



Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán

---

**“Determinación de actividad antimicrobiana de los extractos vegetales de *Tagetes nelsonii* Greenm”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADA EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA

P R E S E N T A:

MARY CARMEN JUÁREZ RAYA

Asesor: QFB Brígida Del Carmen Camacho Enríquez

Co Asesor: Dr. Enrique Salas Téllez

Cuautitlán Izcalli, Estado De México, 2016.



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

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN  
PRESENTE

ATN: M. EN A. ISMAEL HERNÁNDEZ MAURICIO  
Jefe del Departamento de Exámenes Profesionales  
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

**Determinación de actividad antimicrobiana de los extractos vegetales de *Tagetes nelsonii* Greenm.**

Que presenta la pasante: Mary Carmen Juárez Raya  
Con número de cuenta: 308168451 para obtener el Título de la carrera: Licenciatura en Bioquímica Diagnóstica

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 14 de Octubre de 2015.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
<b>PRESIDENTE</b>	Q.F.B. Brígida del Carmen Camacho Enriquez	
<b>VOCAL</b>	Dra. Alma Lucila Nuñez del Arco	
<b>SECRETARIO</b>	M. en C. Ma. Guadalupe Avilés Robles	
<b>1er. SUPLENTE</b>	Q.F.B. Leticia Cubillo Carrillo	
<b>2do. SUPLENTE</b>	L.F. Miguel Angel Trejo Rodríguez	Trejo Rodríguez Miguel A.

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

IHM/mmgm\*

## **Agradecimientos**

Doy gracias a **Dios**, aquel que sin querer o tal vez con toda la intención me dio la oportunidad de vivir.

### ***A mi familia***

Posiblemente esta parte sea una de las más largas, sin embargo vale la pena ser extensos, porque ni escribiendo un libro entero hará que sean suficientes mis agradecimientos.

*Papá...*

Hace tanto que estás físicamente lejos de mí, que me da temor perderte en el olvido; ese miedo se difumina cuando recuerdo que tú siempre serás mi protector. Gracias por iniciar la creación de una mujer fuerte, por quererme en demasía y por siempre estar orgulloso de mí.

Perdóname por no ser Ingeniero, pero orgullosamente soy Bioquímica.

*Mamá...*

¡Dios! No sé cómo darte las gracias, sin duda alguna tú eres responsable de que yo esté aquí, en este mundo. Tú mi protectora de vida, mi Isis encarnada. Gracias por tus desvelos, tus abrazos y besos, pero sobre todo, gracias por haberme peinado aunque no quisiera, por limpiar mis lágrimas y ayudar a sanar mi corazón.

No cabe duda y me atrevo a decir que ustedes dos me enseñaron lo que es el amor puro y sin condiciones, ojala pueda ser un poquito como ustedes.

**Lo que se hace por amor está más allá del bien y del mal** (Friedrich Nietzsche)

Los quise, los quiero y los querré siempre.

*Hermano...*

Mi hombre favorito, digo hombre, porque hace mucho que los infortunios de la vida decidieron tomarte por sorpresa y hacerte crecer. Tú, aquel que me ha enseñado un tipo de amor raro, de esos que te abrazan y no te sueltan. Estoy muy orgullosa de ti, me has demostrado que la edad no es más que un impedimento mental que la gente pone para decirte que no lo lograras, pero como siempre, tú demuestras lo contrario. Robin Williams dijo: *Creo que las personas que han experimentado las mayores tristezas son las que siempre se esfuerzan más en hacer a otros felices. Porque ellos saben en carne propia lo que se siente sentirse desolados y abatidos, y no quieren que nadie más se sienta así.* Tú eres de esas personas, siempre con una sonrisa y mil ocurrencias.

Gracias por quererme, por hacerme reír. Te quiero.

*A mis papás adoptivos...*

Obviamente son ustedes Rubí y Miguel, no sé qué haría sin ustedes, se han convertido en unos ángeles, ustedes que sin tener, se han ocupado de mí, gracias por su infinito apoyo y amor. Por acogerme como una hija, en verdad no tengo palabras para agradecerles, sólo pido a la vida y a Dios que los llene de mil bendiciones y salud, para que permanezcan aún más cerca de mí.

*Mis primos, que más que eso se han convertido en hermanos...*

Cardenitas, Ferts y Julian, gracias por soportarme, ustedes me han acogido como una más, me hacen reír, aprender cosas distintas todos los días y bueno, me hacen más amena la vida.

Los quiero changuitos

*Tías Lety y Rocío...*

Lety: gracias por tu comida, adoramos la fondita Juárez. Gracias también por siempre escucharnos y andar ahí como loca ayudándonos a solucionar nuestros problemas, no hay duda que te has convertido en la mamá de los pollitos Juárez.

Rocío: Gracias tía por siempre apoyarnos cuando lo necesitamos, usted sin duda alguna es parte fundamental de este proyecto.

*A mis primos...*

Claus y Rocks, ¡par de deschavetadas! Ustedes se han convertido en mujeres vitales en mi vida, gracias a ustedes he aprendido cosas de niñas grandes, como eso de siempre andar arregladas, aunque aún no lo aplico, me han enseñado que en definitiva no existe el cuento de hadas con un príncipe azul, pero lo más importante que he aprendido de ustedes es que debo ser fuerte y siempre salir a delante, que llegará un momento en que no sólo debo luchar por mí, sino por algo pequeñito y grande a la vez. Son un ejemplo para mí, gracias por permitirme aprender de ustedes, por regalarme la oportunidad de enamorarme del sueño de ser mamá. Gracias por mis sobrinos loquillos Mena y Leo.

Patricio, Chicken, Liz, Chiquita, Primor, Andy, Gusano, Chapis, gracias por ser buena onda, divertidos y estar ahí siempre.

### **Mi familia por elección**

Dicen que la vida te da una familia, aquella que no elegimos y tampoco nos eligen, pero con el paso del tiempo uno va armando su propia familia.

Mi psicóloga favorita... Guille, gracias por ser mi amiga, mi hermana, por soportarme, por perdonarme. Eres mi amiga del alma, de la vida y confié en que así será hasta el final de nuestras vidas, sabes que estoy para apoyarte, espero pronto estemos celebrando el logro que tanto deseas.

#### Mis BQD's

*Jess...* Amor mío de mí, tanto que ya te he dicho, qué puedo decirte que no sepas, gracias por ser mi amiga estos mil años de universidad, por siempre ser mi equipo, por soportarme 24x7. *Y debo decir que confié plenamente en la casualidad de haberte conocido. Que nunca intentaré olvidarte, y que si lo hiciera, no lo conseguiría* (Julio Cortázar). ¡Te amo!

*Claudia...* Bebé, gracias por los excelentes momentos que hemos vivido, por integrarte a la perfección en nuestro equipo "Trabajador", te quiero mucho, tú y Jess son personas hermosas que me enseñaron un poco de la belleza que aún hay en el mundo, las llevaré siempre en mi corazón, esperando nunca olvidarnos.

*Victor...* Gracias por todos los momentos vividos, eres un hombre raro, pero con excelentes sentimientos, sin duda alguna soy afortunada en considerarme tu amiga, no te apartes nunca de mi camino.

*Itzel...* Amiga, gracias por estar igual de amargada que yo, por ser payasa para trabajar y por las platicadas que nos aventamos. Aunque estés amargadita, haces que los días sean infinitamente divertidos, con sólo tu presencia. Te quiero.

*Josué...* Gracias por despejar mi duda sobre tus hermosas y sensuales canas, por enseñarme los números nones, por preguntarme en seminarios donde siempre dormía, por aquella ocasión del árbol, pero sobre todo por ser mi panda favorito.

*Joaquis...* mi eterno trovador! Gracias por tu amistad, tu cariño, por los excelentes momentos que vivimos cantando y bailando, siempre tendrás un lugar en mi corazón. Te quiero.

#### Mis Químicos favoritos

*Ceci...* Manaaaaa, lo logré! Debo decirte mil cosas, una de ellas es que estás bien loquita, evidentemente igual que yo. Aún recuerdo cuando te tenía miedo, te veías muy ruda, pero descubrí que eres más pachoncita que un muffin. Eres un amor de persona, adoro el conocerte, nunca imaginé vivir cosas padrísimas contigo, te has convertido en mi hermana, te quiero y confío que la vida nos tendrá juntitas un ratote. Gracias por hacer mi vida divertida, cursi, pero sobretodo, por permitirme ser tu Mana.

*Sarita...* Eres un pan de Dios, gracias por permitirme ser tu amiga y darme tu confianza, te aprecio infinitamente y agradezco a la vida por ponerte en mi camino en momentos de oscuridad, sin duda alguna tú eres una lucecita en mi vida. Gracias. Te quiero.

*Heriberto...* Betún, gracias por ser mi amigo, por confiar en mí, por tantos ratos de risa, por los tips de vida, en verdad jamás pensé compartir tanto contigo.

Ricardo, Daniel, Sergio, Israel, gracias por todo lo aprendido, los momentos de risa, estrés, miedo, que viví a su lado.

Ale... Hijolee!! ¿Cómo empezar? Pues gracias por el apoyo brindado durante mi trabajo, por escucharme, tolerarme, por las risas, gracias por enseñarme que uno siempre debe seguir echándole ganas, que no hay nada más poderoso que el querer. Sabes que te deseo mil bendiciones, un abrazo poquito fuerte y vamos por más.

*Migue, Isaac, Lidia, Isbo...* chicos gracias por todos los momentos vividos a su lado, por escucharme, por compartir algo de ustedes, la confianza brindada, los aprecio infinitamente. Lidia y Ale, gracias por escucharme y sus consejos, les deseo muchas bendiciones en su vida.

### ***Mi inspiración***

*Dra. Brígida...* agradezco me haya permitido ser parte de su equipo de investigación, aprendí infinidad de cosas con usted, como hace mucho le dije la admiro como mujer y Químico que es. Se convirtió en una mamá para mí, gracias por su confianza, cariño y sus conocimientos compartidos. De igual modo agradezco al profe Mario, que sin duda alguna es parte vital de este proyecto, además de ser una fuente de conocimiento inigualable.

*Dr. Téllez (Mi Pos Doc, favorito)...* No tengo palabras para agradecerle el adoptarme como tesista de último momento, he aprendido mucho de usted, lo admiro en demasía. Agradezco su confianza, su tiempo y paciencia, pero sobretodo el excelente ser humano que es. Gracias por ser parte de este logro, por regalarme su guía y brindarme un nuevo camino.

Gracias a todos mis compañeros de laboratorio, tanto del L-324 como del 17 en la UIM, me llevo experiencias gratas y aprendizajes, deseo que todos estén llenos de bendiciones y mucho éxito. (Miri, Pepé, Armando, Pilly, Uriel, Jackie, Ana, Janine, Kevin, Imelda y los que falten).

Gracias al Dr. Méndez y la Dra. Alma Núñez, por brindarme la oportunidad de usar las instalaciones y equipo de su laboratorio, pero sobre todo por su confianza.

### ***Mi Alma Máter***

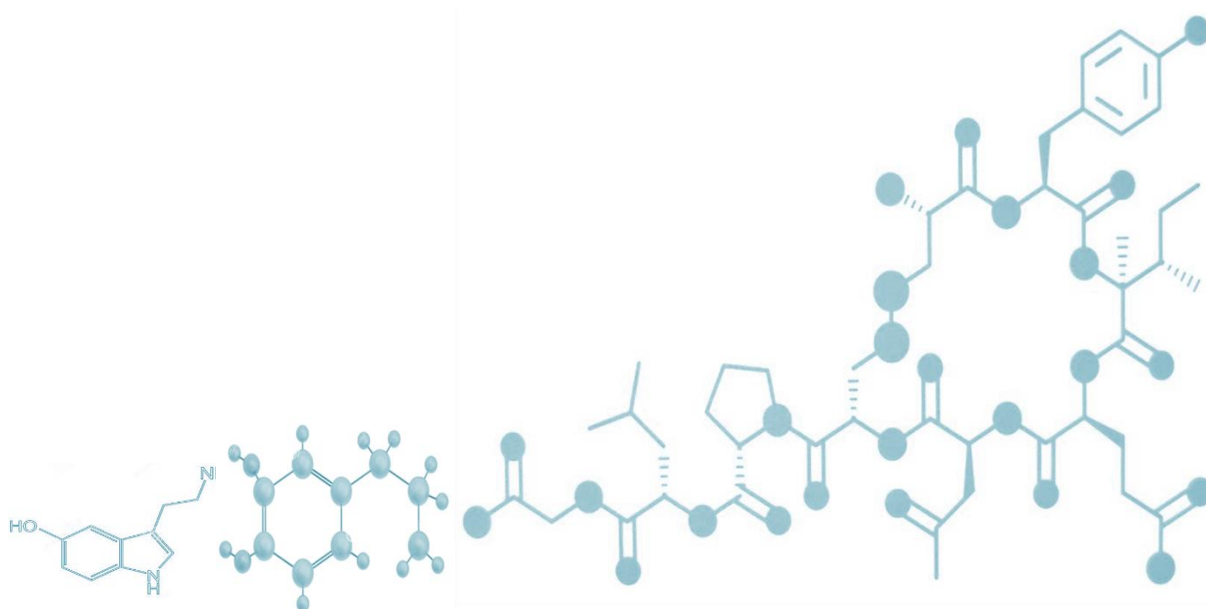
Gracias infinitas a la UNAM por permitirme desarrollarme como profesional y como mujer, de ella me llevo las experiencias más gratas de mi vida. Prometo que donde quiera que vaya pondré en alto su nombre y siempre estaré orgullosa de pertenecer a ella.

***¡Por mi raza hablará el espíritu!***

*For you,  
My best friend,  
My deeper love...*

*...The best of me.*

*P.D.* 🎵🎵





# Índice

I. Abreviaturas .....	I
II. Índice de Diagramas .....	I
III. Índice de Tablas.....	II
IV. Índice de Imágenes.....	III
Introducción.....	1
1. Marco teórico.....	3
1.1. Medicina Tradicional.....	3
1.1.1. Plantas medicinales ¿Recurso divino o Química? .....	5
1.2. Extractos vegetales.....	9
1.2.1. Fitoquímica .....	10
1.2.1.1. Tamizaje Fitoquímico.....	11
1.3. ¿Por qué centrar la atención en los extractos vegetales? .....	11
1.3.1. Los microorganismos y las plantas medicinales. ....	12
1.4. Género <i>Tagetes</i> en México.....	15
1.4.1. <i>Tagetes nelsonii</i> Greenm .....	17
2. Objetivos .....	25
2.1. Objetivo general.....	25
2.2. Objetivos particulares .....	25
3. Metodología.....	26
3.1. Tratamiento de la materia prima Chilchagua .....	26
3.1.1. Colecta de la materia prima .....	26
3.1.2. Herborización e identificación del material biológico .....	26
3.1.3. Material extraño .....	26
3.1.4. Parte utilizada de la planta.....	27
3.1.5. Desecación a la sombra .....	27
3.1.6. Molienda.....	29
3.1.7. Obtención de extractos vegetales por maceración de la Chilchagua .....	29
3.1.8. Análisis Fitoquímico Preliminar .....	30

3.1.9.	Obtención de Aceite esencial .....	31
3.1.10.	Conservación de extractos vegetales y Aceite esencial .....	33
3.2.	Actividad Antimicrobiana .....	34
3.2.1.	Preparación de Soluciones stock de Extractos Vegetales, Aceite Esencial, Gentamicina y Anfotericina B. ....	34
3.2.2.	Diluciones de las soluciones stock. ....	35
3.2.3.	Preparación del inóculo. ....	41
3.3.2.	Inoculación de placas. ....	43
3.4.	Actividad antimicrobiana (método de difusión en agar). ....	44
3.5.	Actividad antimicrobiana del extracto vegetal en crudo. ....	45
3.5.1.	Obtención del extracto vegetal en crudo de Chilchagua.....	45
3.5.2.	Llenado de placas e inoculación. ....	46
4.	Resultados.....	47
4.1.	Tratamiento de la materia vegetal. ....	47
4.1.1.	Materia prima. ....	47
4.2.	Extractos vegetales.....	48
4.2.1.	Análisis fitoquímico preliminar. ....	48
4.2.2.	Extracción .....	52
4.2.3.	Espectroscopia infrarroja de los extractos vegetales y del aceite esencial de Chilchagua.....	53
4.2.4.	Material extraíble. ....	54
4.2.5.	Conservación de extractos vegetales y aceite esencial.....	55
4.3.	Actividad antimicrobiana.....	55
4.3.1.	Soluciones stock de Extractos Vegetales y Aceite Esencial de la Chilchagua en etapa longeva.....	55
4.3.1.	Actividad Antimicrobiana (Microdilución en placa).....	56
4.3.3.	Actividad Antimicrobiana (Difusión en agar). ....	58
4.3.4.	Actividad antimicrobiana con extracto vegetal en crudo. ....	61
5.	Análisis de resultados. ....	62
5.1.	Tratamiento de la materia prima. ....	62
5.1.1.	Identificación Taxonómica.....	62
5.1.2.	Materia extraña. ....	63

5.2.	Extracción.....	63
5.2.1.	Extractos vegetales.....	63
5.2.2.	Extracción del aceite esencial de <i>Tagetes nelsonii</i> Greenm.....	63
5.3.	Rendimiento de extracción.....	63
5.4.	Control de calidad del aceite esencial.....	64
5.4.1.	Propiedades organolépticas.....	64
5.4.2.	Determinaciones fisicoquímicas.....	65
5.5.	Actividad Antimicrobiana.....	66
6.	Prospectivas.....	71
7.	Anexos.....	71
8.	Referencias.....	75

## I. Abreviaturas

Concentración Mínima Inhibitoria	<b>MIC</b>
Revoluciones por minuto	<b>rpm</b>
Horas	<b>h</b>
Litros	<b>L</b>
Militros	<b>mL</b>
Microlitros	<b>µL</b>
Gramos	<b>g</b>
Microgramos	<b>µg</b>
Partes por millón	<b>ppm</b>
Grados Celsius	<b>°C</b>
Organización Mundial de la Salud	<b>WHO/OMS</b>
Farmacopea Herbolaria De los Estados Unidos Mexicanos	<b>FHEUM</b>
Dimetilsulfóxido	<b>DMSO</b>
Infusión Cerebro Corazón	<b>BHI</b>
Metanol	<b>MetOH</b>
Etanol	<b>EtOH</b>

## II. índice de Diagramas

DIAGRAMA 1. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS.....	10
DIAGRAMA 2. DIAGRAMA GENERAL DE TRABAJO.....	28

### III. Índice de Tablas

TABLA 1. METABOLITOS SECUNDARIOS RESPONSABLES DE LA ACTIVIDAD MEDICINAL DE LAS PLANTAS.....	8
TABLA 2. GRUPOS QUÍMICOS MÁS IMPORTANTES CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA OBTENIDOS DE PLANTAS. .....	13
TABLA 3. APLICACIONES MICROBIOLÓGICAS DE EXTRACTOS VEGETALES.....	14
TABLA 4. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DEL GÉNERO <i>TAGETES</i> .....	15
TABLA 5. ALGUNAS ESPECIES DEL GÉNERO <i>TAGETES</i> Y SU USO MEDICINAL.....	17
TABLA 6. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE <i>TAGETES NELSONII</i> GREENM .....	18
TABLA 7. CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS PRINCIPALES DE <i>E. COLI</i> .....	20
TABLA 8. PRUEBAS BIOQUÍMICAS DE <i>CANDIDA ALBICANS</i> . .....	21
TABLA 9. PROPORCIÓN DE DISOLVENTES PARA LOS EXTRACTOS VEGETALES DE <i>T. NELSONII</i> GREENM.....	35
TABLA 10. PROPORCIÓN DE DISOLVENTES PARA EL ACEITE ESENCIAL DE <i>T. NELSONII</i> GREENM .....	35
TABLA 11. DILUCIONES DE LOS EXTRACTOS VEGETALES DE <i>T. NELSONII</i> GREENM.....	36
TABLA 12. DILUCIONES DEL ACEITE ESENCIAL DE <i>T. NELSONII</i> GREENM. ....	37
TABLA 13. DILUCIONES ANFOTERICINA B (PRIMERA ETAPA). ....	38
TABLA 14. DILUCIONES DEL STOCK DE GENTAMICINA. ....	40
TABLA 15. SISTEMAS DE DISOLVENTES PARA EXTRACCIÓN EN CRUDO DE LA CHILCHAGUA.....	45
TABLA 16. IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA DE LA MATERIA VEGETAL.....	47
TABLA 17. MATERIAL EXTRAÑO. ....	47
TABLA 18. PRUEBA GUIGNARD (MATERIAL VEGETAL COMPLETO). ....	48
TABLA 19. PRUEBAS FITOQUÍMICAS PARA EL EXTRACTO HEXÁNICO DE CHILCHAGUA.....	48
TABLA 20. PRUEBAS FITOQUÍMICAS PARA EL EXTRACTO CON ACETATO DE ÉTILO DE CHILCHAGUA.....	49
TABLA 21. PRUEBAS FITOQUÍMICAS PARA EL EXTRACTO DE CHILCHAGUA EN ACETATO DE ÉTILO.....	50
TABLA 22. PRUEBAS FITOQUÍMICAS AL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE LA CHILCHAGUA. ....	51
TABLA 23. PARÁMETROS DE EXTRACCIÓN PARA LOS EXTRACTOS VEGETALES .....	52
TABLA 24. CONTROL DE CALIDAD DEL ACEITE ESENCIAL DE LA CHILCHAGUA (ASPECTOS SENSORIALES)...	53
TABLA 25. ASPECTOS FISICOQUÍMICOS DEL ACEITE ESENCIAL.....	53
TABLA 26. EXTRACTOS OBTENIDOS POR GRADIENTE DE POLARIDAD.....	54
TABLA 27. ACEITE ESENCIAL. ....	54
TABLA 28. RESULTADOS DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS EXTRACTOS VEGETALES POR EL MÉTODO DE MICRODILUCIÓN EN PLACA. ....	56
TABLA 29. RESULTADOS DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL ACEITE ESENCIAL POR EL MÉTODO DE MICRODILUCIÓN EN PLACA.....	56
TABLA 30. RESULTADOS DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS EXTRACTOS VEGETALES POR EL MÉTODO DE DIFUSIÓN EN AGAR.....	58
TABLA 31. RESULTADOS DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL ACEITE ESENCIAL POR EL MÉTODO DE DIFUSIÓN EN PLACA. ....	59
TABLA 32. RESULTADOS DEL MÉTODO DIFUSIÓN EN AGAR PARA <i>E. COLI</i> . ....	59
TABLA 33. RESULTADOS PARA EL MÉTODO DE DIFUSIÓN EN AGAR PARA <i>S. AUREUS</i> . ....	60
TABLA 34. RESULTADOS DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS EXTRACTOS VEGETALES EN CRUDO. ..	61
TABLA 34 GRUPOS FUNCIONALES PRESENTES EN EL ESPECTRO IR DEL ACEITE ESENCIAL DE CHILCHAGUA. .....	65
TABLA 35. GRUPOS FUNCIONALES PRESENTES EN EL ESPECTRO IR DEL EXTRACTO DE ACETATO DE ÉTILO. .....	66

TABLA 36. METABOLITOS IDENTIFICADOS EN EL TAMIZ FITOQUÍMICO CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA.....	67
TABLA 37. FACTORES QUE INFLUYEN EN LA CALIDAD Y CONCENTRACIÓN DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS.....	69

#### IV. Índice de Imágenes

IMAGEN 1. CÓDICE DE LA CRUZ-BADIANO COMPILADO O RECETARIO DONDE SE DESCRIBE EL USO DE 227 PLANTAS PARA ENFERMEDADES DE LA ÉPOCA, FUERON RECOMENDADOS POR MARTÍN DE LA CRUZ, MÉDICO INDÍGENA .....	4
IMAGEN 2. ORIGEN DE ALGUNOS METABOLITOS SECUNDARIOS.....	6
IMAGEN 3. FLOR DE CEMPOALXOCHITL .....	16
IMAGEN 4. CHILCHAGUA.....	17
IMAGEN 5. FLOR DE CHILCHAGUA .....	18
IMAGEN 6. TINCIÓN GRAM DE <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> (40X) .....	19
IMAGEN 7. ESTRUCTURA QUÍMICA DE LA GENTAMICINA.....	22
IMAGEN 8. MECANISMO DE ACCIÓN DE LA GENTAMICINA .....	23
IMAGEN 9. MECANISMO DE ACCIÓN DE ANFOTERICINA B .....	24
IMAGEN 10. EQUIPO DE MACERACIÓN .....	30
IMAGEN 11. EQUIPO DE HIDRODESTILACIÓN ADAPTADO CON UNA TRAMPA DE CLEVINGER .....	32
IMAGEN 12. ESQUEMA DE DILUCIONES DEL ACEITE ESENCIAL DE CHILCHAGUA.....	36
IMAGEN 13. ESQUEMA DE DILUCIONES DEL ACEITE ESENCIAL DE CHILCHAGUA. ....	37
IMAGEN 14. ESQUEMA DE DILUCIONES DE LA ANFOTERICINA B (ETAPA 1). ....	38
IMAGEN 15. SEGUNDO PASO DE LA DILUCIÓN DE ANTIMICROBIANO DE REFERENCIA, .....	39
IMAGEN 16. ESQUEMA DE DILUCIONES DE LA GENTAMICINA. ....	40
IMAGEN 17. ESQUEMA DE DILUCIONES DE LA GENTAMICINA (ETAPA DOS).....	41
IMAGEN 18. LLENADO DE PLACAS, .....	43
IMAGEN 19. SIEMBRA MASIVA EN PLACAS DE AGAR. ....	44
IMAGEN 20. MONTAJE DE DISCOS IMPREGNADOS CON ANTIMICROBIANO (ACEITE ESENCIAL, EXTRACTOS VEGETALES DE CHILCHAGUA, ANFOTERICINA B Y GENTAMICINA).....	44
IMAGEN 21. PLACA DE TITULACIÓN.....	46
IMAGEN 22. EXTRACTOS VEGETALES DE <i>T. NELSONII</i> GREENM CON DISTINTOS DISOLVENTES (HEXANO, ACETATO DE ETILO Y ETOH/H <sub>2</sub> O [50:50], EN ORDEN CORRESPONDIENTE). ....	52
IMAGEN 23. INFRARROJO DEL ACEITE ESENCIAL DE CHILCHAGUA. ....	53
IMAGEN 24. INFRARROJO DEL EXTRACTO ACETATO DE ETILO DE CHILCHAGUA.....	54
IMAGEN 25. CONSERVACIÓN DE LOS EXTRACTOS ACUOSOS Y DEL ACEITE ESENCIAL.....	55
IMAGEN 26. SOLUCIONES STOCK .....	55
IMAGEN 27. EXTRACTOS VEGETALES EN CRUDO. ....	55
IMAGEN 28. ACTIVIDAD MICROBIOLÓGICA DE LOS EXTRACTOS VEGETALES Y EL ACEITE ESENCIAL DE <i>TAGETES NELSONII</i> GREENM ( <i>C. ALBICANS.</i> ) .....	57
IMAGEN 29. ACTIVIDAD MICROBIOLÓGICA DE LOS EXTRACTOS VEGETALES Y EL ACEITE ESENCIAL DE <i>TAGETES NELSONII</i> GREENM ( <i>S. AUREUS</i> ).....	57
IMAGEN 30. ACTIVIDAD MICROBIOLÓGICA DE LOS EXTRACTOS VEGETALES Y DEL ACEITE ESENCIAL DE <i>TAGETES NELSONII</i> GREENM ( <i>E. COLI</i> ). ....	58
IMAGEN 31. <i>E. COLI</i> Y <i>S. AUREUS</i> CONTRA LOS EXTRACTOS EN CRUDO DE LA CHILCHAGUA. ....	61
IMAGEN 32. <i>C. ALBICANS</i> CONTRA EXTRACTOS CRUDOS DE LA CHILCHAGUA .....	62
IMAGEN 33. ESTRUCTURA MOLECULAR DE LA E-TAGETONA. ....	66

## Introducción.

La medicina tradicional forma parte del sistema de salud de los mexicanos, junto con la académica y las llamadas alternativas. Actualmente, la medicina herbolaria o tradicional está teniendo un resurgimiento muy fuerte a nivel mundial, sobre todo en países desarrollados en los que la medicina moderna es la principal fuente de cuidado de la salud, con mayor razón en México, que es un país rico en cultura y vegetación. Algunas ventajas de las drogas de origen vegetal es que son ideales para el tratamiento y prevención de enfermedades crónicas, producen efectos secundarios mínimos y son económicamente accesibles a toda la población (Folashade, 2012).

La OMS reporta que la cuarta parte de los fármacos empleados actualmente en los países industrializados, proceden de productos vegetales; tendencia en crecimiento, esta razón le ha conferido un gran impulso a la investigación en las plantas medicinales con fines terapéuticos.

De igual modo, la proliferación de enfermedades causadas por microorganismos patógenos y la multiresistencia de estos a los fármacos de mercado, que constituyen un factor de riesgo para la salud pública, es por esto que se buscan fuentes naturales que inhiban el crecimiento microbiano; descubriendo en las plantas compuestos bioactivos para tal fin (Corzo, 2012).

La multiresistencia que se ha generado como resultado del empleo indiscriminado de los antibióticos comerciales en el tratamiento de las enfermedades infecciosas y la aparición de efectos secundarios, ha obligado a la comunidad científica a investigar nuevas sustancias antimicrobianas provenientes de fuentes vegetales, popularmente conocidas como plantas medicinales. Los ensayos realizados hasta este momento revelan que las plantas representan una potencial fuente de nuevos agentes antimicrobianos (Zampini & Cudmani, 2007). Por lo anterior se puede afirmar que los productos naturales se han convertido en fuente de hallazgos de numerosas drogas desde el siglo XIX hasta la actualidad.

La OMS estima que para el 2020, la salud del 75% de la población empleará Fitofármacos, razón por la cual la ciencia médica tiene la responsabilidad de aprovechar los trabajos de investigación de todas las disciplinas, pero sobre todo rescatar la riqueza heredada del conocimiento tradicional y darle un uso actual en beneficio de la salud de la población (Rojas, 2009).

Todo lo anteriormente descrito ha despertado un fuerte interés al equipo científico de Farmacognosia y Fitoquímica; dándose a la tarea de desarrollar temas de investigación como el que se presenta a continuación. Cabe resaltar que todo el trabajo experimental, se desarrolló en laboratorio de Farmacognosia y Fitoquímica (L-324) de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, C-1 y en el laboratorio 17 de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, C-4. Ambos pertenecientes a la Universidad Nacional Autónoma de México.



# 1. Marco teórico.

## 1.1. Medicina Tradicional.

*“No debe avergonzarnos el tomar del pueblo todo  
aquello que puede ser útil  
en el arte de curar”*

**Hipócrates Siglo IV a. C.**

La medicina tradicional es base del saber humano, conocimiento que le ha permitido sobrevivir a lo largo del tiempo. Sin duda alguna, todos los pueblos que han habitado la tierra desarrollaron una visión distinta sobre la misma, sin embargo, la medicina tradicional mexicana se define como el conjunto de sistemas de atención a la salud que tienen como origen, los conocimientos médicos ancestrales que se han difundido mediante el aprendizaje teórico y práctico, por medio de la observación y la experimentación, a partir de la repetición exacta de sus principios e igualmente de las innovaciones que algunos individuos introducen gracias a su propia experiencia (Fagetti, 2007).

Para la Organización Mundial de la Salud (OMS), la medicina tradicional, representa un sistema abstracto de conocimiento mágico-religioso, que está firmemente arraigado en un sustrato ideológico indígena, el cual manifiesta una notable capacidad de adaptación al cambio. Comprende el conjunto de ideas, conceptos, creencias, mitos y procedimientos, sean explicables o no, relativos a las enfermedades físicas, mentales o desequilibrios sociales que están presentes en las comunidades indígenas (Almaguer, 2003). Por lo anteriormente descrito, es erróneo afirmar que la medicina tradicional es igual a plantas medicinales.

Sin embargo, las plantas han sido utilizadas en la medicina griega hipocrática, la medicina china, la homeopatía, la terapia de microdosis, la terapia floral de Bach, la aromaterapia, el naturismo de herencia Hindú, las medicinas tradicionales europeas, las medicinas tradicionales africanas, en la medicina occidental actual y por supuesto en las medicinas tradicionales americanas. Lo interesante es que en cada una de ellas es utilizada bajo una filosofía y visión del mundo diferente (Almaguer, 2003). El uso de las plantas medicinales, enteras o sus partes, secas o frescas, solas o asociadas; así como sus extractos y formulaciones, para tratar algún padecimiento se conoce como Fitoterapia.

En México, el estudio de las plantas medicinales se remonta desde antes de la época prehispánica. Se hace mención que los aztecas clasificaban las plantas de acuerdo a su uso; conocimiento que transmitieron de manera oral a sus generaciones (véase imagen 1). Es importante mencionar que la rápida occidentalización de los pueblos, provocó la exterminación de especies vegetales antes de siquiera ser registradas o bien estudiadas, ha despertado la necesidad de incrementar los esfuerzos para recopilar toda la información posible que los pueblos puedan guardar sobre su medicina tradicional, de igual modo se está intentando conservar la información genética de las múltiples especies vegetales.

En México se tiene un estimado de 30, 000 especies vegetales, de las cuales sólo 3,000 han sido documentadas como plantas medicinales por el Instituto Nacional Indigenista, y de este número sólo del 1 al 5% de especies, se han validado farmacológica y químicamente (Rosales, y otros, 2007) Sin duda alguna, la medicina tradicional forma parte del sistema de salud en México, se estima que se cuentan con alrededor de 10 000 especies medicinales. A pesar de esto no se cuenta con una estadística real sobre cuántos mexicanos recurren a la medicina tradicional, sin embargo, el ISSTE reportó a finales de los 80's, que más del 50 por ciento de los derechohabientes recurrían a la medicina tradicional (Zolla, 2012).

En síntesis, el interés de estudiar las plantas medicinales reside en su contenido de metabolitos secundarios y la actividad farmacológica de estos; de hecho muchos de los metabolitos, ya son modelo químico para la síntesis orgánica de los mismos, evitando así la deforestación. Además, es importante mencionar que existe un número importante de personas que están retomando el uso de remedios naturales, debido al menor número de efectos secundarios que se presentan, incluyendo que pueden ser consumidos sin prescripción médica, son baratos y con mínimos efectos secundarios.



**Imagen 1. Códice de la Cruz-Badiano compilado o recetario donde se describe el uso de 227 plantas para enfermedades de la época, fueron recomendados por Martín de la Cruz, médico indígena**

(Viesca, 2015)

### 1.1.1 Plantas medicinales ¿Recurso divino o Química?

*“El médico cura, sólo la naturaleza sana”*

**Hipócrates**

**Siglo IV a.C.**

Como ya se ha hecho mención, las plantas medicinales se han empleado en el tratamiento y prevención de enfermedades en la población mexicana desde tiempos inmemorables.

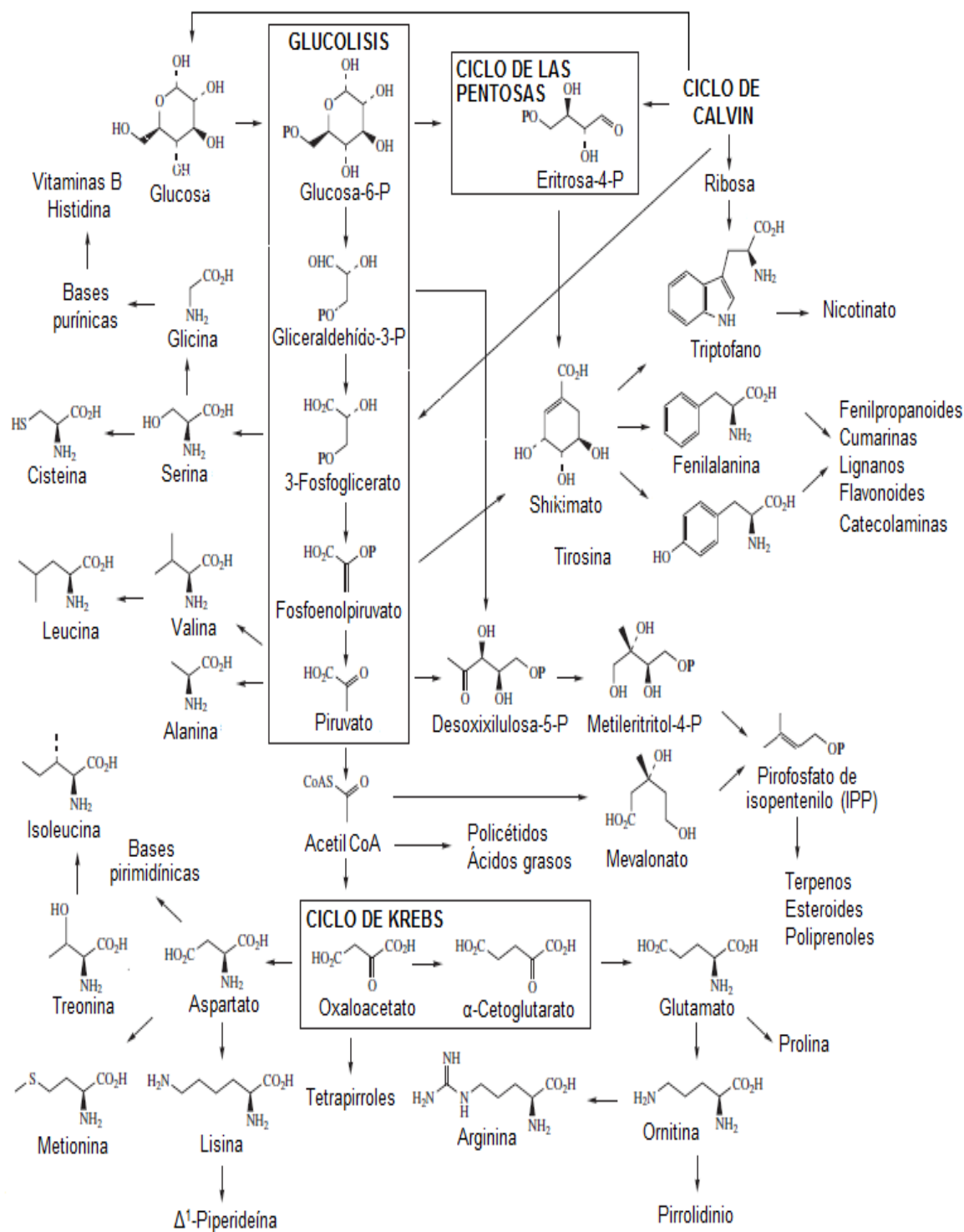
Es importante recordar que las plantas, representan un organismo con una capacidad bioquímica impresionante, pues mediante la fotosíntesis es capaz de producir glucosa y liberar oxígeno al ambiente, esto teniendo como sustrato a sustancias tan simples como el agua y el dióxido de carbono.

El metabolismo de las plantas se divide en dos, metabolismo primario y secundario. Por tanto, existen metabolitos primarios y secundarios. Los metabolitos primarios son compuestos químicos que intervienen como productos finales o intermedios en las rutas anabólicas y catabólicas, desempeñan funciones vitales y son comunes en todos los seres vivos (Butrón, 2008). Por el contrario, los metabolitos secundarios son compuestos químicos sintetizados por los seres vivos, se les considera como no esenciales para la vida, son los responsables de las funciones biológicas, de la coloración, aromas de flores y frutos, de la atracción de polinizadores; o bien como mecanismo de defensa (Imagen 2).

De todos los metabolitos secundarios existentes, se han identificado químicamente 12 000, los cuales son responsables de las propiedades curativas de las plantas (Dewick, 2009).

Los metabolitos secundarios se clasifican en tres grupos, siendo (Véase tabla 1):

1. **Terpenos** (hormonas, pigmentos, aceites esenciales, saponinas y cardiotónicos).
2. **Compuestos fenólicos** (cumarinas, flavonoides, lignina y taninos).
3. **Alcaloides.**
4. **Policetidos** (protaglandinas, antraquinonas, antibióticos, estatinas).
5. **Esteroides** (hormonas sexuales y adrenocorticales, sales biliares).
6. **Shikimatos** (estilbenos, ácidos benzoicos y cinámicos).



**Imagen 2. Origen de algunos metabolitos secundarios (Dewick, 2009)**

Se hizo mención de los compuestos químicos resultantes del metabolismo secundario de las plantas, siendo estos los principales responsables de la actividad medicinal. Sin embargo, es importante hacer referencia a los metabolitos primarios con importancia medicinal asociados a una aglicona del metabolismo secundario, a continuación se hará una breve descripción.

Los **Heterósidos**, son compuestos que al sufrir una hidrólisis originan dos partes, una glicosídica y otra denominada genina o aglicona. De acuerdo a su estructura química, se clasifican en tres grupos:

1. Glucósidos cianogénicos: Efecto sedante en dosis pequeñas, pero tóxico en dosis altas.
2. Antraquinonas: tienen efecto laxante y purgante, con función digestiva, equilibran las funciones del hígado y la vesícula.
3. Antocianinas: ejercen acción antiinflamatoria, antiséptica, anticancérgica y vasoprotectora.

La investigación sobre los metabolitos secundarios de las plantas medicinales, involucra estudios multidisciplinarios, es decir involucra a profesionales de todas las áreas, desde los etnobotánicos y antropólogos para la recolección de la información y de la materia vegetal; los botánicos para la identificación de las especies vegetales; los químicos, en el estudio fitoquímico; el farmacólogo, en la determinación de la toxicidad y los microbiólogos para los estudios antimicrobianos. El resultado de este estudio determinará el futuro de la investigación sobre la especie en específico.

Es importante enfatizar que la producción de metabolitos secundarios, es costosa desde el punto de vista energético, dependiente de las fuentes de energía y de los precursores formados en el metabolismo primario. Además, las rutas metabólicas para la síntesis de los metabolitos secundarios, son activadas en etapas específicas del crecimiento y desarrollo de las plantas. Otra característica importante es la concentración de los metabolitos, pues pueden presentarse incrementos en la síntesis de estos debido a una respuesta inducida por el daño mecánico o por el consumo de alguna parte de la planta por un herbívoro, o por los factores bióticos y abióticos del hábitat.

**Tabla 1. Metabolitos secundarios responsables de la actividad medicinal de las plantas**

Grupo	Descripción general		Actividad	
Terpenos	Grupo mayoritario de metabolitos secundarios, se reportan más de 40 000 moléculas diferentes. De gran importancia comercial debido a su uso medicinal por sus propiedades anticarcinogénicas, antiulcerosas, atimaláricas, antimicrobianas, etc.	Aceites volátiles	Sustancias grasas líquidas, extraíbles a presión en frío o por destilación al vapor,	Antiinflamatoria, estimulante, laxante, sedante y antiséptica. Reduce los niveles de colesterol y son protectores de la piel.
		Saponinas	Glucósidos de tipo triterpénico o esteroidal. Su extracción se realiza en calor o frío, mediada por agua o alcoholes de bajo peso molecular (Etanol, metanol, butanol).	Tienen un efecto expectorante y diurético.
		Glucósidos cardiotónicos	En su estructura, la aglicona es un núcleo esteroideo.	Empleadas en enfermedades cardiacas como arritmia y fallo cardiaco.
Compuestos fenólicos	Metabolitos secundarios que contienen un grupo fenol (anillo aromático con un grupo hidroxilo). Grupo diverso que comprende desde moléculas sencillas, hasta polímeros complejos.	Taninos	Sustancias pertenecientes al grupo de los polifenoles, dan un color amarillo, naranja y rojizo a las plantas y frutos. Unen proteínas entre sí de manera inespecífica	Tienen un efecto astringente y antihemorrágico, reduciendo las inflamaciones y favoreciendo la cicatrización de las heridas.
		Lignina	Polímero con múltiples ramificaciones de fenilpropanoides. Covalentemente unida a la celulosa.	Tienen actividad, antiviral, antimicrobiana, antiparasitaria, antitumoral.
		Cumarinas	Grupo químico con estructura de 2H-1-benzopirano-2-ona, su biosíntesis se da por la vía del ácido Shikímico, a partir de la fenilalanina.	Tienen efecto anticoagulante, venotónico antiespasmódico y antibiótico.
		Flavonoides con esqueleto (C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> ), se clasifican según su isomerización y grado de oxidación del anillo B y C en: Chalconas, flavonas, flavonoles, flavandioles, antocianinas y taninos condensados.	Amplia familia de compuestos, solubles como heterósidos en agua. Su extracción se realiza con disolventes orgánicos de alta polaridad como el etanol.	Su función más destacada es el reforzamiento de capilares, manteniendo una buena circulación sanguínea. Responsables de las propiedades antihemorrágica, diuréticas, antimicrobiana, antiinflamatorias, antivirales, etc.
Alcaloides	Sustancias nitrogenadas.		Acción protectora sobre el hígado y de la acción tonificante.	

Tabla1b. Metabolitos secundarios responsables de la actividad medicinal de las plantas

Grupo	Descripción General		Actividad
Esteroides	Los esteroides se encuentran ampliamente distribuidos en los reinos animal y vegetal; y se les encuentra en forma libre, como ésteres o como glicósidos. Todos contienen un núcleo ciclopentanoperhidrofenantreno y presentan un grupo hidroxilo en el carbono 3.	Colesterol Fitoesterol y ergosterol	Constituyente importante de membranas y precursor de sustancias fisiológicamente importantes (Hormonas, Acidos biliares, Vitamina D, etc.). En levaduras y hongos forma parte de la pared.
Policetidos	Los policétidos son biosintetizados por la polimerización de subunidades acetilo y propionilo en un proceso similar a la biosíntesis de ácidos grasos		Antibióticos policétidos, antifúngicos, citostáticos, anticolesterolémicos, antiparasíticos, promotores del crecimiento animal, e insecticidas naturales.
Shikimatos	El ácido shikímico es precursor de diversos intermediarios metabólicos aromáticos, tales como los taninos, el cloranfenicol, el ácido 4-aminobenzoico, los fenilpropanoides, los lignanos, los aminoácidos aromáticos (tirosina, fenilalanina y triptófano), así como sus derivados: glucósidos cianogénicos aromáticos, amins biógenas aromáticas, catecolaminas, betalainas, melaninas, bisindoles, los flavonoides, las fenazinas y diversos alcaloides tales como los tetrahidroisoquinolínicos, los alcaloides del ergot y los morfínicos, entre otros.		Fijación de nitrógeno en la fotosíntesis, aminoácidos esenciales y no esenciales.

Se ha encontrado una relación entre la concentración de los metabolitos secundarios, su velocidad de crecimiento y el hábitat. Las plantas de lento crecimiento y carentes de nutrientes son las que presenten una concentración elevada de metabolitos secundarios, a diferencia de las plantas de crecimiento veloz y en hábitats ricos en nutrientes (Crawley, 1997). Esto se da gracias a la influencia de los factores ambientales sobre la expresión de los genes responsables de la producción de los principios activos.

## 1.2. Extractos vegetales

Un extracto es una preparación concentrada de consistencia líquida, sólida o intermedia; usualmente obtenido de materia vegetal o animal seca. La composición química que presentan es compleja ya que dependiendo de su naturaleza puede tener tanto metabolitos primarios como secundarios.

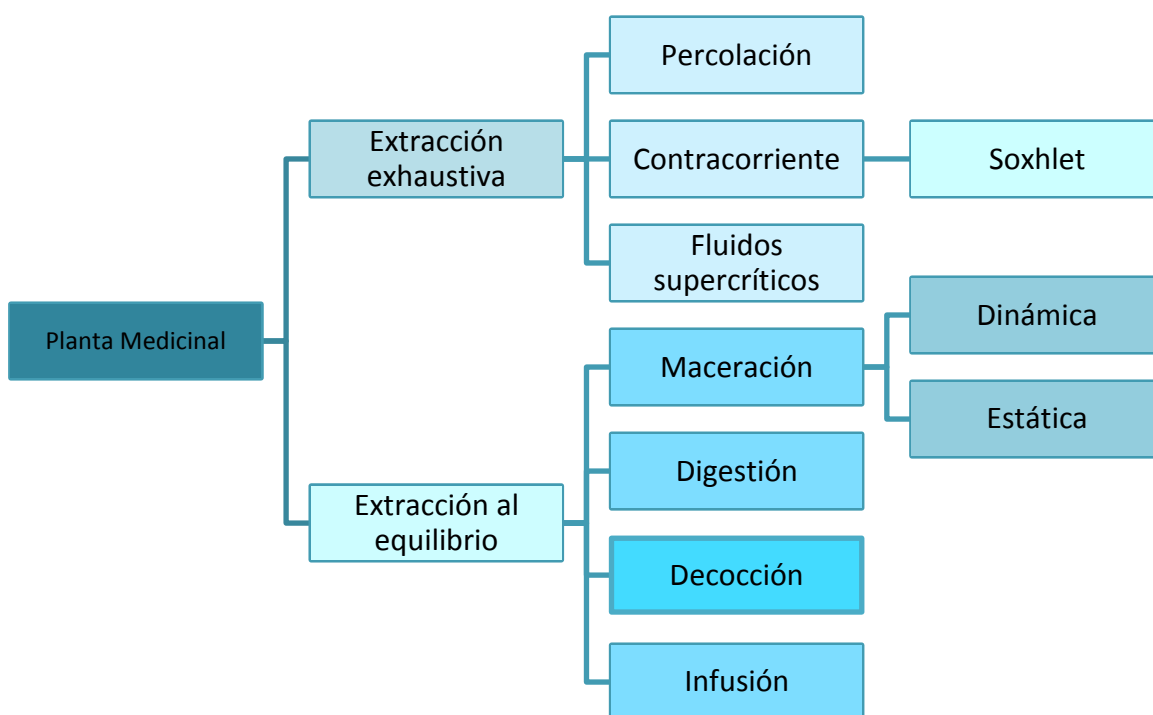
Uno de los primeros pasos para obtener principios activos a partir de plantas es la extracción, éste es un proceso dinámico que involucra diferentes fenómenos físicos y químicos, como humidificación, penetración e hinchamiento. Las sustancias químicas son lixiviadas de las células rotas y difundidas de las intactas

al medio ambiente externo; dependiendo de la afinidad química de las sustancias por el disolvente extractor (M, Da Silva, Cuoto, & Bresolin, 2012).

Existen distintas posibilidades para la obtención de los principios activos, pueden ser extracción a partir de la planta, métodos semisintéticos y biotecnológicos.

Los principales métodos de extracción se clasifican como se muestra en el diagrama 1.

**Diagrama 1. Métodos de extracción de metabolitos secundarios**



### 1.2.1. Fitoquímica

La fitoquímica se ha desarrollado como una disciplina independiente, que relaciona la química de los productos naturales y la bioquímica de la planta. Se interesa por la enorme variedad de sustancias orgánicas que son elaboradas y almacenadas por las plantas, la estructura química de estos compuestos, su biosíntesis, metabolismo, su distribución natural y su función biológica. Siendo el estudio de los metabolitos secundarios un tema de interés para la fitoquímica (Riguelete, 2013).



### 1.2.1.1. Tamizaje Fitoquímico

El tamizaje fitoquímico es una de las etapas iniciales de la investigación fitoquímica, permitiendo determinar presuntivamente los principales grupos químicos presentes en los extractos, para así orientar la investigación de los grupos de interés. El tamizaje consiste en la extracción de la planta con disolventes apropiados y la aplicación de reacciones de coloración y/o precipitación. Debe permitir la evaluación rápida, con reacciones sensibles, reproducibles y de bajo costo. El tamizaje fitoquímico arroja resultados que sólo ayudarán a la orientación, estos resultados deben interpretarse en conjunto con los resultados obtenidos de la evaluación farmacológica/ microbiológica (Nikolai, 2000).

La evaluación farmacológica/microbiológica, que también se le conoce como evaluación hipocrática, es una técnica observacional, cualitativa y semi-cuantitativa, en el cual se usan los resultados verificados como patrón de actividad. Consiste en enfrentar los extractos vegetales a microorganismos o algún otro sistema biológico como lo son las ratas y ratones de laboratorio.

### 1.3. ¿Por qué centrar la atención en los extractos vegetales?

*“Contra cada padecimiento crece una planta”*  
**Paracelso, Siglo XVI**

Gracias a los avances fitoquímicos, se ha logrado el aislamiento de múltiples principios activos de diversas plantas medicinales y como consecuencia se han introducido como fármacos en los sistemas modernos de salud (Senthilkumor & Gurumoorthi, 2005). En los últimos días la comunidad científica de diversos puntos del planeta, se ha dado a la tarea de recuperar toda la información posible que los pobladores puedan otorgarles sobre las plantas medicinales, y con ella emprender estudios etnobotánicos y fitoquímicos, los resultados obtenidos contribuyen a la búsqueda mundial de medicamentos a base de hierbas seguras, además de ayudar a la conservación de las especies vegetales.

El principal objetivo de la búsqueda de principios activos de origen natural se basa en la necesidad de sustituir los antibióticos de origen sintético y semi-sintético, los cuales causan efectos secundarios, algunos de ellos perturban la microflora intestinal humana. Además, las plantas medicinales pueden ofrecer una nueva fuente de agentes antibacterianos para uso externo como: compresas, cataplasmas, gárgaras y ungüentos.

Un estudio, realizado por Newman y Cragg, que analizó el origen de mil trescientas treinta (1330) nuevas entidades químicas, aprobadas como fármacos entre 1981 y 2010; reveló que el 64% tenía alguna relación con los compuestos naturales. Si se incluyen vacunas y biotecnológicos, el porcentaje sube al 71%, y de los 175 nuevos fármacos antineoplásicos aprobados en este periodo, 131 son compuestos naturales o tienen relación con ellos, es decir un 75% (Gordaliza, 2015). Como ejemplo de fármacos derivados de los productos naturales se pueden mencionar al ácido acetilsalicílico, morfina, enalapril, ciprofloxacina, ciclosporina, lovastatina, sinvastatina, entre otros.

### **1.3.1. Los microorganismos y las plantas medicinales.**

*“Que la comida sea tu alimento y el alimento sea tu medicina”*  
**Hipócrates Siglo IV a.C.**

La sensibilidad es la propiedad que tiene una sustancia antimicrobiana, ésta determina si es o no eficaz para eliminar o inhibir un patógeno determinado. Tiempo después de la introducción de las sulfonamidas y de la penicilina, se dio el surgimiento de cepas resistentes, por esta razón los microbiólogos se han dado a la tarea de enfrentar a los microorganismos antimicrobianos, de esta manera se mide la sensibilidad ante una gran variedad de posibles antimicrobianos (Matthew, 2002). Se ha mencionado y recalado, que el uso de las plantas medicinales para el tratamiento de enfermedades data poco antes de la época de los hombres del Neandertal. Pero, cómo han intervenido las plantas medicinales en el tratamiento de enfermedades de origen microbiano. Un ejemplo del uso de los principios activos es el primer antipalúdico, proveniente de la planta *Chinchona officinalis* y el principio activo quinina. De los 12, 000 metabolitos aislados de organismos

vegetales se estima que el 10% de ellos tienen cierta actividad frente a los microorganismos. En realidad se conoce poco el porqué de la existencia de estos metabolitos, existen teorías, una de ellas menciona que estos compuestos tienen diferentes funciones y que de manera accidental aportan poder antimicrobiano o que realmente tienen como función, actuar como antimicrobiano (Domingo, 2003). En la tabla 3 se presentan ejemplos de grupos químicos que tienen actividad antimicrobiana.

**Tabla 2. Grupos químicos más importantes con actividad antimicrobiana obtenidos de plantas. (Domingo, 2003).**

Grupo químico	Compuesto	Planta	Actividad
<b>Fenoles simples</b>	Timol	<i>Thymus officinalis</i>	General
	Ácido antémico	<i>Matricaria chamomilla</i>	<i>S. aureus</i> <i>S. thyphimurium</i>
<b>Taninos</b>		<i>Quercus rubra</i>	Bacterias y virus
		<i>Eucalyptus globulus</i>	virus
<b>Quinonas</b>	Hipericina	<i>Hypericum perforatum</i>	VIH
<b>Cumarinas</b>		<i>Matricaria chamomilla</i>	Virus
<b>Flavonoides</b>	Catequina	<i>Camellia sinensis</i>	<i>Shigella, Vibrio, S. mutans</i>
	Isoflavona		<i>Achistosoma</i>
	Quercetina		
<b>Alcaloides</b>	Coca	<i>Erythroxylum coca</i>	Cocos gram positivos
	Piperina	<i>Piper nigrum</i>	Hongos, lactobacillus
	Mescalina	<i>Lophophora williamsii</i>	General

Sin duda alguna existe un gran número de sustancias naturales que poseen cierta actividad frente a los microorganismos; sin embargo, sólo un pequeño porcentaje muestra actividad suficiente para ser empleados en clínica.

En tabla 3 se muestran algunas de las aplicaciones microbiológicas de los principios activos de distintas especies vegetales.

**Tabla 3. Aplicaciones microbiológicas de extractos vegetales**

Microorganismo o padecimiento	Metodología	Resultado
<b>Tratamiento del impétigo (agentes causales: <i>S. aureus</i> y <i>S. pyogenes</i>)</b>	Se comparó la efectividad del tratamiento convencional (frameticina más gramicidina en un grupo, y cefalexina en otro) contra la efectividad de preparaciones de té negro ( <i>Thea sinensis</i> ).	Obteniendo resultados de mejoría en el caso de los tratamientos con fármacos un porcentaje superior al 70%, contra un 31% de efectividad con el Té negro (Domingo, 2003).
<b><i>Enterococcus fecalis</i></b>	Efecto antibacteriano del aceite esencial de manzanilla ( <i>Matricaria chamomilla</i> ) a distintas concentraciones contra <i>E. fecalis</i> .	Obteniendo resultados óptimos desde una concentración al 50% del aceite esencial (Linares, 2012).
<b>Acné</b>	Se comparó la eficacia del aceite de <i>Ocimum gratissimum</i> contra el peróxido de benzoilo.	Siendo más activo el aceite que el peróxido de benzoilo (Orafidiya & Agbani, 2002)
<b>VIH</b>	Se han empleado compuestos que actúan sobre la transcriptasa inversa, como el ácido cafeico del <i>Hyssop officinalis</i> , la glicirricina del regaliz ( <i>Glycyrrhiza glabra</i> ) o una proteína del cactus <i>Opuntia streptacanth</i> ; compuestos inhibidores de la integrasa, como la quercetina, un flavonoide presente en el <i>Quercus rubra</i> ; inhibidores de la proteasa al ácido carnosílico, del romero.	Muchos de estos compuestos inhiben el virus a concentraciones lo suficientemente pequeñas como para poder ser utilizados (Bedoya, Palomino, Abad, & Bermejo, 2002)
<b><i>Staphylococcus intermedius</i>, <i>Streptococcus</i> sp, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Proteus mirabilis</i></b>	Se emplearon Caléndula ( <i>Calendula officinalis</i> ) tinturas a diversas concentraciones contra el tratamiento de otitis en canes.	Se comprobó de forma <i>in vitro</i> , el efecto antimicrobiano en diferentes concentraciones de la tintura de Caléndula sobre las principales cepas de bacterias, utilizando aislamientos de <i>Staphylococcus intermedius</i> , <i>Streptococcus</i> sp, (Granados, 2015) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Proteus mirabilis</i> , provenientes de muestras clínicas de perros con patología de oído.

## 1.4. Género *Tagetes* en México

En la actualidad, la clasificación de los seres vivos está fundamentada en las relaciones evolutivas entre las distintas especies de organismos, a lo que se le da el nombre de la filogenia (Gamma, 1997). Los grupos taxonómicos se ordenan de mayor a menor, siendo el primero el reino y el último, la especie (Barrera, 2008).

En la tabla 4 se presenta clasificación, del género *Tagetes*.

**Tabla 4.** Clasificación taxonómica del género *Tagetes*

Reino:	<b>Plantae</b>
División:	<b>Magnoliophyta</b>
Clase:	<b>Magnoliopsida</b>
Orden:	<b>Asterales</b>
Familia:	<b><i>Asteraceae</i></b>
Subfamilia:	<b><i>Asteroideae</i></b>
Tribu:	<b><i>Tageteae</i></b>
Género:	<b><i>Tagetes</i></b>
Especie:	<b><i>T. spp</i></b>

La Familia *Asteraceae* originada hace 65 millones de años, es endémica del Continente Americano. México es importante centro de origen y diversidad de tribus, subtribus, géneros y especies de esta familia botánica aportando alrededor del 30 % de la diversidad de *Asteraceae*, y donde con gran dinamismo, cada vez se incorporan taxones. El género *Tagetes* pertenece a la tribu *Tageteae* y hasta ahora se han referido 56 especies distribuidas en América del Norte, del Sur y Sudamérica; cerca de 24 a 28 de ellas se encuentran en México, pero el conocimiento en tales especies se puede calificar como escaso y disperso. Por el número de especies de *Tagetes* se ha planteado que México es centro de origen y diversidad (Serrato, 2010)

Existen dos fuentes históricas importantes que ilustran sobre el uso y conocimiento de algunas especies del género *Tagetes* en la época prehispánica: Historia General de la Nueva España de Fray Bernardino de Sahagún e Historia Natural de la Nueva España del protomédico Francisco Hernández, obras escritas en el siglo XVI. Fue el grupo náhuatl del centro de México quien heredó y dejó patente en las obras de Sahagún y de Hernández los principales antecedentes de

ellas. Con los nombres de *yiahutli*, *cempoalxochitl* (Imagen 3), *macuilxochitl*, *tzitziquilitl*, *tepecempoalxochitl* (Sahagún, 1999), *tlapalcozatli*, *oquichtli*, *tlapaltecacayatli* y *zacaxochitlcoztic* (Hernández, 1959) los náhuatl mesoamericanos identificaron diferentes especies y variedades de *Tagetes*, todas plantas aromáticas (Serrato, 2009).



**Imagen 3. Flor de Cempoalxochitl  
(Andraca, 2012)**

La SAGARPA en el 2009, reportó 30 especies diferentes de *Tagetes* en México, dos variedades, por definir varias categorías infraespecíficas y potencialmente nuevas especies.

En México, las especies de *Tagetes* pueden ser herbáceas o anuales (*circa* 60%) o perennes (*circa* 40%). En todas las regiones de México se encuentran las especies de *Tagetes*, pero no todas se distribuyen en las mismas regiones ni en los mismos estados. Resulta claro, que la diversidad de especies en México de *Tagetes*, lo ubica como centro de origen y diversidad de *Tagetes* en el mundo, o al menos como un centro de radiación evolutiva del género (Serrato, 2009).

El códice Florentino ilustra los principales usos de las especies del género *Tagetes*, de los cuales resaltan, el uso ceremonial y medicinal (Estrada, 1989). En la tabla 5, se describen algunas plantas pertenecientes al género *Tagetes* y su uso.

**Tabla 5. Algunas especies del género *Tagetes* y su uso medicinal**

<i>Tagetes</i>	Usos
<i>T. coronopifolia</i>	En el centro y sur de México, se emplea como infusión contra la tos y dolor de pecho.
<i>T. erecta</i>	Ornamental, teñir telas, lana e hilos. Contra el dolor de estómago, parásitos intestinales, empacho, diarrea, cólicos, afecciones hepáticas, bilis, vómito, indigestión, dolor de muelas, lavados intestinales, expulsión de gases; contra enfermedades de tipo respiratorio, para el dolor de cabeza, afrodisiaco, aperitivo, carminativo, diaforético, diurético, relajante muscular, rituales religiosos, estimulante.
<i>T. micrantha</i>	Se usa el cocimiento de la planta para cólicos y dolores de estómago y como saborizante de alimento

#### 1.4.1. *Tagetes nelsonii* Greenm

*Tagetes nelsonii* Greenm, es una especie del género *Tagetes*, endémica de los Altos de Chiapas. Comúnmente es conocida por los indígenas chiapanecos como “Chilchagua”, aunque se reportan otros nombres comunes como “Chik chawa” o “Caldex”, éste último nombre lo reporta en Chihuahua el Señor Ellis Wongs (WONGS, 2015).

*T. nelsonii* Greenm, es una hierba anual de la familia *Asteraceae*, de porte erecto, alcanza hasta 1.5 m de altura; presenta hojas lanceoladas, flores color amarillo, correspondientes a las flores de la familia *Asteraceae* o *Compositae*. Las flores de esta familia, se caracterizan por una inflorescencia

denominada capítulo (formada por flores sésiles sobre un receptáculo común, rodeadas por un involucre de brácteas o filarios) (Cabrera, y otros, 2002). Esta descripción puede ser observada en las imágenes 4 y 5, donde se muestra un ejemplar de la Chilchagua.



**Imagen 4. Chilchagua**  
(Imagen tomada por Edith Díaz, Chiapas, México)



**Imagen 5. Flor de Chilchagua**  
(Imagen tomada por Edith Díaz, en Chiapas, México).

La taxonomía completa de esta especie se presenta en la tabla 6:

**Tabla 6. Clasificación taxonómica de *Tagetes nelsonii* Greenm**

Reino:	<b>Plantae</b>
División:	<b>Magnoliophyta</b>
Clase:	<b>Magnoliopsida</b>
Orden:	<b>Asterales</b>
Familia:	<b><i>Asteraceae</i></b>
Subfamilia:	<b><i>Asteroideae</i></b>
Tribu:	<b><i>Tageteae</i></b>
Género:	<b><i>Tagetes</i></b>
Especie:	<b><i>T. nelsonii</i></b> Greenm

Los pobladores indígenas de San Cristóbal de las Casas, Chiapas, México; han referido el uso de esta planta para el tratamiento de enfermedades de tracto digestivo, como lo son: dolor de estómago, diarreas, también mencionan su empleo contra infecciones como la salmonelosis, además de emplearla para desparasitar, limpiar el riñón, alivio de dolor de cabeza y fiebres (Díaz E, 2015).



## 1.5. Los bichos.

### 1.5.1. *Staphylococcus aureus*

*Staphylococcus aureus* es un microorganismo de gran importancia médica, pertenece a la familia *Micrococcaceae*, género *Staphylococcus*, el cual contiene más de 30 especies diferentes y muchas de éstas son habitantes naturales de la piel y de las mucosas del hombre.

Es un coco Gram (+) (Imagen 6), no móvil, en pares, en cadenas cortas o en racimos. Son cocos anaerobios facultativos, no esporulan; su metabolismo es oxidativo/fermentativo, catalasa positivo y puede metabolizar una gran variedad de carbohidratos en condiciones aeróbicas (UNAM, 2016).

*S. aureus* posee un alto grado de patogenicidad y es responsable de una amplia gama de enfermedades. Produce lesiones superficiales de la piel y abscesos localizados en otros sitios. Causa infecciones del sistema nervioso central e infecciones profundas como osteomielitis y endocarditis, también causa infecciones respiratorias como neumonía, infecciones de vías urinarias y es la principal causa de infecciones nosocomiales (Hamdan, 2006).

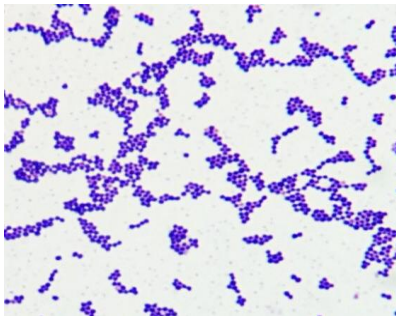


Imagen 6. Tinción Gram de *Staphylococcus aureus* (40X)  
Imagen tomada en el laboratorio 17 de la UIM, FESC-UNAM (2015).

### 1.5.2. *Escherichia coli*

*Escherichia coli*, pertenece a la familia *Enterobacteriaceae* que constituye un grupo grande y heterogéneo de bacterias Gram negativas. Son bacterias ubicuas, encontrándose de forma universal en el suelo, agua y vegetación; además es una bacteria habitual en el intestino del ser humano y de otros animales de sangre caliente (Mateos, 2011).

Las características microbiológicas de *E. coli* se muestran en la tabla 8:

Tabla 7. Características microbiológicas principales de *E. coli*  
(Mateos, 2011) (Toledo, 1980)

Prueba	Interpretación
<b>Gram</b>	Bacilos Gram (-)
<b>Catalasa</b>	(+)
<b>Oxidasa</b>	(-)
<b>Motilidad</b>	(+)
<b>O/F (Oxidación- fermentación)</b>	Facultativo
<b>Nitratos</b>	(+)
<b>Glucosa</b>	(+)
<b>Lactosa</b>	(+)
<b>Arabinosa</b>	(+)
<b>RM</b>	(+)
<b>VP</b>	(-)
<b>KCN</b>	(-)
<b>Citrato</b>	(-)
<b>Acetato</b>	(+)
<b>Ureasa</b>	(-)
<b>H<sub>2</sub>S</b>	(-)
<b>Fenilalanina</b>	(-)
<b>Indol</b>	(+)
<b>Lisina</b>	(+)

La infección por *E. coli* se transmite generalmente por consumo de agua o alimentos contaminados, como productos cárnicos poco cocidos y leche cruda.

Los síntomas de la enfermedad incluyen cólicos y diarrea, que puede ser sanguinolenta. También pueden aparecer fiebre y vómitos. La mayoría de los pacientes se recuperan en el término de 10 días, aunque en algunos casos la enfermedad puede causar la muerte (OMS, 2016).

### 1.5.2. *Candida albicans*

El Género *Candida* comprende más de 150 especies, cuya principal característica es la ausencia de forma sexual, con excepción de algunas especies micóticas. Solamente una docena de las especies pertenecientes al Género *Candida* poseen la facultad de adaptarse a una temperatura de 37°C., y pueden ser

ocasionalmente patógenas para el hombre, éstas son entre otras: *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. kefyr (pseudotropicalis)*, *C. krusei*, *C. guilliermondi*, *C. parakrusei*, *C. zeylanoides*, *C. stellatoidea* y *C. brumptii*.

*C. albicans* suele presentarse como una célula oval levaduriforme de 2 a 4 micras, con paredes finas; sin embargo, en tejidos infectados también se han identificado formas filamentosas de longitud variable, con extremos redondos de 3 a 5 micras de diámetro y pseudohifas, que son células alargadas de levadura que permanecen unidas entre sí.

Las especies de *Candida* crecen bien en medios de cultivo con agar, peptona, dextrosa, maltosa o sacarosa. Las colonias muy pequeñas aparecen en un lapso de 24 a 36 horas en Agar Sabouraud y miden de 1,5 a 2 mm de diámetro después de 5 a 7 días. Las colonias son típicamente blancas por completo, pero adquieren un color crema o requemado al continuar envejeciendo.

**Tabla 8. Pruebas Bioquímicas de *Candida albicans*.**

<i>Candida albicans</i>		
	Seudomicelio	+
	Micelio y Clamidoconidias	+
	Filamentación en suero a 37°C	+
	Actidiona	+
<b>Auxonograma</b>	Glucosa	+
	Maltosa	+
	Sacarosa	+
	Lactosa	+
	Galactosa	+
	Rafinosa	-
	Inositol	-
	Celobiosa	-
	Xilosa	-
	Trehalosa	+
<b>Zimograma</b>	Glucosa	+
	Maltosa	+
	Sacarosa	+
	Galactosa	+/-
	Rafinosa	-

Pruebas correspondientes para la identificación de especies del Genero *Candida*, además de las pruebas bioquímicas: Auxonograma = medio sintético con peptona y sin carbohidratos, Zimograma = medio peptonado, indicador pH, anaerobio, Actidiona + = resistente, Actidiona - = sensible, V = variable. (Bonifaz, 2012, López 2012)

## 1.6. Antimicrobianos comerciales vs. Naturales.

### 1.6.1. Gentamicina

Antibiótico aminoglucósido (Imagen 7) de uso parenteral, producido por un actinomiceto, el *Micromonospora purpurea*, tiene acción sobre bacterias Gram-positivos y Gram-negativos (ANMAT, 2016).

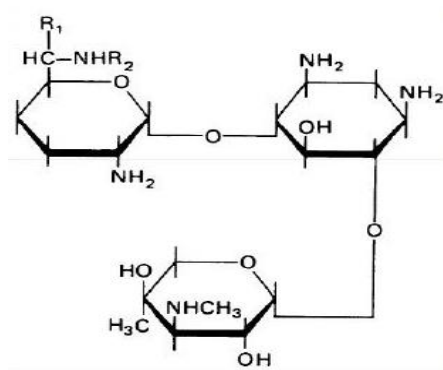
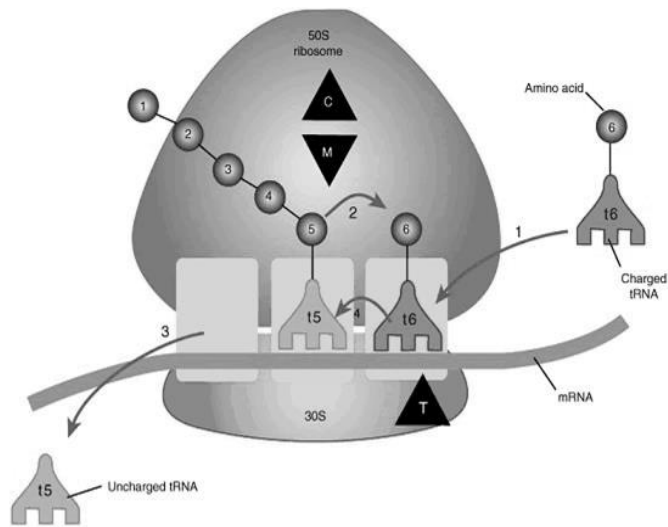


Imagen 7. Estructura Química de la Gentamicina (UNAM, Gentamicina, 2016)

Los microorganismos susceptibles a Gentamicina son *Pseudomonas aeruginosa*, especies de *Proteus*, *Escherichia coli*, especies de *Klebsiella-Enterobacter-Serratia*, especies de *Citrobacter* y *Staphylococcus* (UNAM, Gentamicina, 2016).

Se utiliza en el tratamiento de sepsis neonatal, septicemia, infecciones del sistema nervioso central (SNC), infecciones urinarias, respiratorias, gastrointestinales, y en infecciones en huesos, piel y de tejidos blandos (IMSS, 2015). Es un antibiótico bactericida que actúa a nivel de ribosomas alcanzando el citoplasma bacteriano para poder ejercer su acción. Atraviesa la membrana externa mediante porinas por un proceso pasivo y se difunde a través de la membrana celular en contra de un gradiente de concentración, logrando grandes concentraciones del antibiótico en el citoplasma. A nivel ribosomal se une a la unidad 30s en las proteínas s12, s3, s4 y s5 y bloquea el inicio de la síntesis proteica al fijar el complejo 30s-50s al codón de inicio del RNA mensajero. En la imagen 8 se ilustra el mecanismo de acción de los algunos antibióticos como la gentamicina (Rendón, 2010).



**Imagen 8. Mecanismo de acción de la Gentamicina (Rendón, 2010)**

### 1.6.2. Anfotericina B

Anfotericina B, es un antifúngico polieno, descubierto en la década de los 50 como producto de la bacteria *Streptomyces nodosus*, es el fármaco de elección en la mayoría de las infecciones micóticas que amenazan la vida en pacientes inmunocomprometidos (ANMAT, 2016).

La estructura química de la Anfotericina B, es un macrólido heptaeno. La molécula está formada por una porción hidrófila de varios carbonos hidroxilados, una Porción hidrófoba que consta de siete átomos de carbono unidos por dobles enlaces y una cadena lateral de micosamina que es un aminodesoxihexosa. Se comporta como fungicida o fungistático dependiendo de la sensibilidad del hongo y de la concentración alcanzada (Thompson, 2002).

Mecanismo de acción: Se fija a los esteroides de la membrana de las células eucariotas pero no de los procariontes. Es mayor su afinidad por el ergosterol de los hongos que por el colesterol de las células de mamíferos. Resultando una alteración en la estructura de la membrana, por la formación de poros compuestos de pequeños agregados de anfotericina B y esteroides. Estos poros generan una despolarización de la membrana y un aumento de la permeabilidad para protones y cationes monovalentes (Imagen 9) (Montejo, 2006).

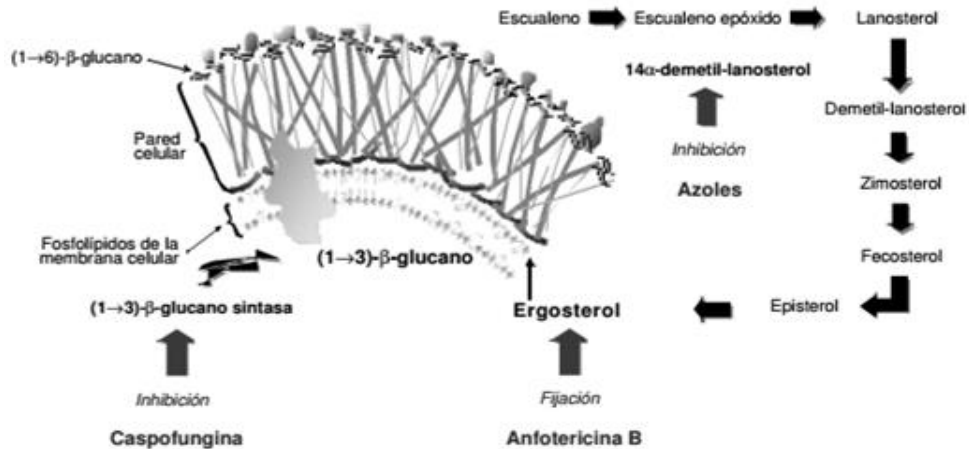


Imagen 9. Mecanismo de acción de Anfotericina B (Montejo, 2006)

### 1.6.3. Metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana.

Como parte de la respuesta química contra el daño que ocasiona el ataque de microorganismos patógenos en las plantas superiores, se induce la síntesis y acumulación de metabolitos secundarios. Durante la respuesta hipersensible, algunos compuestos pertenecientes a los grupos de los alcaloides, terpenoides y flavonoides, participan eliminando al microorganismo o restringiendo su invasión.

En vista de que la lista de metabolitos secundarios puede ser muy amplia, se hará una descripción del mecanismo de sólo tres grupos los terpenoides, alcaloides y flavonoides.

- **Terpenoides.** El mecanismo de acción propuesto para este grupo de metabolitos es la ruptura de la membrana celular, mediante tres posibles vías aumentando la permeabilidad de la membrana a iones pequeños, afectando la estabilidad estructural de la membrana y desestabilizando el empaquetamiento de la bicapa lipídica (Maguna, 2006)
- **Alcaloides.** la interacción de los alcaloides con el DNA, las proteínas y enzimas de la transcripción, contribuyen a los efectos aleloquímicos y tóxicos contra bacterias, hongos y virus (Sepúlveda, 2003) .
- **Flavonoides.** Tienen la capacidad de generar complejos con proteínas extracelulares y proteínas solubles, así como una actividad sobre la pared celular muy similar a la de las quinonas. Además, los flavonoides lipofílicos pueden dañar la integridad de la membrana celular (Fuertes & Roque, 1997).

## **2. Objetivos**

### **2.1. Objetivo general**

- Determinar la actividad antimicrobiana de los extractos vegetales de *Tagetes nelsonii* Greenm, a través de un ensayo microbiológico, para comprobar la acción microbicida de esta planta medicinal en etapas fenológicas extremas.

### **2.2. Objetivos particulares**

- Obtener por donación el material vegetal a emplear.
- Seleccionar el método de extracción adecuado para la obtención de los extractos vegetales y del aceite esencial.
- Realizar la preservación de los extractos vegetales y del aceite esencial.
- Realizar la determinación del MIC con diferentes microorganismos.

### **3. Metodología**

La siguiente investigación es de carácter totalmente experimental, comprendiendo la aplicación de un método microbiológico, para determinar la actividad antimicrobiana de los extractos vegetales y el aceite esencial de *Tagetes nelsonii* Greenm.

La metodología está dividida en (ver diagrama 2):

1. Tratamiento de la materia prima vegetal: Chilchagua.
2. Extracción y conservación de los extractos vegetales de la Chilchagua.
3. Ensayo microbiológico: Determinación de la MIC.

#### **3.1. Tratamiento de la materia prima Chilchagua**

##### **3.1.1. Colecta de la materia prima**

El material vegetal empleado para este trabajo, se obtuvo por la donación de la Q. Edith Díaz, quien recolectó la Chilchagua en la comunidad de San Cristóbal de las Casas, Chiapas, México. El 21 de Diciembre de 2014.

##### **3.1.2. Herborización e identificación del material biológico**

Obtenida la materia prima, se prosiguió a realizar la herborización; para ello, se colocó un ejemplar completo (hojas, tallo, flores y raíz) de Chilchagua entre dos hojas de papel secante. Una vez perfectamente herborizada, se llevó a identificar al Herbario Etnobotánico IZTA de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM.

##### **3.1.3. Material extraño**

Las materias primas vegetales deben inspeccionarse y seleccionarse antes de su procesado primario. Esto con referencia a las características macroscópicas del material vegetal, se debe realizar una inspección y separación de todo aquel material presente que no cumpla con las especificaciones que marca la



descripción botánica (WHO, 1998). La inspección puede comprender los siguientes componentes (WHO, 2003):

- Inspección visual para detectar la contaminación cruzada por plantas o partes de plantas medicinales diferentes de la deseada;
- Inspección visual para detectar la presencia de materia extraña;
- Evaluación organoléptica de aspectos como la apariencia, los daños, el tamaño, el color, el olor, y posiblemente el gusto.

#### **3.1.4. Parte utilizada de la planta**

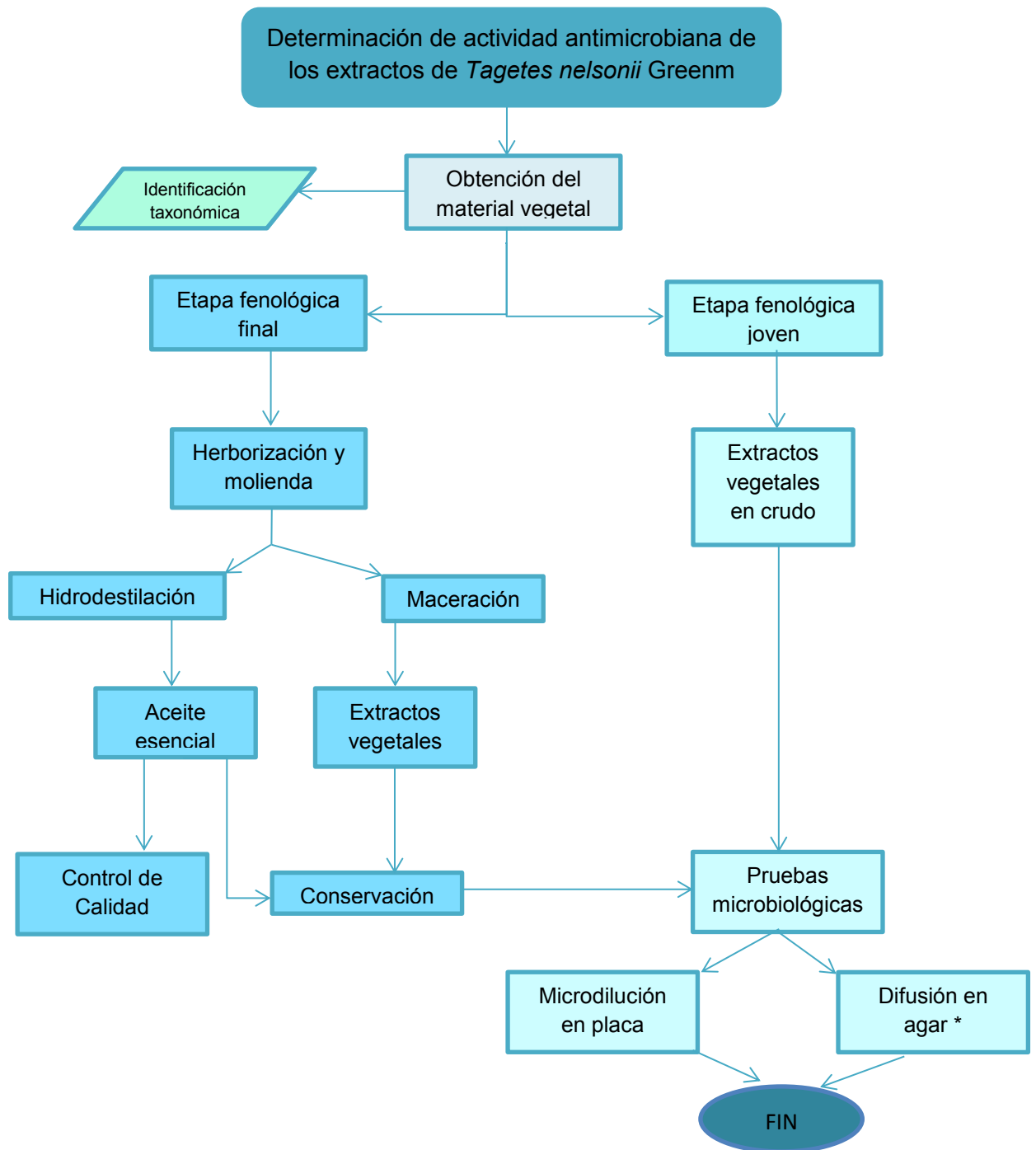
Para la obtención de los extractos vegetales de Chilchagua, se hizo uso de la parte aérea. Es importante mencionar que la materia vegetal se obtuvo a etapas fenológicas extremas, obteniendo lo siguiente:

- **Etapa longeva de floración**, extractos en Hexano, Acetato de Etilo y EtOH/H<sub>2</sub>O; además del aceite esencial de Chilchagua. Estos extractos y aceite se emplearon en los métodos microbiológicos: Microdilución en placa y difusión en agar.
- **Etapa joven de floración**, se obtuvieron extractos en crudo con diferentes disolventes como metanol, etanol y agua a diferentes concentraciones. Con ellos se realizó el método de microdilución en placa.

#### **3.1.5. Desección a la sombra**

El contenido de humedad de las materias vegetales medicinales preparadas para su uso en forma seca debe mantenerse lo más bajo posible, con el fin de reducir los daños ocasionados por mohos y otros tipos de infestación por microbios (WHO, 2003). Por tanto, se colocó a los ejemplares en disposición de capas delgadas entre papel secante. Se secó a temperatura ambiente, protegiendo de la luz solar y el polvo a la materia prima (Villar del Fresno, 1999).

Diagrama 2. Diagrama general de trabajo



\*Esta prueba sólo se realizó con los extractos y el aceite esencial de la Chilchagua en etapa fenológica final.

### **3.1.6. Molienda**

Para obtener mejores resultados en la extracción se recomienda llevar a molienda la materia prima, esto para que la superficie de contacto entre ella y el disolvente, sea mayor. La molienda se realizó con ayuda de un molino de café marca Moulinex MR, se colocó muestra vegetal y se muele por 3 minutos. Por último se pasó por un tamiz de malla número 40. Se guardó en un recipiente que proteja a la materia de la luz, se etiquetó y se guardó para su posterior empleo.

### **3.1.7. Obtención de extractos vegetales por maceración de la Chilchagua**

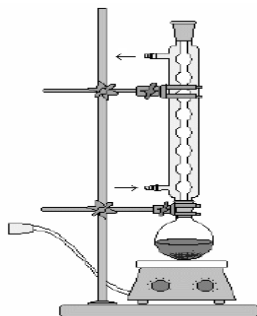
Los extractos de la planta medicinal Chilchagua, se obtienen por maceración, empleando la siguiente metodología:

1. Se pesaron 100g del material vegetal perfectamente seco, molido y tamizado en malla no. 40.
2. En un matraz tipo bola de 2L, se colocó la materia prima y 1L de disolvente (Hexano, Acetato de Etilo y/o EtOH/Agua). Se protegió de la luz y se dejó macerando por 24 h. El macerado se colocó en agitación (ver imagen 9).
3. Pasadas las 24 h de maceración, se separó el marco del extracto. Se centrifugó 10 minutos a 2500rpm, obteniendo por decantación el extracto.
4. Se concentró el extracto con ayuda del rotavapor a temperatura de 22-25 °C con una rotación de 90 rpm.
5. Se realizó por duplicado los puntos del 2 al 4, por cada disolvente empleado.
6. Una vez concentrado el extracto se dispensó en viales color ámbar para su conservación.

La extracción se realizó por gradiente de polaridad, iniciando con un disolvente no polar y finalizando con un disolvente polar. En este caso los disolventes empleados fueron: Hexano, Acetato de Etilo y Etanol/Agua [50:50]. Se mantienen condiciones de temperatura ambiente (25°-30°C) y evitando la exposición de la muestra a la luz.

Los extractos obtenidos se filtraron y llevaron a sequedad, para determinar la cantidad de extracto obtenido por gradiente de polaridad, el cual se emplea para plantas medicinales cuyo contenido químico no ha sido determinado (WHO, 1998). Como resultado de este proceso se obtuvieron tres extractos: el extracto Vegetal

Hexánico, extracto vegetal con Acetato de Etilo y el extracto vegetal hidroalcohólico (Imagen 10).



**Imagen 10. Equipo de maceración**

(Camacho, 2015)

### **3.1.8. Análisis Fitoquímico Preliminar**

Este análisis tiene como objetivo el determinar de manera presuntiva los principales grupos químicos que presenta una planta, para ello se requirió de la obtención de extractos los cuales se pusieron en contacto con diferentes reactivos químicos, se observaron las reacciones de coloración y/o precipitación, con ello se determinó la presencia o ausencia de los metabolitos. Para esta parte la obtención de los extractos se realizó como se describió en el punto anterior, modificando la cantidad de materia empleado, que en este caso fueron 5g.

El Análisis Fitoquímico Preliminar se dividió en cuatro etapas que se desarrollan a continuación (ver anexo 2):

#### **3.1.8.1. Materia vegetal seca**

Al material vegetal seca se le realizó la prueba Guignard, para ello se pesó 1 g de material vegetal seco, se colocó en un matraz pequeño, se humedeció con agua destilada. Con ayuda de un tapón de goma se selló, colocando en el interior, una tira de papel filtro previamente impregnada con reactivo de Guignard. El matraz una vez sellado se colocó en baño María, por 10 minutos. Se observó el cambio de coloración de amarillo a rojo-rosa, este color indica presencia de glucósidos cianogénicos (véase tabla 18).

### **3.1.8.2. Extracto vegetal Hexánico**

El extracto vegetal hexánico se concentró a seco para posteriormente realizar las pruebas químicas: Dragendorff, Lieberman-Buchard, Börntrager, Baljet y Sudán (Véase tabla 19).

### **3.1.8.3. Extracto vegetal con el disolvente Acetato de Etilo**

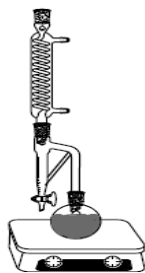
El extracto vegetal con Acetato de etilo se concentró a seco para posteriormente con una fracción del extracto realizar las pruebas químicas: Fehling, Rosenthaler, Cloruro férrico, Baljet, ninhidrina y espuma. Una vez terminadas estas pruebas, el resto del extracto se aciduló y se filtró, al residuo se le hacen las pruebas: Börntrager y Lieberman-Buchard; al filtrado se le realizaron las pruebas: Dragendorff, Ácido Silicotungstico y Hager. Posterior a ello, al filtrado, se colocó en un embudo de separación con 10 mL de cloroformo, obteniendo la fase acuosa y la fase orgánica, esto se realizó por duplicado. A la fase acuosa se le realizaron las pruebas de Shinoda y Amoniaco; a la fase orgánica se le hicieron las pruebas Shinoda, Börntrager y Baljet (Véase tabla 20 y 21).

### **3.1.8.4. Extracto vegetal con mezcla hidroalcohólica**

El extracto vegetal hidroalcohólico se concentró a seco para posteriormente realizar las pruebas químicas: Dragendorff, gelatina, Kedde, Baljet, cloruro férrico, Shinoda, espuma, Fehling y Sudán (Véase tabla 22).

### **3.1.9. Obtención de Aceite esencial**

El aceite esencial de la Chilchagua, se obtuvo por hidrodestilación, la metodología empleada fue la siguiente, se pesaron aproximadamente 100g de materia vegetal, previamente seca y molida, se colocó en un matraz bola de 3L, al cual se le adicionaron 1.5L de agua destilada. Se montó un equipo de Hidrodestilación adaptado con una trampa tipo Clevenger (Imagen 11). Se calentó con ayuda de una parrilla, una vez iniciada la destilación se tomó el tiempo (3-4 h). Cuidando la temperatura y la exposición de la muestra a la luz.



**Imagen 11. Equipo de Hidroddestilación adaptado con una trampa de Clevenger**

(Camacho, 2015)

El aceite se obtuvo al separarlo de la mezcla aceite-agua por diferencia de densidades, esto se realizó directamente de la trampa de Clevenger.

### **3.1.9.1. Control de calidad del aceite esencial**

El control de calidad comprendió las siguientes etapas:

#### **3.2.5.1.1 Pruebas sensoriales**

Estado físico: Estado de agregación de la muestra.

Color: Se empleó el modelo RGB

Olor: Para eliminar el factor subjetividad se utilizaron los criterios propuestos por Etaio en su Guía para la evaluación sensorial de la calidad de los vinos tintos de Rioja Alavesa: vinos jóvenes y vinos con crianza en bodega. (2007)

- ✓ Afrutado: con aroma a frutas. Frutos rojos (grosella negra, cereza o frambuesa) para vinos tintos y otros (durazno, damasco o cítricos) para vinos blancos.
- ✓ Animal: vino tinto que presenta un bouquet de cuero, musgo, caza.
- ✓ Balsámico: incienso, alcanfor, resina, pino, vainilla.
- ✓ Empireumático: pan tostado, café ahumado, tabaco, cacao.
- ✓ Especiado: con olores a especias (regaliz, canela, pimienta, clavo de olor, nuez moscada).
- ✓ Floral: con perfume de flores (rosa, violeta).
- ✓ Maderizado: posee un olor particular producto de su crianza en barricas de roble.
- ✓ Vegetal: hierba, hoja, maleza, humus, heno cortado, pimiento morrón.

### 3.2.5.1.2 Pruebas físicas

#### 1. Densidad relativa

Para este apartado, se emplea el principio del método de picnómetro (NMX-F-075-SCFI, 2012). O bien utilizando matraces volumétricos de 1mL, esto debido al poco o bajo rendimiento de los aceites esenciales.

#### 2. Infrarrojo

La espectroscopia se determinó en un espectrofotómetro de infrarrojo, modelo Nicolet iS10FT con punta de diamante, en la que se colocó una fracción de la muestra sin dilución, obteniendo un infrarrojo para su interpretación.

### 3.1.10. Conservación de extractos vegetales y Aceite esencial

Para asegurar en lo posible la viabilidad de los extractos vegetales y el aceite esencial, se realizó el siguiente tratamiento:

..

#### ➤ **Extractos con Hexano y Acetato de Etilo como disolventes.**

1. Una vez concentrados los extractos, se dispensaron en viales ámbar, se dejó evaporar por completo el disolvente. Esto para lograr sequedad del extracto.
2. Sellar los viales con tapa de goma y ayuda de parafilm.
3. Se introdujo atmósfera de nitrógeno.
4. Se conservó en congelación de  $-20^{\circ}\text{C}$ , hasta su uso.

### ➤ **Extractos Hidroalcohólicos**

1. Una vez concentrados los extractos, se dispensaron en viales ámbar.
2. Se liofilizó.
3. Se introdujo atmósfera de nitrógeno.
4. Se conservó en congelación de -20°C hasta su uso.

### ➤ **Aceite esencial**

1. Se dispensó el aceite esencial en viales color ámbar.
2. Se introdujo atmósfera de nitrógeno y se selló con ayuda de parafilm.
3. Se conservó en congelación de -20°C hasta su uso.

## **3.2. Actividad Antimicrobiana.**

Debe recordarse que los extractos vegetales (Hexano, Acetato de Etilo y EtOH/H<sub>2</sub>O) y el aceite esencial, se obtuvieron de Chilchagua en etapa longeva de floración, se emplearon en los métodos microbiológicos: Microdilución en placa y difusión en agar, en el caso de los extractos vegetales de Chilchagua en fresco, la planta se encontraba en la etapa más joven, con ellos se realizó el método de microdilución en placa.

### **3.2.1. Preparación de Soluciones stock de Extractos Vegetales, Aceite Esencial, Gentamicina y Anfotericina B.**

#### **3.2.1.1. Solución stock de extractos vegetales.**

1. Se pesó en un matraz aforado de 10mL, 0.08 g de extracto vegetal para obtener una concentración de 8 000 ppm. Se disolvió siguiendo el orden de la tabla 9:



**Tabla 9. Proporción de disolventes para los extractos vegetales de *T. nelsonii* Greenm**

Disolvente	Cosolvente	Volumen ( $\mu$ L)	%
Etanol		2000	20
Agua destilada		7 450	74.5
	Tween 80	50	0.5
	DMSO	500	5

### 3.2.1.2. Solución stock del aceite esencial.

1. Se pesó en un matraz aforado de 10mL, 10 mg de aceite esencial para obtener una concentración de 1 000 ppm. Se disolvió empleando los disolventes de la tabla 10:

**Tabla 10. Proporción de disolventes para el aceite esencial de *T. nelsonii* Greenm**

Disolvente	Coadyuvante	Volumen ( $\mu$ L)	%
Etanol		1000	1
Agua destilada		8650	86.5
	Tween	50	0.5
	DMSO	300	3

### 3.2.1.3. Solución stock de Anfotericina B (antifúngico de referencia).

- Se pesó 0.016 g de Anfotericina B.
- Se disolvió con 10 mL de DMSO, esto se realizó en un matraz aforado de 10 mL. Obteniendo un stock de 1600 ppm.

### 3.2.1.4. Solución stock de Gentamicina (antibacteriano de referencia).

- Se pesó 0.012 g de Gentamicina
- Se disolvió en 10 mL de agua destilada, se realizó en matraz aforado de 10 mL. Obteniendo un stock de 1200 ppm.

### 3.2.2. Diluciones de las soluciones stock.

Una vez que se obtuvieron las soluciones stock de cada uno de los productos a emplear se realizaron las siguientes diluciones:

### 3.2.2.1. Diluciones de los extractos vegetales.

Se realizó una serie de diluciones, que se muestra a continuación: En 10 tubos estériles, se dispensó Caldo Sabouraud de acuerdo a la tabla 11 e imagen 12:

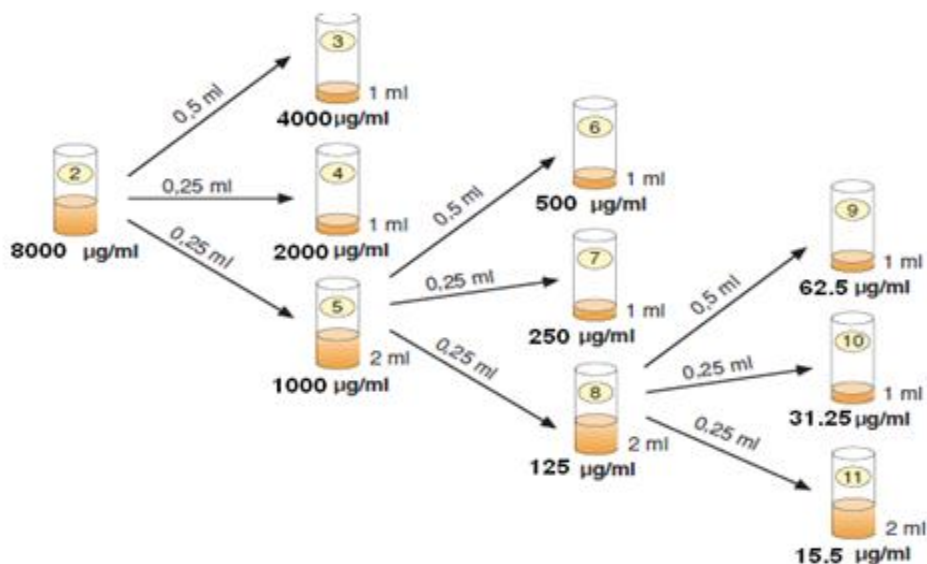


Imagen 12. Esquema de diluciones del aceite esencial de Chilchagua.

Modificado de (Cantón & Martín, 2007).

Tabla 11. Diluciones de los extractos vegetales de *T. nelsonii* Greenm.

Tubo	Concentración (ppm)	Transferir soluciones madre de los extractos vegetales (mL)	A un tubo con Caldo Sabouraud (mL)	Concentración resultante (ppm)	Tubo
n° 2	8 000	0.5	0.5	4 000	n°3
n°2	8 000	0.25	0.75	2 000	n°4
n°2	8 000	0.25	1.75	1 000	n°5
n°5	1 000	0.5	0.5	500	n°6
n°5	1 000	0.25	0.75	250	n°7
n°5	1 000	0.25	1.75	125	n°8
n°8	125	0.5	0.5	62.5	n°9
n°8	125	0.25	0.75	31.25	n°10
n°8	125	0.25	1.75	15.62	n°11

### 3.2.2.2. Diluciones del aceite esencial.

Una vez obtenido el stock de aceite esencial con una concentración de 1000 ppm se realizaron las diluciones que se muestran en la tabla 12 e imagen 13, esto en tubos estériles:

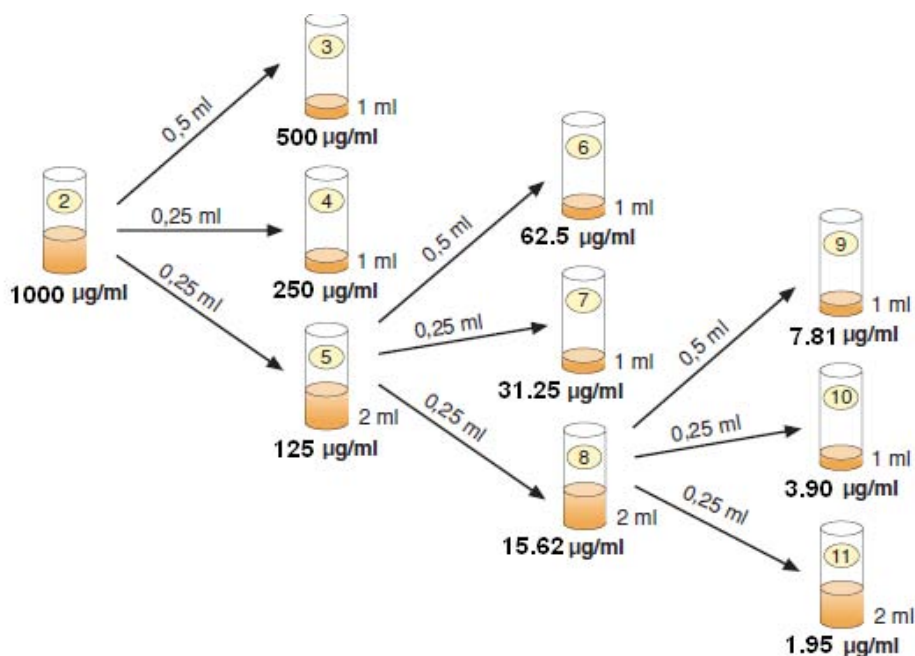


Imagen 13. Esquema de diluciones del aceite esencial de Chilchagua.

Modificado de (Cantón & Martín, 2007).

Tabla 12. Diluciones del aceite esencial de *T. nelsonii* Greenm.

Tubo	Concentración (ppm)	Transferir soluciones madre de los extractos vegetales (mL)	A un tubo con Caldo Sabouraud (mL)	Concentración resultante (ppm)	Tubo
n° 2	1 000	0.5	0.5	500	n°3
n°2	1 000	0.25	0.75	250	n°4
n°2	1 000	0.25	1.75	125	n°5
n°5	125	0.5	0.5	62.5	n°6
n°5	125	0.25	0.75	31.25	n°7
n°5	125	0.25	1.75	15.625	n°8
n°8	15.625	0.5	0.5	7.8125	n°9
n°8	15.625	0.25	0.75	3.9062	n°10
n°8	15.625	0.25	1.75	1.953	n°11

### 3.2.2.3. Diluciones de Anfotericina B.

La dilución de la Anfotericina B, consistió en dos etapas, la primera se describe en la tabla 13 e imagen 14. Esta etapa se realizó en 10 tubos estériles.

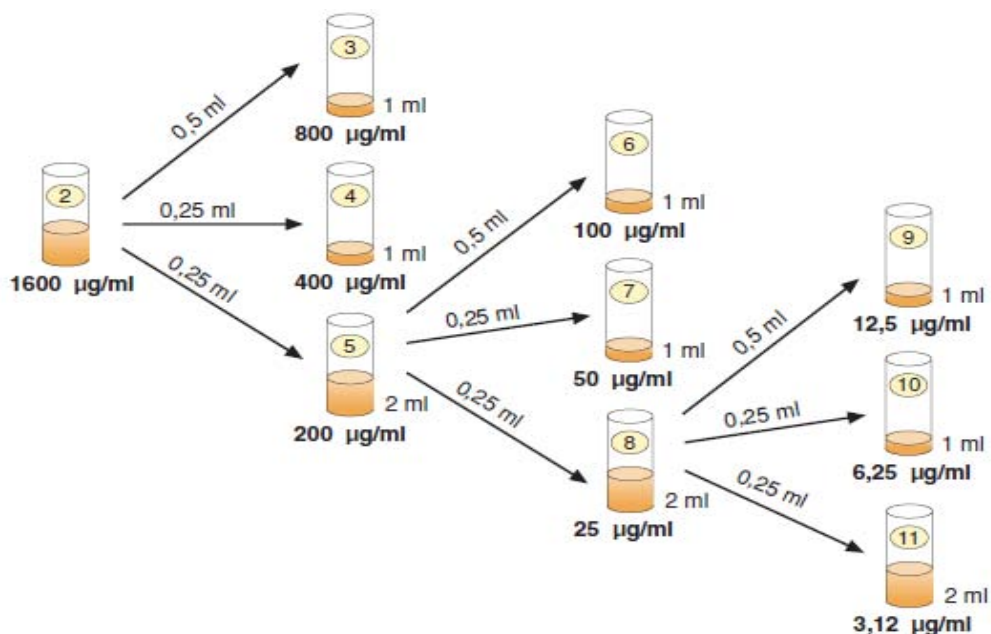


Imagen 14. Esquema de diluciones de la Anfotericina B (etapa 1).  
Modificado de (Cantón & Martín, 2007).

Tabla 13. Diluciones Anfotericina B (Primera etapa).

Tubo	Concentración (ppm)	Transferir soluciones madre de los extractos vegetales (mL)	A un tubo con Caldo Sabouraud (mL)	Concentración resultante (ppm)	Tubo
n° 2	1 600	0.5	0.5	800	n°3
n°2	1 600	0.25	0.75	400	n°4
n°2	1 600	0.25	1.75	200	n°5
n°5	200	0.5	0.5	100	n°6
n°5	200	0.25	0.75	50	n°7
n°5	200	0.25	1.75	25	n°8
n°8	25	0.5	0.5	12.5	n°9
n°8	25	0.25	0.75	6.25	n°10
n°8	25	0.25	1.75	3.12	n°11

Segunda etapa: Aquí se realizó una dilución 1/50, tomando 100  $\mu$ L de cada uno de los tubos de la primera etapa de dilución de la Anfotericina B, estos 100  $\mu$ L se transfirieron a un tubo con 4.9 mL de caldo Sabouraud, como se muestra en la imagen 15. De esta manera se obtiene una concentración dos veces mayor a la deseada.

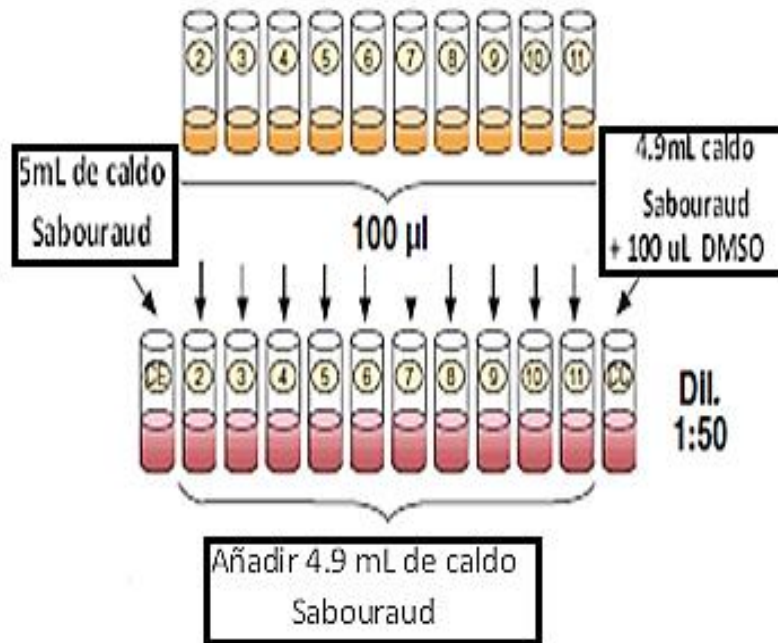
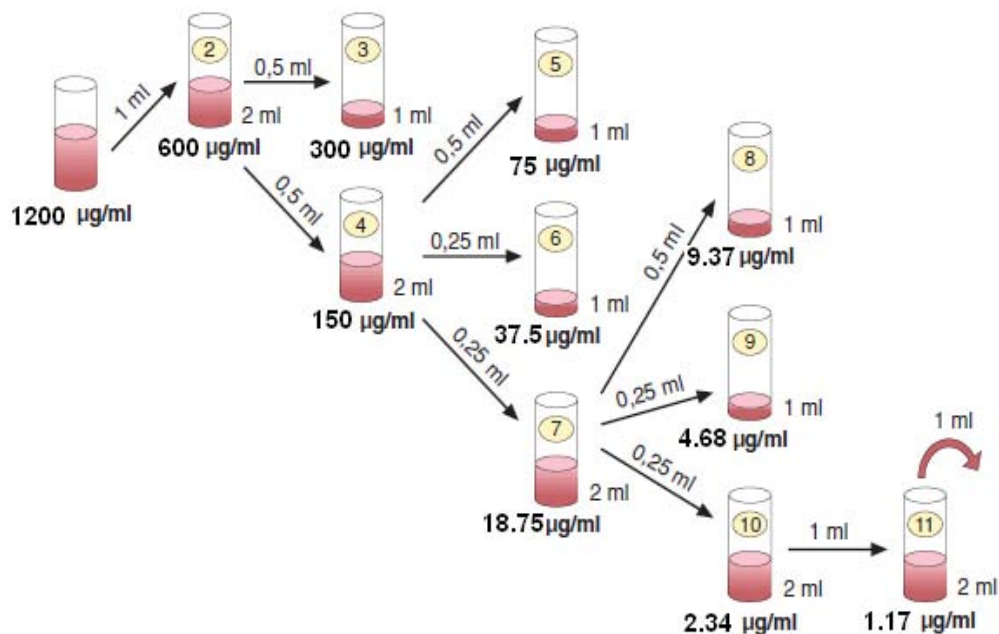


Imagen 15. Segundo paso de la dilución de antimicrobiano de referencia, modificado de (Cantón & Martín, 2007).

#### 3.2.2.4. Diluciones de la Gentamicina.

Al igual que en el caso de la Anfotericina B, las diluciones de la Gentamicina se dividió en dos etapas, descritas en la tabla 14 e imagen 16. Las diluciones se realizaron en tubos estériles.



**Imagen 16. Esquema de diluciones de la Gentamicina.  
Modificado de (Cantón & Martín, 2007).**

**Tabla 14. Diluciones del stock de Gentamicina.**

Tubo	Concentración (ppm)	Transferir soluciones madre de los extractos vegetales (mL)	A un tubo con Caldo Sabouraud (mL)	Concentración resultante (ppm)	Tubo
n°1	1 200	1	1	600	n°2
n°2	600	0.5	0.5	300	n°3
n°2	600	0.5	1.5	150	n°4
n°4	150	0.5	0.5	75	n°5
n°4	150	0.25	0.75	37.5	n°6
n°4	150	0.25	1.75	18.75	n°7
n°7	18.75	0.5	0.5	9.37	n°8
n°7	18.75	0.25	0.75	4.68	n°9
n°7	18.75	0.25	1.75	2.34	n°10
n°7	2.34	1	1	1.17	n°11

Segunda etapa: Aquí se realizó una dilución 1/50, tomando 100 µL de cada uno de los tubos de la primera etapa de dilución de la Gentamicina, estos 100 µL se transfirieron a un tubo con 4.9 mL de caldo BHI, como se muestra en la imagen 17.

De esta manera se obtiene una concentración dos veces mayor a la deseada.

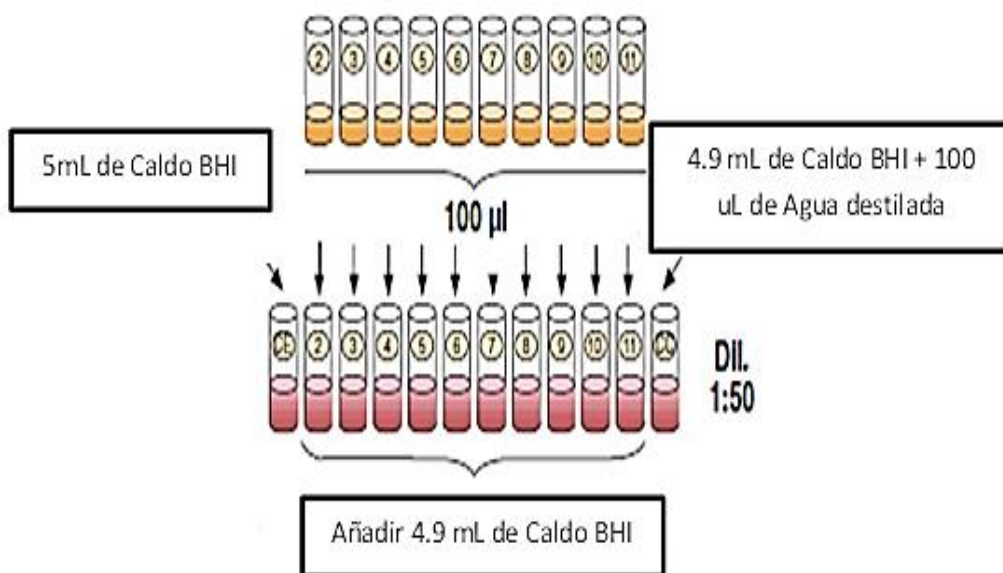


Imagen 17. Esquema de diluciones de la Gentamicina (etapa dos).  
Modificado de (Cantón & Martín, 2007).

### 3.2.3. Preparación del inóculo.

Recomendación: Si la levadura o bacteria ha estado almacenada o congelada, antes de realizar las pruebas de sensibilidad conviene hacer por lo menos dos pases en medio de agar glucosado de Sabouraud (SDA), para el caso de levaduras y agar infusión cerebro-corazón (BHI) para bacterias.

#### 3.2.3.1. Inóculo para *Candida albicans*.

##### 3.2.3.1.1. Métodos: Microdilución en placa (Material vegetal seca y extractos en crudo).

Se preparó tocando con el asa bacteriológica, una colonia de 24 h de crecimiento en una placa de SDA, se resuspendió en un tubo con solución salina (NaCl 0.85%). Se agitó y ajustó al estándar 0.5 de McFarland, añadiendo la cantidad necesaria de solución salina. Posteriormente se realizó una dilución 1:1000 con medio Caldo Sabouraud (Cantón & Martín, 2007). Esta última dilución es la que se

utilizó para inocular las placas con antifúngico, llámese Anfotericina B, extractos vegetales, aceite esencial de Chilchagua.

### **3.2.3.2. Inóculo para Bacterias (*Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*)**

#### **3.2.3.2.1. Métodos: Microdilución en placa (Material vegetal seca y extractos en crudo).**

Se preparó tocando con el asa bacteriológica, una colonia de 24 h de crecimiento en una placa de SDA, se resuspendió en un tubo con solución salina (NaCl 0.85%). Se agitó y ajustó al estándar 0.5 de McFarland, añadiendo la cantidad necesaria de solución salina. Posteriormente se realizó una dilución 1:1000 con medio Caldo BHI (Cantón & Martín, 2007). Ésta última dilución es la que se utilizó para inocular las placas con antibacteriano, llámese, Gentamicina o extractos vegetales de Chilchagua.

#### **3.2.3.2.2. Método: Difusión en agar.**

Se preparó tocando con el asa bacteriológica, una colonia de 24 h de crecimiento en una placa de BHI, se resuspendió en un tubo con solución salina (NaCl 0.85%). Se agitó y ajustó al estándar 0.5 de McFarland, añadiendo la cantidad necesaria de solución salina.

### **3.3. Método de microdilución en placa de titulación (Extracto de Chilchagua y aceite esencial en etapa longeva).**

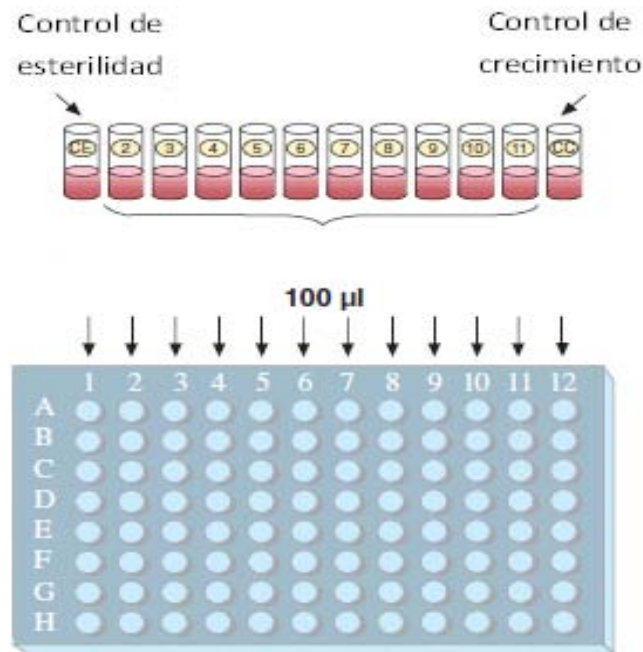
#### **3.3.1. Llenado de placas.**

En las placas de titulación colocaron 100 µL de solución de antimicrobiano (llámese, Anfotericina B, Gentamicina, extractos vegetales y/o aceite esencial de la Chilchagua) siguiendo los pasos a continuación (ver imagen 18):

- Del contenido del tubo n°2 se transfirieron 100 µL a la columna n°2.
- Del contenido del tubo n°3 se transfirieron 100 µL a la columna n°3.
- Así hasta la columna n° 11.



- Los pocillos de la columna número 12 se llenaron con 100  $\mu$ L de Caldo Sabouraud y 2% de los disolventes empleados para disolver el extracto vegetal, aceite esencial o antifúngico. Estos pocillos serán el control de crecimiento.
- Los pocillos de la columna n°1 se llenaron con 200  $\mu$ L de Caldo Sabouraud o Caldo BHI, siendo el control de esterilidad.



**Imagen 18. Llenado de placas,**  
Modificado de (Cantón & Martín, 2007).

### 3.3.2. Inoculación de placas.

1. Las placas de titulación se inocularon con 10  $\mu$ L de la suspensión de levadura o bacteria desde el pocillo 2 hasta el 12.

NOTA: la columna n°1 se utilizó para el control de esterilidad, por tanto no se inoculó.

La columna n°12 no contiene antifúngico pero presentó la misma concentración de disolvente que los pocillos con antifúngico. Fue el control de crecimiento.

Las placas se incubaron a 35°C, durante 24h.

### 3.4. Actividad antimicrobiana (método de difusión en agar).

#### 3.4.1. Impregnación de discos.

En este método se utilizan las series de diluciones, que se describieron anteriormente (punto 3.3.2.). Para esto, se tomaron 10  $\mu\text{L}$  de cada una de las concentraciones obtenidas en las diluciones de los extractos vegetales, del aceite esencial de Chilchagua, de la Gentamicina y de la Anfotericina B, se impregnaron los discos de papel filtro estéril.

#### 3.4.2. Siembra de placas.

Con ayuda de un hisopo estéril se realizó una siembra masiva (Imagen 19) en placas de agar Mueller Hinton, empleando el inóculo que se preparó previamente (punto 3.3.3.). Una vez impregnados los discos se colocaron de forma estratégica sobre la placa de agar (Imagen 20). Las placas de agar se incubaron a 35°C por 24 h.

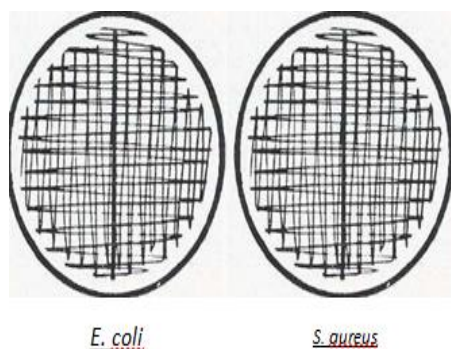


Imagen 19. Siembra masiva en placas de agar.

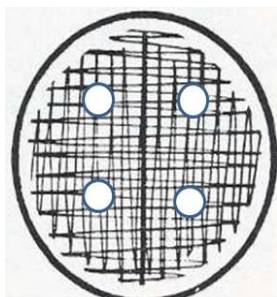


Imagen 20. Montaje de discos impregnados con antimicrobiano (Aceite esencial, extractos vegetales de Chilchagua, Anfotericina B y Gentamicina).

### 3.4.3. Lectura de placas de agar.

La lectura de las placas de agar se realizó mediante la determinación de la presencia o ausencia del halo de inhibición.

### 3.5. Actividad antimicrobiana del extracto vegetal en crudo.

La finalidad de este ensayo, es el reproducir lo más cercano posible el preparado que consumen los pobladores de Chiapas, pues ellos mencionan beber una “ramita” de Chilchagua licuada en agua.

#### 3.5.1. Obtención del extracto vegetal en crudo de Chilchagua.

De una planta en fresco se tomaron de manera aleatoria hojas, hasta lograr una masa de 3g. Se lavó la materia vegetal con agua destilada, posterior a ello se fraccionó en pedazos pequeños.

Con ayuda de un mortero de porcelana y 10 mL de disolvente (véase tabla 15) se trituro la materia vegetal hasta obtener una pasta homogénea. La pasta se filtró con ayuda de una gasa estéril, obteniendo un filtrado que sería el extracto vegetal a confrontar con los microorganismos.

Tabla 15. Sistemas de disolventes para extracción en crudo de la Chilchagua

Extracto vegetal en crudo	Disolventes	Volumen
1	Agua destilada	10 mL
2	Agua/EtOH	7ml / 3mL
3	Agua/metOH	8mL /2mL

### 3.5.2. Llenado de placas e inoculación.

- Control de esterilidad: En la fila 1, del pocillo 1 a al 1e, se dispensó 200  $\mu$ L de Caldo Sabouraud. Para el caso de las bacterias dispensar hasta el pocillo F Caldo BHI.
  - Control de crecimiento: El pocillo número 5b se dispensó con 100  $\mu$ L de agua destilada, el pocillo 5c con 100  $\mu$ L de Agua/EtOH [7:3], el pocillo 5d con 100  $\mu$ L de Agua/metOH [8:2]. Esto en el caso de *C. albicans*. Para *E. coli* y *S. aureus*, el pocillo número 5e se dispensó con 100  $\mu$ L de agua destilada, el pocillo 5f con 100  $\mu$ L de la mezcla de Agua/EtOH [7:3], el pocillo 5g con 100  $\mu$ L de la mezcla Agua/metOH [8:2].
  - Antimicrobianos control: se emplearon los antimicrobianos (Anfotericina B y Gentamicina) del punto (3.3.2.3. y 3.3.2.4.) usando únicamente las concentraciones del tubo 2, 7 y 11, dispensando 100  $\mu$ L en la fila A, de los pocillos 2 al 4.
  - Los pocillos 2b al 2e, se dispensaron con 100  $\mu$ L de extracto crudo acuoso. Los pocillos 3b al 3e, se dispensaron con 100  $\mu$ L de extracto crudo etanólico. Los pocillos 4b al 4e, se dispensaron con 100  $\mu$ L de extracto crudo metanólico. En el caso de *E. coli* y *S. aureus*, se dispensó hasta la columna f para todos los pocillos.
  - Se dispensó 100 $\mu$ L de medio previamente inoculado (Caldo Sabouraud/ Caldo BHI), en los pocillos de las filas 2 a la 5, hasta la columna E para el caso de *Candida albicans*, para *E. coli* y *S. aureus*, hasta la columna F.
- Las placas se incubaron a 35°C, durante 24h.

Se añadió una imagen que ilustra una placa de titulación, similar a la que se empleó durante la experimentación, esto con fines ilustrativos y una mejor visualización de lo que se describió anteriormente (Imagen 21).

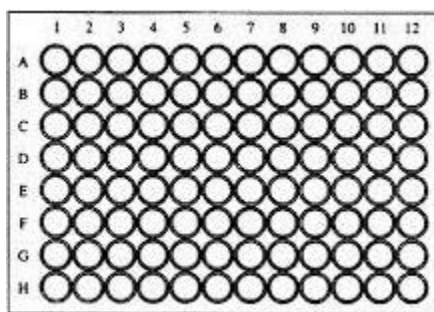


Imagen 21. Placa de titulación

## 4. Resultados.

### 4.1. Tratamiento de la materia vegetal.

#### 4.1.1. Materia prima.

##### 4.1.1.1. Recolección.

La planta medicinal Chilchagua, fue donada por Edith Díaz quien la recolectó en San Cristóbal de las Casas, Chiapas, México; el 20 de Diciembre de 2014. Coordenadas 16°44'12"N 92°38'18"O.

##### 4.1.1.2. Identificación etnobotánica.

La identificación botánica de la materia prima vegetal, empleada en este trabajo, se realizó en la colección etnobotánica del Herbario Etnobotánico IZTA con el que cuenta la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, perteneciente a la UNAM. Se extendió un certificado de identidad con los datos mostrados en la tabla 15 (Ver Anexo 1).

Tabla 16. Identificación Taxonómica de la materia vegetal.

Nombre científico	Familia	Nombre vulgar	Número de registro
<i>Tagetes nelsonii</i> Greenm	Asteraceae/ Compositae	Chilchagua Chik chawa Caldex	2411 IZTA

##### 4.1.1.3. Materia extraña.

El análisis macroscópico para identificar la materia extraña se realizó de acuerdo a los criterios que establece la Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos (2013) (FHEUM), obteniendo lo siguiente:

Tabla 17. Material extraño.

Nombre común	Material extraño	Peso (g) y porcentaje
Chilchagua	Polvo Pasto	0.05 g (1%)


Según especificaciones de la FHEUM el material extraño debe estar presente en un porcentaje menor a 2%, haciendo énfasis en que deben estar ausentes la materia fecal y cabellos. Sin embargo, como logra observarse, el material extraño en la materia prima no rebasó siquiera el 1%, por tanto es viable para su uso.

## 4.2. Extractos vegetales.

### 4.2.1. Análisis fitoquímico preliminar.

Donde	+++	Cantidad apreciable
	++	Poca cantidad
	+	Pequeñas cantidades / trazas
	-	No contiene

**Tabla 18. Prueba Guignard (Material vegetal completo).**

Nombre de la prueba	Resultados experimentales	Imagen
<b>Guignard</b>	(-) No hubo cambio de coloración en la tira de papel filtro.	

**Tabla 19. Pruebas Fitoquímicas para el extracto Hexánico de Chilchagua**


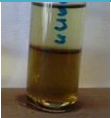


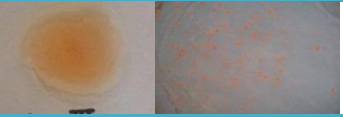








Nombre de la prueba	Resultados experimentales	Imagen
<b>Dragendorff</b>	(-)	
<b>Liebermann-Buchard</b>	(++)	
<b>Börntrager</b>	(-)	
<b>Baljet</b>	(-)	
<b>Sudán</b>	(+++)	

Tabla 20. Pruebas Fitoquímicas para el extracto con Acetato de Etilo de Chilchagua.

Nombre de la Prueba	Resultado experimental	Imagen
Fehling	(-)	
Espuma	(++)	
Rosenthaler	(+++)	
Baljet	(-)	
Cloruro Férrico	(+)	
Aminas	(-)	
Residuo		
Börntrager	(-)	
Liebermann-Buchard	(++)	

**Tabla 21. Pruebas fitoquímicas para el extracto de Chilchagua en Acetato de Etilo.**






Nombre de la prueba	Resultados experimentales	Imagen
Filtrado		
<b>Dragendorff</b>	Trazas	
<b>Ácido Silicotúngstico</b>	Trazas	
<b>Hager</b>	(-)	
Fase acuosa		
<b>Shinoda</b>	(+)	
<b>Amoniaco</b>	(++)	
Fase Orgánica		
<b>Shinoda</b>	(-)	
<b>Baljet</b>	(-)	
<b>Börntrager</b>	(-)	



Tabla 22. Pruebas fitoquímicas al extracto hidroalcohólico de la Chilchagua.

Nombre de la Prueba	Resultados experimentales	Imagen
<b>Dragendorff</b>	(-)	
<b>Gelatina</b>	(-)	
<b>Shinoda</b>	(-)	
<b>Baljet</b>	(+++)	
<b>Cloruro Férrico</b>	(++)	
<b>Kedde</b>	(+) (+)	
<b>Fehling</b>	(-)	
<b>Espuma</b>	(+++)	

#### 4.2.2. Maceración dinámica.

**Tabla 23. Parámetros de extracción para los extractos vegetales**

Parámetros	Extracto Hexánico	Extracto con Acetato de Etilo	Extracto Etanol/agua [50:50]
Cantidad de materia vegetal	100g	100g	100g
Volumen de disolvente	1L	1L	1L
Método de extracción	Maceración	Maceración	Maceración
Tiempo de extracción	24 hrs	24 hrs	24 hrs
Extras	Temperatura ambiente (25-30°C) Protegiendo al extracto de la luz.	Temperatura ambiente (25-30°C) Protegiendo al extracto de la luz.	Temperatura ambiente (25-30°C) Protegiendo al extracto de la luz.



**Imagen 22. Extractos vegetales de *T. nelsonii* Greenm con distintos disolventes (Hexano, Acetato de etilo y EtOH/H<sub>2</sub>O [50:50], en orden correspondiente).**

**Tabla 26. Parámetros de extracción del aceite esencial**

Parámetros	Aceite esencial
Cantidad de materia vegetal	91.74g
Volumen de disolvente (agua)	1L
Método de extracción	Hidrodestilación
Tiempo de extracción	4 h
Extras	Protegiendo al aceite de la luz.

#### 4.2.2.1. Control de calidad del aceite esencial de Chilchagua.

Tabla 24. Control de calidad del aceite esencial de la Chilchagua (Aspectos sensoriales).


Nombre común	Color (RGB)	Aspecto	Olor	Imagen
Chilchagua	Rojo: 242 Verde: 236 Azul: 0	Líquido	Vegetal	

Tabla 25. Aspectos fisicoquímicos del aceite esencial

Nombre común	Densidad (g/mL)	
	Experimental	Teórico
Chilchagua	No determinado	No hay reportado

#### 4.2.3. Espectroscopia infrarroja de los extractos vegetales y del aceite esencial de Chilchagua.

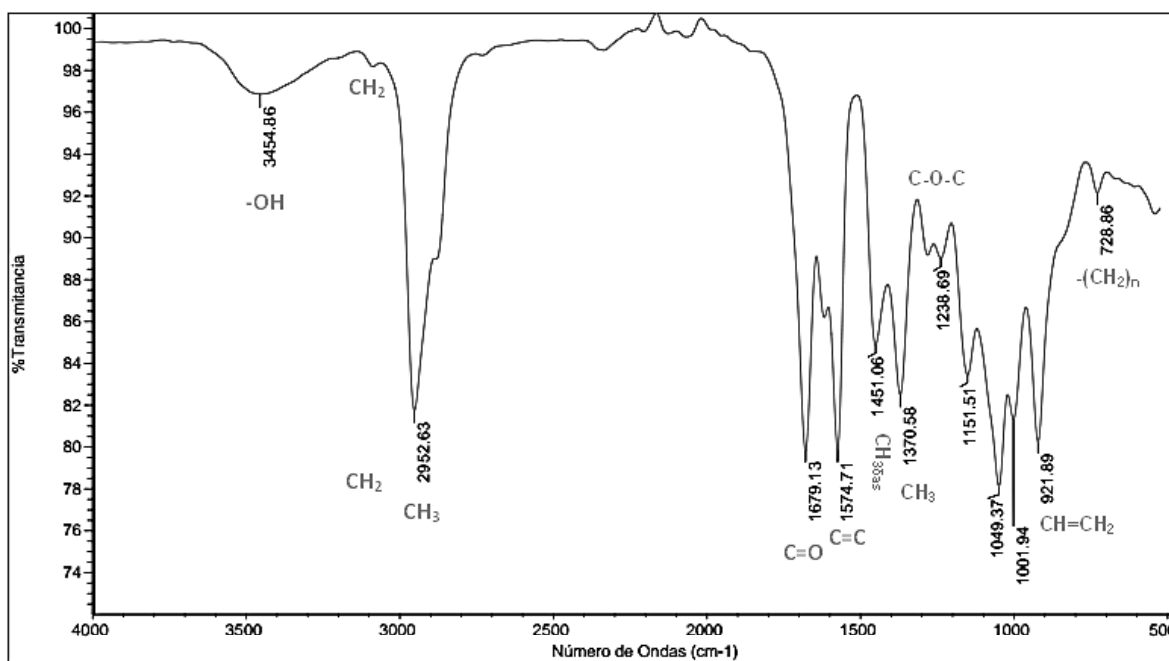


Imagen 23. Infrarrojo del Aceite esencial de Chilchagua.

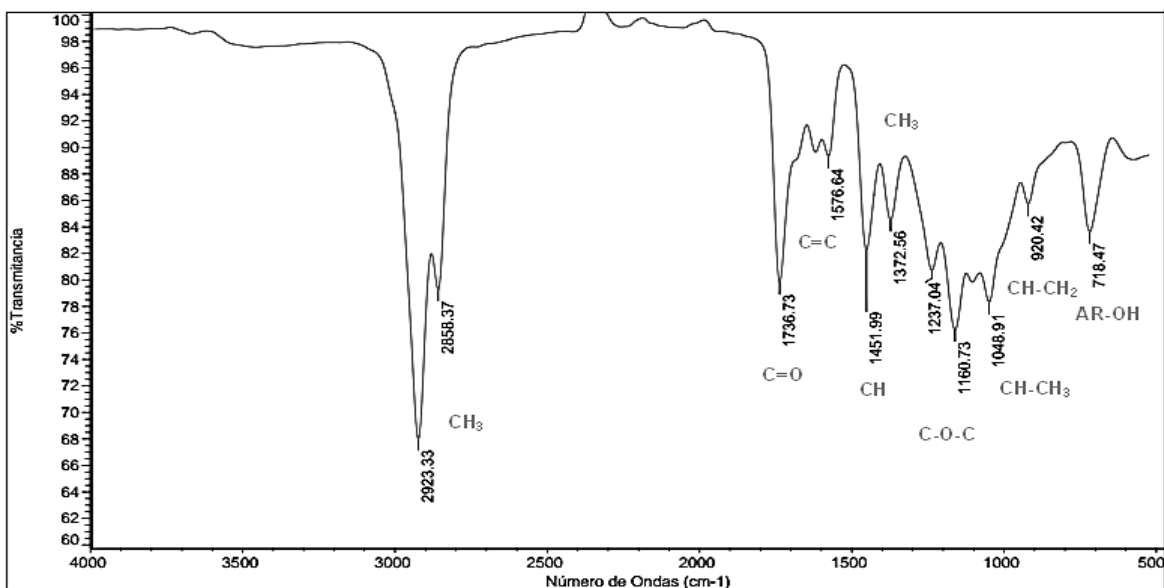


Imagen 24. Infrarrojo del extracto Acetato de Etilo de Chilchagua.

#### 4.2.4. Material extraíble.

Tabla 26. Extractos obtenidos por gradiente de polaridad.

Nombre de la planta empleada	Parte de la planta empleada	Material vegetal (g)	Extracto vegetal obtenido (g)			% de material extraíble			
			Hexano	Acetato de etilo	Etanol/agua [50:50]	Experimental			Teórico
						Hexano	Acetato de etilo	Etanol/agua [50:50]	
Chilchagua	Hojas, tallo y flores	100g	4.06g	1.98g	20.3g	4.06%	1.98%	20.3%	No hay datos reportados

Tabla 27. Aceite esencial.

Nombre de la planta empleada	Parte de la planta empleada	Material vegetal (g)	Aceite esencial obtenido		Rendimiento de extracción %	
			(μL)	(mg)	Experimental	
					Experimental	Teórico
Chilchagua	Hojas y flores	91.74g	350 μL	35mg	0.35%	No hay datos reportados

#### 4. 2. 5. Conservación de extractos vegetales y aceite esencial



Imagen 25 Conservación de los extractos acuosos y del aceite esencial.

#### 4.3. Actividad antimicrobiana.

##### 4.3.1. Soluciones stock de Extractos Vegetales y Aceite Esencial de la Chilchagua en etapa longeva.

Se obtuvieron soluciones stock de concentración 8 000 ppm en el caso de los extractos vegetales y 1 000 ppm el stock del aceite esencial (imagen 26).



Imagen 26. Soluciones stock



Imagen 27. Extractos vegetales en crudo.

### 4.3.1. Actividad Antimicrobiana (Microdilución en placa)

Tabla 28. Resultados de la actividad antimicrobiana de los extractos vegetales por el método de microdilución en placa.

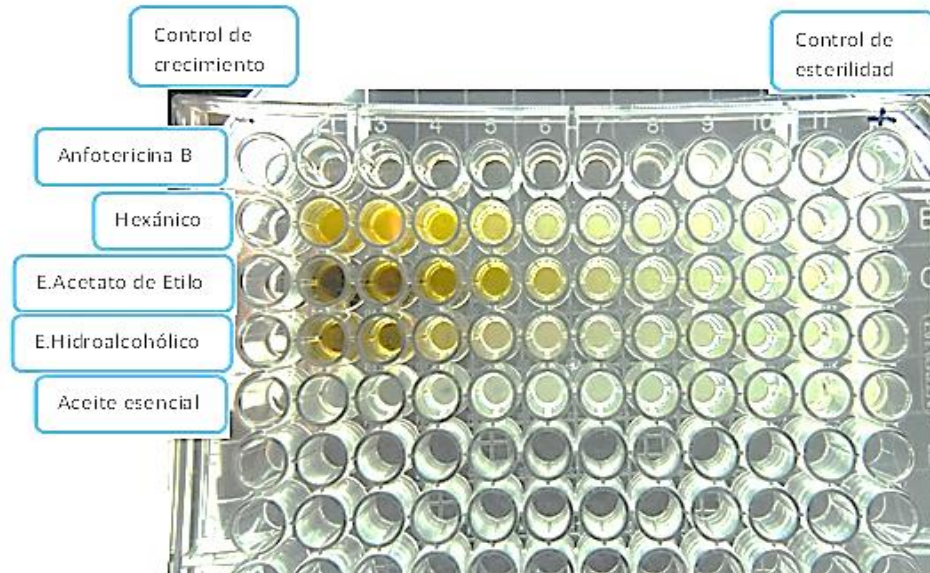
Microorganismos	Extractos		
	Hexánico*	Acetato de Etilo*	Hidroalcohólico*
<b><i>C. albicans</i> ATCC 32364</b>	Resistente	Resistente	Resistente
<b><i>C. albicans</i> L1710215</b>	Resistente	Resistente	Resistente
<b><i>C.albicans</i> L178015</b>	Resistente	Resistente	Resistente
<b><i>C. albicans</i> L177615</b>	Resistente	Resistente	Resistente
<b><i>E.coli</i> ATCC 25992</b>	Resistente	Resistente	Resistente
<b><i>S.aureus</i> ATCC 25923</b>	Resistente	Resistente	Resistente
<b><i>E.coli</i> L170115</b>	Resistente	Resistente	Resistente
<b><i>S.aureus</i> L170115</b>	Resistente	Resistente	Resistente

\*Los microorganismos fueron resistentes a todas las concentraciones de los extractos vegetales

Tabla 29. Resultados de la actividad antimicrobiana del aceite esencial por el método de microdilución en placa

Microorganismos	Aceite esencial (µg/mL)									
	250	125	62.5	31.25	15.62	7.81	3.90	1.95	0.75	0.48
<b><i>C. albicans</i> ATCC 32364</b>	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<b><i>C. albicans</i> L177615</b>	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<b><i>C.albicans</i> L178015</b>	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<b><i>C. albicans</i> L1710215</b>	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<b><i>E.coli</i> ATCC 25992</b>	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<b><i>S.aureus</i> ATCC 25923</b>	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<b><i>E.coli</i> L170115</b>	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<b><i>S.aureus</i> L170115</b>	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-

+ = Efecto de inhibición/ - = Ningún efecto



**Imagen 28. Actividad microbiológica de los extractos vegetales y el aceite esencial de *Tagetes nelsonii* Greenm (*C. albicans*.)**



**Imagen 29. Actividad microbiológica de los extractos vegetales y el aceite esencial de *Tagetes nelsonii* Greenm (*S. aureus*).**



Imagen 30. Actividad microbiológica de los extractos vegetales y del aceite esencial de *Tegetes nelsonii* Greenm (*E. coli*).

#### 4.3.3. Actividad Antimicrobiana (Difusión en agar).

Tabla 30. Resultados de la actividad antimicrobiana de los extractos vegetales por el método de difusión en agar.

Microorganismos	Extractos		
	Hexánico	Acetato de Etilo	Hidroalcohólico
<b><i>E.coli</i> ATCC 25992</b>	Resistente	Resistente	Resistente
<b><i>S.aureus</i> ATCC 25923</b>	Resistente	Resistente	Resistente
<b><i>E.coli</i> L170115</b>	Resistente	Resistente	Resistente
<b><i>S.aureus</i> L170115</b>	Resistente	Resistente	Resistente



Tabla 31. Resultados de la actividad antimicrobiana del aceite esencial por el método de difusión en placa.

Microorganismos	Aceite esencial (ppm)
<i>E.coli</i> ATCC 25992	Resistente
<i>S.aureus</i> ATCC 25923	Resistente
<i>E.coli</i> L170115	Resistente
<i>S.aureus</i> L170115	Resistente

Tabla 32. Resultados del método difusión en agar para *E. coli*.

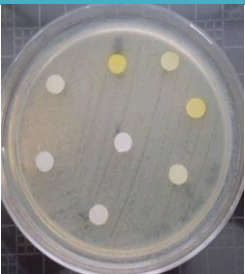
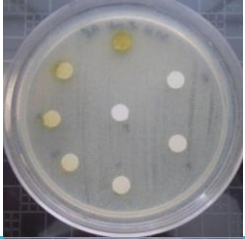

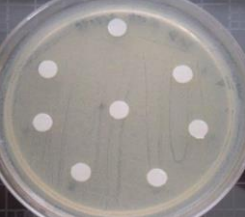

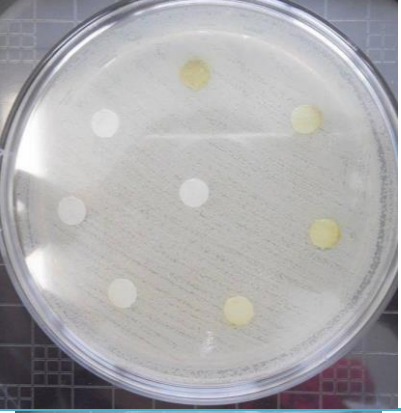

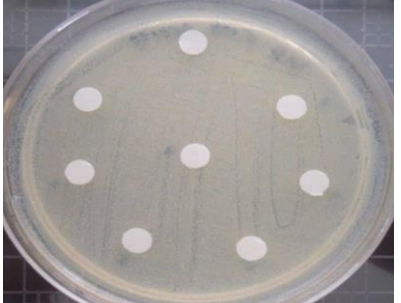
Microorganismo	Extracto	Placa
<i>E. coli</i>	Hexánico	
	Acetato de Etilo	
	Hidroalcohólico	
	Aceite esencial	

Tabla 33. Resultados para el método de difusión en agar para *S. aureus*.

Microorganismo	Extracto	Placa
<b><i>S. aureus</i></b>	Hexánico	
	Acetato de etilo	
	Hidroalcohólico	
	Aceite esencial	

#### 4.3.4. Actividad antimicrobiana con extracto vegetal en crudo.

Tabla 34. Resultados de la actividad antimicrobiana de los extractos vegetales en crudo.

Microorganismos	Extractos		
	Acuoso	Hidroalcohólico [70:30]	Metanólico [80:20]
<b><i>C. albicans</i> ATCC 32364</b>	Resistente	Resistente	Resistente
<b><i>C. albicans</i> L1710215</b>	Resistente	Resistente	Resistente
<b><i>C. albicans</i> L178015</b>	Resistente	Resistente	Resistente
<b><i>C. albicans</i> L177615</b>	Resistente	Resistente	Resistente
<b><i>E. coli</i> ATCC 25992</b>	Resistente	Resistente	Resistente
<b><i>S. aureus</i> ATCC 25923</b>	Resistente	Resistente	Resistente
<b><i>E. coli</i> L170115</b>	Resistente	Resistente	Resistente
<b><i>S. aureus</i> L170115</b>	Resistente	Resistente	Resistente

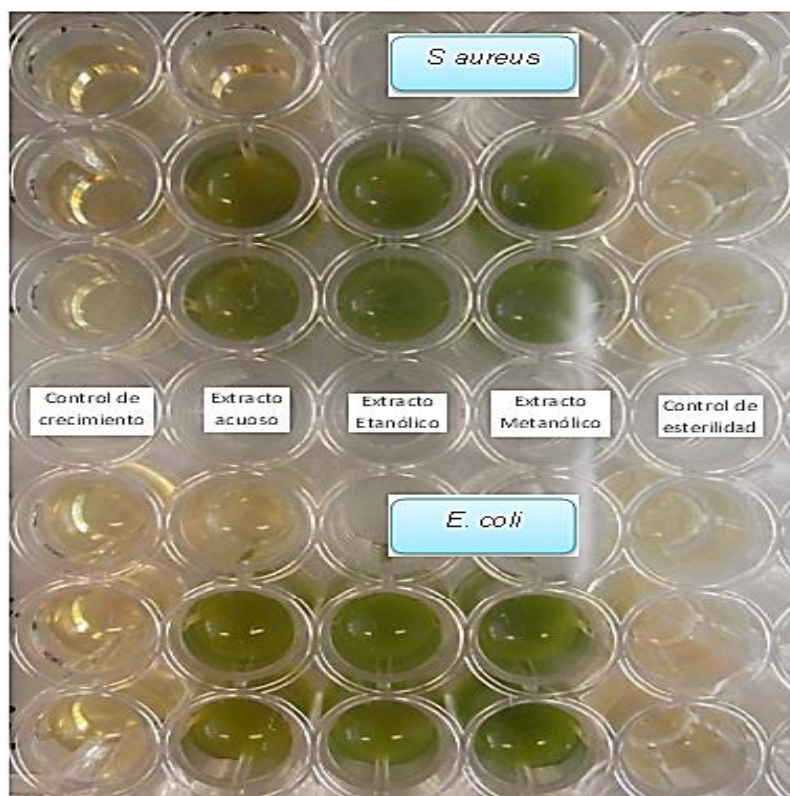


Imagen 31. *E. coli* y *S aureus* contra los extractos en crudo de la Chichagua.



Imagen 32. *C. albicans* contra extractos crudos de la Chilchagua

## 5. Análisis de resultados.

### 5.1. Tratamiento de la materia prima.

#### 5.1.1. Identificación Taxonómica.

La identificación taxonómica es una etapa vital para realizar cualquier investigación que implique el manejo de especies vegetales, pues con ello se asegura que dicho material sea el que se dice.

Además, esta información es de utilidad, ya que se contribuye en la recuperación y seguimiento de las especies vegetales de una determinada población. Otro objetivo de la identificación, es proveer material que sirva de referencia para descubrir o identificar la identidad de las especies vegetales, en pocas palabras la identificación taxonómica es un registro sobre la biodiversidad botánica.

El herbario Etnobotánico de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, otorgó la certificación del material vegetal empleado en este trabajo, dando el nombre científico del mismo, identificándolo como *Tagetes nelsonii* Greenm y asignándole un número de identificación el cual es: 2411 IZTA (Anexo I).

### **5.1.2. Materia extraña.**

Durante la inspección macroscópica de la planta, sólo se identificó, tierra y pasto; en pequeñas cantidades. Se retiró todo el material que no correspondía a la descripción botánica de *Tagetes nelsonii* Greenm. El material extraño no rebasó el 2%, especificado por la FHEUM, por tanto el material vegetal se encuentra en el rango permitido.

## **5.2. Extracción.**

### **5.2.1. Extractos vegetales.**

Para la obtención de los extractos vegetales de la materia vegetal, la técnica de extracción fue la maceración dinámica por 24h a 22-25°C, procurando evitar la exposición a la luz.

Se obtuvieron 3 extractos vegetales y aceite esencial de Chilchagua en etapa fenológica longeva. El extracto Hexánico presentó una apariencia de color verde pasto, ligeramente acuoso o bien, líquido de aroma dulce, obteniéndose una cantidad mínima comparada con los otros dos. El extracto con Acetato de Etilo, era de viscosidad exagerada, casi sólido, de aroma más ligero que el hexánico, de color verde intenso, cercano al verde botella, en proporción fue un poco más que el hexánico. El extracto hidroalcohólico, fue sólido de aroma dulce, como azúcar, de color café y fue el más abundante.

El aceite esencial como ya se observó fue de consistencia líquida, color amarillo fluorescente, de densidad menor al agua y con un fuerte aroma a hierba.

### **5.2.2. Extracción del aceite esencial de *Tagetes nelsonii* Greenm.**

El método de extracción empleado, fue el método de hidrodestilación, mediante un equipo de hidrodestilación con una trampa tipo Clevenger, debido a la densidad del aceite, que es inferior a la del agua.

## **5.3. Rendimiento de extracción.**

El rendimiento que presente un extracto vegetal, es importante, pues entre mayor sea el rendimiento del extracto, menor será la cantidad de muestra vegetal que deba emplearse. Esto tiene influencia en la rentabilidad de la elaboración de

medicamentos (Ortíz, 2009). De manera particular y de ámbito científico es importante conocer el rendimiento de extracción, pues con ello se conoce la cantidad de materia vegetal necesaria para la obtención de la dosis deseada para un tratamiento o bien para la obtención de la concentración mínima inhibitoria (MIC) contra un patógeno, y como base para investigaciones posteriores.

Además, nos permite determinar la cantidad de componentes activos extraídos del material vegetal, es el inicio de la compilación de datos para las plantas en las que no existe hasta el momento ningún dato reportado (WHO, 1998).

Se logra observar en la tabla 25, el rendimiento de extracción para el caso de los extractos vegetales en Hexano, Acetato de Etilo y la mezcla hidroalcohólica, podría considerarse buena, tomando en cuenta que no existen datos comparativos con los cuales se pueda determinar el grado de éxito de la extracción. Se debe recalcar que el mayor rendimiento, se presentó en el caso de la mezcla hidroalcohólica y una menor en el caso del acetato de etilo. Esto gracias a la naturaleza de los compuestos presentes en la planta y la afinidad con el disolvente empleado, por tanto, la materia extraíble fue mayor en el caso del extracto hidroalcohólico, debido a que los compuestos que presentaba la Chilchagua son principalmente de naturaleza polar o bien la mayoría están asociados a azúcares, siendo de polaridad similar al disolvente pudieron ser extraídos por éste.

Para el caso del aceite esencial (Tabla 27) tampoco es posible realizar comparación, sin embargo el rendimiento de extracción fue alto, pues hay que considerar que los aceites esenciales están presentes en pequeñas concentraciones, pues se reporta que el Aceite esencial se encuentra en una concentración no superior al 1% (Fresno, 1999), además haciendo la comparación del rendimiento de extracción del aceite esencial de *Tagetes lacera* que se reporta fue de 0.25% (Díaz, Serrato, & Arce, 2002), se puede mencionar que el rendimiento de extracción del aceite esencial de *T. nelsonii* Greenm es similar y puede decirse que mejor, reportando un 0.31% de rendimiento.

## **5.4. Control de calidad del aceite esencial**

### **5.4.1. Propiedades organolépticas.**

Las propiedades sensoriales del aceite esencial se determinaron de la siguiente manera:

Color y aspecto: El aceite esencial obtenido presentó características de un líquido. Se realizó empleando el sistema RGB, realizando una búsqueda y comparación de tonos de dicho sistema y del aceite esencial, determinando las siguientes

proporciones: Rojo 242, Verde 236 y azul 0. Este dato será de utilidad como referencia para una posterior identificación.

Olor: se empleó la clasificación de vinos, esto con la finalidad de reducir la subjetividad, además de tener una referencia. Como resultado se concluyó que el aceite esencial de Chilchagua es de aroma Herbal, de acuerdo a la Guía de Vinos de Etaio (2007).

## 5.4.2. Determinaciones fisicoquímicas.

### 5.4.2.1. Densidad

No se determinó este parámetro debido a la poca cantidad de aceite esencial extraído y a la falta de más materia vegetal. Sin embargo es importante recordar que el parámetro debe obtenerse de acuerdo al método del picnómetro, esto según la NMX- F-075-SCFI (2012).

### 5.4.2.2. Infrarrojo.

Los espectros en la región infrarroja están asociados a las transiciones entre niveles de energía vibracional; estos niveles corresponden a vibraciones (tensión-contracción) y flexiones de los enlaces y otros movimientos complejos de las moléculas (López, 2015).

Debe mencionarse que la información fitoquímica existente sobre esta especie es casi nula, por esta razón y para propósitos de contribución al estudio fitoquímico, se obtuvo un espectro infrarrojo en el que sólo se hace mención de los posibles grupos funcionales presentes en las moléculas que conforman el aceite esencial. (Tablas 34 y 35).

**Tabla 35 Grupos funcionales presentes en el espectro IR del aceite esencial de Chilchagua.**

Intervalos de frecuencia (referencia) ( $cm^{-1}$ )	Intervalos de frecuencia muestra ( $cm^{-1}$ )	Grupo Funcional
3095-3075	3080	C-H
3650-3200	3454.86	O-H
3000-2840	2952.63	C-H
1650-1600	1574.71	C=C
1675	1679.13	C=O
1475-1450	1451.06	CH <sub>3</sub>
1470-1430	1451.06	CH <sub>2</sub>
1450-1200	1370	O-H
1395-1365	1370.58	CH <sub>3</sub>
1260-970	1049.37-1001.94	C-O

Tabla 36. Grupos funcionales presentes en el espectro IR del extracto de Acetato de Etilo.

Intervalos de Frecuencia (referencia) ( $cm^{-1}$ )	Intervalos de frecuencia de la muestra ( $cm^{-1}$ )	Grupos funcionales
3000-2840	2923.33- 2858.37 $cm^{-1}$	C-H
1775-1650	1736.73 $cm^{-1}$	C=O
1625-1575	1576.64 $cm^{-1}$	C=C
1475-1450	1160.73-1048.91 $cm^{-1}$	C-O
1470-1430	1451.99 $cm^{-1}$	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub>
1260-970	1451.99 $cm^{-1}$	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub>

Como ya se mencionó, no existen datos de espectroscopía infrarroja de *Tagetes nelsonii* Greenm, pero existe información sobre la composición química de otras especies del género *Tagetes*, donde se hace mención que la molécula e-tagetona, está presente en el aceite esencial y es la responsable de la actividad antimicrobiana. Al realizar el análisis de los IR's en especial del aceite esencial se puede hacer presunción de la presencia de e-Tagetona en *Tagetes nelsonii* Greenm, esto puede observarse en las bandas, la primera banda muy intensa en 1675 y otra de menor intensidad en 1574.71. Estas bandas corresponden a los grupos funcionales C=C y C=O, los cuales están presentes en la estructura molecular de la e-Tagetona.

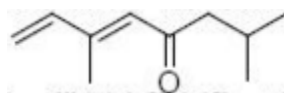


Imagen 33. Estructura molecular de la E-Tagetona.  
(Díaz, F. 2011)

## 5.5. Actividad Antimicrobiana.

El primer paso para reconocer la actividad antimicrobiana de compuestos de origen vegetal, es la ejecución de un ensayo biodirigido, como el que se realizó en este trabajo, el cual consiste en utilizar extractos y fracciones obtenidas del material vegetal con disolventes orgánicos de diferentes polaridades. El objetivo de este trabajo fue el demostrar la actividad antimicrobiana de los extractos vegetales de *Tagetes nelsonii* Greenm.

Iniciemos por recalcar que todo el trabajo se realizó cuidando aspectos vitales como controles de crecimiento, de esterilidad, antimicrobianos de referencia como lo fue la Gentamicina y la Anfotericina B, así como cepas ATTC y de muestras clínicas de los tres microorganismos, al igual que las técnicas microbiológicas según el CLSI y la OMS, en un laboratorio perteneciente a la UNAM. Del mismo



modo se hace referencia que los ensayos fueron reproducidos múltiples veces siguiendo las mismas indicaciones y por el mismo operador; empleando controles de esterilidad, crecimiento y antimicrobianos de referencia como lo fue la gentamicina y la anfotericina B.

En la tabla 36 se hace mención de los grupos químicos identificados en la Chilchagua durante el tamizaje fitoquímico, del mismo modo se presenta un resumen de la actividad antimicrobiana reportada en la literatura.

**Tabla 37. Metabolitos identificados en el tamiz fitoquímico con actividad antimicrobiana.**

Metabolito	Actividad antimicrobiana
Fenoles	El mecanismo de acción que a éste se le atribuye es la inhibición enzimática por oxidación de compuestos. La acción que se le atribuye a este grupo de compuestos contra los microorganismos es la inhibición enzimática posiblemente sobre los grupos azufrados de sus aminoácidos de cisteína o por medio de reacciones más específicas con proteínas (Araujo, 2008).
Taninos	Se cree que su actividad antimicrobiana, se debe a su interacción sobre las adhesinas, proteínas de la pared celular y a su capacidad de unirse a polisacáridos (Cowan, 1999).
Terpenoides	El mecanismo de acción propuesto para este grupo de metabolitos es la disrupción de la membrana celular, mediante tres posibles vías aumentando la permeabilidad de la membrana a iones pequeños, afectando la estabilidad estructural de la membrana y desestabilizando el empaquetamiento de la bicapa lipídica (Maguna, 2006)
Flavonoides	Tienen la capacidad de generar complejos con proteínas extracelulares y proteínas solubles, así como una actividad sobre la pared celular muy similar a la de las quinonas. Además, los flavonoides lipofílicos pueden dañar la integridad de la membrana celular (Fuertes & Roque, 1997).
Saponinas	Causan daños en pared y membrana celular.
Quinonas	Ampliamente reactivos en reacciones de óxido-reducción, generan radicales libres y complejos irreversibles con aminoácidos nucleofílicos de las proteínas, generando su inactivación. Las Quinonas, tienen acción posiblemente sobre las adhesinas expuestas en la superficie de las bacterias, sobre los polipéptidos de la pared celular y sobre las enzimas de membranas (Cowan, 1999).

Sin embargo, y a pesar de los resultados positivos a la presencia de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana, la respuesta obtenida no fue la esperada en ninguno de los ensayos y concentraciones utilizadas de los extractos. A excepción del aceite esencial en las concentraciones 250  $\mu$ L y 125  $\mu$ L, que fue activo para *C. albicans*, *S. aureus* y *E. coli* tanto ATCC, como de cepas provenientes de muestras clínicas.

El resultado negativo de la actividad antimicrobiana de los extractos vegetales puede justificarse a diversas situaciones, las cuales se desglosan a continuación:

Las plantas medicinales, se cosechan en sus períodos óptimos, o sea, en la etapa de máxima concentración de los principios activos, con alto rendimiento de material vegetal, fundamentalmente el mejor momento para cosechar se debe determinar en función de la calidad y la cantidad de los componentes con actividad biológica y no del rendimiento total en materia vegetal, por tanto, el momento de cosecha tiene gran significación y va a depender de la especie y de la parte de la planta que se vaya a utilizar, pues la concentración de los principios activos varía según la etapa de crecimiento y desarrollo de la planta (Acosta, 2009).

La materia vegetal *Tagetes nelsonii* Greenm, fue recolectada en extremos de su vida, es decir, antes de su floración (agosto) para el caso del método de difusión en agar y a finales de su floración (diciembre), para el método de microdilución en placa. Lo anteriormente mencionado es de vital importancia, pues la época y edad de recolección de la materia vegetal determinará la cantidad y a veces la naturaleza de los principios activos, pues tendrá repercusiones en las proporciones relativas de los componentes de los extractos vegetales, a esta variación se le conoce como variación ontogenética (Osorio, 2009).

Debe recordarse que la biosíntesis de metabolitos secundarios suele estar restringida a estados específicos del desarrollo y a períodos de estrés. Algunas plantas producen metabolitos secundarios al tener interacción con el medio ambiente, es decir, para protegerse de patógenos, depredadores o simplemente del estrés ambiental. Otra etapa en que las plantas producen los metabolitos, es cuando se encuentra en la etapa de reproducción, pues con ellos puede atraer insectos que promueven la polinización (Llerena, 2011).

En general, las hojas deben recolectarse cuando las flores comienzan a abrirse, las flores justo antes de que estén totalmente abiertas.

Otro aspecto de importancia, es el origen de la planta, la materia vegetal *Tagetes nelsonii* Greenm empleada en el trabajo experimental, es silvestre, la literatura menciona ciertos inconvenientes que implica el manejar una planta de este tipo para la obtención de principios activos, pues generalmente una planta silvestre presenta una gran dispersión geográfica, obligando a ampliar el área de recolección y por ende pueden presentarse una gran variabilidad en el contenido de principios activos.

Sin embargo, existen factores extrínsecos relacionados al clima, que tienen repercusión en el crecimiento y desarrollo de las plantas. La naturaleza y cantidad de metabolitos secundarios que se ven afectados por la temperatura, lluvia, orientación, duración del día (incluyendo la calidad de la luz) y altitud (Osorio, 2009).

**Tabla 38. Factores que influyen en la calidad y concentración de los metabolitos secundarios**

Factor	Influencia
Temperatura	Es un factor de importancia para el desarrollo y metabolismo de las plantas. Aunque se ha logrado una adaptación a distintas temperaturas, la formación de esencias tiende a elevarse en temperaturas altas, aunque en días muy cálidos también suelen existir pérdidas.
Lluvias	Los efectos de la lluvia deben considerarse en relación a las lluvias anuales y su distribución a través del año, su efecto en la humedad y su efecto con las propiedades de retención del agua del suelo. Una lluvia continua puede llegar a una pérdida de sustancias hidrosolubles de las hojas y de las raíces. Esto se relaciona con los bajos rendimientos de algunos principios activos en estaciones húmedas.
Duración del día y características de las radiaciones	Las plantas varían mucho en sus necesidades, tanto respecto a la cantidad como a la intensidad de la luz requerida, interviniendo en la concentración de los principios activos.
Altitud	Las concentraciones de los principios activos varían según la altitud

En resumen, la concentración de los principios activos o metabolitos secundarios de la materia vegetal *Tagetes nelsonii* Greenm, se vieron afectados por múltiples factores que incluyen desde la recolección, época de recolección, edad de la planta en la que se hizo la recolección, además del clima en el que se dio la recolección, pues al menos el lote que se recolectó en diciembre se realizó, en días de intensas lluvias y como se ha mencionado anteriormente puede existir una pérdida de principios activos hidrosolubles, cuando se presentan estos casos.

Respecto al aceite esencial, que sí presentó actividad antimicrobiana. Se conoce que el género *Tagetes* presenta un metabolito llamado E-tagetona, que es un monoterpeno no cíclico, junto con otros compuestos como la dehidrotagetona y ocimenona, confieren el olor de las especies. También se conoce que presenta un compuesto Cristenona, que presenta actividad antimicrobiana contra *Salmonella*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Fusarium* y *Aspergillus*.  $\alpha$ -Thujeno y  $\alpha$ - pineno, también son metabolitos presentes en el género *Tagetes* los cuales contribuyen a su actividad antimicrobiana (Díaz, Serrato, & Arce, 2002). Sin embargo, la actividad antimicrobiana se dio a concentraciones elevadas, atribuyendo esto a la etapa en que se presentaba la Chilchagua.

Por último y ya como propuesta, sería importante completar el estudio realizando el ensayo pero con material vegetal en época de floración, para así obtener resultados de todo el ciclo fenológico y hacer un análisis completo de resultados.

## 5. Conclusiones

- Se determinó que la actividad antimicrobiana de los extractos vegetales de *Tagetes nelsonii* Greenm es nula en sus extremos de vida, a excepción del aceite esencial el cual si presentó actividad antimicrobiana a concentraciones elevadas (250  $\mu$ L-125  $\mu$ L).
- Se identificó taxonómicamente la materia vegetal *Tagetes nelsonii* Greenm en el Herbario IZTA de la FES-Iztacala, UNAM.
- Se seleccionó el método de maceración, como técnica de extracción adecuada para la obtención de los extractos vegetales de *T. nelsonii* Greenm y para el caso del aceite esencial la técnica seleccionada fue la hidrodestilación adaptado con una trampa tipo Clavenger.

## 6. Prospectivas

- Se propone realizar la identificación y cuantificación de los componentes del aceite esencial de *Tagetes nelsonii* Greenm.
- Se sugiere realizar la determinación de la actividad antimicrobiana de los extractos vegetales y del aceite de *Tagetes nelsonii* Greenm, en época de floración, para así comparar los resultados obtenidos.
- Se plantea el diseñar protocolos para corroborar, las otras razones por las que los pobladores de Chiapas la consumen, es decir, comprobar su actividad antiparasitaria, analgésica y diurética.

## 7. Anexos

### 7.1. Anexo I (Certificado de Identificación Taxonómica).

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA  
SECRETARÍA GENERAL ACADÉMICA  
CARRERA DE BIOLOGÍA



FESI/HN/015/2015

**MARY CARMEN JUÁREZ RAYA**  
Alumna de la Carrera de Bioquímica Diagnóstica,  
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM,  
Presente

Por este conducto me permito proporcionar a usted la identificación taxonómica del material botánico de respaldo del proyecto de investigación: **“Determinación de actividad antimicrobiana de los extractos vegetales de *Tagetes nelsonii* Greenm (ASTERACEAE)”**, que se realiza en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM bajo la dirección de la QFB Brígida del Carmen Camacho Enríquez.

Así mismo, le informo que la planta ha sido integrada en la Colección Etnobotánica del Herbario de Iztacala con el siguiente número de registro:

NOMBRE CIENTIFICO	FAMILIA	NOMBRE POLPULAR	NO. DE REGISTRO
<i>Tagetes nelsonii</i> Greenm	ASTERACEAE/ COMPOSITAE	“Chilchagua”	2411 IZTA

Sin otro particular le envío un cordial saludo.

**ATENTAMENTE**  
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”  
Los Reyes Iztacala, Edo. de México, 23 de febrero de 2015



**M. EN C. MA. EDITH LÓPEZ VILLAFRANCO**  
RESPONSABLE DEL HERBARIO IZTACALA



Herbario IZTA  
Edificio L4, Planta baja  
Av. de los Reyes No. 1  
Los Reyes Iztacala, Tlaxtepec  
Estado de México, CP 54093 MÉXICO  
Tel/Fax: 5623-1376  
herbario\_izta@compuserver.unam.mx



Edificio de gestión: primer piso  
Tel: 5623-1147-5623-1-49  
Fax: 5623-1149  
Av. de los Reyes No. 1, Los Reyes Iztacala,  
Tlaxtepec, CP 54093,  
Estado de México, México



## 7.2. Anexo II

- **Guignard:** Se impregna una tira de papel filtro con reactivo de Guignard, se coloca en la boca de un matraz Erlenmeyer, que contenga 1g de materia vegetal húmeda, esto debe ser en baño María por 10 minutos. El cambio de color de la tira a rojo-rosa es positivo a Glucósidos cianogenéticos
- **Dragendorff:** La fracción disuelta en 1mL de HCl al 1%, sin disolvente orgánico; se mezcla con gotas del reactivo. La aparición de un precipitado rojo ladrillo, indica la presencia de alcaloides.
- **Liebermann-Buchard:** La fracción disuelta en 1mL de cloroformo se le añade 1mL de anhídrido acético y se mezcla. Por la pared del tubo se dejan caer 3-4 gotas de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado. Un color verde-verde oscuro, indica la presencia de triterpenos y/o esteroides.
- **Börntrager:** La fracción disuelta en 1mL de cloroformo, se agita con 1mL de hidróxido de sodio al 5%. Sí, la fase alcalina se colorea de rosa-rojo, esto indica la presencia de quinonas.
- **Baljet:** La fracción disuelta en 1mL de etanol, se le añade una mezcla recién preparada de 1mL de ácido pícrico al 1% en etanol y 1mL de NaOH al 10% en agua. Un color o precipitado rojo naranja indica la presencia de agrupamientos lactónicos.
- **Sudán III:** Cuando un extracto etéreo se evapora en presencia de una solución de Sudán III 0.6% en glicerina-agua 1:1. En un vidrio de reloj colocar una gota de extracto y añadir 2-3 gotas de reactivo de Sudán. La aparición de gotas oleosas de color rojo oscuro, indica la presencia de lípidos y/o aceites esenciales.
- **Fehling:** La fracción concentrada a seco se trata con una mezcla recién preparada de 1mL de Fehling A y 1mL de Fehling B. se calienta a baño María por 15-30 minutos. La aparición de un color o precipitado rojo indica la presencia de azúcares reductores.
- **Espuma:** La fracción disuelta en 1mL de etanol se le adiciona 10 mL de agua tibia y se agita la mezcla fuertemente durante 2 minutos. La aparición de espuma jabonosa que se mantenga por más de 5 minutos, indica la presencia de saponinas.
- **Rosenthaler:** La fracción disuelta en 1 mL de etanol se le adiciona una gota de reactivo de Rosenthaler y 1-2 gotas de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado. Las saponinas de triterpenos pentacíclicos dan un color violeta.
- **Cloruro Férrico:** La fracción disuelta en 1 mL de etanol, se le añade 3-4 gotas del reactivo de cloruro férrico. La aparición de un color o precipitado verde oscuro indica la presencia de fenoles y/o taninos.

- **Aminas:** A la fracción disuelta en 1mL de etanol se le adiciona 1 mL de solución de ninhidrina al 5% en etanol. Se calienta a baño María por 5-10 minutos. Si aparece una coloración azul o violeta el ensayo es positivo a aminas.
- **Ácido Silicotúngstico:** El filtrado en HCl diluido se toma 1 mL y se mezcla con gotas del reactivo de Ácido Silicotúngstico. La presencia de un precipitado blanco y fino indica la presencia de alcaloides.
- **Hager:** El filtrado en HCl diluido se toma 1 mL y se mezcla con gotas del reactivo de Hager. La aparición de agujas de color amarillo indica la presencia de alcaloides.
- **Shinoda:** La fracción en disuelta en 2mL de agua o etanol, se añade un pedacito de magnesio metálico y por la pared del tubo se añade H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado. La aparición de colores del anaranjado, rojo, rojo azulado o violeta, indica la presencia de flavonas, flavononas, flavonoles, flavononoles o xantonas.
- **Amoniaco:** Se impregna una tira de papel filtro con extracto diluido, se deja secar a temperatura ambiente, posteriormente se somete a los vapores de amoniaco. La aparición de un color amarillo ocre se considera positiva para flavonoides.
- **Gelatina:** Colocar 1 mL de extracto y mezclar con 1 mL re reactivo Gelatina. La precipitación de la proteína será positivo para
- **Kedde:** La fracción disuelta en 1mL de etanol se trata con una mezcla recién preparada de 1mL de ácido 3-5 dinitrobenzoico al 2% en metanol y 1 mL de KOH al 5.7% en agua. El desarrollo de una coloración violeta entre 1-10 minutos indica la presencia de glicósidos cardiotónicos.



## 8. Referencias

- Acosta, L. (24 de octubre de 2009). *Herbociencia.com.ar*. Recuperado el 1 de septiembre de 2015, de <http://www.herbotecnia.com.ar/c-public-010.html>
- Almaguer, J. y. (2003). *Relación Intercultural con la medicina tradicional*. México: Secretaria de Salud.
- Araujo, J. (2008). Actividad antimicrobiana de plantas. *Alimentos naturales*.
- Ávalos, A. y. (2009). Metabolismo secundario de Plantas. *Reduca. Serie de fisiología Vegetal*, 3(2), 119-145.
- Ávalos, T.; Chalala, M.; Rodríguez, C.; Ramos, R.; Carballo, C. y Cabezas, C. (2000). Lavado y desinfección de drogas vegetales. Normas técnicas. Proceso Tecnológico (proyecto). Departamento de control microbiológico del centro de Investigación y desarrollo de Medicamentos. México:
- Barrera, R. (2008). *Fitoquímica y evaluación farmacológica de las propiedades sedantes de extractos de las hojas de Casimiora edulis llave y lex*. México: UNAM.
- Bedoya, L., Palomino, S., Abad, M., & Bermejo, P. y. (2002). Screening of selected plants extracts for in vitro activity on human inmunodeficiency virus. *Phytother Res*, 16, 550-554.
- Butrón, A. y. (2008). *Fitoquímica y actividad antimicrobiana de las cumarinas*. México: UNAM.
- Cabrera, A., Crisci, J., Delucchi, G., Freire, S., Giuliano, A., Katina, I., Urtubey, E. (2002). *Catálogo ilustrado de las compuestas de la provincia de Buenos Aires, Argentina: Sistemática, Ecología y usos*. Argentina: Secretaria de Política ambiental.
- Cebraín, J. (2009). Diccionario integral de plantas medicinales. España: Egedsa RBA libros.
- Corzo, D. (2012). Evaluación antimicrobiana del extracto etanólico. *Revista mexicana de ciencias farmacéuticas*, 81-86.
- Cowan, M. (1999). Plant Products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiological Review*, 4(12), 564-582.
- Cruz, S. (15 de Agosto de 2007). *Más de 100 plantas medicinales*. Obtenido de <http://www.Fitoterapia.net./biblioteca/100PM.pdf>
- Díaz, F., Serrato, M., & Arce, M. y. (2002). Composición del aceite esencial de Tagetes lacera, planta endémica de Baja California sur, México. *Revista Mexicana de biodiversidad* (83), 543-547.

- Domingo, D. y. (2003). Plantas con acción antimicrobiana. *Revista Española Quimioterapia*, 4(16), 385-393.
- Domínguez, X. (1992). *Química Orgánica*. México: Continental.
- Estrada, L. (1989). *Códice Florentino. Su información etnobotánica*. México: Colegio de Postgraduados.
- Etaio, I. (2007). *Guía para la evaluación sensorial de la calidad de los vinos tintos de Rioja Alavesa: vinos jóvenes y vinos con crianza en bodega*. España: Servicio central de Publicaciones del gobierno Vasco.
- Fagetti, A. (2007). *Fundamentos de la Medicina tradicional Mexicana*. México: Universidad Autónoma de Puebla.
- Folashade, O. (2012). Standardization of herbal medicines. *International Journal of biodiversity and conservation*, 101-112.
- Fuertes, C., & Roque, M. y. (1997). *Flavonoides y alcaloides de Lupinus ballianus con actividad antimicrobiana y antifúngica*. Instituto de microbiología UNMSM.
- Gamma, M. (1997). *Biología*. México: Pearson educación.
- Gil, P. (2002). *Productos naturales*. España: Universidad Pública de Navarra.
- Gordaliza, M. (19 de mayo de 2015). Los compuestos naturales son una fuente muy importante de nuevos fármacos. *Noticias de la Ciencia y la tecnología*.
- Jacinto, G. (2015). *Estudio de la acción antibacteriana inhibitoria de las plantas medicinales Punica granatum, Schinus molley Aloysia triphylla, cultivadas en el campus II de la FES Zaragoza*. México : UNAM.
- Llerena, A. (2011). Metabolitos secundarios. *Tercer congreso Latinoamericano de Agroecología* (págs. 1-32). México: Universidad de Chapingo.
- Lynn. (8 de agosto de 2015). *munsellcharts*. Obtenido de [www.://envirothonpa.org/documents/munsellchart.pdf](http://www.://envirothonpa.org/documents/munsellchart.pdf)
- Maguna, E. (24 de agosto de 2006). *Actividad antimicrobiana de un grupo ed terpenoides*. Obtenido de Universidad nacional del Nordeste.
- Matthew, H. y. (2002). *Antimicrobial use and antimicrobial resintance: A population perspective*. Massachuseth USA: Harvard school of publcal health.
- Nikolai, S. (2000). *Fundamento de tecnología de productos fitoterapéuticos*. Colombia: Convenio Andrés Bello.

- OMS. (2003). Directrices de la OMS sobre Buenas Prácticas Agrícolas y de Recolección (BPAR) de plantas medicinales. Ginebra: Catalogación por la Biblioteca de la OMS
- Orafidiya, L., & Agbani, E. O. (2002). Preliminary clinical test on topical preparations of *Acinum gratissimum* Linn leaf essential oil for the treatment of *Acne vulgaris*. *Clin Drug(2)*, 313-319.
- Ortiz, A. (2009). *Bioactividad del extracto etanólico de Tagetes lucida Cav. sobre diversos hongos y bacterias fitopatógenos*. México: UNAM.
- Osorio, E. (2009). *Aspectos básicos de farmacognosía*. Colombia: Uiversidad de Antioquia.
- Riguelete, J. y. (2013). *Productos Naturales Vegetales*. Argentina: Universidad de la Plata.
- Rojas, M. (2009). *Tratado de Medicina tradicional mexicana*. México: TlahuiEdu.
- Rosales, R., Garza, M., Arias, C., Rodriguez, M., Fattel, F., Arce, P., Villa, T. (2007). Aqueous crude extract of *Rhoeodiscolor*, a mexican medicinal plant, decreases the formation of liver preneoplastic foci in rats . *Journal of Ethnopharmacology*, 13, 382-386.
- Senthilkumor, M., & Gurumoorthi, P. y. (2005). Antibacterial potential of some plants used by tribals in Maruthamalai hills, Tamil Nadu. *Natural Products adiance*, 4(1), 27-34.
- Serrato, M. (2009). *Información documental sobre la Taxa Tagetes para dimensionar su centro de origen en y diversidad genética en México*. México: Universidad Autónoma Chapingo.
- Serrato, M. (2010). *Información documental sobre el taxa Tagetes para dimensionar su centro de origen y diversidad genética en México (informe final)*. México: CONABIO.
- WHO. (1998). Quality control methods for herbal materials. Geneve: WHO Library Cataloging in Publication data.
- Zampini, C., & Cudmani, N. e. (2007). Actividad Antimicrobiana de plantas medicinales argentinas sobre bacterias antibiótico-resistentes. *SciELO*, 4.
- Zolla, C. (11 de Julio de 2012). La medicina tradicional, fundamental para la salud del mexicano. *Boletín UNAM*.