



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

LABORATORIO DE INMUNOBIOLOGÍA

**Efecto *in vitro* del extracto metanólico de *Tagetes lucida*  
sobre *Naegleria fowleri*.**

**Tesis**

**Que para obtener el Título de Bióloga**

**PRESENTA**

**MARÍA ISABEL SALINAS DE LA CRUZ**

**ASESOR: DR. MARCO AURELIO RODRÍGUEZ MONROY**



**Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México, 2017.**



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.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Estudios Superiores Iztacala.

Al Dr. Marco Aurelio Rodríguez Monroy, Dra. Ma. Margarita Canales Martínez, Dra. Patricia Bonilla Lemus, Dr. Oscar de Jesús Nieto Yáñez, M. en C. Luis Antonio Hernández González, a quienes agradezco infinitamente por las observaciones y revisiones en la evolución y conclusión de mi tesis.

Este trabajo fue financiado por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), con los proyectos: PAPIIT IN213713, IN211614

## DEDICATORIAS

A mis padres Arturo y Leonor por darme una hermosa familia, su amor incondicional y por creer en mí siempre. A ti papi que hasta el cielo te comparto mi logro, por todos los sacrificios que hiciste por nuestra familia, te quiero y te extraño. A ti mami por no dejarme caer nunca, por tu apoyo y tener las palabras de aliento que siempre necesito. Gracias por forjar a una persona que alcanza sus anhelos.

A mis hermanos Arturo y Jimena por ser mis compañeros en las alegrías y en las tristezas, por su apoyo y por esas veces que siempre me han sacado una sonrisa y enseñarme que de eso se trata la vida, de reír siempre.

A mi abuelita Koy por enseñarme que jamás debo de darme por vencida, le agradezco todo lo que ha hecho por mí; jamás me alcanzará la vida para regresarle algo de lo mucho que usted ha hecho por mí, la quiero mucho.

A mis Tíos Lucy y Carlos por su apoyo y cariño incondicional, nunca me han dejado sola.

A mi hija Valentina desde tu nacimiento has sido mi alegría, mi motivo de superación, te quiero mucho mi niña hermosa, por esos días en que tu sonrisa remedia cualquier cosa. Eres mi motivo para ser una mejor persona.

A mis amigos Mariana, Adriana, Mónica, Blanca y Donovan por su amistad y los grandes momentos que pasamos durante nuestra carrera Universitaria.

A mis amigos del Laboratorio Claudia, Grace, Mari, Ceci, Oscar, Rebeca por los consejos y los excelentes momentos que pasamos.

Y finalmente al Dr. Marco Aurelio Rodríguez Monroy por su paciencia, por todo el conocimiento, la amistad, los consejos y la guía para la realización de mi trabajo. Gracias.

## ÍNDICE

RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
MORFOLOGÍA Y CICLO DE VIDA DE <i>N. fowleri</i> .....	4-7
MENINGOENCEFALITIS AMEBIANA PRIMARIA.....	8
TRATAMIENTO.....	9
MEDICINA TRADICIONAL.....	10
PLANTAS MEDICINALES.....	11
METABOLITOS SECUNDARIOS.....	11
FAMILIA <i>ASTERACEAE</i> .....	16
ANTECEDENTES.....	20
OBJETIVOS.....	22
MATERIAL Y MÉTODOS.....	23
RECURSOS BIOLÓGICOS	
Cultivo de células de cérvix humano cancerígenas, CaSki.....	23
Reactivación de la virulencia de trofozoítos de <i>N. fowleri</i> .....	24
Curva Patrón de la virulencia de trofozoítos de <i>N. fowleri</i> .....	24
Bioensayo del extracto de <i>T. lucida</i> .....	26
Ensayo de citotoxicidad.....	26
Caracterización química .....	27
RESULTADOS	
Curva patrón para los ensayos de viabilidad de los trofozoítos de <i>N. fowleri</i> .....	29
Efecto <i>in vitro</i> del extracto metanólico de <i>T. lucida</i> sobre <i>N. fowleri</i> .....	30

Curva de Anfotericina B.....	31
Citotoxicidad celular.....	32
Fotografías de células CaSki.....	33
Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) del extracto de <i>T. lucida</i> .....	34
CG-EM del extracto metanólico de <i>T. lucida</i> .....	36
DISCUSIÓN.....	37
CONCLUSIONES.....	41
Referencias.....	42

## ÍNDICE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida de *N. fowleri*

Figura 2-3-4. Estadios morfológicos de *N. fowleri*.

Figura 5. *T. lucida Cav.*

Figura 6. Descripción de *T. lucida Cav.*

Figura 7. Distribución de *Tagetes lucida Cav.*

Figura 8. Curva patrón de viabilidad celular

Figura 9. Interacción del extracto metanólico de *T. lucida* sobre *N. fowleri*

Figura 10. Curva patrón de la Anfotericina B

Figura 11. Interacción del extracto metanólico de *T. lucida* sobre células CaSki

Figura 12. Fotografías de Células CasKi tomadas con Microscopio Óptico.

Figura 13. HPLC del extracto metanólico de *T. lucida*

Figura 14. CG- EM metanólico de *T. lucida*

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Número de células por pozo para el ensayo de Viabilidad Celular por Cristal Violeta

Cuadro 2. Tiempo de Retención y UV máxima del extracto metanólico de *T. lucida*.

## LISTA DE ABREVIATURAS

**AVL** ----- Amebas de Vida Libre

**MAP**-----Meningoencefalitis Amebiana Primaria

***N. fowleri***-----*Naegleria fowleri*

**AMB**-----Anfotericina B

**CL**-----Concentración Letal

**CI**-----Concentración Inhibitoria

**CaSki**-----Células humanas de cáncer cervicouterino

**HPLC**-----Cromatografía Líquida de Alta Resolución

**CG-EM** -----Cromatografía de gases acoplada a espectrometría  
de masas

**SNC**-----Sistema Nervioso Central

**CNI**----- National Cancer Institute

## RESUMEN

Las Amebas de Vida Libre son organismos cosmopolitas que cumplen muchas funciones en el medio ambiente, estas amebas se encuentran en el ambiente suelo-agua. Debido a su habilidad para vivir como organismos de vida libre y endoparásitos se les conoce también como anfizoicas. Dentro del grupo de Amebas de Vida Libre está *Naegleria fowleri*, que es responsable de ocasionar Meningoencefalitis Amebiana Primaria (MAP) una enfermedad letal y fulminante que avanza en pocos días desde su exposición por vía intranasal; el único agente anti-*naegleria* es Anfotericina B (AMB) un antimicótico altamente tóxico y conocido por sus fuertes efectos secundarios tal vez el más temido es la insuficiencia renal que puede ser temporal o definitiva.

México cuenta con zonas con alto potencial para la producción de hierbas finas, entre ellas las plantas medicinales que contienen principios activos, los cuales administrados correctamente producen efectos curativos; un ejemplo de esto es la especie *Tagetes lucida* una planta que ha demostrado un efecto antimicrobiano, antiinflamatorio, antioxidante y contra tumores; por estas propiedades es importante evaluar su potencial para combatir a *N. fowleri*.

En este trabajo se determinó el efecto del extracto metanólico de *T. lucida* sobre *N. fowleri*, donde la  $CL_{50}$  fue de 1.25 mg/mL. Así mismo para determinar la toxicidad del extracto se utilizaron las células CaSki y de acuerdo con el CNI de E.U; la Concentración Inhibitoria  $CI_{50}$  fue de 0.020 mg/mL determinando que el extracto no es tóxico.

Mediante el análisis de HPLC se encontró que los principales compuestos presentes en el extracto fueron los flavonoides. La Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de masas mostró que el compuesto mayoritario que se identificó fue la 7-metoxi-cumarina donde se observó que el extracto se compone en su mayoría de fenilpropanoides, destacando a las cumarinas que podrían ser uno de los compuestos responsables de la actividad antiamebiana.

## INTRODUCCIÓN

La mayoría de las bacterias, algas, hongos y protozoos son prácticamente inocuas en la naturaleza y constituyen una parte muy importante del ambiente. Sin embargo, cada día se descubre que microorganismos considerados de vida libre pueden actuar como parásitos patógenos de animales superiores.

Uno de estos hallazgos fue en 1958, cuando se descubrió que determinadas, amebas pequeñas del suelo y de agua que hasta entonces se consideraban inocuas, llegaba a colonizar los tejidos del hombre y de los animales, causando la muerte o daño cerebral irreversible [1].

Las Amebas de Vida Libre (AVL), se encuentran distribuidas alrededor de todo el mundo y se les localiza en todos los ambientes, terrestre, aéreo y acuático, en este último pueden ser localizadas desde el mar hasta pequeñas charcas [2], pero principalmente en las interfaces: agua-suelo, agua-plantas, agua-aire, etc. [3], en donde juegan un papel muy importante dentro del control poblacional de bacterias.

Estas amebas se encuentran en el ambiente suelo-agua, debido a su habilidad para vivir como organismos de vida libre y endoparásitos. Debido a lo anterior estas amebas también se les han llamado anfizoicas, (gr; amphi, ambos lados) porque además de vivir en el ambiente pueden parasitar a otros organismos [4].

Las amebas de vida libre producen en el hombre enfermedades de curso diverso; desde cuadros agudos y fatales con componentes de predominio necrótico a enfermedades crónicas con reacción inflamatoria granulomatosa. Las características de las enfermedades humanas producidas por estas amebas sólo han sido reconocidas durante los últimos 30 años. Debemos considerar a las amebas de vida libre como agentes infecciosos emergentes, tanto patógenos primarios como oportunistas, cuyo diagnóstico resulta muy difícil desde el punto de vista clínico y morfológico [5].

Dentro del grupo de Amebas de Vida Libre encontramos a los géneros *Naegleria*, *Acanthamoeba*, *Balamuthia* y *Sappinia* que son muy importantes desde el punto de vista médico pues son responsables de algunas enfermedades que afectan a seres humanos y animales.

Tal es el caso de *Naegleria fowleri* que es la responsable de una enfermedad mortal llamada meningoencefalitis amebiana primaria (MAP) [6]. Enfermedad que se desarrolla en pocos días después de la exposición con *N. fowleri* por transmisión vía nasal que causa la muerte entre tres o siete días; antes de que se pueda diagnosticar el agente infeccioso [7].

Cuando los síntomas y el diagnóstico son positivos a MAP, la anfotericina B ha sido la única y eficaz terapia durante los últimos 40 años. Su eficacia clínica no ha podido ser superada, pese a la aparición de anti fúngicos más modernos como el fluconazol [8]. El uso de AMB es motivo de preocupación debido a que induce una variada gama de reacciones adversas, como por ejemplo: fiebre, calofríos, náuseas, vómitos y cefalea. Se ha informado la aparición de shock anafiláctico, arritmias cardíacas, falla hepática, mialgias y convulsiones [8].

Quizá el efecto adverso más conocido y temido de la droga es la disfunción renal, la cual puede regresar a lo normal varias semanas después de cesado el tratamiento, o bien, evolucionar a una falla renal irreversible [8].

## **MORFOLOGÍA DE LAS AVL**

La palabra Ameba se deriva del griego: *amoibé*, que significa “cambio” y que se aplica en este caso al cambio constante de forma que presentan estos organismos.

Son organismos unicelulares, asexuales, cuyas dimensiones varían de unos cuantos micrómetros hasta algunos milímetros. Pueden estar desnudas o cubiertas por una testa; se mueven por medio de pseudópodos, que también usan

para fagocitar. Los tiempos de generación son variables y generalmente se incrementan con la temperatura [9].

En el ambiente las AVL se alimentan de bacterias, como *Legionella* y la mayoría de amebas forman quistes que son más resistentes a las condiciones adversas del medioambiente.

Los trofozoitos son de forma ameboidea, esta forma es elongada, con un extremo anterior redondeado y un extremo posterior más delgado; presentan un abundante citoplasma vacuolado o granular y un gran núcleo central, claro y redondo con un nucléolo esférico prominente; su movimiento, se realiza a través de pseudópodos gruesos y lobulares en el extremo más ancho [5].

La forma flagelar se presenta cuando las formas ameboideas se transfieren de agua destilada o con pocos nutrientes, particularmente a una temperatura de 27°C a 37°C. Tiene forma de pera un poco más pequeña y presenta dos flagelos en el extremo más ancho. Los quistes son redondeados, miden entre 7 µm y 10 µm, presenta un núcleo similar al de los trofozoitos y están rodeados por una pared lisa doble y gruesa. Tanto los trofozoitos, la forma flagelar y los quistes se presentan en el agua o suelo y en el líquido cefalorraquídeo de los huéspedes [5].

Se sabe que los trofozoítos de *N. fowleri* penetran por las fosas nasales y que alcanzan el SNC penetrando el neuroepitelio olfatorio, migrando a través de la placa cribiforme, hasta llegar a los bulbos olfatorios produciendo extensas áreas de necrosis.

## **CICLO DE VIDA**

El ciclo de vida de *Naegleria fowleri*, consta de tres estadios: ameba, flagelado y quiste, que son reversibles dependiendo de las condiciones ambientales en las que se encuentre el organismo. El estadio en la que se alimenta es el de trofozoito, en esta etapa se fija al sustrato y puede utilizar su amebostoma

(citostoma) [10], para alimentarse de poblaciones de microorganismos que se encuentren en su hábitat.

Cuando las condiciones son adversas: pueden transformarse en flagelado y migrar y buscar otros lugares donde las condiciones sean mejores para su desarrollo [11]. Sí lo encuentra se establece y se revierte a su estado trófico, si no es el caso, se cambia a quiste y queda en estado de latencia hasta que las condiciones mejoren.

Como parásito *N. fowleri* se sabe que su forma invasiva es el trofozoíto y la infección es adquirida por la instilación intranasal de la ameba, que invade la mucosa nasal y migra a través del nervio olfatorio hasta el bulbo olfatorio [9]. El contacto se da principalmente en nadadores y otras personas especialmente jóvenes que realicen actividades acuáticas, la vía de entrada es por la nariz por su fácil acceso [12]. Debido a su proximidad con el punto de entrada, los lóbulos frontales y olfatorios son los blancos iniciales de destrucción de la ameba [13].



Figura 1. Trofozoíto de *N. fowleri*

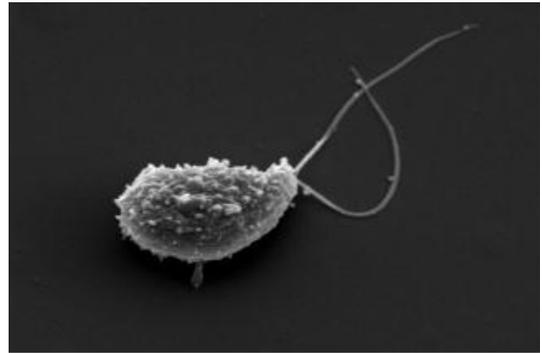


Figura 2. Estadio flagelar de *N. fowleri*

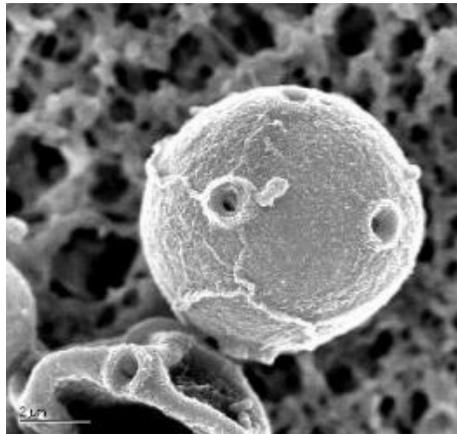


Figura 3. Quiste de *Naegleria fowleri*

Fotografías de estadios morfológicos de *N. fowleri*. Tomadas en microscopio electrónico de barrido [14].

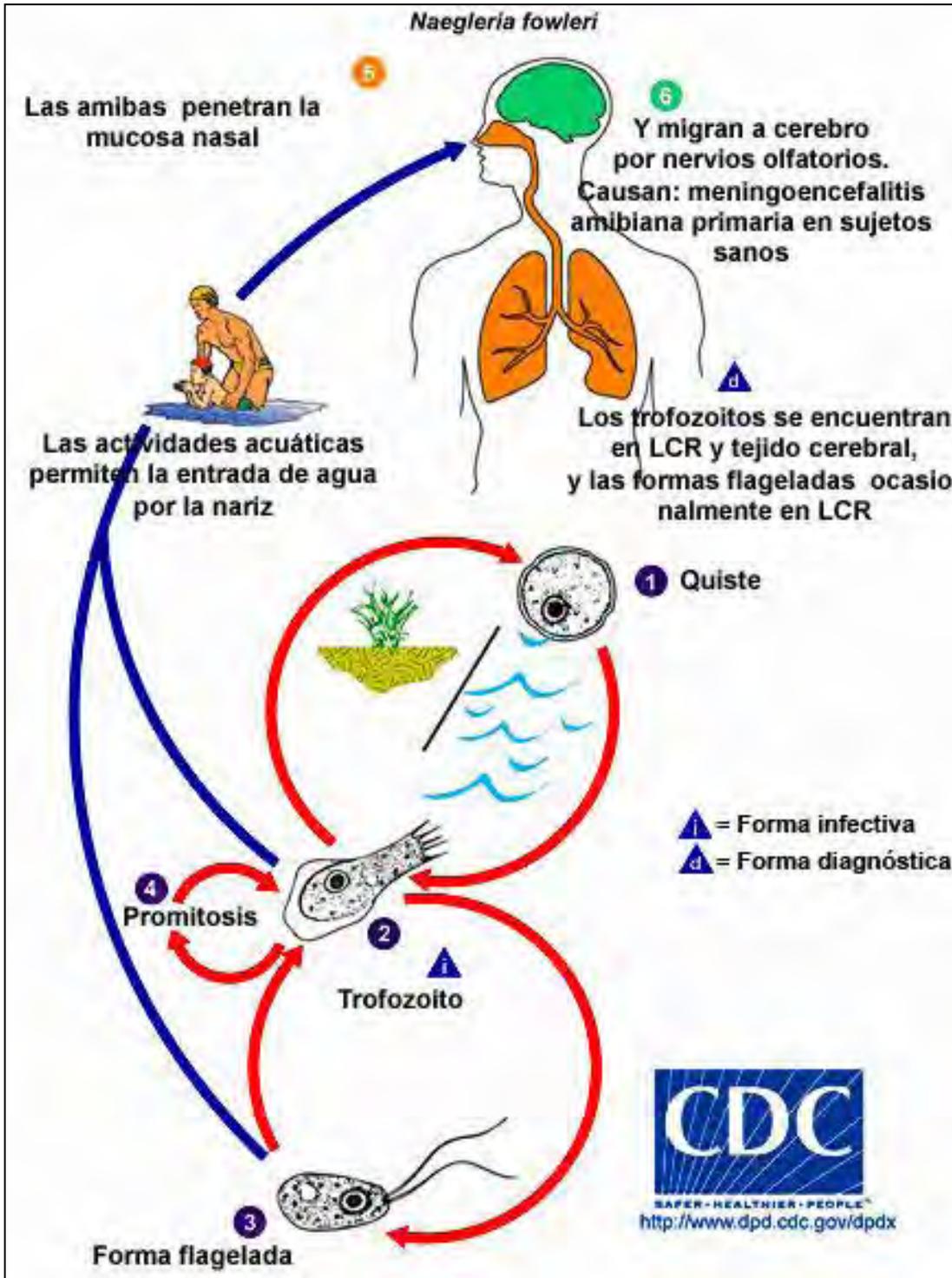


Figura 4. Ciclo de vida de *N. fowleri*.

## MENINGOENCEFALITIS AMEBIANA PRIMARIA

*N. fowleri* es el agente causal de la MAP la cual es una enfermedad aguda y rápidamente progresiva, es rara, al menos 250 casos han sido reportados en todo el mundo [15]. Sin embargo el número de casos va en aumento, con un desenlace fatal en casi todos los casos. En México se han reportado cerca de 35 casos, la mayoría de ellos en el noroeste del país [16] la presencia de AVL en esta región puede deberse a las condiciones presentes en el lugar, como: temperaturas extremas, la existencia de canales de irrigación, piscinas, balnearios y cuerpos de agua artificiales, que presentan una amplia variedad de estos organismos [17].

La mayoría de los casos han ocurrido en niños o adultos jóvenes con buena salud durante los meses de verano, los pacientes mostraban un historial de haber nadado o estado en contacto con agua contaminada con *N. fowleri* antes de contraer la enfermedad [17].

Los signos y síntomas que presentan los pacientes que contraen esta enfermedad van desde dolor de cabeza, náusea, vómito, fiebre alta a más de los 39°C, meningitis, anorexia, estupor y agitación [18]. La infección ocurre cuando la forma trófica entra en contacto con la mucosa nasal, el trofozoíto penetra la mucosa nasofaríngea y migra por el nervio olfatorio, e invade el cerebro a través de la placa cribiforme [19]. Llegando hasta los lóbulos olfatorio y frontal, en donde los trofozoítos comienzan a producir efectos citopáticos sobre los tejidos, a la vez que las defensas del paciente comienzan a actuar, sin embargo, el organismo comienza a producir niveles grandes de leucocitos (29,000 leucocitos/nm<sup>3</sup>) [17], la ameba empieza a proliferar y llega a superar las defensas del cuerpo del paciente, invadiendo otros tejidos cerebrales tales como el tallo cerebral y el cerebelo, produciendo daños irreversibles en el cerebro e inflamando las meninges [17]. Al ir engullendo la ameba los tejidos cerebrales, los pacientes van perdiendo sus capacidades, hasta llegar a caer en coma, que en la mayoría de los casos deriva en la muerte.

Durante la MAP los hemisferios cerebrales y el cerebelo muestran edema y una gran congestión. El bulbo olfatorio y los córtices orbitofrontales presentan necrosis y hemorragia [20].

## TRATAMIENTO

La MAP es una infección grave, por lo que requiere un tratamiento oportuno y eficaz cuando se detecta a tiempo para poder combatirla. En las últimas tres décadas, el agente de elección para iniciar el tratamiento de la mayoría de las micosis sistémicas ha sido el antimicótico Anfotericina B (AMB), que, a pesar de los efectos tóxicos descritos en la literatura mundial, continúa teniendo un papel importante en el tratamiento de las infecciones micóticas sistémicas [11].

De todos los agentes amebicidas actuales, la AMB es el único efectivo, tanto *in vivo* como *in vitro*, en animales de laboratorio. En algunos casos reportados se ha visto una mejoría en pacientes que han sido tratados con anfotericina B administrada por vía intravenosa y por vía intratecal [21].

La AMB, sigue siendo un fármaco socorrido por su amplio espectro hacia levaduras y hongos filamentosos, perfil de toxicidad conocido, que es posible de ser monitorizado y un costo relativamente bajo. Esta droga actúa sobre la membrana plasmática perturbando su permeabilidad selectiva y causando poros y por consecuencia, fuga de los componentes celulares [22]. Cuando el trofozoito de *N. fowleri* entra en contacto con la AMB ésta se redondea y es incapaz de formar pseudópodos y finalmente muere.

La administración de AMB se puede asociar a efectos adversos inmediatos, tales como fiebre, escalofríos, náuseas, vómitos, cefalea, *shock* anafiláctico, arritmias, falla hepática y también reacciones adversas que se presentan después de administraciones repetidas del medicamento, incluyendo en hipocaliemia, hipomagnesemia y toxicidad medular. Sin embargo, la toxicidad más preocupante y en la cual se ha centrado la mayoría de los estudios sigue siendo la nefrotoxicidad [23].

Es por esta causa que se buscan nuevas alternativas para encontrar nuevos tratamientos para aliviar la infección por *N. fowleri*, sobre todo si se toma en cuenta que las plantas medicinales han sido utilizadas para combatir ciertas enfermedades, ofreciendo una disminución de los efectos colaterales además de ser productos que están al alcance de un gran porcentaje de la población mundial [24].

### **MÉXICO Y SU MEDICINA TRADICIONAL**

Las plantas medicinales son aquellas que contiene en alguno de sus órganos, principios activos, los cuales administrados en dosis suficientes, producen efectos curativos en las enfermedades de los hombres y de los animales en general. Se calcula que de las 260 000 especies de plantas que se conocen en la actualidad el 10% se pueden considerar medicinales [25].

La diversidad de plantas medicinales disponible varía según las regiones y los ecosistemas de cada zona donde habitan, debido a ello se debe conservar el ambiente que las sustenta [26].

México cuenta con zonas con alto potencial para la producción de hierbas finas, su creciente demanda las ha convertido en productos con un nicho de mercado rentable y en expansión, además representan una alternativa económica a los cultivos tradicionales [27].

El origen que se conoce de las plantas medicinales y que han formado parte importante de la historia y de la cultura de los pueblos indígenas, se refiere a su uso y aplicación como remedio de enfermedades, pues constituye un conocimiento que, aún en nuestros días, se transmiten de forma oral de generación en generación [28].

## PLANTAS MEDICINALES

En los últimos 20 años, las plantas se diversificaron exponencialmente debido a la comercialización, o por continuar la práctica medicinal antigua. Además las investigaciones científicas dan sustento a su efectividad ya que su campo científico se genera a partir de su estudio y el análisis que se realiza de cuestiones farmacológicas y químicas extendiéndose a la identificación química de principios activos [29].

Las plantas medicinales contienen principios activos, que son los responsables de las propiedades terapéuticas que se les atribuye; por lo tanto, el metabolismo es el conjunto de reacciones químicas que realizan las células de los seres vivos para sintetizar sustancias complejas a partir de otras más simples, o para degradar las complejas y obtener las simples. Las plantas, además del metabolismo primario presente en todos los seres vivos, poseen un metabolismo secundario que les permite producir y acumular compuestos de naturaleza química diversa [30].

## METABOLITOS SECUNDARIOS

El conjunto de reacciones químicas que tienen lugar en un organismo constituye el metabolismo. La mayor parte del carbono, del nitrógeno y de la energía termina en moléculas comunes a todas las células, necesarias para su funcionamiento y el de los organismos. Se trata de aminoácidos, nucleótidos, azúcares y lípidos, presentes en todas las plantas y desempeñando las mismas funciones. Se denominan metabolitos primarios [30].

Pero a diferencia de otros organismos, las plantas destinan una cantidad significativa del carbono asimilado y de la energía a la síntesis de una amplia variedad de moléculas orgánicas que no parecen tener una función directa en procesos fotosintéticos, respiratorios, asimilación de nutrientes, transporte de solutos o síntesis de proteínas, carbohidratos o lípidos, y que se denominan

metabolitos secundarios (también denominados productos secundarios, productos naturales) [30].

Además de no presentar una función definida en los procesos mencionados, difieren también de los metabolitos primarios en que ciertos grupos presentan una distribución restringida en el reino vegetal, es decir, no todos los metabolitos secundarios se encuentran en todos los grupos de plantas [30]. A menudo su producción está restringida a un determinado género de plantas, a una familia, o incluso a algunas especies.

Algunos productos del metabolismo secundario tienen funciones ecológicas específicas como atrayentes o repelentes de animales. Muchos son pigmentos que proporcionan color a flores y frutos, jugando un papel esencial en la reproducción atrayendo a insectos polinizadores, o atrayendo a animales que van a utilizar los frutos como fuente de alimento, contribuyendo de esta forma a la dispersión de semillas [30].

Otros compuestos tienen función protectora frente a predadores, actuando como repelentes, proporcionando a la planta sabores amargos, haciéndolas indigestas o venenosas. También intervienen en los mecanismos de defensa de las plantas frente a diferentes patógenos, actuando como pesticidas naturales.

Es importante destacar que los metabolitos secundarios tienen un importante valor medicinal y económico, debido al uso en la industria cosmética, alimentaria y farmacéutica. Se agrupan en cuatro clases principales [30].

**TERPENOS.** Entre los que se encuentran hormonas, pigmentos o aceites esenciales.

**COMPUESTOS FENÓLICOS.** Cumarinas, flavonoides, lignina y taninos.

**GLICÓSIDOS.** Saponinas, glicósidos cardiacos, glicósidos cianogénicos y glucosinolatos.

**ALCALOIDES.** Son compuestos nitrogenados, de origen vegetal; se emplean como fármacos, actúan sobre el sistema nervioso.

Un gran número de estos productos naturales, ya se usaban en la medicina antigua como remedios para combatir enfermedades y en la actualidad se utilizan para la elaboración de medicamentos, resinas, gomas, potenciadores de sabor, aromas, colorantes etc. [30].

Es por esto que la medicina tradicional es reconocida hoy como un recurso fundamental para la salud de millones de seres humanos, un componente esencial del patrimonio tangible e intangible de las culturas del mundo, un acervo de información, recursos y prácticas para el desarrollo y el bienestar, y un factor de identidad de numerosos pueblos del planeta [31].

Es importante destacar que también reciben la denominación de productos naturales y tienen un importante y significativo valor medicinal y económico, derivado éste último de su uso en la industria cosmética, alimentaria y farmacéutica. Un gran número de estos productos naturales, que ya se usaban en la medicina antigua como remedios para combatir enfermedades, se utilizan en la actualidad como medicamentos, resinas, gomas, potenciadores de sabor, aromas, colorantes, etc. [32].

La medicina tradicional mexicana, como toda institución social, ha cambiado en el curso de los siglos, interactuando con otros modelos terapéuticos para conformar lo que llamamos el “sistema real de salud” de millones de mexicanos del siglo XXI, habitantes del campo y la ciudad. Asociada fuertemente a las plantas medicinales su recurso más abundante, accesible y conocido, la medicina tradicional es mucho más que botánica medicinal [33].

A partir de la aparición de las medicinas de farmacia, los médicos se olvidaron del uso de las plantas medicinales limitándose a recetar cosas caras, difíciles de conseguir y en varios casos con efectos peligrosos [28].

Es por este motivo que es necesario realizar estudios fitoquímicos, farmacológicos y toxicológicos de las plantas que resulten en el conocimiento y validación de las propiedades terapéuticas de los productos naturales, como una alternativa para la obtención de compuestos activos, útiles en el desarrollo de fármacos que permitan resolver problemas de salud tanto en los países en desarrollo como en los industrializados. La abundancia y diversidad de los recursos naturales del país, son fuente potencial para el hallazgo de estos compuestos con aplicación terapéutica [34].

Dentro de las aplicaciones terapéuticas se encuentra el uso de las plantas medicinales que se han utilizado como medicina para el tratamiento de una amplia gama de enfermedades. A pesar del gran avance observado en la medicina moderna en las últimas décadas, las plantas todavía hacen una enorme contribución a la salud [35].

Un ejemplo de esto, es la especie *Tagetes lucida* Linneo, una planta que ha demostrado tener un efecto antimicrobiano sobre diversos hongos y bacterias patógenas del hombre, y también propiedades antiespasmódicas, antisépticas, antidiarréicas, antiinflamatorias, antioxidantes, carminativas, digestivas, diuréticas, febrífugas, aromáticas y contra tumores [36, 37].

Se probaron los extractos metanólico y clorofórmico de *T. lucida*, así como los flavonoides y cumarinas aislados a partir de estos extractos, y reportaron su efecto sobre bacterias patógenas del hombre tales como *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella* sp., *Vibrio cholerae*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter agglomerans*, *Salmonella typhi*, *Shigella boydii*, *Yersenia enterocolitica*, *Bacillus subtilis*, *Sarcina lutea*, *Staphylococcus aureus*. Así como

sobre los hongos *Aspergillus niger*, *Fusarium moniliforme*, *Fusarium sporotrichoides*, *Rhizoctonia solani*, *Trichophyton mentagrophytes* [38].

También Hernández y colaboradores, reportan el efecto antimicrobiano del extracto de acetato de etilo del "pericón" como también se le conoce, sobre las bacterias *S. boydii*, *S. aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* y *Sarcina lutea*, identificando a las 5, 7,4'-trimethoxyflavona como el compuesto que confiere el efecto antibacteriano [39].

De manera general, diversos estudios han demostrado que las hojas y flores de las plantas de pericón contienen: aceite esencial (limoneno 16.5%;  $\beta$ -ocimeno 14%,  $\beta$ -cariofileno 28%, mirceno 4-5%, anetol, alilanol, estragol éter metílico de eugenol, tagetona) alcaloides cuaternarios, flavonoides (quercetagina, patuletina), saponinas, taninos, leucoantocianinas, ácido gálico, glucósidos cianogénicos, cumarinas (herniarina, dimetil alileter de 7 hidroxycumarina, 6, 7, 8-trimetoxicumarina) y pectina [37].

Se identificaron 30 compuestos presentes en el extracto de plantas de *T. lucida* colectadas en Costa Rica, donde el aceite esencial metil chavicol es el mayor constituyente con un 95-97 % [40].

El estudio más reciente sobre la composición fitoquímica de *T. lucida*, reporta que se aislaron e identificaron 7 cumarinas y 3 flavonoides presentes en los extractos metanólico y clorofórmico de las partes aéreas de *T. lucida* colectadas en Michoacán, México [38].

**FAMILIA ASTERACEAE**

***Tagetes lucida* Cav. (Pericón, Flor de anís)**

La Familia *Asteraceae* se encuentra ampliamente distribuida en el continente americano, y está conformada por 18 tribus; en la tribu *Tageteae* se encuentra *Tagetes*, que es uno de los ocho géneros que la integran [41]. El número de especies de *Tagetes* es de 55 [42] y México es un importante centro de diversidad, contando con 26 especies nativas [43, 44, 42].

Ocupa partes altas de laderas y montañas en bosque mesófilo de montaña, de encino, de pino, mixto de encino-pino y de junípero [45].



Figura 5. *Tagetes lucida* Cav.

**Clasificación taxonómica.**

**Reino** Plantae

**Subreino** Traqueobionta (plantas vasculares)

**Superdivisión** Spermatophyta (plantas con semillas)

**División** Magnoliophyta (plantas con flor)

**Clase** Magnolipsida (dicotiledóneas)

**Subclase** Asteridae

**Orden** Asterales

**Familia** Asteraceae

**Genero** *Tagetes*

**Especie** *Tagetes lucida*

**Otros nombres usados:**

Hierbanís, jericón, pericón vomol y Santa María [46]. En el Bajío se usa cuchrucumín, falso hipericón, flor de Santa María, hierba añil, pericón, periquillo y yerbanís; fuera de esta zona se conoce como tzitziqui y yiauhtli [47].

**Descripción:** El pericón es una hierba erecta de 30 cm a 1 m de altura, muy ramificada y que huele a anís. Las hojas son de un mismo ancho tanto en la parte axial, como en la distal, con los bordes dentados y de color verde oscuro, de olor y sabor a anís. Tiene las flores dispuestas en cabezuelas agrupadas en racimos, están en las partes terminales de la planta y son de color amarillo. Sus frutos son negros y pequeños (figura 6).



Figura 6. Descripción de *T. lucida*

### Hábitat y Distribución:

*T. lucida* es originaria de México, Guatemala y Honduras [48]. Crece de manera silvestre en lugares con clima templado húmedo a subtropical templado muy húmedo con lluvias en verano, a un rango de altitud de entre 1000 y 2600 msnm, a una temperatura promedio de 15 y 20 °C [49].

*T. lucida* Cav. Se distribuye en Mexico desde Sonora, Chihuahua y Nuevo León hasta Honduras [36].

En condiciones naturales se encuentra en suelos arcillosos y bien drenados, pero bajo cultivo responde mejor a suelos francos con suficiente materia orgánica [50,36,51].



Figura 7. Distribución de *T. lucida* Cav.

### USOS DE *T. lucida*

Las partes usadas principalmente son los capítulos y las hojas. El uso medicinal más frecuente de esta planta es en trastornos digestivos, principalmente para dolores de estómago (Guanajuato, Guerrero, Michoacán y Tlaxcala). También se le emplea en cólico estomacal, diarrea, disentería, empacho, tifoidea y vómito [45].

Asimismo, se recomienda en desórdenes ginecológicos como cólicos menstruales (dolor de regla), dismenorrea y cuando hay menstruación lechosa o blanca, para expeler el flujo, en baños de señora (baño para después del parto) y para poder tener hijos. Se prescribe para dolores en general, tales como los de espalda, de abdomen, cerebro, cuerpo, huesos, dolor de muela, rabadilla, dolor de riñón,

dolores internos y de "aire" (producidos por un cambio brusco de temperatura), enfriamiento localizado en cintura, oídos, cabeza y pecho; dolor y tos de naturaleza reumática, al igual que para cólicos abdominales y cólico de hombres. Además, es útil en problemas de reumatismo, inflamación, várices, nubes de los ojos, insomnio, resfriado, asma. Otras propiedades que se le atribuyen son como abortivo, carminativo, digestivo, contra *Ascaris* y el mal aliento [52].

### ANTECEDENTES

El extracto etanólico de pericón, sobre bacterias patógenas del hombre, reportando que el extracto presentó efecto antimicrobiano sobre las bacterias *S. aureus*, *Corynebacterium xerosis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus*  $\beta$  hemolítica, *Enterococcus faecalis*, *Mycobacterium phlei* y *E. coli*. Y sobre los hongos *Candida albicans*, *Candida stellatoidea*, *Geotrichum sp.*, *Candida krusei*, *Candida tropicalis* y *Cryptococcus neoformans* [51].

Compuestos fenólicos mostraron actividad antifúngica en contra de dos casos clínicos de *C. albicans*. Otro grupo es el de los flavonoides los cuales han sido reportados por ser compuestos antifúngicos de origen natural.

El  $\beta$ -Sitosterol un compuesto de *T. lucida* posee propiedades antiespasmódicas, digestivas, carminativas, diuréticas, antiinflamatorias tópicas, antibacterianas y antifúngicas, tonificante y equilibradora del sistema nervioso; el aceite esencial ha mostrado efectos espasmolíticos [53].

Es importante mencionar que a las cumarinas se le atribuyen propiedades antioxidantes, anticancerígenas, anti promotor de tumores, antidiabético y antimicrobiano; son utilizadas como fármacos antitumorales que inducen la muerte celular.

En 2013 se realizaron pruebas del aceite esencial de *T. lucida* encontrando que dichas muestras presentan un efecto fungistático. Así mismo se reportó que la alocriptopina posee propiedades bactericidas y fungicidas [52].

Se evaluó la actividad antifúngica y antibacterial de diferentes cumarinas, adicionalmente se corroboró su actividad contra las cepas micóticas *T. mentagrophytes* y *R. solani*, lo cual es un antecedente importante para combatir a *N. fowleri* debido a que la AMB es un antifúngico y es el único fármaco efectivo contra *N. fowleri* [38].

### JUSTIFICACIÓN

La infección Meningoencefalitis amebiana primaria ha sido descrita como una enfermedad fatal causada por *N. fowleri*. La combinación de fármacos empleados para combatir esta infección como lo son: rifampicina, fluconazol, anfotericina y azitromicina no garantizan una efectividad y pueden causar severos daños a los pacientes y es difícil determinar el mejor tratamiento dado que pocas personas sobreviven.

En los últimos años se ha resaltado el uso de los fenilpropanoides en aplicaciones farmacéuticas como antioxidantes, antivirales, antitumorales y fungicidas [54].

Asimismo, la escoparona, 6,7-dimetoxicumarina y la 6,7-dimetoxi-4-cumarina, presentaron actividad antifúngica contra *T. mentagrophytes* y *R. solani*. Por otra parte, se demostró que el extracto metanólico de *T. lucida* tiene actividad antimicótica e inhibe el crecimiento y un efecto fungistático sobre *C. albicans*; reportando además, que el extracto metanólico de *T. lucida* no es tóxico a nivel celular [52]. Con base en todo lo anterior, resulta importante probar el efecto del extracto metanólico de *T. lucida* sobre trofozoitos de *N. fowleri*, ya que como se ha mencionado anteriormente, esta ameba es muy susceptible al antimicótico AMB, pero lamentablemente es un compuesto altamente tóxico que provoca daños irreversibles.

## HIPÓTESIS

Si *N. fowleri* es susceptible al antimicótico Anfotericina B, y el extracto metanólico de *T. lucida* presenta una actividad antifúngica importante, entonces cabe esperar que este extracto tenga actividad sobre *N. fowleri*.

## OBJETIVOS

### Objetivo General

- Determinar la actividad *in vitro* del extracto metanólico de la planta *T. lucida* sobre la especie *Naegleria fowleri*.

### Objetivos Particulares

- Realizar una curva patrón para los ensayos de viabilidad de los trofozoítos de *N. fowleri* en cultivo axénico mediante la técnica de viabilidad celular por cristal violeta.
- Determinar la concentración letal (CL) y la concentración letal media (CL<sub>50</sub>) del extracto metanólico de *T. lucida* sobre *N. fowleri* mediante la técnica de viabilidad celular por cristal violeta.
- Determinar la toxicidad del extracto metanólico de *T. lucida* mediante la prueba de citotoxicidad con Células de Cáncer Cervicouterino.
- Caracterizar la composición química del extracto metanólico de *T. lucida* por HPLC (Cromatografía Líquida de Alta Resolución) y una Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### RECURSOS BIOLÓGICOS

#### **Amibas**

Son de la cepa ATCC-30808, de la especie *Naegleria fowleri* (donadas por la Dra. Patricia Bonilla del proyecto de Conservación y Mejoramiento del Ambiente CyMA de la F.E.S Iztacala).

#### **Extracto Metanólico**

El extracto metanólico de *T. lucida* fue proporcionado por la Dra. María Margarita Canales Martínez, del Laboratorio de Farmacognosia de la Unidad de Biotecnología y Prototipos (UBIPRO), F.E.S Iztacala.

#### **Ratones**

Para reactivar la virulencia de las amibas se utilizaron Ratones (*Mus musculus*) machos de la cepa BALB/c de seis semanas de edad.

#### **Cultivo de Amibas**

Se cultivaron axénicamente en frascos Corning de 75 cm<sup>2</sup> con 30 ml de medio Bactocasitona al 2% (DIFCO), enriquecido con suero fetal de bovino (SFB) al 10%, con antibiótico Antibac y se mantuvieron en incubación a 37°C para promover el óptimo crecimiento.

#### **Cultivo de células de cérvix humano cancerígenas, CaSki**

Se cultivaron en frascos Corning con filtro de 75 cm<sup>2</sup> con 30 ml de medio DMEM enriquecido con suero fetal bovino al 10%, posteriormente se incubaron con CO<sub>2</sub> al 5% y a 37°C. Estas células fueron donadas por el Dr. Alberto Parra de la ESM del IPN.

### **Reactivación de la virulencia**

Se realizó en 3 ratones anestesiados con éter, a los que se les inocularon por vía intranasal  $2.5 \times 10^4$  trofozoítos de *N. fowleri* a cada ratón utilizando una micropipeta. Los ratones se mantuvieron en observación durante 7 días aproximadamente, que es el tiempo durante el cual aparecen los síntomas y evoluciona la enfermedad, tomando nota de los cambios de comportamientos que se presenten durante este lapso de tiempo y haciendo pruebas de reacción a estímulos externos. Al momento de la muerte se extrajeron los cerebros y se recuperaron las amibas, las cuales se sembraron nuevamente y se inocularon a otro ratón [55].

### **Curva patrón para los ensayos de viabilidad Celular por Cristal Violeta.**

Una vez formada la monocapa de trofozoítos de *N. fowleri* en las cajas Corning se agregó una solución de PBS 1x estéril y se colocó la caja en el congelador por un lapso de 10 minutos esto para que las células se despeguen de la superficie de la caja. Transcurridos los 10 min la caja se llevó a una campana de flujo laminar y se golpeó ligeramente con la palma de la mano para recuperar el contenido en tubos estériles, esto procedimiento fue repetido en 2 ocasiones. Se centrifugaron los tubos con amebas por un tiempo de 10 minutos a 2500 rpm, se decantó el PBS 1x cuidando que la pastilla obtenida no se deseche.

A dicha pastilla se le agregó un volumen conocido de medio y se realizó el conteo mediante una cámara de Neubauer y un microscopio óptico. Después en una placa para cultivo celular con 96 pozos se le agregaron a cada pozo 100  $\mu\text{L}$  de medio, excepto en el primer pozo; se realizaron los cálculos para ajustar el número de amibas a  $2 \times 10^6$  en 200  $\mu\text{L}$  y se agregaron en el primer pozo con una micropipeta; se mezclaron muy bien las amibas del primer pozo procurando no hacer burbujas, después se tomaron 100  $\mu\text{L}$  y se pasaron al segundo pozo, mezclando y procurando no hacer burbujas; este procedimiento se hizo sucesivamente hasta el pozo número 12 [55].

POZO	No. de CÉLULAS
1	1 000 000
2	500 000
3	250 000
4	125 000
5	62 500
6	31 250
7	15 625
8	7 812
9	3 906
10	1 953
11	976
12	488

**Cuadro 1.** Número de células por pozo para el ensayo de viabilidad celular por cristal violeta.

Posteriormente se incubó a una temperatura de 37°C por 30 minutos; una vez que transcurrió este tiempo se eliminó el medio de la placa sacudiéndola, se lavó suavemente con solución salina estéril o PBS 1X estéril (dos veces), se fijaron las células con 100 µL de metanol por 30 segundos y se retiró el resto de metanol. Se agregaron con 100 µL de Solución de cristal violeta al 0.1% a todos los pozos (la solución se preparó al 0.1% y se disolvió en agua destilada). Se incubó de 10 a 15 min a temperatura ambiente en obscuridad.

Posteriormente se eliminó el colorante sacudiendo la placa, se lavó suavemente con PBS 1X. Se solubilizaron las células agregando 100  $\mu$ L de SDS al 1% (la solución se prepara con 1g de SDS y se disuelve en 100 mL de etanol al 50%). Finalmente se leyó en un lector de ELISA en un rango de onda de 570nm. La curva patrón obtenida se utilizó para determinar la CL y la CL<sub>50</sub> del extracto metanólico de *T. lucida*, siguiendo la técnica de viabilidad celular por Cristal Violeta, los valores de absorbancia se graficaron contra el número de amebas.

### **Bioensayo del extracto metanólico de *T. lucida***

Para probar el efecto del extracto metanólico de *T. lucida*, se colocaron en una placa de 96 pozos 15,000 trofozoítos por pozo (de la misma forma como se explicó anteriormente) en 150  $\mu$ L de medio de cultivo, a los pozos se les agregó diferentes concentraciones del extracto (de 40 a 0.020 mg/mL) y se incubaron a 37°C por un periodo de 24 horas.

Posteriormente, se realizó la prueba de viabilidad celular por cristal violeta siguiendo el mismo procedimiento que se explicó para la curva patrón.

Los valores que se obtuvieron se interpolaron en la curva patrón y se graficaron para obtener el resultado del número de trofozoítos, y de esta manera saber la concentración letal (CL) y concentración letal media (CL<sub>50</sub>) del extracto metanólico.

### **Ensayo del Citotoxicidad**

Este ensayo se realizó mediante la técnica de cristal violeta, en la cual se utilizaron células CaSki (células humanas de cáncer cervicouterino). Esta línea celular, tienen la propiedad de crecer de forma adherente al recipiente, y presentan morfología epitelial. Se cultivaron en medio de cultivo DMEM enriquecido con suero fetal bovino al 10%, y se incubaron con CO<sub>2</sub> al 5% a una temperatura de 37°C. Una vez saturada la caja de cultivo se despegaron las células agregando tripsina y dejando reposar 5 minutos a 37°C, una vez obtenidas las células se centrifugaron por 10 min a 1500 rpm para ser contadas en la cámara de Neubauer. En placas de cultivo celular de 96 pozos, se colocaron  $1.5 \times 10^4$  células CaSki en 100  $\mu$ L de medio las cuales se dejaron reposar por 30 minutos

para que se adhirieran a la placa. Posteriormente se añadieron las diferentes concentraciones del extracto de *T. lucida* partiendo de la concentración doble de la  $CL_{50}$  que se obtuvo y se realizaron diluciones seriadas para los siguientes pozos. Una vez realizado lo anterior, la placa se dejó incubar por un periodo de 72 horas a  $37^{\circ}C$ . La placa se lavó suavemente con solución salina o PBS 1 X estéril a  $37^{\circ}C$  (2 veces). Se fijaron las células con 100  $\mu L$  de metanol por 30 segundos. Se desechó el metanol y se agregó 100  $\mu L$  de solución de cristal violeta al 0.1% a todos los pozos y se dejó incubar de 10 a 15 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Se eliminó el colorante, sacudiendo la placa y se lavó suavemente con solución salina o PBS 1 X estéril a  $37^{\circ}C$  (2 veces). Se solubilizaron las células agregando 100  $\mu L$  de SDS al 1%. La placa se leyó en un lector de ELISA a una longitud de onda de 540nm.

Se determinó la  $CI_{50}$  (Concentración inhibitoria del 50% de la población) mediante un análisis de regresión no lineal exponencial.

### **Caracterización de la composición química del extracto metanólico de *T. lucida* por HPLC y CG-EM**

#### HPLC

La caracterización química se realizó mediante una cromatografía líquida de alta resolución (HPLC por sus siglas en inglés), utilizando una columna Discovery C-18, de 250 x 4.6 mm, tamaño de partícula 5  $\mu m$ . Corrida isocrática con mezcla de MeOH-acetonitrilo-agua (25-25-50), flujo de 1mL/min. Detector de arreglo de diodos (DAD) a longitud de onda de 260 nm con barrido completo de 200-400 nm.

#### CG- EM

Se realizó cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas utilizando el Cromatógrafo de gases Modelo 6850 de Agilent technologies, acoplado a un Espectrómetro de masas modelo 5975 con Columna RTX 30 m. de largo por 0.25 mm de diámetro interno por 25 micras de película.

Teniendo como parámetros los siguientes aspectos:

Condiciones de corrida:

- Temperatura del inyector: 250°C.
- Modo de inyección: Split.
- Radio: 33.5:1
- Flujo del Split: 29.9 mL/mn.
- Flujo de corrida: 35 cm/seg

Horno:

- Temperatura inicial: 70°
- Rampa de calentamiento: 8 °C por min hasta 270 °C
- Segunda rampa: 10 °C por min hasta 290 °C, se mantiene 6 min.
- Tiempo de corrida total: 35 min.
- Línea de transferencia: 290 °C.

## RESULTADOS

### Curva patrón para los ensayos de viabilidad de los trofozoítos de *N. fowleri*

Se realizó mediante la técnica de viabilidad celular por cristal violeta, donde la curva se obtuvo al graficar diferentes números de trofozoítos contra sus absorbancias (figura 8) y fue empleada para interpolar los datos obtenidos de las absorbancias de las interacciones del extracto metanólico de *T. lucida* sobre *N. fowleri*.

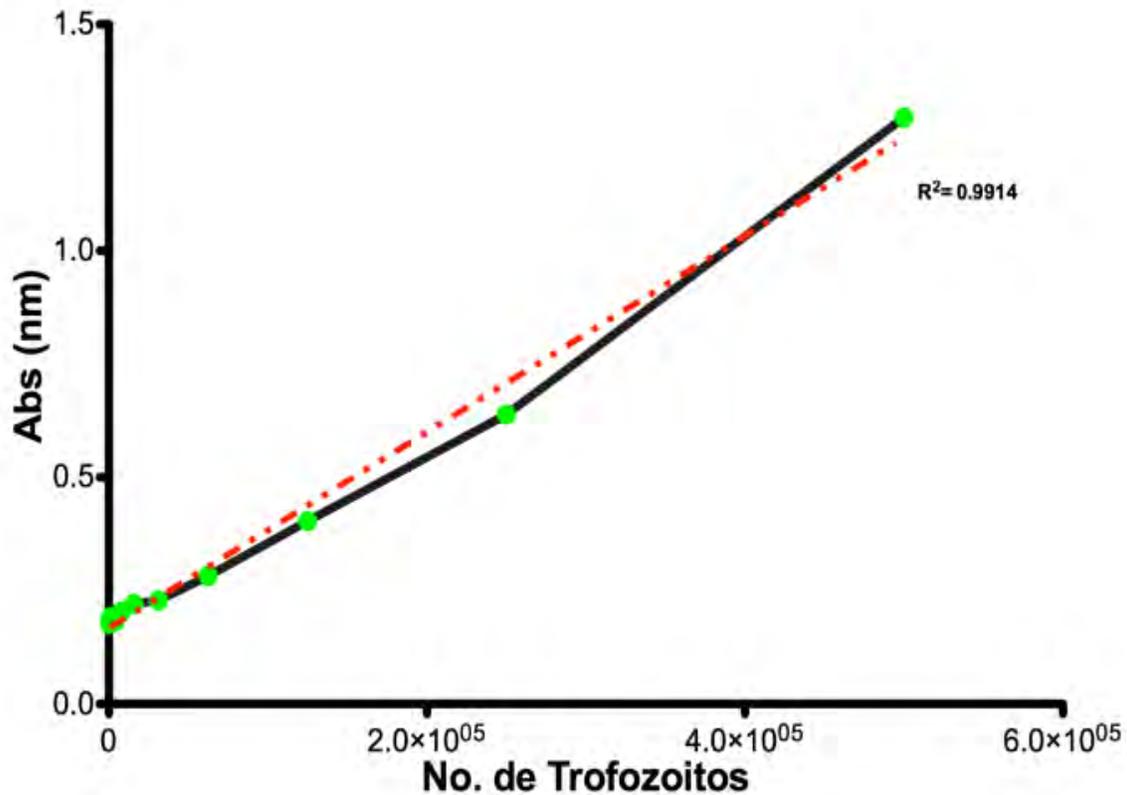


Figura 8. Curva patrón de viabilidad celular, los datos de absorbancia se tomaron a 570 nm.

**Efecto *in vitro* del extracto metanólico de *T. lucida* sobre *N. fowleri***

La interacción del extracto metanólico de *T. lucida* sobre *N. fowleri* se realizó mediante la técnica de viabilidad por cristal violeta donde la  $CL_{50}$  se obtuvo interpolando las absorbancias en la curva patrón. Se observó que el extracto tuvo un efecto dosis dependiente sobre *N. fowleri*, en el figura 9 se muestra la  $CL_{50}$  del extracto que fue de 1.25 mg/mL.

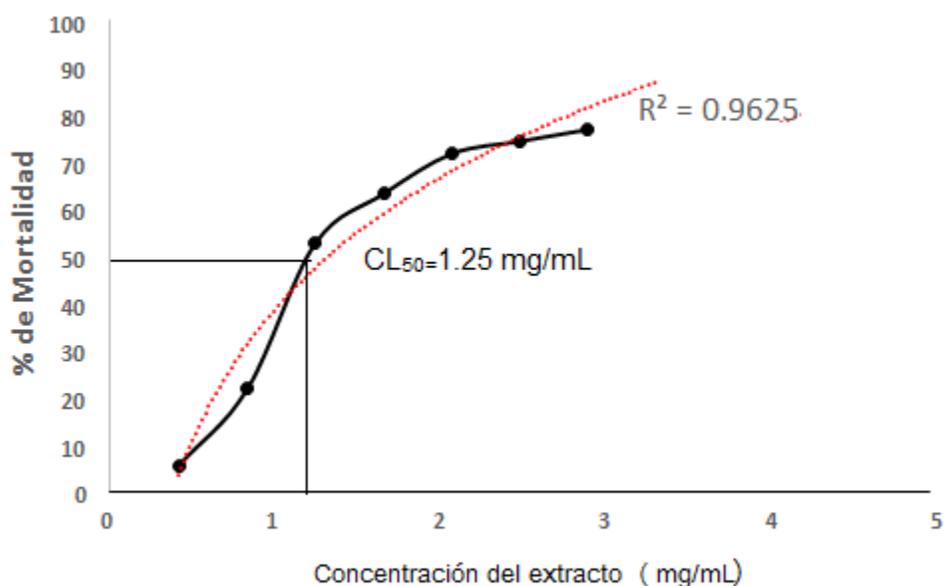


Figura 9. Interacción del extracto metanólico de *T. lucida* sobre *N. fowleri*, donde la concentración de la  $CL_{50}$  es de 1.25 mg/mL.

### Curva de AMB

Se realizó una curva para determinar el efecto de la AMB sobre trofozoítos de *N. fowleri*, donde se obtuvo una  $CL_{50}$  de  $0.113\mu\text{g/mL}$ , y comparando la  $CL_{50}$  obtenida del ensayo del extracto metanólico de *T. lucida* sobre *N. fowleri* que fue de  $1.103\text{ mg/mL}$  podemos decir que *N. fowleri* es más susceptible a la AMB que al extracto metanólico de *T. lucida* (figura 10).

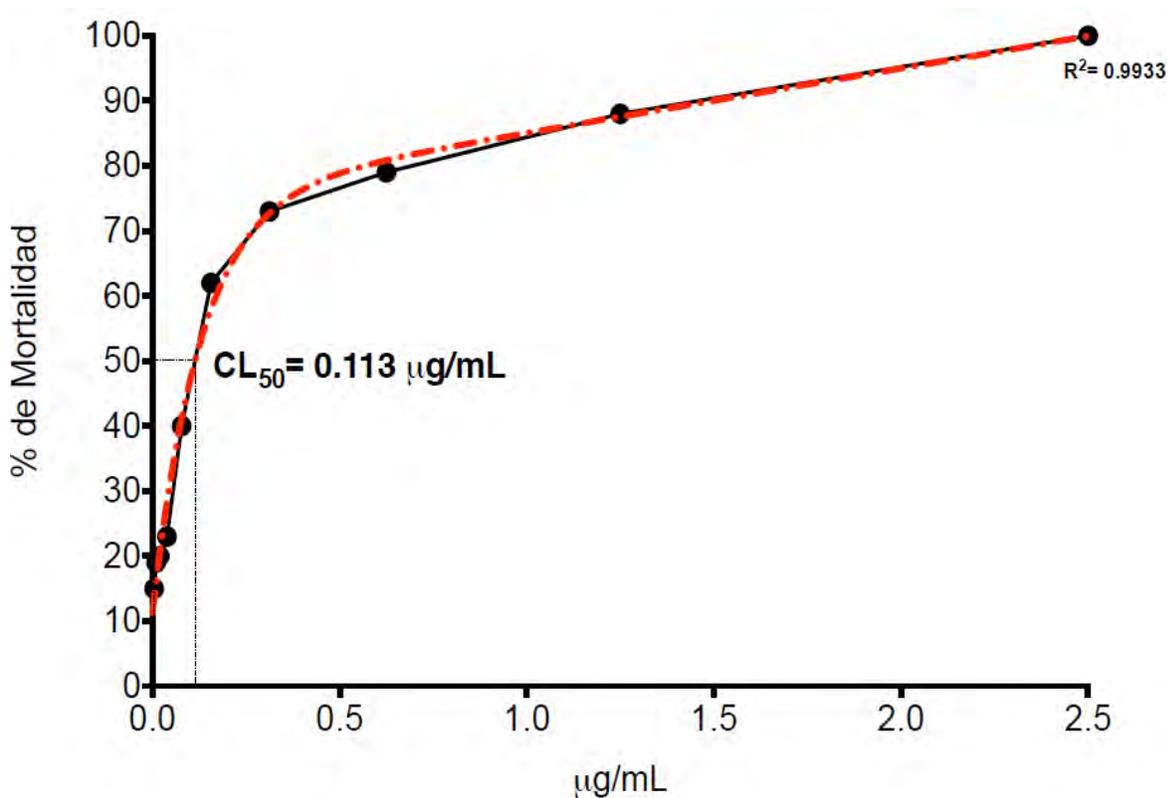


Figura 10. Interacción de *N. fowleri* con AMB

### Citotoxicidad celular

Una vez que se comprobó que el extracto presentó un efecto contra *N. fowleri*, se consideró importante evaluar si el extracto es citotóxico. Para esta técnica se utilizó la línea celular CaSki se determinó la  $CI_{50}$  (Concentración Inhibitoria del 50% de la población) mediante la técnica de viabilidad celular por cristal violeta, en la figura 11 se observa que la  $CI_{50}$  fue de 0.020 mg/mL, y tomando en cuenta el criterio del Instituto Nacional de Cáncer (NCI) que menciona que para un extracto se considere citotóxico la concentración debe ser igual o menor a 20  $\mu$ g/mL. Por lo tanto, lo anterior indica que el extracto de *T. lucida* no es citotóxico debido a que superó por mucho la concentración referida.

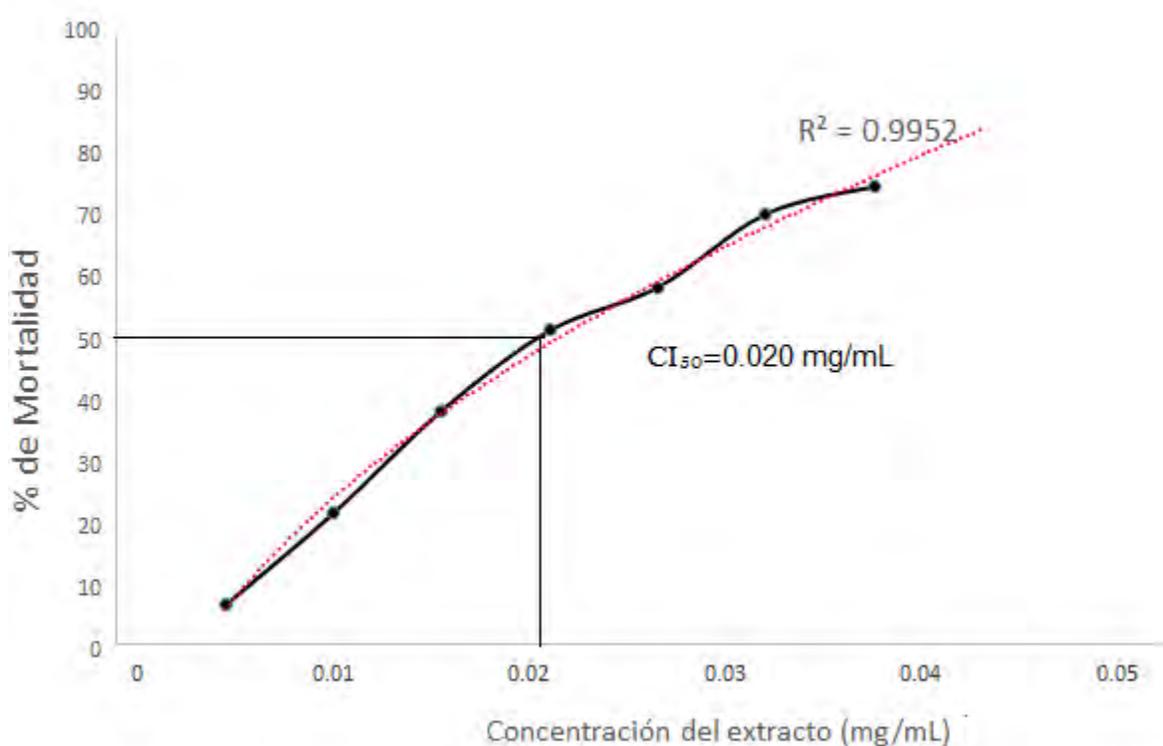


Figura 11. Interacción del extracto metanólico de *T. lucida* sobre células CaSki, donde se observa que la  $CI_{50}$  es de 0.020 mg/mL.

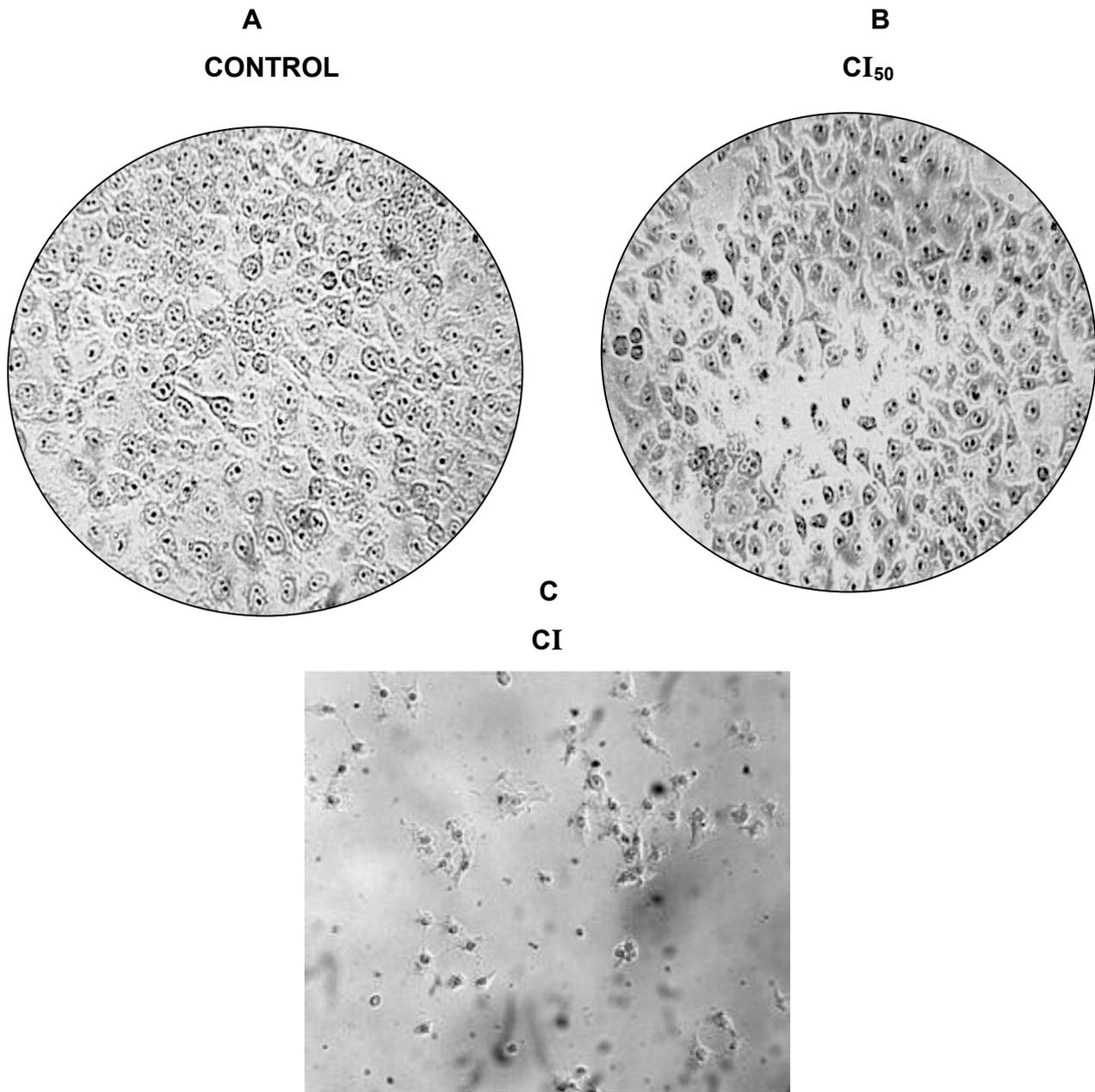


Figura 12. Fotografías de células caSki observadas a 40x con microscopio óptico donde: **A)** Se observa el control de células CaSki adheridas al pozo. **B)** Se observa la CI<sub>50</sub>, 50% de mortalidad de células CaSki. **C)** Pozo con la CI, donde se presenta el 100% de mortalidad de células CaSki y a simple vista se observan restos de células que se despegaron de la placa.

### HPLC del extracto de *T. lucida*

Se pueden observar al menos 17 picos de absorbancia en el Cromatograma (figura 13), 9 de los cuales corresponden a flavonoides, algunos derivado del Ácido benzoico, un fenilpropanoide y un fenol (cuadro 2).

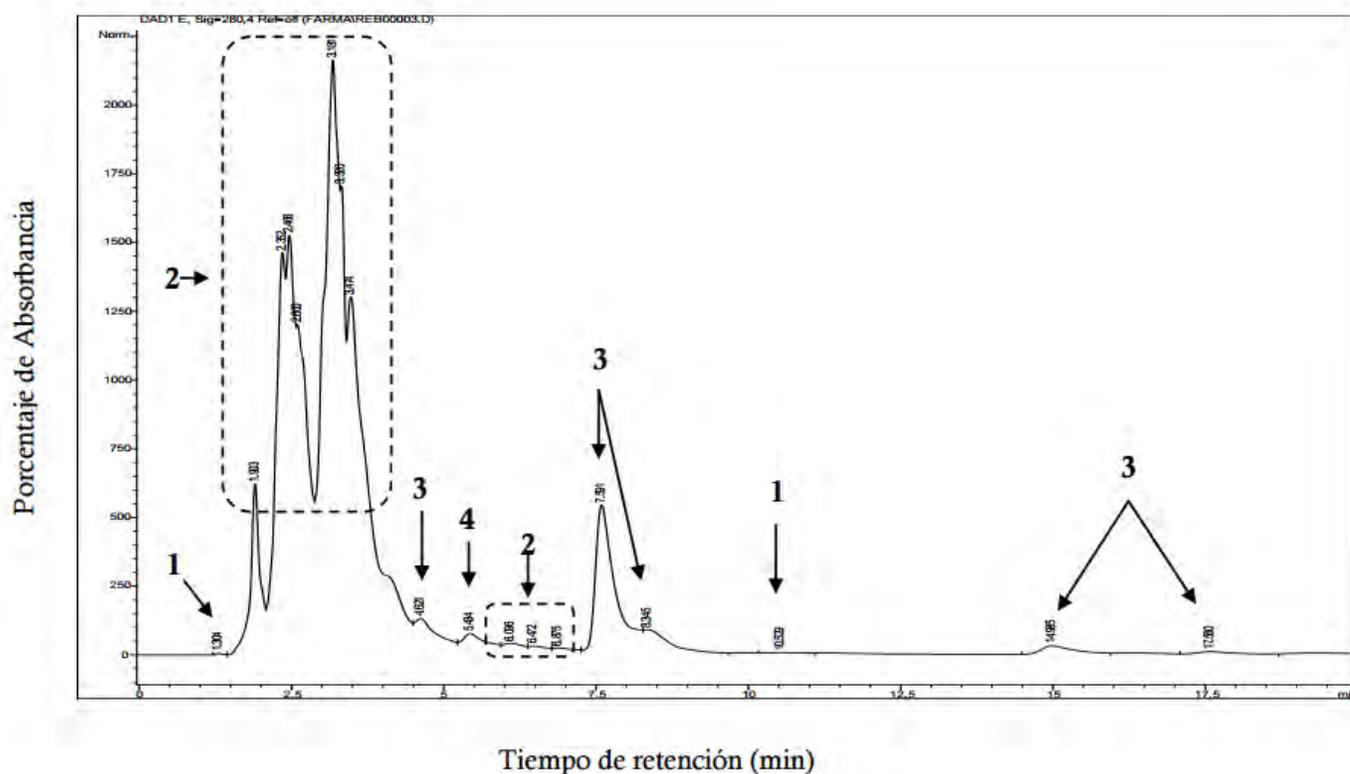


Figura 13. Cromatograma del HPLC del extracto de *T. lucida*.

1= Fenol, 2=Flavonoide, 3= Derivado del Ácido benzoico, 4= Fenilpropanoide

**Cuadro 2. Tiempo de Retención y UV máxima del extracto metanólico de *T. lucida*.**

No. del Compuesto	Tiempo de Retención (min)	UV $\lambda$ máxima (nm)	Compuesto
1	1.91	290	Fenol
2	2.32	210 290 328	Flavonoide
3	2.46	214 282 332	Flavonoide
4	2.59	206 258 278 340	Flavonoide
5	3.16	218 260 274 356	Flavonoide
6	3.34	214 258 276 352	Flavonoide
7	3.47	208 258 278 348	Flavonoide
8	4.60	256 342	Derivado del Ácido Benzoico
9	5.42	260 274 356	Fenilpropanoide
10	6.08	230 244 258 346	Flavonoide
11	6.46	244 258 270 310 350	Flavonoide
12	6.86	242 258 270 348	Flavonoide
13	7.58	216 322	Derivado del Ácido Benzoico
14	8.40	216 322	Derivado del Ácido Benzoico
15	10.54	270	Fenol
16	14.98	230 278	Derivado del Ácido Benzoico
17	17.57	260 298	Derivado del Ácido Benzoico

**CG-EM del extracto de *T. lucida***

El Cromatograma muestra el compuesto mayoritario que se identificó como 7 metoxy-cumarina (19.87%) (figura 14), también se reportaron otros compuestos como  $\beta$ -sitosterol, alocriptopina y siringol, también se menciona que el género *Tagetes* posee dentro de sus componentes, compuestos con actividad antioxidante como el kampferol y la quercetina, planteando de manera concreta la actividad antioxidante de la especie [56,53].

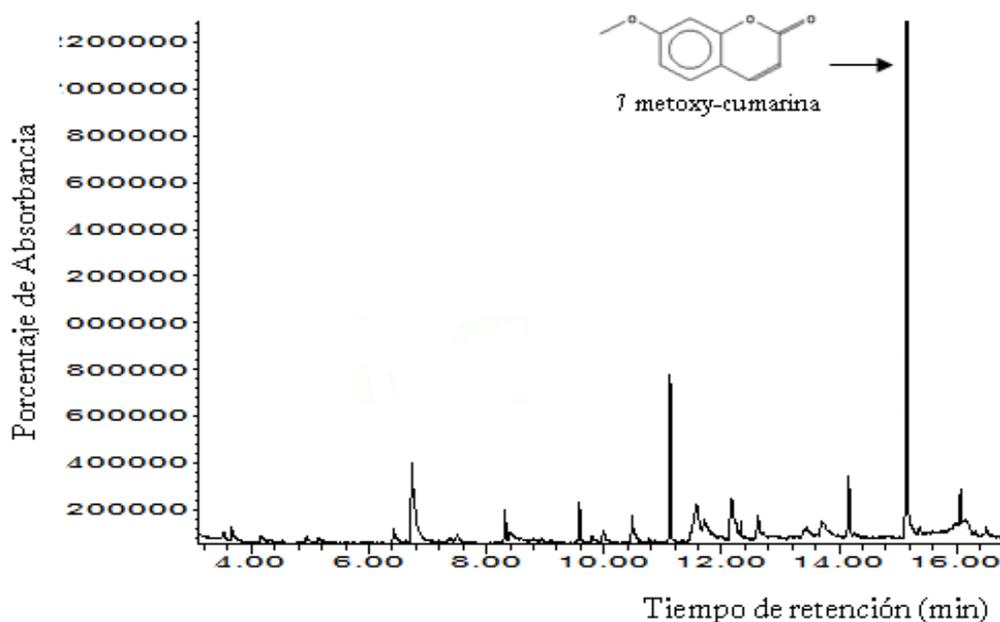


Figura 14. CG-EM del extracto metanólico de *T. lucida*.

## DISCUSIÓN

Con base en los resultados se puede afirmar que en este trabajo se presentan por primera vez evidencias de que el extracto de *T. lucida* tiene actividad contra *N. fowleri*. Es importante mencionar que son muy pocos trabajos sobre *T. lucida* y este es el primero que reporta su actividad contra amibas de vida libre.

El extracto presentó un efecto amebicida contra *N. fowleri*, lo que se puede atribuir a la presencia de compuestos fenólicos y fenilpropanoides entre otros, muchos de estos productos están implicados en las interacciones planta-herbívoro. Actúan como agentes antimicrobianos. Algunos de estos compuestos muestran fototoxicidad frente a insectos tras activarse por luz UV, acción llevada a cabo por bloqueo de la transcripción y de la reparación de DNA, provocando la muerte celular [30].

Los flavonoides son los compuestos polifenólicos mejor estudiados que se caracterizan por tener una estructura de tres anillos formada de dos centros aromáticos y un heterociclo central oxigenado. Dentro de los flavonoides se incluyen a las flavonas, flavanonas, catequinas y antocianinas [57].

Se conocen más de 8 000 compuestos fenólicos los cuales son formados por las vías del ácido shikímico o vía del malonato/acetato. La función de los flavonoides es atraer polinizadores, proteger por ejemplo de patógenos fúngicos y de la radiación UV [58, 59].

Esta clase de productos naturales se están convirtiendo en un tema de investigación anti-infecciosa, y muchos grupos de investigación han aislado e identificado que los flavonoides poseen actividad antifúngica, actividad antiviral y antibacteriana [59].

Estos resultados coinciden con estudios que demostraron el efecto de isoflavonas presentes en *Dalea aurea* sobre *N. fowleri*, donde se registró una actividad significativa en la inhibición del crecimiento de *N. fowleri* [60], sin embargo, su

estudio solo consistió en observar como afectaba el crecimiento en el cultivo de la ameba.

Se ha comprobado el efecto de extractos metanólicos ricos en fenilpropanoides de diversas plantas mexicanas contra trofozoítos de *Trichomonas vaginalis*, *E. histolytica* y *Giardia lamblia* [61,62], así como también ha sido reportado el efecto *in vitro* antiplasmódico, antileishmanial y antitripanosomal de diversos flavonoides como catecol, catequinas, flavanos y flavanoles [63], así mismo se ha reportado el efecto de flavonoides sobre *C. albicans* y *C. krusei* [64,65]. Por otro lado también se comprobó el efecto *in vivo* de tres flavonoides sobre *G. lamblia* [66].

En el presente trabajo se confirma lo señalado por Vizcaíno en 2013 quien evaluó la actividad antifúngica de diferentes fenilpropanoides sugiriendo que estos son los principales responsables de la actividad fungistática contra el hongo *B. theobromae* [67].

Las cumarinas son fenilpropanoides encontrados en el extracto de *T. lucida*, estos compuestos son de gran interés, se utilizan como colorantes e insecticidas. Estudios *in vitro* sobre la actividad estructural de las cumarinas han demostrado que el carácter lipofílico y la estructura planar son requisitos para desarrollar actividades antimicrobianas [68]. Las cumarinas son inhibidores de la actividad de la ATPasa y de la DNA girasa por consiguiente tiene un buen potencial antimicrobiano mecanismo por el cual, es probable que esté actuando sobre *N. fowleri* [69]. En la medicina son empleadas para la fotoquimioterapia, como antifúngicos y antibacteriales, en el tratamiento de la diabetes, contra el cáncer de seno, pulmones y próstata, así como antibacterial, antiinflamatoria, anticoagulante y en el tratamiento del SNC [38, 70,71, 72]. Se comprobó la actividad de una cumarina para inhibir el crecimiento de *Leishmania amazonensis* y *L. braziliensis* [73]. Por otra parte, es también conocida la actividad antiparasitaria de las cumarinas, y la creciente demanda de nuevos antiprotozoarios ha provocado la síntesis de nuevos fármacos de estructura flavonoide de los que destacamos la 8-

(3-furil) cumarina, compuesto natural con actividad antileishmania y actividad antimalaria [74]. Adicionalmente se corroboró contra cepas micóticas de *T. mentagrophytes* y *R. solani* [38]. En estudios relacionados con actividad antimicrobiana en el extracto alcohólico de *Haplopappus multifolius* se comprueba la presencia de cumarinas que confieren una actividad antibacterial contra *S. aureus*, *Sarcina lutea* y *E. coli* [75].

De esta manera se reporta que las cumarinas como la 7-hidroxycumarina que, *in vitro*, induce la inhibición en la proliferación de diversas líneas celulares malignas de distinta estirpe histológica alterando su ciclo celular [76].

Con base a los resultados se demuestra que el extracto metanólico de *T. lucida* tiene actividad amebicida contra *N. fowleri*, sin embargo era importante evaluar si el extracto es tóxico ya que como se ha mencionado anteriormente el problema con la AMB no radica en su efectividad sino en su alta toxicidad y efectos colaterales que la acompañan.

Se determinó para el extracto de *T. lucida* una  $CI_{50} = 0.020$  mg/mL y tomando como referencia el criterio del CNI de E.U (National Cancer Institute), en el cual se considera que para que un extracto tenga un efecto citotóxico activo el valor de  $CI_{50}$ , tras la incubación entre 48 y 72 horas, debe ser máximo de 20  $\mu$ g/mL o menos y para un compuesto puro es de 4  $\mu$ g/mL o menos [77,78, 79], lo anterior demuestra que el extracto de *T. lucida* no es citotóxico.

Sobre la toxicidad, de la familia *Asteraceae* se han aislado flavonoides tóxicos entre ellos apigenina que ha mostrado propiedades antioxidantes, anticancerígenas, antibacteriales, antifúngicas, antiinflamatorias, antiasmáticas, antidermatitis y antineurodegenerativas en diferentes tipos celulares [80]. Otro compuesto es el fitoesterol [81],  $\beta$ -sitosterol del cual se reporta su capacidad antiinflamatoria [53], cabe destacar que Bouic menciona propiedades inmunomoduladoras para este fitoesterol, las cuales, podrían ser benéficas para la

prevención de cáncer de colon, cáncer de mama y daño tisular asociado a inflamación [82].

Se ha reportado actividad antimicótica muy baja de *Pterocaulon* (*Asteracea*) (micosis animal) contra las cepas de *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus*, *Microsporium gypseum*, *T. mentagrophytes* [83].

Cabe destacar que todos estos resultados provienen de experimentos *in vitro* por lo que es necesario realizar pruebas *in vivo* para comprender mejor la acción del extracto y por otra parte realizar un fraccionamiento del mismo para conocer su composición química y tratar de elucidar los mecanismos moleculares de los compuestos no sólo sobre las células cancerígenas sino también sobre los trofozoítos de *N. fowleri*. Hacen falta más estudios sobre las propiedades biológicas del extracto metanólico de *T. lucida* para poder proponer diversos usos potenciales.

## CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos en este trabajo se concluye lo siguiente:

- El extracto metanólico de *T. lucida* presentó efecto amebicida sobre *N. fowleri*.
- El extracto metanólico de *T. lucida* no presentó efecto citotóxico.
- Los compuestos principales presentes en el extracto de *T. lucida* pertenecen al grupo de los fenilpropanoides entre ellos cumarinas.

## REFERENCIAS

1. Culbertson, G., Smith, J. y Miner. J. 1958. *Acanthamoeba*: Observation on animal pathogenicity. *Science*; 127:45.
2. Martinez, A. J. y Janitschke. (1985). *Acanthamoeba*, an opportunistic microorganism; a review. *Infection* 13:251-256 pp.
3. Rodriguez- Zaragoza. (1994). Ecology of free-living amoebae. *Crit. Rev. Microbiol*; 20(3): 225-241 pp.
4. Rondanelli; E. G. (1987). *Infection Diseases. I. Amphizoic Amoebae Human Pathology*. Ed. Piccin Nuova Libreria. Padua. Italy. 279 pp.
5. Oddó, B. (2006). Infección por amebas de vida libre. *Pontifica Universidad Católica de Chile*; 23(3):200-214 pp.
6. De Jonkheere, J.F. (1987). Characterization of *Naegleria* species by restriction endonuclease digestion of whole cell DNA. *Molecular and Biochemical parasitology*. 2: 55-66 pp.
7. Behets, J., Segui, F., Declerk, P., Verelst, L., Duvivier, L., Van Damme, A. y Ollevier, F, (2003). Detection of *Naegleria spp.* and *Naegleria fowleri*: a comparison of flagellation tests, ELISA and PCR. *Water science and technology*. *Water Sci Technol*; 47(3):117-22.47:117-122 pp.
8. Hernández, P. G., Altermatt, F., Bernucci, F., Acuña, D., Apablaza, F., Valenzuela, F., Lefio, A., Pérez, C., Bugedo, G y Castillo L.(2000). Uso de anfotericina B en mezcla lipídica: ¿previene la toxicidad de la droga en pacientes críticos? *Rev. Méd. Chile*; 128:10.
9. John, D.T., Howard, M.J. (1993). Opportunistically pathogenic free-living amoebae. En: Kreier, J.P and Baker J.R. Parasitic protozoa. *Academic Press. San Diego California, U.S.A*; 283:143.
10. Marciano-Cabral, F. (1988). *Biology of Naegleria spp.* *Microbiology. Rev.* 52: 114-133 pp.
11. Griffin, J.L. (1983). The pathogenic amoeboflagellate *Naegleria fowleri*: environmental isolations competitors, ecological interactions and the flagellate empty habitat hypothesis. *J. Protozool*; 30 (2):403-409 pp.

12. Gallegos, E. M. (1997). Amibas de vida libre potencialmente patógenas en Cuerpos de Agua de uso recreativo en el Estado de San Luis Potosí. Biología, Tesis doctoral. UNAM. Facultad de Ciencias, México.
13. Visvesvara, G.S., Moura, H., Schuster, F. L. (2007). Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*. *Division of Parasitic Diseases, National Center for Infectious Diseases*; 3341-3724 pp.
14. Rodríguez, C. M. (2014). Efecto amebicida de los extractos metanólicos de tres especies del género *Bursera* contra *Naegleria fowleri*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. UNAM.
15. De Jonckheere, J.F. (2011). Origin and evolution of the worldwide distributed pathogenic amoeboflagellate *Naegleria fowleri*. *Infect Genet Evol*; 11(7):1520-8 pp.
16. Lares-Villa, F., Hernández-Peña, C. Concentration of *Naegleria fowleri* in natural waters used for recreational purposes in Sonora, Mexico (Nov 2007– Oct 2008). *Exp Parasitol*, Sept 2010. 126(1):33-36 pp.
17. Vargas-Zepeda, J., Gómez-Alcalá, A.V, Vásquez-Morales, JA., Licea-Amaya, L., De Jonckheere, JF., Lares-Villa, F. (2005). Successful treatment of *Naegleria fowleri* meningoencephalitis by using intravenous amphotericin B, fluconazole and rifampicin. *Department of Pediatrics*; 36 (1):83-6 pp.
18. Visvesvara, G.S., Schuster FL. Y Martinez J. (1993). *Balamuthia mandrillaris*, N.G., N. Sp., Agent of amebic meningoencephalitis in humans and other animals. *J. Euk. Microbiol*; 40:504 pp.
19. Bottone, EJ. (1993). Free-living amebas of the genera *Acanthamoeba* and *Naegleria*: an overview and basic microbiologic correlates. *Clinical Microbiology Laboratory, Mount Sinai Hospital. New York, NY*; 60(4):260-70 pp.
20. Valenzuela, G., López-Corella, E., De Jonckheere, JF. (1984). Primary amoebic meningoencephalitis in a young male from northwestern Mexico. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*; 78:558-559 pp.
21. Zavala, T. J. M. (2010). Purificación de una proteína con actividad de sintasa de óxido nítrico presente en *Naegleria fowleri*. Tesis de Maestría en ciencias en farmacología. IPN. Escuela Superior de Medicina.

22. Kobayashi, G.S., Medoff, G. (1977). Antifungal agents: recent developments. *Annual review of microbiology*; 31:298-308 pp.
23. Quinteros, A. R., Fica, C. A., Abusada, A.N., Muñoz, C.L., Novoa, M.C., Gallardo, A.C. (2010). Uso de anfotericina B deoxicolato y sus reacciones adversas en un hospital universitario en Chile. Hospital Clínico Universidad de Chile, Santiago. *Rev Chil Infect*, 27 (1): 25-33 pp.
24. Rates, S.M.K. (2001). Plants as source of drugs. *Toxicon*; 39:603 pp.
25. Contreras, P, H. (2005). El uso de plantas medicinales. Universidad Veracruzana Multicultural.
26. Lauro, A. M. J., Rodriguez, R. E., Gómez, P., Orozpe, Ol. J., Carbajar, D. N. (2015). Caracterización del comercio de plantas medicinales en Ciudad de Juárez, Chihuahua, México. *Culcyt/Plantas Medicinales*; 57, 331-341 pp.
27. Juárez, R., Aguilar, C., Juárez, R., Bugarín, M., Juárez, L., y Cruz, C. (2013). Hierbas aromáticas y medicinales en México: tradición e innovación. *Revista biociencias*, 2(3), 119-129 pp.
28. Cosme, P. I. (2008). El uso de las plantas medicinales. *Revista intercultural*. Universidad Veracruzana Intercultural. 23-26 pp.
29. Santillán, M. L. (2012). El uso tradicional de las plantas medicinales, un aporte para la ciencia. DGDC-UNAM, recuperado el 01 de abril del 2013 de <http://ciencia.unam.mx>.
30. Ávalos, A., Pérez-Urria, E. (2009). Metabolismo secundario de las plantas. *Reduca (Biología)*. Serie Fisiología Vegetal; 3:119-145 pp.
31. Pérez, G. S. (2017). Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana. De [www.velvet.unam.mx](http://www.velvet.unam.mx).
32. Flores, H. M. (2011). Compilación Bibliográfica *Brugmansia spp.* Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Veracruzana. Orizaba, Veracruz.
33. Biblioteca Digital de la Medicina Tradicionañ Mexicana. (2009). De [www.velvet.unam.mx](http://www.velvet.unam.mx).
34. Organización Mundial de la Salud. 2002. Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2002–2005 pp.

35. Téllez-López, M., Treviño-Neávez, J., Verde-Star, M., Rivas-Morales, C., Oranday-Cárdenas, A., Moran-Martínez, J., Serrano-Gallardo, L. y Morales-Rubio, M. (2013) Evaluación del efecto del extracto metanólico de *Tagetes lucida* sobre la función testicular y calidad espermática en ratas machos *Wistar*. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéutica*; 44: 43-52 pp.
36. Orellana, P.A. (2002). *Propagación del Pericón*. Ministerio de Agricultura Ganadería y Alimentación. Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas. Villa Nueva, Guatemala.
37. De la Cruz, B. C. (2005). Caracterización de cinco extractos de plantas medicinales nativas de Guatemala, validadas científicamente. Informe de Tesis, Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.
38. Céspedes, G., Ávila, A., Martínez, B., Serrato, J., Calderón-Mugica, R., Salgado-Arciglia. (2006). Antifungal and Antibacterial Activities of Mexican Tarragon (*Tagetes lucida*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 54 (10): 3521-3527 pp.
39. Hernández, T., Canales, M., Flores, C., García, M., Durán, A y Avila, G. (2006). Antimicrobial Activity of *Tagetes lucida*. *International Journal of Pharmacognosy*. 44(1): 19-22 pp.
40. Cicció, J F. (2005). A source of almost pure methyl chavicol: volatile oil from the aerial parts of *Tagetes lucida* (Asteraceae) cultivated in Costa Rica. *Rev. Biol. Trop*; 52:853–857 pp.
41. Heywood, V. N., Harborne J. B., y Turner B.L. (1997). The biology and chemistry of the Compositae. Academic Press, London. 1118 pp.
42. Turner, B. L., (1996). The Comps of México: A systematic account of the family Asteracea, vol. 6.
43. Neher, R. T., (1966). *Monograph of the genus Tagetes (Compositae)*. Ph. D. Thesis. Indiana University. Bloomingthan, Indiana, USA. 306 pp.
44. Turner, B. L., y Nesom G. L. (1993). *Biogeography, diversity and endangered or threatened status of Mexican Asteraceae*. Biological Diversity of Mexico: Origins and Distribution. T P Ramamorthy, R Bye, A Lot, J Fa (eds). Oxford University Press, New York, USA. 290-299pp.

45. Argueta, V., A. y Cano, A., J. (1994) Atlas de las plantas de la medicina tradicional Mexicana. Instituto Nacional Indigenista. DF. 1785 pp.
46. Márquez, A. C., F, Lara. O., B, Esquivel. R. y R, Mata. E. (1999). Plantas medicinales de México II. Composición, usos y actividad biológica. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F.
47. Villarreal, J. A. (2003). Compositae. Tribu Tageteae. En: Rzedowski, G. C. de y J. Rzedowski (eds.). Flora del Bajío y de regiones adyacentes. Fascículo 113. Instituto de Ecología-Centro Regional del Bajío.
48. Olvera E. (2007). Estudio fotoquímico y evaluación antimicrobiana de *Tagetes lucida* (Perico). Tesis de licenciatura. Facultad de Química, UNAM.
49. Acosta, L., Rodríguez, C., Hechevarría, I. y Milanés, M. (2010). Determinación de la fecha de plantación en *Tagetes lucida Cav.* *Rev Cubana Plant Med*; 15(4):236-245 pp.
50. Martínez, M. (1994). *Catálogo de Nombres Vulgares y Científicos de Plantas Mexicanas*. 3ra ed. Fondo de Cultura Económica. México.
51. Garduño, Y. (2007). Efecto de *Tagetes lucida Cav.* Como antimicrobiano sobre diversos patógenos. Tesis de Licenciatura, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. UNAM, México; DF.
52. Rivera, Y. C. R. (2013). Actividad anti-*Candida* de cuatro plantas medicinales. Tesis de Maestría en Ciencias de la Salud. Instituto Politécnico Nacional. México D.F.
53. Waizel, H. S. y Waizel, B. J. (2009). Algunas plantas utilizadas en México para el tratamiento del asma. *An Orl Mex*; 54 (4): 145-171 pp.
54. Funes, L., Laporta, O., Cerdán-Calero, M. & Micol, V. (2010) Effects of verbascoside, a phenylpropanoid glycoside from *lemon verbena*, on phospholipid model membranes. *Chemistry and Physics of Lipids*; 163, 190-199 pp.
55. Rodríguez, M. M. A. (2003). Reconocimiento de antígenos específicos para la identificación de la amiba de vida libre *Naegleria fowleri*. Tesis de maestría. FES Iztacala. Universidad Nacional Autónoma de México.

56. Parejo I., Bastida J., Validomat F. y Codina C. (2005). Acylated quercetagenin glycosides with antioxidant activity from *Tagetes maxima*. *Phytochemistry*; 66, 2356-2362 pp.
57. Drago, S.M.E., López, L.M., Sainz, R. (2006). Componentes bioactivos de alimentos funcionales de origen vegetal. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. 37(4): 58-68 pp.
58. Leyva E., Navarro-Tovar G., Loredó-Carrillo S. E., Santos D. M. S. (2011). Biosíntesis y actividad biológica de fitoestrógenos y fotoesteroides. *Boletín, Sociedad Química de México*; 5(2):35-43 pp.
59. Cushnie, T., Lamb A. J. (2005). Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*; 26:343-356 pp.
60. Belosfky, C., Carreno, R., Grosnick, S., Shannon, M., John, T. (2006). Activity of isoflavans of *Dalea aurea* (Fabaceae) against the opportunistic amoeba *Naegleria fowleri*. *Plant Med*; 72:383-386 pp.
61. Calzada, F., Cervantes, A. y Yépez, L. (2005). *In vitro* antiprotozoal activity from the roots of *Geranium mexicanum* and constituents on *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia*. *Journal of ethnopharmacology*; 98:191-193 pp.
62. Calzada, F., Yépez, L. y Tapia, A. (2007). Effect of Mexican medicinal plant used to treat trichomoniasis on *Trichomonas vaginalis* trophozoites. *Journal of Ethnopharmacology*; 113:248-251 pp.
63. Ramírez, M. M. E., Mendoza, A. J. A., Arreola, R. H., Ordaz, P. C. (2010). Flavonoides con actividad antiprotozoaria. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*; 41(1):6-21 pp.
64. Deliorman, D., Özcelik, B., Özgen, S., Ergun F. (2010). Antibacterial, antifungal, and antiviral activities of some flavonoids. *Microbiological Research*; 165:496-504 pp.
65. Peralta, M. A., Calise, M., Fornari, C., Ortega, G.M., Diez, R. A., Cabrera, J. L., (2012). A Prenylated Flavanone from *Dalea elegans* Inhibits Rhodamine 6 G Efflux and Reverses Fluconazole-Resistance in *Candida albicans*. *Planta Médica UNAM*; 78:981-987 pp.

66. Barbosa, E., Calzada, F., Campos, R. (2007). *In vivo* anti-giardial activity of three flavonoids isolated of some medicinal plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of diarrhea. *Journal of Ethnopharmacology*; 109:552-554 pp.
67. Vizcaíno, P. S. (2013). Safrol y Apiol: metabolismo, preparación de derivados y actividad antifúngica contra el hongo fitopatógeno *Botryodiplodia theobromae*. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias, Escuela de Química. Universidad Nacional de Colombia. Medellín, Colombia.
68. Ferrazzoli Deviene, K., Goncalves Raddi, M. S., Gomes, R., & Vilegas, W. (2005). Structure- antimicrobial activity of some natural isocoumarins and their analogues. *Phytomedicine*; 12(5), 378-381 pp.
69. Laurin, P., Ferroud, D. (1999), Structure activity relationship in two of aminoalkyl substituted coumarin inhibitors of gyrase B. *Bioorg Med Chem Lett*; 9, (19), 2875-2880 pp.
70. Musa, M., Cooperwood, J., Khan, O. (2008). A review of coumarin derivatives in pharmacotherapy of breast cancer. *Current Medicinal Chemistry*; 15(26):2664-2679 pp.
71. Shen, Q., Shao, J., Peng, Q., Zhang, W., Ma, L., Chan, A., Gu, L. (2010). Hydroxycoumarin Derivates: Novel and Potent  $\alpha$ -Glucosidase Inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*; 53:8252-8259 pp.
72. Medeiros-Neves, B., Maikon, F., Lino von Poser, G., Ferreira, H. (2015). Quantification of coumarins in aqueous extract of *Pterocaulon balansae* (Asteraceae) and characterization of a new compound. *Molecules*; 20(10): 18083-18094 pp.
73. Brenzan, A., Ferreira, P., Leonardon, C., Honda, A., Rodriguez-Filho, E., Nakamura V., Dias, P., Ueda-Nakamura, T. y Cortez G. (2008). Activity of extracts and coumarins from leaves of *Calophyllum brasiliense* Camb. On *Leishmania braziliensis*. *Pharmaceutical Biology*; 6: 380-386 pp.
74. Carreiro, P. C. M. M.J. (2013). Cumarinas: Versatilidad estructural y aplicaciones en Química Farmacéutica. Tesis Doctoral, Universidad de Santiago De Compostela. Portugal.

75. Chiang, T., Bittner, M., Silva, M., Mondaca, A., Zemelman, R. (1982). A prenylated coumarin with antimicrobial activity from *Haplopappus multifolius*. 21, 2753-2755 pp.
76. Sullivan J., Prado H., Aguilar D., Molina J. y Medina F. (2000). Efecto del ciclo celular de líneas de adenocarcinoma por cumarina y 7 hidroxycumarina. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex*; 13 (4): 192-197 pp.
77. Geran, R. I., Greenberg, N. H., McDonald, M. M., Schumacher, A. M., Abbott, B.J. (1972). Protocols for screening chemical agents and natural products against animal tumor and other biological systems. *Cancer Chemother*; 3:17-19.
78. Swanson S.M., Pezzuto J.M., (1990). Bioscreening technique for cytotoxicity potential and ability to inhibit macromolecule biosynthesis. In Thompson EB, Ed VCH, editors. *Drug bioscreening: drug evaluation techniques in pharmacology*. New York; 273-297 pp.
79. Sri, N. A. M., Sim, K. S., Norhanom, A. W., Hashim Y. (2009). Cytotoxic components of *Pereskia bleo* (Kunth) DC. (*Cactaceae*) leaves. *Molecules*; 4:1713-1724 pp.
80. González, R. Z. (2014). Efecto del Flavonoide Apogenina sobre una línea celular H9c2 derivada de cardiomiocitos de ratón estimuladas con LTA. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química. UNAM. México; DF.
81. Escalona B. (2005). Estudio de componentes presentes en las semillas de piñón (*Pinus pinea*) y Michay (*Berberis darwinii hook*), factibles de utilizar en el desarrollo de alimentos funcionales. Tesis Licenciatura, Universidad de Chile. Santiago de Chile.
82. Bouic, P. J. D. (2001). El papel de los fitoesteroles y las fitoesterinas en la modulación inmune: una revisión de los últimos 10 años. *Opinión Actual en Nutrición Clínica y Atención Metabólica*; 4 (6):471-475 pp.
83. Stein, A. C., Álvarez, S., Avancini, C., Zacchino, S., Von Poser, G. (2006). Antifungal activity of some coumarins obtained from species of *Pterocaulon* (*Asteracea*) 107, 95-98 pp.