



**Universidad Nacional Autónoma de México**  
**Facultad de Estudios Superiores Iztacala**

**“Determinación y comparación de la composición química y la actividad antibacteriana y antifúngica de *Tagetes erecta* L. (Cempasúchil), cultivada en hidroponía y en condiciones silvestres”.**

**TESIS**  
**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE BIÓLOGO**  
**PRESENTA:**

**Hernández Nava Gabriel Alejandro**

**Director de tesis:**  
**M. en C. José Martínez Aguilar**

**Los Reyes Iztacala, Edo. de México. 2009**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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: Dra. Ma. Margarita Canales Martínez.*  
*Vocal: Dra. Claudia Tzasna Hernández Delgado.*  
*Secretario: M. en C. José Martínez Aguilar.*  
*Suplente: M. en C. María Edith López Villafranco.*  
*Suplente: Bióloga Irma Rosa Castillo Padilla.*

*El presente trabajo se realizó en el Taller de Equipo de Laboratorio y Enseñanza (TELE) y en el laboratorio de Fitoquímica en la Unidad de Biotecnología y Prototipos (UBIPRO) de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM. Contando con la colaboración del Instituto de Química de la UNAM.*

*Agradezco por permitirme el uso de sus instalaciones, así como al personal académico.*



*Agradecimientos.*

*Quiero agradecer especialmente a todo el grupo de investigadores, por la asesoría, consejos y observaciones que fueron necesarios para la realización de este trabajo.*

*A mi director de tesis el M. en C. José Martínez Aguilar por su paciencia, dedicación y energías puestas durante la elaboración de esta tesis. Siempre estaré agradecido con usted.*

*A mis sinodales, por su dedicación, enseñanzas y recomendaciones durante la revisión de este proyecto.*

*A las Dras. Tzasna y Margarita, por permitirme conocerlas, dos grandes seres humanos, gracias por sus consejos y los buenos momentos que pasamos durante mi estancia en ese estupendo lugar que fue el lab, son muchos los aprendizajes que me dejan.*

*Al M. en C. Ángel Durán por el apoyo brindado en la parte estadística del proyecto.*

*A todas las personas del T.E.L.E., Principalmente a Armando, Daniel y Enrique, por toda la ayuda que me brindaron.*

*Al equipo de Fitoquímica, por dejarme disfrutar junto con ustedes de todos los instantes que pasamos en el laboratorio.*

*Por último agradezco a la vida que me ha puesto en el momento, lugar y con las personas indicadas con el fin disfrutar, conocer y principalmente aprender de todas las experiencias vividas durante el camino que he recorrido.*

---



## *Dedicatoria*

*Dedico esta tesis a mis padres Georgina Nava y Gracian Hernández quienes me han dado la vida.*

*A mi madre, quien ha sabido guiarme para ser un hombre que puede valerse por sí mismo, por tu amor, fuerza, coraje y ejemplo, demostrándome que eres una guerrera en todo el sentido de la palabra.*

*A mi familia que son el pilar y motor para realizar las metas que me propongo.*

*A mi tía Imelda Nava, por su cariño, afecto y amistad y por que has estado en los momentos que más he necesitado.*

*A mi madrina Ángela Sánchez, por sus consejos y ejemplo de vida.*

*A mis tíos y primos, con los que he pasado momentos importantes en mi vida*

*También dedico este trabajo a mis amigos, que han sido los hermanos que he escogido para caminar junto en esta vida, gracias por querer compartir conmigo su esencia y buena vibra. Gracias por que llenan mi vida de alegría, por estar a mi lado, por apoyarme y brindarme su afecto incondicionalmente, por todas las experiencias vividas, los llevo siempre en mi mente.*

*Gabriel Alejandro Hernández Nava.*

*“Por mi raza hablará el espíritu”*

*El camino no termina apenas comienza....*

---



## Índice general

	<b>Página</b>
<b>Resumen</b>	I
<b>Introducción</b> .....	1
Descripción botánica de <i>Tagetes erecta</i> L.....	4
<b>Antecedentes</b> .....	6
<b>Objetivo general</b> .....	8
Objetivos particulares.....	8
<b>Materiales y Método</b> .....	9
Colecta de ejemplares.....	9
Establecimiento del cultivo hidropónico.....	9
Obtención de extractos.....	10
Extracción del aceite esencial.....	10
Determinación de los compuestos presentes en los aceites esenciales.....	10
Evaluación de la actividad antibacteriana.....	11
Microorganismos utilizados.....	11
Evaluación cualitativa.....	11
Evaluación cuantitativa.....	11
Evaluación de la actividad antifúngica.....	12
Microorganismos utilizados.....	12
Evaluación cualitativa.....	12
Evaluación cuantitativa.....	13
Pruebas estadísticas.....	13

---



<b>Resultados.....</b>	14
Registro de ejemplar herborizado.....	14
Establecimiento del cultivo hidropónico.....	15
Rendimiento del aceite esencial y extractos obtenidos.....	16
Composición de los aceites esenciales.....	17
Evaluación de la actividad antibacteriana.....	21
Evaluación cualitativa.....	21
Evaluación cuantitativa .....	25
Evaluación de la actividad antifúngica.....	26
<b>Análisis y discusión.....</b>	27
Cultivo hidropónico.....	27
Extractos.....	29
Composición de aceites esenciales.....	31
Evaluación antibacteriana.....	34
Evaluación cualitativa.....	34
Evaluación cuantitativa.....	38
Evaluación antifúngica.....	42
Obtención de metabolitos secundarios de interés.....	43
<b>Conclusión .....</b>	44
<b>Bibliografía.....</b>	46
<b>Anexos.....</b>	54
<b>Apéndice 1.</b>	
Composición de la solución nutritiva.....	54
<b>Apéndice 2.</b>	
Extracción por arrastre de vapor de aceites esenciales.....	55
<b>Apéndice 3.</b>	
Método de difusión en agar o de Kirby-Baüer.....	56

---



**Apéndice 4.**

Determinación de la Concentración mínima inhibitoria y Concentración mínima bactericida.....	58
---	----

**Apéndice 5.**

Método cualitativo de inhibición del crecimiento radial.....	59
--	----

**Apéndice 6.**

Espectros de masa de aceite esencial de <i>Tagetes erecta</i> .....	61
---	----

---



## Índice de cuadros

	<b>Página</b>
<b>Cuadro 1.</b> Datos generales del ejemplar herborizado.....	14
<b>Cuadro 2.</b> Rendimiento del aceite esencial y extractos de <i>T. erecta</i> .....	16
<b>Cuadro 3.</b> Composición química del aceite esencial de <i>T. erecta</i> .....	19
<b>Cuadro 4.</b> Actividad antibacteriana de los extractos de <i>T. erecta</i> .....	21
<b>Cuadro 5.</b> Concentración mínima inhibitoria y Concentración mínima bactericida de los extractos de <i>T. erecta</i> .....	25

---



## Índice de figuras

	Página
<b>Fig. 1.</b> planta silvestre de <i>T. erecta</i> (Cempasúchil).....	4
<b>Fig. 2.</b> Distribución de <i>T. erecta</i> en México.....	5
<b>Fig. 3.</b> Ejemplar herborizado de <i>T. erecta</i> .....	14
<b>Fig. 4.</b> Comparación cualitativa de <i>T. erecta</i> cultivada en hidroponía y planta silvestre .....	15
<b>Fig. 5.</b> Rendimiento de aceite y extractos de la parte aérea de <i>T. erecta</i> de ambos tratamientos. ....	16
<b>Fig. 6.</b> Cromatograma de aceite esencial de <i>T. erecta</i> cultivado en hidroponía.....	17
<b>Fig. 7.</b> Cromatograma de aceite esencial de <i>T. erecta</i> silvestre.....	18
<b>Fig. 8.</b> Actividad antibacteriana (cualitativa) de <i>T. erecta</i> cultivado y silvestre .....	22
<b>Fig. 9.</b> Relación entre los factores evaluados.....	22
<b>Fig. 10.</b> Actividad antibacteriana en contra de <i>S. aerus</i> .....	23
<b>Fig. 11.</b> Actividad antibacteriana en contra de <i>S. epidermidis</i> .....	23
<b>Fig. 12.</b> Gráfica de interacciones: planta, extracto y grupo bacteriano.....	24
<b>Fig. 13.</b> Gráfica de interacciones planta, extracto y cepa.....	24

---



## Resumen

Los cultivos hidropónicos son definidos como el crecimiento de las plantas sin suelo, actualmente no se tienen reportes de plantas medicinales desarrolladas bajo tal técnica, lo que demanda la realización de estudios que permitan conocer su comportamiento bajo tales condiciones, ya que en la última década ha resurgido interés sobre el descubrimiento de antimicrobianos de origen vegetal debido a que presentan ventajas en relación a medicamentos alópatas. Una especie empleada en la medicina tradicional mexicana es Cempasúchil (*Tagetes erecta*) a la que se le adjudicando propiedades antimicrobianas.

El presente estudio tuvo como objetivo, determinar si existe variación en la composición química y por consiguiente en la actividad biocida de los extractos de *T. erecta* cultivada en hidroponía en comparación con individuos silvestres.

De la parte aérea de la planta se obtuvo el aceite esencial y los extractos: metanólico, hexánico y un precipitado. Mediante un análisis de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas se determinaron en el aceite esencial: 7 compuestos en planta hidropónica y 8 en silvestre, mostrando que en ambos tratamientos la mayoría de los compuestos fueron monoterpenos, sesquiterpenos y compuestos nitrogenados.

Se realizaron pruebas cualitativas y cuantitativas para determinar actividad antibacteriana a los extractos en contra de 14 cepas, observándose en la evaluación cualitativa que los 3 extractos presentaron actividad contra bacterias Gram negativas y positivas. De acuerdo a un análisis de varianza (ANOVA) se determinaron interacciones entre los factores: origen de la planta, extracto, grupo bacteriano y cepa. En las pruebas cuantitativas, el extracto metanólico de planta cultivada mostró valores menores de CMI y CMB en comparación con el mismo extracto de planta silvestre, las cepas más sensibles fueron: *S. dysenteriae*, *Y. enterocolitica* y dos cepas de *V. cholerae*. El extracto precipitado de planta silvestre mostró valores de CMI y CMB bajos contra *S. epidermidis*. Del mismo modo, se realizaron pruebas cualitativas y cuantitativas para determinar acción fungicida a los extractos en contra de tres cepas de hongos y 3 levaduras, demostrado no tener actividad. Con lo anterior se determinó que factores biológicos y físicos intervienen en la síntesis de metabolitos secundarios en *T. erecta*, tanto en la composición química de los compuestos, como en su actividad antibacteriana al demostrar diferencias en las evaluaciones de plantas hidropónicas y silvestres.



Debido a que se han identificado compuestos biocidas u otros, de interés económico en *T. erecta*, se dio a la tarea de generar métodos para la obtención de dichos compuestos, la técnica hidropónica resulta una buena alternativa para la obtención de metabolitos secundarios, su importancia radica en que bajo estas condiciones, los trabajos son repetitivos, obteniendo resultados similares; en esta investigación se establecieron las bases de los parámetros para la estandarización del cultivo hidropónico de *T. erecta* con el fin de maximizar el aprovechamiento de metabolitos secundarios con propiedades antibacterianas.



## Introducción

En la obtención de hortalizas, flores y productos agrícolas existen diversas técnicas, que van desde las tradicionales (cultivo en tierra), hasta las más recientes como el cultivo en hidroponía, este último presenta ventajas por ser un sistema intensivo que permite optimizar los recursos tanto agronómicos como humanos y por consiguiente los recursos económicos (Hutewall, 1979), al tener una mayor producción por área se mejora la calidad y hay un control más eficientemente de plagas y enfermedades, optimizando la mano de obra (Penningsfeld y Kurzman, 1983).

Fue a comienzos de los años treinta del siglo pasado en que, W. F. Gericke, de la Universidad de California, puso los ensayos de laboratorio de nutrición vegetal a escala comercial, denominando a este sistema de cultivo en nutrientes “Hidroponics”, palabra derivada de las griegas *Hydro* (agua) y *Ponos* (labor, trabajo), literalmente “trabajo en agua” (Resh, 2001).

Los cultivos hidropónicos pueden ser definidos como el crecimiento de las plantas sin suelo, usando en su lugar un medio inerte como sustrato, al cual se añade una solución que contiene los elementos necesarios: macro y micronutrientes, para el crecimiento y desarrollo de la planta. El interés en la práctica de los cultivos hidropónicos inicia con el desarrollo de la industria de los invernaderos, debido a la necesidad de cambiar los cultivos en tierra, para evitar los problemas de estructura, fertilidad y enfermedades; como resultado, los investigadores comenzaron a valorar el uso potencial del cultivo hidropónico para remplazar los métodos convencionales (Resh, 2001). Los invernaderos para cultivo en hidroponía representan una excelente alternativa, por el incremento de la producción, mejora de la calidad y la precocidad de la cosecha. Se orienta, a la producción de plantas de origen climático distinto del ambiente natural donde se desea cultivar, además permite el control de los factores climáticos, y asimismo protege el cultivo de factores adversos (Alpi y Tognoni, 1991).



De acuerdo a la literatura, los principales estudios realizados en cultivos hidropónicos han sido en cuanto a la producción de hortalizas, plantas ornamentales, forrajes para el ganado, etc., sin embargo en la producción de plantas medicinales no existen trabajos suficientes. La necesidad de realizar dichos estudios de cultivos hidropónicos de plantas medicinales se debe a que en la última década ha resurgido en el sector público y privado una búsqueda e interés impresionante sobre el descubrimiento de productos naturales (Boyd, 1996). El uso de compuestos antimicrobianos de origen vegetal podría tener un gran impacto en el control de enfermedades (Verástegui *et al.*, 1996).

Aproximadamente un 60% de la población mundial ha usado plantas con fines medicinales, lo que indica que los productos naturales son reconocidos como un recurso de importancia terapéutica (Harvey, 2000). El interés por estos compuestos ha crecido recientemente al demostrarse efectos: antibacteriano, antifúngico y anticancerígeno (Dey y Harborne, 1991; Croteau *et al.*, 2000).

Por lo anterior es conveniente recalcar que la importancia de los estudios actuales sobre las plantas medicinales, radica en que presentan ventajas indiscutibles con relación a medicamentos alópatas o fármacos sintéticos, ya que estos provocan efectos negativos colaterales (McPartland y Pruitt, 1999), como el crear resistencia en algunas cepas patógenas o de importancia médica (Donald *et al.*, 1995) lo cual, hace que cada vez sean más las personas que regresen a la utilización de alternativas naturales.

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

Los metabolitos secundarios son compuestos que no son necesarios en el metabolismo básico, sin embargo, son sustancias ecológicamente eficaces, ya que tienen diversas funciones entre la planta y su medio (Croteau *et al.*, 2000; Strasburger *et al.*, 2002) como: defensa ante patógenos (virus, bacterias y hongos) y algunos depredadores como moluscos, nemátodos, artrópodos y vertebrados (Bruneton, 1991), causan repelencia y



toxicidad (Wink, 1999), así como también pueden atraer animales para la polinización y dispersión de semillas, (Gros *et al.*, 1985). Estos compuestos también le confieren diversas propiedades útiles al hombre, como antisépticos, espasmolíticos, sedantes, expectorantes, antimicrobianos, etc. (Bruneton, 1991).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda a los países en vías de desarrollo que, por una parte, incidan en programas centrados en la identificación y el cultivo de las plantas medicinales utilizadas por la medicina tradicional, y por otra parte de tecnologías que evalúen la calidad y eficiencia de estas medicinas con la ayuda de técnicas modernas (Fleurentín y Pelt, 1981).

En nuestro país, la medicina tradicional ocupa un lugar muy importante en la realidad médica. Así, mientras la medicina alópata cubre el 40 % de los servicios de salud, cerca de 20 millones de habitantes recurren al uso de plantas medicinales. Gran parte de la medicina tradicional es aún rescatable y puede ser un importante campo para implementar nuevos planes de salud, que combinen el conocimiento popular, con el científico (Argueta *et al.*, 1994; Torres, 1999).

El Herbario Medicinal del Instituto Mexicano del Seguro Social tiene una colección aproximada de más de 14 mil ejemplares que apoyan los estudios de plantas medicinales de México (Aguilar *et al.*, 1994); ya que nuestro territorio cuenta con una gran riqueza y tradición ancestral sobre el uso de estas plantas; se estima que en la actualidad cerca de 300 especies son empleadas con esta finalidad (Estrada, 1985).

Los metabolitos con propiedades terapéuticas están distribuidos en limitados grupos taxonómicos dentro del reino vegetal (Croteau, 2000) y entre las familias botánicas más importantes de plantas utilizadas en la medicina tradicional mexicana está Asteraceae (Heinrich *et al.*, 1998), vastos estudios se han realizado en géneros pertenecientes a esta familia, encontrándose propiedades curativas en muchas de ellas. Una especie que pertenece a esta familia es *Tagetes erecta* L., comúnmente llamada Cempasúchil o flor de muerto, que de acuerdo a algunos autores es utilizada en muchas regiones del país contra diversas afecciones.

### Descripción botánica de *Tagetes erecta* (Cempasúchil).

Se conoce como Cempasúchil, del náhuatl *Cempoalxóchitl* (flor de veinte pétalos), es una planta anual de hasta 1.8 m de altura. Sus tallos son estriados, glabros o pubescentes; las hojas generalmente pinnadas, con hendiduras casi hasta la nervadura central y sus bordes con dientes, presenta numerosas glándulas oleíferas. Cabezuelas solitarias o agrupadas sobre pedúnculos provistos de brácteas; flores liguladas generalmente presentes, fértiles, sus corolas amarillas o anaranjadas, las flores del disco hermafroditas de 150 a 250, involucreo campanulado, aquenios lineales o claviformes (Rzedowski, 1985).



Figura 1. Planta silvestre de *T. erecta* (Cempasúchil).

Su clasificación taxonómica se muestra a continuación:

Reino:	Plantae
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Familia:	Asteraceae
Tribu:	Tegeteae
Género:	<i>Tagetes</i>
Especie:	<i>erecta</i>
Nombre científico:	<i>Tagetes erecta</i> L.

Es nativa de México (Rzedowski, 1985) y habita en climas cálidos, secos y templados; desde los 8 a los 3900 msnm. Adaptada a distintos hábitats o cultivada en huertos, crece en milpas o zonas urbanas, asociadas a distintos tipos de vegetación como: bosques tropicales caducifolios y subcaducifolios, matorral xerófilo y bosques espinosos, mesófilo de montaña, de encino, pino y mixto pino-encino (Fig. 2) (Argueta *et al.*, 1994).

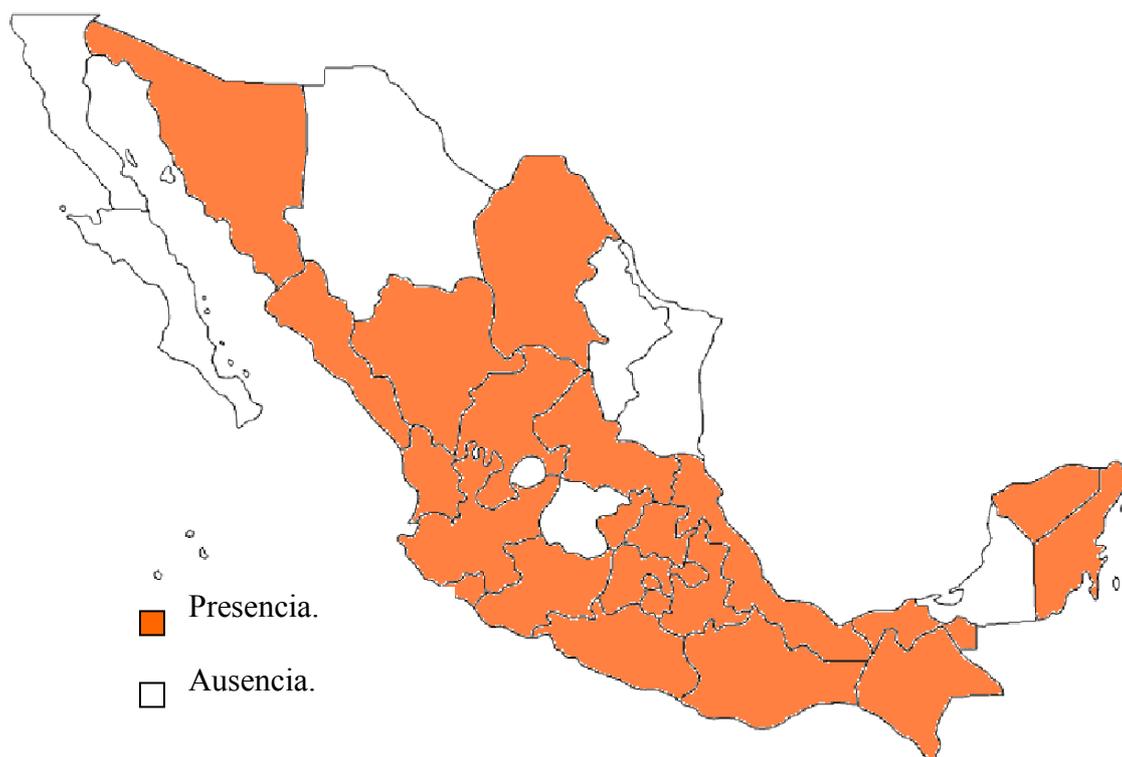


Figura 2. Distribución de *T. erecta* en México.

En el mundo, el cultivo de Cempasúchil ha adquirido importancia comercial, debido a la gran demanda que tienen sus flores por ser fuente rica de carotenoides y sus derivados xantofílicos, utilizados en la elaboración de alimentos balanceados y también, como colorantes para alimentos de consumo humano (Khachik, 1995); los principales usos de esta especie en nuestro país son, ornamental, pigmento para las carnes de aves y yemas de huevo; para teñir lana, pieles, tela e hilos. Las principales entidades productoras son Durango, Guerrero, Jalisco, Michoacán y Oaxaca (Rzedowski, 1985).



## Antecedentes

- La referencia más antigua se encuentra en el Códice Florentino, del siglo XVI donde se señala como una planta ceremonial y estética. Es una especie medicinal muy empleada en distintas partes de México, se recomienda principalmente en padecimientos digestivos. Para el tratamiento de las distintas enfermedades es muy común encontrar que se preparen las hojas con o sin flor; ya sea en cocimiento, infusión, sahumero o fritas; puede aplicarse oralmente o localmente e inhalada, siendo en algunos casos mezclada con otras plantas o materiales acompañantes (Argueta *et al.*, 1994).
- Hernández (2003) menciona a *T. erecta* como una planta usada por los pobladores en la medicina tradicional, en la localidad del Valle de Zapotitlán de las Salinas, Puebla para curar afecciones del tracto digestivo.
- Estudio etnobotánicos como los hechos por Andrade-Cetto, (2008) realizados en la localidad de Tlanchinol, Hidalgo, reportan la utilización de esta especie, por parte de los pobladores para tratar diferentes padecimientos como heridas, bronquitis, dolores estomacales, etc.; además, Giovannini y Heinrich (2008), reportan su uso en la medicina tradicional de Mazatecos en Oaxaca, mencionan que *T. erecta* (*Xka-scion-ko*) es utilizada como planta medicinal, utilizando las hojas contra la fiebre.
- Se han realizado estudios fitoquímicos en los que se han caracterizado compuestos presentes en las hojas de *T. erecta*, donde se han identificado monoterpenos hidrocarbonados, oxigenados y sesquiterpenos hidrocarbonados y flavonoides como feritrin, camferol y su ramnósido. Las flores son ricas en carotenoides, así como monoterpenos y el flavonoide quercetagietrina. En las flores y en las raíces se han detectado componentes azufrados. El aceite esencial obtenido de hojas y tallos presenta actividad antibiótica contra las bacterias *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* y *Escherichia*



*coli* y los hongos *Candida albicans*, *Candida utilis*, *Aspergillus niger* y *A. viride* (Argueta *et al.*, 1994; Ogunwande y Olawore, 2006; Chomnawang *et al.*, 2008).

- En países como India, Egipto, Nigeria, Italia y Brasil ya se tienen reportes de cultivos de esta especie por sus altas demandas de sus metabolitos secundarios (Marotti *et al.*, 2004; Singh *et al.*, 2006; Ogunwande y Olawore 2006).
- Se han realizado estudios del cultivo de *T. erecta* bajo la técnica hidropónica como biorremediador de aguas residuales (Jarecki *et al.*, 2005), así como de biorremediador de suelos (Malarkodi, *et al.*, 2008).

Actualmente no se tienen reportes del cultivo de plantas medicinales bajo la técnica hidropónica, lo cual demanda la realización de estudios científicos que permitan conocer el comportamiento de estos organismos bajo tales condiciones, ya que las plantas suelen presentar propiedades biológicas que les son conferidas por la producción de metabolitos secundarios, cuya composición y cantidad depende de su medio. De este modo, surge la necesidad de conocer si las condiciones de la técnica de cultivo influye para que la planta produzcan o no ciertos metabolitos. Debido a lo anterior, el presente estudio tiene como objetivo el determinar si existe variación en la composición química y por consiguiente en la actividad antimicrobiana de los extractos de *Tagetes erecta* utilizando la técnica de cultivo hidropónico en comparación con individuos silvestres.



## Objetivo general

- Determinar y comparar la variación en la composición química y la actividad antibacteriana y antifúngica de *Tagetes erecta* (Cempasúchil), cultivada en hidroponía y en condiciones silvestres.

## Objetivos particulares

- Colectar plantas de *T. erecta* silvestre.
- Establecer el cultivo de *T. erecta* bajo la técnica hidropónica en condiciones de invernadero.
- Obtener el aceite esencial de la parte aérea de *T. erecta* hidropónica y silvestre.
- Determinar y comparar la composición química presente en el aceite esencial de ambos tratamientos.
- Obtener los extractos de la parte aérea de *T. erecta* hidropónica y silvestre.
- Comparar el rendimiento de los aceites esenciales y de los extractos de ambos tratamientos.
- Evaluar cualitativamente la actividad antibacteriana y antifúngica de los diferentes extractos
- Evaluar cuantitativamente la actividad antibacteriana y antifúngica de los extractos activos.



## **Materiales y Métodos**

### **Colecta de ejemplares**

Los ejemplares silvestres de *T. erecta* fueron colectados en el mes de Noviembre de 2008 en la localidad de Tecozautla, Hidalgo; que se localiza entre los paralelos 20° 32' 0" N, 99° 37' 59" O; de acuerdo con datos obtenidos en un estudio prospectivo en donde se encontró dicha especie en su estado silvestre, esta planta fue depositada en el Herbario de la FES Iztacala (IZTA) para su determinación taxonómica y obtener el No. de registro correspondiente del material botánico.

### **Establecimiento del cultivo hidropónico**

El cultivo hidropónico se realizó bajo condiciones de invernadero en el Jardín Botánico de la FES Iztacala (JABIZ) en los meses de Diciembre 2008 a Febrero de 2009. Los aquenios obtenidos de las plantas silvestres fueron germinados en un almaciguero y se trasplantaron en contenedores cuando las plántulas presentaron su primer par de hojas verdaderas. El sustrato utilizado fue una mezcla de agrolita y grava (90:10), esterilizados previamente. En cuanto a la solución nutritiva se preparó una mezcla que contenía la cantidad necesaria de nutrimentos para la especie (Apéndice 1) y el riego fue por goteo. Cabe mencionar que los parámetros dentro del invernadero como temperatura y humedad se mantuvieron constantes, con un rango para la primera entre 15 y 20 °C y el de humedad con un porcentaje del 60 %. Las observaciones del crecimiento y desarrollo de las plantas fueron registrados a lo largo del cultivo, que fue de alrededor de ocho semanas, tomándose en cuenta desde la germinación de los aquenios hasta la floración de la planta.



### **Obtención de extractos**

El extracto acuoso crudo se obtuvo a partir de la parte aérea de *T. erecta* (500 g de material fresco y fragmentado), el cual fue concentrado a sequedad. El extracto acuoso se disolvió en metanol y se realizó una partición hexánica. Los extractos obtenidos se filtraron y se concentraron mediante destilación a presión reducida en un rotavapor, finalmente éstos se colocaron en charolas de vidrio para completar la evaporación del solvente; se obtuvieron las fracciones: hexánica, metanólica y un precipitado, cada una se cuantificó y se comparó el rendimiento de ambos tratamientos en relación al peso fresco de la planta (Domínguez, 1973).

### **Extracción del aceite esencial**

La extracción del aceite esencial de ambos tratamientos de la parte aérea de planta fresca y fragmentada (500 g), se obtuvo mediante la técnica de arrastre de vapor (Domínguez, 1973) (Apéndice 2). El criterio para la extracción de aceites esenciales para el tratamiento en hidroponía fue cuando la planta floreciera. Se cuantificó el rendimiento de aceites esenciales de ambos métodos de cultivo para su comparación.

### **Determinación de los compuestos presentes en los aceites esenciales**

La determinación de los compuestos presentes en las diferentes muestras de aceite se realizó en el Instituto de Química de la UNAM, mediante un análisis en cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas. Se utilizó un cromatógrafo Hewlett Packard modelo 5809 serie II conectado a un espectrómetro de masas Jeol AX505H, utilizando una columna de 30 cm por 0.2 mm y con un diámetro interno de 0.25 mm.

Los nombres comunes de los compuestos fueron determinados con el Phytochemical Dictionary (Harbone y Baxter, 1993).



## Evaluación de la actividad antibacteriana

### Microorganismos utilizados

Se utilizaron 10 cepas Gram negativas: *Vibrio cholerae* No. 01 (no patógena), *Vibrio cholerae* INDRE 206 aislada de agua contaminada, *Vibrio cholerae* aislada de un caso clínico, *Vibrio cholerae* CDCV12 las cuales corresponden al grupo 01, productor de enterotoxinas, serotipo Inaba, biotipo El Tor., *Enterobacter agglomerans* ATCC 27155, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhi* ATCC 19430, *Yersinia enterocolitica*, *Shigella dysenteriae* donadas por el laboratorio de análisis clínico de la CUSI del campus Iztacala UNAM, *Enterobacter aerogenes* donada por el laboratorio de microbiología de la FES Cuautitlán UNAM. Además de 4 cepas Gram positivas: *Staphylococcus aureus* ATCC 12398, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis* y *Sarcina lutea* donadas por el laboratorio de microbiología de la FES Cuautitlán UNAM.

### Evaluación cualitativa

Se evaluó la actividad antibacteriana de todos los extractos (hexánico, metanólico y precipitado), de acuerdo al método de difusión en agar de Kirby-Baüer (Van den Berghe y Vlietinck, 1991) (Apéndice 3). Cada bioensayo se realizó por triplicado. Los discos fueron impregnados con 4 mg de cada uno los extractos. Como control positivo se utilizó Cloramfenicol 25 µg por disco, como control negativo se impregnaron discos con metanol y hexano. Los resultados se obtuvieron 24 horas después de incubación a 37 °C.

### Evaluación cuantitativa

Se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración bactericida mínima (CMB) utilizando el método modificado de dilución en agar (Jones *et al.*, 1987, citado y modificado por Ávila, 1996) (Apéndice 4) en las cepas que mostraron sensibilidad en la prueba cualitativa. Las concentraciones utilizadas fueron diluciones de 4.0 a 0.125 mg/ml. Cada bioensayo se realizó por triplicado. Los resultados se observaron 24 horas después de incubación a 37 °C.



## **Evaluación de la actividad antifúngica**

### **Microorganismos utilizados**

Se utilizaron 3 hongos filamentosos: *Aspergillus niger* CDBB-H-179, *Fusarium sporotrichum* ATCC NRLL3299 (donado por el laboratorio de fisiología vegetal de la UBIPRO de la FES Iztacala UNAM) y *Fusarium moniliforme* CDBB-H-265.

En cuanto a las levaduras se utilizaron 3 cepas: *Candida albicans* ATCC 10231, *C. albicans* ATCC 14065 y *Cryptococcus neoformans*, donadas por el Laboratorio de Micología y Parasitología de la Facultad de Medicina UNAM. Dr. Rubén López Martínez (responsable), Dra. Patricia Manzano Gayosso; *C. albicans* aislada de un caso clínico, donada por el laboratorio de análisis clínicos de la FES Iztacala UNAM.

### **Evaluación cualitativa**

Se evaluó la actividad de los extractos en contra de las levaduras de acuerdo al método de difusión en agar de Kirby-Baüer (Van den Berghe y Vlietinck, 1991) (Apéndice 3). Como medio de cultivo se utilizó PDA. Cada bioensayo se realizó por triplicado. Los discos fueron impregnados con 4 mg de cada uno los extractos. Como control positivo se utilizaron discos con 7 µg Ketoconazol, como control negativo se emplearon discos impregnados con cada uno de los solventes empleados. La lectura de los resultados se realizó después de 24 horas de incubación a 37 ° C.

Para evaluar la actividad en contra de los hongos filamentosos, se utilizó la técnica de inhibición del crecimiento radial descrita por Wang y Bun (2002) usando una concentración de 4 mg por disco del extracto a probar; como control positivo Ketoconazol 7 µg (Apéndice 5) y como control negativo se emplearon discos impregnados con cada uno de los solventes empleados. Todos los bioensayos se realizaron por triplicado.



### **Evaluación cuantitativa**

El ensayo contra hongos filamentosos se llevó a cabo en las cepas que mostraron actividad. Para determinar la concentración fungicida media ( $CF_{50}$ ) y la concentración fungicida mínima (CFM) se utilizó el método en el método de inhibición del crecimiento radial reportado por Wang y Bun (2002). Las concentraciones utilizadas fueron diluciones de 4.0 a 0.125 mg/ml. Cada bioensayo se realizó por triplicado.

### **Pruebas estadísticas**

Los resultados obtenidos de la evaluación de la actividad antibacteriana y antifúngica se les realizó un análisis estadístico descriptivo y un análisis de varianza multifactorial (ANOVA) para determinar si existen diferencias significativas entre ambos tratamientos, siendo los factores: Planta (cultivado y silvestre); extracto (metanólico y precipitado); grupo de bacteria (Gram positiva y negativa); cepa; así como la interacción entre las variables antes mencionadas. Se realizaron las representaciones de los resultados por medio de gráficas de diagrama de caja e histogramas.

## Resultados

Los resultados obtenidos en la investigación de este proyecto se muestran en los siguientes cuadros, figuras y gráficas, su análisis y discusión se muestran posteriormente.

### Registro de ejemplar herborizado

Los datos generales de la planta silvestre se observan en el cuadro 1 y en la figura 3 se muestra el ejemplar herborizado.

Cuadro 1. Datos generales del ejemplar herborizado.

<b>Familia</b>	Asteraceae
<b>Nombre científico</b>	<i>Tagetes erecta</i> L.
<b>Nombre común</b>	Cempasúchil
<b>Número de registro</b>	IZTA 1794



Figura 3. Ejemplar herborizado de *T. erecta*. Se determinó dicha especie en el Herbario IZTA  
**Establecimiento del cultivo hidropónico**

Se pudo establecer el cultivo hidropónico de *T. erecta* con las condiciones antes mencionadas, es importante señalar que el porcentaje de germinación de los achenios fue del 50 %. Las diferencias morfológicas halladas en las plantas crecidas en hidroponía se pueden observar en la Fig. 4.

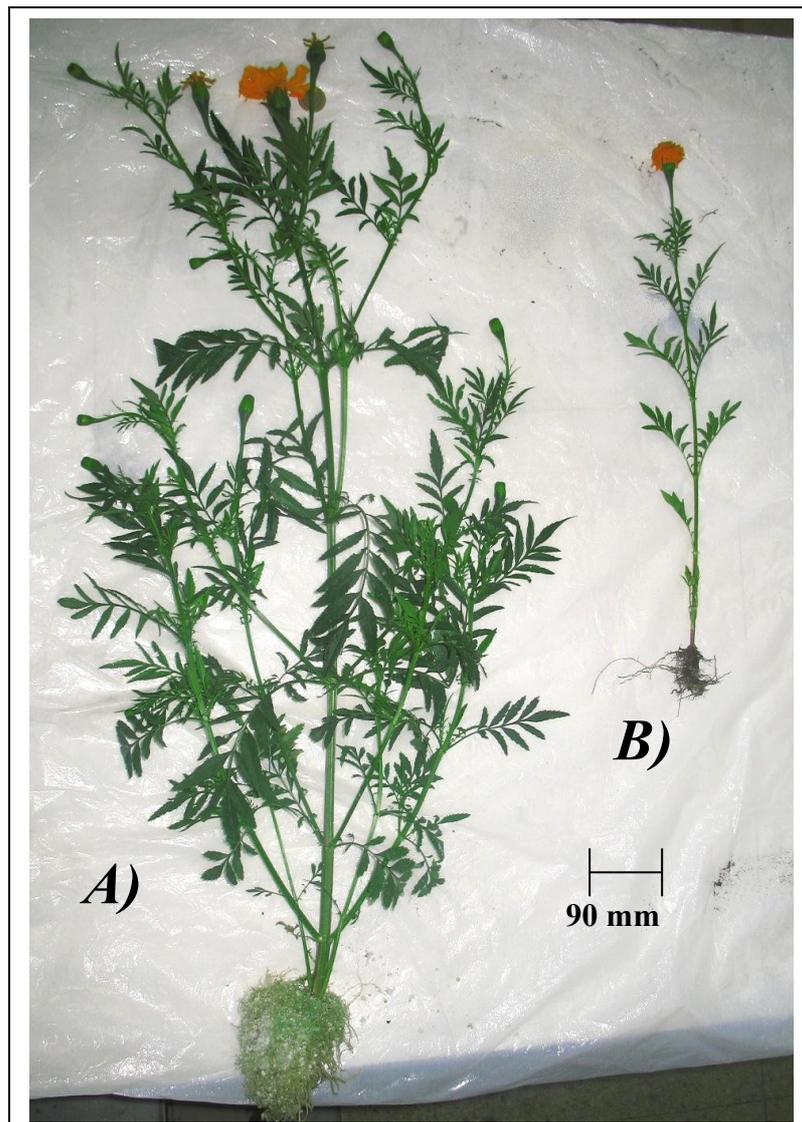


Figura 4. Comparación cualitativa de *T. erecta* cultivada en hidroponía (A) y planta silvestre (B). Se observa un mayor desarrollo de raíz, tallo, hoja y flor en la planta cultivada en relación con la planta silvestre.

### Rendimiento del aceite esencial y extractos obtenidos.

El rendimiento del aceite esencial, así como de los tres extractos de ambos tratamientos se muestra en el cuadro 2 y figura 5.

Cuadro 2. Rendimiento del aceite esencial y extractos de *T. erecta*. (Los valores se expresan en porcentaje).

	Aceite Esencial	Metanólico	Extracto Hexánico	Precipitado
<b>Hidroponía</b>	0.02	3.04	0.07	1.64
<b>Silvestre</b>	0.02	3.04	0.22	1.81

Referidos a 500 g de planta fresca.

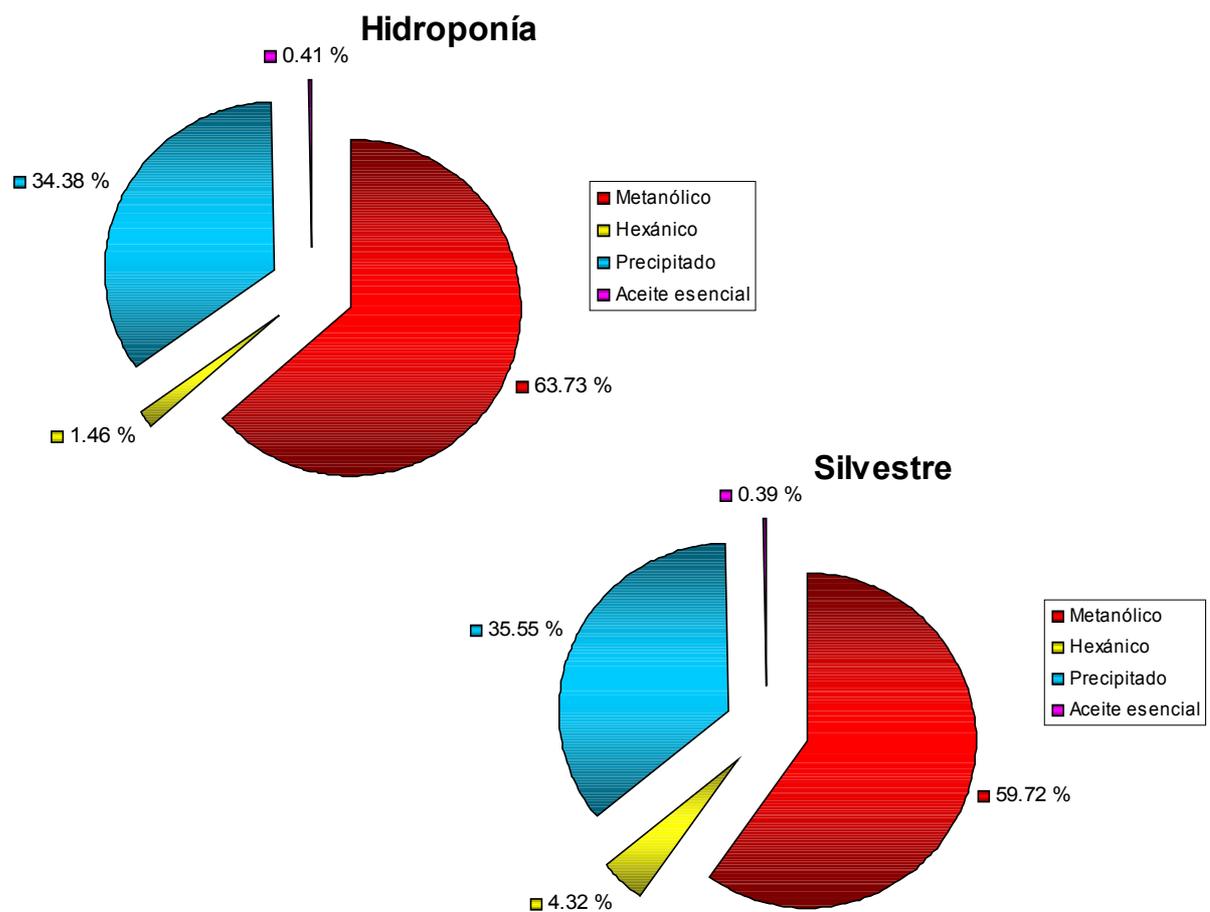


Figura 5. Rendimiento de aceite esencial y extractos de la parte aérea de *T. erecta* de ambos tratamientos. Se tomó como el 100 % el total del rendimiento del aceite y los extractos y se representan en porcentaje.

## Composición de los aceites esenciales

El aceite de la planta silvestre mostró una densidad de 0.891 gr/ml, mientras que para la planta cultivada fue de 0.878 gr/ml. En los cromatogramas de los aceites esenciales de *T. erecta* hidropónico (Fig. 6) y silvestre (Fig.7) se observan diferentes picos, los cuales por el tiempo de retención y por sus patrones de fragmentación se identificó la presencia de 7 compuestos para planta cultivada y ocho en planta silvestre, se pueden observar en el cuadro 3.

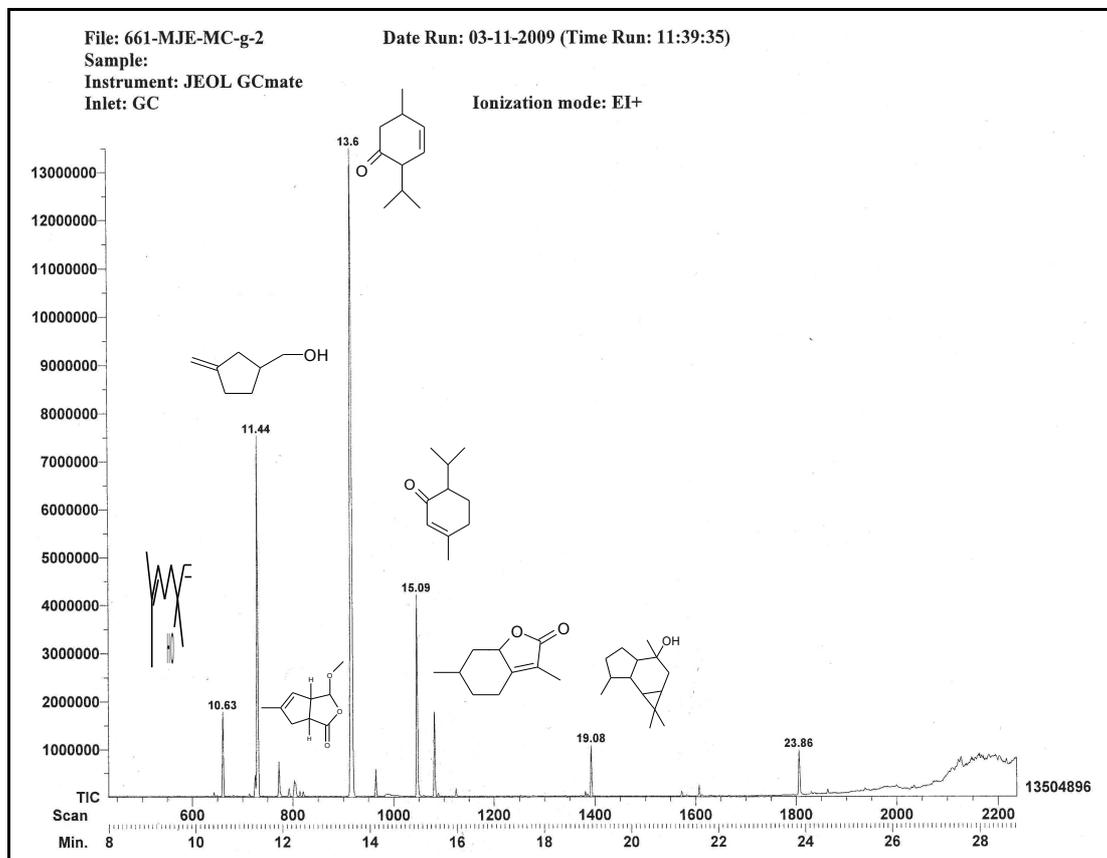


Figura 6. Cromatograma de aceite esencial de *T. erecta* cultivado en hidroponía.

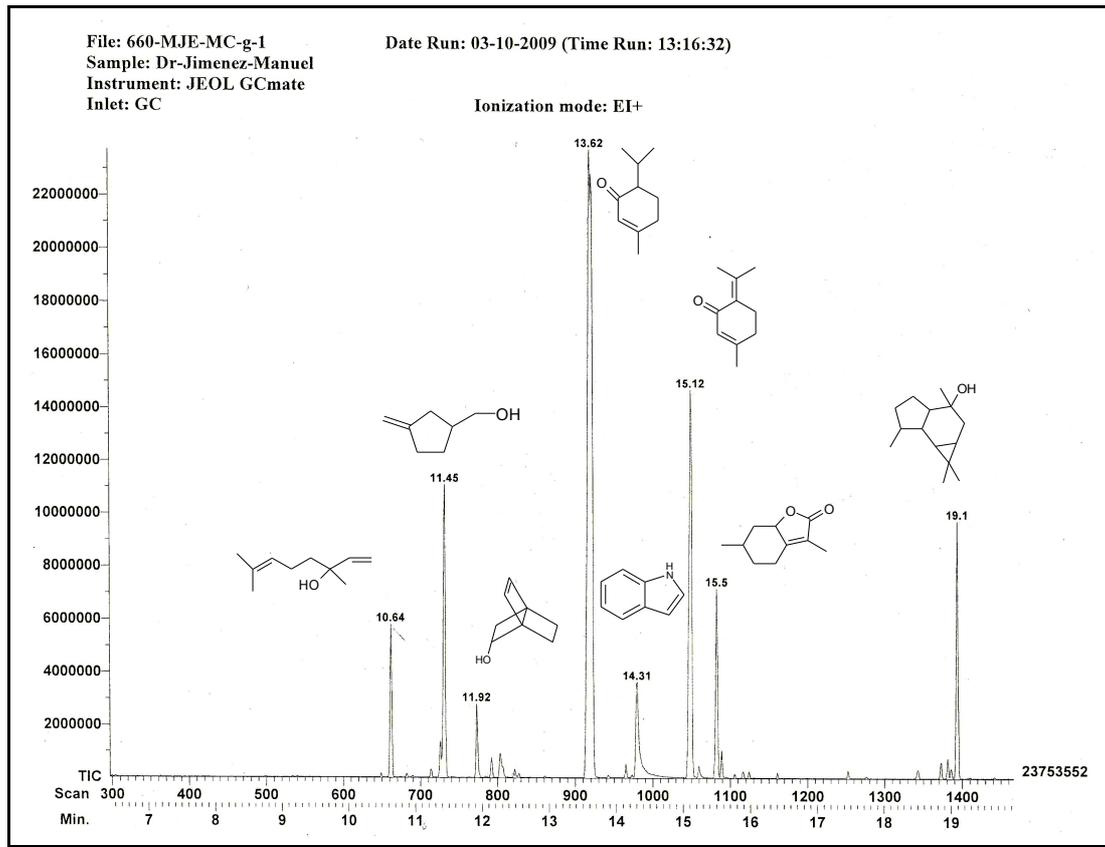
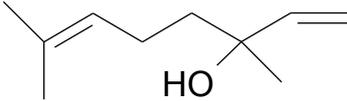
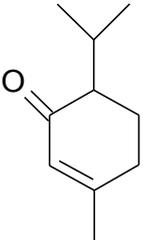
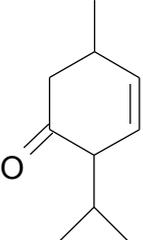
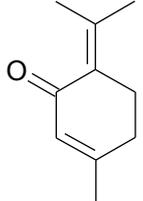
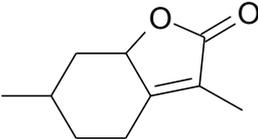
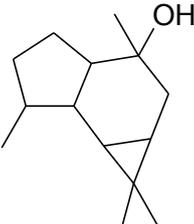
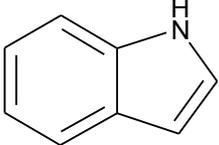
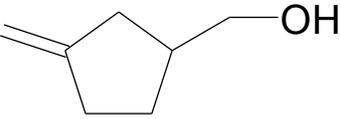
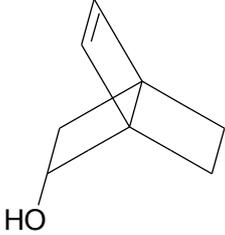
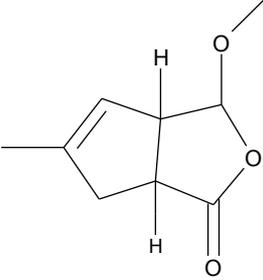


Figura 7. Cromatograma de aceite esencial de *T. erecta* silvestre.

Cuadro 3. Composición química del aceite esencial de *T. erecta* (cultivado y silvestre).

Nombre	Estructura química	Hidroponía (%)	Silvestre (%)
Linalol	 <chem>CC(=C)CC(C)CC=C</chem>	5.64	6.86
Piperitona	 <chem>CC(C)C1C=CC(C)C(=O)C1</chem>	---	28.62
2-isopropil-5-metil-3-ciclohexeno-1-ona	 <chem>CC(C)C1C=CC(C)C(=O)C1</chem>	40.96	----
3-metil-6-(1-metiletilideno)-2ciclohexanona-1-ona	 <chem>CC(C)C1C=CC(C)C(=O)C1</chem>	12.71	17.45
Mentofuranona	 <chem>CC1=C(C)OC(=O)C1</chem>	5.64	8.62
Veridiflorol	 <chem>CC1(C)C(C)C(C)C(C)C1O</chem>	3.67	11.76

Cuadro 3. Composición química del aceite esencial de *T. erecta* (cultivado y silvestre). Continuación.

Nombre	Estructura química	Hidroponía (%)	Silvestre (%)
Indol		---	4.50
3-metilen-ciclopentanometanol		22.59	13.33
Oct-5-en-2-ol biciclo [2.2.2]		---	3.33
Trans-3-oxabicyclo[3.3.0] oct-6-en, 4-metoxi-7-metil		2.25	---

Simbología: (---) Ausente.



## Evaluación de la actividad antibacteriana

### Evaluación cualitativa

Los resultados obtenidos en la evaluación cualitativa de la actividad antibacteriana de los extractos se muestran en el cuadro 4 y la figura 8. En la figura 9 se muestra la actividad antibacteriana de *T. erecta* sobre el grupo bacteriano, tomando en cuenta el tratamiento y extracto. Las figuras 10 y 11 muestran los halos de inhibición contra algunas de las cepas más sensibles a los extractos.

Cuadro 4. Actividad antibacteriana de los extractos de *T. erecta* silvestre y cultivada. (Halos de inhibición se expresan en mm).

Cepa	Extractos					
	Hexánico		Metanólico		Precipitado	
	Silvestre	Cultivado	Silvestre	Cultivado	Silvestre	Cultivado
<i>Sa</i>	---	---	9.0 ± 0.5	7.0 ± 0.5	10.0 ± 0.5	---
<i>Se</i>	14.0 ± 0.5	---	10.0 ± 0.5	7.0 ± 0.5	12.0 ± 0.5	7.0 ± 0.5
<i>Bs</i>	---	---	---	7.0 ± 0.5	7.0 ± 0.5	---
<i>Sd</i>	---	---	7.0 ± 0.5	7.0 ± 0.5	7.0 ± 0.5	7.0 ± 0.5
<i>Ec</i>	---	---	7.0 ± 0.5	7.0 ± 0.5	7.0 ± 0.5	7.0 ± 0.5
<i>Ye</i>	7.0 ± 0.5	---	7.0 ± 0.5	7.0 ± 0.5	7.0 ± 0.5	---
<i>St</i>	---	---	7.0 ± 0.5	7.0 ± 0.5	7.0 ± 0.5	7.0 ± 0.5
<i>Eae</i>	---	---	7.0 ± 0.5	7.0 ± 0.5	7.0 ± 0.5	7.0 ± 0.5
<i>Eag</i>	---	---	7.0 ± 0.5	7.0 ± 0.5	7.0 ± 0.5	7.0 ± 0.5
<i>Vch cc</i>	7.0 ± 0.5	---	10.0 ± 0.5	7.0 ± 0.5	---	7.0 ± 0.5
<i>Vch Tor</i>	---	---	---	7.0 ± 0.5	---	---

**Simbología:** *Sa*. *Staphylococcus aureus*, *Se*. *Staphylococcus epidermidis*, *Bs*. *Bacillus Subtilis*, *Sd*. *Shigella dysenteriae*, *Ec*. *Escherichia coli*, *Ye*. *Yersinia enterocolitica*, *St*. *Salmonella typhi*, *Eae*. *Enterobacter aerogenes*, *Eag*. *Enterobacter agglomerans*, *Vch cc*. *Vibrio cholerae* aislada de un caso clínico, *Vch Tor*. *Vibrio cholerae* INDRE 206 Tor, (---) no presentó actividad. El control positivo (Cloranfenicol) consistió en sensibilizadores de 25 µg y se determinó que todas las cepas son sensibles a este compuesto.

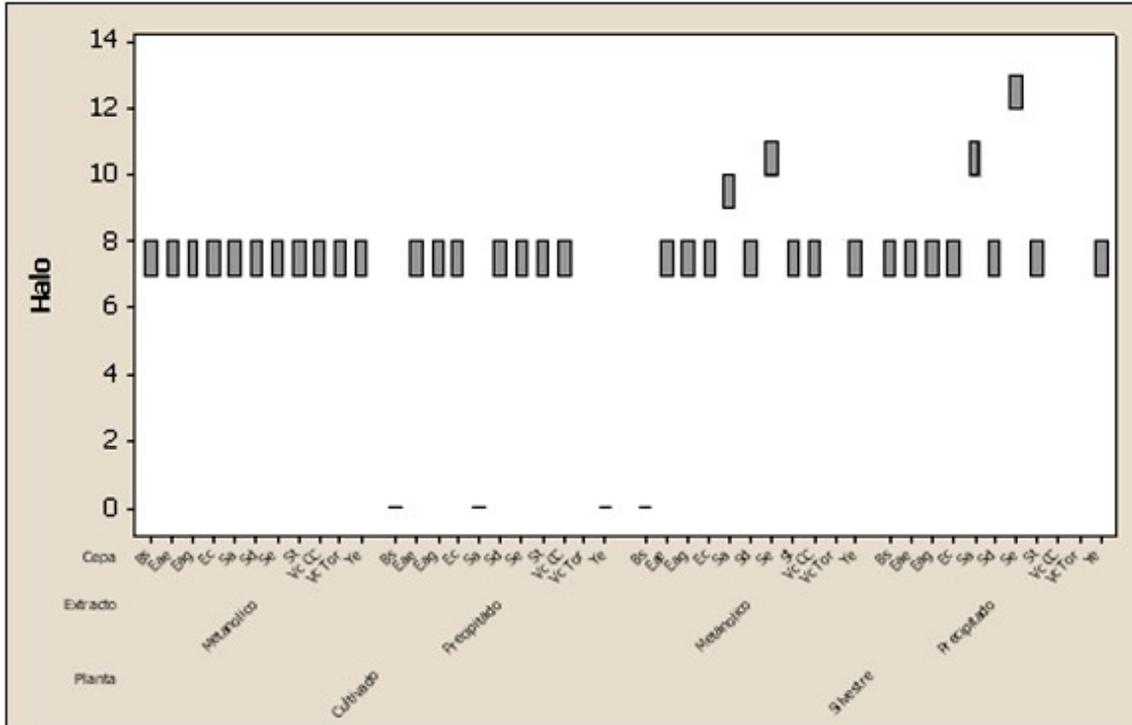


Figura 8. Actividad antibacteriana (cualitativa) de *T. erecta* cultivado y silvestre. Inhibición del crecimiento en contra de las once cepas sensibles. En la gráfica de diagrama de caja se muestra la sensibilidad de las cepas expresados en el diámetro del halo de inhibición expresados en mm. Simbología igual al cuadro anterior.

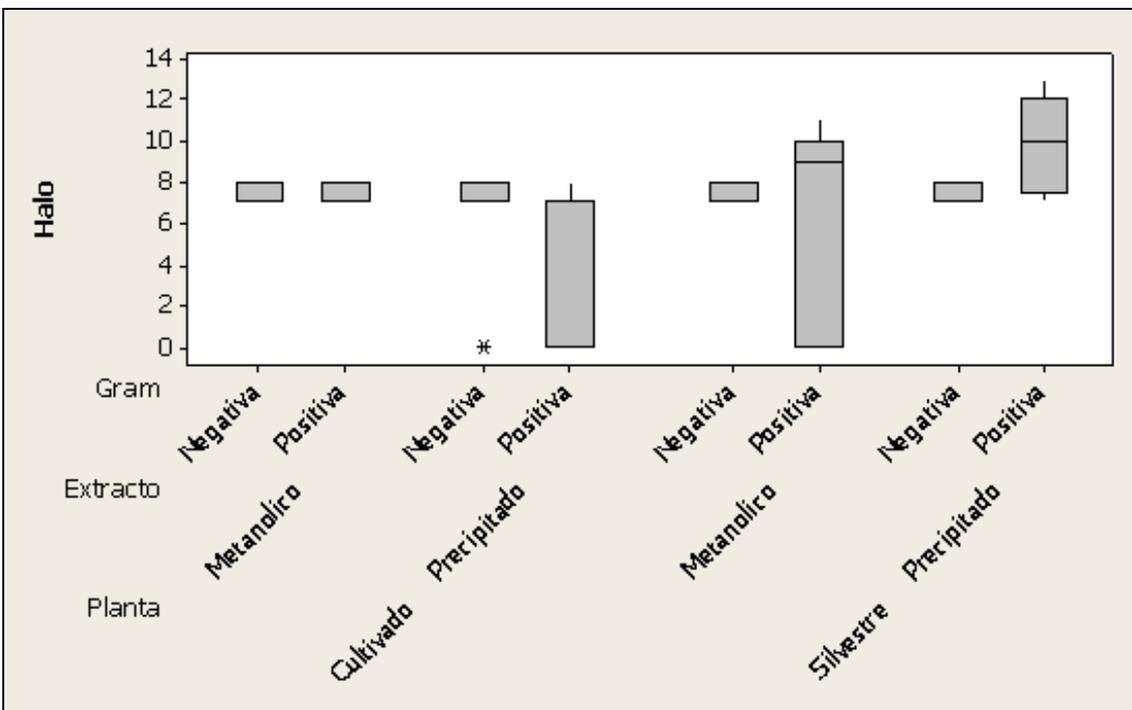


Figura 9. Relación entre los factores evaluados. Efecto de los diferentes extractos de *T. erecta* (cultivado y silvestre) sobre bacterias Gram positivas y Gram negativas. En esta gráfica de diagrama de caja se observa la relación entre el tipo de planta, el extracto y el grupo bacteriano. El valor de los halos registrados esta en mm.

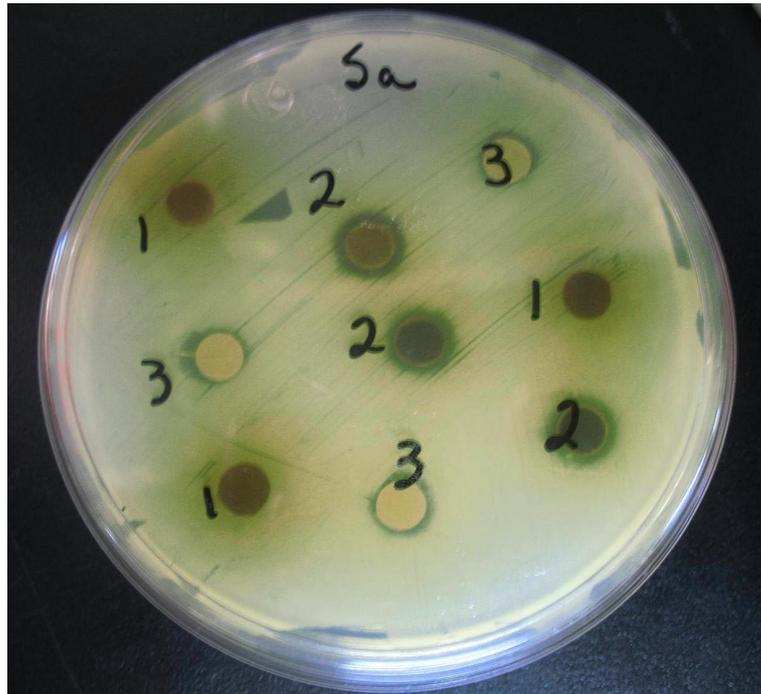


Figura 10. Actividad antibacteriana en contra de *S. aerus*. Se observan los halos en la prueba cualitativa del extracto precipitado de *T. erecta* silvestre en contra de dicha cepa.



Figura 11. Actividad antibacteriana en contra de *S. epidermidis*. Los halos de inhibición demuestran la actividad antibacteriana del extracto metanólico de la planta silvestre en contra de la bacteria Gram positiva.

Los resultados de análisis de varianza, arrojaron valores que afirman que existen interacciones entre factores, tal y como lo muestran las Figuras 12 y 13.

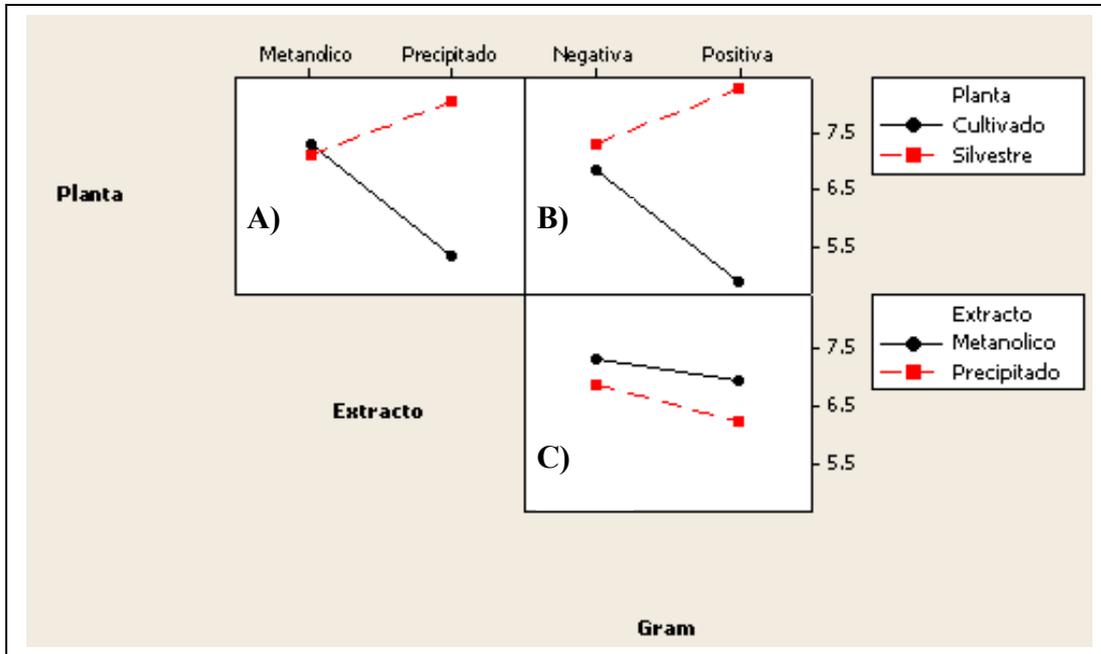


Figura 12. Gráfica de interacciones: planta, extracto y grupo bacteriano. (Líneas paralelas demuestran que no existen interacciones. Líneas divergentes demuestran que si hay tal interacción entre dichos factores).

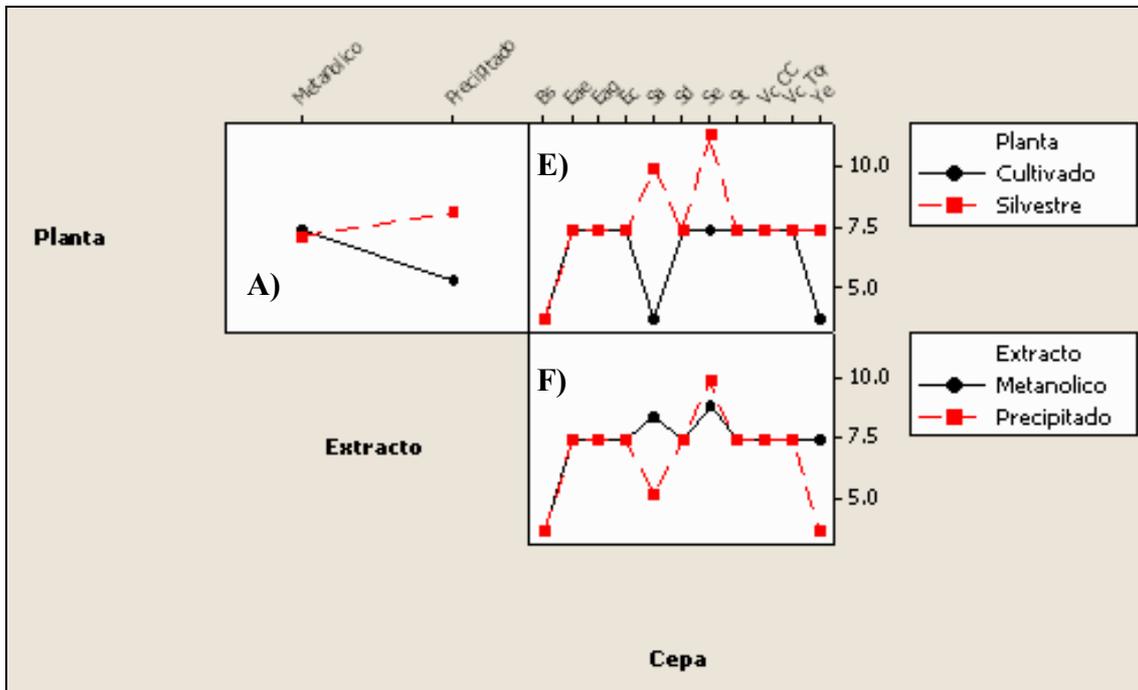


Figura 13. Gráfica de interacciones: planta, extracto, cepa. (Líneas divergentes demuestran que si hay tal interacción entre las variables. Líneas paralelas demuestran que no existen interacciones). La simbología de las cepas es igual a la del cuadro 4.



## Evaluación cuantitativa

Los datos sobre la CMI y CMB de las bacterias sensibles a los extractos se muestran en el cuadro 5.

Cuadro 5. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Mínima Bactericida (CMB) de los extractos obtenidos de *T. erecta* silvestre y cultivada (los valores arrojados están expresados en mg/ml).

Cepa	Extracto									
	Hexánico		Metanólico				Precipitado			
	Silvestre CMI	CMB	Silvestre CMI	CMB	Cultivado CMI	CMB	Silvestre CMI	CMB	Cultivado CMI	CMB
<i>Sa</i>	---	---	1.50	2.0	1.50	2.0	3.0	4.0	---	---
<i>Se</i>	> 4.0	>>4.0	1.0	1.5	> 4.0	>> 4.0	0.50	0.75	> 4.0	>> 4.0
<i>Bs</i>	---	---	---	---	> 4.0	>> 4.0	3.0	4.0	---	---
<i>Sd</i>	---	---	> 4.0	>> 4.0	<0.125	0.125	3.0	4.0	> 4.0	>> 4.0
<i>Ec</i>	---	---	> 4.0	>> 4.0	> 4.0	>> 4.0	---	---	> 4.0	>> 4.0
<i>Ye</i>	2.0	3.0	> 4.0	>> 4.0	0.125	0.250	0.75	1.0	---	---
<i>St</i>	---	---	> 4.0	>> 4.0	2.0	3.0	> 4.0	>> 4.0	> 4.0	>> 4.0
<i>Eae</i>	---	---	> 4.0	>> 4.0	2.0	3.0	0.75	1.0	> 4.0	>> 4.0
<i>Eag</i>	---	---	> 4.0	>> 4.0	2.0	3.0	0.75	1.0	> 4.0	>> 4.0
<i>Vch</i>	1.50	2.0	1.50	2.0	0.125	0.250	1.0	1.50	2.0	3.0
<i>cc</i>										
<i>Vch</i>	---	---	---	---	0.250	0.50	---	---	---	---
<i>Tor</i>										

Simbología: Igual al cuadro 4.



### **Evaluación de la actividad antifúngica**

Ninguno de los extractos presentó actividad contra las cepas de *Aspergillus niger*, *Fusarium sporotrichum* y *Fusarium moniliforme*, así mismo, el ensayo contra levaduras demostró que ningún extracto de ambos tratamientos presentó actividad biológica al no inhibir su crecimiento.



## Análisis y discusión

El análisis y la discusión de los resultados obtenidos en la investigación se muestran a continuación:

### Cultivo hidropónico

Se estableció el cultivo de Cempasúchil con las condiciones antes mencionadas, de hecho, de acuerdo a observaciones cualitativas (Figura 4) se consideraron características morfológicas distintas en raíz, tallo, hoja y flores al ser más grandes, comparadas con plantas silvestres; de esta forma, *T. erecta* cultivada en hidroponía puede obtener una mayor producción, tal y como lo menciona Hutewall (1979) para este tipo de cultivos; se puede presumir que la biomasa de cada organismo cultivado es mayor que la de los individuos silvestres; con lo anterior se afirma que la solución nutritiva propuesta por Martínez (2008) y utilizada en este trabajo es la idónea para esta especie.

Por otra parte, el establecer el cultivo bajo condiciones de invernadero permitió tener controladas variables como: temperatura, humedad y el posible ataque de plagas y enfermedades, que según Osorio (2009), pueden ser factores que pueden afectar en la síntesis de metabolitos secundarios, afectando su composición química y por ende, la actividad antimicrobiana, que son los parámetros que se analizaron en este trabajo de investigación.

Cabe mencionar que los resultados obtenidos en cuanto el tiempo de desarrollo del cultivo resultan sobresalientes por que contrastan con los aplicados en el campo, ya que en México, los agricultores siembran dicha especie en los meses de mayo-junio para obtener su cosecha en Octubre-Noviembre, siendo el lapso del cultivo alrededor de 4 a 5 meses (Cárdenas *et al.*, 2007)), en comparación con el hidropónico que lleva sólo alrededor de 8 semanas el término de su crecimiento. Los cultivos hidropónicos de Cempasúchil, al disminuir el tiempo de cultivo o ser más precoces (Alpi y Tognoni, 1991), generan un beneficio económico al obtener cosechas de incluso seis veces al año, en comparación con cultivos tradicionales donde solo se obtienen hasta 3 cosechas, lo que indicaría una mayor producción al año de *T. erecta*.



También resulta importante este hecho, porque además de poder obtener productos antibacterianos de *T. erecta* se pueden aprovechar otros metabolitos secundarios útiles como pigmentos, principalmente carotenoides, utilizados como fuente de colorantes en alimentos (queso, yema de huevo y piel de aves de corral) (Delgado y Paredes, 1997), al tener un costo considerablemente bajo en comparación con pigmentos sintéticos u otros carotenoides naturales (Seemann, 1998).

Los metabolitos secundarios de *T. erecta*, también han sido utilizados en el tratamiento contra el cáncer y enfermedades de fotosensibilidad (Park *et al.*, 1998) y como suplementos alimenticios (agente oftalmológico) (Delgado y Paredes, 1997). Algunos de sus compuestos han sido probados como antimutagénicos y fitotóxicos (De Mejía *et al.*, 1997), así como insecticida y nematocida (Kaskavalci *et al.*, 2009).

Por lo anteriormente mencionado, los resultados de precocidad de cosecha de dicha especie debido al cultivo hidropónico, aunado con los beneficios del establecimiento de Cempasúchil bajo condiciones de invernadero, mayor biomasa en comparación con planta silvestres y la importancia económica de sus compuestos resulta una gran alternativa para una mejor gestión de este recurso.



## Extractos

El rendimiento de los diferentes extractos se observan en el cuadro 2 y en la figura 5, en ambos tratamientos, tomando como referencia el peso de la planta fresca, se puede considerar su rendimiento como bajo. De acuerdo a la bibliografía, el rendimiento se puede ver influenciado por la etapa fenológica de la planta en el que se obtienen los extractos. En este estudio, el momento de la obtención de los extractos fue durante la floración, esto se sustenta con el trabajo de Singh *et al.*, (2006) donde realizaron un estudio con una especie del género *Tagetes* para determinar en que etapa de crecimiento se obtenía un mayor rendimiento de extractos y se observó que es durante el estadio de floración, fue por esto que se decidió en esta investigación que la etapa fenológica en la extracción de los compuestos fuera cuando la planta presentara inflorescencias.

Enfocándonos en la solución nutritiva utilizada en el cultivo hidropónico, trabajos como el de Arroo *et al.* (1997) señalan que la concentración de elementos necesarios para la síntesis de metabolitos secundarios deben de contenerse en alto grado en el medio nutritivo para que la planta pueda sintetizarlos, de lo contrario no se producen; la solución que se utilizó para el cultivo de Cempasúchil, propuesta por Martínez (2008), tiene los requerimientos necesarios de nutrientes, ya que la planta cultivada sintetizó tales metabolitos (cuadro 2), con actividad antibacteriana (cuadro 4).

Se determinó que los extractos con mayor abundancia son los polares, que fueron el metanólico (63% en cultivado, 59% en silvestre) y precipitado (34% y 35% respectivamente), esto en ambos tratamientos (figura 5), indicando que en su mayoría los compuestos de *T. erecta* son de esta naturaleza; estos resultados son similares a los de (Olvera, 2007), en donde los extractos polares son los más abundantes; los compuestos no polares (como aceite esencial, lípidos, ceras, etc.) están presentes en menor cantidad.

Las plantas cultivadas, a pesar de que no estuvieron sometidas a determinados tipos de estrés, sintetizaron metabolitos secundarios; se sabe que 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 ante depredadores y patógenos (Kaufman *et al.*, 1999; Vivanco *et al.*, 2005); con los resultados obtenidos en esta investigación se afirma lo anterior, ya que aún en ausencia de estos agentes, hubo una producción de dichos metabolitos; cabe mencionar que además de los factores biológicos, diversos factores extrínsecos como los ambientales afectan el cultivo de plantas medicinales, entre ellos la temperatura, altitud, estacionalidad, fotoperiodo, etc., afectando el crecimiento y desarrollo de la planta, y de esta manera la cantidad de metabolitos secundarios generados (Osorio, 2009), en el presente trabajo, factores como temperatura y humedad fueron controlados, debido a que el cultivo se realizó bajo condiciones de invernadero, esto representa una ventaja, sobre los cultivos a campo abierto en donde no se pueden controlar dichas variables.

La época en que se colectan las plantas es de considerable importancia, puesto que la cantidad y a veces la naturaleza de los principios activos no son constantes a lo largo del año; uno de los factores que pueden influir en el rendimiento de los extractos son las lluvias, que pueden llevar a una pérdida de sustancias hidrosolubles (Osorio, 2009), estos se relaciona con los bajos rendimientos de algunos principios activos de las plantas en estaciones húmedas y es que este trabajo de investigación, la colecta de planta silvestre se llevó a cabo precisamente en la temporada de precipitaciones (Noviembre, 2008).



## Composición de aceites esenciales

El rendimiento obtenido a partir de la extracción de los aceites esenciales de ambos tratamientos de *T. erecta* fue de 0.02 %, lo cual sugiere un rendimiento bajo en comparación con el peso fresco de la planta.

Con ayuda de la cromatografía de gases acoplada con espectrometría de masas (Fig. 6, 7 y cuadro 5) se observa que para el aceite de Cempasúchil cultivado se identificaron 7 compuestos en total; y para Cempasúchil silvestre un total de 8 compuestos (Apéndice 6); del cual, en el aceite de planta cultivada, los monoterpenos constituyen los principales compuestos (57 %), aunque también están presentes en menor cantidad sesquiterpenos y compuestos nitrogenados; de igual forma, para el aceite de planta silvestre, la constitución principal es por monoterpenos (50 %), seguido por sesquiterpenos y compuestos nitrogenados.

Se observa en el cuadro 5 que de los componentes monoterpénicos principales de *T. erecta* hidropónica fueron: 2-isopropil-5-metil-3-ciclohexano-1-on (40.96 %), 3-metilen-ciclopentanometano (22.59 %) y 3-metil-6-(1-metiletilideno)-2 ciclohexan-1-ona (12.71%); mientras que para *T. erecta* silvestre son: piperitona (28.62%), 3-metil-6-(1-metiletilideno)-2ciclohexan-1-ona (17.45 %), 3-metilen-ciclopentanometano (13.33 %) y Veridiflorol (11.76 %).

Algunos compuestos coinciden en ambos tratamientos como es el caso del Linalol, 3-metilen-ciclopentanometano, mentofuranona, 3-metil-6-(1-metiletilideno)-2-ciclohexanona -1- cetona y el veridiflorol. Otros compuestos se presentaron solo para cierto tipo de tratamiento, para *T. erecta* cultivado se menciona el 2-isopropil-5-metil-3-ciclohexeno-1-on y el trans-3-oxabicyclo [3.3.0] oct-6-en, 4-metoxi-7-metil. En el caso de *T. erecta* silvestre, los compuestos que solo se presentan en este tratamiento son la piperitona, el indol y el oct-5-en-2-ol bicyclo [2.2.2].

Al comparar los resultados de esta investigación con investigaciones de otros autores como los de Marotti *et al.*, 2004; Singh *et al.*, 2006; Ogunwande y Olawore (2006), se



coteja que existen compuestos similares tales como el linalol, piperitona y el indol, sin embargo los otros ocho compuestos determinados en este trabajo no se reportan en tales trabajos y es que es importante mencionar que los trabajos previamente citados, se han realizado en diferentes partes del planeta, como Nigeria, Francia, Italia y la India; Lawrence (1985), menciona que existe gran variedad en la composición del aceite esencial en el género *Tagetes*, esto se puede deber a las diferentes latitudes en que se cultiva, es bien sabido que muchos factores tales como la localidad donde se cultiva la planta, el estadio de desarrollo, las diferentes partes usadas, composición del suelo, fertilización, etc., tienen influencia en la composición del aceite esencial (Marotti, 2004), lo anterior, son parámetros de gran importancia para determinar la calidad de la planta, ya sea con fines medicinales o aromáticos (Chalchat, 1995).

Resulta importante resaltar que algunos compuestos determinados en este trabajo como el linalol se reportan como antifúngico, bactericida, antiparasitario y con propiedades aromáticas. La Piperitona es utilizada como saborizante, en la fabricación de cosméticos y como tratamiento terapéutico como aromaterapia con propiedades sedantes, en altas concentraciones tiene un aroma desagradable; además de que es repelente contra algunos insectos como el gusano del algodón, que causa grandes pérdidas económicas a los productores de dicho cultivo (Bruce y Cork, 2001). La mentofuranona es indispensable como materia prima en la producción de sabores de alimentos y fragancias, en la industria cosmética es utilizado para la fabricación de bases aromáticas. El indol, con un olor fétido, usado en bajas concentraciones es un principal constituyente en esencias y perfumes, además de que es utilizado como fitohormona. El veridiflorol es usado como aromatizante en alimentos y se ha determinado como feromona en insectos (Wheeler, 2002). Lo anterior demuestra la importancia de los compuestos encontrados en el aceite esencial de *T. erecta*, particularmente si se propone la extracción de dichos metabolitos al cultivar esta especie en hidroponía y bajo condiciones de invernadero.



Es importante mencionar que la presencia de terpenos como los determinados en este trabajo, son de suma importancia, ya que se ha documentado que dichos compuestos son reconocidos con propiedades activas en contra de bacterias, virus y protozoos, además de propiedades antifúngicas, como sustancias alelopáticas, insecticidas, atracción de polinizadores o como fitohormonas. Sus propiedades antimicrobianas se deben, tal y como lo menciona Cowan (1999), a que los terpenos tienen la propiedad de desestabilizar la membrana de algunos microorganismos al ser compuestos lipofílicos.

El interés por los aceites esenciales ha crecido por su utilidad comercial en la fabricación de perfumes y saborizantes, actualmente son usados contra algunas afecciones (Croteau *et al.*, 2000; Dey y Harborne. 1991), incluso son altamente demandado al presentar propiedades insecticidas (Tomova *et al.*, 2005) y nematocidas.

Hay que señalar que debido al bajo rendimiento obtenido del aceite esencial de ambos tratamientos, no fue posible evaluar su actividad antibacteriana y antifúngica, por lo que es de suma importancia conocer dicho rendimiento para que el investigador pueda coleccionar material vegetativo suficiente para la realización de pruebas biocidas.



## Evaluación antibacteriana

### Evaluación cualitativa

Se observó actividad antibacteriana en todos los extractos (metanólico, hexánico y precipitado) de la planta silvestre; en comparación con la planta cultivada, en la que solo el extracto metanólico y precipitado tuvo actividad. Seguramente hubo diferencias en la composición de los extractos o en la concentración de los compuestos activos. Estos resultados también pueden sugerir que es posible que exista sinergismo e incluso antagonismo en los compuestos, confiriendo o no actividad a dicho extracto. Dentro de los compuestos que se han identificados en el género *Tagetes* y particularmente en *T. erecta* se enlistan: flavonoides, cumarinas, tiofenos, entre otros, algunos de ellos con la característica de tener actividad biológica (Tereschuk *et al.*, 1997); es posible que dichos compuestos se encuentren en los extractos obtenidos en esta investigación.

Como se observa en el cuadro 4, que para la planta cultivada, el extracto metanólico fue activo contra once de las catorce cepas desafiadas (8 Gram negativa y 3 Gram positivas), mientras que el precipitado del mismo tratamiento, lo fue contra 7 cepas (6 Gram negativa y 1 Gram positiva). Para la planta silvestre la sensibilidad en contra de las cepas bacterianas fue la siguiente: para el extracto metanólico 9 cepas fueron inhibidas (7 Gram negativas y 2 Gram positivas) y en cuanto al precipitado resultó con actividad antimicrobiana para 9 cepas (6 Gram negativas y 3 Gram positivas). El extracto hexánico solo fue activo en contra de dos cepas Gram negativas y una Gram positiva.

También se puede observar que los extractos evaluados de *T. erecta* son sensibles tanto en bacterias Gram negativas y Gram positivas (Fig. 9), aunque no se muestran diferencias significativas, ya que los extractos son activos para los dos tipos de bacterias. Se puede suponer que los compuestos activos de los extractos combaten o inhiben el crecimiento tanto de bacterias Gram positivas como negativas, de hecho de acuerdo a datos que son similares como los estudios realizados por Tereschuk *et al.*, (1997), algunos compuestos ya identificados como flavonoides y tiofenos son probablemente los que le confieran la actividad antibacteriana a dichos extractos, ya que estos compuestos tienen



características quelantes de solubilizar proteínas de la membrana celular de bacterias (Cowan , 1999).

De acuerdo a la figura 8, se observa que el tamaño de los halos de los extractos metanólico y precipitado de planta silvestre presentaron una mayor actividad al obtener valores de inhibición significativamente mayores; de hecho de acuerdo a las pruebas estadísticas de ANOVA, se demuestra que la actividad antibacteriana depende de si la planta es cultivada o silvestre, ya que se determinó una interacción (Fig. 12, A) entre los factores planta, extracto ( $F = 14.89$ ,  $P = 0.00$ ), siendo el extracto precipitado de planta silvestre más efectivo; se cree que los factores biológicos y físicos confirieron mayor actividad antimicrobiana a la planta silvestre, comparándolo con la planta cultivada que no tuvo los mismos factores, sin olvidar además, que a pesar de que *T. erecta* es una planta anual, la destemporalidad de su cultivo también pudo afectar la actividad antimicrobiana de los extractos. (Osorio, 2009).

A su vez hubo otra interacción, señalada en la figura 12, B, en donde se muestra que hay una interacción entre el origen de la planta y la inhibición entre grupo bacteriano ( $F = 11.74$ ,  $P = 0.001$ ), siendo más activo la planta silvestre en contra de bacterias Gram positivas, recordemos que la principal diferencia entre grupos bacterianos se encuentra en sus estructuras externas, ya que las bacterias Gram positivas poseen una pared gruesa de peptidoglicanos, mientras que las Gram negativas poseen una pared bastante compleja, ya que existe una membrana externa la cual rodea a una capa delgada de peptidoglicano; es posible que en los extracto de la planta silvestre se encuentren compuestos que puedan desestabilizar los puentes peptídicos o enlaces covalentes lipídicos de la membrana plasmática, así como hidrolizar los enlaces o quizá inhibir la síntesis de peptidoglicanos de la pared de las bacterias Gram positivas (Prescott, 2002).

Como se observa en la figura 12 C, la interacción entre sensibilidad de cepas, tomando en cuenta el extracto contra el grupo bacteriano, no mostró diferencias significativas ( $F = 0.10$ ,  $P = 0.758$ ), significando que los extractos metanólico y precipitado actúan de igual forma en contra de bacterias Gram negativas y positivas.



La relación de la actividad biocida entre el origen de la planta contra cepas (Fig. 13, D), fue comprobado por las pruebas estadísticas al arrojar valores de  $F = 6.94$ ,  $P = 0.00$ , demostrando que la planta silvestre fue diferentemente significativa, ya que obtuvo valores mayores en cuanto el halo de inhibición contra algunas cepas como *S. aureus* y *S. epidermidis*, de este modo se indica que existen ciertas cepas más sensibles a los extractos evaluados, afirmando que la planta desarrollada en un ambiente más estresante, comparada con la planta cultivada obtuvo mejores resultados en la prueba cualitativa.

Tomando en cuenta la interacción entre extracto contra cepas, se encontró diferencia significativa, se observa que el extracto que mostró mayores halos fue el metanólico ( $F = 2.96$ ,  $P = 0.003$ ), posiblemente sus compuestos afectaron de mayor forma el crecimiento de algunas cepas. El extracto metanólico de planta silvestre demostró mayor sensibilidad frente a las cepas *E. coli* y *S. dysenteriae* y el extracto precipitado de planta silvestre contra las cepas *S. aureus* (Fig. 10) y *S. epidermidis* (Fig. 11).

Las bacterias que no fueron sensibles a ningún extracto fueron las cepas de *V. cholerae* No. 01 (no patógena), *V. cholerae* INDRE 206 aislada de agua contaminada y *S. lutea*. El extracto Hexánico de planta silvestre, fue activo frente a las cepas *S. epidermidis*, *Y. enterocolitica* y *V. cholerae* aislada de un caso clínico, el extracto hexánico de la planta cultivada no tuvo actividad antimicrobiana contra ninguna cepa demostrando que es posible que los compuestos presentes en los extractos no eran activos contra las cepas evaluadas, o que quizás existió antagonismo entre los compuestos o a que sus concentraciones no eran las suficientes para inhibir el crecimiento de las bacterias.

Algunos autores ya han probado la actividad antimicrobiana de *T. erecta* en contra de algunas de las cepas, tales como *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli*, *S. typhi* (Argueta *et al.*, 1994; Lara y Márquez, 1996; Chomnawang *et al.*, 2008) encontrando actividad biocida en contra de estos organismos, sin embargo hay que resaltar que las cepas *S. epidermidis*, *S. dysenteriae*, *S. lutea*, *Y. enterocolitica*, *E. agglomerans*, *E. aerogenes* y *V. cholerae*, no habían sido evaluadas contra los extractos de *T. erecta*, de esta manera se afirma que este trabajo es de los primeros en demostrar dichas actividades antimicrobianas.



En nuestro país las enfermedades intestinales y de infecciones respiratorias son de las principales causas de muerte, primordialmente en niños de 1 a 4 años. Muchas de las drogas comúnmente utilizadas para el tratamiento de estas afecciones o son caras o no están disponibles para la población (INEGI, 2009), además es importante mencionar los efectos colaterales de algunos antibióticos utilizados en la medicina alópata, tal es el caso del Cloranfenicol, el cual fue utilizado en este trabajo como control positivo; ya que al ser antibiótico de amplio espectro presenta algunos efectos secundario como la disminución de la función de la médula ósea u otras reacciones alérgicas (Prescott, 2002).y su uso continuo e indebido de este medicamento desarrolla resistencia en los microorganismos; es por esto que surge la necesidad de encontrar nuevas drogas, no costosas, accesibles y que sean capaces de actuar por periodos largos antes de crear resistencia ante las cepas bacterianas (Mc Graw *et al.*, 2000) como es el caso de *T. erecta* la cual presentó actividad antimicrobiana contra bacterias que causan padecimientos digestivos, respiratorios y de la piel.



## Evaluación cuantitativa

Los resultados de las pruebas cuantitativas contrastan con la evaluación antibacteriana cualitativa, en donde los extractos de la planta silvestre fueron los que inhibieron en mayor proporción a ciertas cepas; por el contrario, en el ensayo cuantitativo, los extractos más activos fueron para la planta cultivada el metanólico, mientras que para la planta silvestre fue el precipitado (cuadro 5); lo anterior se puede deber a que en el método de Kirby-Baüer la difusión presenta un gradiente, mostrando una concentración alta cerca del disco y a medida que aumenta la distancia desde el disco disminuye tal concentración, incurriendo en el tamaño de los halos de inhibición, esta actividad puede verse afectada por la concentración, la solubilidad y la tasa de difusión de los extractos a través del agar. Por lo tanto, no se puede emplear el diámetro de la zona de inhibición para comparar directamente la eficacia del extracto a probar (Lugo, 2005).

Conforme a lo observado en el cuadro 5, se tiene que existen diferencias importantes en la CMI y CMB en los extractos de ambos tratamientos contra ciertas cepas.

En las pruebas cuantitativas, el extracto metanólico de *T. erecta* cultivada en hidroponía demostró mayor sensibilidad contra casi todas las cepas comparándolo con su homólogo de planta silvestre, sin embargo sobresalió su actividad antimicrobiana contra cepas Gram negativas como *S. dysenteriae*, ya que con una concentración menor a 0.125mg/ml se inhibió su crecimiento y para obtener la concentración bactericida mínima se requirió de una concentración de 0.125 mg/ml; *Y. enterocolitica*, *V. cholerae* caso clínico, y *Vibrio cholerae* CDCV12 las cuales corresponden al grupo 01, productor de enterotoxinas, serotipo Inaba, biotipo El Tor, son también cepas bacterianas que necesitaron de concentraciones menores del extracto para inhibir su crecimiento, posiblemente los compuestos encontrados en dicho extracto presentaron mayor actividad en contra de la pared compleja de este grupo bacteriano, desestabilizando su membrana externa o inhibiendo su síntesis (Prescott, 2002), o quizá la concentración de estos compuestos se encontraron en mayor proporción, la sinergia entre compuestos presentes posiblemente también confirieron mayor efectividad ante bacterias Gram negativas.



El extracto precipitado de planta silvestre también mostró valores importantes contra microorganismos Gram positivos como *S. epidermidis*, que requirió de concentraciones de 0.50 mg/ ml para obtener la CMI y 0.75 mg/ml para la CMB. Las cepas Gram negativas como *E. agglomerans*, *Y. enterocolitica* y *E. aerogenes* requirieron de concentraciones menores del extracto precipitado para inhibir su crecimiento.

Las bacterias que fueron más resistentes, al necesitar mayores concentraciones de los extractos fueron, tanto bacterias Gram positivas como negativas, ya que en las pruebas necesitaron de más de 4.0 mg/ml para inhibir por completo su crecimiento. Este comportamiento se puede deber a que los metabolitos generados, así como su concentración, se ven afectados por diversas razones, la época en que se colectan las plantas es de considerable importancia, puesto que la cantidad y a veces, la naturaleza de los principios activos no son constantes a lo largo del año, lo anterior considerando la destemporalidad del cultivo hidropónico respecto a la cosecha de plantas silvestres; tales diferencias entre extractos también pueden deberse a que posiblemente contengan sustancias sinérgicas o antagonistas o el compuesto o los compuestos responsables de la actividad antibacteriana son más activo o mas concentrados, tal y como lo afirma Caius (1940). De la misma forma, posiblemente existan compuestos similares aunque en diferentes concentraciones, como lo explica Canales (2007).

Igual que el rendimiento de los extractos, la variedad en la actividad antibacteriana se pudo haber visto influida por factores físicos y biológicos que anteriormente se han mencionado.

Los valores bajos de la CMI en contra de ciertas cepas son importantes, ya que una CMI excesivamente elevada es resistente al agente antibacteriano a las concentraciones normalmente alcanzadas en el cuerpo (Lugo, 2005), lo anterior resulta sobresaliente, ya que las cepas más sensibles en las pruebas cuantitativas, son aquellas que afectan de manera significativa e la población mexicana.



La shigelosis, inducida por *Shigella dysenteriae* provoca cerca de 1.1 millones de muertes, principalmente en países en vías de desarrollo como México. 69 % de los pacientes son niños menores de 5 años. Ataca principalmente a grupos vulnerables como etnias o comunidades indígenas, por sus condiciones sanitarias y alta transmisión; otra cepa que resulto particularmente sensible fue *Yersinia enterocolitica*, la cual causa linfadenitis mesentérica, ileítis terminal y bacteremias, también tiene importancia en veterinaria. En México genera enteritis al 1.3 % de la población (Prescott, 2002).

En 1961 *Vibrio cholerae* biotipo el Tor emergió como una causa importante de epidemias de cólera, en América latina se extendió en la década de los noventa. La tasa de mortalidad sin tratamiento supera a menudo el 50 %; con el tratamiento y cuidados es inferior al 1 % (Lugo, 2005).

*Staphylococcus* se presenta principalmente en la piel y mucosa formando parte de la flora bacteriana, sin embargo se le considera una cepa oportunista. *S. aureus* es uno de los patógenos con mayor índice de morbilidad y mortalidad en pacientes hospitalizados, ya que presenta alta resistencia a antibióticos (Prescott, 2002). En 1946, casi todas las cepas de *Staphylococcus* eran sensibles a la penicilina, en la actualidad, la mayoría de las cepas son resistentes a la bencilpenicilina, meticilina, gentamicina y solo pueden tratarse con vancomicina.

Solo en México de un 2 a 6 % de las diarreas corresponden a las provocadas por la bacteria *Salmonella*, ocasionando también las llamadas fiebres tifoideas. Un 20 % de los individuos recaen por presentar resistencia antimicrobiana a antibióticos como al cloranfenicol. En 1972 apareció la cepa resistente. El 1 % de los pacientes muere (Prescott, 2002). En 1972, México fue barrido por una epidemia de fiebres tifoideas que produjo 100 000 infecciones y 14 000 muertos, se debió a una cepa de *Salmonella typhi* (Lugo, 2005). En 2003, más de 17 mil casos fueron reportados en ciudades importantes del país, aunque en áreas rurales es mayor la incidencia (Prescott, 2002).



Como se describe anteriormente, se ha vuelto muy difícil tratar las enfermedades mencionadas, esto debido a que a menudo se prescriben antibióticos sin cultivar o identificar al patógeno previamente, o sin determinar la sensibilidad de la bacteria al fármaco, administrando antibiótico de amplio espectro en lugar de fármacos de espectro reducido, con el consiguiente riesgo de efectos secundario, sobre infecciones y selección de mutantes resistentes a fármacos. La situación empeora en los pacientes que no completan su ciclo de tratamiento, es por eso que resulta importante enfocar investigaciones en buscar nuevos antibiótico con los que los microorganismos nunca hayan tenido contacto (Lugo, 2005), como los presentes en los extractos de *T. erecta*.

Sería necesario conocer el modo de acción de los compuestos encontrados en los extractos de *T. erecta*, ya que los antimicrobianos más selectivos son los que interfieren en la síntesis de las paredes celulares bacteriana y de esta forma poseen un índice terapéutico elevado, porque las paredes bacterianas tienen una estructura exclusiva que no se encuentra en las células eucariotas. Se puede suponer que los compuestos presentes en los extractos de Cempasúchil dañen o alteren la membrana de las bacterias, inhiban síntesis de proteínas, de ácidos nucleicos, o bloqueen el funcionamiento de vías metabólicas (Prescott, 2002).



## **Evaluación antifúngica**

Se demostró que ningún extracto presento actividad biológica al no inhibir el crecimiento tanto de las levaduras ni hongos filamentosos evaluados. Esto se puede deber a que posiblemente los metabolitos secundarios presentes en los extractos no son activos o no tienen propiedad antifúngica, o quizá a que su concentración no fue la suficiente para inhibir el crecimiento de dichos microorganismos (Canales, 2007). También se debe tomar en cuenta que probablemente existió antagonismo entre los compuestos de los extractos y esto permitió que no se presentara actividad biológica (Caius, 1940).



## Obtención de metabolitos secundarios de interés

Debido a que se han identificado compuestos biocidas u otros de interés económico en especies del género *Tagetes* (Bohlmann et al., 1973; Gomers, 1981), varios investigadores se han dado a la tarea de generar métodos para la obtención de dichos compuestos.

Se pueden citar trabajos como los de Ketel (1986), en donde por medio de cultivos celulares, generó una producción de compuestos biocidas, aunque este trabajo se vio obstaculizado por la dificultad en la diferenciación morfológica y el metabolismo secundario de los callos cultivados.

Otra investigación fue realizada por Mukundan y Hjortso (1990); y Ramachandra *et al.* (2001), en la que se estimuló la síntesis de metabolitos como el tiofeno al exponer a las raíces de *Tagetes* a un elicitador fúngico y la inoculación de un alga para una mayor síntesis de pigmentos como carotenos, teniendo como resultado un mayor rendimiento de los compuestos en comparación con el testigo.

El mejoramiento genético ha sido una alternativa para una mayor explotación, por ejemplo, de pigmentos en *T. erecta* (Sreekala y Raghva, 2003).

Sin embargo la técnica hidropónica resulta una buena alternativa para la obtención de metabolitos secundarios, su importancia radica en que bajo estas condiciones, permite que estos trabajos sean repetitivos obteniendo resultados similares, es por esto que se busca establecer parámetros para la estandarización de este cultivo con fines de maximizar el aprovechamiento de tales metabolitos secundarios.

De este modo se propone que aunado al crecimiento de *T. erecta* en hidroponía, se combine con las técnicas antes mencionadas, tales como el mejoramiento genético (la elección de variedades con características óptimas), así como la estimulación de la síntesis de metabolitos secundarios por medio de elicitores, de esta manera se podría obtener un mayor rendimiento de uno o de los compuestos que al investigador interesen.



## Conclusión

- Se estableció el cultivo hidropónico de *T. erecta* bajo condiciones de invernadero, siendo la solución nutritiva óptima para su desarrollo ya que se observó una mayor biomasa, en comparación con la planta silvestre.
- El rendimiento de los extractos y el aceite esencial fue diferente en ambos tratamientos. Los extractos con mayor abundancia fueron de naturaleza polar. En el aceite esencial se determinaron 7 compuestos en la planta hidropónica y 8 en silvestre, la composición de los aceites en ambos tratamientos fue principalmente de monoterpenos, así como sesquiterpenos y compuestos nitrogenados.
- Los extractos: Hexánico, metanólico y precipitado, presentaron actividad antibacteriana contra cepas Gram negativas y Gram positivas, las más sensibles en la evaluación cualitativa fueron: para el extracto metanólico de planta silvestre *E. coli* y *S. dysenteriae* y para el extracto precipitado de planta silvestre, *S. aureus*.
- De acuerdo a un análisis de varianza se determinó interacciones significativamente diferentes entre los factores: origen de la planta, extracto, grupo bacteriano y cepa.
- En la prueba antibacteriana cuantitativa, el extracto metanólico de planta cultivada mostró valores de CMI y CMB menores en comparación que con la planta silvestre, sobresaliendo las cepas: *S. dysenteriae*, *Y. enterocolitica*, *V. cholerae* caso clínico, y *V. cholerae* biotipo El Tor.  
El extracto precipitado de planta silvestre también mostró valores de CMI y CMB menores contra microorganismos Gram positivos como *S. epidermidis*.



- Los extractos de *T. erecta* no tienen actividad antifúngica contra las cepas evaluadas.
- Factores biológicos y físicos intervienen en la síntesis de metabolitos secundarios en *T. erecta*, tanto en la composición química de los compuestos presentes en los extractos, así como en su actividad antibacteriana.
- Se establecieron parámetros para la estandarización del cultivo hidropónico de *T. erecta* con el fin de maximizar el aprovechamiento de metabolitos secundarios con propiedades antibacterianas.



## Bibliografía

- Aguilar, A., Camacho, J. R., Chino, S., Jacques., P. y López, M. E. 1994. Herbario Medicinal del Instituto Mexicano del Seguro Social. Información Etnobotánica. IMSS. México. 1-20. pp.
- Alpi, A. y Tognoni, F. 1991. Cultivo en invernadero. Tercera edición. Ed. Ediciones Mundi-Presa. Madrid.13-54. pp.
- Andrade-Cetto, A. 2008. Ethnobotanical study of the medicinal plants from Tlanchinol, Hidalgo, México. Journal of Ethnopharmacology.
- Argueta, V. A., Cano, A. L. y Rodarte M. E. 1994. Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana. Vol. I y III. Instituto Nacional Indigenista. México.
- Arroo, R. R. J., Jacobs, J. J. M. R., Van-Gestel, J. A. M., Kenkel, H., Jannink, W., Croes, A. F. y Wullems, G. J. 1997. Regulation of thiophene biosynthesis by sulphate in roots of marigolds. New Phytologist. 135: 175-181.
- Ávila, J. G. 1996. Actividad anti-*Vibrio Cholerae* de dos plantas utilizadas en la medicina tradicional Purépecha. Tesis Maestría en Microbiología. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. UNAM. México.
- Boholmann, F., Burkhardt, T., y Zdero, C. 1973. Naturally occurring acetylenes. Academic Press. Londres. 9-27 pp.
- Boyd, M. R. 1996. The position of intellectual property rights in drug discovery and developments from natural products. Journal of Ethnopharmacology. 51: 17-27.



- Bruce, T. Y. y Cork, A. 2001. Electrophysiological and behavioral responses of female *Helicoverpa armigera* to compounds identified in flowers of African marigold, *Tagetes erecta*. *Journal of Chemical Ecology*. 27: 1119-1131.
- Bruneton, J. 1991. *Elementos de Fitoquímica y de Farmacognosia*. Ed. Acribia. España. 594 pp.
- Caius, J. F. 1940. The medicinal and poisonous Compositae of India. *Journal of Bombay Natural History Society*. 41:607.
- Cárdenas, F. A., Estrada, L. A. y Olalde, P. V. 2007. Yield and quality enhancement of marigold flowers by inoculation with *Bacillus subtilis* and *Glomus fasciculatum*. *Journal of Sustainable Agriculture*. 31: 21-31.
- Canales, M., Hernández T., Serrano, R., Hernández, L. B., Durán, A., Ríos, V. Hernández, H. L. M., García, A. M., Ángeles-López, O., Fernández-Araiza, M. A., Ávila, G. 2007. Antimicrobial and general toxicity activities of *Gymnosperma glutinosum*: A comparative study. *Journal of Ethnopharmacology*. 110: 343-347.
- Chalchat, J., Garry, R. y Muhayimana, A. 1995. Essential oil of *Tagetes minuta* from Rwanda and France: chemical composition according to harvesting, location, grow stage and part of plant extracted. *Journal of Essential Oil Research*. 7: 375-386.
- Chomnawang T, M., Surassmo, S., Wongsariya, K., Bunyaphatsara, N. 2008. Antibacterial activity of Thai medicinal plants against Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Fitoterapia*.
- Cowan, M. 1999. Plants products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Review*. American Society for Microbiology. 12 (4): 564-582.



- Croteau, R., Kutchan, T. M., Lewis, N.G. 2000. Natural products (Secondary Metabolites). American Society of Plant Physiologist. 1250-1268 pp.
- De Mejía, E. G., Loarca, P. G. y Ramos, G. M. 1997. Antimutagenic activity of natural xanthophylls against aflatoxin B-1 in *Salmonella typhimutim*. Mutation Research. 30: 219-226.
- Delgado, V. F. y Paredes, L. O. 1997. Effects of enzymatic treatments of marigold flowers on lutein isomeric profiles. Journal Science Food Agriculture. 45: 1097-1102.
- Dey, P. M. y Harborne, J. B. 1991. Methods in plant biochemistry. Terpenoids. Volume 7. Academia Press. Department of Chemistry. University Collage London. UK. 565 pp.
- Domínguez, A. X. 1973. Métodos de investigación fitoquímica. Editorial Limusa. México. 3-17, 229-239 pp.
- Donald, L., Mortensen, J., Fraimow, H. S. y Calandra, G. B. 1995. Antimicrobial resistance: A crisis in healt care. New York: Plenum. 248 pp.
- Estrada, L. E. 1985. Jardín botánico de plantas medicinales “Maximino Martínez”. Universidad Autónoma Chapingo. México.
- Fleurentín, J. y Pelt, J. 1981. Las plantas medicinales. Mundo científico. 10 (105): 926-934.
- Giovannini, P. y Heinrich, M. 2008. Xki yoma` (our medicine) and Xki tienda (patent medicine)- Interface between traditional and modern medicine among the Mazatecas of Oaxaca, México. Journal of Ethnopharmacology. 121: 383-399.



- Gommers, F. J. 1981. Biochemical interactions between nematodes and plants and their relevance to control. *Helminthol.* 50: 9-24.
- Gros, G.E., Pomillo, A., Seldes, A. y Burton, G. 1985. Introducción al estudio de los productos naturales. Secretaria General de los Estados Americanos. Programa de Desarrollo Científico y Tecnológico, Washington. 147 pp.
- Harbone, J. B. y Baxter, H. 1993. *Phytochemical dictionary. A handbook of bioactive compounds from plants.* London. 550-669 pp.
- Harvey, A. 2000. Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products. Elsevier Science. Collage Building. 294-300 pp.
- 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.
- Hernández, T., Canales, M., Ávila, 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.
- Huterwall, G. O. 1979. *Hidroponía: Cultivo de plantas sin tierra.* Ediciones Albatros. Buenos Aires. 251 pp.
- Jarecki, M. K., Chong, C. y Voroney R. P. 2005. Evaluation of compost heachates for plants growth in hydroponic culture. *Journal of Plant Nutrition.* 28: 651-667.
- Kaskavalci, G., Tuzel, V., Dura, O. Y Öztekin, G. B. 2009. Effects of alternative control methods against *Meloidogyre incognita* in organic tomato production. *Ekoloji Dergisi.* 18: 23-31.



- Kaufman, P. B., Ledand, J.C., Warber, S., James, A.D., Harry, B.L. 1999. Natural products from plants. CRC Press. USA. 343 pp.
- Ketel, D. H. 1986. Morphological differentiation and occurrence of thiphenes in leaf callus cultures from *Tagetes* species: Relation to the growth medium of the plants. *Physiologia Plantarum*. 66: 392-396.
- Khachick, F. 1995. Process for isolation, purification and recrystallization of luteins from saponified marigold oleoresin and uses thereof. United States Patent. 5.382.714.
- Lara, F. y Márquez C. 1996. Plantas medicinales de México. Instituto de Química. Universidad Nacional Autónoma de México. 29-33 pp.
- Lawrence, B. M. 1985. Essential oils of the *Tagetes* genus. *Perfum, Flavor*. 10: 73-82.
- Lugo, F. G. 2005. Bacteriología médica. Ediciones Cuellar. Tercera edición. México. 456 p.
- Malarkodi, M., Krishnamy, R. y Chitdeshwari, T. 2008. Phytoextraction of nickel contaminated soil using castor phytoextractor. *Journal of Pant Nutrition*. 31:219-229.
- Mc Graw, L. J., Jäger, A. K., & Van Staden, J. 2000. Antibacterial anthelmintic and anti-amoebic activity in South African medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*. 72: 247-263.
- McPartland J. M. y Pruitt P. L. 1999. Side effects of pharmaceuticals not elicited by comparable herbal medicines, the case of tetrahydrocannabinol and marijuana. *Alternative Theraphy Healt and Medicine* 5: 57-62



- Marotti, M., Piccaglia, R., Biavati, B., y Marotti, I. 2004. Characterization and yield Evaluation of essential oils from different *Tagetes* species. *Journal of Essential Oil Research*. 16: 440-444
- Mukundan, U. y Hjortso, M. A. 1990. Effect of fangal elicitor on thiphene production in hairy roots cultures of *Tagetes patula*. *Applied Microbiology Biotechnology*. 33: 145-147.
- Ogunwande, I. y Olawore N. 2006. The Essential Oil from the Leaves and Flowers of “African Marigold”, *Tagetes erecta* L. *Journal of Essential Oil Research*. 18: 366-368.
- Olvera, S. E. 2007. Estudio fitoquímico y evaluación antimicrobiana de *Tagetes lucida* (Pericón). Tesis de licenciatura. Facultad de Química, UNAM. 91 pp.
- Osorio, E. 2009. Aspectos básicos de farmacognosia. Facultad de Química Farmacéutica. Universidad de Antioquia. 80 pp.
- Park, J.S., Chew, B. P. y Wong, T. S. 1998. Dietary lutein from marigold extract inhibits mammary tumor development in BALB/C mice. *Journal of Nutrition*. 128: 1650-1656.
- Penningsfeld, F. y Kurzman, P. 1983. Cultivos Hidropónicos y en Turba. Ediciones Mundi Prensa. Madrid. España. 23-57 pp.
- Prescott, L. M., Harley, J. P. y Klein, D. A. 2002. Microbiología. Mc Graw-Hill. Interamericana de España. Quinta edición. España. 1239 pp.
- Ramachandra, R. S., Usha, T., Suresh, B. Y Ravishankar, G. 2001. Enhancement of secondary metabolite production in hairy roots cultures of *Beta vulgaris* and *Tagetes patula* under the influence of microalgal elicitors. *Food Biotechnology*. 15: 35-46.



- Resh, H. M. 2001. Cultivos Hidropónicos, nuevas técnicas de producción. Ediciones Mundi-Prensa. Quinta edición. España. 558 pp.
- Rzedowski, J. 1985. Flora fanerogámica del Valle de México. Volumen 2. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Instituto Politécnico Nacional. México, D. F. 586-587 pp.
- Seemann, M. 1998. Latest trenes in layer nutrition. How does the yellow get into the egg?. Lohmann information. 21: 7-11.
- Singh, A., Khanuja, S., Arya, S., Singh, S., y Yadaw, A. 2006. Essential oil quality and yield with respect to Harvest index in *Tagetes minuta* cultivated in sub tropical plains of North India. Journal of Essential Oil Research. 18: 362-365.
- Sreekala, C. y Raghava, S. P. S. 2003. Exploitation of heterosis for carotenoid content in African marigold (*Tagetes erecta* L.) and its correlation with esterase polymorphism. TAG Theoretical and Applied Genetics. 106: 771-776.
- Strasburger, E., Noll, F., Sdeneck, H., Schimper, A. F. W. 2002. Tratado de botánica. Octava Edición. Ediciones Omega. Barcelona. 381-385 pp.
- Tereschuk, M. L., Riera, M. V., Castro, G. R., Abdala, L. R. 1997. Antimicrobial activity of flavonoids from leaves of *Tagetes minuta*. Journal of Ethnopharmacology. 56: 227-232.
- Tomova, S. B., Waterhouse, S. B. y Boberski, J. 2005. The effect of fractionated Tagetes oil volatiles on aphid reproduction. Entomologia Experimental et Application. 15: 153-159.
- Torres, L. B. 1999. Plantas, curanderos y prospección biológica. Ciencias. 55-56: 54-60.



- Van den Berghe, D. A. y Vlietinck, A. J. 1991 Screening methods for antibacterial and antiviral agents from higher plants. En: Dey, P. M., Harborne, J. B., Hostettman, K. (Eds.), *Methods in Plant Biochemistry Assay for Bioactivity*. Vol. 6. Academic Press, San Diego, pp. 47-69.
- Verástegui, M. A., Sánchez, C. A., Heredia, N. I. Y García-Alvarado, J. S. 1996. Antimicrobial activity of extracts of three major plants from the Chihuahua Desert. *Journal of Ethnopharmacology*. 52: 173-177
- Vivanco, J. M., Cosío, E., Víctor, M., Loyola-Vargas y Flores, H. E. 2005. Mecanismos químicos de defensa de las plantas. *Scientific American Latinoamérica*. 68-75 pp.
- Wang, H., Bun, T. N. 2002. Isolation of an antifungal Thaumatin-like protein from kiwi fruits. *Phytochemistry*. 61: 1-6
- Wheeler, G. S., Massey, L. M. y Southwell, I. 2002. Antipredator defense of biological control agent *Oxyops vitiosa* is mediated by plant volatiles sequestered from the host plant *Maleleuca quinquenervia*. *Journal of Chemical Ecology*. 28: 297-315.
- Wink, M. 1999. Functions of plant secondary metabolites and their exploitation in Biotechnology. *Annual Plant Reviews*. 3: 1-14
- <http://www.inegi.org.mx> 2009.



## Anexos

### Apéndice 1

#### **Composición de la solución nutritiva.**

*(Tagetes erecta)*

Por Ing. Federico Martínez M. (2008)

Por cada 1000 litros de agua de riego:

Nitrato de amonio 420 g

Nitrato de potasio 450 g

Ácido fosfórico 120 ml

Sulfato de magnesio 100 g

Fertiquel Combi o similar 60 g

Al inicio de la floración:

Nitrato de amonio 300 g

Fosfato monopotásico 580 g

Sulfato de magnesio 100 g

Fertiquel Combi o similar 60 g

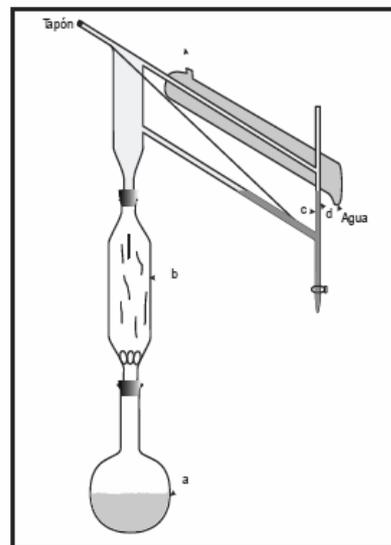
## Apéndice 2

### Extracción por arrastre de vapor de aceites esenciales.

Los aceites esenciales se obtienen por la técnica de destilación por arrastre de vapor a partir de material fresco (Domínguez, 1973); en este método se utiliza la característica que poseen las esencias de presentar bajas presiones de vapor y por tanto pueden ser arrastradas por sustancias que poseen presiones de vapor más altas. El aparato que se utiliza, se muestra en la siguiente figura.

Destilador por arrastre de vapor:

- a) Matraz
- b) Columna de vidrio
- c) Colector
- d) Refrigerante



Empleando este aparato se puede destilar por arrastre de vapor continuo de 100 g a 500 g de planta fresca, con un buen rendimiento. En los casos que el rendimiento sea bajo se puede colocar en “d” un poco de éter etílico para obtener los aceites y el destilado. Se colectan los aceites, se refrigera a 0°C por 24 horas para separar el éter de la mezcla.



### Apéndice 3

#### Método de difusión en agar o de Kirby-Baier.

Este método se utiliza para evaluar cualitativamente la actividad antibacteriana de los preparados herbales (Van den Berghe y Vlietinck, 1991).

La metodología es la siguiente:

- **Medio.** Se utiliza como medio de cultivo estándar el agar Müeller-Hinton (Bioxon 110-1), ya que promueve el desarrollo de la mayoría de los aislamientos bacterianos clínicamente significativos. 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 dilución del antibiótico hacia abajo con tendencias a estrechar artificialmente las zonas de inhibición.
- **Inóculo.** Con un asa de siembra se tocan las superficies convexas de 4 o 5 colonias de apariencia semejante, se sumerge el asa en 10 ml de caldo Müeller-Hinton (Bioxon 260), se enjuaga bien en el líquido para descargar todo el material y luego se retira el asa. Se incuba el tubo de cultivo a 37° C durante 24 horas, o hasta que la turbidez del medio sea equivalente al estándar N° 0.5 ml de MacFarland. Esto equivale a una concentración de aproximadamente  $1.5 \times 10^8$  bacterias/ml.

El estándar 0.5 de MacFarland se prepara añadiendo 0.5 mg de cloruro de bario a 99.5 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> N (Hendrickson, 1987, en 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 a 660 nm. Si la suspensión de organismos es más turbia que el estándar, se añadirá solución salina isotónica (0.9% NaCl) hasta igualarlas. Una vez logrado esto, se sumerge un hisopo de poliéster, estéril y seco en la suspensión bacteriana, y antes de retirarlo se elimina el exceso de líquido haciendo rotar el hisopo contra la pared interna del tubo. Con este hisopo se inoculará la superficie de una placa de agar de Müeller-Hinton.



Previamente, se deja que la placa alcance la 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  $60^\circ$  luego de cada estría.

Una vez seco el inóculo, la placa de Müller-Hinton esta lista para la aplicación de las muestras a las que se les evalúa su actividad antibacteriana.

- **Aplicación de extractos.** Para este caso, se utiliza sensidiscos de 5 mm de diámetro hechos de papel Whatman N° 5. En todos los casos se hacen las diluciones necesarias para que los sensidiscos lleven la cantidad deseada de los extractos (4 mg/disco).

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

- **Control positivo.** Se evalúa la sensibilidad de las cepas experimentales utilizando discos con Cloranfenicol (25  $\mu\text{g}$ ) en el caso de los ensayos con bacterias, y Ketoconazol (7  $\mu\text{g}$ ) en el caso de hongos.
- **Incubación.** Una vez preparadas las placas para la prueba de susceptibilidad, se colocan en una incubadora a  $37^\circ\text{C}$ , sin mayor tensión de  $\text{CO}_2$ . Es preciso evitar presión de  $\text{CO}_2$  debido a que se puede formar ácido carbónico en la superficie humedecida del agar, provocando un descenso del pH. El desarrollo de algunos microorganismos es inhibido a pH ácido, lo cual tiende a aumentar 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 incubarán siempre placas con discos con solvente, como control negativo.
- **Interpretación de los resultados.** Las zonas de inhibición se miden con una regla de calibración en milímetros. En todos los casos, esta prueba se hace por triplicado y se reportan los valores promedio en mm.



## Apéndice 4

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

**Método Modificado de Microdilución en Agar** (Jones, *et al.*, 1987, citado en Ávila, 1996).

- **Preparación de reactivos y diluciones.** La solución antimicrobiana de trabajo se prepara diluyendo la fracción en agar de Müeller-Hinton (Visón 260) a la mayor concentración final deseada. La prueba se realiza en cajas de Petri. Las concentraciones que se utilizan son 0.125, 0.250, 0.05, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0 y 4.0 mg/ml. Cada ensayo se realiza por triplicado.
- **Inóculo e incubación.** Se prepara un inóculo que contenga  $10^6$  a  $10^7$  UFC/ml (unidades formadoras de colonia/ml), con ayuda de un hisopo se toma un poco del inóculo y se puntea sobre el agar. Incubar las cajas 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 los resultados.** La menor concentración de antimicrobiano que produce una inhibición completa del desarrollo visible representa la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI). La inhibición total del crecimiento bacteriano, es decir cuando no se observe el desarrollo del 99.9 % del inóculo sembrado se considera la CMB.



## Apéndice 5

### Método cualitativo de inhibición del crecimiento radial.

El ensayo contra hongos filamentosos (Wang y Bun, 2002), se lleva a cabo en cajas de Petri 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 del compuesto 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 hasta que el crecimiento micelial se haya desarrollado.
- **Controles positivos.** Se evaluará la sensibilidad de las cepas experimentales con sensidiscos de 7 µl/disco de Ketoconazol.
- **Interpretación de resultados.** En el caso de existir zonas de inhibición se reportará el extracto como activo, en todos los casos esta prueba se hará por triplicado.



### **Método cuantitativo de inhibición del crecimiento radial**

El ensayo contra hongos filamentosos (Wang y Bun, 2002), se lleva a cabo en cajas de Petri (60 x 15), que contengan 6 ml de agar de papa dextrosa, con las siguientes concentraciones del extracto a probar 4.00, 3.00, 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.
- **Control positivo.** Se evaluará 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 CMF; mientras que la concentración que representa al 50 % de inhibición corresponde a la  $CF_{50}$  y estas serán determinadas por regla de tres con respecto al control negativo, el cual representa el 0% de inhibición.

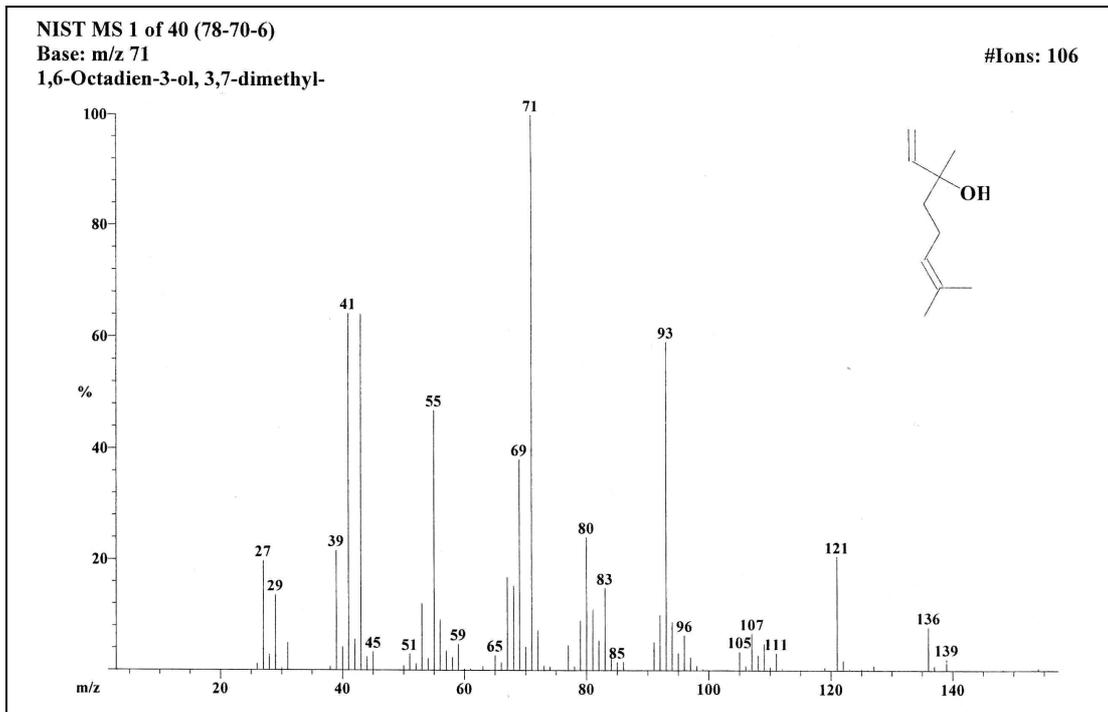


### Apéndice 6

#### Espectros de masa de aceite esencial de *Tagetes erecta* L. (Cempasúchil).

Nombre del compuesto: Linalol (C<sub>10</sub>H<sub>18</sub>O)

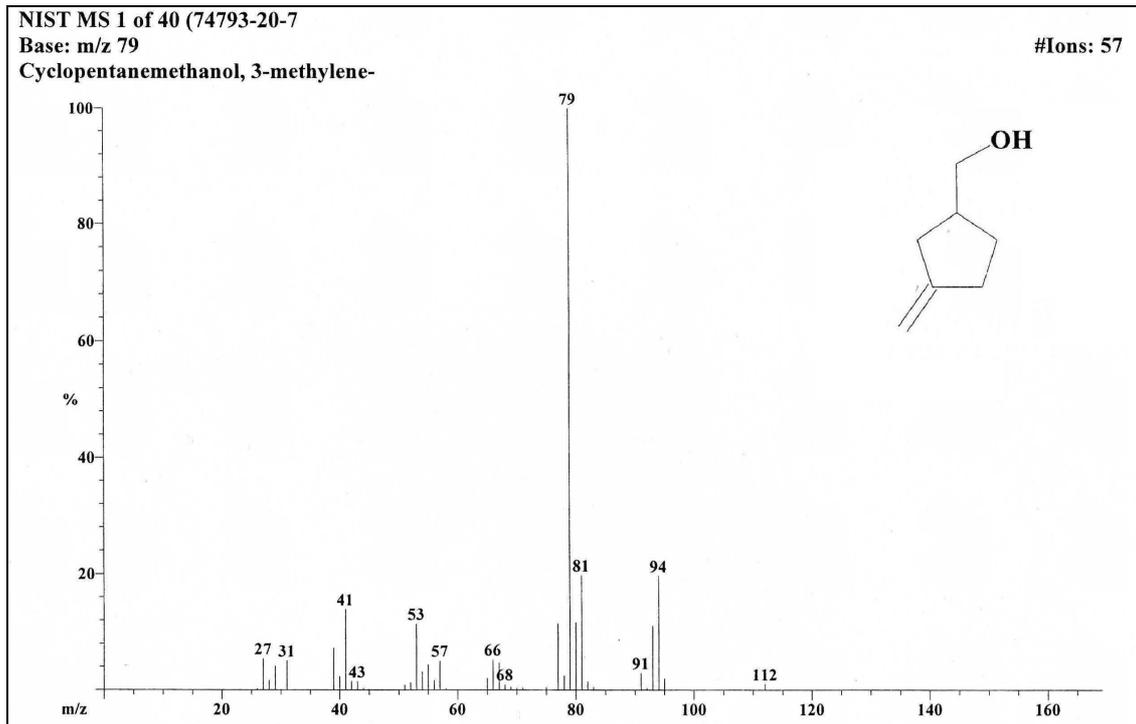
Planta Hidropónica	Tiempo de Retención: 10.63	Porcentaje: 5.64 %
Planta silvestre	Tiempo de retención: 10.64	Porcentaje: 6.86 %





Nombre del compuesto: 3-metilen-ciclopentanometanol (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O)

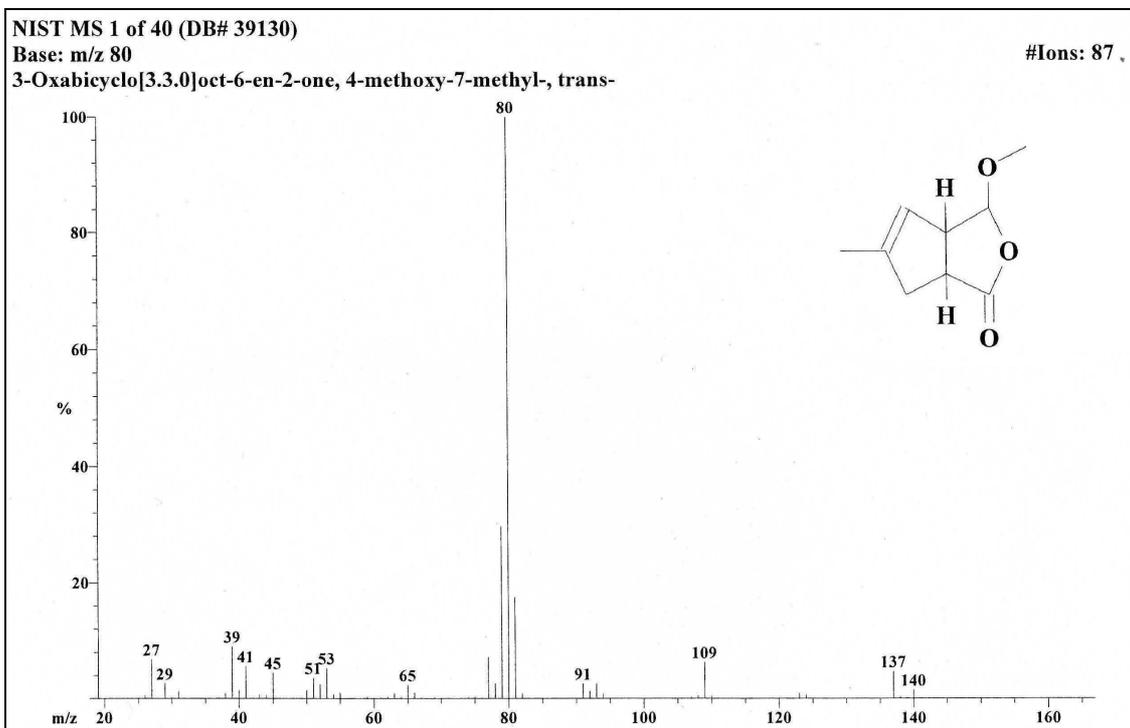
Planta Hidropónica	Tiempo de Retención: 11.44	Porcentaje: 22.59 %
Planta silvestre	Tiempo de retención: 11.45	Porcentaje: 13.33 %





Nombre del compuesto: Trans-3-oxabicyclo[3.3.0]oct-6-en-2-ona-4-metoxi-7-metil  
(C<sub>9</sub>H<sub>11</sub>O<sub>3</sub>)

Planta Hidropónica	Tiempo de Retención: 11.92	Porcentaje: 2.25 %
Planta silvestre	Tiempo de retención: ---	Porcentaje: ---





Nombre del compuesto: Oct-5-en-2-ol biciclo [2.2.2] (C<sub>8</sub>H<sub>12</sub>O)

Planta Hidropónica

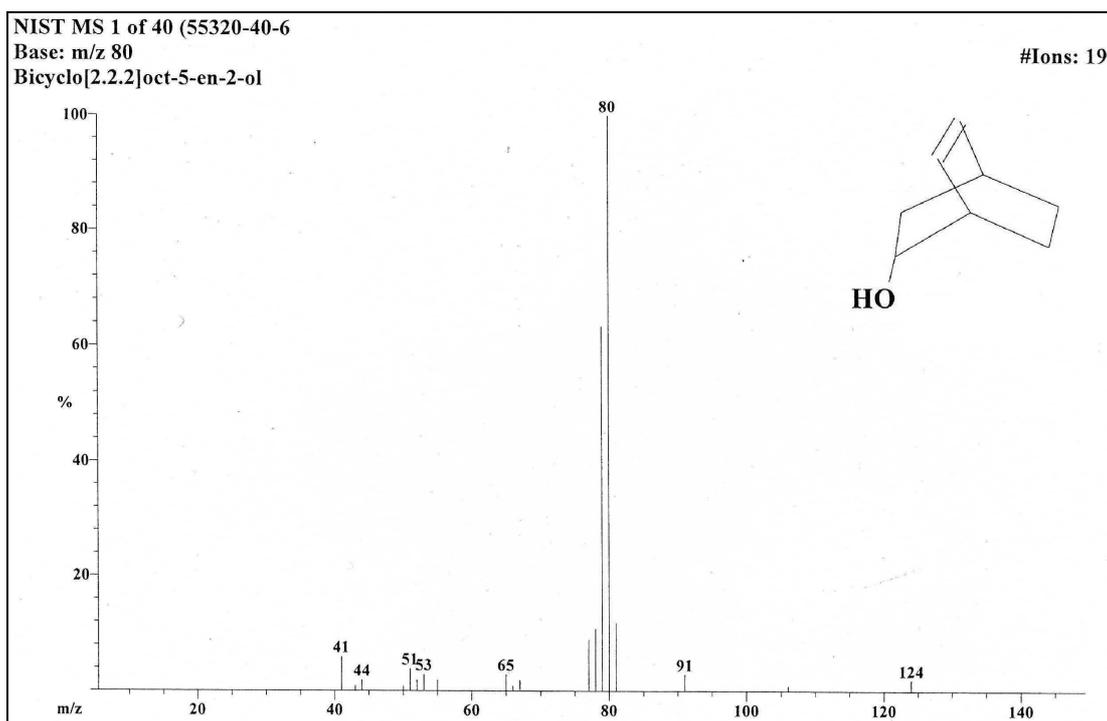
Tiempo de Retención: ---

Porcentaje: ---

Planta silvestre

Tiempo de retención: 11.92

Porcentaje: 3.33 %





Nombre del compuesto: 2-isopropil-5-metil-3-ciclo hexeno-1-ona (C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>O)

Planta Hidropónica

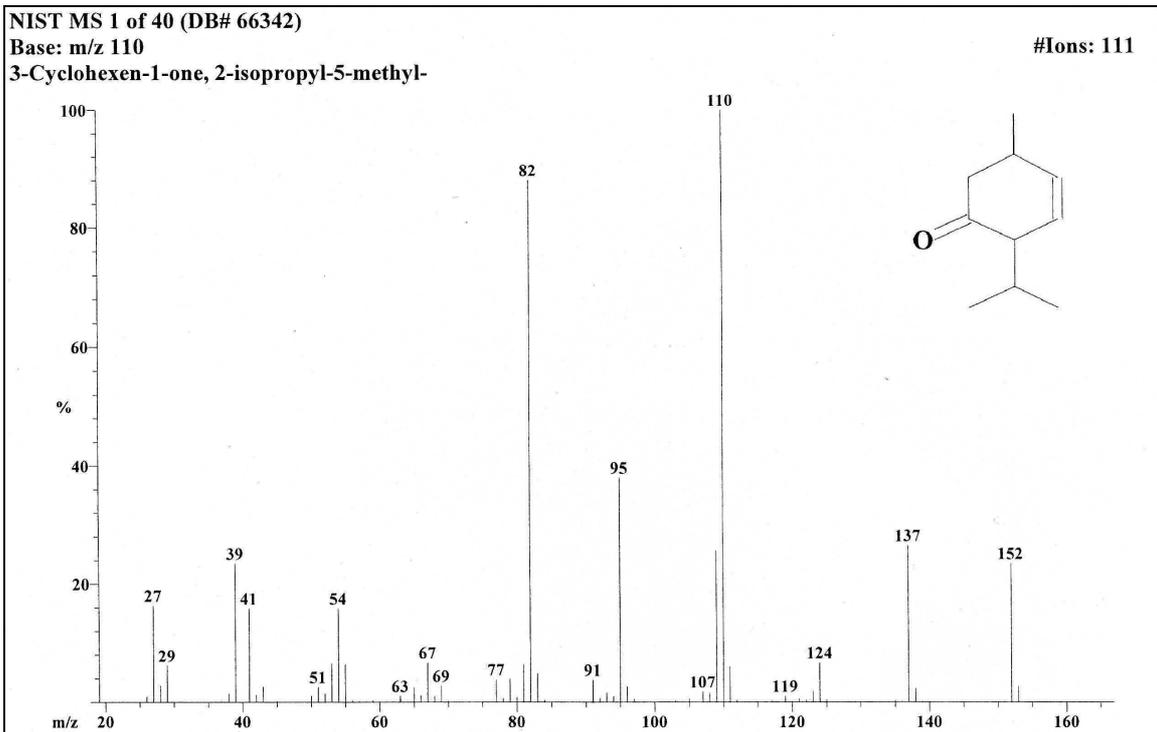
Tiempo de Retención: 13.6

Porcentaje: 40.96 %

Planta silvestre

Tiempo de retención: ---

Porcentaje: ---





Nombre del compuesto: Piperitona (C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>O)

Planta Hidropónica

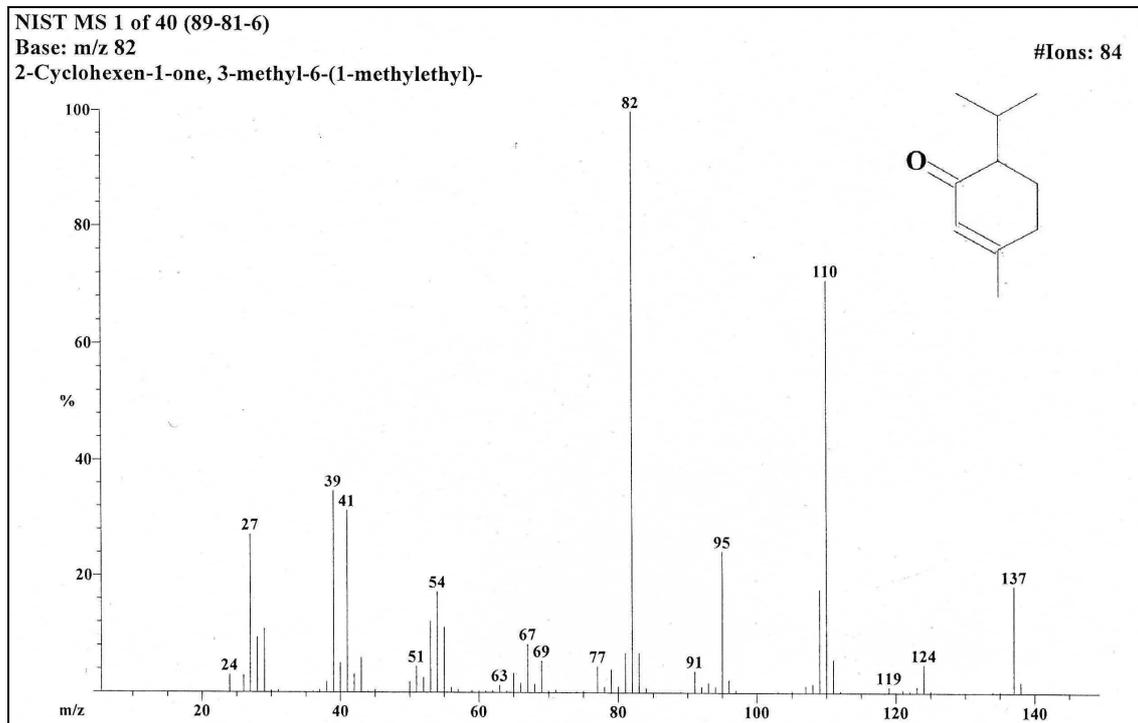
Tiempo de Retención: ---

Porcentaje: ---

Planta silvestre

Tiempo de retención: 13.62

Porcentaje: 28.62 %





Nombre del compuesto: Indol ( $C_8H_7N$ )

Planta Hidropónica

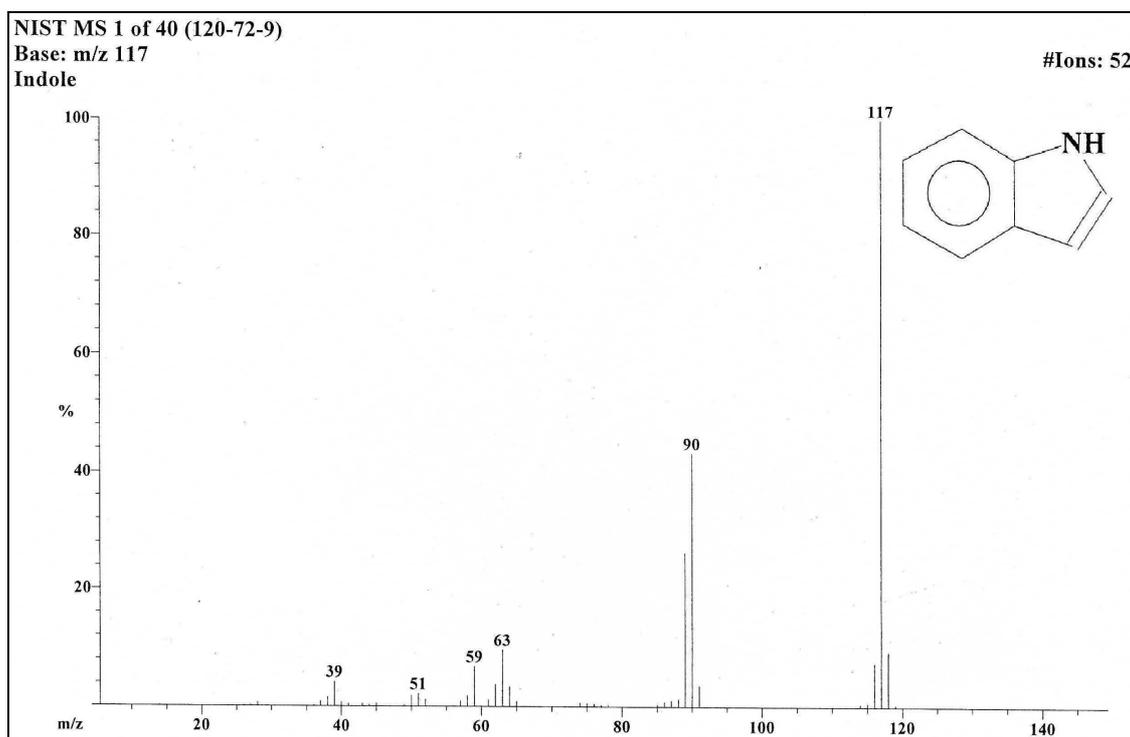
Tiempo de Retención: ---

Porcentaje: ---

Planta silvestre

Tiempo de retención: 14.31

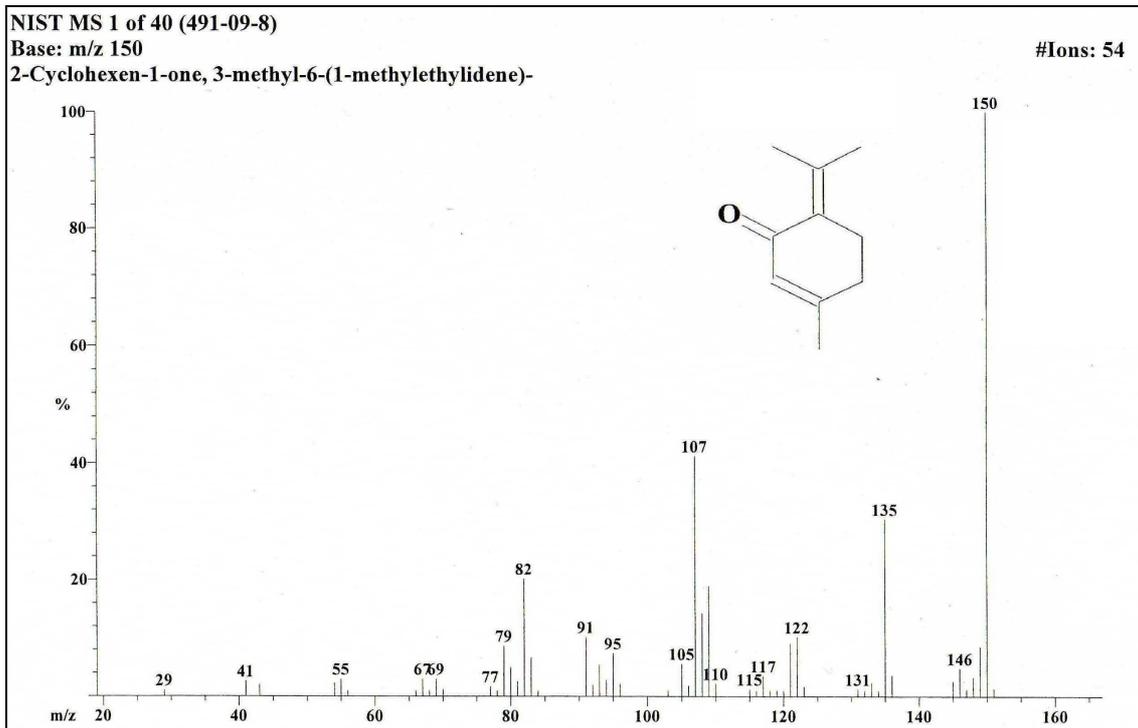
Porcentaje: 4.50 %





Nombre del compuesto: 3-metil-6-(1-metiletilideno)-2ciclohexanona-1-ona  
(C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>O)

Planta Hidropónica	Tiempo de Retención: 15.09	Porcentaje: 12.71 %
Planta silvestre	Tiempo de retención: 15.12	Porcentaje: 17.45 %





Nombre del compuesto: Mentofuranona (C<sub>10</sub>H<sub>12</sub>O<sub>2</sub>)

Planta Hidropónica

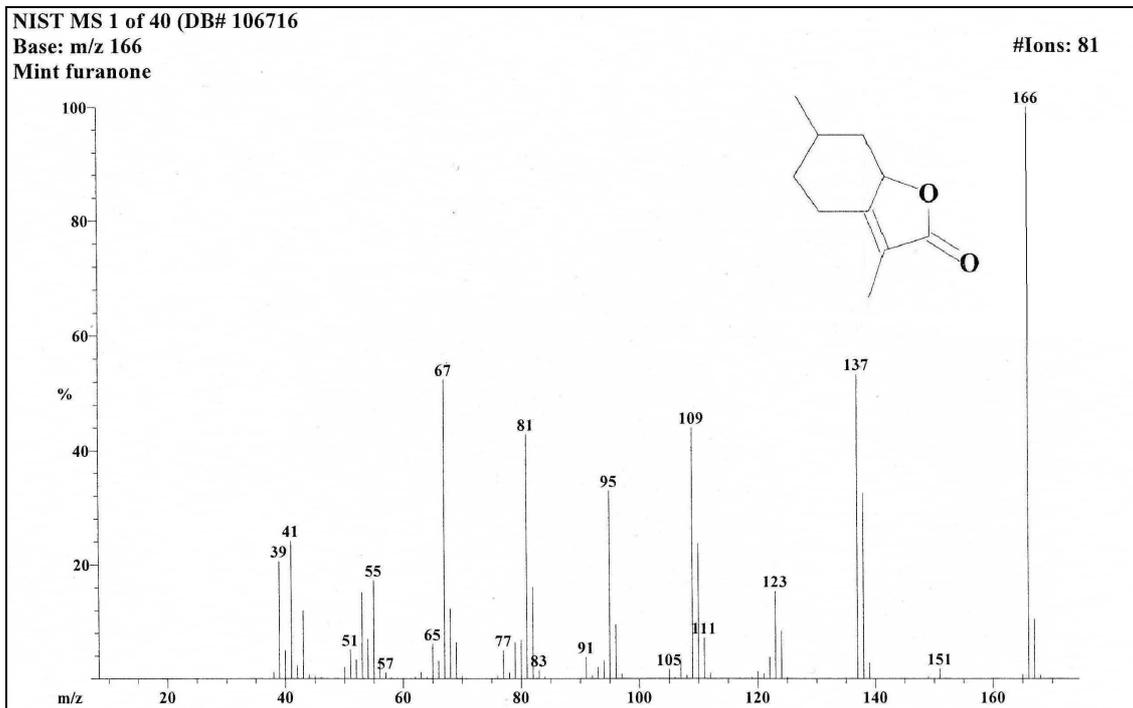
Tiempo de Retención: 15.48

Porcentaje: 5.64 %

Planta silvestre

Tiempo de retención: 15.50

Porcentaje: 8.62 %





Nombre del compuesto: Veridiflorol (C<sub>15</sub>H<sub>26</sub>O)

Planta Hidropónica

Tiempo de Retención: 19.08

Porcentaje: 3.67 %

Planta silvestre

Tiempo de retención: 19.10

Porcentaje: 11.76 %

