



**UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**INVESTIGACIÓN QUÍMICA Y BIOLÓGICA DE LA ESPECIE  
*TAGETES PATULA* (CINCOYAGA).**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**PRESENTA**

**JORGE ABRAHAM DE LEÓN BRITO**



México D. F.

2014



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

## JURADO ASIGNADO

**Presidente: Profesor: MARÍA ISABEL AGUILAR LAURENTS**

**Vocal: Profesor: ARTURO NAVARRO OCAÑA**

**Secretario: Profesor: JOSÉ FAUSTO RIVERO CRUZ**

**1er. suplente: Profesor: GLORIA DÍAZ RUÍZ**

**2do. suplente: Profesor: MABEL CLARA FRAGOSO SERRANO**

Sitio donde se desarrolló el proyecto:

Laboratorio 111, Edificio E

Facultad de Química, UNAM

Asesor del tema

---

Dr. José Fausto Rivero Cruz

Sustentante

---

Jorge Abraham De León Brito

## ÍNDICE

### ÍNDICE

Jurado Asignado.....	I
Lista de Abreviaturas.....	v
Lista de cuadros.....	VII
Lista de Figuras.....	VIII
1. Introducción.....	1
2. Antecedentes.....	3
2.1 Cincoyaga ( <i>Tagetes patula</i> ).....	3
2.1.1 Sinonimia.....	3
2.1.1.1 Sinonimia popular.....	3
2.1.1.2 Nombres en algunas lenguas indígenas en México.....	3
2.1.1.3 Nombres comunes Internacionales.....	3
2.1.1.4 Sinonimia botánica.....	5
2.1.2 Categorías taxonómicas superiores.....	5
2.1.3 Definición y Generalidades.....	5
2.1.4 Aspectos históricos.....	8
2.1.5 Composición Química.....	12
2.1.6 Propiedades biológicas y farmacológicas.....	18
2.2 Flavonoides.....	23
2.2.1 Definición y generalidades.....	23
2.2.2 Estructura Química de los flavonoides.....	23
2.2.3 Relación estructura Química-Actividad antioxidante.....	25

## ÍNDICE

2.3 Compuestos fenólicos.....	27
2.3.1 Compuestos fenólicos simples .....	28
2.3.2 Ácidos fenólicos y aldehídos.....	28
2.4 Enfermedades periodontales.....	28
2.4.1 Concepto.....	28
2.4.2 Factores que influyen en el desarrollo de la enfermedad periodontal.....	28
2.5 Biopelículas.....	29
2.5.1 Concepto.....	28
2.5.2 Características.....	29
2.5.3 Estructura.....	30
2.6 Caries dental.....	33
2.6.1 Concepto.....	33
2.6.2 Etiología.....	33
2.6.3 Microorganismos relacionados con la caries dental.....	34
2.6.4 Factores de virulencia relacionados con la caries dental.....	35
3. Justificación.....	36
4. Objetivos.....	38
4.1 Objetivos generales.....	38
4.2 Objetivos particulares.....	38
5. Desarrollo experimental.....	39

## ÍNDICE

5.1 Material vegetal.....	39
5.2 Estudio fitoquímico de la cincoyaga.....	39
5.2.1 Obtención del extracto metanólico total.....	39
5.2.2 Cuantificación de fenoles y flavonoides a partir del extracto metanólico total.....	39
5.2.3 Determinación de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteau.....	40
5.2.4 Fraccionamiento secundario del extracto metanólico total.....	41
5.3 Ensayo biológico.....	41
5.3.1 Microorganismos de prueba.....	41
5.3.2 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI).....	42
5.3.3 Inhibición de la formación de biocapa por <i>Streptococcus mutans</i> .....	43
6. Resultados y Discusión.....	45
6.1 Contenido de flavonoides totales presentes en el extracto metanólico de la cincoyaga.....	45
6.2 Contenido de fenoles totales en el extracto metanólico.....	46
6.3 Evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto metanólico y de sus fracciones secundarias de la cincoyaga.....	46
6.4 Inhibición de la formación de biocapa por <i>Streptococcus mutans</i> .....	48
7. Conclusiones.....	50
8. Perspectivas.....	51
9. Bibliografía.....	52

## LISTA DE ABREVIATURAS

### Lista de Abreviaturas

Abreviatura	Significado
°C	Grado centígrado
α-T	Alfatertienilo
AE	Aceite esencial
AG	Ácido gálico
AlCl <sub>3</sub>	Tricloruro de aluminio
BBT	5-(3-buten-1-inil)-2,2'-bitienil
BBTOAc	5-(4-acetoxi-1-butinil)-2,2'-bitienil
BBTOH	5-(4-hidroxi-1-butinil)-2,2'-bitienil
BHI	Infusión cerebro corazón
CaCl <sub>2</sub>	Cloruro de calcio
cm	Centímetro
CO <sub>2</sub>	Bióxido de carbono
DL <sub>50</sub>	Dosis letal cincuenta
DMSO	Dimetilsulfóxido
EAG	Equivalentes de ácido gálico
EQ	Equivalentes de quercetina
ERNs	Especies reactivas de nitrógeno
EROs	Especies reactivas de oxígeno
FHEUM	Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos
g	Gramo
h	Hora

LISTA DE ABREVIATURAS

<b>IgA-1</b>	Inmonoglobulina tipo A-1
<b>Kg</b>	Kilogramo
<b>L</b>	Litro
<b>LD<sub>90</sub></b>	Dosis letal noventa
<b>mg</b>	Miligramo
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	Dicloruro de magnesio
<b>MIC</b>	Concentración mínima inhibitoria
<b>msnm</b>	Metros sobre el nivel del mar
<b>Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub></b>	Bicarbonato de sodio
<b>nm</b>	Nanómetros
<b>O<sub>2</sub></b>	Molécula de oxígeno
<b>OH</b>	Grupo alcohol
<b>ppm</b>	Partes por millón
<b>pH</b>	Potencial de hidrógeno
<b>RE</b>	Equivalentes de rutina
<b>TPA</b>	12-o-tetradecanoilforbol-13acetato
<b>UFC</b>	Unidades formadoras de colonias
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>µg</b>	Microgramo
<b>µL</b>	Microlitro
<b>µm</b>	Micrómetro



## LISTA DE CUADROS

### **Lista de Cuadros.**

**Cuadro 1.** Sinonimias internacionales de la especie *Tagetes patula*.

**Cuadro 2.** Distribución preliminar de *Tagetes patula* en México por estados y municipios.

**Cuadro 3.** Principales compuestos presentes en el AE de la especie *Tagetes patula*.

**Cuadro 4.** Tiofenos más comunes del género *Tagetes*.

**Cuadro 5.** Ejemplos de compuestos identificados de la especie *Tagetes patula* indicando sus actividades biológicas.

**Cuadro 6.** Fraccionamiento secundario del extracto metanólico total.

**Cuadro 7.** Controles para el ensayo biológico.

**Cuadro 8.** Evaluación de la actividad antibacteriana del extracto metanólico total de las partes aéreas de *Tagetes patula*.

**Cuadro 9.** Evaluación de la actividad antibacteriana del fraccionamiento secundario del extracto metanólico total de las partes aéreas de *Tagetes patula*.

**Lista de Figuras.**

**Figura 1.** Planta *Tagetes patula*.

**Figura 2.** Compuestos aislados e identificados a partir de distintas partes de la especie *Tagetes patula* y sus derivados.

**Figura 3.** Estructura base del esqueleto flavonoide.

**Figura 4.** Estructuras de diversos grupos de flavonoides.

**Figura 5.** Estructura básica de los flavonoides (Modificado de Iglesias-Neira, 2009).

**Figura 6.** Estructura del catecol.

**Figura 7.** Doble enlace 2,3 conjugado a un grupo 4-oxo del anillo C.

**Figura 8.** Esquema que representa las etapas de desarrollo de un biofilm sobre su sustrato.

**Figura 9.** Tipos de bacterias involucradas en la colonización de una superficie dental.

**Figura 10.** Esquema de la placa utilizada en el ensayo de la inhibición de la biocapa.

**Figura 11.** Estructura química de la patuletina.

## INTRODUCCIÓN

### 1. INTRODUCCIÓN

El estudio de recursos naturales con fines medicinales, adquirido empíricamente por el ser humano a lo largo de miles de años, ha favorecido el desarrollo de diversas áreas como la terapéutica, la farmacéutica, la farmacología y la medicina. Su mayor impacto lo ha tenido en el campo de las ciencias médicas y farmacéuticas al identificar y desarrollar nuevos y potentes agentes medicinales (Cortez-Gallardo, 2004).

A través de los siglos, culturas como la Griega y la China, por mencionar algunas, adquirieron conocimientos empíricos sobre las propiedades medicinales de varias plantas y hierbas, los cuales fueron transmitidos oralmente o de manera escrita (Rojas-Alba, 2010). Este cúmulo de información y prácticas son parte de la Medicina Tradicional, la cual es definida por la Organización Mundial de la Salud (2010) como “la suma total de todos los conocimientos y prácticas, ya sean explicables o no, que se utilizan para el diagnóstico, la prevención y la eliminación de todo desequilibrio físico, mental o social y que se basan exclusivamente en la experiencia práctica y la observación, transmitidos de generación en generación, ya sea de forma oral o escrita”. Sin embargo, con el auge de la tecnología e industria, se abandonó esta práctica y se volvió cada vez más frecuente el uso de principios activos sintéticos para aliviar las enfermedades.

México posee una de las mayores biodiversidades en el mundo, por lo que no es de sorprender que las plantas medicinales y otros productos de origen natural forman parte esencial de las estrategias generadas por la población para enfrentar sus enfermedades cotidianas. Esto no solamente se da en las poblaciones indígenas y rurales, sino también entre poblaciones mestizas, en zonas urbanas y suburbanas como resultado de la naturaleza pluriétnica de la población y de la necesidad de recursos accesibles frente a muy diversos padecimientos (FHEUM, 2001). La diversidad de actividades farmacológicas descritas para las diferentes

## INTRODUCCIÓN

especies vegetales se pueden atribuir a su composición química, origen geográfico y época de colecta (Cortez-Gallardo, 2004).

En el Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana, se enlista la cincoyaga cuya denominación botánica es *Tagetes patula* esta planta se encuentra descrita desde los siglos XVI al XX en diversos documentos haciendo especial alusión a sus diversas propiedades curativas en desordenes de tipo digestivo como diarrea, disenteria, dolor de estomago, “empacho“, falta de digestión, “bilis” y “tapado”. También son muy conocidas sus propiedades para curar afecciones de la piel como la sarna, el salpullido y las heridas (Atlas de la Medicina Tradicional Mexicana, 1994).

En México se han realizado pocos estudios sobre la composición de *Tagetes patula* sin embargo, diversos estudios realizados con extractos metanólicos revelan actividad anti fúngica contra *Botrytis cinerea*, *Fusarium moniliforme* y *Pythium ultimum*, dichas especies de hongos son patógenos tanto para especies animales como vegetales (Mares, 2004).

El interés en *Tagetes patula* se centra en sus propiedades antioxidantes, que constituyen una alternativa en el tratamiento de las enfermedades crónico-degenerativas que, según la Dra. Margaret Chan directora general de la OMS, son actualmente la principal causa de morbilidad y mortalidad (OMS, 2010).

A la vez cobra especial interés su actividad antibacteriana como alternativa del tratamiento de las enfermedades orales, incluyendo las caries dentales y enfermedades periodontales, las cuales ocasionan considerables costos sociales y económicos (OMS, 2010).

## ANTECEDENTES

### 2. ANTECEDENTES

#### 2.1 CINCOYAGA (*Tagetes patula*).

##### 2.1.1 Sinonimias

###### 2.1.1.1 Sinonimia popular

Esta planta se conoce con los nombres triviales de Aceitilla, angelito, cempazúchil, cempazúchitl silvestre, cinco gallos, cinco yagas, flor de muerto, tringuini (Biblioteca de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009), anís dulce, anís criollo, anicillo, anís de la sierra, tuna anís, anís de grano. En Bolivia se conoce como anís anís, en Guatemala como anís de chucho, en Perú como anisillo, pampa anís, pimpinela, en Venezuela como anís cimarrón, anís verde (Berdonces, 1996), otros autores señalan que en México también se le conoce con los siguientes nombres: clemolitos, flor de muerto, iscoque, pastora, pastoral, pastorcita, tlemole (Quattrocchi, 2001).

###### 2.1.1.2 Nombres en algunas lenguas indígenas de México del género *Tagetes*.

El grupo nahuas del centro de México fueron quienes heredaron y dejaron patente en las obras de Sahagún y de Hernández los principales antecedentes de ellas. Con los nombres de *yiahutli*, *cempoalxochitl*, *macuilxochitl*, *tzitziquilitl*, *tepecempoalxochitl* (Sahagún, 1999), *tlapalcozatli*, *oquichtli*, *tlapaltecacayatli* y *zacaxochitlcoztic* (Hernández, 1959) los nahuas mesoamericanos identificaron las diferentes especies y variedades de *Tagetes*, como plantas aromáticas.

En dialecto purépecha se conoce con los siguientes nombres: *iumu takisi* y *re'engajo* (Villarreal, 2003).

###### 2.1.1.3 Nombres comunes internacionales de la especie *Tagetes patula*.

La especie *Tagetes patula* recibe algunos nombres internacionales algunos de ellos provienen de traducciones a distintas lenguas (Torkelson, 1996).

ANTECEDENTES

Cuadro 1. Sinonimias internacionales de la especie *Tagetes patula* (Torkelson, 1996).

IDIOMA	SINONIMIA	IDIOMA	SINONIMIA
Alemán	Ringelblume, goudsbloem, totenblume, ackerringelblume,	Italiano	Calendula
Árabe	Kahlek, qaouqaham	Polaco	Noglerek
Español	Mercadela, rosa del angel, amapola amarilla, amarillo, maravilla, clavel de muerto, damasquina, flamenquilla, flor de muerto,	Portugués	Cravo de defunte, cravo defunto dolrado, cravo japonés, cravo <i>Tagetes</i>
Francés	Oeillet d' Inde, grand souci, souci, souci cultivate, souci deschamps, souci des jardins, veloutine, fleurs de tous les mois, fleurs souci	Ruso	Nogotki
Inglés	Marigold, marygold, African marigold, French marigold	Turco	Ringblomma

## ANTECEDENTES

### **2.1.1.4 Sinonimia botánica.**

*Tagetes lunulata*, *Tagetes tenuifolia* (Biblioteca de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009).

### **2.1.2 Categorías taxonómicas superiores.**

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Familia: Asterales

Tribu: Asteraceae

Género: *Tagetes*

Especie: *patula*

### **2.1.3 Definición y generalidades**

*Tagetes patula* es una planta anual, aromática, erecta, crece hasta 80 cm de altura y 30 cm de anchura, nativa de México, se cultiva en el jardín en toda la India como planta ornamental, tiene hojas de 5 a 10 cm de largo con forma pinnada estas tienen foliolos de 9 a 23, es linear a lanceolada, de 1 a 3 cm de largo, el ápice de la hoja es agudo o acumulado y el margen de la hoja es profundamente aserrado, con numerosas glándulas oleosas y flores de color rojizo, naranja o amarillo, dispuestas en pequeñas cabezuelas agrupadas en racimos, ubicadas en las partes terminales de la planta, con un fruto aquenio linear. En la Figura 1 se muestran las partes aéreas utilizadas en el presente trabajo.

## ANTECEDENTES



Figura 1. Partes aéreas de *Tagetes patula*.

*Tagetes* es una especie nativa de México y se distribuye por toda Mesoamérica y al norte de Sudamérica, se encuentra principalmente en la vegetación secundaria derivada de bosques de pino-encino y del bosque tropical caducifolio, así como a menudo en grandes poblaciones en calidad de maleza en lotes baldíos, a orilla de caminos y cultivos ubicados a una altitud entre 1400 y 3000 msnm. Floreciendo de septiembre a diciembre (Villarreal, 2003). En el Cuadro 2 se resume la distribución de la especie *Tagetes patula* en el territorio mexicano.



ANTECEDENTES

Cuadro 2. Distribución preliminar de *Tagetes patula* en México por estados y municipios (Serrato, 2009).

Estado	Municipio/Lugar
Sinaloa	Culiacán, Mazatlán, La constansa
Durango	Nombre de dios
Nayarit	Mexcaltitan, Zapotlán
Aguascalientes	Calientes
San Luis Potosí	Tamazunchale
Zacatecas	Sureste de Zacatecas
Jalisco	El Molino, Zapotlán
Querétaro	Tonilita, Guzman
Colima	Cadereyta y Visaron
Michoacán	Coalcoman, Uruapan, Tancítaro, Coahuayula
Estado de México	Amecameca, Temascaltepec, Ixtapan, Rincón del Carmen, Valle de Bravo
Distrito Federal	Acambay, Pedregal
Veracruz	Orizaba, Córdoba
Morelos	Cuernavaca
Guerrero	Galeana
Puebla	Cerro San Juan, Posadas
Oaxaca	Almoloya, Sierra de San Felipe, Valle de Etna, San Luis Tultitlanapa
Campeche	Lerma
Yucatán	Izamal

## ANTECEDENTES

La infusión de las flores y hojas en México se usa como anticonceptivo, para curar mal de aire (*Thashi* o mal de aire es un padecimiento que concuerda con algún tipo de enfermedad estomacal que presenta diarrea, vómito y escalofríos) (Biblioteca de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009); se utiliza en cocción sola o con orégano y cáscara de granada para tratar casos de diarrea y disentería; así como para contrarrestar los efectos de piquetes de alacrán y mordedura de víbora frotando la parte afectada con la planta en estado fresco, previamente calentada en un comal (Serrato, 2009).

### **2.1.4 Aspectos históricos.**

Existen dos fuentes históricas importantes que ilustran sobre el uso y conocimiento de algunas especies de *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. Aunque varios grupos prehispánicos debieron conocer varias especies de *Tagetes* (por el conocimiento tradicional que mantiene la mayoría de grupos étnicos actuales sobre estos vegetales) (Sahagún, 1999).

En el Códice Florentino al *yiahutli* se le describe así: “es muy verde, tiene muchas ramas y crecen todas juntas hacia arriba, siempre huele”, fue una planta ceremonial que los aztecas empleaban para sahumar en la festividad *Atemoztli* (petición de lluvia en el mes de diciembre); para empolverar la cara de cautivos antes de ser sacrificados “y no sintiesen la muerte” (atenuante) en la fiesta *Tlaxochimaco* (agosto en honor al Dios del fuego); para sembrar de incienso como ritual y sahumar en *Etzalqualiztli* (junio, fiesta a honra de los dioses de la lluvia), elaborar incienso ofrendado por la gente pobre en honor a *Xiuhtecutli* (dios del fuego o en fiestas en honor al Dios Tláloc). Los aztecas también lo usaron como medicinal para curar granos en la espalda, “molida y mezclada con cacao tostado se bebe para los que escupen sangre y para los que tienen calentura” (Sahagún, 1999).

## ANTECEDENTES

En excavaciones arqueológicas recientes en el templo Mayor en la capital de México, la ofrenda número 10, con ubicación en la calle de Guatemala 38, contenía restos de copal y fragmentos de *yahutli*, como ofrendas que los mexicas hacían como parte de ritos de consagración de construcciones de nuevas edificaciones dentro de un espacio considerado sagrado (Montúfar, 2003).

En el mismo Códice Florentino se presentan algunas ilustraciones de las variedades de *cempoalxóchitl* y se describen algunas de sus características.

“Estas flores que se llaman *cempoalsuchitl*: son amarillas y de buen olor y hermosas hay muchas de ellas. Que ellas se nacen y otras que las siembran en los huertos. Son de dos maneras unas que llaman hembras *cempoalsuchitl* y son grandes y hermosas: otras hay que se llaman macho *cempoalsuchitl* no son hermosas ni grandes”. “Hay otras de este género que se llaman *macuilsuchitl* son pequeñas aunque muy amarillas y muy olorosas”. “Estas que se llaman *cozatli* son pequeños y son silvestres son del genero de las arriba dichas (son) amarillas y olorosas”. “Esta flor que se llama *tecacayactli* es colorada y del genero de las arriba dichas” (Sahagún, 1999).

Francisco Hernández presenta más detalle de las variedades de *cempoalxochitl*, estableciendo las diferencias por el nombre náhuatl, por el color y por el tamaño; además, presenta láminas de las formas de estas variedades. Señala que todas tienen hojas parecidas con “flores amarillo rojizas o amarillo rojizas con encarnado...”.

*cempoalxochitl* lo describe con flor “amarillo rojiza y supera a las de los demás géneros en el número y amplitud de sus hojas, siendo propiamente llamada *cempoalxochitl* por la numerosa y admirable agrupación de sus hojas (corolas de las flores liguladas), en cuya forma y disposición se parece hasta cierto punto a nuestra rosa blanca; la planta es mayor que todas las otras y con hojas más grandes”.

*Oquichtli* (*oquichticocaxochitl*) “o flor macho por el tamaño de sus hojas y del cáliz, del mismo modo que es superada por el primer género en el tamaño de toda la planta, de la flor y de las hojas, así supera a las demás en todo, excepto en el número de hojas, que es inferior al de casi todas las otras”.

## ANTECEDENTES

*Tlapaltecacayatl* “por la variedad de sus colores, es menor que (*oquichtli*), pero con hojas más numerosas y de color amarillo rojizo tendiendo a verdemar; la planta es menor que las precedentes y con hojas más chicas”.

*Tlapalcozatli* (*tlapalcozatlixochitl*) o *coaxochitl* “es más pequeño que todos los anteriores, con hojas no muy numerosas y parecido en el color al tercer género”.

*Zacaxochitlcoztic* o *cozatli* “es amarillo rojizo y menor que el precedente”.

*Tepecempoalxochitl* “Un poco más grande...pero con flores amarillo rojizas más delicadas, como son también las hojas de la planta, que son las más chicas de todas” (Serrato, 2009).

“*Cempoalxochitl* o veinte flores (en Xochimilco es la flor de cuatrocientos pétalos) es un nombre que abarcaba a un grupo de plantas con características comunes: tallos, hojas e inflorescencias olorosas, flores de color amarillo, anaranjado, rojo y colores combinados. La condición silvestre y cultivada de las plantas *cempoalxochitl*, referida por Sahagún y por Hernández, indica, por un lado, que se practicaba la siembra y por otro lado, la recolección. En cuanto a su cultivo, en el Códice Florentino se hace referencia a quienes se dedicaban a las flores: Párrafo decimoprimer: de las flores compuestas, por arte de oficiales que hacen flores” o *xochimanque*, cuya presencia se ilustra en las láminas del párrafo undécimo, donde se les representa sembrando el almácigo, trasplantando, cortando flores, arreglando guirnaldas, racimos y coronas, decorando diversos bastones y comerciando. Las especies cultivadas corresponden a *Tagetes erecta* (*Cempoalxochitl* hembra y macho) y *T. patula* (*Tepecempoalxochitl*, *Tlapalcozatlixochitl*, *Oquichtlicocaxochitl*, *Cozatlicoztic*, *Tlapaltecacayatl* y *Zacaxochitlcoztic*); mientras que las especies silvestres (*Cozatli*, *Macuilxochitl*, *Tecacayactli*) de recolección pueden ser: *T. erecta* silvestre, *T. lunulata* y *T. tenuifolia*”, respectivamente (Serrato, 2009).

En el Códice Florentino aparecen dibujos de plantas de *T. erecta* y de *T. patula*, la hembra y el macho, así como actividades en torno al cultivo y uso de flores (tomo III, Libro XI); en el trabajo de Hernández se muestran dibujos de planta y flor de *cempoalxochitl*, flor macho de *oquichtli*, *tlapaltecacayatl*, *macuilxochitl*, *tlapalcozatli*, *zacaxochitlcoztli* y *tepecempoalxochitl*.

## ANTECEDENTES

Especialmente el uso del *cempoalxochitl* (*T. erecta*) fue importante considerando su empleo festivo en el calendario solar azteca. En las veintenas *Tecuilhuitontli* (12 de junio al 1 de julio), *Uey Tecuilhuitl* (2 al 21 de julio), *Tlaxochimaco* (22 de julio al 10 de agosto) o *Miccailhuitl* (“fiesta de los muertitos”), *Xocotl Huetzi* o *Huey Miccailhuitl* (11 al 30 de agosto) y *Ochpaniztli* (31 de agosto al 19 de septiembre), se utilizaban flores de *cempoalxochitl* en las más diversas formas: racimos en la mano, guirnaldas, sartales, cadenas, estandartes, tanto para ofrecer a las personas como enflorar patios, estatuas en los templos y nichos en las casas (Sahagún, 1999; Serrato, 2004).

Con excepción del hallazgo de restos de *yahutli*, hasta ahora no se ha encontrado evidencia arqueológica de polen u otro resto vegetal de *Tagetes*, especialmente de *T. erecta* o de *T. patula* que fueron los más empleados y sobre los cuales hubo más trabajo de domesticación en el centro de México. Kaplan (1960) refiere la escultura de una corona de mazorcas de maíz junto con cabezuelas grandes de *cempoalxochitl* dispuestas en el cuello de una urna funeraria; también se comenta que las flores en los huaraches del monolito de la Coyolxauqui corresponden a una especie silvestre de *T. erecta*, y no hay duda sobre la necesidad de examinar otros monolitos como el de *Xochipilli* o el de *Xilonen*. Finalmente, se tiene la evidencia inequívoca de flores de *T. patula* o de *T. erecta* en uno de los muros del convento del Divino Salvador de Malinalco, al costado oeste bajo la iglesia Agustina que data de 1540, pintadas por *tlacuilos*, o artistas indígenas, que trataron de representar el paraíso terrenal con plantas y animales (Linares y Bye, 2006).

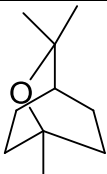
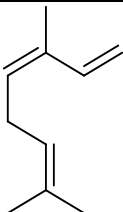
## ANTECEDENTES

### 2.1.5 Composición química.

El contenido y cantidad de compuestos es afectado por factores como el hábitat de la planta (Karososu, 2005), la etapa fenológica, las diferentes partes de las que se extrae, la composición del suelo y la fertilización mineral (Macías y Galindo, 2001), por lo que es común encontrar diferencias en el contenido de compuestos aún entre plantas de la misma especie. Hay algunas especies de *Tagetes* que comparten compuestos químicos, mientras que otros compuestos solo se encuentran en una sola especie (Duke, 2009). Las propiedades biológicas de estas plantas afectan a diversos organismos, desde bacterias, virus, hongos, nematodos, ácaros e insectos e inclusive otras especies de plantas (Serrato y Quijano, 1993).

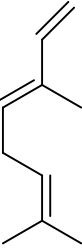
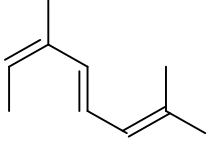
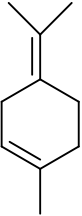
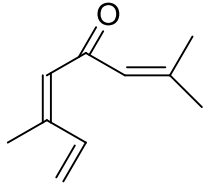
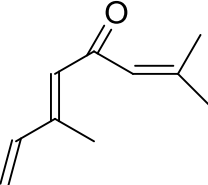
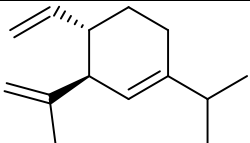
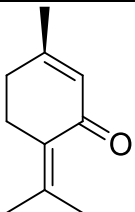
En cuanto a la composición química del aceite esencial de las partes aéreas de *Tagetes patula cap.* Se han identificado 51 compuestos, que comprenden el 93% del total de los compuestos del aceite esencial, de los cuales los principales son cineol, ocimeno, terpinoleno, ocimenona, elemeno, piperitenona, caryofileno e ionona (Om Prakash, 2012).

Cuadro 3. Principales compuestos presentes en el AE de la especie *Tagetes patula cap* (Om Prakash, 2012).

Fórmula	Compuesto	Contenido en AE (%)
	1,8-cineol	4.4
	(Z)- $\beta$ -ocimeno	11.8

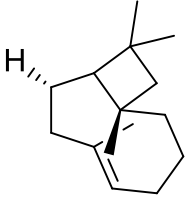
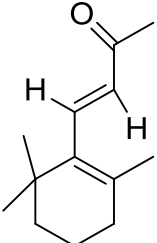
ANTECEDENTES

Continuación Cuadro 3. Principales compuestos presentes en el AE de la especie *Tagetes patula* cap (Om Prakash, 2012).

	(E)- $\beta$ -ocimeno	1.8
	Alo-ocimeno	2.0
	Terpinoleno	6.9
	(Z)-ocimenona	6.4
	(E)-ocimenona	3.0
	$\delta$ -elemeno	16.9
	Piperitenona	3.3

## ANTECEDENTES

Continuación Cuadro 3. Principales compuestos presentes en el AE de la especie *Tagetes patula* cap (Om Prakash, 2012).

	<p><math>\beta</math>-Cariofileno</p>	<p>18.6</p>
	<p>(E)- <math>\beta</math>-ionona</p>	<p>2.5</p>

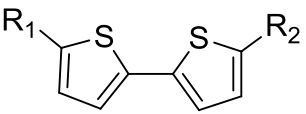
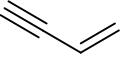
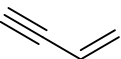
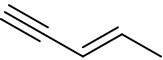
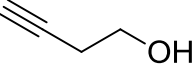
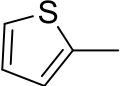
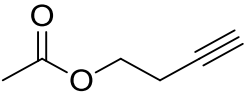
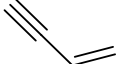
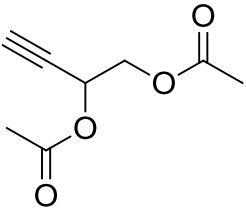
Los usos referidos en la actualidad para *T. patula* son similares a los de la especie *T. erecta* y al igual que en éste se han identificado componentes azufrados en la raíz. Es muy probable que la química de esta planta sea también similar a la de *T. erecta*. Pero es de suma importancia realizar investigación experimental que corroboren la efectividad de estos usos, y la toxicidad de la planta (Biblioteca de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009).

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



ANTECEDENTES

Cuadro 4. Tiofenos más comunes del género *Tagetes*.

Estructura		Nombre	Acrónimo
			
R1	R2		
-H		5-(3-buten-1-inil)-2,2'-bitienil	BBT
-CH <sub>3</sub>		5'-metil-5-(3-buten-1-inil)2,2'-bitienil	MeBBT
-H		5-(1-pentil-2,2'-bitienil)	PBT
-H		5'-(4-hidroxi-1-butinil)-2,2'-bitienil	BBTOH
-H		2.2',5',2''-tiertienilo, ( $\alpha$ -tertiofeno, $\alpha$ -tertienilo)	$\alpha$ -T
-H		5-(4-acetoxi-1-butinil)-2.2'-bitienil	BBTOAc
CH <sub>3</sub> -O-CO-CH <sub>2</sub> .		5-metilacetato-5'-(3-buten-1-inil)-2,2'-bitienil	AcOCH <sub>2</sub> BBT
-H		5-(3,4-diacetoxi-1-butinil)-2-2'-bitienil	BBT(OAc) <sub>2</sub>

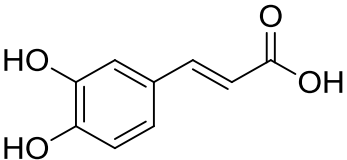
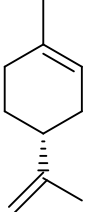
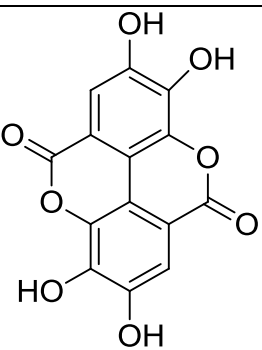
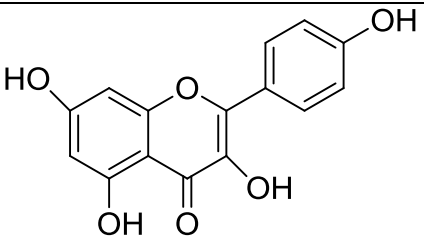
El gran espectro de eficiencia de los tiofenos como agentes antimicrobianos y su capacidad biodegradable, los hace muy atractivos como alternativa del uso de pesticidas químicos (Marotti *et al.*, 2004); (Santa Cruz, 2005). El  $\alpha$ -tertienilo

## ANTECEDENTES

presenta actividad antimicrobiana, puede ser fototóxico en presencia de luz ultravioleta cercana y producir fotodermatitis por un mecanismo que no depende de la peroxidación lipídica de la membrana (Guzmán y Manjarrez, 1962).

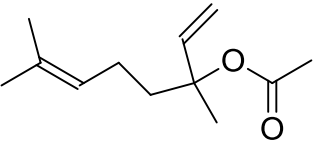
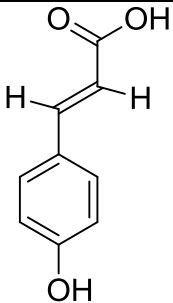
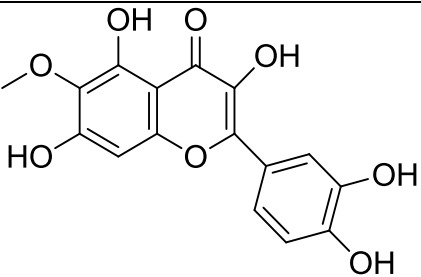
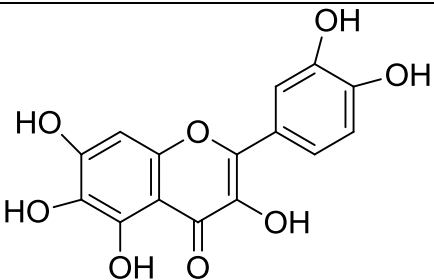
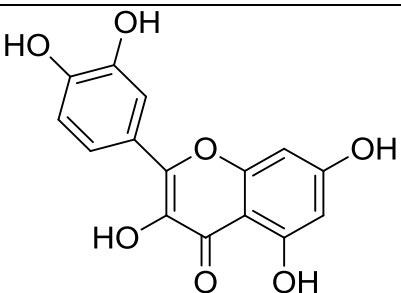
También se reportan diversos compuestos identificados de la especie *Tagetes patula*, dichos compuestos presentan una gran diversidad en cuanto a sus actividades biológicas; y en el Cuadro 5 se describen algunos ejemplos (Duke, 2009).

Cuadro 5. Ejemplos de compuestos identificados de la especie *Tagetes patula* indicando sus actividades biológicas.

Estructura	Compuesto	Actividad biológica	Referencia
	Ácido cafeico	Citoprotector Inhibidor de aldosa reductasa	Newall, C.A. 1996. Ichikawa, K., et al. 1991
	<i>d</i> -limoneno	Repelente de insectos	Jacobson, M. 1990
	Ácido-elagico	Anti HIV Antimalarial	Tan, G.T. 1991 Rukunga, G. 2006
	Kaempferol	Antihistamínico Antipirético	Williamson, E. M. 1989 Amoros, M. et al. 1992

ANTECEDENTES

Continuación Cuadro 5. Ejemplos de compuestos identificados de la especie *Tagetes patula* indicando sus actividades biológicas.

	<p>Acetato de linaloilo</p>	<p>Depresor-SNC</p>	<p>Buchbauer et al, 1993</p>
	<p>Ácido-<i>p</i>-cumárico</p>	<p>Citotóxico hepatoprotector</p>	<p>Jeffery B., 1983 Jeffery B., 1983</p>
	<p>Patuletina</p>	<p>Antiespasmódico</p>	<p>Iwu, M.M. 1993.</p>
	<p>Quercetagetina</p>	<p>Antibacteriano Antioxidante</p>	<p>Jeffery B., 1983 Nigg, H.N., 1992</p>
	<p>Quercetina</p>	<p>Inhibidor de ATPasa Antioxidante</p>	<p>Nigg, H.N., 1992 Jeffery B., 1983</p>

### **2.1.6 Propiedades biológicas y farmacológicas.**

La medicina popular de México se cuenta con numerosas especies vegetales que son utilizadas para contrarrestar enfermedades de origen bacteriano. Las especies de la familia *Asteraceae* representan algunas de las más útiles y se han realizado estudios utilizando extractos metanólicos para mostrar actividades farmacológicas. Las infusiones de las flores poseen efectos terapéuticos para tatar fiebres. Por otra parte, en la medicina Ayurvedica las infusiones de las hojas de *Tagetes* son utilizadas para el tratamiento de enfermedades estomacales e intestinales como los cólicos, diarrea, vómitos, fiebre, enfermedades de la piel y trastornos hepáticos (Ross, 1981; Farjana, 2009). Algunos de los compuestos aislados de especies con actividad antimicrobiana son tiofenos, flavonoides y terpenos (Ghani, 1998). Otros estudios reportan la actividad antibacteriana de los flavonoides de las asteráceas contra *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*. Estudios fitoquímicos realizados al jugo de la flor han revelado propiedades farmacológicas útiles para el tratamiento de hemorroides, reumatismo, resfriados y bronquitis (Tereschuk, 2003).

En otras investigaciones se han estudiado los efectos antiinflamatorios de la patuletina, flavonoles y su glucósido a partir de extractos metanólicos de *Tagetes patula* en modelos de inflamación aguda inducida en animales, como son el edema de pata trasera que se cree que representa la fase temprana de la inflamación y es inducida por  $\gamma$ -carragenina y la histamina, así como también el edema de la oreja inducido por el ácido araquidónico y el 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA). Los estudios anteriores han mostrado que la administración oral de patuletina y patulitrina suprime el edema inducido por carragenina en una forma dependiente de la dosis. A 15 y 50 mg/kg de patuletina, el edema se suprimió significativamente y las tasas de inhibición fueron del 41-52 % en 4-5 h. mientras que con 50 mg/kg de patulitrina, el edema de las patas traseras se suprimió en 3 a 5 h. después de la administración, con tasas de inhibición del 45-52 %. con 15 mg/kg de patulitrina el edema de la pata posterior fue suprimido en 4 a 5 h. sin embargo, con 10 mg/kg, del fármaco anti-inflamatorio fenilbutazona, el edema disminuyo en 47 a 60% en 3-6 h. Lo anterior prueba que la patuletina y la

## ANTECEDENTES

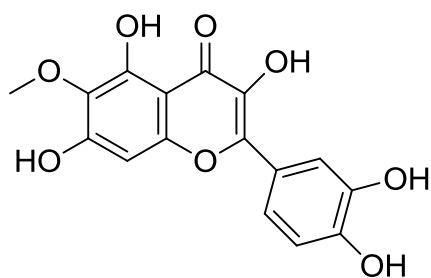
patulitrina fueron menos eficaces en suprimir el edema inducido por la carragenina en comparación con la fenilbutazona. Estos resultados sugieren que los componentes activos en los efectos anti-inflamatorios de la especie *Tagetes patula* son la patuletina y la patulitrina. También se analizó la administración tópica de la patuletina y la patulitrina, ambos compuestos inhibieron el edema de la oreja inflamatoria inducida por ácido araquidónico en ratones (Yasukawa, 2013).

Investigaciones realizadas con extractos metanólicos y de éter de petróleo a las distintas partes y semillas de la especie *Tagetes patula* señalan que poseen actividad antimicrobiana; el fraccionamiento fue guiado por bioensayo condujo al aislamiento del flavonoide patuletina como el activo antibacteriano y se determinó la concentración mínima inhibitoria (MIC), en *Corynebacterium spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, y *Micrococcus luteus*. La actividad antibacteriana se determinó por el método de difusión en disco, siendo el extracto con éter de petróleo de las partes aéreas el que demostró actividad contra *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *Micrococcus luteus*, *M. lysodeikticus*, *Staphylococcus aureus*, *S. saprophyticus*, *S. pyogenes*, y todas las bacterias Gram-negativas que se probaron excepto *Pseudomonas aeruginosa*. A diferencia del extracto metanólico que presentó actividad antibacteriana contra *P. aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae*, el extracto con éter de petróleo de la raíz presentó un efecto inhibitorio significativo contra *Bacillus subtilis* y *P. aeruginosa* y el extracto metanólico de la raíz presentó actividad contra *M. luteus* y *P. aeruginosa*, los extractos de semillas tanto con metanol y éter de petróleo exhiben buena actividad contra *B. subtilis*, *Shigella flexneri* y *Proteus mirabilis*.

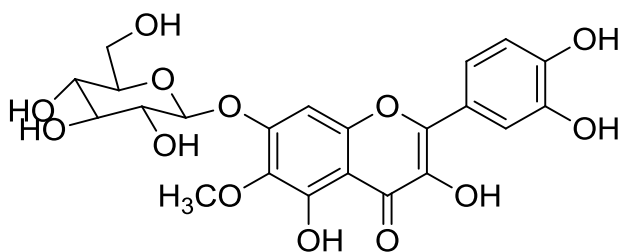
Se aislaron y purificaron compuestos puros a partir de las diferentes fracciones estudiadas; de las fracciones metanólicas se aislaron e identificaron los flavonoides patuletina (Figura 2) y patulitrina (Figura 2) evaluando su actividad antimicrobiana y adicionalmente también incluyen en el estudio derivados de la patuletina como son: 3,3',4',7-tetrabenzoilpatuletina (Figura 2) y 3,3',4',7-tetracinnamoilpatuletina (Figura 2), siendo la patuletina efectiva en la inhibición del crecimiento de las bacterias Gram-positivas que se evaluaron, en cuanto a la evaluación de la patulitrina se describe que es un potente inhibidor del crecimiento

## ANTECEDENTES

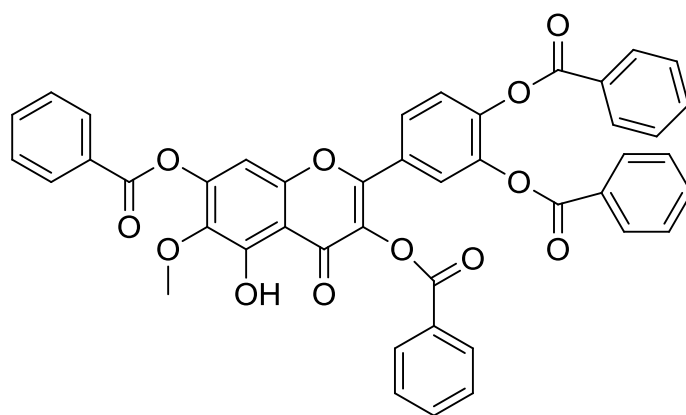
de *Streptococcus faecalis*, *S. pyogenes*, y *Staphylococcus saprophyticus*. En cuanto a la actividad antibacteriana de 3,3',4',7-tetrabenzoilpatuletina, ésta fue similar a la de su compuesto de origen patuletina, contra bacterias Gram-positivas y era marginalmente mejor contra bacterias Gram-negativas. En la evaluación de la 3,3',4',7-tetracinnamoilpatuletina únicamente se observa una inhibición a una concentración de 50 µg/disco para *Corynebacterium hofmani* y *C. xerosis* (Shaheen *et al.*, 2008).



patuletina.

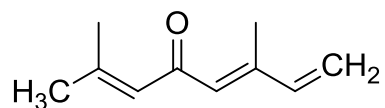


patulitrina.

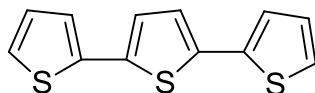


3,3',4',7-tetrabenzoilpatuletina.

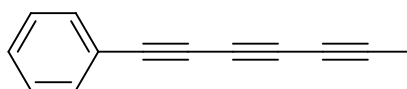
## ANTECEDENTES



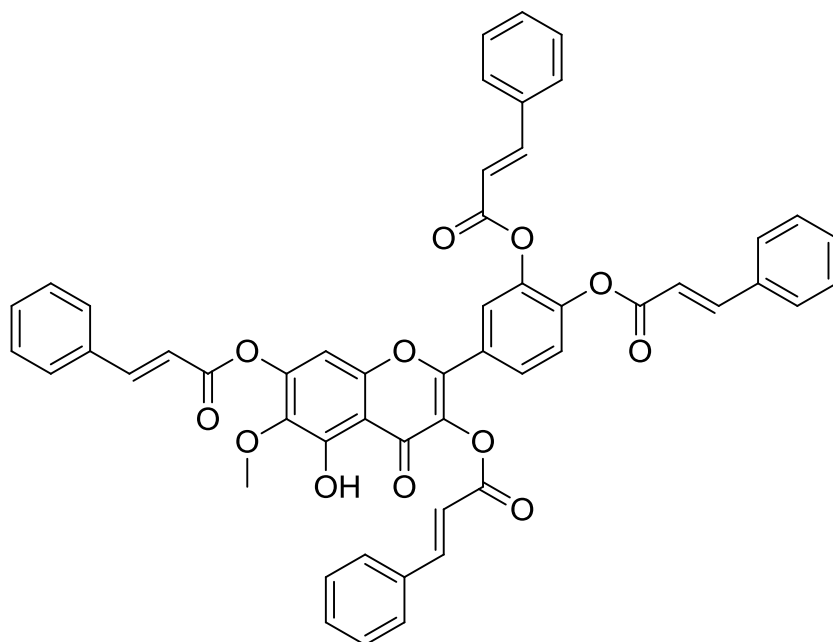
(*E*)-ocimenona.



$\alpha$ -tertienilo



fenilheptatrieno.



3,3',4',7-tetracinnamoilpatuletina

Figura 2. Compuestos aislados e identificados a partir de distintas partes de la especie *Tagetes patula* y sus derivados (Shaheen *et al.*, 2008).

## ANTECEDENTES

En otras Investigaciones que tienen como objetivo demostrar las propiedades insecticidas de distintos extractos del género *Tagetes*, se investigaron extractos de *T. erecta*, *T. patula* y *T. diminuta* contra larvas de *Aedes aegypti* y *Anopheles stephensi*, siendo el mosquito *Aedes aegypti* el responsable de transmitir la enfermedad del dengue, la fiebre amarilla y encefalitis a los seres humanos, y el mosquito *Anopheles stephensi* el vector para transmitir la malaria hacia los humanos (Perich *et al.*, 1994) resultando tener una buena actividad biológica.

Las investigaciones de diferentes tipos de compuestos señalan que especies de *Tagetes* contienen esteres monoterpenoides y tiofenos, estos tipos de compuestos se han estudiado por separado, mencionando que la actividad larvicida de los extractos de *T. minuta* es causado por el monoterpeno ocimenona (Figura 2) (Maradufu *et al.*, 1978).

También se hace mención de que este compuesto no es el único con actividad larvicida sino que también existen otros componentes responsables de dicha actividad. El componente responsable de la actividad larvicida de *T. patula* sobre *Aedes aegypti* en el cuarto estadio por el método de inmersión y expuesto bajo luz UV es el  $\alpha$ -tertienilo (Koul y Dev, 1997). También se ha observado que el alfa tertienol incrementa su actividad con la exposición a la luz, produciendo una acción fototóxica (Arnason *et al.*, 1981).



## **2.2 Fenilpropanoides.**

### **2.2.1 Flavonoides.**

Es un grupo de compuestos presentes en muchas especies vegetales, con diversas actividades farmacológicas tales como antioxidante, antimicrobiana, algunos con potencial actividad anticarcinogénica o cardioprotectora.

Estos compuestos fueron descubiertos por el premio Nobel Szent-György, quien aisló a partir de la cáscara de limón una sustancia en 1930, la citrina, que regulaba la permeabilidad de los capilares (Singleton *et al.*, 1981).

Los flavonoides se denominaron primeramente como vitamina P (por permeabilidad) y también como vitamina C<sub>2</sub> (porque se comprobó que algunos de ellos tienen propiedades similares a las de la vitamina C). Sin embargo, el hecho de que los flavonoides fueran vitaminas no pudo ser confirmado y ambas denominaciones fueron abandonadas alrededor de 1950 (Singleton *et al.*, 1981).

Etimológicamente la palabra flavonoide deriva del latín *flavus* que significa “amarillo”, los flavonoides se encuentran en la naturaleza tanto en su estado libre como glicosilado y constituyen el grupo de los fenoles naturales (Bruneton, 2002).

Los flavonoides se encuentran ampliamente distribuidos en las plantas verdes, especialmente en las angiospermas, pero han sido detectados algunos en hongos y algas. Se encuentran especialmente en partes aéreas, en tejidos superficiales, y se les encuentra en forma libre (agliconas flavonoides), como glicósidos, sulfatos y algunas veces como dímeros o polímeros (Törrönen, 1997). Los glicósidos se pueden diferenciar por el tipo de enlace, habiendo de dos tipos C-glicósidos y O-glicósidos, siendo los segundos los más frecuentes (Li *et al.*, 1996).

### **2.2.2. Estructura Química de los flavonoides.**

La estructura general de los flavonoides comprende un anillo A, derivado de la cadena polietídica, un anillo B, derivado del ácido siquímico, tres átomos de carbono que conectan a los anillos A y B, correspondientes a la parte alquílica del fenilpropanoide y por eso se les conoce como compuestos C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> (Figura 3 ).

## ANTECEDENTES

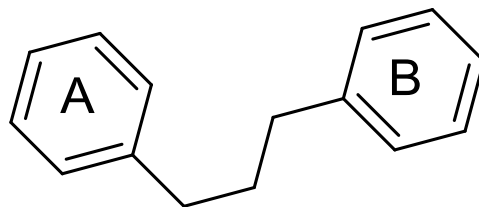


Figura 3. Estructura base del esqueleto flavonoide.

Las distintas estructuras se encuentran con cadena alquílica abierta (chalconas), formando éstas un heterociclo (Y-pironas) o polimerizaciones que ocurren principalmente por uniones C-C etc., a continuación se presenta la Figura 4 con diversos grupos estructurales de flavonoides.

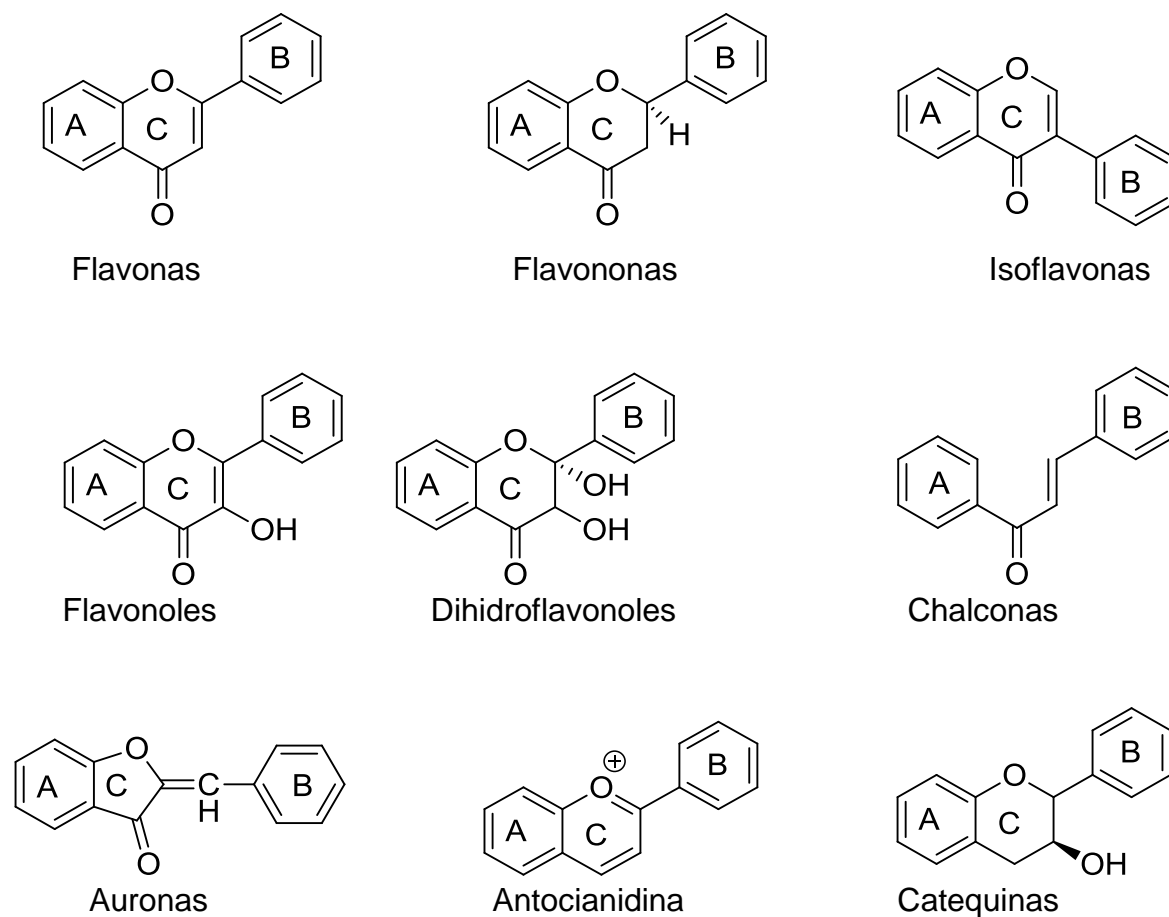


Figura 4. Estructuras de diversos grupos de flavonoides (Harbone *et al.*, 1975).

## ANTECEDENTES

De forma general, el anillo A deriva de la ruta del acetato-malonato y el anillo B proviene de la fenilalanina. Por último, el heterociclo se nombra anillo C (Iglesias-Neira, 2009).

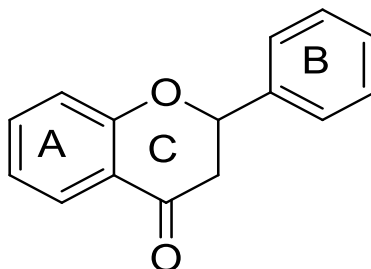


Figura 5. Estructura básica de los flavonoides (Modificado de Iglesias-Neira, 2009).

### 2.2.3 Relación estructura química – actividad antioxidante.

La estructura básica de los flavonoides permite una multitud de patrones de sustitución por lo que su actividad antioxidante dependerá de los grupos funcionales que posea y de la posición de los mismos. A continuación se enlistan una serie de parámetros estructurales que afectan a su actividad (Iglesias-Neira, 2009).

a) *Grupos hidroxilo*. Son fundamentales para la actividad neutralizadora de radicales libres, por ejemplo, los hidroxilos del anillo B pueden donar fácilmente hidrógenos y electrones a EROs y ERNs. Entre los homólogos estructurales de flavonas y flavanonas, la capacidad neutralizadora de radicales libres e incrementa de manera lineal y curvilínea, respectivamente con el número de grupos hidroxilo de su estructura. La formación del grupo catecol (dos –OH's en posición 3' y 4') en el anillo B, aumenta considerablemente la capacidad antioxidante. También es importante la presencia de este grupo funcional en la posición 3 del anillo B, mismo que al encontrarse sustituido por grupos metilo o unidades de carbohidratos, carece de actividad (Prochazkova *et al.*, 2011).

## ANTECEDENTES

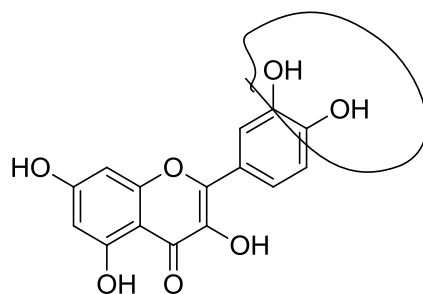


Figura 6. Estructura de catecol (Modificada de Prochazkova *et al.*, 2011).

b) Doble enlace en las posiciones 2-3 conjugado a un grupo oxo en el anillo C. Dicha conjugación provee la deslocalización electrónica del anillo B (Modificada de Prochazkova *et al.*, 2011).

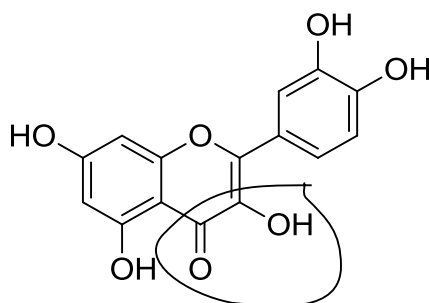


Figura 7. Doble enlace 2,3 conjugado a un grupo 4-oxo del anillo C (Prochazkova *et al.*, 2011).

c) *Esterificación con grupos no glucosídicos.* Comúnmente se encuentran esterificados ácidos orgánicos en el hidroxilo de la posición 3, a los flavonoides bajo esta forma se les denomina galatos (Iglesias-Neira, 2009).

d) *Esterificación de grupos glicosídicos.* La actividad antioxidante de un flavonoide glicosilado depende de la estructura y la posición del azúcar. La posición 3 es la que con más frecuencia se conjuga a un azúcar, que generalmente es D-glucosa (Iglesias-Neira, 2009).

e) *Grado de polimerización.* Los fenoles poliméricos presentan una estructura compleja por lo que aun no se cuenta con correlaciones estructura – actividad, aunque existen estudios sobre la capacidad antioxidante y el grado de polimerización de procianidinas, encontrando que los dímeros y trímeros resultaron más efectivos que sus respectivos monómeros contra el radical superóxido (Iglesias-Neira, 2009).

#### **2.2.4. Compuestos fenólicos.**

El interés por los compuestos fenólicos o polifenoles, como beneficios para la salud, se ha incrementado debido a que se han observado potentes actividades antioxidantes y atrapadoras de radicales libres en estudios *in vitro*. Sin embargo, su papel *in vivo* aun no está claro ya que, su aparición en plantas como una mezcla compleja de compuestos polifenólicos crea grandes dificultades en el análisis de su biodisponibilidad y de sus efectos nutricionales y fisiológicos (Prochazkova *et al.*, 2011).

Se originan principalmente en las plantas que los sintetizan en gran cantidad, como producto de su metabolismo secundario por lo que se pueden encontrar en una gran variedad de plantas comestibles: frutos, hortalizas, bebidas (como té, café, cerveza y vino tinto), en el aceite de oliva, en cereales y en algunas semillas. El aporte de polifenoles en la dieta puede estar entre 50 y 800 mg/día, dependiendo del consumo de productos que lo contienen. Un nivel importante de antioxidantes se alcanza cuando el consumo es de unos 800 mg/día, que puede lograrse con una dieta rica en frutas y hortalizas (Estrella-Pedrola, 2007).

Algunos polifenoles son indispensables para las funciones fisiológicas vegetales. Otros participan en funciones de defensa ante situaciones de estrés y estímulos diversos.

La biosíntesis de los polifenoles como producto del metabolismo secundario de las plantas tiene lugar a través de dos importantes rutas primarias: la ruta del ácido siquímico y la ruta de los poliacetatos (Quiñones *et al.*, 2012).

Los polifenoles constituyen un amplio grupo de sustancias, con diferentes estructuras y propiedades químicas y actividades biológicas, englobando más de 8,000 compuestos distintos. Químicamente, son sustancias que poseen un anillo aromático, con uno o más grupos hidroxilo. Estos compuestos se pueden clasificar en diferentes grupos en función del número de anillos fenólicos que contienen y de los elementos estructurales que unen a los anillos (Manach *et al.*, 2004).

### **2.2.5. Compuestos fenólicos simples.**

Son básicamente fenoles sustituidos. El patrón de sustitución del anillo bencénico por grupos –OH se encuentra en posiciones 1,2-, 1,3- y 1,4-. Con tres sustituyentes, el patrón de sustitución puede ser 1,3,5-, y si se trata de tres sustituyentes idénticos se llama *meta*-tri-sustitución. Como ejemplos se tiene al resorcinol (1,3-dihidroxibenceno) y el floroglucinol (1,3,5-trihidroxibenceno) (Vermerris *et al.*, 2006).

### **2.2.6. Ácidos fenólicos y aldehídos.**

Los ácidos hidroxibenzóicos se caracterizan por la presencia de un grupo carboxilo sustituido en un fenol. Como ejemplos están el ácido *p*-hidroxibenzóico, ácido gálico, ácido protocatéquico, ácido salicílico y ácido vanílico (Vermerris *et al.*, 2006).

## **2. 3. Enfermedades periodontales**

### **2.3.1. Concepto**

La enfermedad periodontal está constituida por un grupo de cuadros clínicos de etiología infecciosa que producen lesiones inflamatorias con una elevada capacidad destructiva local del tejido (Raspall, 2006).

### **2.3.2. Factores que influyen en el desarrollo de la enfermedad periodontal**

Existen diversos factores que inducen y favorecen la enfermedad periodontal como los agentes irritantes, la placa dental y el sarro, los materiales de restauración, desechos de alimentos y la respiración bucal (Raspall, 2006). De todos los factores mencionados, la placa dental es el principal agente etiológico de las caries y las enfermedades periodontales (Sepa, 2009), siendo la placa dental una biopelícula, la cual se describirá a continuación.

## **2.4. Biopelículas.**

### **2.4.1. Concepto.**

En cualquier parte de la naturaleza, una biopelícula es una comunidad microbiana sésil, caracterizada por células irreversiblemente unidas a una sustancia o interfase y entre sí, embebidas en una matriz extracelular de sustancias polimerizadas producidas por ellas y que exhiben un fenotipo alterado con respecto al grado de multiplicación celular y transcripción de genes (Negroni, 2009).

### **2.4.2. Características.**

Las biopelículas presentan características relevantes, como:

- *Heterogeneidad fisiológica.* Dentro de la biopelícula se observa un amplio rango de micronichos, separados unos de otros por mínimas distancias, pero con ambientes sumamente contrastantes por ejemplo la tensión de O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>, pH, entre otras. Por lo tanto, células de la misma especie bacteriana pueden tener estados fisiológicos diferentes y se pueden encontrar especies bacterianas diferentes con distintas necesidades fisiológicas. Esta heterogeneidad explica, en parte, la mayor resistencia de las bacterias cuando crecen en una biopelícula (Sepa, 2009).
- *Fenotipos.* Cuando una bacteria crece siendo parte de una biopelícula (forma sésil), manifiesta un fenotipo diferente al que presentan cuando crecen suspendidas en un medio líquido (planctónica). Los fenotipos de las bacterias que crecen en la biopelícula les confieren una mayor resistencia a los antimicrobianos e incluso, la resistencia se mantiene aunque se hayan desprendido de la biopelícula, la cual se ilustra en la Figura 8 (Sepa, 2009).
- *Capacidad adaptativa.* En condiciones desfavorables, la biopelícula puede involucionar a estadios anteriores y en cuanto se presentan las condiciones favorables, se desarrollan nuevamente (Sepa, 2009).
- *Resistencia a los antimicrobianos.* La biopelícula es más resistente a los antimicrobianos probablemente debido a que estos llegan en menores concentraciones (no efectivas para eliminar a las bacterias) a las zonas

## ANTECEDENTES

profundas de la biopelícula, a la protección de la matriz extracelular, a la producción de enzimas que inactivan los antibacterianos, entre otros (Sepa, 2009).

- Señales en la biopelícula. Las bacterias inmersas en la biopelícula se comunican mediante señales químicas e intercambio de material genético.

Esta comunicación tiene influencia sobre la resistencia a antibacterianos, producción de factores de virulencia y en la estructura de la propia biopelícula (Sepa, 2009).

### **2.4.3. Estructura.**

Las biopelículas se organizan en forma de colonias adheridas a diferentes superficies, ya sean blandas, animadas e inanimadas. Están formadas por 15-25% de células y 75-85% de agua y matriz extracelular, generalmente contienen polisacáridos, aunque también pueden encontrarse proteínas, ácidos nucleicos, fibrina y calcio. Los microorganismos de la comunidad conviven, cooperan y se comunican por sistemas de señales denominados “*quorum sensing*”, que regulan la expresión de genes (Negroni, 2009).



## ANTECEDENTES

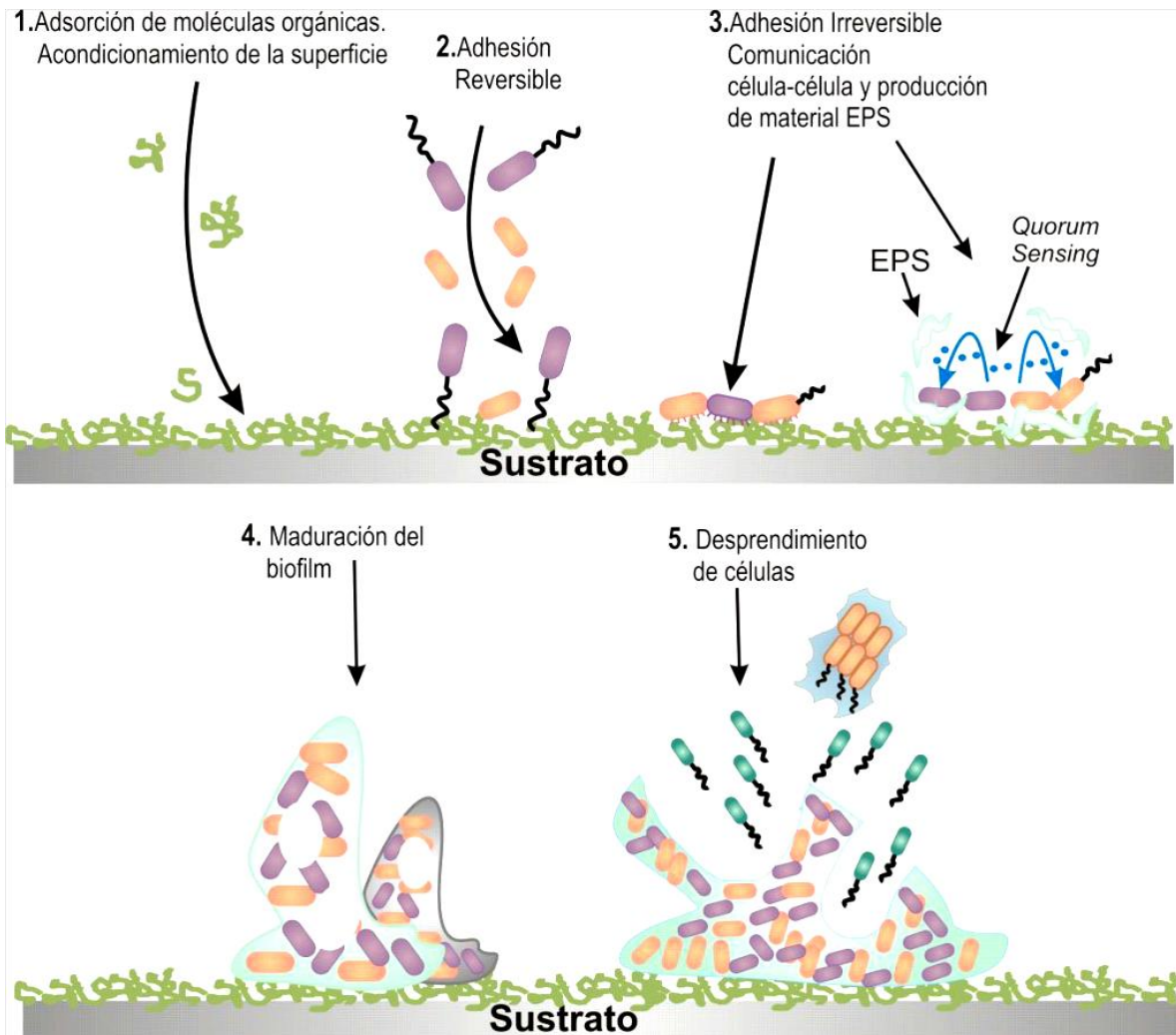


Figura 8. Esquema que representa las etapas presentes en un biofilm sobre su sustrato (Díaz, 2011).

Se ha descrito que la biopelícula está formada por dos estructuras principales:

- La capa salival o película adquirida, formada por proteínas y glucoproteínas y carece de bacterias. Tiene un grosor aproximado de 1-2  $\mu\text{m}$ .
- La capa formada por microorganismos y polímeros extracelulares. Comprende dos procesos: la colonización primaria y la colonización secundaria.

Colonización primaria.

Una vez establecida la película adquirida, comienzan a depositarse las primeras poblaciones bacterianas. Esta biopelícula suele estar compuesta por 20-30 especies bacterianas distintas (ver Figura 9). Mientras el resto de los factores se

## ANTECEDENTES

mantienen constantes, las bacterias se encuentran en equilibrio; en caso contrario (consumo de azúcares, bajo pH, mala higiene bucal), se produce un desequilibrio en la población y se favorece el desarrollo de especies que estaban en bajo número (*S. mutans* y lactobacilos). Los colonizadores iniciales presentes en mayores proporciones son los estreptococos y actinomicetos. *S. mitis*, *S. oralis* y *S. sanguinis* presentan adhesinas de alta afinidad con los componentes de la película salival adquirida. Además, poseen la capacidad para producir IgA-1, (proteasas no producidas por *S. mutans*), que confieren una ventaja para comportarse como pioneros en el establecimiento de la comunidad biótica que constituye la biopelícula (Negróni, 2009).

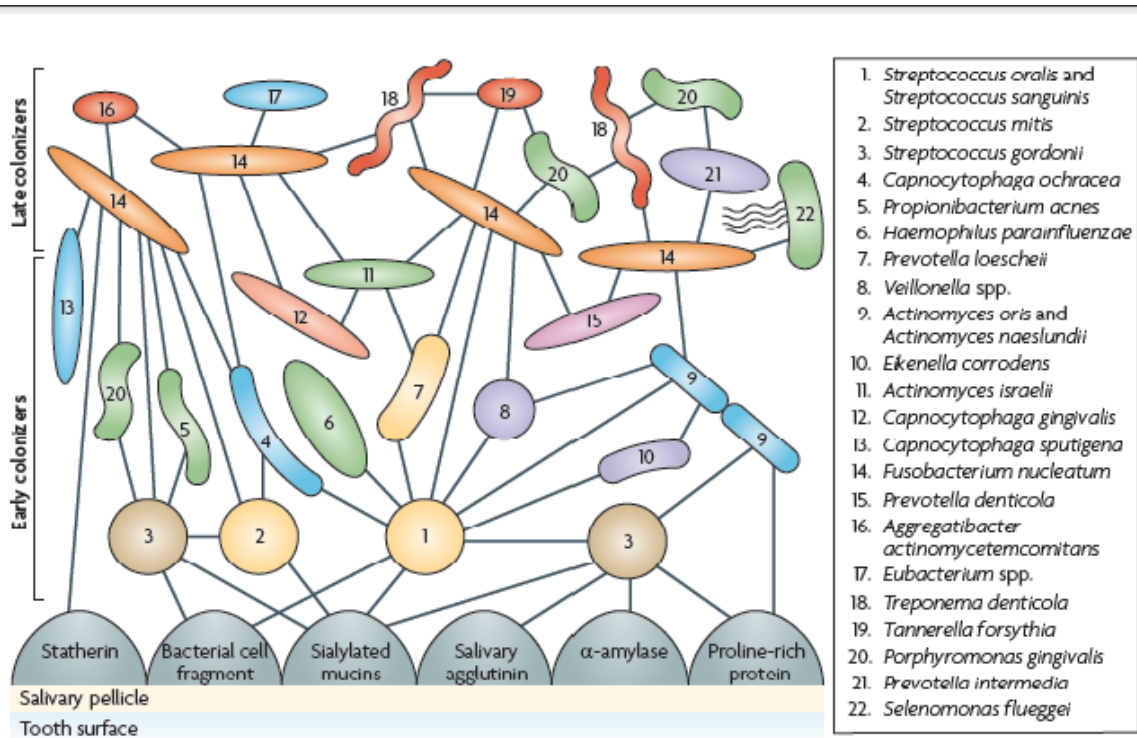


Figura 9. Tipos de bacterias involucradas en la colonización de una superficie dental (Modificada de Kolenbrander, 2002).

## ANTECEDENTES

### *Colonización secundaria.*

En esta etapa, la biopelícula sufre modificaciones estructurales y aumenta en grosor y complejidad. Adicionalmente, se producen fenómenos de cohesión interbacteriana intraespecífica e intergenérica. La cohesión intraespecífica se debe a los constituyentes de la saliva, *S. sanguinis*, *S. oralis* y *A. naeslundii*, a través de los polisacáridos extracelulares (PEC) de *S. mutans* y *A. naeslundii*. La adhesión intergenérica se da a través de los constituyentes de la superficie de las bacterias de diferentes géneros y especie asociados a fimbrias, tal es el caso de la agregación entre *A. naeslundii* y estreptococos orales (Negroni, 2009).

## **2.5. Caries dental.**

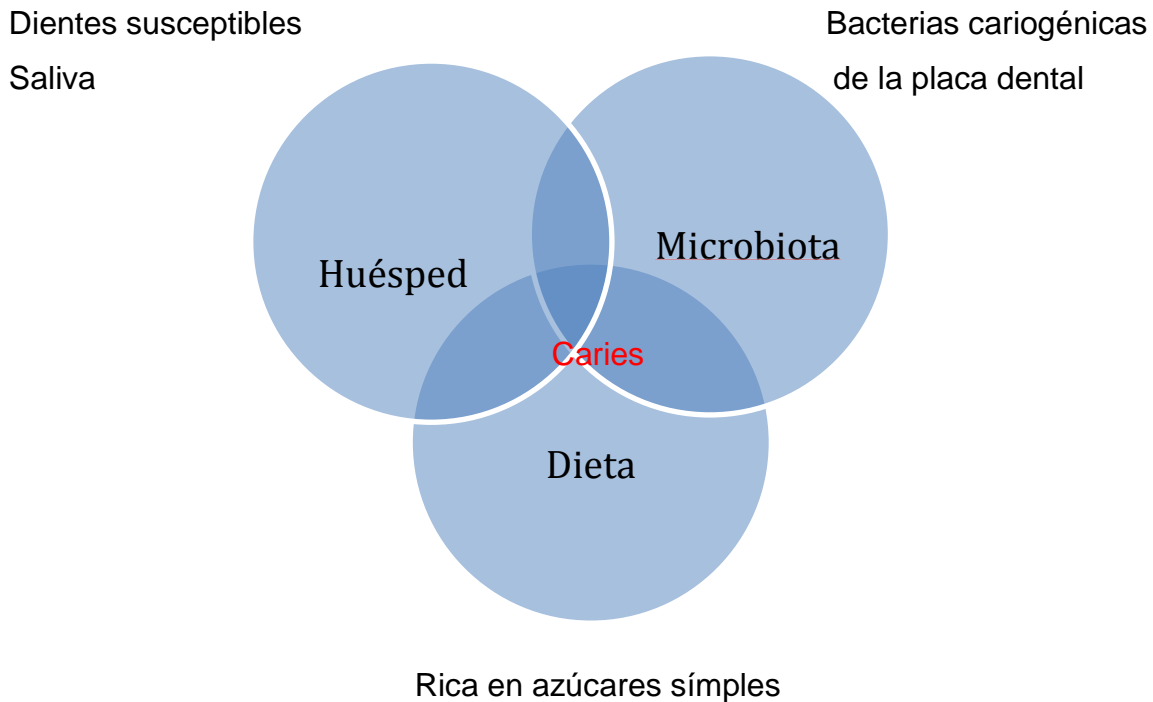
### **2.5.1. Concepto.**

La caries dental se puede definir como una enfermedad microbiológica infecciosa que resulta en la destrucción localizada de los tejidos duros calcificados dentarios (esmalte, dentina, cemento). Es causada por la producción de ácidos por las bacterias y se manifiesta por el oscurecimiento y reblandecimiento progresivo de dichos tejidos, con su posterior pérdida (Palma-Cárdenas *et al.*, 2007).

### **2.5.2. Etiología.**

Para explicar el origen de la enfermedad de la caries y sus lesiones, se recurre al diagrama de Keyes (**Diagrama 1**), que considera a la caries como una enfermedad donde deben intervenir tres factores al mismo tiempo: huésped, microbiota y dieta.

## ANTECEDENTES



**Diagrama 1.** Diagrama multifactorial de Keyes (Modificado de Sacyl, 2006).

### 2.5.3. Microorganismos relacionados con la caries dental.

Los principales microorganismos relacionados con la caries dental son:

- *Streptococcus mutans*, participa en el desarrollo inicial de la enfermedad ya que produce ciertas condiciones favorables para otros microorganismos. En segundo lugar se encuentra *S. sobrinus*.
- *Lactobacillus spp.* y *Actinomyces spp.* que participan en la progresión de las lesiones establecidas.
- *Candida albicans*, es capaz de sobrevivir y proliferar en medios ácidos.
- Otros estreptococos: *S. salivarius*, *S. mitis*, *S. anginosus*, *S. gordonii*, *S. oralis* y *S. sanguinis*, tienen baja capacidad para descender el pH.
- *Actinomycetes*, poseen la capacidad de formar lévanos a partir de sacarosa (Sacyl, 2006).

#### **2.5.4. Factores de virulencia de los microorganismos relacionados con caries dental**

- Acidogénesis. Los azúcares son metabolizados por la vía glicolítica y finalmente se produce ácido láctico, principalmente; es así como se alcanza un pH entre 4.5-5.5, crítico para el proceso de desmineralización.
- Acidofilia. Un pH ácido favorece el crecimiento de *S. mutans* e inhibe simultáneamente el de microorganismos comensales como *S. sanguinis*, *S. gordonii* y *S. oralis*.
- Síntesis de polisacáridos extracelulares, principalmente a través de enzimas denominadas glucosiltransferasas.
- Síntesis de polisacáridos intracelulares, se almacena glucógeno como fuente de glucosa ante la falta de ingreso de ésta.
- Síntesis de proteínas que ligan glucano, son proteínas asociadas a su pared celular y son importantes para la acumulación de *S. mutans* en presencia de sacarosa, al formar un puente que une las superficies celulares de los microorganismos a la matriz extracelular de polisacáridos.
- Adhesinas, *S. mutans* presenta adhesinas de superficie de la familia Spa, también llamada de antígeno I/II, participan en el proceso de adherencia a las glicoproteínas salivales y otros microorganismos.
- Proteína asociada a la pared celular (WapA), permite la adhesión a las caras libres de la pieza dental (Negroni, 2009).

### **3. JUSTIFICACIÓN.**

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

En las últimas décadas del siglo XVIII aparecen las obras de José Mariano Mociño, Luis Montaña y Martín Sessé. Al finalizar el siglo XIX hay una gran producción bibliográfica sobre el uso de las plantas medicinales, instituciones de gran prestigio como el Instituto Médico Nacional se dedican entonces al estudio de la herbolaria. Asimismo en las últimas décadas del siglo pasado y en este siglo que comienza se ha vuelto a considerar el potencial de la medicina herbolaria, como una esperanza tanto para los países desarrollados en la búsqueda de nuevos medicamentos como en los países donde todavía impera la pobreza y la dependencia tecnológica, la herbolaria se ha considerado como una medicina alternativa ante el alto costo de las terapias innovadoras de los países ricos.

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

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

## JUSTIFICACIÓN

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

Con base en estos antecedentes, el presente proyecto de investigación planteó determinar la actividad antibacteriana y antibiociapa del extracto total y de las fracciones de acetato de etilo y metanólica derivadas del fraccionamiento primario de la cincoyaga.

## OBJETIVOS

### 4. OBJETIVOS.

#### 4.1 OBJETIVOS GENERALES

El objetivo general del presente proyecto de investigación consiste en evaluar el potencial para inhibir el crecimiento de bacterias patógenas de la cavidad oral y la formación de biocapa por la especie *Tagetes patula* (cincoyaga). Para cumplir con el objetivo principal se plantearon los siguientes objetivos particulares:

#### 4.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Preparar el extracto metanólico a partir de las partes aéreas de *Tagetes patula* (cincoyaga).
- Realizar el fraccionamiento primario del extracto activo, empleando para ello, métodos cromatográficos convencionales y procesos de fraccionamiento por reparto.
- Determinar el efecto de las fracciones del extracto metanólico de la cincoyaga sobre el crecimiento de bacterias del grupo *viridans* utilizando el método de microdilución en placa de 96 pozos.
- Determinar el efecto del extracto metanólico y de las fracciones activas de la cincoyaga sobre la formación de biocapas monoespecie por *S. mutans* utilizando el método de cristal violeta.
- Determinar el conteo de flavonoides y fenoles totales como estudio químico preliminar.



## **5. DESARROLLO EXPERIMENTAL.**

### **5.1 MATERIAL VEGETAL.**

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

### **5.2 ESTUDIO FITOQUÍMICO DE LA CINCOYAGA.**

#### **5.2.1 Obtención del extracto metanólico total.**

El material se desecó, y se conservó a temperatura ambiente. Posteriormente, el material seco se trituró manualmente. Se realizó la extracción del material triturado utilizando un método de infusión con agua desionizada.

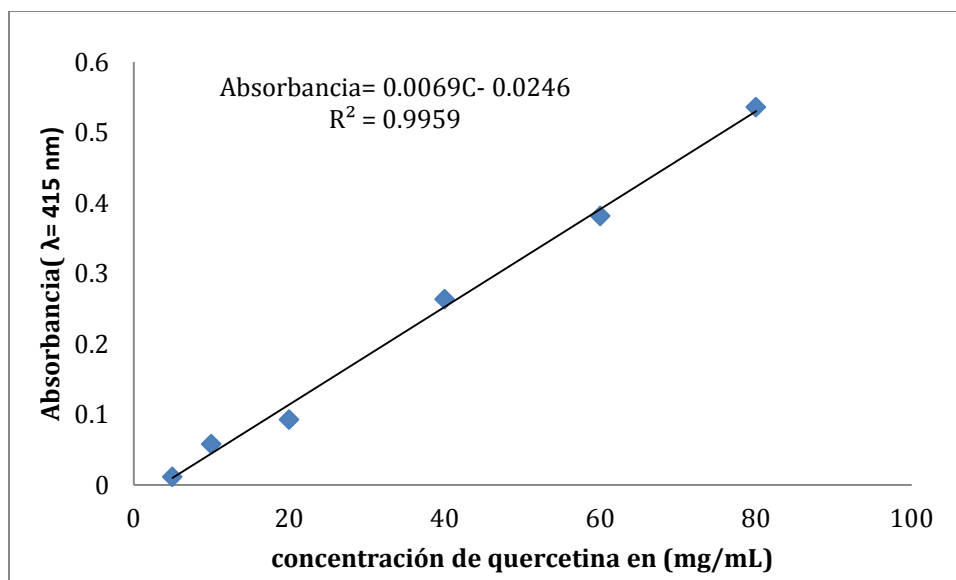
Se realizó el primer fraccionamiento de la infusión utilizando la resina Amberlita XAD-16 con un tiempo de agitación de 5 horas, como paso siguiente se realizó una desadsorción con metanol. La fracción resultante se concentró a presión reducida con ayuda de un rotaevaporador.

#### **5.2.2 Cuantificación de flavonoides totales por el método de Kumazawa modificado a partir del extracto metanólico total.**

La determinación de flavonoides totales se realizó en placas de 96 pozos, siguiendo la metodología de Kumazawa y colaboradores (2004). Se adicionaron 100  $\mu$ L de solución de la muestra (1 mg/mL), y 100  $\mu$ L de solución metanólica de  $\text{AlCl}_3$  al 2%. Se dejó incubar a temperatura ambiente una hora y se midió la absorbancia a 415 nm en un lector de ELISA BIO-RAD Benchmark. El ensayo se realizó por triplicado y los resultados se presentan como el promedio de las determinaciones.

## DESARROLLO EXPERIMENTAL

En la Gráfica 1, se muestra la curva de calibración de quercetina que se construyó en un intervalo de concentración entre 5-80 mg/mL, con el fin de expresar los resultados como equivalentes de quercetina por gramo de extracto ( $\text{mg}_{\text{quercetina}}/\text{g}_{\text{ext}}$  o mg EQ/g).



**Gráfica 1.** Curva de calibración para determinar el contenido de flavonoides totales.

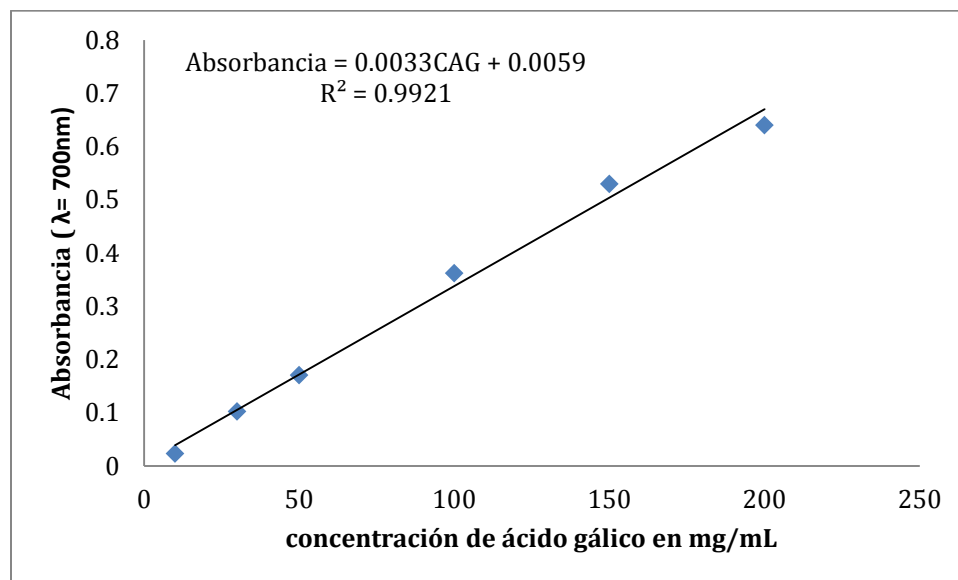
### 5.2.3. Determinación de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu.

Se utilizó la metodología descrita por Singleton y colaboradores (1965) con algunas modificaciones. Se agregaron 800  $\mu\text{L}$  de la disolución de metanol al 50% del extracto total, por triplicado y se reposó por 8 minutos en la oscuridad. Finalmente, se adicionaron 50  $\mu\text{L}$  de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 20% y se guardó la mezcla de reacción por una hora. Por último se realizó una lectura en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 760 nm. en un lector de ELISA BIO-RAD Benchmark. El ensayo se realizó por triplicado y los resultados se presentan como el promedio de las determinaciones.

En la Gráfica 2, se muestra la curva de calibración de ácido gálico que se construyó en un intervalo de concentración entre 10-200 mg/mL, con la finalidad

## DESARROLLO EXPERIMENTAL

de expresar los resultados como equivalentes de ácido gálico por gramo de extracto (mg  $\text{ác.gálico/g}_{\text{ext}}$  o mg EAG/g).



**Gráfica 2.** Curva de calibración para determinar el contenido de fenoles totales.

### 5.2.4 Fraccionamiento secundario del extracto metanólico total.

El proceso de fraccionamiento secundario se realizó utilizando una porción de la fracción metanólica. El proceso se realizó utilizando cromatografía a presión reducida (conocida por sus siglas en inglés como VCL) y como fase móvil mezclas de acetato de etilo-metanol en gradiente de polaridad. El proceso permitió la obtención de dieciséis fracciones combinadas que se analizaron por cromatografía en capa fina y se combinaron aquellas que presentaron similitud.

Cuadro 6. Fraccionamiento secundario del extracto metanólico total.

Fracción	Disolvente	Proporción	Muestra (g)
I	AcOEt	100	1.2081
II	AcOEt-meOH	95:5	0.6844
III	AcOEt-meOH	90:10	0.4999

## DESARROLLO EXPERIMENTAL

Continuación cuadro 6. Fraccionamiento secundario del extracto metanólico total.

IV	AcOEt-meOH	85:15	0.2316
V	AcOEt-meOH	80:20	0.0711
VI	AcOEt-meOH	75:25	1.7602
VII	AcOEt-meOH	70:30	0.0024
VIII	AcOEt-meOH	65:35	0.7360
IX	AcOEt-meOH	60:40	0.0012
X	AcOEt-meOH	55:45	1.1995
XI	AcOEt-meOH	50:50	0.3584
XII	AcOEt-meOH	40:60	0.4718
XIII	AcOEt-meOH	30:70	0.7877
XIV	AcOEt-meOH	20:80	0.4164
XV	AcOEt-meOH	10:90	0.1106
XVI	meOH	100	0.2617

### 5.2.5. Aislamiento de la patuletina a partir de la fracción F-1.

A partir de la fracción F-1 precipitó de manera espontánea un polvo de color amarillo el cual se purificó por recristalización con metanol el compuesto c-1. Este compuesto se caracterizó por comparación de sus constantes espectroscópicas, espectrométricas y RF con las de una muestra auténtica aislada a partir de *Tagetes erecta* como la patuletina (Jiménez, 2013).

## 5.3 ENSAYO BIOLÓGICO.

### 5.3.1 Microorganismos de prueba.

Los microorganismos de prueba utilizados para determinar la actividad antibacteriana del extracto metanólico y del fraccionamiento secundario de las partes aéreas de la especie *Tagetes patula*, fueron *Streptococcus mutans*, *S. oralis* y *S. sanguinis*.

## DESARROLLO EXPERIMENTAL

Para el crecimiento óptimo de las bacterias, se utilizaron los medios de agar nutritivo y los caldos de infusión de cerebro-corazón (BHI) y Mueller-Hinton adicionado con 59.5 mg/L de  $\text{CaCl}_2$  y 66.0 mg/L de  $\text{MgCl}_2$ .

### 5.3.2 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)

La actividad del extracto metanólico y de sus fracciones secundarias de las partes aéreas de *Tagetes patula* sobre la batería de bacterias de prueba se determinó utilizando el método de microdilución en placa de 96 pozos.

Las cepas de las bacterias *Streptococcus mutans*, *S. oralis* y *S. sanguinis*, se utilizaron conservadas en glicerol a  $-64^\circ\text{C}$ . Cada una de estas bacterias se incubó por 24 h, en caldo BHI para reactivar las cepas, después se resembraron en caldo BHI, y se incubaron por 4 horas, posteriormente la suspensión de células se ajustó a una concentración de  $1 \times 10^6$  UFC/mL. Posteriormente se agregó medio de cultivo con 1% de sacarosa (80  $\mu\text{L}$ ). Para la realización del bioensayo en cada pozo se colocó el medio de cultivo, (BHI) (80  $\mu\text{L}$ ) y en el primer canal se adicionaron las sustancias de prueba a partir de las cuales se realizaron diluciones seriadas (2-0.01563 mg/mL). Posteriormente se adicionó  $1 \times 10^6$  UFC/mL de microorganismo de prueba (20  $\mu\text{L}$ ). Las CMIs se determinaron por duplicado.

Finalmente las placas fueron incubadas durante 24 horas a  $37^\circ\text{C}$  en una incubadora Symphony VWR 98000-362. En el Cuadro 6 se muestran los controles utilizados para el ensayo biológico.

Cuadro 7. Controles para el ensayo biológico

Control	Medio de cultivo	Sustancia de prueba	Condiciones
<b>Control de disolvente*</b>	Con inóculo	-	37°C
<b>Control negativo</b>	Con inóculo	-	37°C
<b>Blanco</b>	Sin inóculo	-	37°C
<b>Control positivo</b>	Con inóculo	Gluconato de clorhexidina (CHX) al 0.12%	37°C

\* El disolvente utilizado fue H<sub>2</sub>O: DMSO (95:5)

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

### 5.3.3 Inhibición de la formación de biocapa por *Streptococcus mutans*.

El ensayo se realizó en una placa de 96 pozos, en donde se agregaron 100  $\mu$ L del caldo BHI, posteriormente, se adicionaron 100  $\mu$ L del extracto metanólico y de sus fracciones activas de prueba (I y IV) y se realizaron las diluciones seriadas. Como paso siguiente se adicionaron 80  $\mu$ L de medio BHI enriquecido con 1 % de glucosa y finalmente 20  $\mu$ L de la suspensión bacteriana ( $1 \times 10^6$  UFC/mL). En la Figura 10 se resume la distribución de las sustancias probadas en el bioensayo.

La placa de 96 pozos se incubó en condiciones aerobias a 37 °C por 72 h. Posteriormente, la formación de las biocapas se cuantificó mediante la metodología de Hwang y Rukayadi (2006), en la cual después de las 72 h, la placa se lavó con agua desionizada con la finalidad de eliminar las bacterias que no se adhirieron y después de ello, se eliminó el agua; a continuación se agregaron 100  $\mu$ L de etanol en cada pozo (95 %) para que las bacterias que se adhirieron se fijaran y se dejaron secar a temperatura ambiente en una corriente de aire. Inmediatamente, se añadieron 200  $\mu$ L de cristal violeta (0.4 %) a cada pozo con la

## DESARROLLO EXPERIMENTAL

finalidad de teñir a las bacterias y se incubó a temperatura ambiente por 45 min; una vez transcurrido ese tiempo, la placa se lavó con agua desionizada y se agregaron 200  $\mu$ L de etanol dejándola reposar otros 45 min, posterior al tiempo establecido se tomaron 100  $\mu$ L de cada pozo y se transfirieron a una placa de 96 pozos para leer su absorbancia a 565 nm con un lector de placas. Se utilizó como control positivo 80  $\mu$ L de gluconato de clorhexidina (CHX) al 0.12 % y como control negativo el inóculo de la cepa sin tratamiento.

Se considera que el 100 % de adhesión corresponde a la absorbancia de los pozos con la bacteria sin tratamiento y con base en los resultados de la absorbancia de los pozos con tratamiento se calcularon los porcentajes de inhibición de cada extracto.

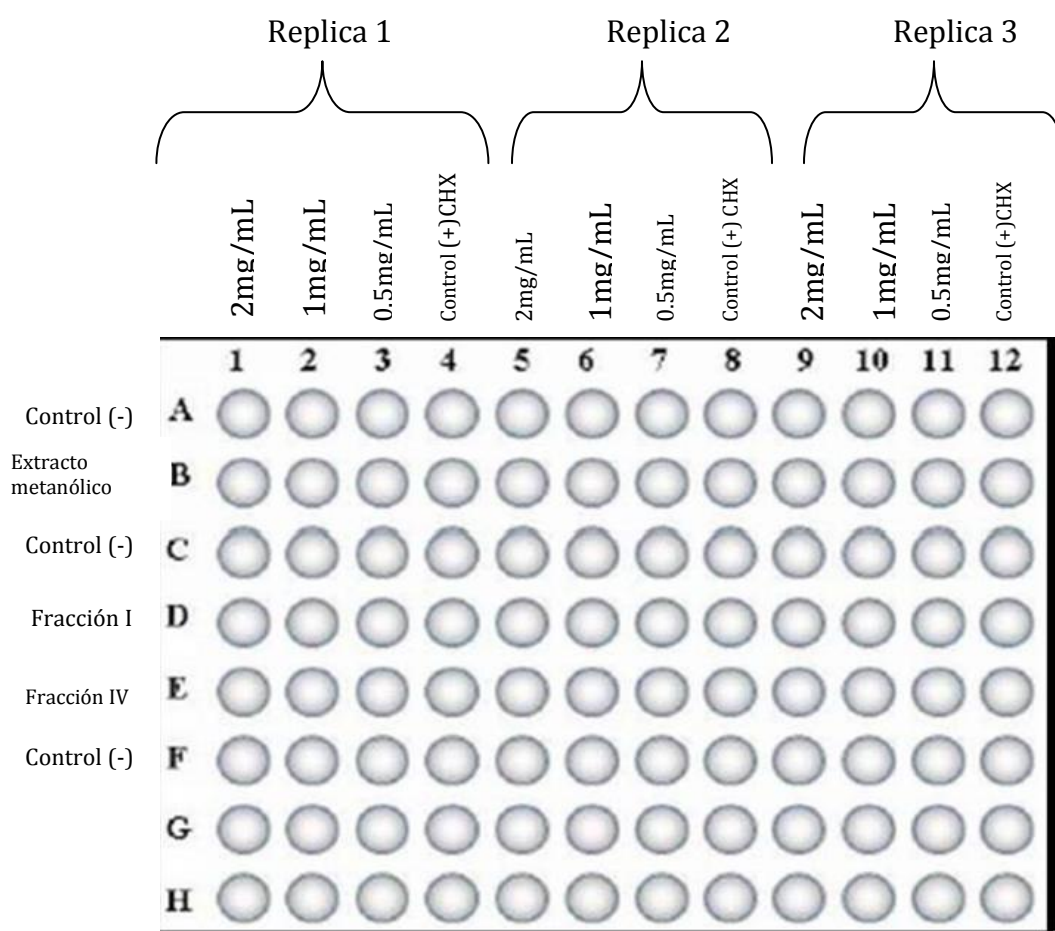


Figura 10. Esquema de la placa utilizada en el ensayo de la inhibición de la biocapa.

### 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

La selección de la especie *Tagetes patula* se realizó considerando su amplio uso en la medicina tradicional, para tratamiento de afecciones de etiología bacteriana, tratamiento de heridas, fiebre y trastornos hepáticos (Farjana, 2009). Considerando los resultados biológicos obtenidos durante este estudio hace más interesante la elección de esta especie como objeto de estudio, también abre una amplia gama de perspectivas para la obtención de nuevos principios activos.

Las partes aéreas de la cincoyaga se extrajeron utilizando un método de infusión. El extracto obtenido se fraccionó utilizando Amberlita XAD-16. Posteriormente, los componentes adsorbidos en la resina se recuperaron utilizando metanol como disolvente. Como resultado de este proceso se obtuvieron 67.5 g de un sólido de color ámbar.

#### 6.1 Concentración de flavonoides totales presentes en el extracto metanólico total de la cincoyaga.

El contenido de flavonoides totales se determinó mediante el método de Kumazawa, los resultados obtenidos indican que el extracto metanólico posee una concentración de flavonoides de 222.87 mg equivalentes a Quercetina/g extracto. Es importante destacar que en el cuerpo humano, la contribución de los flavonoides al sistema de defensa antioxidante es sustancial ya que el consumo diario de flavonoides puede estar entre 50 y 800 mg; este consumo es alto comparado con el promedio del consumo de vitamina C (70 mg), vitamina E (10mg) o carotenoides (2 mg) (Peterson, 2000). Por otra parte, es importante destacar que la cincoyaga también presenta un mayor contenido de flavonoides totales que *Tagetes erecta* L. Esta especie contiene de 97 mg RE/g (Ying Gong, 2011).



### **6.2 Concentración de fenoles totales presentes en el extracto metanólico.**

La determinación de la cantidad de fenoles totales presentes en el extracto derivado de la cincoyaga se realizó utilizando el método de Folin-Ciocalteu, el cual es considerado como uno de los mejores y más antiguos métodos para determinar el potencial antioxidante en productos naturales (Prior *et al.*, 2005).

Como resultado del proceso se encontró que el extracto metanólico de la cincoyaga contiene compuestos fenólicos en cantidades significativas.

Al comparar el contenido de fenoles totales del extracto metanólico total de la cincoyaga (226.24 mg AG/g extracto) con los contenidos descritos en la literatura para bebidas y frutos con reconocida actividad antioxidante y alto contenido de fenoles totales, se encuentra que el extracto metanólico de la cincoyaga, presenta un mayor contenido de fenoles totales que la cascara de uva roja (106 mg AG/ g muestra), el té negro (194.1 mg AG/L muestra) (Chavez *et al.*, 2002).

### **6.3 Evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto metanólico y de sus fracciones secundarias de la cincoyaga.**

Con el objeto de evaluar la actividad antimicrobiana del extracto metanólico y de las fracciones secundarias del extracto de la especie *Tagetes patula*, se diseñó un experimento en el que se evalúa la capacidad del extracto metanólico y de las fracciones para inhibir el crecimiento de un panel de bacterias de la cavidad oral utilizando el método de microdilución en placa. El control positivo que se utilizó fue el gluconato de clorhexidina. Este compuesto pertenece al grupo de las biguanidas y es un antimicrobiano antiséptico muy utilizado, de amplio espectro y es activo en técnicas *in vitro* contra un gran número de bacterias (Martínez *et al.*, 1998; Nolasco, 2011). El gluconato de clorhexidina es especialmente eficaz frente a estreptococos del grupo mutans, estreptococos simples, *Selenomonas sp* y *Propionibacterium sp*, en concentraciones elevadas suele ser bactericida y en concentraciones bajas, bacteriostático (Nolasco, 2011).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este estudio se evaluó el efecto inhibitorio de crecimiento de bacterias del extracto metanólico de las partes aéreas de *Tagetes patula* y de las fracciones secundarias derivadas del extracto sobre bacterias de la cavidad oral (*S. mutans*, *S. sanguinis* y *S. oralis*). Los resultados resumidos en los Cuadros 7 y 8 muestran que el crecimiento de todas las bacterias evaluadas fue inhibido por el extracto metanólico con CMI's en un rango de 1 a 2 mg/mL. Para las bacterias *Streptococcus sanguinis* y *S. mutans* las CMI's fueron de 2 mg/mL. Si bien estas concentraciones son consideradas altas, en artículos recientes se describe que los extractos con actividades por encima de 1 mg/mL pueden ser una fuente prometedora de compuestos activos, un ejemplo es descrito en el artículo "Minimum inhibitory concentrations of medicinal plants used in Northern Peru as antibacterial remedies" en el cual se reporta una CMI de 64 mg/mL para un extracto acuoso de *Tagetes erecta* sobre *Staphylococcus aureus* (Bussman *et al*, 2010).

Posteriormente, se realizó un fraccionamiento primario utilizando Amberlita XAD-16. El resultado de este proceso permitió la obtención de 3 fracciones que se combinaron por similitud cromatográfica.

Las fracciones combinadas se recromatografiaron en una columna a presión reducida, como fase estacionaria silica gel y como eluyente mezclas de acetato de etilo-metanol (Cuadro 6). Como resultado de este proceso se obtuvieron 16 fracciones combinadas (Cuadro 9). Estas fracciones se evaluaron para conocer su efecto sobre el crecimiento de las bacterias *Streptococcus mutans*, *S.oralis* y *S. sanguinis*. Los resultados indican que las fracciones tuvieron CMI's en un rango de 0.25-2.0 mg/mL. La fracción I presentó CMI más baja sobre *Streptococcus oralis* con 0.25 mg/mL, seguida de las CMI's de 0.5 y 2.0 mg/mL obtenidas para las bacterias *S. sanguinis* y *S. mutans*, respectivamente. La fracción IV presentó la mejor CMI sobre la bacteria *S. oralis* (1 mg/mL) seguida de las bacterias *S. mutans* y *S. sanguinis* con un valor de 2 mg/mL, respectivamente.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cuadro 8. Evaluación de la actividad antibacteriana del extracto metanólico total de las partes aéreas de *Tagetes patula*.

Bacteria de prueba	CMI (mg/mL)
<b><i>Streptococcus mutans</i></b>	2.0
<b><i>Streptococcus sanguinis</i></b>	2.0
<b><i>Streptococcus oralis</i></b>	1.0

CMI: concentración mínima inhibitoria. Se utilizó gluconato de clorhexidina como control positivo.

Cuadro 9. Evaluación de la actividad antibacteriana del fraccionamiento secundario del extracto metanólico total de las partes aéreas de *Tagetes patula*.

Fracción	<b><i>Streptococcus mutans</i></b> (mg/mL)	<b><i>Streptococcus sanguinis</i></b> (mg/mL)	<b><i>Streptococcus oralis</i></b> (mg/mL)
I	2.0	0.5	0.25
II	2.0	<2.0	2.0
III	2.0	<2.0	2.0
IV	2.0	2.0	1.0
V	2.0	2.0	2.0
CHX	0.31	0.64	0.64

CMI: Concentración mínima inhibitoria. Se utilizó gluconato de clorhexidina como control positivo.

### 6.4. Aislamiento de la patuletina a partir de la fracción F-I.

El fraccionamiento secundario permitió el aislamiento de la patuletina a partir de la fracción que presentó una mayor actividad biológica (F-1) la cual se monitoreo por cromatografía en capa fina presentando una mayor cantidad de compuestos.

Este flavonoide glicosilado ha sido aislado a partir de *Eriocaulon buergerianum*, y se determino la concentración mínima inhibitoria evaluada sobre el crecimiento de *Staphilococcus aureus* obteniendo una CMI de 64 µg/mL (Jing-Jing, 2007). Otras investigaciones han revelado que la patuletina presenta actividad antiespasmódica (Iwu, 1993).

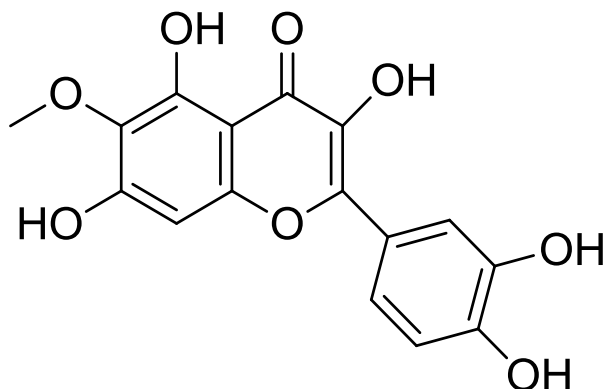


Figura 11. Estructura química de la patuletina 2-(3,4-dihidroxifenil)-3,5,7-trihidroxi-6-metoxicromen-4-ona (Iwu, 1993).

#### 6.4 Inhibición de la formación de biocapa por *Streptococcus mutans*.

La etiología de la caries se encuentra bien establecida y la colonización bacteriana es un paso importante para las enfermedades de la cavidad oral, dando lugar a la formación de las biocapas (Nishimura *et al.*, 2012).

*Streptococcus mutans* es considerada como la bacteria responsable de las caries dentales debido a sus propiedades acidogénicas junto con su capacidad para sintetizar glucanos extracelulares a partir de sacarosa catalizada por GTFs (Marsh & Bradshaw, 1995).

Como se mencionó anteriormente, la determinación del efecto sobre la formación de la biocapa por la especie *S. mutans* se realizó siguiendo la metodología de Hwang & Rukayadi (2006). En este método se consideró como el 100 % de adhesión a la medida de absorbancia del carril sin tratamiento, y con base en este resultado se calcularon los porcentajes de inhibición para los extractos de prueba. Por último, es importante destacar que se evaluó el extracto metanólico total y sus

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

fracciones activas (I y IV) las cuales mostraron tener actividad biológica para el ensayo de CMI.

Como resultado de este ensayo, se obtuvo que, para el extracto metanólico de la cincoyaga el porcentaje de inhibición de la biocapa fue de  $27.646 \pm 1.242$  % a una concentración de 1 mg/mL; para el caso de la fracción I, la inhibición con 0.5 mg/mL fue de  $51.051 \pm 2.099$  %; en tanto que para la fracción IV fue de  $25.687 \pm 0.701$  % a una concentración de 1 mg/mL. Estos resultados son comparables a los reportados por Koo y colaboradores (2002) cuando se evaluó el efecto de propóleos recolectados en Brasil sobre la formación de biocapas por *S. mutans*.

## CONCLUSIONES

### 7. CONCLUSIONES

El contenido de flavonoides y fenoles totales del extracto metanólico de la cincoyaga fue de 222.87 mg EQ/g extracto y 226.24 mg eq. AG/g, respectivamente.

La fracción metanólica derivada del fraccionamiento primario utilizando Amberlita XAD-16 tuvo una moderada actividad contra las bacterias ensayadas. La bacteria *S. oralis* presentó una CMI de 1 mg/mL en tanto que *S. mutans* y *S. sanguinis* tuvieron una concentración mayor al límite de 2 mg/mL.

La fracción I derivada del fraccionamiento secundario demostró una potente actividad antibacteriana con CMI de 0.5 mg/mL para *Streptococcus sanguinis* y 0.25 mg/mL. Por otra parte, la fracción IV tuvo una CMI de 1 mg/mL contra *Streptococcus oralis*.

El estudio químico de la infusión de la cincoyaga permitió el aislamiento de la patuletina con una CMI de 0.5 mg/mL para *Streptococcus oralis* y 0.25 mg/mL para *S. sanguinis*.

El extracto metanólico de la cincoyaga demostró una excelente actividad inhibidora de formación de la biocapa mono especie de *S. mutans* con un porcentaje de  $27.646 \pm 1.242$  %, la fracción I de  $51.051 \pm 2.099$  % y la fracción IV de  $25.687 \pm 0.701$  %. La inhibición de la formación de biocapas por el extracto y las fracciones derivadas de la cincoyaga es comparable a la del control positivo gluconato de clorhexidina ( $17.890 \pm 0.12$  %).

## 8. PERSPECTIVAS

- Realizar la purificación de las fracciones restantes para obtener compuestos puros minoritarios y realizar su elucidación estructural empleando técnicas espectroscópicas estructurales.
- Evaluar las fracciones obtenidas a partir de las partes aéreas de la especie *Tagetes patula* para determinar su efecto sobre el crecimiento de las principales bacterias causantes de enfermedades del tracto gastrointestinal.
- Evaluar otras actividades biológicas, como antioxidante o antifúngica, de esta especie, tomando en cuenta el estudio presente.
- Realizar estudios de los principales compuestos presentes en las fracciones de *Tagetes patula* sobre la contracción y relajación del intestino delgado en un modelo animal.

**9. BIBLIOGRAFÍA.**

1. Arnason J.T., Swain T., Wat C.K., Graham E.A. (1981). **Mosquito larvicides from polyacetylenes occurring naturally in Asteraceae biochem. Syst Ecol.** Pp. 63-68.
2. Amoros, M., Simoes, C.M.O., Girre, L., et al. (1992). **Synergistic Effect Of Flavones And Flavonols Against Herpes Simplex Virus Type 1 In Cell Culture. Comparison With The Antiviral Activity Of Propolis.** J. of Natural Products. P.1732-1740.
3. Argueta, A. (2009) **Atlas de las plantas de la Medicina Tradicional Mexicana,**
4. Instituto Nacional Indigenista, México. Versión digital, <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx>. Consultada el 20 de enero 2014.
5. Berdonces José Luis (1996). **Gran enciclopedia de las plantas medicinales,** universidad de Barcelona, ed: océano pp. 138
6. Biblioteca de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009, recuperado el 20 de enero de 2014 de <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx>
7. Bruneton, J. (2002). **Farmacognosia Plantas Medicinales.** 2ªEd, España. Pp. 306-341.
8. Buchbauer et al, e.g.Buchbauer et al, (1993).**Therapeutic properties of essential oils and fragrances.** Chap.12 in Teranishi,R, Buttery,R.G and Sugisawa,H. Eds. Bioactive Volatile Compounds from Plants. ACS Symposium Series 525. Amer. Chem. Soc., Washington DC.
9. Bussman R. W., Glenn A., Sharon D., Ghait G., Díaz D., Kuhlman A., (2010). **Minimum inhibitory concentrations of medicinal plants used in Northern Peru as antibacterial remedies.** Missouri Botanical Garden, San Diego State University. Journal of Ethnopharmacology. Vol. 132. Pp: 101-108.
- 10.Chaves, M. G., Maiocchi, M. G., Sgropo, S. C., Avanza, J. R. (2002) **Actividad antioxidante de infusiones de yerba mate (*Ilex paraguariensis* st. Hil.),** Información Tecnológica, España, 13(2):4.



## BIBLIOGRAFÍA

11. Cortez-Gallardo, V., Macedo- Ceja, J.P., Hernández-Arrollo, M., Artega-Aureoles, G., Esponisa-Galván, D., Rodríguez-Landa, J.F., **Farmacognosia: Breve historia de sus orígenes y su relación con las ciencias médicas**, Rev. Biomed. 2004,15, pp.123-136.
12. Department of Plant Science South Dakota State University, consultado en el mes de enero del 2014. <http://www.sdstate.edu/ps/>.
13. DIAZ, Carolina, (2011). **Adherencia y colonización de Pseudomonas fluorescens sobre sustratos sólidos: influencia de la topografía y composición química de la superficie**. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas.
14. Duke, J. (2009). **USDA Phytochemical and Ethnobotanical databases**. [http:// www.ars-grin.gov/duke/plants.html](http://www.ars-grin.gov/duke/plants.html). Consultado en el mes de enero del año 2014.
15. Estrella Pedrola I. (2004). **Polifenoles y sus propiedades antioxidantes**. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Universidad Complutense Madrid.
16. Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos (FHEUM) (2001) México. SSA. pp15.
17. Farjana, N., Rowshanul, H. M., Zahangir, A. S., Rezaul, M. K., Apurba, K. R., Shahriar. **Toxicological evaluation of chloroform fraction of flower of Tagetes erecta Linn. On rats**. 2009, 161-165.
18. Garzón C. (2006). **Análisis bromatológicos y fitoquímicos básicos de las especies priorizadas dentro del marco del proyecto "Uso sostenible de los recursos vegetales del D.C. y la región"**. Jardín Botánico José Celestino Mutis-Subdirección Científica. Bogotá, 133p.
19. Ghani, A. (1998) **Medicinal plants of Bangladesh. Chemical constituents and uses, 2nd ed., Asiatic Society of Bangladesh, Dhaka**, 1998, 301-302.
20. Guzmán, A. y Manjarrez, A. (1962). **El estudio del aceite esencial de Tagetes florida**. Boletín del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México. Vol. (14): 48-54.

## BIBLIOGRAFÍA

21. Harbone, J. B., et al (1975). **The flavonoids (part 2)**. Pp. 159-161, 693-696.
22. Hernández, Francisco, **Historia Natural de Nueva España**, t. II, vol. I. UNAM. México, 1959.
23. Hwang, K. & Rukayadi, Y. (2006). **In vitro activity of xanthorrhizol against *Streptococcus mutans* biofilms**. *Letters in Applied Microbiology*, 42: 400-404.
24. Ichikawa, K., et al. 1991. **Isolation and Structure Determination of Aldose Reductase Inhibitors from Traditional Thai Medicine, and Syntheses of Their Derivatives**. *Sankyo Kenkyusho Nempo*, 43: 99-110.
25. Iglesias-Neira, J. (2009) ***Diseño de ingredientes antioxidantes de origen natural y su aplicación en la estabilización de productos derivados de la pesca***, Tesis Doctorado, Universidad Santiago de Compostela.
26. Iwu, M.M. (1993). **Handbook of African Medicinal Plants**. CRC Press, Boca Raton, FL. P. 435.
27. Jacobson, M. (1990). **Glossary of plant-derived insect deterrents**, CRC press, Boca Raton, FL, 1990. P. 213.
28. Jeffery B. Harborne and H. Baxter, eds. 1983. **Phytochemical Dictionary. A Handbook of Bioactive Compounds from Plants**. Taylor & Frost, London. P. 791.
29. Jiménez Martínez K. (2013). **Estudio químico y actividad antimicrobiana de la infusión de *Tagetes lucida cav.*** UNAM
30. Jing-Jing Fang, Guan Ye, Wen-Liang Chen, Wei-Min Zhao (2007). **Antibacterial phenolic components from *Eriocaulon buergerianum***. Central Research Institute of Shanghai Pharmaceutical Group, Shanghai 201203, China. Shanghai Institute of Materia Medica, Shanghai Institutes for Biological China.
31. Karousou, D., Koureas, D. N. y Kokkini, S. (2005). **Essential oil composition is related to the natural habitats: *Coridothymus capitatus* and *Satureja thymbra***. In *Natura 2000 Sites of Crete*. *Phytochemistry*. P. 2668-2673.

## BIBLIOGRAFÍA

32. Kolenbrander, P.E. (2002) *et a.*, **Communication among oral bacteria.** *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66, 486-505.
33. Koo, H., Cury, J., Rosalen, P., Ambrosano, G., Ikegaki, M., Park, Y. (2002). **Effect of a mouthrinse containing selected propolis on 3-day dental plaque accumulation and polysaccharide formation.** *Caries Research*, 36: 445-448.
34. Koul O., y Dev S., **Insecticides of natural origin.** Copyright 1997. OPA (overseas Publishers Association) Amsterdam B. V. Published in The Netherlands by Harwood Academic Publishers.
35. Li, Y. Q., et al (1996). **Studies on the structure of isoostelbin.** 31(10): 761-763.
36. Linares, E. y Bye R. (2006). **Las plantas ornamentales en la obra de Francisco Hernández: “21 preguntador del rey”.** *Arqueología Mexicana (Las Flores en el México Prehispánico) XIII.* P. 48-57.
37. Macías, A. F. y Galindo C. G. J. (2001). **Terpenoides alelopáticos: estructura, actividad y aplicaciones.** En: Anaya A. L., Espinoza G. F. J. y Cruz O. R. **Relaciones químicas entre organismos. Aspectos básicos y perspectivas.** Instituto de Ecología. Plaza Valdés S.A. de C.V. México D.F. P. 137-161.
38. Manach, C.; Scalbert, A.; Morand, C.; Remesy, C.; Jimenez, L. (2004). **Polyphenols: food sources and bioavailability.** *American Journal for Clinical Nutrition*, 79:727–47.
39. Maradufu, A., Lubega R. y F.Dorn. (1978). **Isolation of (5e)-ocimenone, a mosquito larvicide from *Tagetes minuta*.** *Lloydia (Cinnci).* Pp. 181-183.
40. Mares D; B. Tosi, F. Poli, E. Andreotti, C. Romagnoli (2004). **Antifungal activity of *Tagetes patula* extracts on some phytopathogenic fungi: ultrastructural evidence on *Pythium ultimum*.** Department of Natural and Cultural Resources, University of Ferrara, C.so Porta Mare 2, I-44100 Ferrara, Italy.

## BIBLIOGRAFÍA

41. Marotti, M; Piccaglia, R; Biavati, B; and Marotti, I. (2004). **Characterization and yield evaluation of essential oils from different *Tagetes* species.** Journal of Essential Oil Research. Vol. 16(5): 440-444.
42. Marsh, P. D. & Bradshaw, D. J. (1995). **Dental plaque as a biofilm.** Journal of Industrial Microbiology, 15: 169-175.
43. Martínez M., Sánchez G., Martín P., Martín R. E., Daza R. M. Mendaza P., Potrero F. (1998). **Sensitivity to quinolones and ampicilin in salmonella spp.** Enfermedades Infecciosas y Microbiología clínica. Vol. 16 (8): 389.
44. Montúfar, Aurora, Leonardo López Luján y Jaime Torres (2003). **Los materiales constructivos del Templo Mayor de Tenochtitlan, *Estudios de Cultura Náhuatl*,** p. 137-166.
45. Negroni, M. (2009) **Microbiología Estomatológica,** Ed. Médica Panamericana, pp. 276.
46. Newall, C. A., Anderson, L. A. and Phillipson, J. D. 1996. **Herbal Medicine - A Guide for Health-care Professionals.** The Pharmaceutical Press, London. P. 296.
47. Nigg, H.N. and Seigler, D.S., eds. 1992. **Phytochemical Resources for Medicine and Agriculture.** Plenum Press, New York. P. 445.
48. Nishimura, J., Saito, T., Yoneyama, H., Bai, L., Okumura, K., Isogai, E. (2012). **Biofilm Formation by Streptococcus mutans and Related Bacteria.** Advances in Microbiology, 2: 208-215.
49. Nolasco Herrera H., (2011). **Gluconato de clorhexidina al 0.12%.** Odontología Moderna.
50. Om Prakash, P.K. Rout, C.S. Chanotiya, L.N. Misra (2012). **Composition of essential oil, concrete, absolute and SPME analysis of *Tagetes patula capitula*.** Chemical Science Division, CSIR-Central Institute of Medicinal and Aromatic Plants, Lucknow, Uttar Pradesh 226015, India.
51. OMS, a través del sitio en internet <http://www.who.int>, Consultada el 20 de enero 2014.
52. Palma-Cárdenas, A. & Sánchez-Aguilera, F. (2007) **Técnicas de ayuda odontológica y estomatológica,** Editorial Paraninfo, pp. 154.

## BIBLIOGRAFÍA

53. Perich MJ, Wells C, Bertsch W, Tredway KE (1994). **Isolation of the insecticidal components of *Tagetes minuta* (Compositae) against mosquito larvae and adults.** J Am Mosq Control Ass: 307-310.
54. Peterson J., Dwyer J., (2000). **Flavonoids: dietary occurrence and biochemical activity.** Tektran, United States Department of Agriculture, September, 2000 visitado en enero, de 2014. Disponible en <http://www.nal.usda.gov/ttic/tektran/data/000011/50/0000115068.html>.
55. Prior, R. L.; Wu, X.; Schaich, K. (2005) **Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements**, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53:4290-4302.
56. Prochazkova, D.; Bous\_ova, I.; Wilhelmova, N. (2011) **Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids**, Fitoterapia, 82:513–523.
57. Quattrocchi Umberto (1999) **World Dictionary of plant names** ed: CRC Press pp. 2624,2625.
58. Quiñones, M.; Miguel, M.; Aleixandre, A. (2012). **Los polifenóles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular.** Nutrición Hospitalaria, 27(1):76-89.
59. Raspall, G. (2006) **Cirugía Oral e Implantología**, Ed. Medica Panamericana, pp.290.
60. Rojas-Alba, Mario (2010) **Herbolaria y Medicina Tradicional Mexicana**, Diplomado de Tlahui-Educa, Xalapa, Veracruz, México, 17 de Julio del 2010.
61. Ross, S.A., El-Keltawi, N.E., Megalla, S.E. 1981. **Antimicrobial activity of some egyptian aromatic plants. Fitoterapia.** 201–205.
62. Rukunga, G. and Simons, A. J. (2006). **The Potential of Plants as a Source of Antimalarial Agents - A Review. Africa Herbal Antimalaria Meeting.** Planta Phile Publications, Berlin. 72 pp.
63. Rzedowski, G. C. de, J. Rzedowski y colaboradores, (2001). **Flora fanerogámica del valle de México.** 2a ed. Instituto de Ecología y Comisión

## BIBLIOGRAFÍA

- Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Pátzcuaro, Michoacán, México.
64. Sacyl (2006). **Higienistas Dentales**, Servicio de salud de Castilla y León MAD-Eduforma, pp. 20.
65. Sahagún, fray Bernardino de, (1999). **Historia General de las Cosas de la**
66. **Nueva España**, Ángel Ma. Caribay K. (ed.), Editorial Porrúa, México, 1969; CONACULTA/Alianza Editorial, Cien de México, 2 vols., ed., glos. y not. de Alfredo López Austin y Josefina García Q., México.
67. Santa Cruz, C. (2005). **Extracción a nivel de laboratorio de aceite esencial crudo de pericón (*Tagetes lucida cav.*), y utilización del desecho sólido para la extracción del colorante natural, para su uso en el teñido de fibras naturales. (Tesis)**. Guatemala Facultad de Ingeniería. Escuela de ingeniería Química. Universidad de San Carlos Guatemala.
68. Sepa (2009). **Manual De Higiene Bucal**, Ed. Medica Panamericana, pp. 25.
69. Serrato Cruz M. A. (2009). **Recopilación y análisis de la información existente de las especies de las que México es centro de origen y diversidad genética. Información documental sobre el taxa de *Tagetes* para dimensionar su centro de origen y diversidad genética en México**. Departamento de Fitotecnia Universidad Chapingo. P.7, 19 y 20.
70. Serrato, C. M. A., y Quijano M. L. (2003). **Memorias I simposio internacional y II reunión Nacional sobre agricultura sostenible: importancia y contribución de la agricultura tradicional**. Comisión de Estudios Ambientales y Centro de Enseñanza, Investigación y Capacitación para el Desarrollo Agrícola Regional (CEICADAR, Puebla), del Colegio de Posgraduados. México. P. 228-238.
71. Shaheen Faizi, Humaira Siddiqi, Samina Bano, Aneela Naz, Lubna, Khalida Mazhar, Saima Nasim, Tasneem Riaz, Saira Kamal, Aqeel Ahmad, y Shakeel Ahmed Khan. (2008). **Antibacterial and Antifungal Activities of Different Parts of *Tagetes patula*: Preparation of Patuletin Derivatives**. International Centre for Chemical and Biological Sciences, HEJ Research

## BIBLIOGRAFÍA

- Institute of Chemistry, University of Karachi, Karachi, Pakistan; Department of Microbiology, University of Karachi, Karachi, Pakistan.
72. Singleton, V.L., et al. (1981). **Naturally occurring food toxicants: phenolic substances of plant origin common in foods** 27: 149-342.
73. Tan, G.T., Pezzuto, J.M., Kinghorn, A.D., Hughes, S.H. (1991). **Evaluation Of Natural Products As Inhibitors Of Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) Reverse Transcriptase**. Journal of Natural Products, p. 143-154.
74. Tereschuk, M., Baigori, M., Abdala, L. **Antibacterial activity of *Tagetes terniflora*. *Fitoterapia* 2003, 404-406.**
75. Torkelson Anthony R. (1996) **Medicinal Plants** ed: CRC press. Pp. 1274, 1275.
76. Törrönen, R. (1997). **Flavonoid and phenolic acids in selected berries**. 114 (1-2): 191-192.
77. Vermerris W, Nicholson R (2006) **Phenolic Compound Biochemistry**. USA: Springer. Nueva York, EEUU. Pp. 3-16, 151-153.
78. Villarreal, J. a. 2003. Compositae. Tribu *Tagetae*. En: Rzedowski, G.C. de y J. Rzedowski (eds). **Flora del Bajío y regiones adyacentes**. Fascículo 113. Instituto de Ecología-Centro Regional del Bajío. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y Comición Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Pátzcuaro, Michoacán, México.
79. Williamson, E. M. and Evans, F. J., Potter's. (1989). **New Cyclopaedia of Botanical Drugs and Preparations**, Revised Ed., Saffron Walden, the C. W. Daniel Co., Ltd., Essex UK, 362 pp, 1988.
80. Yasukawa Ken y Yoshimasa Kasahara. (2013). **Effects of Flavonoids from French Marigold (Florets of *Tagetes patula* L.) on Acute Inflammation Model** School of Pharmacy, Nihon University, Chiba 274-8555, Japan The Yamagata Prefectural Institute of Public Health, Yamagata 990-0031, Japan.

## BIBLIOGRAFÍA

81. Ying Gong, Xuan Liu, Wen-Hao He, Hong-Gao Xu, Fang Yuan, Yan-Xiang Gao (2011). **Investigation into the antioxidant activity and chemical composition of alcoholic extracts from defatted marigold (*Tagetes erecta L.*) residue.** College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing China.