo se prepara diluyendo la fracción en agar de Müeller-Hinton (Bioxon 260) a la mayor concentración final deseada. La prueba se realiza en cajas petri. Las concentraciones que se utilizaron fueron 0.125, 0.125, 0.250, 0.50, 1.0, 1.5 y 2.0 mg/ml. En cada caja se colocaron 2 ml de agar con la concentración del extracto correspondiente. Cada ensayo se realizó por triplicado. También se manejó un control positivo y un negativo como se indicó anteriormente.

#### **Inoculación e incubación.**

Se prepara un inóculo que contenga  $10^6$  a  $10^7$  UFC/ml (unidades formadoras de colonia/ml) ajustando la turbidez de un caldo de cultivo al estándar de turbidez (se utiliza el estándar 0.5 de MacFarland y diluyendo luego 1:200 en caldo). Añadir a cada tubo, 0.1 ml del inóculo ajustado. Incubar los tubos a 35 °C durante 16 a 20 horas. No se recomienda la incubación en atmósfera de CO<sub>2</sub> a menos que sea esencial para el desarrollo del microorganismo.

#### **Interpretación de resultados**

La menor concentración de antimicrobiano que produce una inhibición completa del desarrollo visible representa la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI). Una turbidez muy ligera o un pequeño botón de desarrollo o turbidez definida se considera evidencia de que la droga ha sido incapaz de inhibir por completo el desarrollo a esa concentración.

**Determinación de la concentración bactericida media (Finegold y Jo Baron, 1989).**

Para medir la capacidad de un antimicrobiano para matar a un organismo se realiza la prueba de actividad bactericida que emplea el mismo sistema de dilución en caldo. Cuando la suspensión inicial del microorganismo es inoculada en los tubos de caldo, se toma una alícuota del tubo de control de crecimiento inmediatamente después de ser sembrado, la cual se inocula en una placa de agar de Müeller-Hinton (Bioxon 110-1) para determinar el número real de unidades formadoras de colonia (UFC) del inóculo. Este número se obtiene al contar las colonias presentes luego de la inoculación de la placa de agar hasta el día siguiente y por multiplicación del factor de dilución.

Luego que se ha determinado la CMI se siembra una cantidad conocida del inóculo (usualmente 0.1 ml) tomado de cada uno de los tubos de caldo que no presentan turbidez luego de la incubación, en placas de agar Müeller-Hinton. El número de colonias que se desarrolla en estos subcultivos luego de incubar durante 18 horas se compara con el número de UFC/ml del cultivo original. En aquellos tubos que no presenten turbidez, los microorganismos permanecerán viables o bien, habrán sido destruidos por el agente microbiano. Debido a que incluso las drogas bactericidas no siempre esterilizan totalmente una población bacteriana, la mínima concentración del agente antibacteriano que permite sobrevivir a menos de 0.1% del inóculo original, se denomina Concentración Bactericida media (CBM).

**Microtécnica de dilución en caldo** (Koneman, 1996).

La microtécnica de dilución en caldo sigue el mismo principio que el método de dilución en caldo, excepto que la susceptibilidad de los microorganismos a los antimicrobianos se determina en una serie de microtubos moldeados en una placa plástica (placas de Elisa). La microplaca se prepara colocando 50 µl de caldo Müeller -Hinton con la concentración deseada del compuesto a probar.

Se prepara una suspensión bacteriana con un asa de siembra estéril tocando las superficies convexas de 4 o 5 colonias de los microorganismos a ensayar. Se sumerge el asa en 10 ml de caldo Müeller - Hinton (Bioxon 260), se enjuaga bien el líquido para descargar todo el material y luego se retira el asa de siembra. Incubar el tubo de cultivo a 37 °C durante aproximadamente 24 horas, o hasta que la turbidez del medio sea equivalente al estándar N° 0.5 de MacFarland. Esto equivale a una concentración de aproximadamente  $1.5 \times 10^8$  bacterias/ml, de esta suspensión se toman 0.1 ml y se le adicionan a 99.9 ml de solución salina al 0.9 % obteniéndose así una concentración de  $10^5$  bacterias/ml. Cada concavidad se inocula con 50 µl de esta suspensión bacteriana.

Una vez inoculada la placa se tapa para evitar la desecación y se incuba por 24 hrs. a 37 °C, pasado este tiempo se le añaden 50 µl de una solución de cloruro de tetrazolio al 0.08 % a cada concavidad, se incuba por 30 min. a 37 °C. En las concavidades donde se desarrolla el organismo, el colorante es reducido a formazan de color rojo, produciéndose un botón rojo en el fondo del microtubo. Donde no hay desarrollo bacteriano la solución permanece clara.

### APENDICE 3.

#### **Método cualitativo de inhibición del crecimiento radial (Wang y Bun, 2002).**

El ensayo contra hongos filamentosos se lleva acabo en cajas petri (100 X 15 mm) que contengan 20 ml de agar de papa dextrosa, en el cual se inoculan las esporas del hongo. Después que el micelio se ha desarrollado, se colocan discos previamente impregnados con el compuesto activo, la preparación de los discos es igual a la técnica de difusión en agar. Si el primer ensayo es con un extracto crudo, se recomienda usar concentraciones grandes de activo (1-2 mg por disco). Los discos se colocan a una distancia de 30 mm del límite micelial.

#### **Incubación**

Las placas son incubadas a 23°C durante 72 horas ha sta que el crecimiento micelial se haya desarrollado.

#### **Controles negativos**

Discos a los que se les agregará 10 µl del solvente empleado para disolver el problema, dejándolos evaporar durante 12 horas (al igual que las experimentales).

#### **Controles positivos**

Se evaluará la sensibilidad de las cepas experimentales con sensidiscos de 7 µg/disco de Ketoconazol.

#### **Interpretación de resultados**

En el caso de existir zonas de inhibición se reportará el extracto como activo, en todos los casos está prueba se hará por triplicado.

## APENDICE 4.

### **Método cuantitativo de inhibición del crecimiento radial (Wang y Bun, 2002).**

El ensayo contra hongos filamentosos se lleva a cabo en cajas petri (60 X 15), que contengan 6 ml de agar de papa dextrosa, con las siguientes concentraciones del extracto a probar 3.00, 2.50, 2.00, 1.50, 1.00, 0.75, 0.50, 0.25, 0.125 mg/ml. Posteriormente se coloca una pequeña cantidad de micelio en el centro de la caja.

### **Incubación**

Las placas son incubadas a 23°C durante 72 horas hasta que el crecimiento micelial se haya desarrollado.

### **Controles positivos**

Se evaluó la sensibilidad de las cepas experimentales incluyendo en el agar las siguientes concentraciones de Ketoconazol. 0.05, 0.10, 0.20, 0.40, 0.80, 1.70, 3.50, 7.00, 14.00, 28.00 µg.

### **Interpretación de resultados**

Los resultados se reportan en porcentaje de inhibición, teniendo en cuenta que la concentración que representa el 100% de inhibición es aquella en la que ya no se observa crecimiento, la cual corresponde a CFM; mientras que la concentración que representa al 50 % de inhibición corresponde a la CF<sub>50</sub> y estas fueron determinadas por regla de tres con respecto al control negativo, el cual representa el 0% de inhibición.

## APENDICE 5.

### **Curva letal (curva de supervivencia y efecto sobre el crecimiento).**

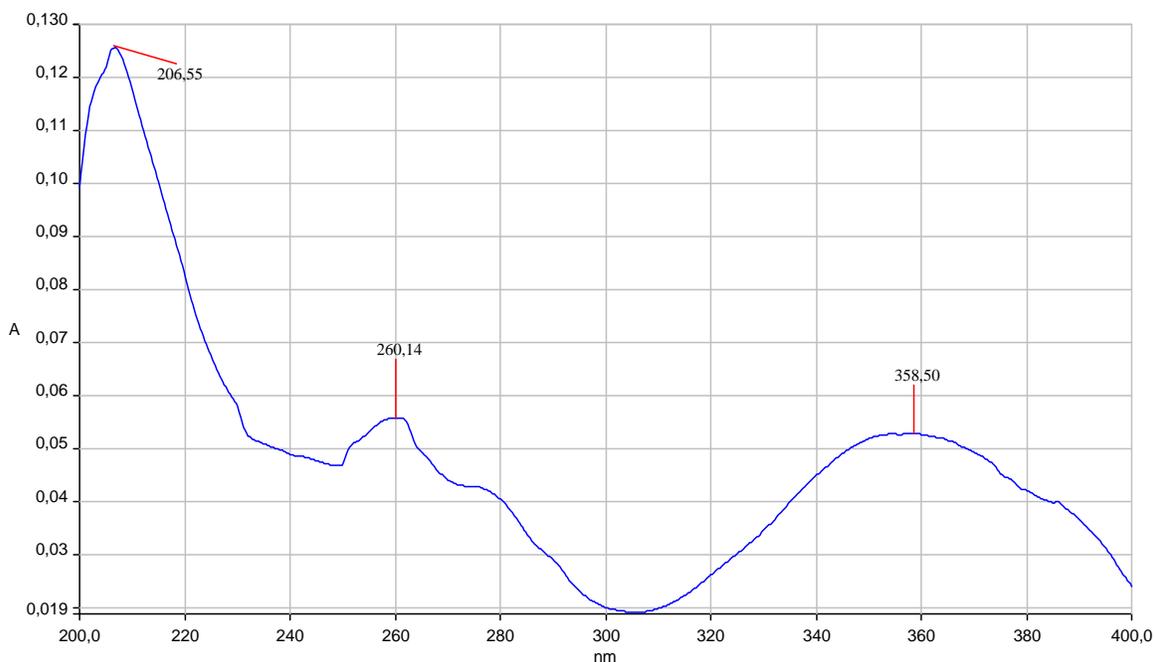
(Kubo, 1993; Shoenknecht *et al.*, 1987, citado en Ávila, 1996).

El desarrollo fue el siguiente:

1. Se obtiene una población de bacterias de aproximadamente  $10^{8-9}$  UFC/ml después de 16-24 horas de incubación.
2. Se preparan tubos que contienen el agente antimicrobiano a concentraciones iguales a la CBM, la CMI,  $\frac{1}{2}$  CMI,  $\frac{1}{4}$  CMI y el control sin antimicrobiano.
3. Se inoculan las bacterias en los tubos que contienen el antimicrobiano de tal forma que cada tubo contenga entre  $10^{7-8}$  UFC/ml.
4. Se toman muestras de 0.1 ml de cada tubo desde el tiempo cero, cada hora durante las primeras 6 horas y posteriormente cada 4-6 horas. A las muestras se les determina el número de microorganismos viables UFC mediante la técnica de diluciones.
5. Los resultados del desafío se reportan graficando el logaritmo del número de sobrevivientes contra el tiempo.

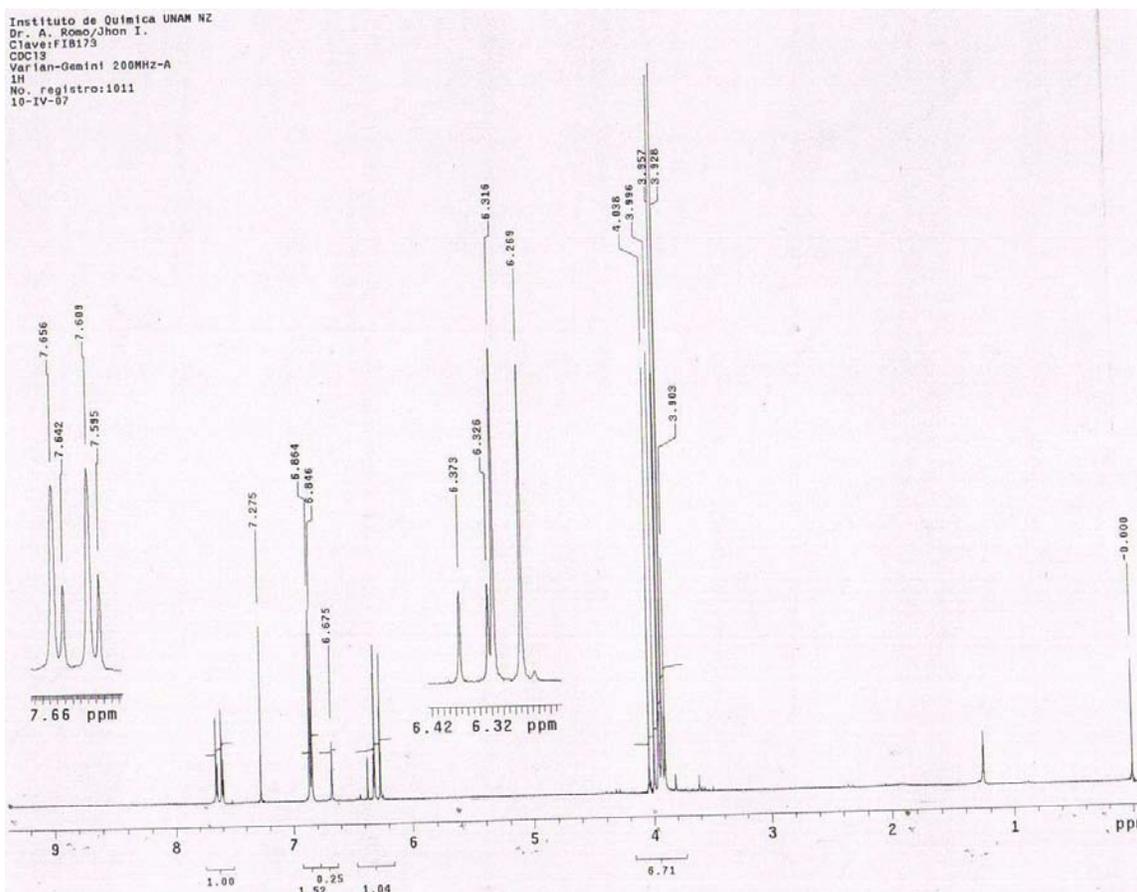
**APENDICE 6.**

Los resultados obtenidos de los espectros de la mezcla aislada (compuesto 2) son los siguientes:



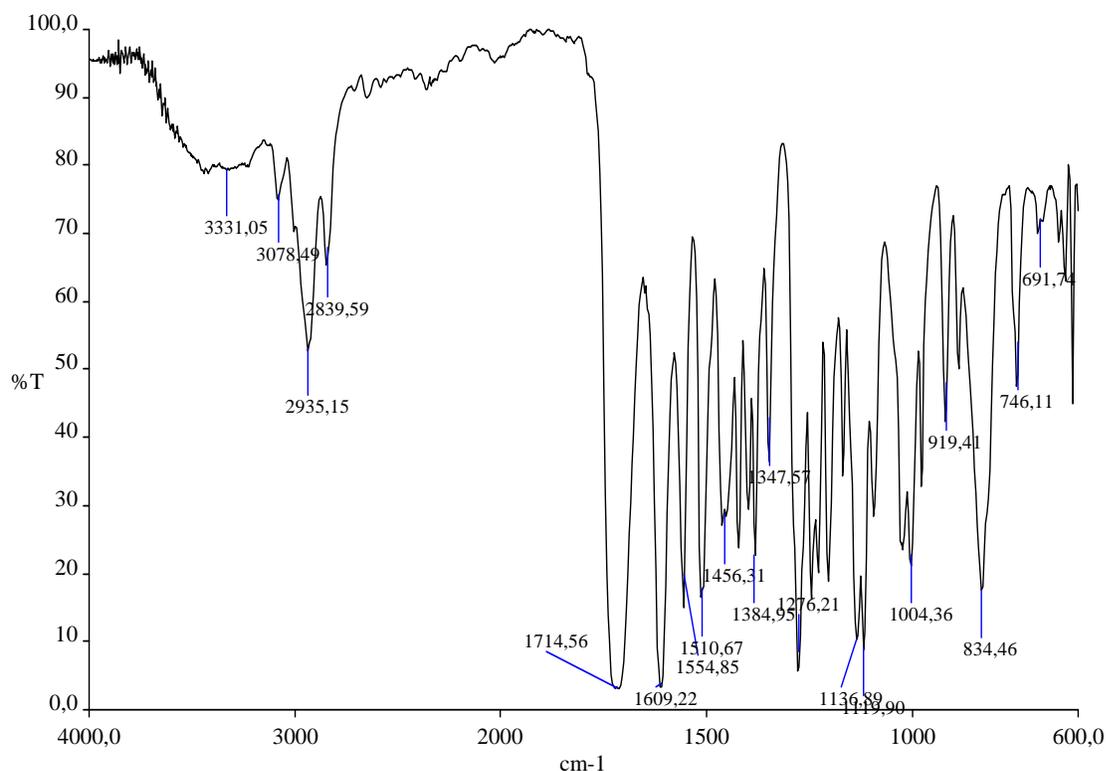
**Figura 22. Espectro UV del compuesto 1 con actividad antimicrobiana aislado de *Tagetes lucida*.**

El la figura 22 se muestra el espectro de absorción ultravioleta, donde se puede observar dos  $\lambda_{\text{Máx.}} = 260 \text{ nm}$  y  $358 \text{ nm}$ . Lo cual sugiere la presencia de compuestos poliaromáticos como, ya que como se sabe éstos presentan máximas de absorción entre los 300 – 400 nm (Harbone, 1994).



**Figura 23. Espectro de resonancia magnética nuclear de protones (RMN<sup>1</sup>H) del compuesto 1 con actividad antimicrobiana aislado de *Tagetes lucida*.**

En el espectro de resonancia magnética nuclear de protones se presentaron las siguientes señales: 5 singuletes entre 3.903 a 4.038 ppm característicos de grupos metoxilo; una señal a 6.675 sin acoplamiento, asignable a un hidrógeno vinílico desprotegido; una señal AB de 4 hidrógenos formando 2 dobles de dobles a 6.27 – 6.37 ppm.



**Figura 24. Espectro de IR del compuesto 1 con actividad antimicrobiana aislado de *Tagetes lucida*.**

En la figura 24 se muestra el espectro de absorción IR, en donde se puede notar la presencia de las siguientes bandas de absorción: 2935 y 2839 asignables a: -CH, -CH<sub>2</sub> Y -CH<sub>3</sub>. En la región de carbonilos se observa una señal a 1714 asignable a un carbono de cetona  $\alpha$ ,  $\beta$  insaturada; a 1609 una señal perteneciente a insaturación, sugiriéndonos la presencia de un compuesto aromático con grupos alquilo sustituidos y un carbonilo de cetonas. Con estos resultados en el espectro de UV de indicios de que se trata de otra cumarina metoxilada.

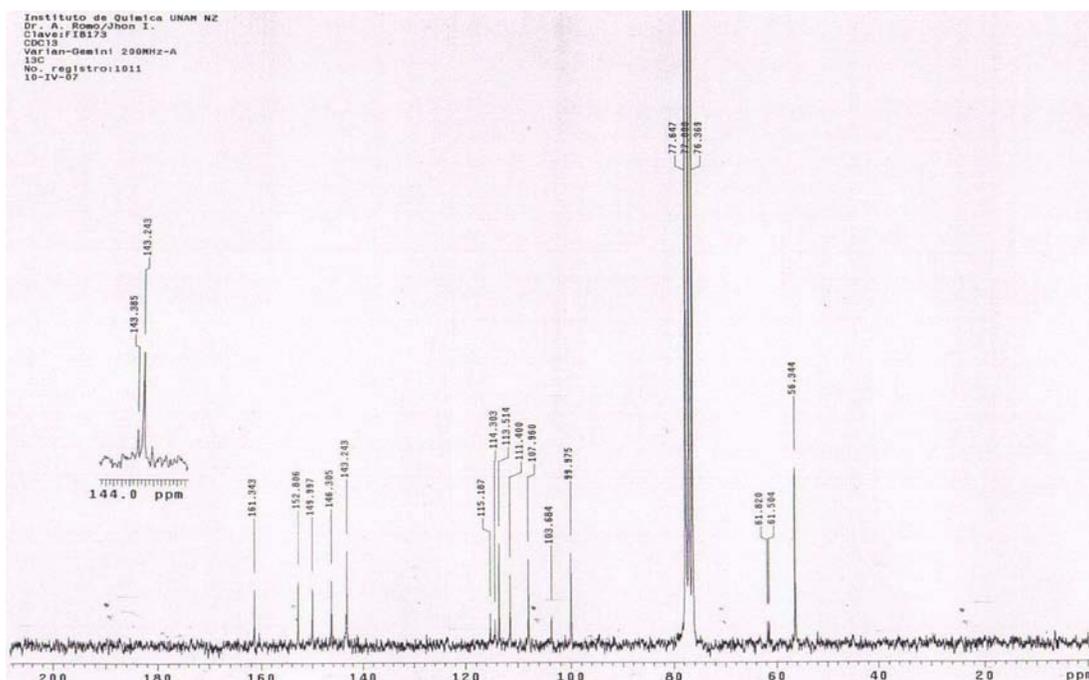


Figura 25. Espectro de resonancia magnética nuclear de carbono 13 (RMN<sup>13</sup>C) del compuesto 1 con actividad antimicrobiana aislado de *Tagetes lucida*.

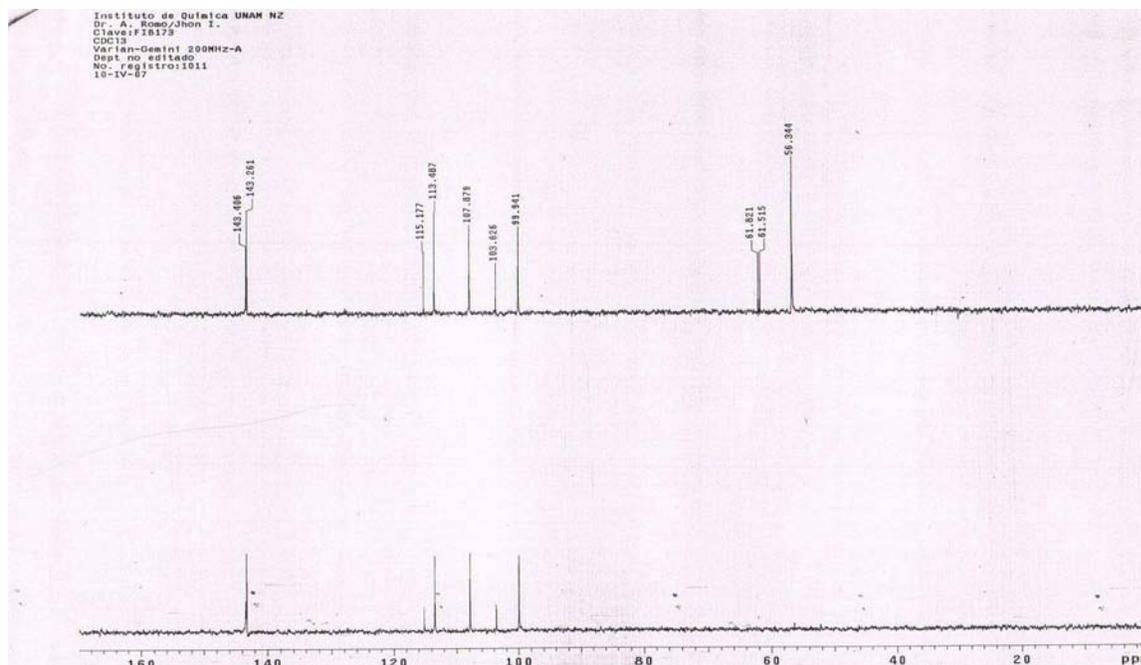
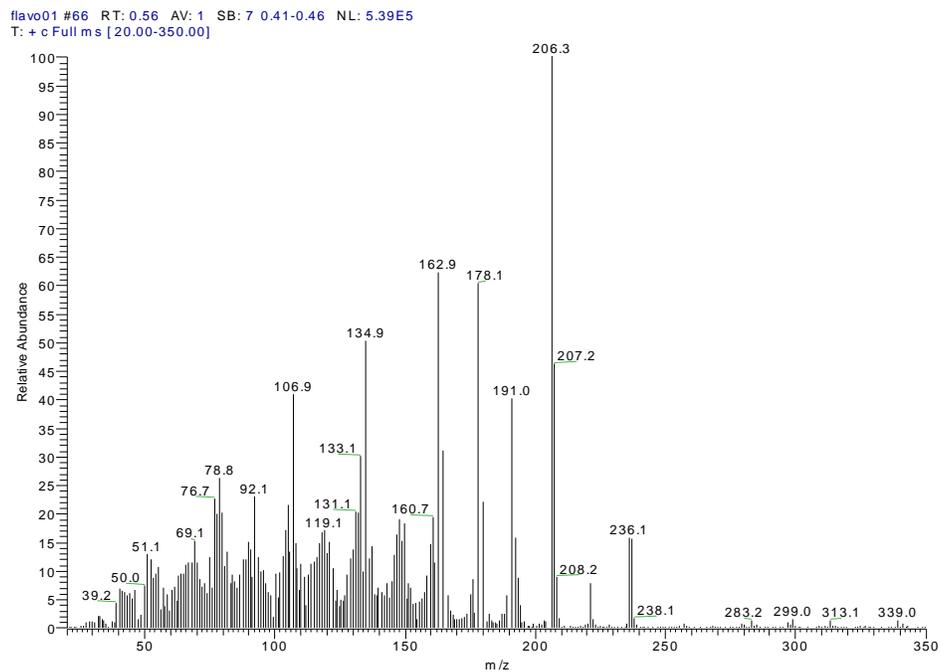


Figura 26. Espectro de resonancia magnética nuclear de protones DEPT del compuesto 1 aislado de *Tagetes lucida*.

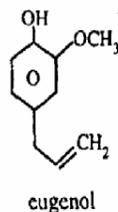
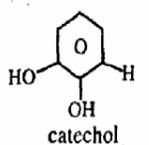
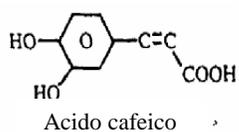


**Figura 27. Espectro de masas del compuesto 1 con actividad antimicrobiana aislado de *Tagetes lucida***

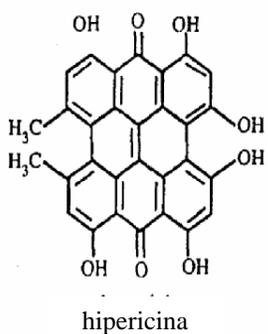
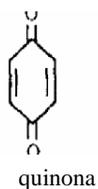
APENDICE 7.

Estructuras de antimicrobianos de origen vegetal más comunes (Murphy, 1999).

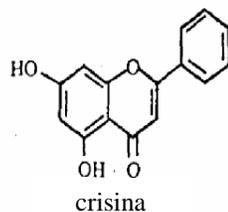
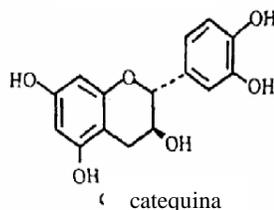
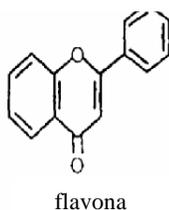
Fenoles simples  
y ácidos fenólicos



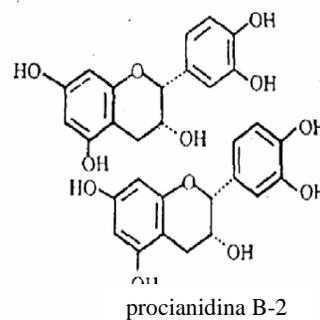
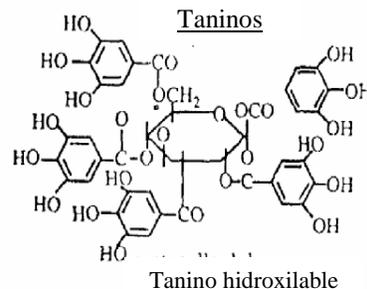
Quinonas



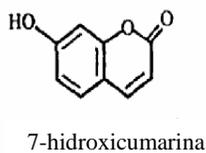
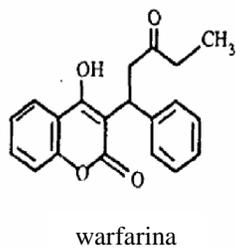
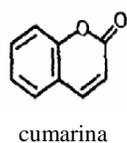
Flavonas y flavonoides



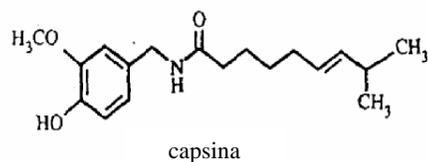
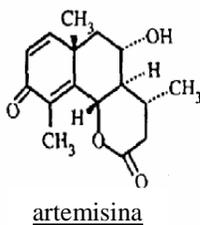
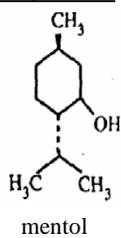
Taninos



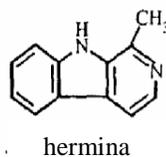
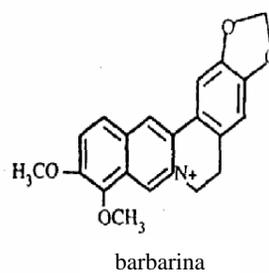
Cumarinas



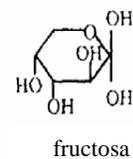
Terpenoide



Alkaloides



Azúcares



---

---

**BIBLIOGRAFIA**

- **Abdala, L. R.** 1999. Flavonoids of the aerial parts from *Tagetes lucida* (Asteraceae). *Biochemical Systematics and Ecology*. Oct. 27(7): 753-754.
- **Agrios, G. N.** 1996. *Fitopatología*. 2ª edición. Ed. Limusa. México . pp. 444-770.
- **Aoki, K. and A. R. Cortes** 1994. Effect of *Tagetes lucida* Cav. extract on in vitro and in vivo exposed skeletal muscle. *Phyton* 56: 43-49.
- **Aquino, R., Caceres, A., Morelli, S., Rastrelli, L.** 2002. An extract of *Tagetes lucida* and its phenolic constituents as antioxidants. *Journal Natural. Products*. 1773-1776.
- **Argueta, V. A., Cano, A. J.,** 1994. *Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana*. Instituto Nacional Indigenista, México. pp. 65
- **Ávila, A. J.G.** 1996. Actividad anti-*Vibrio cholerae* de dos plantas utilizadas en la medicina tradicional Purépecha. Tesis de Maestría. UNAM. Cuautitlán. pp. 104.
- **Azcon, B. A. y Talon, M.** 1993. *Fisiología y Bioquímica Vegetal*. Interamericana Ed. McGraw-Hill. España. pp 239.
- **Bennet, R. N. & Wallsgrove, R. M.** 1994. Tansley Review No 72. Secondary metabolites in plant defense mechanisms. *New Phytol.* 127: 617-633.
- **Bernadette S., Egan, D., Kananagh, K., McCann, A., Thati, B & Walsh, M.** 2006. Synthesis, characterization and antimicrobial activity of a series of substituted coumarins-3-carboxylatosilver(I) complexes. *Inorganica Chimica Acta*. 359: 3976-3984.
- **Bibek R.** 2000. *Fundamental Food Microbiology*, CRC Press, New York. pp. 298-303.
- **Bicchi, C., A. Binello, et al.** 1999. Reliability of Van den Dool retention indices in the analysis of essential oils. *Journal of Chromatographic Science*. Aug. 37(8): 288-294.
- **Bicchi, C., A. Binello, et al.** 1999. Supercritical carbon dioxide in combination with silica gel to fractionate essential oils. *Phytochemical Analysis* 10(1): 17-21.
- **Bicchi, C., M. Fresia, et al.** 1997. Constituents of *Tagetes lucida* Cav. ssp. *lucida* essential oil. *Journal Flavour and Fragrance*. 12(1): 47-52.
- **Baffone, W., Citterio, B., Vittoria, E., Casaroli, A., Campana, R., Falzano, L., & Donelli, G.,** 2003. Retention of virulence in viable but non-culturable halophilic *Vibrio* spp. *International Journal of Food Microbiology*. 89: 31-39.
- **Cáceres, A., A. V. Alvarez, et al.** 1991. Plants used in Guatemala for the treatment of respiratory diseases: 1. Screening of 68 plants against Gram-positive bacteria. *Journal of Ethnopharmacol.* 31(2): 193-208.

- 
- **Cáceres, A., O. Cano, et al.** 1990. Plants used in Guatemala for the treatment of gastrointestinal disorders: 1. Screening of 84 plants against enterobacteria. *Journal of Ethnopharmacol.* 30(1): 55-74.
  - **Calderón, J., Muñoz, J.L., Quijano, L., Ríos, T.** 1976. Estudio químico de los *Tagetes*. II. *Rev. Latinoamericana. Química.* 7: 114-118.
  - **Calva-Calva, G., Esparza G. F., Pérez V. J., Martínez J. V. M., Silva C. S. & López S. C.** 2002. Plantas como biorreactores para la producción de biomoléculas y remoción de xenobióticos. *Avance y perspectiva.* 21: 307-312.
  - **Cameron, S., Smith, R., & Kierstead.** 2005. Linking Medicinal/Nutraceutical Products Research with Commercialization. *Pharmaceutical Biology.* 43 (5): 425-433.
  - **Canales, M., Hernandez, T., Flores, C., Durán, A., García, A. M., & Avila. G.,** 2005. Antimicrobial Activity of *Alternanthera caracasana*. *Pharmaceutical Biology.* 43 (43): 305-307.
  - **Cimanga, K., Kamnu, L., Tona, L., Apers, S., De Bruyne., Hermans, N., Totte, J., Pieter, L., & Vlietinck, J.** 2002. Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. *Journal of Ethnopharmacology.* 79: 213-220.
  - **Cowan, M. M.** 1999. Plant products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews.* 12: 564-565.
  - **Croteau, R., Kutchan, T. M. & Lewis, N. G.** 2000. Natural Products (Secondary Metabolites) *American Society of Plant Physiologists.* pp. 1250-1268.
  - **Cutler J.S., Cutler H.G.,** 2000. "Biologically active natural products: pharmaceuticals." Washington, D.C: CRS Press Boca Raton London New York, pp 95-107.
  - **Dey, P. M. & Harbone, J. B.** 1991. *Methods in plant biochemistry.* Vol. 7. Terpenoids. Academic Press. pp. 43-98.
  - **Dixón, R. A.** 2001. Natural products and plant disease resistance. *Nature.* 411: 843-847.
  - **Domingo, D. & López-Brea, M.** 2003. Plantas con acción antimicrobiana. *Revista Española de Quimioterapia.* 16(4): 385-393.
  - **Domínguez, A. X.** 1973. *Métodos de investigación fitoquímica,* Primera edición. Ed. Limusa. México. pp. 3-17.
  - **Doyle, P. M., Beuchet L. R. & Mantville J. T.** 2001. *Microbiología de los alimentos. Fundamentos y fronteras.* Ed. Acribia, S, A. España. pp.133-343

- 
- **Dmitriev, A., Tena, M., Jorin, J.** 2003. Systematic acquired resistance in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Tsitologija I Genetika*. 37(3): 9-15.
  - **Einhellig, F. A.** 1995. Mechanism of Action of Allelochemicals in Allelopathy. In: *Allelopathy Organisms, Processes, and Applications*; Inderjit, Dakshini K.M.M., Einhellig F.A. Eds.; ACS Symposium Series 582; American Chemical Society: Washington DC; pp. 96-116.
  - **Elffo, J. N.** 1998. Which extract should be used for the screening and isolation of antimicrobial components from plants. *Journal of Ethnopharmacology*. 60: 1-8.
  - **Falter, P., Vassalo, J., Carlton & Daston, G.,** 2006. A safety assessment of coumarin taking into account species-specificity of toxicokinetics. *Food and Chemical Toxicology*, 44: 462-475.
  - **Finegold, S. M. & Jo Baron, E.** 1989. Métodos para evaluar la efectividad antimicrobiana. En *diagnóstico Microbiológico*. 7° edición. Medica Panamericana. Buenos Aires, Argentina.
  - **Fich, H. C. & Finch, A. N.** 1974. Los hongos comunes que atacan cultivos en América Latina. Ed. Trillas. México. pp. 58.
  - **García, B. A. M.** 2003. Estudios fitoquímico y antibacteriano de *Prosopis laevigata* (H. B. ExWild, mexquite de Zapotitlán de las Salinas, Puebla. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas. FES Iztacala. UNAM.
  - **García, J. E.** 1999. Antimicrobianos en medicina. Sociedad Española de Quimioterapia. España. pp. 837
  - **Gil, A., Ghera, C.M., Leicach, S.** 2000. Essential oil yield and composition of *Tagetes minuta* accessions from Argentina. *Biochem. Syst. Ecol.* 28: 261-274.
  - **Gros, G. E., Pomilio, A., Seldes, A. & Burton, G.** 1985. Introducción al estudio de los productos naturales. Secretaría general de los Estados Americanos. Programa de Desarrollo Científico y Tecnológico, Washington. pp. 147.
  - **Hammer, K. A., Carson, C. F. & Riley, T. V.** 2004. Antifungal effects of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and its components on *Candida albicans*, *Candida glabrata* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 53: 1081-1085
  - **Harborne, J. B.** 1999. Recent Advances in Chemical Ecology. *Nat. Prod. Rep.* 16: 509-523.
  - **Harborne, J. B & Dey. P. M.** 1989. *Methods in Plant Biochemistry*. Vol. I. plant Phenolics. ED. Academic Press. USA.

- 
- **Harvey, A.** 2000. Strategies for discovery drugs from previously unexplored natural products. *Drug Discovery Today*. 5(7): 294-300.
  - **Heinrich, M.** 2000. Ethnobotany and its role in drug development. *Phytotherapy Research* 14: 479-488.
  - **Heinrich, M., Robles, M., West, J.E., Ortiz de Montellano, B., Rodríguez, E.** 1998. Ethnopharmacology of Mexican Asteraceae (Compositae). *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 38: 539-550.
  - **Helander, I. M., Alakomi, H. L., Latva-Kala, K., Mattila-Sandholm, T., Pol, I., Smid, E. J., Gorris, L. G. M., Wright, A. V.** 1998. Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 46: 3590-3995.
  - **Hernández, T., Canales, M., Avila, J.G., Duran, A., Caballero, J., Romo de Vivar, A., & Lira, R.,** 2003. Ethnobotany and antibacterial activity of some plants used in traditional medicine of Zapotitlán de las Salinas, Puebla (México). *Journal of Ethnopharmacology* 88: 181-188.
  - **Hernández, D. T. C.** 2004. Etnobotánica y actividad antimicrobiana de algunas plantas tradicionales usadas en la medicina tradicional del Valle de Zapotitlán de las salinas, Puebla. Tesis de Doctorado en Ciencias. UNAM. FES-Iztacala. pp. 163.
  - **Ito, C., Itoigawa, M., Mishina, Y., Cechinel-Filho, V., Enjo, F., Tokuda, H., Nishino, H., Furukawa, H.** 2003. Chemical constituents of *Calophyllum brasiliense*. 2. Structure of three new coumarins and cancer chemopreventive activity of 4-substituted coumarins. *Journal Natural. Products*. 66(3): 368-371.
  - **Jayme, V., A. R. Cortes, et al.** 1998. Effect on rat uterus contractility of *Tagetes lucida* Cav leaf extracts. *Phyton* 62(1-2): 161-165.
  - **Jeug-leun M., Chiu-Ping C., Pou-Chuan H.** 2001. Antimicrobial Effect of Extracts from Chines Chive, Cinnamon, and Cornic Fructs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49: 183-188.
  - **Kaufman, P.B. Cseke, L. J. Warber, S., Duke, J. A. & Brielman, H. I.** 1999. Natural products from plants. CRC Press, Boca Ratón, FL.
  - **Koneman, W.E.** 1996. Diagnóstico microbiológico. Ed. Médica Panamericana, México. pp. 439.
  - **Lambers, H., Chapin, F. S. & Pons, T. L.** 1998. Plant physiology ecology. Springer. United States of America. pp. 427.

- 
- **Laurin, P., Ferroud, D., Schuio, L., Klich, M., Dupus-Hamelin, C., Mauvais, P., Lassaige, P., Bonnefoy, A., & Musicki, B.,** 1999. Structure-activity relationship in two series of aminoalkyl substituted coumarin inhibitor of Gyrase B. *Biorganic & Medical Chemistry Letters*. 9: 2875-2880.
  - **Lee, H-B., Lee, S-M., Kwon, H-J., Hong, K-S., Kim, J-S., Cho, K-Y., & Kim, Ch-J.** 2003. Evaluation of plant derived compounds as natural herbicidal agents. *Korean Journal Weed Science*. 23(2): 135-142.
  - **Martinez, J.L. & Baquero, F.** 2002. Interactions among strategies associated with bacterial infection: Pathogenicity and Antibiotic Resistance. *Clinical Microbiology Reviews*. 15(4): 647-679.
  - **Martínez, M.** 1935. *Plantas Medicinales de México*. Ed. Porrúa, México DF. 65 pp.
  - **McGaw, L.J., Pager, A.C., van Staden, J.,** 2000. Antibacterial anthelmintic and antiamebic activity in South African medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*. 72: 247-263.
  - **Mims, C.** 1999. *Microbiología Médica*. 2ª edición. Ed. Harcourt Brace. España. pp. 582
  - **Morrissey, J. P. & Osbourn, A. E.** 1999. Fungal resistance to plant antibiotics as a mechanism of pathogenesis. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 63(3): 708-724.
  - **Mossel, D. A. A., Moreno B. & Struijic. B. C.** 2003. *Microbiología de los alimentos*. 2ª edición. Ed. Acribia, S, A. España. pp.152-197 .
  - **Mucciarelli, M.; Camusso, W.; Berteá, C. M.; Bossi, S.; Maffei, M.** 2001. Effect of (+)-pulegone and other oil components of *Mentha piperita* on cucumber respiration. *Phytochemistry*. 57: 91-98.
  - **Murray, R. D.** 1978. Naturally occurring plant coumarins. *Forts der Chemie Organischer Natursstoffe*. 35: 199-300.
  - **Murphy, M.** 1999. Plants products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Review*. American Society for microbiology. 12 (4): 564-582.
  - **Myrvin, Q. N., Weisner, R. S.** 1991. *Bacteriología y Micología Médica*. Ed. Interamericana McGraw Hill. México. pp. 362-370, 650-658.
  - **Ngwendson, J.N., Bedir, E., Efangé, S.M.N., Okunji, C.O., Iwu, M.M., Schuster, B.G., Khan, I.A.** 2003. Constituents of *Peucedanum zenkeri* seeds and their antimicrobial effects. *Pharmazie*. 58(8): 587-589.

- 
- **Nice, J.** 1993. Hierbas medicinales y recetas caseras. Primera edición. México. Ed. Paidós. pp. 11-13.
  - **Oleszek, W.** 2002. Dietary phytochemicals and human health, *Phytochemistry Reviews*, 1: 163-166.
  - **Ríos, T., Flores, M.** 1976. Estudio químico de los *Tagetes*. I. *Rev. Latinoam. Química*. 7: 33-36.
  - **Reutrakul, V., Leewanich, P., Tuchinda, P., Pohmakotr, M., Jaipetch, T., Sophasan, S., Santisuk, T.** 2003. Cytotoxic coumarins from *Mammea harmandii*. *Planta Medica*. 69(11): 1048-1051.
  - **Rzedowski, J. & Equihua, M.** 1987. Atlas cultural de México. Ed. Secretaría de Educación Pública. Instituto Nacional de Antropología e Historia. Dpo. Editorial Planeta. México. pp. 14-16.
  - **Sanghyun, L., Lee, Y-S., Jung, S-H., Shin, K-H., Kim, B-K., Kang, S-S.** 2003. Antioxidant activities of decursinol angelate and decursin from *Angelica gigas* roots. *Natural Product Sciences*. 9(3): 170-173.
  - **Schinkovitz, A., Gibbons, S., Stavari, M., Cocksedge, M.J., Bucar, F.** **Ostruthin** 2003: an antimycobacterial coumarin from the roots of *Peucedanum ostruthium*. *Planta Medica*. 69(4): 369-371.
  - **Sheppard-Hanger Sylla.** 1998. *The Aromatherapy Practitioner Reference Manual*, Tampa.
  - **Soberon, M. J. & Llorente, J. B** 1993. La comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad de México. (CONABIO). *Revista de la Sociedad Mexicana de Historia Natural*. Vol. Español (XLIV): 3-7.
  - **Sohn, H. Y., Son, K. H., Kwon, G. S. & Kang, S. S.** 2004. Antimicrobial and cytotoxic activity of 18 prenylated flavonoides isolated from medicinal plants: *Morus alba* L., *Morus mongolica* Schneider, *Broussonetia papyrifera* (L.) Vent, *Sophora flavescens* AIT and *Echinophora Koreensis* Nakai. *Phytomedicine*. 11: 666-672.
  - **Sunthitikawinsakul, A., Kongkathip, N., Kongkathip, B., Phonnakhu, S., Daly, J.W., Spande, T.F., Nimit, Y., Napaswat, C., Kasisit, J., Yoosook, C.** **Anti-HIV-1 limonoid** 2003: first isolation from *Clausena excavata*. *Phytotherapy Research*. 17(9): 1101-1103.
  - **Van der Berghe, D.A., & Vlietinck, A. J.** 1991. Screening methods for antibacterial agents from higher plants. En: *Methods in plant biochemistry*. Vol.6 "Assays for

---

Bioactivity “. Edited by Hostettmann, K. Series editor Dey P.M. Academic Press. New York, USA. pp. 47-71.

- **Verporte, R.** 1998. Exploration of nature's chemodiversity: the role of secondary metabolites as leads in drug development. *Drug Discovery Today*. 3(5): 232-238.
- **Villarreal-Q, José A., De La Rosa-I, Manuel.** A new variety of *Tagetes moorei* (Asteraceae), a poorly known species from central Mexico. *Brittonia*: Vol. 54, No. 3, pp. 164–167.
- **Villaseñor, J. L.** 2003. Diversidad y distribución de las Magnoliophyta de México. *Interciencia* 2: 160-167.
- **Vivanco, J. M., Cosio, E., Victor, M., Loyola-Vargas & Flores, H. E.** 2005. Mecanismos químicos de defensa de las plantas. *Scientific American Latinoamérica*. pp. X: 68-75.
- **Wang, H., Bun, T. N.** 2002. Isolation of an antifungal thaumatin like protein from kiwi fruits. *Phytochemistry*. 61: 1-6.
- **Wing, M.** 2000. Functions of plants secondary metabolites and their exploitation in Biotechnology. *Annual Plant Reviews*. Vol 3. Function of metabolites secondary. Sheffield Academic Press. pp. 1-6.
- **YenMei, L., Hsiao, G., Chang, J-W., Sheu, J-R., Yen, M-H.** 2003. Scoparone inhibits tissue factor expression in lipopolysaccharide activated human umbilical vein endothelial cells. *Journal Biomedical Science*. 10(5): 518-525.