



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

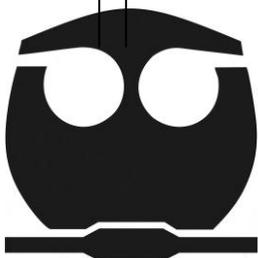
**Estudio químico y actividad antimicrobiana de la
infusión de *Tagetes lucida* Cav.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICO BIÓLOGA

PRESENTA

KAREN KENIA JIMÉNEZ MARTÍNEZ



México D. F.

2013



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



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:	M. en C. José Manuel Méndez Stivalet
Vocal:	Dra. Gloria Díaz Ruiz
Secretario:	Dr. José Fausto Rivero Cruz
1er. suplente:	Dra. Isabel Rivero Cruz
2do. suplente:	Dra. Mabel Clara Fragoso Serrano

Sitio donde se desarrolló el proyecto:

Laboratorio 111, Edificio E
Facultad de Química UNAM

Asesor

Dr. José Fausto Rivero Cruz

Sustentante

Karen Kenia Jiménez Martínez

DEDICATORIAS

A mis padres que siempre han estado a mi lado para apoyarme, por su tiempo y sus esfuerzos, por su motivación, su comprensión y su infinito amor con el cual han logrado junto conmigo alcanzar este sueño.

A mis hermanas por su amor, su apoyo, sus regaños y la confianza que siempre me han brindado.

A toda mi familia porque cada uno ha contribuido enormemente en mi formación personal.

A mis abuelos que desde el cielo me han cuidado y amparado para llegar a esta etapa.

A mis sobrinos Fer y Axel, que siempre que llegaba desmotivada me alegraban con su simple sonrisa y ocurrencias.

A mis amigas de toda la vida, María Fernanda, Dianelly, Dulce, Mirelle, que en las buenas y en las malas han estado conmigo apoyándome y dándome su amor incondicional.

A mis amigos de la facultad, “los auditorianos” que estuvieron conmigo a lo largo de todo este tiempo, que siempre me apoyaron y me ayudaron ya fuera académicamente o personalmente, que siempre me dieron un consejo, ánimos y mucha alegría, porque sin ustedes la universidad no habría sido la mejor etapa que he vivido.

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México por haberme brindado la mejor formación profesional y personal.

Al Dr. José Fausto Rivero Cruz por su asesoría y apoyo para la realización de este trabajo, pero sobre todo por su amistad.

Al personal técnico de la USAI de la Facultad de Química; a la Q. Georgina A. Duarte Lisci por la asistencia técnica.

Al personal del cepario de la Facultad de Química; al QFB Alejandro Camacho Cruz por su asistencia técnica.

Al señor Everardo Cruz Navarrete por proporcionarnos el material vegetal utilizado en este trabajo de investigación.

Al grupo de sinodales por la revisión de este trabajo.

ÍNDICE

Lista de abreviaturas.....	i
Lista de tablas.....	ii
Lista de figuras.....	iii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	2
2.1 PERICÓN (<i>Tagetes lucida Cav.</i>).....	3
2.1.1 Sinonimia.....	3
2.1.1.1 Sinonimia popular.....	3
2.1.1.2 Nombres en lenguas indígenas de México.....	3
2.1.1.3 Nombres comunes en inglés.....	3
2.1.2 Categorías taxonómicas superiores.....	4
2.1.3 Definición y generalidades.....	4
2.1.4 Aspectos históricos.....	6
2.1.5 Composición química.....	8
2.1.6 Propiedades biológicas y farmacológicas.....	14
2.2 ACEITES ESENCIALES.....	19
2.2.1 Definición.....	19
2.2.2 Composición química.....	20
2.2.3 Aplicaciones.....	22
2.2.4. Propiedades biológicas de los aceites esenciales.....	22

2.3 ENFERMEDADES GASTROINTESTINALES.....	23
2.3.1 Enfermedades infecciosas gastrointestinales de origen bacteriano en México.....	23
2.3.2 Generalidades de las enfermedades gastrointestinales causadas por bacterias.....	23
3. JUSTIFICACIÓN.....	31
4. OBJETIVOS.....	33
4.1 OBJETIVOS GENERALES.....	33
4.2 OBJETIVOS PARTICULARES.....	33
5. DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	34
5.1 MATERIAL VEGETAL.....	34
5.2 ESTUDIO FITOQUÍMICO DE PERICÓN.....	34
5.2.1 Obtención del aceite esencial de Pericón.....	34
5.2.2 Cromatografía de gases-Espectrometría de masas.....	34
5.2.3 Análisis por HS-SPME-GC-MS-TOF de las partes aéreas de pericón.....	37
5.2.4 Identificación de los compuestos presentes en el aceite esencial y los volátiles separados utilizando la microextracción en fase sólida.....	38
5.2.5 Preparación de la infusión de las partes aéreas de pericón.....	38
5.2.6 Obtención del extracto total del pericón.....	38
5.3 ENSAYO BIOLÓGICO.....	39
5.3.1 Microorganismos de prueba.....	39

5.3.2 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI).....	39
---	----

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....41

6.1 ESTUDIO QUÍMICO DEL ACEITE ESENCIAL DE LAS PARTES
AÉREAS DE T. LUCIDA CAV.....41

6.1.1 Separación e identificación por CG-EM de los compuestos presentes en el aceite esencial de las partes aéreas de Tagetes lucida Cav.....	41
--	----

6.1.2 Extracción, separación e identificación de los compuestos volátiles presentes en las partes aéreas de Tagetes lucida Cav. mediante la técnica acoplada de EC- MEFS-CG-EM-TV.....	51
--	----

6.2 Evaluación de la actividad antimicrobiana de los compuestos presentes en el aceite esencial y la infusión de pericón.....	56
--	----

7. CONCLUSIONES.....60

8. PERSPECTIVAS.....61

9. BIBLIOGRAFÍA.....62

Lista de Abreviaturas

Abreviatura	Significado
°C	Grado centígrado
BHI	Infusión cerebro corazón
CAPE	Fenetil éster del ácido cafeico
CAR	Carboxen
CG	Cromatografía de gases
CHX	Gluconato de clorhexidina
cm	Centímetro
CMI	Concentración mínima inhibitoria
DB-5	5%-fenil-polimetilsiloxano
DVB	Divinilbenceno
EC	Espacio de cabeza
EM	Espectrometría de masas
g	Gramo
h	Hora
HPLC	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución
HS	Head Space (Espacio de cabeza)
IR	Índice de retención
km	Kilómetro
m	Metro
MEFS	Microextracción en fase sólida
mg	Miligramo
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
NaCl	Cloruro de Sodio
NIST	National Institute of Standards Technology
nm	Nanómetro
PDMS	Polidimetilsiloxano
PTFE	politetrafluoroetileno
TV	Tiempo de Vuelo
u	Unidad de masa atómica
UFC	Unidades formadoras de colonias
µg	Microgramo
µm	Micrómetro

Lista de Tablas

Tabla 1. Principales compuestos presentes en el AE de la especie *Tagetes lucida* Cav. de diferentes orígenes.

Tabla 2. Tiofenos más comunes del género *Tagetes*.

Tabla 3. Compuestos químicos con actividad fungicida, fusicistática y nematocida en *Tagetes lucida* Cav.

Tabla 4. Etiologías de las gastroenteritis en diversos grupos de población.

Tabla 5. Enfermedades comunes transmitidas a través de los alimentos, causadas por bacterias.

Tabla 6. Condiciones de análisis optimizadas.

Tabla 7. Condiciones optimizadas para el análisis de las muestras.

Tabla 8. Controles para el ensayo biológico.

Tabla 9. Compuestos volátiles identificados en el aceite esencial de las partes aéreas (hojas, tallos y flores) de *Tagetes lucida* Cav. mediante CG-EM-TV y el análisis de los índices de retención (Índices de Kovats).

Tabla 10. Estructuras de los compuestos mayoritarios encontrados en el aceite esencial de *Tagetes lucida* Cav. (pericón) y su abundancia relativa.

Tabla 11. Constituyentes volátiles de las partes aéreas de *T. lucida* Cav, identificados a partir de la metodología EC-MEFS-CG-EM-TV y el análisis de índices de retención (Índices de Kovats).

Tabla 12. Evaluación de la actividad antibacteriana del aceite esencial y la infusión de las partes aéreas de *Tagetes lucida* Cav.

Lista de Figuras

Figura 1. Planta *Tagetes lucida* Cav.

Figura 2. *Tagetes lucida* Cav

Figura 3. Distribución de la planta *Tagetes lucida* Cav. en México.

Figura 4. Unidad isopreno C₅

Figura 5. Algunos ejemplos de terpenos de cadena abierta y cíclicos funcionalmente sustituidos

Figura 6. Número de casos de enfermedades del tracto gastrointestinal por grupo de edad.

Figura 7. Microextracción en fase sólida por el método de *headspace*

Figura 8a. Comparación del espectro de masas obtenido para el α -mirceno con el de la biblioteca del equipo utilizado.

Figura 8b. Comparación del espectro de masas obtenido para el metileugenol con el de la biblioteca del equipo utilizado.

Figura 9. Cromatograma de los compuestos presentes en el aceite esencial de las partes aéreas de *Tagetes lucida* Cav.

Figura 10. Cromatograma de los compuestos volátiles presentes en las partes aéreas de la especie *Tagetes lucida* Cav., empleando la técnica EC-MESF-CG-EM-TV.

1. INTRODUCCIÓN

México cuenta con una gran diversidad florística y en cuanto a la diversidad fitoterapéutica, ésta también es muy amplia y depende de las regiones climáticas y de los grupos indígenas que viven en ellas (Gupta, 1995).

Actualmente, en México, la importancia de las plantas medicinales no sólo radica en su riqueza como parte de la cultura, sino también en el conocimiento científico que se genera a partir de su estudio y del análisis que se realiza de cuestiones ecológicas, geográficas, culturales, farmacológicas y químicas que constituyen el contexto global (Santillán, 2012). *Tagetes lucida* en particular es una rica fuente de bioactivos. Debido a la importancia de los principios activos que posee, su estudio es muy interesante.

El género *Tagetes* pertenece a la familia Astereaceae y comprende cerca 50 especies, entre ellas, la *Tagetes lucida* Cav. (*Tagetes florida* Sweet), comúnmente conocida en México como “anisillo” o “flor de Santa María” y en Guatemala y Honduras como “pericón”.

El pericón es una hierba erecta de 30 cm a 1 m de altura, muy ramificada y que huele a anís. Las hojas son de un mismo ancho tanto en la parte axial, como en la distal, con los bordes dentados y de color verde oscuro, de olor y sabor a anís. Tiene las flores dispuestas en cabezuelas agrupadas en racimos, están en las partes terminales de la planta y son de color amarillo. Sus frutos son negros y pequeños. Es originaria de México, Guatemala y Honduras. Habita en climas cálido, semicálido, seco, semiseco y templado. El uso medicinal más frecuente de esta planta es en trastornos digestivos, principalmente para dolores de estómago, diarrea, disentería, empacho y vómito. Asimismo, se recomienda en desórdenes ginecológicos como cólicos menstruales, dismenorrea. Se prescribe para dolores en general (Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009).

Se ha detectado en *Tagetes lucida* un efecto antibacteriano (especialmente contra *Salmonella pyogenes* y *Candida albicans*, lo que señala que la planta es efectiva cuando se utiliza en procesos infecciosos que involucran a estos organismos). Además se ha reportado actividad antiplaquetaria, efecto hipotensor al administrarse por vía intravenosa y un fuerte efecto diurético de la planta en forma de té (Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009)

La planta contiene un aceite esencial en el que sólo se ha identificado un componente que está presente en altas concentraciones, el estragol; además contiene flavonoides, particularmente glicósidos de quercetina, quercetagrítina, tagetona, tagetina y canferol, taninos, pectina y gomas (Céspedes *et al.*, 2006).

Entre los compuestos aislados de los extractos metanólicos de *Tagetes lucida* que han presentado actividad biológica contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, se encuentran: el 7,8-dihidroxi-6-metoxicumarina, el 7,8-dihidroxicumarina y el esculetina, este último mostró una interesante actividad contra *Vibrio cholerae*, principal bacteria contaminante del agua. Asimismo, la escoparona y la 6,7-dimetoxi-4-cumarina, presentaron actividad antifúngica contra *Trichophytum mentagrophytes* y *Rhizotonia solani* (Céspedes *et al.*, 2006). Además, los extractos de acetato de etilo, mostraron actividad antimicrobiana contra *Shigella boydii*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Sarcina lutea* siendo el compuesto bioactivo la 5,7,4'-trimetoxiflavona (Hernández *et al.*, 2006).

2. ANTECEDENTES

2.1 PERICÓN (*Tagetes lucida* Cav.).

2.1.1 Sinonimia

2.1.1.1 Sinonimia popular

Esta planta se conoce con los nombres triviales de anisillo, atagote, cedrón, flor de xuchitl, hierbanís, hierba anís, hierba de nubes, hierba de San Juan, hierba santa, rincón, Santa María de jardín, tatalencho (Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009), Hierbanís, jericón, pericón vomol y Santa María (Márquez *et al.*, 1999). En el Bajío se usa cuchrucumín, falso hipericón, flor de Santa María, hierba añil, pericón, periquillo y yerbanís; fuera de ésta zona se conoce como tziziqui y yauhtli (Villarreal, 2003).

2.1.1.2 Nombres en lenguas indígenas de México

Esta planta recibe diferentes nombres dependiendo del lugar geográfico en que se encuentre, esto es debido a las diferentes lenguas indígenas que existen a lo largo del territorio mexicano. En el estado de Chiapas se le conoce como k'anal nich wamal, k'ixin, perikon vomol, tzitz ak, tzitz pox, tzitz vomol, tzitzilal ul (tzotzil), tzitzak (tzeltal), tzo' ka'il jomol (tzeltal/tzotzil). En el Estado de México se le ha denominado mikua y xonequilitl (otomí). En Guerrero recibe el nombre de yita perico, cuahuyahuitli y curucume (mixteco). En Morelos se le conoce como yauhtli (náhuatl). En Michoacán es conocida por el nombre de tztzcurulcum (purépecha) y en el estado de San Luis Potosí se denomina ojoom (tenek) (Villarreal, 2003).

2.1.1.3 Nombres comunes en inglés

La especie *Tagetes lucida*, recibe los nombres *Sweetscented marigold*, *sweetmace* y *sweet marigold* en el idioma inglés.

2.1.2 Categorías taxonómicas superiores

Dominio: Eucaria

Reino: Plantae

División: Spermatophyta

Clase: Dicotiledoneae

Familia Asterales

Tribu: Astrereae

Género: *Tagetes*

Especie: *lucida*

2.1.3 Definición y generalidades.

Tagetes lucida es una hierba perenne, aromática, erecta, que crece entre 30 y 95 cm. Se levanta desde una base corta, gruesa y leñosa; muy ramificada y que huele a anís. Presenta hojas opuestas, puntiagudas, finamente dentadas, con numerosas glándulas oleosas y flores amarillas dispuestas en pequeñas cabezuelas agrupadas en racimos, ubicadas en las partes terminales de la planta. Sus frutos son negros y pequeños (Gupta, 1995) **(Figura 1)**.



Figura 1. Planta *Tagetes lucida* Cav.

La planta está formada por ramas con cabezuelas, flores, anteras y el aequenio, cuyas medidas y proporciones se ilustran en la **Figura 2**, en conjunto la planta llega a medir un promedio de 60 cm sin pasar del metro de alto.

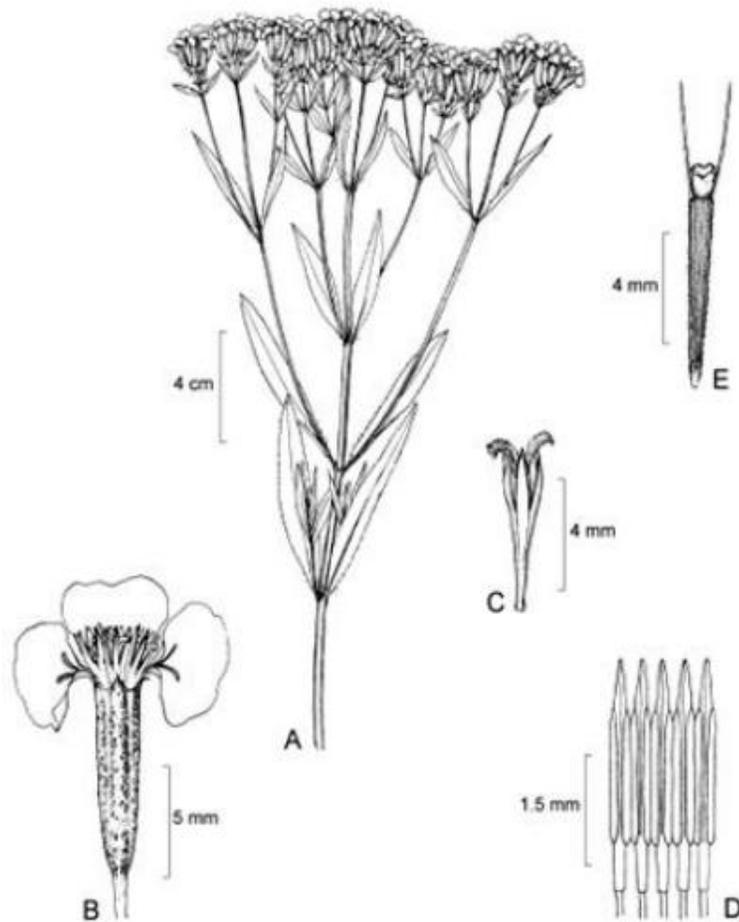


Figura 2. *Tagetes lucida* Cav: A. rama con cabezuelas; B. cabezuela; C. flor del disco; D. anteras; E. aequenio (Villarreal, 2003)

La planta es nativa de México y se distribuye por toda Mesoamérica y Sudamérica, se encuentra principalmente en bosques de encino y laderas de ubicadas entre 1000 y 2600 msnm, con temperaturas entre 15 y 20°C (Gupta, 1995; Ciccío, 2004; Orellana, 2013). Es ampliamente conocida en Sonora, Chihuahua y Nuevo León. (Rzedowski y Equihua, 1987) (**Figura 3**).



Figura 3. Distribución de la planta *Tagetes lucida* Cav. en México (Rzedowski y Equihua, 1987).

La infusión de las flores y hojas se usa en Guatemala, México y otros países latinoamericanos para aliviar los dolores del parto, como tratamiento para la anemia, las afecciones nerviosas, gastrointestinales (cólicos, diarrea, flatulencias, indigestión, náuseas, vómitos, etc.), y respiratorias (amigdalitis, gripe, resfriados y tos ferina, entre otras), así como para los dolores menstruales, el reumatismo y las úlceras. El zumo de las hojas y flores se utiliza como repelente de mosquitos y en México, las hojas se fuman debido a sus presuntas propiedades alucinógenas (Gupta, 1995; Cáceres, 1991).

2.1.4 Aspectos históricos

La referencia más antigua se menciona en el Códice Florentino del siglo XVI en donde se comenta que sirve "para los que tienen cámaras (diarrea), los que escupen sangre y para la fiebre" (Sahagún, 1946).

En el mismo siglo, Francisco Hernández reporta diversos usos "*Cura las úlceras, evacua la orina, estimula las reglas, provoca y atrae los fetos muertos, es favorable al pecho, alivia la tos, quita la flatulencia, estriñe el vientre, corrige el mal aliento, aumenta la leche, combate los venenos, estimula el apetito venéreo, quita*

el dolor de la cabeza, alivia a los dementes, a los espantados y atontados por el rayo, contiene el flujo de sangre, apaga la sed de los hidrójicos, aleja los fríos de las fiebres, mezclado con grasa de víbora y tomado repara las venas rotas; alivia el flujo excesivo de la nariz, sana los oídos enfermos. Resuelve los tumores, calienta el estómago y cura el empacho, principalmente el de los niños. Arroja las piedrecillas y arenas de los riñones y de la vejiga, así como la pituita más crasa acumulada en ellos; adelgaza los humores, contiene el vómito; cría pus, sana las úlceras, aprovecha al útero, destierra las chinches, quita las jaquecas. Sana admirablemente el salpullido y los empeines" (Hernández, 1966).

En el siglo XVII, Francisco Ximenez parafraseando a Hernández describe que *"provoca la orina y la regla, expelle la criatura muerta del vientre, aprovecha a la tos y expelle las ventosidades, conforta el estómago cuando esta bajo, corrige el mal olor de la boca y engendra leche. Es contraria a los venenos, mitiga el dolor de cabeza, aprovecha a los locos y para los que quedaron atónitos y espantados de rayos, restaña el flujo de sangre, quita la sed a los hidrójicos y los fríos de las calenturas, aplicándola con enjundia de víbora y dada a beber repara las venas rotas. También en forma de emplasto en las orejas que están malas las suele sanar y de la misma manera sobre las hinchazones y apostemas las disipa y resuelve, calienta el estómago y cura el ahíto principalmente de los niños, limpia los riñones y vejiga de las arenas y cabellos. De la flema gruesa y tenaz que suele opilar sobre aquellas vías, adelgaza los humores, y puesta con miel sobre la boca del estómago detiene los vómitos engendra materia, y en suma es una especie de pericón no conocido en nuestra España".* Por la misma época, Hernando Ruíz de Alarcón reseña su uso para las calenturas que no son cotidianas, sino terciadas. A las enfermedades de salpullido o empeines, y otros males que proceden del fuego, así como la cura de ciciones o tercianas (Ximenez, 1915).

A inicios del siglo XVIII, Juan de Esteyneffer la emplea en el tratamiento contra las hemorroides, el "mal de madre" y otros malestares (de Esteyneffer, 1712).

En el siglo XX, Maximino Martínez la reporta como: antidisentérico, antiespasmódico, antipalúdico, caquexia, carminativo, diaforético, diurético, emenagogo, emético y relajante (Martínez, 1959). Finalmente, la Sociedad Farmacéutica de México señala a *T. lucida* como antipalúdico, antiparasitario, emenagogo y estimulante.

2.1.5 Composición química

En cuanto a la composición química del aceite esencial de las partes aéreas de *Tagetes lucida* Cav. se han identificado 53 compuestos, de los cuales los principales son anetol, metileugenol y estragol (Amner *et al.*, 2007). Siendo el estragol (metilchavicol) el principal constituyente de dicho aceite (**Tabla 1**), el cual es un derivado fenilpropanoide que se presenta en muchas fuentes vegetales (Ciccíó, 2004).

Tabla 1. Principales compuestos presentes en el AE de la especie *Tagetes lucida* Cav. de diferentes orígenes.

Origen	Compuestos mayoritarios
Guatemala	Estragol (33.9 %), anetol (23.8 %), metileugenol (24.3 %) (Bicchi <i>et al.</i> , 1997).
Italia	<u>Flores:</u> La esencia contenía principalmente estragol (93.8 %) y el <i>trans</i> - β -cariofileno (2.1 %). <u>Hojas:</u> Se observó una disminución en el contenido de estragol (78.2%) y la presencia de metileugenol (3.6%) (Marotti <i>et al.</i> , 2004).
Costa Rica	<u>Hojas y tallos:</u> Estragol (97.1 %), mirceno (1.8 %), (<i>E</i>)- β -ocimeno (0.2 %), linalol (0.2 %), germacreno D (0.2 %). <u>Flores:</u> Estragol (95.4 %), mirceno(1.2 %), (<i>E</i>)- β -ocimeno (0.2 %), linalool (0.2 %), germacreno D (0.5 %), 5-metil-5-(3-buten-1-inil)-2,2-bitienil (0.1 %), 5-(3-penten-1-inil)-2,2-bitienil (0.8 %) (Ciccíó, 2004).

Las hojas y flores contienen: AE constituido por compuestos tales como limoneno, β -ocimeno, β -cariofileno, mirceno, anetol, alilanisol, estragol, éter metílico de eugenol, tagetona, alcaloides cuaternarios, flavonoides

(quercetagetina, patuletina), saponinas, taninos, leucoantocianinas, ácido gálico, glucósidos cianogénicos, cumarinas (herniarina, dimetilalileter de 7-hidroxicumarina, 6,7,8 trimetoxicumarina), pectina, taninos y sales minerales (de la Cruz, 2005; Phillips *et al.*, 1984).

El fenilpropanoide estragol es un constituyente natural de una gran variedad de hierbas, tales como pericón, albahaca, hinojo y anís. El estragol está presente en grandes concentraciones en aceites volátiles de plantas y árboles, como también en los alimentos. De acuerdo a experimentos realizados con ratones se ha encontrado que el uso de los aceites esenciales de estas hierbas como agentes saborizantes han mostrado ser genotóxicos y pueden producir tumores hepáticos (Miller, 1983; Leung y Foster, 1980), además de ser cancerígeno; por lo tanto existen reducciones en la exposición y restricciones en los niveles de uso.

El estragol ha sido ampliamente utilizado como saborizante y aromatizante en las industrias de alimentos y bebidas alcohólicas; además, es usado en perfumes, jabones, detergentes y como precursor en síntesis orgánica para formulaciones farmacéuticas.. Este compuesto presenta actividades biológicas como insecticida, bactericida, antiinflamatoria y anestésica (Okunade y Olaifa, 1987; Muñoz *et al.*, 2007). El estragol es reconocido como sustancia segura y aprobado para su uso en alimentos bajo las secciones 201(s) y 409 de La Ley Federal de Alimentos, Medicamentos y Cosméticos de los Estados Unidos de Norteamérica (FD&C Act). Sin embargo, se ha demostrado que el estragol y sus metabolitos son genotóxicos y producen tumores hepáticos en experimentos con animales, debido a esto su empleo está limitado (Madurga, 2002).

El anetol es el componente principal del aceite esencial del anís (*Pimpinella anisum*) ya que contiene de un 80-90% de dicho compuesto, también está contenido en del aceite esencial de *Tagetes lucida* (23.8%) (Amner, *et al.*, 2007). El anetol es un agente saporífero con propiedades carminativas, por lo que se usa para paliar los problemas de aerofagia y flatulencia en los lactantes (Romero *et al.*,

2007). Otras propiedades farmacológicas son acción estrogénica, acción depresora del SNC, potente actividad antimicrobiana, insecticida, antiinflamatoria y anestésica (Mattos *et al.*, 2007).

Si bien la planta de anís es ampliamente admitida para su uso en productos alimentarios, existe la posibilidad remota de intoxicación por su contenido en anetol. En el ámbito toxicológico, concentraciones altas de anetol inducen convulsiones en animales, por lo tanto soluciones altamente concentradas pueden explicar casos de intoxicación, principalmente en lactantes. Se han comunicado casos de convulsiones, vómitos y edema pulmonar por ingestión de la esencia de anís en dosis de 1 ml por lo que se recomienda evitar un cocimiento prolongado en lugar de una simple infusión (Mattos *et al.*, 2007). El anetol es un compuesto químico precursor de la parametoxianfetamina (PMA), compuesto conocido con el nombre de "éxtasis". Por su alto contenido de anetol y estragol en los aceites esenciales de pericón y anís, se considera neurotóxico. También puede originar hepatotoxicidad, incluyendo insuficiencia hepática, dermatitis de contacto e hipersensibilidad (Cambar *et al.*, 1984).

Por otro lado, en los extractos metanólicos de *Tagetes lucida* han sido identificados diferentes flavonoides, glucósidos y ácidos fenólicos, tales como pautetin, isorhamnetin, quercetagenini 3-O-arabisonil galactósido y isorhamnetin 7-O-glucósido (Abdala, 1999), quercetagenini (3,4-dimetil éter 7-O-β-D-glucopiranosido), el ácido 3-(2-O-β-D-glucopiranosido-4-metoxifenil) propanóico y su metiléster (Aquino, *et al.*, 2002). Los autores destacaron en cada uno de los trabajos, la importancia de las propiedades antioxidantes de estos compuestos.

Los componentes del aceite esencial con propiedades antimicrobianas e insecticidas, así como de los flavonoides que actúan como antioxidantes, son generalmente sintetizados en las flores y las hojas. Los carotenoides, principalmente luteína y esteres de luteína, usados en preparaciones farmacológicas como colorantes y aditivos de alimentos, además de ser conocidos por sus efectos de antienvjecimiento y anti carcinogénico, se encuentran solo en

los pétalos de las flores. Los tiofenos, compuestos sulfuro poliacetilénicos, poseen una fuerte actividad antimicrobiana, son principalmente acumulados en las raíces. Se indica que los tiofenos poseen propiedades alelopáticas, insecticidas, nematocidas, antimicóticas, germicidas y citotóxicas. Además han resultado ser útiles como marcadores quimiotaxonómicos (Marotti *et al.*, 2004).

Los estudios fitoquímicos han revelado que *Tagetes lucida* sintetiza cumarinas, lactonas y terpenos. También se han aislado flavonoides, glicósidos de quercetina, quercetagrítina, tagetona, tagetina y canferol, taninos, pectina y gomas (Morton, 1981). En la raíz se ha detectado un compuesto sulfurado, el 5-(3-buten-1-inil)-2,2'-bitienil (BBT) y en la semilla se indica la presencia de un alcaloide (Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009).

Los tiofenos son compuestos característicos del género *Tagetes*. Son compuestos poliacetilénicos biológicamente activos cuya actividad es incrementada por la irradiación con luz ultravioleta de onda larga (UV-A, 320-400 nm) (Marotti *et al.*, 2004; Santa Cruz, 2005). Se sabe de cuatro tiofenos presentes en abundancia en el género *Tagetes*, estos son: 5-(3-buten-1-inil)-2,2'-bitienil (BBT), 5-(4-hidroxi-1-butinil)-2,2'-bitienil (BBTOH), 5-(4-acetoxi-1-butinil)-2,2'-bitienil (BBTOAc) y 2,2',5',2''-tertienil o α -tertienilo (α -T). El sitio de mayor concentración de tiofenos es la raíz (Santa Cruz, 2005) **(Tabla 2)**.

Tabla 2. Tiofenos más comunes del género *Tagetes* (Margl *et al.*, 2002).

Estructura		Nombre	Acrónimo
R1	R2		
-H		5-(3-buten-1-inil)-2,2'-bitienil	BBT
-CH ₃		5'-metil-5-(3-buten-1-inil)-2,2'-bitienil	MeBBT
-H		5-(1-pentil-2,2'-bitienil	PBT
-H		5'-(4-hidroxi-1-butinil)-2,2'-bitienil	BBTOH
-H		2,2',5',2''-tertienilo,(α -tertiofeno, α -tertienilo)	α -T
-H		5-(4-acetoxi-1-butinil)-2,2'-bitienil	BBTOAc
CH ₃ -O-CO-CH ₂ -		5-metilacetato-5'-(3-buten-1-inil)-2,2'-bitienil	AcOCH ₂ BBT
-H		5-(3,4-diacetoxi-1-butinil)-2,2'-bitienil	BBT(OAc) ₂

El gran espectro de eficiencia de los tiofenos como agentes antimicrobianos y su capacidad biodegradable, los hace muy atractivos como alternativa del uso de pesticidas químicos (Marotti *et al.*, 2004; Santa Cruz, 2005). El α -tertienilo presenta actividad antimicrobiana, puede ser fototóxico en presencia de luz ultravioleta cercana y producir una fotodermatitis por un mecanismo que no depende de la peroxidación lipídica de la membrana (Guzmán y Manjarrez, 1962). En el extracto obtenido con dietiléter se identificó metilchavicol (estragol), metileugenol y alinol (Bicchi *et al.*, 1997).

Por otro lado, en un estudio comparativo de diversos efectos del aceite esencial de *Tagetes lucida* mencionan que las hojas y la flores contienen limoneno (16.5%), β -ocimeno (14%), β -cariofileno (28%), mirceno (cuatro-cinco%), tagetona, dihidrotagetona, tetrahidrotagetona, estragol, metileugenol, linalool, alil-anisol y anetol (Santillán, 2012) (**Tabla 3**).

Tabla 3. Compuestos químicos con actividad fungicida, fuscigistática y nematocida en *Tagetes lucida* Cav (Hethelyi *et al.*, 1986).

Actividad	Compuesto
Efecto fungicida	1,8-Cineol Anetol Anisaldehido Cariofileno Chavicol Hemiarin Linalol Metil-eugenol Mirceno Tiofeno
Efecto fuscigistático	Limoneno Metil-eugenol
Efecto nematocida	1,8-cineol Limoneno Chavicol Linalol Metil-eugenol Metil-isoeugenol Tiofeno

2.1.6 Propiedades biológicas y farmacológicas.

Tagetes lucida es una de las plantas medicinales más frecuentemente investigada por sus propiedades como sedante, enterobactericidas y para el tratamiento de enfermedades respiratorias (Hethelyi *et al.*, 1986). A pesar de que se usa en la medicina tradicional mexicana por sus propiedades en el tratamiento de diferentes enfermedades del SNC, la información científica disponible acerca de estas propiedades de la especie es escasa.

En estudios anteriores se ha reportado que el extracto etanólico acuoso de las hojas y semillas de *T. lucida* ejerció un efecto hipotensor en perros por vía intravenosa, a una dosis de 5 mg/Kg. Asimismo, se reportó que el té de pericón, produjo un fuerte efecto diurético. También se ha demostrado la actividad antibiótica *in vitro* del extracto etanólico de las flores y hojas sobre *Streptococcus pyogenes* y de un extracto etanólico acuoso de las hojas sobre *Candida albicans* (Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009; Cáceres *et al.*, 1990).

Los glicósidos de las flavonas son sustancias con propiedades diuréticas, por lo que es muy probable que la quercetagrítina sea la responsable del efecto diurético reportado para un extracto acuoso de esta planta.

Los extractos de *Tagetes lucida* en ensayos *in vitro* mostraron actividad antibacteriana contra *Escherichia coli*, *Salmonella entérica* Enteritidis, *Salmonella entérica* Typhi, *Shigella dysenteriae* y *Shigella flexneri*, y contra bacterias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* y *Streptococcus pyogenes*) causantes de afecciones respiratorias (Cáceres *et al.*, 1991, Girón *et al.*, 1991). Se ha detectado actividad antibiótica contra *Salmonella pyogenes* y *Candida albicans*, lo que señala que la planta es efectiva cuando se utiliza en procesos infecciosos que involucran a estos organismos (Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009).

Su utilidad medicinal data de la época prehispánica, en el lenguaje Náhuatl es conocida como yauhtli o hierba nube. Francisco Hernández en su obra del siglo XVI reporta su uso en el tratamiento de un gran número de casos. Se toma como un té ligero para aliviar dolores corporales y como té concentrado para el tratamiento del reumatismo, como estimulante de la menstruación, incrementa la producción de leche, dolor de cabeza, fiebre y en caso de diarrea e infecciones (Cano, 1997).

El Centro de Investigación en Plantas Medicinales de Xochitepec Morelos ha reportado actividad antibacteriana del extracto etanólico contra *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Vibrio cholerae*, *Salmonella enterica* Enteritiditis, *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*. Además se ha registrado su actividad como inhibidora de agregación plaquetaria (Cáceres *et al.*, 1991).

En la fracción hexánica de tallo y hojas se han localizado sustancias con propiedades nematocidas y larvicidas. Por cromatografía de líquidos de alta resolución se encontró alfatertienilo y bitienilos. Los tiofenos, grupo al que pertenecen las sustancias anteriores, son fototóxicos frente a bacterias y hongos, encontrándose positiva la actividad antibacteriana en *Bacillus subtilis* (Arnaz y García, 1991).

Se demostró la actividad antimicótica y antibacterial de extractos de diclorometano y metanol de las partes aéreas de *Tagetes lucida*, de los cuales se aislaron 7 cumarinas. El compuesto más activo contra bacterias Gram positivas y Gram negativas fue la 7,8-dihidroxycumarina, además de tener actividad contra *Vibrio cholerae*. Otros compuestos que presentaron actividad antibacteriana fueron la escoparona y la esculetina. La escoparona mostró una fuerte actividad contra algunas cepas de hongos en especial de *Trichophyton mentagrophytes* y *Rhizoctonia solani* (Céspedes *et al.*, 2006).

Salgado y cols. (2007) indican que los metabolitos escopoletina y umbeliferona también muestran actividad contra *Escherichia coli* y *Proteus*

mirabilis. El análisis del efecto antifúngico y antibacteriano del extracto etanólico de *Tagetes lucida*, indica que el extracto presenta efecto antibacteriano en contra de *Pseudomonas marginalis* y *Erwinia carotovora* (Badillo et al., 2008).

De los extractos metanólicos de hojas e inflorescencias se logró aislar la herniarina. De las hojas se registró actividad antimicrobiana en contra de dos cepas de *Candida albicans*, *Vibrio cholerae* y *Yersinia enterocolitica*, mientras que, de las inflorescencias presentó efecto contra cuatro cepas de *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*, *Sarcina lutea*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae* y *Yersinia enterocolitica*; en ambos casos se observa que las bacterias Gram negativas son las más sensibles. El efecto antimicrobiano de la herniarina demostró ser efectivo ante cuatro cepas de *V. cholerae* (Badillo et al., 2008).

El extracto de acetato de etilo de las hojas de *Tagetes lucida* resulta ser efectivo en la disminución de germinación de esporas de *Candida albicans*, *Colletotricumlin demuthianum*, *Mucor circinelloides* y *Sporothrix shcenckii*, mientras que, el extracto de cloroformo-etanol de hoja no inhibe la germinación de esporas de hongos filamentosos (Germosén, 2007). La maceración etanólica de hojas y flores secas de *T. lucida* presenta inhibición del crecimiento de *Escherichia coli*, *Shigella dysenteriae*, *S. flexneri*, *Salmonella typhi* y *Streptococcus pyogenes in vitro*. El extracto acuoso de las flores secas fue activo contra *Escherichia coli enteropatogena*, *Salmonella enteritidis*, *S. typhi*, *Shigella dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. pneumoniae* y *S. pyogenes*. La maceración hidroalcohólica de las hojas y flores de *Candida albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* y *C. stellatoidea* (Malik et al., 2011).

Las cumarinas naturales producen efectos variados y pronunciados en los organismos vivos. Exhiben numerosas actividades farmacológicas y fisiológicas, tales como antibacteriano, antioxidante, antiinflamatoria, antiagregante plaquetario, antimicrobiana, espasmódica, anti VIH-1, vaso dilatador y diurético (Badillo et al., 2008; Guadarrama et al., 2008). La herniarina, además de poseer actividad

antimicrobiana presenta actividad espasmolítica, diurética y antiinflamatoria. Popularmente se le atribuyen propiedades abortivas (Guadarrama *et al.*, 2008). La patuletina tiene actividad antiespasmódica (Malik *et al.*, 2011). La escopoletina está ampliamente distribuida en el reino animal, es un compuesto nutracéutico que posee propiedades terapéuticas contra la diabetes mellitus, diarrea y cáncer (Guadarrama *et al.*, 2008). La DL₅₀ de los extractos preparados con solventes de diferente polaridad de hojas y flores secas con actividad espasmolítica *in vitro*, frente a espasmo por acetilcolina, administrados por vía oral, fue superior a 100 mg/Kg de peso (Guzmán y Manjarrez, 1962; Malik *et al.*, 2011).

Los extractos hidroalcohólicos de flor y hoja aplicados sobre yeyuno de conejo *in vitro* (3.2 y 6.4 µg/ml) redujeron la amplitud y las frecuencias de las contracciones intestinales inducidas por serotonina. La infusión de hoja (500 µg/ml) fue antiespasmódica *in vitro* e *in vivo* sobre íleon de rata a 20 g/Kg (Malik *et al.*, 2011).

Todas las especies del género *Tagetes* estudiadas hasta la fecha se caracterizan por la presencia de 6-metoxi, 6-hidroxi aglucón. En el análisis de un extracto metanólico sometido a hidrólisis para después identificar el contenido de flavonoides demostró que las partes aéreas de *Tagetes lucida* poseen patuletina, isorramnetina, quercetagetina 3-O-arabinosil galactósida e isorramnetina 7-O-glucósido (Carey, 1999). Se ha registrado que las flavonas tienen diferentes efectos biológicos, entre ellos actividad antibiótica, lo cual concuerda con el estudio realizado por Hernández y colaboradores (2006) donde encontró que la 5,7,4'-trimetoxiflavona tiene gran actividad antimicrobiana frente a 11 cepas de bacterias y una levadura. Además menciona que las flavonas pueden inhibir la síntesis del material genético de las bacterias para mediar la actividad antibiótica.

Las tinturas son preparaciones líquidas, por lo general obtenidas por extracción de materia vegetal con alcohol o mezclas hidroalcohólicas, luego de la evaluación de las características microbiológicas hechas a una tintura comercial con propiedad antibacteriana a partir de *Gnaphalium stramineum* (flores), *Plantago*

major (hojas), *Psidium guajava* (hojas) y *Tagetes lucida* (hojas y flores), en solución alcohólica al 35%, se determinó la presencia de cumarinas y flavonoides. Los compuestos flavonoides quercetínicos como la guayaberina presentes en *P. guajava*, los glucósidos flavonoides de *G. stramineum*, las cumarinas de *P. major*, el α -tertienilo y herniarina de *T. lucida*, le confieren a la tintura la actividad antibacteriana. Además, los lotes de tintura antibacteriana analizados mantienen la presencia de sus metabolitos activos luego de 180 días de almacenamiento en condiciones extremas de temperatura (Díaz, 1976).

La infusión de hojas y flores (1 g/Kg) es inactiva como antiinflamatoria en un modelo de edema de pata de rata inducido por carragenina. El extracto etanólico acuoso de las hojas y semillas de *Tagetes lucida* ejerce un efecto hipotensor en perros por vía intravenosa a dosis de 5 mg/Kg. La infusión de hoja (1-5 g/Kg) administrada por vía oral a rata, no induce signos evidentes de toxicidad gástrica ni sangrado digestivo (Malik *et al.*, 2011). El extracto alcohólico provoca en algunas personas trastornos cardiovasculares (Guzmán y Manjarrez, 1962).

Estudios preliminares indican que la decocción de hojas tiene cierta actividad inmunomoduladora en ratones medida por un aumento en la población de linfocitos y en los títulos de anticuerpos séricos (Badillo *et al.*, 2008). La planta también produce efectos anticolinérgicos (Oranday *et al.*, 2008).

La capacidad antioxidante de los vegetales se debe a las vitaminas, carotenoides, esteroides y principalmente polifenoles. Estos tienen la capacidad de reducir la formación de radicales libres ya sea por la quelación de elementos trazas o removiendo los radicales libres y protegiendo las defensas antioxidantes. Los compuestos antioxidantes pueden ser usados en la preservación de alimentos, con propósitos medicinales y cosméticos (Madurga, 2002).

En un estudio *in vitro* realizado por Aquino y colaboradores (2002), se demostró el efecto antioxidante de un extracto metanólico y *n*-butanol (*n*-BuOH) de

las hojas de *Tagetes lucida* empleando la prueba de DPPH (radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil). El análisis del extracto de n-BuOH dio como resultado el aislamiento de un nuevo glicósido de flavonol, la quercetagenina 3,4'-dimetiléter 7-O-β-D-glucopiranosida, dos nuevos ácidos fenólicos, el ácido propanoico 3-(2-O-β-D-glucopiranosil-4-metoxifenil) y el metilester del mismo. De los constituyentes responsables de la actividad antioxidante se identificaron quercetagenina 3,4'-dimetil éter 7-O-β-D-glucopiranosido, quercetagenina 7-O-β-D-glucopiranosido, quercetagenina 3-metil éter 7-O-β-D-glucopiranosido, 6-hidroxicanferol-7-O-β-D-glucopiranosido, quercetagenina 3,3'-dimetiléter. ácido caféico, 6-O-cafeoil-β-D-glucopiranosido, ácido benzoico 4-(β-D-glucopiranosiloxi) y ácido gálico en pequeñas cantidades. La fracción menos activa permitió el aislamiento de dos nuevos glucósidos fenilpropanoides: el ácido propanoico 3-(2-O-β-D-glucopiranosil-4-metoxifenil) y metil 3-(2-O-β-D-glucopiranosil-4-metoxifenil) propanoato, además de la 7-metoxicoumarina (herniarina).

2.2 ACEITES ESENCIALES

2.2.1 Definición

Los aceites esenciales se clasifican como metabolitos secundarios de las plantas (Linskens y Jackson, 1991) y se definen como mezclas complejas de compuestos volátiles, de características lipofílicas, que se obtienen a partir de diferentes partes de las plantas a través de métodos físicos. Los aceites esenciales poseen una química compleja, aunque generalmente consisten en una mezcla de un grupo heterogéneo de sustancias orgánicas: hidrocarburos tales como los terpenos, específicamente monoterpenos (C₁₀H₁₆), sesquiterpenos (C₁₅H₂₄), diterpenos (C₂₀H₃₂) (Bertucco y Vertter, 2001), hidrocarburos alifáticos (lineales, ramificados, saturados y no saturados) de bajo peso molecular (Dorman y Deans, 2000) e hidrocarburos oxigenados como alcoholes, ésteres, aldehídos, cetonas y éteres (Bertucco y Vertter, 2001). Éstos se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza y contribuyen al olor y sabor característico de las

plantas. El mecanismo de acción de estos compuestos en contra de las bacterias no está completamente elucidado, pero se especula que involucra una perturbación en la membrana (Mendoza *et al.*, 1997).

Los aceites esenciales son líquidos menos densos que el agua, pero más viscosos que ella y poseen un color en la gama del amarillo, hasta ser transparentes en algunos casos. Son solubles en disolventes orgánicos y sufren degradación química en presencia de la luz solar, del aire, del calor, de ácidos y álcalis fuertes, generando oligómeros de naturaleza indeterminada (Cerpa, 2007).

2.2.2 Composición química

La mayoría de los componentes, que hacen parte de los AE, pertenece a una familia de sustancias químicas llamada “terpenos” o “terpenoides”, por ejemplo: limoneno, carvona, α -humuleno, etc., cuya característica estructural, que los distingue de otros productos naturales, es la unidad isopreno C_5 en el esqueleto hidrocarbonado (**Figura 4**). Esta observación fue hecha por el químico alemán Otto Wallach en 1887 y se conoce como regla de isopreno (Carey, 1999; Sell, 2003).

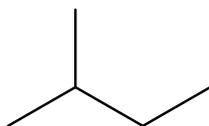


Figura 4. Unidad isopreno C_5 (Carey, 1999)

Otra clase de sustancias químicas presentes en los AE son los fenilpropanoides y sus análogos sustituidos, por ejemplo el anetol, metil-eugenol, safrol, etc., los cuales se caracterizan por poseer en su estructura un grupo propilénico enlazado a un anillo de benceno (**Figura 5**).

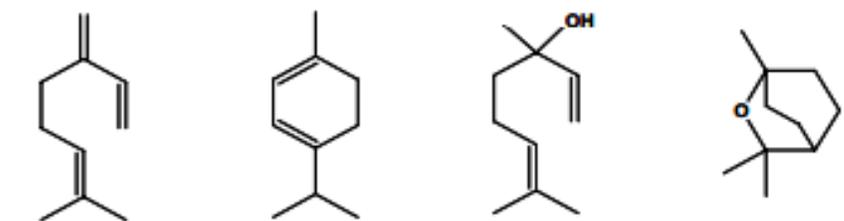
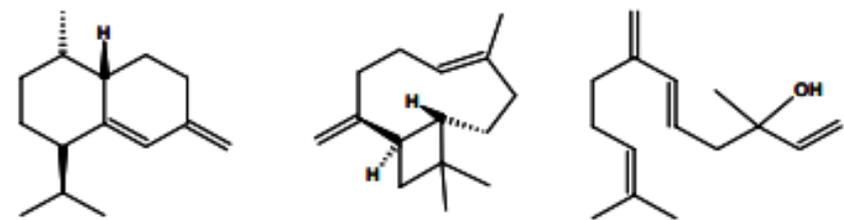
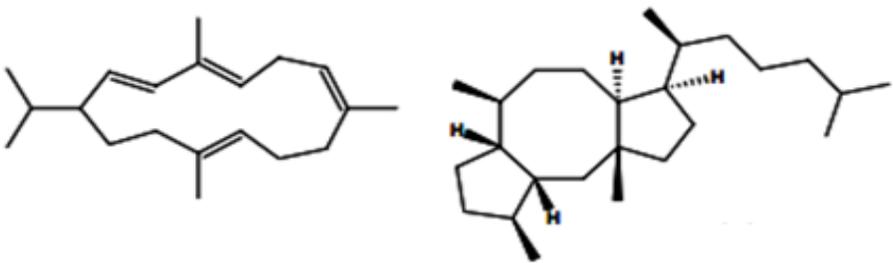
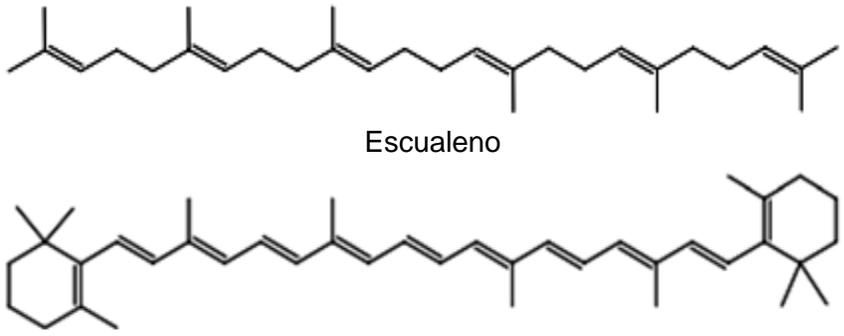
Monoterpenos	 <p>Mirceno α-terpineno Linalool Eucaliptol</p>
Sesquiterpenos	 <p><i>trans</i>-Muurolo-4(14)5-dieno <i>trans</i>-β-cariofileno Nerolidol</p>
Diterpenos y sesterterpenos	 <p>Cembreno Bisabolano</p>
Triterpenos y tetraterpenos	 <p>Escualeno β-caroteno</p>

Figura 5. Algunos ejemplos de terpenos de cadena abierta y cíclicos funcionalmente sustituidos (Sell, 2003)

2.2.3 Aplicaciones

Los aceites esenciales tienen un rango de aplicaciones muy amplio. Éstos se usan en las industrias de alimentos, farmacéutica, cosmética y química, siendo incorporados en productos de consumo, por ejemplo: jarabes, bebidas no alcohólicas, aderezos, mermeladas etc., o de uso externo, como cremas, perfumes, jabones, geles; como saborizantes, aromatizantes y enmascarante de olores (CBI, 2004; CBI, 2005)

Las aplicaciones industriales y terapéuticas de los AE dependen principalmente de su composición química, calidad, propiedades fisicoquímicas, actividad biológica y propiedades organolépticas, así como del grado de refinamiento de la esencia. Por tal motivo, resulta de vital importancia realizar controles de calidad a los AE y estudiar su composición en función de condiciones geobotánicas de su cultivo (CBI, 2004).

2.2.4. Propiedades biológicas de los aceites esenciales

Desde la antigüedad, las especies aromáticas y sus AE se han empleado en preparaciones culinarias no sólo como agentes saborizantes y aromatizantes, sino también como conservantes naturales (Kalemba y Kunicka, 2003; Burt, 2004).

Como conservantes en alimentos y otros productos, los AE pueden detener, prevenir o inhibir el deterioro oxidativo y los daños causados por bacterias, hongos u otros microorganismos (Kalemba y Kunicka, 2003; Antolovich *et al.*, 2002).

De esta manera, y debido a la creciente presión de los consumidores, actualmente, las industrias de alimentos y cosméticos han disminuido el uso de conservantes sintéticos en sus productos, reemplazándolos por sustancias de origen natural (Pokorny *et al.*, 2001).

Por tal motivo, el conocimiento de las actividades antimicrobianas, antioxidantes y citotóxicas son importantes para la aplicación de los AE en las diferentes industrias.

2.3 ENFERMEDADES GASTROINTESTINALES

2.3.1 Enfermedades infecciosas gastrointestinales de origen bacteriano en México y el mundo.

Las enfermedades gastrointestinales son una de las primeras causas de consulta médica y también una de las primeras causas de muerte en México y en el mundo. Por ello, se las considera un problema de salud pública en el nivel mundial, que afecta a personas de cualquier edad y condición social, aunque los grupos más vulnerables son los niños y los ancianos (León, 2002).

En México las infecciones de origen bacteriano se encuentran dentro de las diez primeras causas de muerte dentro de la población indígena, y corresponden a un total de 1.11% del total de las causas de muerte. Se transmiten, ya sea por vía fecal-oral, o bien por el consumo de agua y alimentos contaminados. Afectan principalmente a la población infantil, y tanto su incidencia como su prevalencia dependen del nivel socioeconómico de los pacientes. Dentro de los organismos más comunes que causan las infecciones gastrointestinales se encuentran: *Escherichia coli*, *Salmonella* sp., *Shigella* sp., *Vibrio cholerae*, *Bacillus* sp. y *Yersinia enterocolítica*. Los signos más característicos son diarrea, vómitos, fiebres, náuseas, deshidratación, sangrados con pus y enterocolitis (Mims, 1993).

Existen otros géneros involucrados en estas enfermedades, como *Aeromonas* sp., que en otros países se ha documentado como agente etiológico de enfermedades gastrointestinales y marcador de contaminación fecal en el agua (Mims, 1993).

2.3.2 Generalidades de las enfermedades gastrointestinales causadas por bacterias.

Mundialmente, las infecciones gastrointestinales son una de las causas más importantes de morbimortalidad entre los lactantes y niños. Se ha estimado que en Asia, África y Latinoamérica la probabilidad de que un niño muera antes de los 5

años puede llegar a 50%, aunque esto depende de factores socioeconómicos y nutricionales (León, 2002).

Las enfermedades gastrointestinales infecciosas son causadas por bacterias (principalmente *Escherichia coli*, *Salmonella* sp. y *Shigella* sp.), parásitos (*Giardia lamblia* y amibas), y virus (Rotavirus y virus Norwalk) al consumir alimentos y agua contaminados con materia fecal (Vila *et al.*, 2009).

Las infecciones agudas del tracto gastrointestinal figuran entre las enfermedades infecciosas más frecuentes (Vila *et al.*, 2009).

Los cuadros gastrointestinales pueden presentarse en cualquier época del año, pero el riesgo de sufrir estas enfermedades se incrementa en la temporada de calor (Hernández, 2011)

La gastroenteritis es uno de los principales motivos de demanda de atención médica en los centros de salud. A pesar de que su mayor incidencia se presenta en personas de 20 a 40 años, los niños y los ancianos son los que suelen sufrir sus efectos fulminantes, debido a la excesiva pérdida de electrolitos que aflige al cuerpo durante la enfermedad y que puede causar una deshidratación grave (Hernández, 2011).

De acuerdo con estadísticas del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), las infecciones, como gastroenteritis, salmonelosis, tifoidea, cólera y rotavirus representan un severo problema de salud pública para nuestro país.

La participación de los distintos microorganismos en las enfermedades gastrointestinales difiere de unas áreas geográficas a otras y del grupo de población estudiado, como puede observarse en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Etiologías de las gastroenteritis en diversos grupos de población (Hernández, 2011).

Microorganismo	Niños (0-5 años) países desarrollados	Niños (0-5 años) países en vías de desarrollo	Adultos	Diarrea del viajero
BACTERIAS				
<i>Escherichia coli</i>	No determinado	37%	No determinado	42%
<i>Shigella</i> spp.	Menor a 1%	10%	Menor a 1%	10%
<i>Salmonella</i> spp.	25%	1.5%	60%	3%
<i>Campylobacter</i> spp.	40%	3%	5%	2%
<i>Yersinia enterocolitica</i>	2%	Menor a 1%	2%	2%
<i>Aeromonas</i> spp.	7%	1%	6%	2%
VIRUS				
Rotavirus	44%	24%	No determinado	1%
PARÁSITOS				
<i>Giardia lamblia</i>	35%	10%	No determinado	10%
<i>Entamoeba histolytica</i>	Menor a 1%	3%	5%	7%

A continuación se muestra una grafica de acuerdo con la clasificación de las enfermedades infecciosas del aparato gastrointestinal y teniendo presentes los datos reportados, de 2000 a 2008, en el boletín epidemiológico de México.

La gráfica también toma en cuenta la edad de las personas objeto del estudio, sumando el número total de casos de todos los padecimientos de cada año (**Figura 6**) (Edris, 2007).

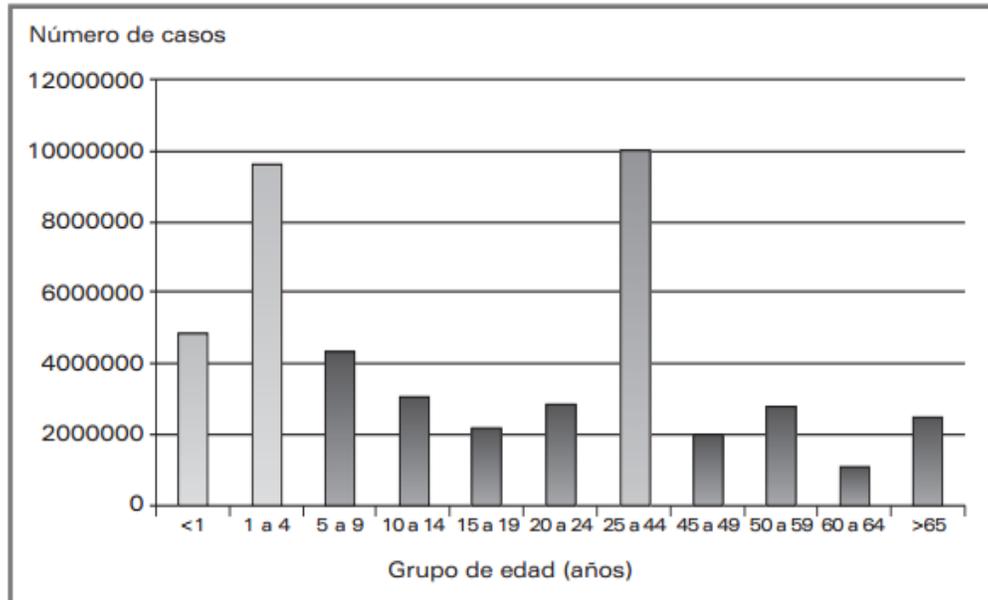


Figura 6. Número de casos de enfermedades del tracto gastrointestinal por grupo de edad. En la gráfica se muestran los datos recopilados desde 2000 hasta 2008. Se observa que los grupos de edad más afectados son los niños menores de cinco años y los adultos de entre 25-44 años.

Diversos grupos humanos utilizan como alternativa para el tratamiento de estos padecimientos, infusiones preparadas con plantas medicinales para el tratamiento de estos, acompañadas de algunas prácticas, rezos y ciertas reglas que deben observarse al coleccionar la planta. Algunas de las familias botánicas más frecuentemente utilizadas para estos padecimientos son: Asteraceae, Lauraceae, Cistaceae, Simaroubaceae, Chenopodiaceae, Urticaceae, Mytaceae, Brassicaceae, Plantaginaceae, Verbenaceae, Rosaceae, Urticaceae y Lamiaceae, por mencionar algunas. Una de las familias botánicas más importantes es la Astraceae, debido a su contribución con un gran número de plantas para la

farmacopea mexicana. Las razones de su importancia incluyen el gran número de especies distribuidas en México y su amplia gama de productos naturales que son útiles en el tratamiento de enfermedades que afligen a los habitantes del México rural. Sin embargo, solo pocas de las especies utilizadas en la medicina tradicional para tratar estos padecimientos han sido evaluadas clínicamente o estudiadas química y biológicamente para identificar los compuestos activos y determinar sus índices terapéuticos (Cliver, 1993).

Las enfermedades transmitidas por medio de los alimentos se suelen dividir en dos clases principales: la primera comprende las enfermedades que son consecuencia de la presencia en los alimentos de microorganismos infectivos. Estos microorganismos son capaces de causar enfermedad por la invasión del hospedador o por la liberación de toxinas (infecciones alimentarias). La segunda clase de enfermedades transmitida por alimentos es consecuencia de la absorción intestinal de toxinas que ya estaban presentes en los alimentos antes de su ingestión (intoxicaciones). En la **Tabla 5** se resumen algunas enfermedades comunes transmitidas por los alimentos causados por bacterias (Margl *et al.*, 2002).

Tabla 5. Enfermedades comunes transmitidas a través de los alimentos, causadas por bacterias (Cliver, 1993).

Enfermedad (agente causante)	Periodo de Latencia (Duración)	Síntomas Principales	Alimentos Típicos	Modo de Contaminación
Intoxicación alimentaria, diarrea. (<i>Bacillus cereus</i>)	8-16 hrs. (12-24 hrs.)	Diarrea, cólicos, vómitos ocasionales	Productos cárnicos, sopas, salsas, vegetales	De la tierra o del polvo
Intoxicación alimentaria, vómito. (<i>Bacillus cereus</i>)	1-5 hrs. (6-24 hrs.)	Náuseas, vómitos, a veces diarrea y cólicos	Arroz y pasta cocidos	De la tierra o del polvo

Tabla 5. Enfermedades comunes transmitidas a través de los alimentos, causadas por bacterias (Cliver, 1993) (continuación).

Enfermedad (agente causante)	Periodo de Latencia (Duración)	Síntomas Principales	Alimentos Típicos	Modo de Contaminación
Botulismo; intoxicación alimentaria (toxina de <i>Clostridium botulinum</i> lábil al calor)	12-36 hrs. (meses)	Fatiga, debilidad, visión doble, habla arrastrada, insuficiencia respiratoria, a veces la muerte	Tipos A y B: vegetales; frutas; productos cárnicos, avícola y de pescado; condimentos; Tipo E: pescado y productos de pescado	Tipos A y B: de la tierra o del polvo; Tipo E: del agua y sedimentos
Botulismo; intoxicación alimentaria, infección infantil	No conocida	Estreñimiento, debilidad, insuficiencia respiratoria, a veces la muerte	Miel, de la tierra	Esporas ingeridas de la tierra, del polvo, o de la miel; coloniza el intestino
Campilobacteriosis (<i>Campylobacter jejuni</i>)	3-5 días (2-10 días)	Diarrea, dolores abdominales, fiebre, náuseas, vómitos	Alimentos de origen animal, infectados	Pollo, leche cruda (no pasteurizada)
Cólera (<i>Vibrio cholera</i>)	2-3 días de horas a días	Heces líquidas profusas; a veces vómitos, deshidratación; si no se trata puede ser mortal	Mariscos crudos o mal cocinados	Heces humanas en el entorno marino
(<i>Clostridium perfringens</i>) intoxicación alimentaria	8-22 hrs. (12-24 hrs.)	Diarrea, cólicos, rara vez náuseas y vómitos	Pollo y carne de res cocidos	De la tierra, alimentos crudos
(<i>Escherichiacoli</i>) infecciones enterohemorrágicas transmitidas por los alimentos	12-60 hrs. (2-9 días)	Diarrea líquida, sanguinolenta	Carne de res cruda o mal cocida, leche cruda	Ganado infectado

Tabla 5. Enfermedades comunes transmitidas a través de los alimentos, causadas por bacterias (Cliver, 1993) (continuación).

Enfermedad (agente causante)	Periodo de Latencia (Duración)	Síntomas Principales	Alimentos Típicos	Modo de Contaminación
Infecciones enteroinvasoras (<i>Escherichia coli</i>)	Por lo menos 18 hrs. (incierto)	Cólicos, diarrea, fiebre, disentería	Alimentos crudos	Contaminación fecal humana, directa o a través del agua
Infecciones enterotoxigénicas transmitidas por los alimentos (<i>Escherichia coli</i>)	10-72 hrs. (3-5 días)	Diarrea líquida profusa; a veces cólicos, vómitos	Alimentos crudos	Contaminación fecal humana, directa o a través del agua
Listeriosis (<i>Listeria monocytogenes</i>)	3-70 días	Meningo-encefalitis; mortinatos; septicemia o meningitis en neonatos	Leche, queso y vegetales crudos	De la tierra o de animales infectados, directamente o por estiércol
Salmonelosis (<i>Salmonella spp</i>)	5-72 hrs.	Diarrea, dolores abdominales, escalofríos, fiebre, vómitos, deshidratación	Huevos crudos, mal cocinados: leche, carne y pollos crudos	Alimentos de origen animal, infectados; heces humanas
Shigelosis (<i>Shigella spp</i>)	12-96 hrs. (4-7 días)	Diarrea, fiebre, náuseas, a veces vómitos y cólicos	Alimentos crudos	Contaminación fecal humana, directa o a través del agua
Intoxicación alimentaria por estafilococos (enterotoxina de <i>Staphylococcus aureus</i> estable al calor)	1-6 hrs. (6-24 hrs.)	Náuseas, vómitos, diarrea y cólicos	Jamón, productos cárnicos y avícola, pastelería rellena de crema, mantequilla batida, queso	Operarios con resfríos, dolor de garganta o cortadas que están infectadas, rebanadoras de carne

Tabla 5. Enfermedades comunes transmitidas a través de los alimentos, causadas por bacterias (Cliver, 1993) (continuación).

Enfermedad (agente causante)	Periodo de Latencia (Duración)	Síntomas Principales	Alimentos Típicos	Modo de Contaminación
Infección por estreptococos transmitidos por los alimentos (<i>Streptococcus pyogenes</i>)	1-3 días (varía)	Diversos, incluso dolor de garganta, erisipela, escarlatina	Leche cruda, huevos "endiablados"	Operarios con dolor de garganta y otro tipo de infecciones por estreptococos
Infección por <i>Vibrio parahemolyticus</i> transmitidos por los alimentos	12-24 hrs. (4-7 días)	Diarrea, cólicos, a veces náuseas, vómitos, fiebre, dolor de cabeza	Pescado y mariscos	Entorno marino de la costa
Infección por <i>Vibrio vulnificus</i> transmitida por los alimentos	En personas que tienen alto hierro sérico: 1 día	Escalofríos, postración, a menudo la muerte	Ostiones y almejas crudas	Entorno marino de la costa
Yersiniosis (<i>Yersinia enterocolitica</i>)	3-7 días (2-3 semanas)	Diarrea, dolores imitando apendicitis, fiebre, vómitos, etc.	Carne de res y puerco cruda o mal cocida, tofu empacado en agua de manantial	Animales infectados, especialmente cerdos; aguas contaminadas

3. JUSTIFICACIÓN

El empleo de las plantas medicinales en nuestro país se registra desde la época prehispánica, algunos de los trabajos más importantes que describen la enorme riqueza herbolaria en nuestro país datan del siglo XVI, durante ese siglo tiene lugar el primer intento para conocer las propiedades de los recursos naturales encontrados en el nuevo continente. Se pueden mencionar obras como la de Fray Bernardino de Sahagún, el código Badiano y la de Francisco Hernández.

En las últimas décadas del siglo XVIII aparecen las obras de José Mariano Mociño, Luis Montaña y Martín Sessé. Al finalizar el siglo XIX hay una gran producción bibliográfica sobre el uso de las plantas medicinales, instituciones de gran prestigio como el Instituto Médico Nacional se dedican entonces al estudio de la herbolaria.

En la última década del siglo pasado y en este siglo que comienza se ha vuelto a considerar el potencial de la medicina herbolaria, como una esperanza tanto para los países desarrollados en la búsqueda de nuevos medicamentos como en los países donde todavía impera la pobreza y la dependencia tecnológica, la herbolaria se ha considerado como una medicina alternativa ante el alto costo de las terapias innovadoras de los países ricos.

Es decir, que a pesar de los avances tan grandes de la industria farmacéutica, las plantas medicinales siguen siendo un recurso fundamental para obtener nuevos fármacos tal y como sucedió en el pasado.

Debido a la tendencia económica que impera en el ámbito mundial para algunos pueblos no existe otra alternativa que producir sus propios medicamentos, resolviendo así sus necesidades de salud y terapéutica, en los mercados de la ciudad de México se comercializa un gran número de plantas con propiedades medicinales, algunas personas acuden a estos mercados para encontrar un remedio más barato y de fácil administración para la cura de sus males y otras

buscan un remedio para enfermedades de las que no han podido restablecerse o que son hasta el momento incurables con los recursos de la ciencia médica actual.

En este marco de referencia, nuestro proyecto se enfocó en determinar la composición química del material vegetal, el aceite esencial y la actividad antimicrobiana del extracto metanólico preparado a partir de las partes aéreas de un pericón recolectado en el pueblo de San Jerónimo Aculco, Estado de México.

Estos hallazgos, constituyen un punto de partida valioso para el descubrimiento de compuestos con actividad antimicrobiana, especialmente con actividad contra bacterias patógenas, de esta manera previniendo, curando y aliviando enfermedades gastrointestinales y de la cavidad oral.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVOS GENERALES

El objetivo general del presente proyecto de investigación consiste en obtener, caracterizar y evaluar la actividad antibacteriana de algunos compuestos presentes en el aceite esencial y en la infusión de la planta *Tagetes lucida* Cav. sobre un panel de bacterias patógenas.

4.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Preparar el aceite esencial a partir de las plantas frescas de *Tagetes lucida*, mediante un proceso de hidroddestilación.
- Separar y caracterizar los compuestos presentes en el aceite esencial de las hojas mediante la técnica CG-EM-TV y el análisis de los índices de retención (índices de Kovats).
- Extraer, separar y caracterizar los compuestos volátiles presentes en las hojas de *Tagetes lucida* Cav. Mediante la técnica EC-MEFS-CG-EM-TV y el análisis de los índices de retención (índices de Kovats).
- Llevar a cabo la elaboración de la infusión de la planta *Tagetes lucida* Cav. recolectada en San Jerónimo Aculco, Estado de México
- Evaluar la actividad antimicrobiana de la infusión sobre en un panel de bacterias patógenas.

5. DESARROLLO EXPERIMENTAL

5.1 MATERIAL VEGETAL.

La muestra de pericón se recolectó del pueblo ubicado en San Jerónimo Aculco, Estado de México. La colecta fue realizada por Everardo Cruz Navarrete el día 1 de Agosto de 2012. Una muestra de referencia de este material vegetal se guarda en el laboratorio 111 del conjunto E de la Facultad de Química de la UNAM, Ciudad Universitaria.

5.2 ESTUDIO FITOQUÍMICO DE PERICÓN.

5.2.1 Obtención del aceite esencial de Pericón

La preparación de las esencias se realizó mediante hidrodestilación (5 L), por un periodo de seis horas, a partir de 1 Kg de las partes aéreas de la planta. Se obtuvo el aceite esencial y posteriormente se procedió a su análisis mediante un sistema acoplado de cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-EM) (Espectrometría de Masas – Cromatografía de Gases).

5.2.2 Cromatografía de gases-Espectrometría de masas

Se empleó el espectrómetro de masas con analizador másico de tiempo de vuelo (TOF), marca LECO, modelo Pegasus 4D (Leco Corp. St. Joseph, MI), acoplado a un cromatógrafo de gases Agilent, modelo 6890N (Agilent Technology, Palo Alto, California, USA) equipado con una columna capilar DB-5 (5% difenil-95% dimetilpolisiloxano) con dimensiones de 10 m × 0.18 mm × 0.18µm (Bellefonte, Pennsylvania, USA). Se empleó como gas acarreador Helio con un flujo constante de 1 mL/min (Praxair 5.0). La temperatura del horno se programó a 40°C (durante 1 minuto) y se incrementó la temperatura a 20°C/min hasta los 300°C durante 5 minutos. Las inyecciones fueron realizadas mediante el modo de inyección “split” (división de flujo) 1:20.

En el espectrómetro de masas se utilizó ionización electrónica a 70 eV y el rango de escaneo de masas fue de 40-400 m/z. el inyector y la línea de transferencia de espectrometría de masas se fijaron a 300°C y 250°C respectivamente (**Tabla 7**).

En la **Tabla 6** se enlistan las condiciones de la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas utilizadas para el análisis del aceite esencial.

Tabla 6. Condiciones de análisis optimizadas.

Técnica de preparación de la muestra	Microextracción en fase sólida en la fase gaseosa (EC-MEFS)
Microfibra utilizada	2cm 50/30µm DVB/CAR/PDMS Marca Supelco Lote P340030 No. Cat. 573-48-U.
Tiempo de exposición de la fibra	90 minutos
Temperatura de la muestra	45-50°C (baño de agua)
Posición de la fibra en la extracción	En fase gaseosa (headspace)
Tiempo de desorción en el inyector	3 minutos

Tabla 7. Condiciones optimizadas para el análisis de las muestras.

Marca y modelo del equipo	LECO Pegasus 4D
Técnica analítica	CG-EM-TV
Temperatura del inyector	300°C
Cromatógrafo de gases	Marca: Agilent, Modelo: 6890N
Columna capilar	DB-5 10 m x 0.18mm di x 0,18µm
Temperatura programa del horno	Temperatura inicial: 40°C (1 minuto). Velocidad: 20°C/minuto. Temperatura final: 300°C (5 minutos)
Tipo de inyección	Split (con división de flujo) 1:20
Gas acarreador	Helio, Praxair, grado 5.0 (Ultra Alta Pureza)
Flujo del gas acarreador	1 mL/minuto
Temperatura de la línea de transferencia	250°C
Tipo de ionización	Ionización electrónica (IE)
Analizador másico	Tiempo de vuelo (TV)
Adquisición espectral	20 espectros/segundo
Retraso/encendido del filamento	0 minutos
Intervalo masas	40-400 u
Temperatura de la cámara de ionización	200°C
Compuesto de calibración	Perfluoroterbutilamina (PFTBA)

5.2.3 Análisis por HS-SPME-GC-MS-TOF de las partes aéreas de pericón

Para realizar la microextracción se empleó la fibra de divinilbencen-carboxen-polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS 2 cm 50/30 μ m); la cual fue activada siguiendo las instrucciones del fabricante (Supelco). Previo a cada proceso de microextracción se realizó una corrida blanco. Posteriormente, para realizar cada microextracción se emplearon aproximadamente 5 g de la muestra de pericón, 5 mL de agua y 20 mg de NaCl, los cuales fueron colocados en un vial de 40 mL con septum de politetrafluoroetileno (PTFE). El vial cerrado herméticamente fue sometido a agitación, a una temperatura de entre 45-50°C y la fibra elegida se expuso en el espacio de la cabeza del vial para la adsorción de los analitos durante 90 minutos (**Figura 7**). Después de ello, se retiró la fibra del vial para introducirla dentro del inyector del cromatógrafo por 3 minutos para su desorción y análisis. Este proceso se realizó por triplicado.

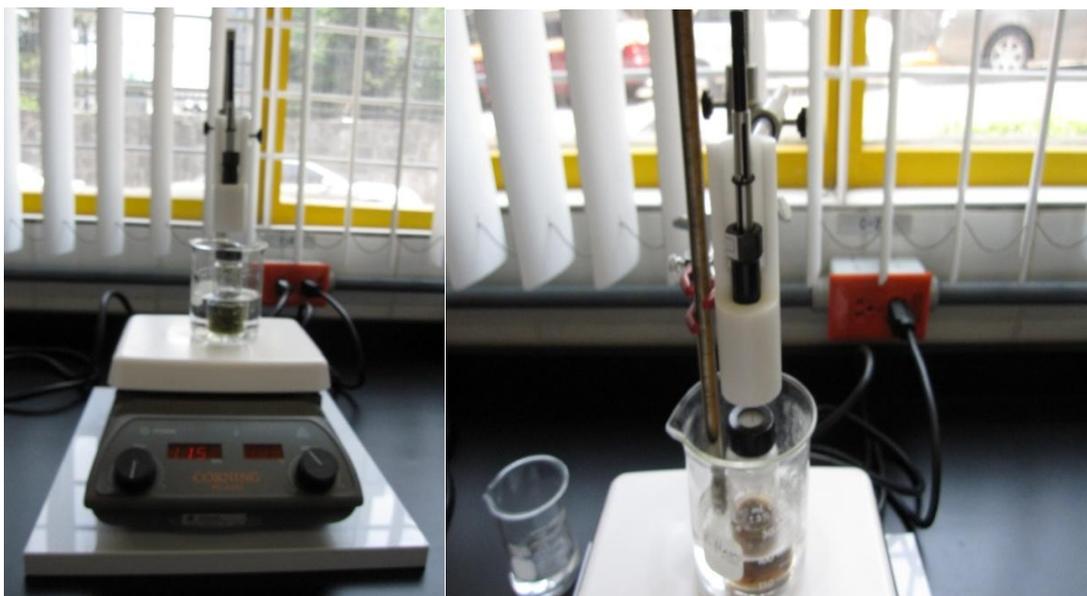


Figura 7. Microextracción en fase sólida por el método de *headspace* (izquierda: hojas del pericón, derecha: flores del pericón)

5.2.4 Identificación de los compuestos presentes en el aceite esencial y los volátiles separados utilizando la microextracción en fase sólida.

La identificación de los compuestos volátiles se realizaron por medio de la comparación de sus espectros de masas con los de la bibliotecas electrónicas y en la literatura como Wiley y NIST (Instituto Nacional de Estándares y Tecnología), así como en la comparación de sus índices de retención con los valores de la literatura y las co-inyecciones de 3-careno y metileugenol que se adquirieron de Sigma Aldrich.

Por último, para corroborar la identidad de los compuestos se utilizó la metodología de Kovats, en la cual se calculan los índices de retención de los compuestos por inyección, de una solución que contiene una serie homóloga de *n*-alcanos (C₈-C₂₄) o hidrocarburos lineales (SIGMA-ALDRICH) como estándares, a las mismas condiciones a las cuales fueron analizadas las muestras de aceite esencial y los compuestos volátiles obtenidos en la microextracción en fase sólida. Finalmente, se compararon los índices de retención obtenidos experimentalmente, con los de la biblioteca electrónica NIST, versión 2.0.

5.2.5 Preparación de la infusión de las partes aéreas de pericón.

Se colocó un kilogramo de las partes aéreas de la planta en cinco litros de agua a ebullición por un periodo de 20 minutos. La infusión obtenida se filtró y se separó el material vegetal del extracto acuoso.

5.2.6 Obtención del extracto total del pericón

El extracto acuoso se mezcló con la resina de Amberlita (XAD-16, 50 g por litro de infusión). La mezcla de la infusión y la resina se agitaron durante 5 horas a 200 rpm y transcurrido el tiempo se procedió a separarlas mediante filtración al vacío. La fase acuosa se descartó.

5.3 ENSAYO BIOLÓGICO

5.3.1 Microorganismos de prueba

Los microorganismos de prueba utilizados para determinar la actividad antibacteriana de la infusión y el aceite esencial de las partes aéreas de *Tagetes lucida*, fueron *Bacillus subtilis* [ATCC6633], *Staphylococcus aureus* [ATCC25923], *Escherichia coli* [ATCC10536], *Salmonella enterica* Typhi [ATCC9992], *Pseudomonas aeruginosa* [ATCC27853], *Streptococcus mutans* [ATCC700611], *Streptococcus oralis* y *Streptococcus sanguinis*.

Para el crecimiento óptimo de las bacterias, se utilizaron los medios de agar nutritivo y los caldos de infusión de cerebro-corazón (BHI) y Mueller–Hinton adicionado con 59.5 mg/L de CaCl₂ y 66.0 mg/L de MgCl₂.

5.3.2 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)

La actividad de la infusión derivada de las partes aéreas de *T. lucida* sobre la batería de bacterias de prueba se determinó utilizando el método de microdilución en placa de 96 pozos.

Las bacterias *Bacillus subtilis* [ATCC6633], *Staphylococcus aureus* [ATCC25923], *Escherichia coli* [ATCC10536], *Salmonella typhi* [ATCC9992], *Pseudomonas aeruginosa* [ATCC27853] se cultivaron en agar nutritivo durante 12 horas. Posteriormente, cada uno de los cultivos se resuspendió en solución salina (0.9%) y se ajustó el inóculo a una concentración de 1×10^5 UFC/mL por comparación con el estándar de McFarland de 0.5. Los extractos se disolvieron en DMSO al 5% (concentración final) y como control positivo se utilizó ampicilina. Para la realización del bioensayo en cada pozo se colocó el medio de cultivo (100 µL), y en el primer canal se adicionó el compuesto de prueba (100 µL), del cual se realizaron diluciones seriadas.

En el caso particular de las especies de *Streptococcus* se utilizaron las cepas de la bacteria conservadas en glicerol a -64°C. Cada una de estas bacterias se incubaron por 24 h, en caldo BHI, para reactivar las cepas, después se

resembraron en caldo BHI, y se crecieron por 4 horas, posteriormente la suspensión de células se ajustó a una concentración de 1×10^6 UFC/mL. Después se agregó medio de cultivo con 1% de sacarosa (80 μ L). Para la realización del bioensayo en cada pozo se colocó el medio de cultivo, y en el primer canal se adicionó el compuesto de prueba a partir del cual se realizaron diluciones seriadas. Por último se adicionaron 20 μ L de una suspensión de microorganismo de prueba con una concentración de 1×10^6 UFC/mL en cada pozo. Las CMI se determinaron por duplicado. Las placas fueron incubadas durante 24 horas a 37°C en una incubadora Symphony VWR. En la **Tabla 8** se muestran los controles utilizados para el ensayo biológico.

Tabla 8. Controles para el ensayo biológico.

Control	Medio de cultivo	Compuesto de prueba	Condiciones
Control de disolvente*	Con inóculo	-	37°C
Control negativo	Con inóculo	-	37°C
Blanco	Sin inóculo	-	37°C
Control positivo	Con inóculo	Gluconato de clorhexidina (CHX) al 0.12%	37°C
Control positivo	Con inóculo	Ampicilina	37°C

* El disolvente utilizado fue H₂O:DMSO (95:5)

Las bacterias se incubaron en condiciones aerobias, el crecimiento se estimó espectroscópicamente (A_{660} nm) después de 24 y 48 horas utilizando un lector de placas. El valor de CMI se determinó como la concentración mínima de compuesto de prueba que limita la absorbancia de cada pozo a 0.05 unidades.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La selección de la especie *Tagetes lucida* Cav. se realizó considerando su amplio uso en la medicina tradicional y los resultados obtenidos en el ensayo de actividad antibacteriana realizado a la infusión acuosa de las partes aéreas del pericón.

Posteriormente, se preparó el aceite esencial de las partes aéreas de la planta utilizando la técnica de hidrodestilación. El aceite obtenido se analizó mediante la técnica de CG-EM-TV. Por último, con la finalidad de completar la caracterización de los componentes volátiles de las partes aéreas del pericón se decidió utilizar la técnica acoplada de EC-MEFS-CG-EM-TV. La identificación de los compuestos separados mediante CG se realizó mediante la comparación de los índices de retención (Índices de Kovats) experimentales con aquellos recopilados en la biblioteca electrónica (NIST, versión 2.0).

6.1 Estudio químico del aceite esencial de las partes aéreas de *T. lucida* Cav.

6.1.1 Separación e identificación por CG-EM de los compuestos presentes en el aceite esencial de las partes aéreas de *Tagetes lucida* Cav.

La separación de los compuestos volátiles se realizó mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-EM-TV), técnica mediante la cual se identificaron 43 compuestos presentes en el aceite esencial de las partes aéreas de la planta *Tagetes lucida* Cav. (**Tabla 9**).

Tabla 9. Compuestos volátiles identificados en el aceite esencial de las partes aéreas (hojas, tallos y flores) de *Tagetes lucida* Cav. mediante CG-EM-TV y el análisis de los índices de retención (Índices de Kovats).

Pico	Nombre	Área %	^a TR(s)	^b IKt	^c IKe	Peso	^d Método Ident.	Fórmula
1	α -Mirceno	1.2022	292.596	991	998	136	IK/EM	C ₁₀ H ₁₆
2	3,4-dimetil-1,5-ciclooctadieno	0.0069	318.346	1041	1044	136	IK/EM	C ₁₀ H ₁₆
3	β -ocimeno	0.2286	323.246	1050	1053	136	IK/EM	C ₁₀ H ₁₆
4	γ -terpineno	12.4270	331.196	1062	1068	136	IK/EM	C ₁₀ H ₁₆
5	óxido de trans-linalool	0.0004	346.396	1097	1096	170	IK/EM	C ₁₀ H ₁₈ O ₂
6	trans-5-metil-2-(1-metiletil)-ciclohexanona	0.5916	362.296	1125	1125	154	IK/EM	C ₁₀ H ₁₈ O
7	(Z)-3,7-dimetil-2,6-octadien-1-ol	0.0965	412.796	1228	1223	154	IK/EM	C ₁₀ H ₁₈ O
8	3-fenilpropanol	0.0007	424.546	1252	1250	136	IK/EM	C ₉ H ₁₂ O
9	Geranil fenil éter	0.0317	426.846	-	1255	180	EM	C ₁₂ H ₂₀ O
10	(E)-3,7-dimetil-1,3,6-octatrieno	0.0365	432.996	1270	1270	136	IK/EM	C ₁₀ H ₁₆
11	(E)-3,7-dimetil-2,6-octadien-1-ol	0.4677	436.246	1277	1277	154	IK/EM	C ₁₀ H ₁₈ O
12	teaspirano A	0.1164	448.796	1305	1306	194	IK/EM	C ₁₃ H ₂₂ O
13	6-isopropiliden-1-metil-biciclo[3.1.0]hexano	0.1782	461.746	-	1336	136	EM	C ₁₀ H ₁₆
14	2,6,6,9-tetrametil-triciclo[5.4.0.0(2,8)]undec-9-eno	0.7482	466.246	1347	1347	204	IK/EM	C ₁₅ H ₂₄
15	α -copaeno	0.0389	484.546	1380	1389	204	IK/EM	C ₁₅ H ₂₄

^aTR(s): Tiempo de retención. ^bIKt: Índice de retención teórico. ^cIKe: Índice de retención experimental redondeado. ^dMétodo de Identificación: IK= Índice de Kovats y EM= Espectrometría de masas.

Tabla 9. Compuestos volátiles identificados en el aceite esencial de las partes aéreas (hojas, tallos y flores) de *Tagetes lucida* Cav. mediante GC-MS-TOF y el análisis de los índices de retención (Índices de Kovats) (continuación).

Pico	Nombre	Área %	^a TR(s)	^b IKt	^c IKe	Peso	^d Método Ident.	Fórmula
16	β -elemeno	7.2495	488.046	1397	1397	204	IK/EM	C ₁₅ H ₂₄
17	(E,E)-2,6-dimetil-2,4,6-octatrieno	12.0530	488.896	1392	1399	136	IK/EM	C ₁₀ H ₁₆
18	1-Tetradeceno	20.2860	489.346	1410	1412	196	IK/EM	C ₁₄ H ₂₈
19	Geranilacetato	26.1029	489.596	1391	1401	196	IK/EM	C ₁₂ H ₂₀ O ₂
20	(-)- β -bourboneno	0.1056	491.046	1407	1405	204	IK/EM	C ₁₅ H ₂₄
21	cis-4-isopropenil-1-metil-7-oxabicyclo[4.1.0]heptano	0.0134	499.096	1430	1426	152	IK/EM	C ₁₀ H ₁₆ O
22	Butirato de linalilo	4.6461	503.146	1437	1437	224	IK/EM	C ₁₄ H ₂₄ O ₂
23	β -cariofileno	4.6155	503.396	1431	1438	204	IK/EM	C ₁₅ H ₂₄
24	β -Selineno	0.3296	506.646	1436	1446	204	IK/EM	C ₁₅ H ₂₄
25	(E)- β -farneseno	0.0526	512.146	1460	1461	204	IK/EM	C ₁₅ H ₂₄
26	[S-(E,E)]-1-metil-5-metilen-8-(1-metiletil)-1,6-ciclododecadieno	0.1376	514.846	1470	1468	204	IK/EM	C ₁₅ H ₂₄
27	7,11-dimetil-3-metilen-1,6,10-dodecatrieno	0.2596	515.096	1462	1469	204	IK/EM	C ₁₅ H ₂₄
28	1,3,7-octatrieno, 3,7-dimetil-	0.5759	516.596	-	1473	136	EM	C ₁₀ H ₁₆
29	α -farneseno	0.0270	519.196	1496	1480	204	IK/EM	C ₁₅ H ₂₄
30	Germacreno D	2.2249	523.796	1496	1496	204	IK/EM	C ₁₅ H ₂₄

^aTR(s): Tiempo de retención. ^bIKt: Índice de retención teórico. ^cIKe: Índice de retención experimental redondeado. ^dMétodo de Identificación: IK= Índice de Kovats y EM= Espectrometría de masas.

Tabla 9. Compuestos volátiles identificados en el aceite esencial de las partes aéreas (hojas, tallos y flores) de *Tagetes lucida* Cav. mediante GC-MS-TOF y el análisis de los índices de retención (Índices de Kovats) (continuación).

Pico	Nombre	Área %	^a TR(s)	^b IKt	^c IKe	Peso	^d Método Ident.	Fórmula
31	Naftaleno, 1,2,3,5,6,8a-hexahidro-4,7-dimetil-1-(1-metiletil)-, (1S-cis)-	1.4422	531.796	1515	1514	204	IK/EM	C ₁₅ H ₂₄
32	β-bisaboleno	0.1201	536.546	1525	1527	204	IK/EM	C ₁₅ H ₂₄
33	Naftaleno, 1,2,3,5,6,8a-hexahidro-4,7-dimetil-1-(1-metiletil)	1.0224	539.896	1540	1536	204	IK/EM	C ₁₅ H ₂₄
34	Falcarinol	0.1044	541.796	-	1541	244	EM	C ₁₇ H ₂₄ O
35	α-calacoreno	0.0728	550.146	1550	1563	200	IK/EM	C ₁₅ H ₂₀
36	3,7,11-trimetil-1,6,10-dodecatrien-3-ol	1.0099	556.796	1583	1581	222	IK/EM	C ₁₅ H ₂₆ O
37	óxido de cariofileno	0.2663	564.846	1606	1603	220	IK/EM	C ₁₅ H ₂₄ O
38	α-cadinol	0.0020	573.996	1638	1632	222	IK/EM	C ₁₅ H ₂₆ O
39	Cubenol	0.1081	580.546	1649	1652	222	IK/EM	C ₁₅ H ₂₆ O
40	decahidro-1,4,8-alfa-trimetil-9-metileno-1,6-metanonaftaleno	0.2089	586.196	1669	1670	204	IK/EM	C ₁₅ H ₂₄
41	6-butil-1,4-cicloheptadieno	0.2345	586.746	1691	1672	150	IK/EM	C ₁₁ H ₁₈
42	(Z,Z)-3,7,11-trimetil-2,6,10-dodecatrien-1-ol	0.4343	591.896	1689	1688	222	IK/EM	C ₁₅ H ₂₆ O
43	Cadaleno	0.1250	597.596	-	1706	198	EM	C ₁₅ H ₁₈

^aTR(s): Tiempo de retención. ^bIKt: Índice de retención teórico. ^cIKe: Índice de retención experimental redondeado. ^dMétodo de Identificación: IK= Índice de Kovats y EM= Espectrometría de masas.

La identificación de los constituyentes volátiles del pericón, se realizó utilizando la cromatografía de gases (CG) acoplada a la espectrometría de masas (CG-EM), ya que es la herramienta de separación e identificación de analitos más adecuada para analizar compuestos volátiles, y por lo tanto la más utilizada para el análisis de los aceites esenciales y compuestos volátiles de un modo confiable (Pawliszyn, 2000; Gholivand *et al.*, 2013; Barquero, 2006).

Para el análisis por CG-EM de los compuestos volátiles se utilizan métodos combinados que incluyen el cálculo de índices de retención (IR), el análisis de los espectros de masas y la inyección de compuestos estándares.

Para implementar la identificación de los compuestos volátiles basada en la metodología de Kovats se utilizaron como estándares externos una mezcla de hidrocarburos constituida por una serie homóloga de *n*-alcanos (C₈-C₂₄); el proceso de elución se realizó utilizando las mismas condiciones cromatográficas que para las muestras. Las mezclas de parafinas son ampliamente utilizadas debido a que son no polares y químicamente inertes (Barquero, 2006).

La comparación de los espectros de masas se realizó utilizando la base de datos que se incluye en el programa del equipo (Software Chroma TOF ®). Esta comparación se realiza considerando el espectro obtenido y el incluido en la base de datos NIST (Instituto Nacional de Estándares y Tecnología).

Asimismo, los índices de Kovats fueron calculados de manera automática por el software del equipo utilizando el siguiente algoritmo (Zenkevich, 2006).

$$I = \left(\frac{t_{r(\text{desconocido})} - t_r(n)}{t_r(N) - t_r(n)} \right) * 100z + 100n$$

Donde:

I = Índice de Kovats

n = número de átomos de carbono del alcano más corto

N = número de átomos de carbono en el alcano más largo

z = diferencia del número de átomos de carbono entre alcano más corto y el más largo

t_r = tiempo de retención

En las **Figuras 8a** y **8b**, se observan como ejemplo, los espectros de masas obtenidos para el α -mirceno y el metileugenol, respectivamente, los cuales fueron comparados con la biblioteca del instrumento y la base electrónica NIST (versión 2.0), con el fin de determinar la similitud entre los espectros.

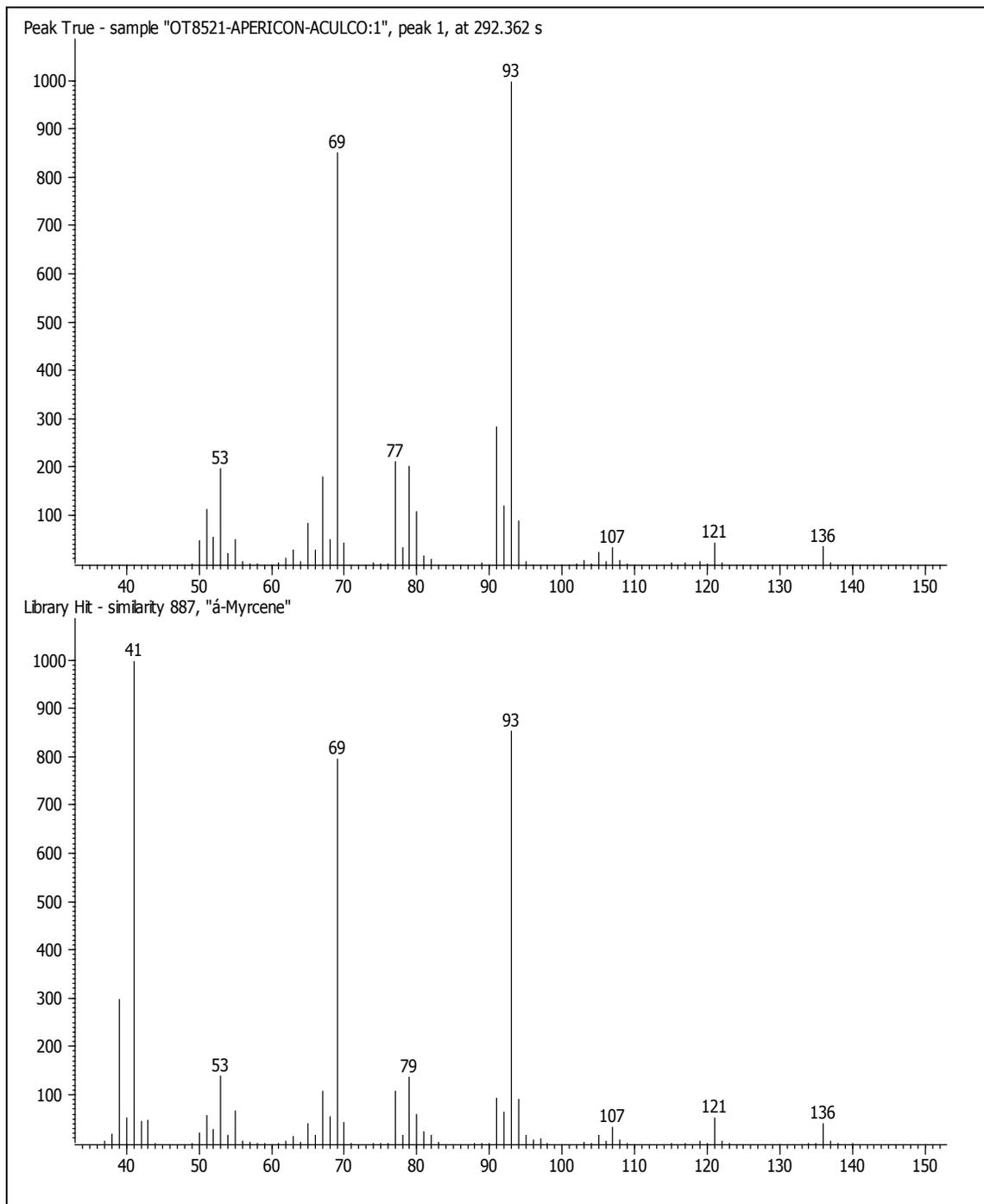


Figura 8a. Comparación del espectro de masas obtenido para el α -mirceno con el de la biblioteca del equipo utilizado.

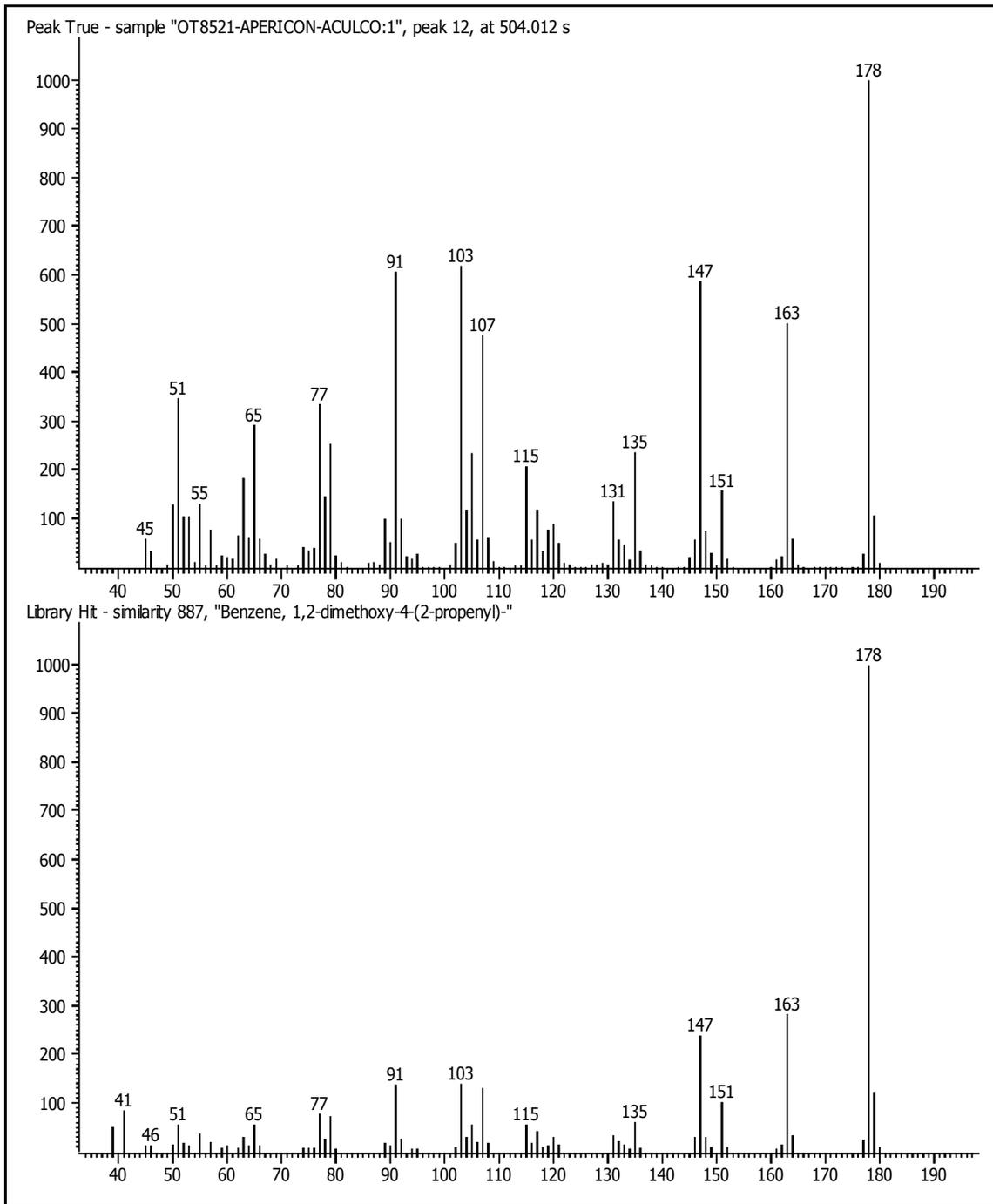


Figura 8b. Comparación del espectro de masas obtenido para el metileugenol con el de la biblioteca del equipo utilizado.

Por otra parte, se coeluyó la muestra con una serie de *n*-alcanos (C₈-C₂₄) para determinar los índices de retención (índices de Kovats) de los compuestos separados. Finalmente para corroborar la identidad de los compuestos separados se compararon los índices de retención (índices de Kovats) obtenidos experimentalmente con los de la biblioteca electrónica (NIST, versión 2.0).

Un total de 43 constituyentes fueron separados a partir de la muestra de aceite de pericón recolectada en Aculco, Estado de México (**Figura 9**). Los compuestos mayoritarios fueron los siguientes: acetato de geranilo (26.103%), tetradeceno (20.286%), γ -terpineno (12.427%), 2,6-dimetil-2,4,6-octatrieno (12.053%), β -elemeno (7.2495%), butirato de linalilo (4.6461%), β -cariofileno (4.6155%), germacreno D (2.225%). En la **Tabla 10** se ilustran los compuestos mayoritarios presentes en el aceite esencial del pericón.

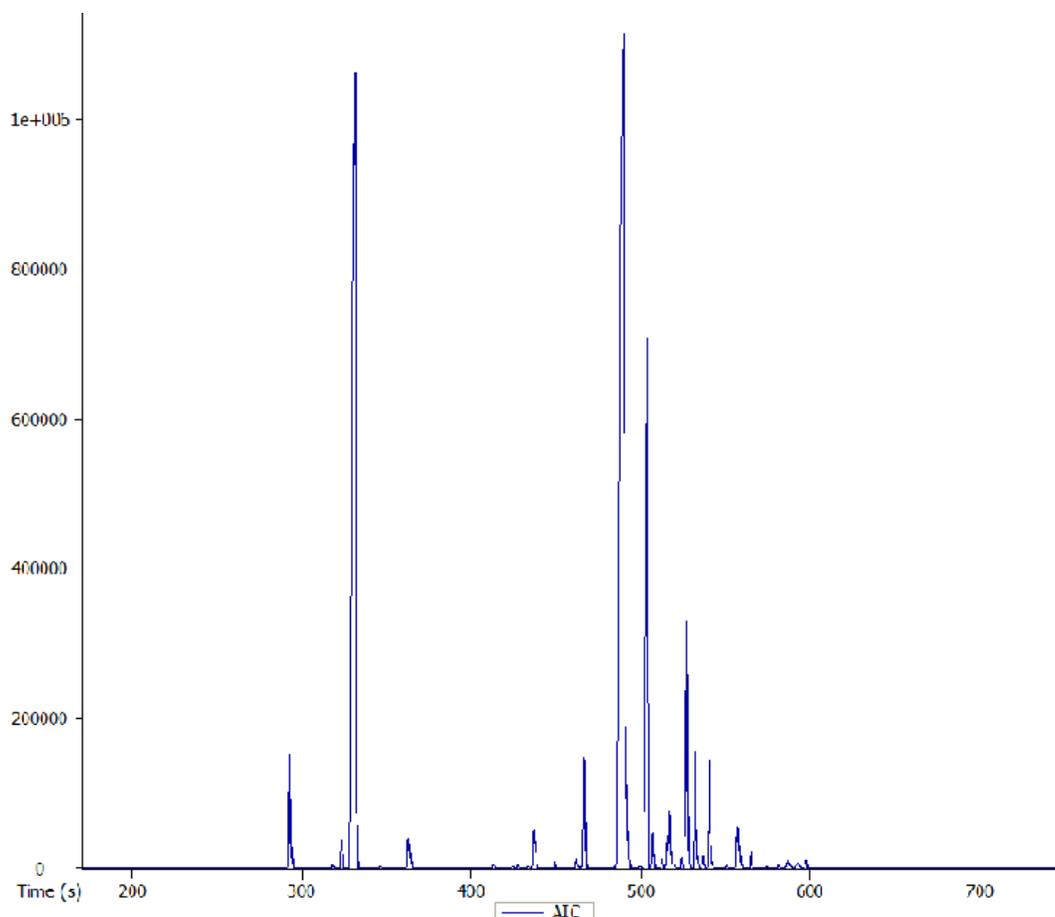
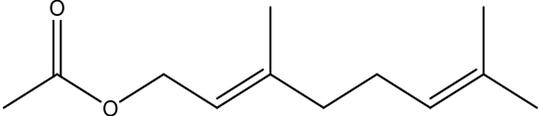
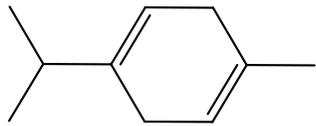
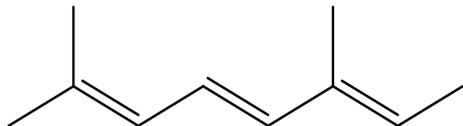
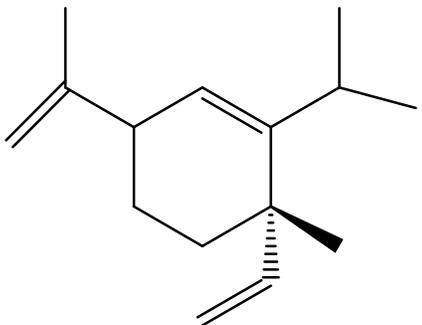
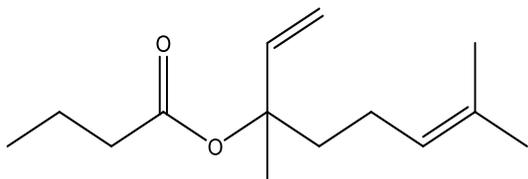
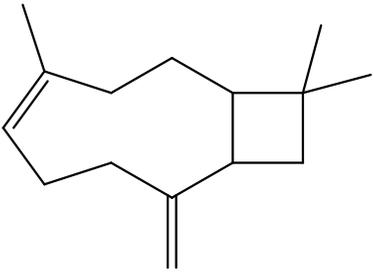
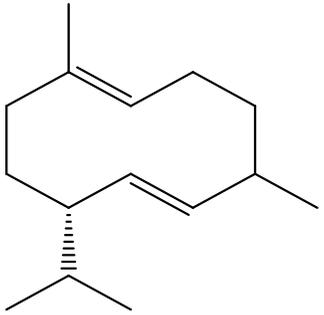


Figura 9. Cromatograma de los compuestos presentes en el aceite esencial de las partes aéreas de *Tagetes lucida Cav.*

Tabla 10. Estructuras de los compuestos mayoritarios encontrados en el aceite esencial de *Tagetes lucida* Cav. (pericón) y su abundancia relativa.

	
Acetato de geranilo (26.103%)	1-Tetradeceno (20.286%)
	
γ -terpineno (12.427%)	2,6 dimetil 2,4,6 octatrieno (12.053%)
	
β -elemeno (7.2495%)	Butirato de linalilo (4.6461%)
	
β -cariofileno (4.6155%)	Germacreno D (2.225%)

6.1.2 Extracción, separación e identificación de los compuestos volátiles presentes en las partes aéreas de *Tagetes lucida* Cav. mediante la técnica acoplada de EC-MEFS-CG-EM-TV

La microextracción en fase sólida (MEFS) fue desarrollada por Pawliszyn y colaboradores en 1990. Esta técnica emplea una fibra de sílica fusionada recubierta en su exterior por diferentes fases estacionarias. En este método el analito es directamente extraído y concentrado en el recubrimiento de la fibra. Las mayores ventajas que posee la MEFS es el ahorro de tiempo, de disolvente y la mejora en los límites de detección (Gholivand *et al.*, 2013) sin la pérdida de analitos que debido a la temperatura conlleva un proceso de extracción (destilación, Soxhlet, etc.) (Zenkevich, 2006; King, 2003).

Los compuestos volátiles del pericón se determinaron utilizando la técnica acoplada de EC-MEFS-CG-EM-TV utilizando una fibra gris (DVB/CAR/PDMS). Mediante ésta técnica se obtuvieron un total de 22 componentes presentes en la muestra de pericón, siendo el ácido pentanóico (67.983%) y el β -espringeno (17.670%) los compuestos mayoritarios.

A continuación se muestran los índices de retención (índices de Kovats) experimentales comparados con los teóricos obtenidos de la biblioteca electrónica NIST 2.0, en la **Tabla 11** se resumen los compuestos separados, las abundancias relativas y los tiempos de retención para cada uno de los compuestos separados en una columna DB-5. En la **Figura 10** se muestra el cromatograma obtenido

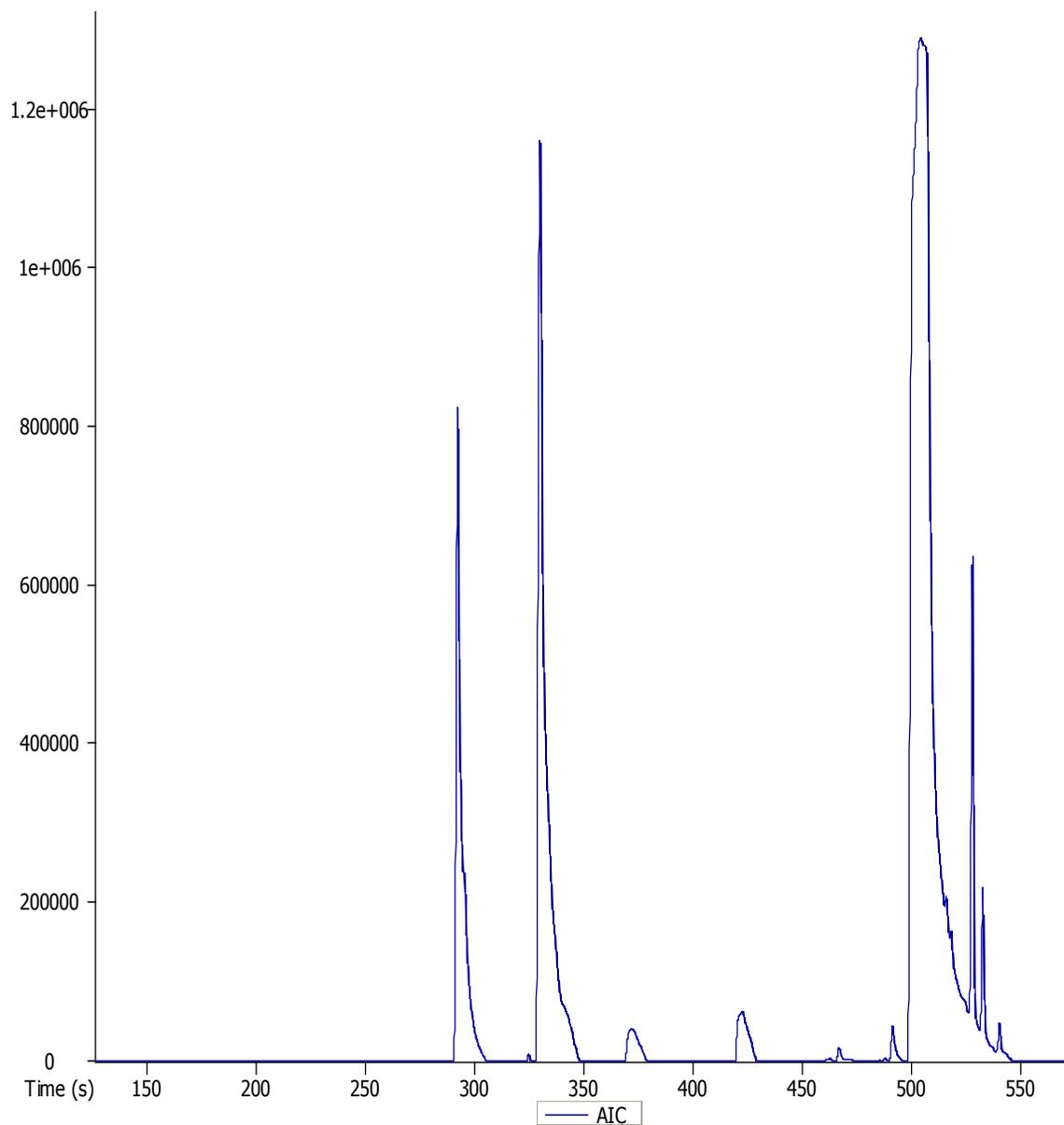


Figura 10. Cromatograma de los compuestos volátiles presentes en las partes aéreas de la especie *Tagetes lucida* Cav., empleando la técnica EC-MESF-CG-EM-TV.

Tabla 11. Constituyentes volátiles de las partes aéreas de *T. lucida* Cav, identificados a partir de la metodología EC-MEFS-CG-EM-TV y el análisis de índices de retención (Índices de Kovats).

Pico	Nombre	Área %	^a TR(s)	^b IKt	^c IKe	Peso	^d Método Ident.	Fórmula
1	<i>p</i> -Menta-1(7),8-dieno	3.1732	292.362	1001	998	136	IK/EM	C ₁₀ H ₁₆
2	3-careno	0.0479	324.812	1009	1056	136	IK/EM	C ₁₀ H ₁₆
3	<i>p</i> -menta-3,8-dieno	6.1702	330.112	1018	1072	136	IK/EM	C ₁₀ H ₁₆
4	Isopulegol	0.2555	372.762	1146	1145	154	IK/EM	C ₁₀ H ₁₈ O
5	Metilchavicol	0.3501	423.012	1195	1247	148	IK/EM	C ₁₀ H ₁₂ O
6	Silfineno	0.0557	467.012	1337	1348	204	IK/EM	C ₁₅ H ₂₄
8	Metileugenol	1.2199	500.362	1401	1407	178	IK/EM	C ₁₁ H ₁₄ O ₂
9	β -elemeno	0.2120	491.512	1445	1406	204	IK/EM	C ₁₅ H ₂₄
10	β -espringeno	17.6700	503.212	-	1437	272	EM	C ₂₀ H ₃₂
11	Ácido pentatónico	67.9833	505.443	1440	1443	178	IK/EM	C ₁₁ H ₁₄ O ₂
16	β -Selineno	0.0812	516.112	1474	1476	204	IK/EM	C ₁₅ H ₂₄
17	γ -muuroleno	0.0257	518.512	1477	1478	204	IK/EM	C ₁₅ H ₂₄
18	α -Muuroleno	0.0253	525.012	1499	1496	204	IK/EM	C ₁₅ H ₂₄
19	β -Bisaboleno	0.8565	528.112	1500	1504	204	IK/EM	C ₁₅ H ₂₄
20	γ -Cadineno	0.2879	532.862	1511	1513	204	IK/EM	C ₁₅ H ₂₄
21	α -Cadineno	0.0066	537.312	1524	1529	204	IK/EM	C ₁₅ H ₂₄
22	δ -Cadineno	0.0889	540.462	1535	1538	204	IK/EM	C ₁₅ H ₂₄

^aTR(s): Tiempo de retención. ^bIKt: Índice de retención teórico. ^cIKe: Índice de retención experimental redondeado. ^dMétodo de Identificación: IK= Índice de Kovats y EM= Espectrometría de masas.

Recientemente, se ha intensificado el estudio de los componentes volátiles y aceites esenciales derivados de especies vegetales como agentes de control bacteriano (Pisseri, 2008). Esta tendencia obedece a que los aceites esenciales contienen constituyentes con actividad antibacteriana sobre bacterias Gram positivas y Gram negativas (Edris, 2007). Otras actividades importantes de estos aceites son las espasmolíticas, antinociceptivas y antioxidantes, entre otras. Además, los aceites esenciales poseen propiedades inmunomoduladoras, psicotrópicas, acaricidas y expectorantes (Pisseri, 2008). Por otra parte, se les ha descrito actividades antivirales y propiedades supresoras del cáncer (Edris, 2007). Debido a estas propiedades los aceites esenciales poseen numerosas aplicaciones en la medicina y la aromaterapia (Pauli, 2010).

En el curso de la historia los aceites esenciales han sido utilizados en la medicina tradicional por sus propiedades antibacterianas. Por esta razón, las plantas y materiales vegetales que los contienen se usan para el tratamiento de enfermedades infecciosas desde tiempos antiguos, aun cuando no se tenía conocimiento de la existencia de los microorganismos (Pauli, 2010).

En el caso particular de *Tagetes lucida* se han realizado estudios previos conducentes a determinar la composición química y las actividades biológicas de muestras recolectadas en diferentes países.

Visbal y colaboradores en el 2007 encontraron que el aceite esencial de una muestra recolectada en Venezuela contenía mayoritariamente metilchavicol (99.5%). Otro estudio realizado por Ciccio en el 2004 con una muestra recolectada en Costa Rica obtuvo resultados similares con un rango de concentraciones de metilchavicol de 95-97%. Por último Marotti y colaboradores en el 2004 encontraron 93.8% de metilchavicol en una muestra de pericón proveniente de Italia. Estos resultados contrastan con los obtenidos en el presente estudio ya que la concentración encontrada de metilchavicol fue de 0.3501%, sin embargo, son congruentes con un estudio realizado por Bicchi y colaboradores en 1997 en donde se encontró un 33% de metilchavicol en una muestra de Guatemala y

0.34% en una muestra de Perú. Además en el trabajo realizado por Guzmán y Manjarrez en 1962, encontraron 12% de metilchavicol en muestras de *Tagetes lucida* cultivadas en México.

De manera adicional es importante destacar que la composición química de la muestra analizada es muy similar a la descrita por Ciccío, entre los componentes mayoritarios similares se pueden mencionar metileugenol, β -cariofileno, α -mirceno, β -ocimeno y germacreno D.

Debido a las similitudes e inconsistencias observadas en los resultados obtenidos en estudios previos y en el presente, se puede señalar que la composición química de la planta, aunque se conserva similar en sus componentes, difiere en sus proporciones de acuerdo a la región geográfica en que se encuentre cultivada, lo cual es el reflejo tanto de la diversidad natural que existe en distintas zonas del mundo en cuanto a flora y fauna, como de la actividad del hombre y otras sustancias químicas con las que esté en contacto la planta al desarrollarse.

6.2 Evaluación de la actividad antimicrobiana de los compuestos presentes en el aceite esencial y la infusión de pericón.

Es común el empleo popular de partes vegetales con la finalidad de obtener diversos efectos terapéuticos. Varios estudios han validado científicamente la eficacia de numerosos usos de la medicina tradicional utilizada por la gente. Entre las variadas aplicaciones terapéuticas de los vegetales, se incluyen aquellas con finalidad antimicrobiana (Garzón, 2006).

Con el objetivo de evaluar la actividad antimicrobiana de la infusión y el aceite esencial de la especie *Tagetes lucida* Cav. se diseñó un experimento en el que se evalúa la capacidad de ambos extractos para inhibir el crecimiento de los microorganismos patógenos utilizando el método de microdilución en placa. Los controles positivos utilizados fueron el gluconato de clorhexidina y ampicilina. La ampicilina es un antibiótico beta lactámico que inhibe la síntesis y la reparación de la pared celular bacteriana y el gluconato de clorhexidrina pertenece al grupo de las biguanidas, es un antimicrobiano antiséptico muy utilizado, ambos antimicrobianos son de amplio espectro y son activos en técnicas in vitro contra un gran número de bacterias, en gran variedad de organismos Gram negativos y Gram positivos (Martínez *et. al.*, 1998; Nolasco, 2011). El gluconato de clorhexidina es especialmente eficaz frente a estreptococos del grupo *mutans*, estreptococos simples, *Selenomonas* spp. y *Propionibacterium* spp., en concentraciones elevadas suele ser bactericida y en concentraciones bajas, bacteriostático (Nolasco, 2011). La ampicilina es bactericida y es comúnmente indicada para infecciones por *Escherichia coli*, *Listeria* sp., *Proteus mirabilis*, *Shigella* sp., *Salmonella* sp., estafilococos y estreptococos (Martínez *et. al.*, 1998).

Es importante señalar que un extracto o fracción se considera activa cuando se obtienen dosis letales menores de 1000 µg/mL (Rivero, *et al.*, 2008).

En este estudio se llevó a cabo la evaluación antimicrobiana de la infusión y el aceite esencial de las partes aéreas de *Tagetes lucida* Cav. en ocho bacterias distintas. Los resultados resumidos en la **Tabla 12** muestran que todas las bacterias evaluadas demostraron ser sensibles al aceite esencial en un rango de CMI de 128-512 µg/mL. Para las bacterias *Streptococcus mutans*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella enterica* Typhi se obtuvo el valor de CMI más bajo (128 µg/ml), es decir, se presentó una mayor actividad antimicrobiana del aceite esencial de la especie *Tagetes lucida* Cav. Para las bacterias *Streptococcus oralis* y *Escherichia coli* se obtuvo una CMI de 256 µg/ml, que se considera moderada y tanto para *Streptococcus sanguinis* como para *Pseudomona aeruginosa* se obtuvo una CMI de 512 µg/mL, que a pesar de ser la concentración mínima inhibitoria más alta del ensayo, el aceite esencial se considera activo.

En cuanto a la infusión de la planta, se obtuvo un rango de CMI de 256-1024 µg/mL. La CMI más baja obtenida corresponde a la bacteria *Streptococcus mutans* (256 µg/mL), seguida de las bacterias *Streptococcus oralis*, *Bacillus subtilis* y *Salmonella typhi* (512 µg/mL) y las CMI más altas obtenidas fueron para las bacterias *Streptococcus sanguinis*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, con un valor de 1024 µg/mL.

Tabla 12. Evaluación de la actividad antibacteriana del aceite esencial y la infusión de las partes aéreas de *Tagetes lucida* Cav.

Microorganismo	CMI ($\mu\text{g/mL}$)	
	Infusión	Aceite esencial
<i>Streptococcus mutans</i>	256	128
<i>Streptococcus oralis</i>	512	256
<i>Streptococcus sanguinis</i>	1024	512
<i>Bacillus subtilis</i>	512	128
<i>Staphylococcus aureus</i>	1024	128
<i>Escherichia coli</i>	1024	256
<i>Salmonella enterica</i> Typhi	512	128
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	>1024	512

CMI: Concentración mínima inhibitoria. Se utilizó gluconato de clorhexidina y ampicilina como controles positivos

En la presente investigación se obtuvieron evidencias de la actividad antimicrobiana de la infusión y el aceite esencial de *Tagetes lucida* con el método de microdilución en placa de 96 pozos.

Como se ha mencionado, el uso medicinal más frecuente de esta planta registrado en algunos estados de la Republica Mexicana es en transtornos digestivos, principalmente para dolores de estómago, cólicos menstruales, dismenorrea e inflamación. También se ha encontrado efecto antimicrobiano de esta planta frente a estreptococos y estafilococos, entre otras bacterias y en levaduras como *Candida albicans* (Guadarrama et al., 2008; Sierra, 2000; Vibrans, 2009).

En el presente trabajo se ha realizado la evaluación de la actividad antimicrobiana del aceite esencial y la infusión de pericón recolectado en San Jerónimmo Aculco, Estado de México, obteniendo los resultados mostrados en la

Tabla 12, los cuales muestran que todas las bacterias evaluadas fueron sensibles al aceite esencial en un rango de CMI de 128-512 $\mu\text{g/mL}$ y para la infusión, se obtuvo un rango de CMI de 256-1024 $\mu\text{g/mL}$. Para el caso de la infusión cuatro de las ocho bacterias evaluadas (*Streptococcus sanguinis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*) presentaron una CMI mayor a 1000 $\mu\text{g/mL}$, por lo que la infusión se considera moderadamente activa.

Estos resultados son congruentes con los obtenidos por Cáceres y Girón (1991) en el cual describieron la actividad antimicrobiana del AE de *Tagetes lucida* frente a algunos microorganismos, obteniendo actividad sobre bacterias como *Escherichia coli*, *Salmonella Enteritidis*, *Salmonella Typhi*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* y *Streptococcus pyogenes*.

7. CONCLUSIONES

Se identificaron 44 compuestos volátiles en las partes aéreas de *Tagetes lucida* Cav. mediante la técnica de hidrodestilación seguida de cromatografía de gases, acoplada a espectrometría de masas (CG-EM-TV) y la comparación de los índices de retención (índices de Kovats) experimentales con los de la biblioteca electrónica (NIST, versión 2.0).

La preparación del aceite esencial por hidrodestilación y su análisis por CG-EM-TV permitió la identificación de los siguientes compuestos mayoritarios en las partes aéreas de *Tagetes lucida* Cav: γ -terpineno (12.427%), β -elemeno (7.2495%), 2,6 dimetil 2, 4,6 octatrieno (12.053%), tetradeceno (20.286%), geranil acetato (26.103%), linalil butirato (4.6461%), cariofileno (4.6155%), germacreno (2.225%).

Además se identificaron 2 compuestos volátiles mayoritarios β -espringeno (17.670%) y ácido valérico (67.983%) en las partes aéreas de pericón mediante la técnica EC-MEFS-CG-EM-TV.

En contraste con estudios previos realizados en Venezuela por Visbal y colaboradores y en Costa Rica por Cicció, se obtuvo una baja concentración de metilchavicol en el aceite esencial (0.3501%).

El aceite esencial de las partes aéreas de pericón presentó actividad sobre el crecimiento de las ocho especies patógenas evaluadas (*Streptococcus mutans*, *Streptococcus oralis*, *B subtilis*, *S. typhi*, *Streptococcus sanguinis*, *S. aureus*, *E. coli* y *P. aeuriginosa*).

La infusión de pericón presentó actividad sobre el crecimiento de 4 de las bacterias evaluadas (*Streptococcus mutans*, *Streptococcus oralis*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhi*) y sobre 3 especies (*Streptococcus sanguinis*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*) presentó CMI's mayores a 1000 μ g/mL, por lo que se considera no activa.

8. PERSPECTIVAS

- Determinar la composición de volátiles de muestras de pericón recolectadas en otras regiones de México con la finalidad realizar una comparación de su composición.
- Evaluar los componentes volátiles mayoritarios para determinar su efecto sobre el crecimiento de las principales bacterias causantes de enfermedades del tracto gastrointestinal.
- Evaluar otras actividades biológicas, como antioxidante o antifúngica, de ésta especie, tomando en cuenta el estudio presente.
- Realizar el estudio del resto de las fracciones no volátiles, con la finalidad de aislar y purificar compuestos presentes.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Abdala, L. R. 1999. Flavonoids of the aerial parts from *Tagetes lucida* (Asteraceae). *Biochemical Systematics and Ecology*. Vol. 27 (7): 753-754.
2. Adams, R. 2007. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry. 4th Ed. Biology Department of Baylor University.
3. Amner, M., Bottia, E., Cardenas, C., Patiño, J., Díaz, O., Martínez, J., Kouznetsov, V. y Stashenko, E. 2007. Estudio comparativo sobre la capacidad de atrapamiento del catión radical ABTS+ por los aceites esenciales de especies aromáticas con alto contenido de trans-anetol y estragol. *Scientia et Technica*. Vol. 13 (33): 117-120.
4. Antolovich, M., Prenzler, P.D., Patsalides, E., McDonald, S., and Robards, K. 2002. Methods for testing antioxidant activity. *The Analyst*. Vol. 127: 183-198.
5. Aquino, R., Cáceres, A., Morelli, B., and Rastrelli, L. 2002. An extract of *Tagetes lucida* and its phenolic constituents as antioxidants. *Journal of Natural Products*. Vol. 65 (12): 1773-1776.
6. Arnaz, P., García A. 1991. Composición del extracto hexánico de tallos y hojas de *Tagetes lucida* y pruebas anti bacterianas. *Plantas de uso medicinal en Centroamérica, Cooperación Italiana*.
7. Badillo-Damián, L., Salgado-Garciglia, R., Martínez-Muñoz, R. y Martínez-Pacheco, M. 2008. Antifungal properties of some mexican medicinal plants. *The Open Natural Products Journal*. Vol. 1: 27-33.
8. Barquero Quirós, M., 2006. Principios y Aplicaciones de la Cromatografía de Gases. 1ª Edición. Editorial Universidad de Costa Rica. Costa Rica. 28-30.
9. Bertucco, A. y Vertter, G. 2001. High pressure process technology: fundamentals and applications. Elsevier. *The Netherlands*. 547-549.

10. Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009, recuperado el 01 Abril de 2013 de <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx>
11. Bicchi, C., Fresia, M., Rubiolo, P., Monti, D., Franz, C. y Goehler, I. 1997. Constituents of *Tagetes lucida* Cav. Lucida Essential Oil. Flavour and Fragrance Journal. Vol. 12 (1): 47-52.
12. Burt, S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. International Journal of Food Microbiology. Vol. 94: 223– 253.
13. Cáceres, A; Alvarez, A.V; Ovando, A.E.; and Samayoa, B.E. 1991. Plants used in Guatemala for the treatment of respiratory diseases. Screening of 68 plants against Gram-positive bacteria. Journal of Ethnopharmacology. Vol. 31 (2): 193-208.
14. Cáceres, A; Cano, O; Samayoa, B.; and Aguilar, L. 1990. Plants used in Guatemala for the treatment of gastrointestinal disorders. Screening of 84 plants against enterobacteria. Journal of Ethnopharmacology. Vol. 30 (1): 55-73.
15. Cambar, P., Tabora, E., Andonie H., Alger, J., Figueroa, R., Martínez, E. y Martínez J. 1984. Estudio preliminar de los efectos farmacológicos de: *Tagetes lucida* ("pericón"). Revista Médica Hondureña. Vol. 52 (3): 142-147.
16. Cano, A. L. 1997. Flora medicinal de Veracruz, I. Inventario etnobotánico. Universidad de Veracruz.
17. Carey, F.A. Química orgánica. 1999. Tercera edición, Ed. McGraw-Hill, Inc., Madrid. 945-953.
18. CBI. 2004. Food Ingredients for Industrial Use. EU Market Survey. ProFound. 46-72.
19. CBI. 2005. Natural Ingredients for Cosmetics. EU Market Survey. ProFound, 32-52.
20. Cerpa, M. 2007. Hidrodestilación de aceites esenciales: modelado y caracterización (Tesis doctoral). Universidad de Valladolid, España, 1-21.

21. Céspedes, C.L; Avila, J.G; Martínez, A; Serrato, B; Calderón-Mugica, J.C.; and Salgado-Garciglia, R. 2006. Antifungal and antibacterial activities of Mexican tarragon (*Tagetes lucida*). Journal of Agricultural and Food Chemistry. Vol. 54(10): 3521-3527.
22. Cicció, J.F. 2004. A source of almost pure methyl chavicol: Volatile oil from the aerial parts of *Tagetes lucida* (Asteraceae) cultivated in Costa Rica. Revista de Biología Tropical. Vo. 52 (4): 853-857.
23. Cliver, D.O. 1993. Eating Safely: Avoiding Foodborne Illness. Ed. A. Golaine, American Council on Science and Health, New York.
24. de Esteyneffer Juan. 1712. Florilegio Medicinal de todas las enfermedades. México.
25. de la Cruz Beranza, B.C. 2005. Caracterización de cinco extractos de plantas medicinales nativas de Guatemala, validadas científicamente, in Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala: Guatemala.
26. Díaz, J.L. 1976. Etnofarmacología de algunos psicotrópicos vegetales de México. Cuaderno Científico Cemef. No. 4. México. Centro Mexicano de Estudios de Farmacodependencia.
27. Dorman, H. y Deans, S. 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. Journal of Applied Microbiology, Vol. 88: 308-316.
28. Edris, A.E. 2007. Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. Phytother. Vol. 21: 308-23.
29. Flores, W. 2008. Evaluación de la estabilidad acelerada de una tintura vegetal comercializada con propiedad antibacteriana, preparada a partir de *Gnaphalium stramineum* HBK (flores), *Plantago major* L. (hojas), *Psidium guajava* L. (hojas) y *Tagetes lucida* Cav. (hojas y flores), en solución alcohólica al 35%. (Tesis). Guatemala. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala.

30. Garzón C. 2006. Análisis bromatológicos y fitoquímicos básicos de las especies priorizadas dentro del marco del proyecto “Uso sostenible de los recursos vegetales del D. C. y la región”. Jardín botánico José Celestino Mutis-Subdirección Científica. Bogotá, 133 p.
31. Germosén Robineau, L. 2007. Farmacopée Végétal Caribéenne. 12a edición. Santo Domingo, Republica Dominicana Editora & Pap. Josué.
32. Gholivand, B.M., Piryaei, M., Abolghasemi, M.M., Maassoumi, S.M. 2013. Rapid analysis of volatile components from *Teucrium polium* L. by nanoporous silica-polyaniline solid phase microextraction fibre. *Phytochemical Analysis*. Vol. 24: 69-74.
33. Girón, L.M; Freire, V; Alonzo, A.; and Cáceres, A. 1991. Ethnobotanical survey of the medicinal flora used by the Caribs of Guatemala. *Journal of Ethnopharmacology*. Vol. 34 (2-3): 173-187.
34. Guadarrama, G., Alarcon, F., Lezama, R., Vazquez, G. y Bonilla, H. 2008. Antidepressant-like effects of *Tagetes lucida* Cav. In the forced swimming test. *Journal of Ethnopharmacology*. Vol. 120: 277-281.
35. Gupta, M.P. 1995. Plantas Medicinales Iberoamericanas. Editorial Presencia Ltda. Bogotá. 559-560.
36. Guzmán, A. y Manjarrez, A. 1962. Estudio del aceite esencial de *Tagetes florida*. *Boletín del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México*. Vol. 14: 48-54
37. 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*. Vol. 38: 539-550.
38. Hernández C., Aguilera A., Castro E. 2011. Situación de las enfermedades gastrointestinales en México. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*. Vol. 31 (4): 137-151.
39. Hernández, F. 1966. Historia Natural de Cayo Plinio Segundo. Traslada y Anotada por el Dr. Francisco Hernández. En: Obras completas de Francisco Hernández, Tomo IV. Editadas por Germán Somolinos D'Ardois. Universidad Nacional de México.

40. Hernández, T; Canales, M; Flores, C; García, A.M; Duran, A.; and Avila, J.G. 2006. Antimicrobial activity of *Tagetes lucida*. *Pharmaceutical Biology*. Vol. 44 (1): 19-22.
41. Hethelyi E, Danos B, Tetenyi P, Koczka I. 1986. GC-MS analysis of the essential oils of four *Tagetes* species and the anti-microbial activity of *Tagetes minuta*. *Flavour Frag J*. Vol. 1: 169–17
42. Jirovetz, L.; Buchbauer, G. 2005. Processing, analysis and application of essential oils. Ed. Har Krishan Bhalla & Sons. Dehradun, India. 21-23.
43. Kalemba, D.; Kunicka, A. 2003. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry*. Vol. 10: 813-829.
44. King, A.J., 2003. The application of solid-phase micro-extraction (SPME) to the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Environmental Geochemistry and Health*. Vol. 25: 69–75.
45. León Ramírez S. 2002. “Shigelosis (disentería bacilar)”. Vol. 8: 22-25.
46. Leung, A.Y. and S. Foster. 1980. *Encyclopedia of common natural ingredients used in food, drugs, and cosmetics*, ed. I. John Wiley & Sons. New Jersey, USA.
47. Linskens, H. y Jackson, J. 1991. *Modern methods of plants analysis. Essential oils and waxes*. Springer-Verlag. Germany. Vol. 12: 82-96, 310-313.
48. Madurga, M. 2002. Anís estrellado ¿una planta medicinal inocua?. *Revista Pediatría de Atención Primaria*. Vol. 4 (16): 657-666.
49. Malik, A., Kushnoor, A., Saini, V., Singhail, A., Kumar, S. Chand, Y. 2011. In vitro antioxidant properties of scopoletin. *Pharmacology online*. Vol. 1: 1125-1133.
50. Margl, L., Tei, A., Gyurjan, I. y Wink, M. 2002. GLC and GLC-ms analysis of thiophene derivatives in plants and *in vitro* cultures of *Tagetes patula* L. (Asteraceae). *Zeitschrift für Naturforschung C. A Journal of Biosciences*. Vol. 57 (1-2): 63-71
51. Martínez M., Sánchez G., Martín P., Martín R. E., Daza R. M., Mendaza P., Portero F. 1998. Sensitivity to quinolones and ampicillin in *Salmonella*

- spp.* Enfermedades infecciosas y Microbiología clínica. Vol. 16 (8): 389
52. Marotti, M; Piccaglia, R; Biavati, B.; and Marotti, I. 2004. Characterization and yield evaluation of essential oils from different *Tagetes* species. Journal of Essential Oil Research. Vol. 16 (5): 440-444
 53. Márquez, A. C., F. Lara O., B. Esquivel R. y R. Mata E. 1999. Plantas medicinales de México II. Composición, usos y actividad biológica. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F.
 54. Martínez Maximino. 1959. Plantas útiles de la flora mexicana. Ediciones Botas.
 55. Mattos, P., Cordero, A. y Bartos, A. 2007. Intoxicación por anís estrellado en un lactante menor. Revista de la Sociedad Boliviana de Pediatría. Vol. 46 (2): 105-107.
 56. Mendoza, L. Wilkens, M. Urzua, A: 1997. Antimicrobial study of the resinous exudates and of diterpenoids and flavonoids isolated from some *Chilean pseudognaphallum* (Astraceae) J. Ethnopharmacol. Vol. 58: 85-88.
 57. Miller, E.C., *et al.*, 1983. Structure-activity studies of the carcinogenicities in the mouse and rat of some naturally occurring and synthetic alkenylbenzene derivatives related to safrole and estragole. Cancer Res, Vol. 43(3): 1124-1134.
 58. Mims, C. 1993. Microbiología Médica, 2ª edición. Ed. Harcourt Brace. España. 582.
 59. Morton, J.F. 1981. Atlas of medicinal plants of Middle America: Bahamas to Yucatan. Ilustrada ed, ed. C.C. Thomas. Vol. 1.
 60. Muñoz, A. *et al.*, 2007. Estudio comparativo sobre la capacidad de atrapamiento del catión radical ABTS+ por los aceites esenciales de especies aromáticas con alto contenido de trans-anetol y estragol. Scientia Et Technica. Vol. 13: 117-120.
 61. Nolasco Herrera H., 2011. Gluconato de clorhexidina al 0.12%. Odontología Moderna. Vol. 8 (86):12

62. Okunade, A.L. and J.I. Olaifa. 1987. Estragole: An Acute Toxic Principle from the Volatile Oil of the Leaves of *Clausena anisata*. *Journal of Natural Products*. Vol. 50 (5): 990-991.
63. Olvera, E. 2007. Estudio fitoquímico y evaluación antimicrobiana de *Tagetes lucida* (pericón). Tesis. México. Facultad de Química. UNAM.
64. Oranday, A., Martínez, G., Nuñez, A., Rivas, C. y Flores A. E. 2008. Coumarin isolated from *Tagetes lucida* Cav. Exhibits Larvicidal Activity in *Aedes aegypti*. *Southwestern Entomologist Scientific Note*. Vol. 33 (4): 315-317.
65. Orellana, A. Recomendaciones técnicas del cultivo de Pericón. Recuperado el 02 de Abril de 2013 de http://www.icta.gob.gt/reco_rec_nat.htm
66. Pauli, A., Schilcher, H., 2010. Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Applications, edited by K. H. C. Baser and G. Buchbauer (Taylor & Francis, Boca Raton, 2010)
67. Pawliszyn, J., 2000. Applications of solid-phase microextraction in food analysis. *Journal of Chromatography*. Vol. 880: 35-62.
68. Phillips, D.H., M.V. Reddy, and K. Randerath, 32P-Post labelling analysis of DNA adducts formed in the livers of animals treated with safrole, estragole and other naturally occurring alkenyl benzenes. II. Newbornmale B6C3F1 mice. *Carcinogenesis*, 1984. Vol. 623-1628.
69. Pisseri, F., 2008. Essential oils in medicine: principles of therapy. *Parassitology*. Vol. 50, 89-91.
70. Pokorny, J., Yanishlieva, N. 2001. Gordon, M. (Eds), Antioxidants in food: practical applications. CRC Press, Boca Raton. 17.
71. Rivero J. F. 2008. Antimicrobial compounds isolated from *Haematoxylon brasiletto*. *Journal of Ethnopharmacology*. Vol. 119 (1): 99-103.
72. Rietjens, I.M.C.M., *et al.* 2005. Flavonoids and alkenylbenzenes: Mechanisms of mutagenic action and carcinogenic risk. *Mutation Research/ Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. Vol. 574(1-2): 124-138.

73. Romero, A., Merchan, D. y Kouznetsov, V. 2007. Reacción de IminoDiels-Alder de tres componentes con precursores de origen natural. Generación de nuevas tetrahydroquinolinas 2,4-diaril disustituidas. *Scientia et Technica*. Vol. 13 (33): 91-95.
74. Rzedowski, J. y Equihua, M. 1987. Atlas cultural de México, Ed. Secretaría de Educación Pública. Instituto Nacional de Antropología e Historia. Dpo. Editorial Planeta. México. 14-16.
75. Sahagún, Bernardino. 1946. Historia general de las cosas de la Nueva España. Primera parte, p. 9.
76. Salgado, R., López, R., Martínez, M. y García, A. 2007. Biotecnología de plantas. *Ciencia Nicolaita*. Vol. 48: 65-78.
77. Santa Cruz, C. 2005. Extracción a nivel de laboratorio de aceite esencial crudo de pericón (*Tagetes lucida Cav.*), y utilización del desecho sólido para la extracción del colorante natural, para su uso en el teñido de fibras naturales. (Tesis). Guatemala. Facultad de Ingeniería. Escuela de Ingeniería Química. Universidad de San Carlos de Guatemala.
78. Santillán María Luisa, 2012. El uso tradicional de las plantas medicinales, un aporte para la ciencia. DGDC-UNAM, recuperado el 01 de Abril de 2013 de <http://ciencia.unam.mx>
79. Sell, C.S. 2003. A fragrant introduction to terpenoid chemistry. Primera edición, Royal Society of Chemistry. 396
80. Sierra, D. 2000. El yauhtli o pericón, planta curativa y protectora. Su importancia mágico-religiosa en el presente y en el pasado. (Tesis). México. Facultad de Filosofía y Letras. UNAM.
81. Vibrans, H. 2009. Malezas de México. Consultado el 21 de enero del 2011.
82. Vila J, Álvarez-Martínez MJ, Buesa J, Castillo J. 2009. Diagnóstico microbiológico de las infecciones gastrointestinales. *Enfermedades Infecciosas Microbiología Clínica*. Vol. 27: 406-411
83. Villarreal, J. A. 2003. Compositae. Tribu Tageteae. En: Rzedowski, G. C. de y J. Rzedowski (eds.). Flora del Bajío y de regiones adyacentes. Fascículo 113. Instituto de Ecología-Centro Regional del Bajío. Consejo

Nacional de Ciencia y Tecnología y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Pátzcuaro, Michoacán, México.

84. Ximenez Francisco. 1915. Quatro libros de la naturaleza y virtudes de las plantas y animales. México.
85. Zenkevich, I., 2006. Chromatographic quantitation at losses of analyte during sample preparation. Application of the modified method of double internal standard. Journal of Chromatography. Vol. 1150: 117-23.